



# ***In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Endothelvorläuferzellen**

vorgelegt von  
Diplom-Ingenieur Jörg Frauenschuh

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing. -

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulf Stahl

Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Priv. Doz. Dr. Thomas Bunte

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 02.03.2006

Berlin 2006

D 83

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karl-Heinz Thierauch (Schering AG) für die freundliche Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die gute Betreuung der Doktorarbeit und die sehr hilfreichen Diskussionen. Zudem möchte ich der Schering AG für die finanzielle Unterstützung während dieser Promotionszeit danken.

Herrn Prof. Dr. Roland Lauster (Technische Universität Berlin) sowie Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Bunte (Schering AG) danke ich sehr für die Erstellung der Gutachten.

Weiterhin möchte ich mich bei Bianca Timpner und Melanie Wagener für die großartige Hilfe bei den Tierversuchen bedanken. Herrn Dr. Peter Hauff und Herrn Jens Jeschke danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des *in vivo* Imagings.

Ein herzliches Dankeschön für die anregenden Diskussionen und die nette Zeit gilt vor allem meinen Kollegen in der „AG Thierauch“ Kirstin Valdix und Sandra Zickelbein sowie Andrea Sturz, Fanny Knoth, Stefan Stargard, Dr. Olaf Schäfer, Dr. Manja Friese-Hamim, Dr. Florian Pühler, Dr. Heike Petrul, Dr. Rudolph Beier, und meinen Mitdoktoranden Jan Kunde, Stephen Gelling, Arn Tellmann, Julia Eschenbrenner, Michael Schneider, Alice Dittewig sowie dem gesamten Team der Abteilung Onkologie.

Ganz besonders danke ich meiner Frau Simone, meinen Eltern und meinen beiden Brüdern für ihre stete Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

<b>Danksagung</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hämatopoetische Stammzellen und Hämatopoese</b>	<b>2</b>
1.1.1 Der Hämangioblast	3
<b>1.2 Endothelvorläuferzellen</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Vaskulogenese und Angiogenese</b>	<b>6</b>
1.3.1 Tumorangiogenese	7
<b>1.4 Rolle der Endothelvorläuferzellen in der Angiogenese</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Isolation von Vorläuferzellen aus Blut</b>	<b>17</b>
2.1.1. Dichtegradienten-Zentrifugation	17
2.1.2 Isolation von AC133 positiven Zellen	18
<b>2.2 Semiquantitative Expressionsanalyse</b>	<b>19</b>
2.2.1 RNA Isolation	19
2.2.2 Messung der RNA-Konzentration	20
2.2.3 Reverse Transkription der mRNA	20
2.2.4 semi-quantitative RT-PCR (TaqMan®)	21
2.2.5 Affymetrix Chip Analyse	22
<b>2.3 Zellfärbung</b>	<b>23</b>
2.3.1 FACS Analyse	23
2.3.2 Beladung von Zellen mit Fluoreszenzreagenzien	24
2.3.2.1 Bestimmung der Toxizität von Calcein AM	24
2.3.2.2 Bestimmung der optimalen Fluoreszenzfarbstoffkonzentration	25
2.3.2.3 Markierung des Zellen mit Calcein AM	25
<b>2.4 Zellkultur</b>	<b>26</b>
2.4.1 Kulturbedingungen	26
2.4.2 Herstellung von Humanserum	27
<b>2.5 Tiermodelle</b>	<b>28</b>
2.5.1 Zucht des GFP-Mausstammes	28
2.5.2 Entnahme von Knochenmark aus dem Oberschenkel der Maus	28
2.5.3 Herstellung von Allotransplantaten in Mäusen	28

2.5.4 Injektion von humanen Zellen in tumortragende Nacktmäuse	29
2.5.5 <i>In vivo</i> Imaging von Mäusen	30
<b>2.6 Anfertigung von Gefrierschnitten aus Mausgewebe</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Immunhistochemie von Gefrierschnitten</b>	<b>31</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Isolation von humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnur- und adultem Blut</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Expressionsanalyse bestimmter Gene mit Hilfe der Real Time RT- PCR</b>	<b>34</b>
3.2.1 Genexpression in humanem adultem Blut	35
3.2.2 Expression in humanem Nabelschnurblut	37
3.2.3 Kultivierung der AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen in Kokultur mit verschiedenen Zelltypen	38
3.2.3.1 mRNA Expression bestimmter Gene in kultivierten AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen aus adultem Blut	39
3.2.3.2 mRNA Expression bestimmter Gene in AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut	40
<b>3.3 Affymetrix Chip Analyse der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen</b>	<b>41</b>
3.3.1 Vergleich der Ergebnisse aus der Taqman Analyse mit denen der Chip Analyse	42
3.3.2 Untersuchung des Verwandtschaftsgrades der AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit anderen Zelltypen	43
3.3.3. Analyse der differentiellen Genexpression von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit MVEC	44
3.3.4. Analyse der differentiellen Genexpression von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit PBMC	45
3.3.5 Analyse der differentiellen Genexpression von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit den Promyeloblastenzelllinien	47
3.3.6 Analyse der differentiellen Genexpression von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit Knochenmarkszellen	48
<b>3.4 Untersuchung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und der AC133<sup>-</sup>-PBMC auf die Expression von Oberflächenproteinen</b>	<b>48</b>
3.4.1 Oberflächencharakterisierung von isolierten Zellen aus humanem adultem Blut	49
3.4.2 Oberflächencharakterisierung von isolierten Zellen aus humanem Nabelschnurblut	52
<b>3.5 Einbau von markierten Zellen in Mausgewebe</b>	<b>54</b>
3.5.1 Dotierung von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen	54
3.5.2 Einbau von Calcein AM gefärbten Zellen in Mausgewebe	57
3.5.2.1 Applikation von AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen	57
3.5.2.2 Applikation von mikrovaskulären Endothelzellen	58
3.5.3 <i>In vivo</i> Imaging der mit eGFP Knochenmarkszellen behandelten Mäuse	62
3.5.4 Immunhistologische Untersuchung der mit eGFP Knochenmarkszellen behandelten Mäuse	64
<b>4. Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen</b>	<b>69</b>
<b>4.2 Expressionsanalyse auf Translationsebene mittels FACS Analyse</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene mittels real time RT- PCR</b>	<b>72</b>

---

<b>4.4 Analyse der Genexpression in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in der Kokultur mit unterschiedlichen Zellarten</b>	<b>73</b>
<b>4.5 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix</b>	<b>75</b>
<b>4.6 Einbau von humanen Zellen in Mausgewebe</b>	<b>79</b>
<b>4.7 Einbau von syngenen Knochenmarkszellen in Mausgewebe</b>	<b>81</b>
<b>5. Ausblick</b>	<b>85</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>Literatur</b>	<b>87</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>96</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>97</b>

## Abkürzungen

Ac-LDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
AmpErase® UNG	Uracil-N-glycosylase
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Calcein AM	Calcein Acetoxymethylester
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
CFDA SE	Carboxy-Fluoreszin-Diacetat Succinimidyl Ester
Cy3	Cyanin 3
dATP	2'-Desoxyadenin 5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin 5'-triphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanidin 5'-triphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosid 5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin 5'-triphosphate
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
Em	Emission
Ex	Extinktion
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FAM	5' fluoreszenz Reporter für Taqman
FCS	Foetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinethiocyanat
G	Gauge
g	Gravitation
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GITC	Guanidinisoethiocyanat
G-SCF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
HCl	Hydrogen chloride (Salzsäure)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure

---

i.c.	Intrakutan
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
i.v	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
M	Molar
MACS	Magnetic activated cell sorting (Magnetbeadisolation)
M-CSF	Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger ribonucleic acid (messenger Ribonukleinsäure)
MVEC	Microvascular endothelial cells (Mikrovaskuläre Endothelzellen)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (Periphere mononukläre Blutzellen)
PBS-	Phosphate buffered saline w/o Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> (Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> )
PCR	Polymerase chain reaction( Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
r.H.	Relative humidity (Relative Luftfeuchtigkeit)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Nukleinsäure)
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	Subkutan
SCF	Stem cell factor (Stammzellefaktor)
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Natriumchloridlösung)
Tris	Tris (-hydroxymethyl) –aminomethan
U	Units
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vWF	von Willebrand Faktor

## 1. Einleitung

Ruhende Stamm- und Vorläuferzellen verbleiben im menschlichen Körper im Knochenmark oder anderen Geweben. Zudem zirkulieren sie zum Teil im Blut und werden für die physiologische oder pathologische Geweberegeneration durch verschiedene Stimuli aktiviert (Asahara and Kawamoto, 2004). In den letzten Jahren haben viele Forscher eine große Zahl an Stamm- und Vorläuferzellen für unterschiedliche Zellarten gefunden, siehe hierzu Abbildung 1. Unter diesen Stamm- und Vorläuferzellen soll hier näher auf die Endothelvorläuferzellen (EPC) und deren Rolle bei der Angiogenese eingegangen werden. Mehrere Forschergruppen zeigten, dass Endothelvorläuferzellen bei pathologischen Prozessen aktiviert werden und vermehrt im Blut sowie in den Entzündungsherden zu finden sind. Es konnte festgestellt werden, dass EPC durch Herzinfarkt sowie bei starken Verbrennungen mobilisiert werden (Gill et al., 2001; Shintani et al., 2001). Takahashi et al. zeigten, dass Zytokin-induzierte EPC die Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe verstärkten (Takahashi et al., 1999). Neben der Rolle der EPC bei pathologischen Prozessen wie Herzinfarkt, Verbrennungen und Trauma wurde auch eine Rolle der Endothelvorläuferzellen bei der Tumorangio-genese postuliert, wie in Abschnitt 1.4 dargestellt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zahl der zirkulierenden Endothelvorläuferzellen und der zirkulierenden Endothelzellen im Blut mit dem Grad der Tumorangio-genese korrelieren (Shaked et al., 2005). Die Behandlung von Patienten mit Darmtumoren mit einem anti-VEGF Antikörper, der die Tumorangio-genese hemmt, verminderte die Zahl der zirkulierenden Endothelvorläuferzellen (Willett et al., 2004). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Endothelvorläuferzellen als mögliche Surrogatmarker für antiangiogene Therapien verwendet werden könnten. De Palma et al. nutzten EPC als Angiogenese-selektive Zielvektoren, die zytotoxische Gene trugen, wodurch die Tumorangio-genese gehemmt wurde (De Palma et al., 2003). In einem Tumormodell in der Maus konnte gezeigt werden, dass genetisch modifizierte EPC, die das Protein Thymidinkinase exprimierten, bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielten. Nach der Behandlung der Tiere mit Ganciclovir konnte eine signifikante Nekrotisierung des Tumors festgestellt werden (Ferrari et al., 2003). Diese und andere Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle der Endothelvorläuferzellen bei der Tumorangio-genese hin, und zeigen die klinische Bedeutung dieser Zellen bezüglich ihrer Verwendung als Vehikel oder als Surrogatmarker zur Therapiekontrolle auf.

Der Nachweis, dass endotheliale Vorläuferzellen eine direkte und wichtige Rolle bei der Tumorangio-genese spielen, konnte bisher nicht eindeutig erbracht werden. Auf Grund

dessen sollen in der vorliegenden Arbeit die Endothelvorläuferzellen genauer charakterisiert werden und ihr Einfluss bei der Angiogenese speziell der Tumorangiogenese weiter untersucht werden.

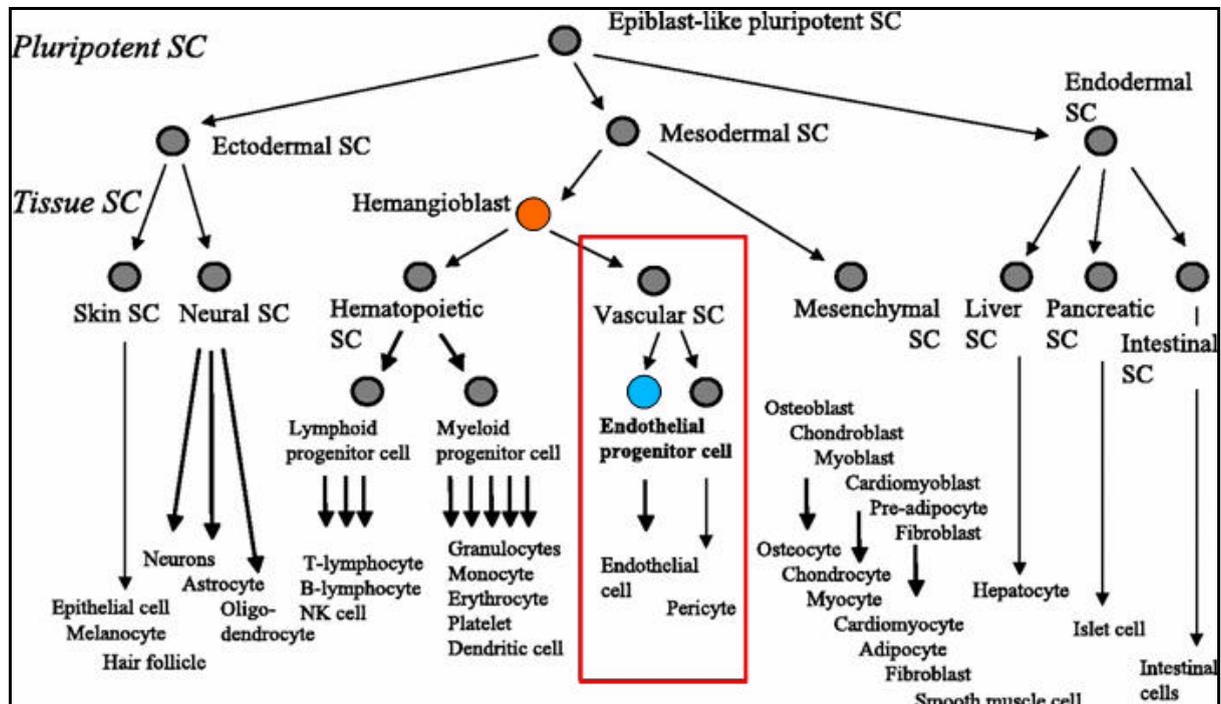


Abbildung 1: schematische Darstellung der postnatalen Stamm- und Vorläuferzellen. SC: stem cell (Asahara and Kawamoto, 2004).

### 1.1 Hämatopoetische Stammzellen und Hämatopoese

Hämatopoetische Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie sich asymmetrisch teilen, d.h. aus ihnen entsteht eine neue Stammzellen und eine Progenitorzelle (Vorläuferzelle). Aus der Vorläuferzelle können dann die verschiedenen Blutzelltypen differenzieren. Durch diesen Mechanismus der Selbsterneuerung und der gleichzeitigen Bildung von Vorläufer- und daraus resultierenden Effektorzellen ist es möglich die enorme Zahl an Zellen, die für die Bildung des Blutsystems notwendig sind, zu bilden. Im humanen adulten Organismus werden ca.  $10^{10}$  Erythrozyten und  $10^8$  bis  $10^9$  Leukozyten (Williams-DA 1995) pro Stunde produziert. Die hämatopoetischen Stammzellen befinden sich zum größten Teil im Knochenmark, in dem unter anderem auch mesenchymale Stammzellen nachweisbar sind.

### 1.1.1 Der Hämangioblast

Der erste Hinweis, dass Blut- und Endothelzellen aus einer gemeinsamen Ursprungszelle gebildet werden, wurde vor mehr als 80 Jahren von Sabin et al. (1920) formuliert. Es konnten in der frühen Phase der Entwicklung des Hühnerembryos die Entstehung von Blut- und Endothelzellen aus dem primitiven Mesoderm beobachtet werden. Risau und Flamme beschrieben 1995 die Bildung des vaskulären Systems im Säugerembryo (Risau and Flamme, 1995). Der erste Schritt zu einem vollständig ausgebildeten Blutgefäßsystem erfolgt im fötalen Dottersack durch die starke Proliferation von mesodermalen Zellen. Die mesodermalen Zellen lagern sich zu Blutinseln zusammen. Die peripheren Zellen dieser Inseln werden als Angioblasten und die Zellen im Inneren als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet. Aus den Angioblasten, die einige der charakteristischen Endothelzellmarker aufweisen, bilden sich im Verlauf der Embryonalentwicklung Endothelzellen, die dann die ersten Kapillargefäße auskleiden, siehe hierzu Abbildung 2 (Risau and Flamme, 1995).

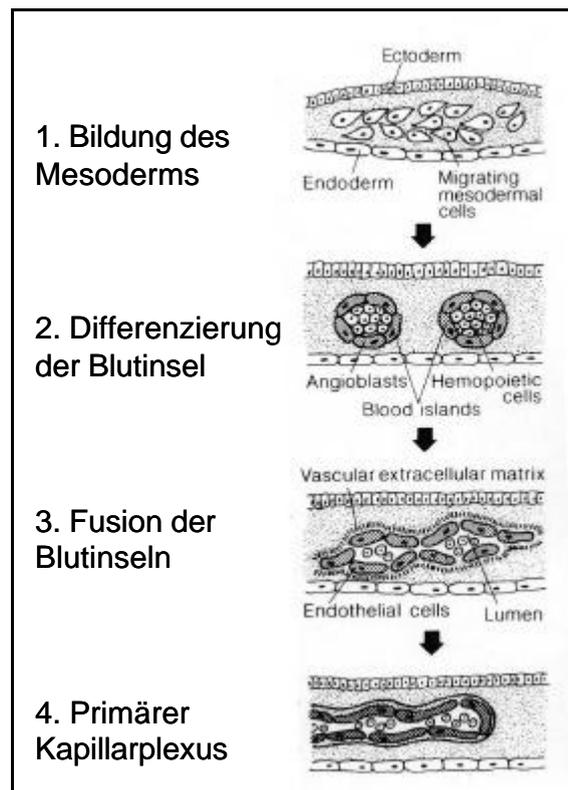


Abbildung 2: Bildung des Blutgefäßsystems im Embryo (Vasculogenese) (Risau and Flamme, 1995). Die Blutinseln entwickeln sich aus migrierenden und proliferierenden Mesodermzellen. Die äußeren Zellen der Blutinseln, die sog Angioblasten entwickeln sich zu Endothelzellen und die inneren zu Blutzellen. Die Blutinseln fusionieren und bilden die ersten Kapillargefäße im Embryo.

Die räumliche Nähe von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen legt die Hypothese nahe, dass beide Zellarten aus einem gemeinsamen Vorläufer gebildet werden, dem Hämangioblasten, siehe Abbildung 3. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass in Endothel- und hämatopoetischen Zellen eine Vielzahl der exprimierten Gene gleich sind. Beispielsweise die Tyrosinrezeptorkinasen Tie1, Tie2 und VEGFR-2 werden sowohl auf Endothelzellen als auch auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Yano et al., 1997). Das Oberflächenprotein CD34, das als Marker für Vorläuferzellen verwendet wird, wird auch in Endothelzellen exprimiert (Fina et al., 1990).

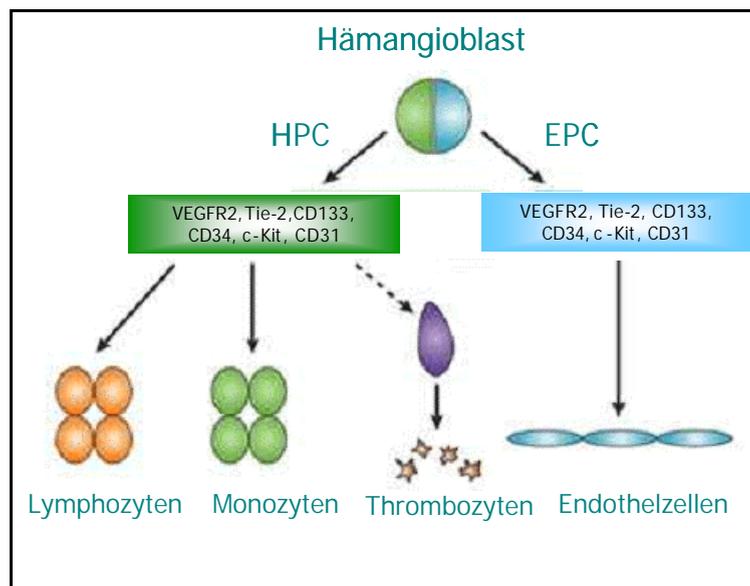


Abbildung 3: Der Hämangioblast als Vorläuferzelle von Endothel- und Blutzellen. Endothelvorläuferzellen (EPC) tragen zum größten Teil die selben Marker auf der Zelloberfläche wie hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC). Zudem weisen die differenzierten Zellen ebenfalls eine Vielzahl dieser Oberflächenproteine auf. Auf Grund dessen wird angenommen, dass ein gemeinsamer Vorläufer von Blut- und Endothelzellen existiert, der Hämangioblast. (Choi, 1998; Choi, 2002; Choi et al., 1998).

Des weiteren wird die Existenz des Hämangioblasten durch die Zebrafisch Mutante *cloche* unterstützt, bei der sowohl die Differenzierung von Endothelzellen als auch die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen durch ein Knock-out des Gens *cloche* verhindert wird (Stainier et al., 1995). *In vitro* konnte die These einer gemeinsamen Ursprungszelle durch die Bildung von „Embryoid Bodies“ aus embryonalen Stammzellen, die während ihrer Differenzierung entstehen, bestätigt werden (Keller, 1995). Bei den „Embryoid Bodies“ handelt es sich um dreidimensionale Strukturen embryonaler Stammzellen in denen verschiedene Zelltypen, wie neuronale Zellen, Muskelzellen, Endothelzellen und hämatopoetische Zellen ausdifferenzieren können (Keller et al., 1993; Nakano et al., 1994; Risau and Flamme, 1995; Wiles and Keller, 1991). Die Bildung von Endothel- und

hämatopoetischen Zellen innerhalb dieser „Embryoid Bodies“ spiegelt Aspekte der natürlichen Entwicklung im Dottersack wider. In den „Embryoid Bodies“ wurde eine bestimmte Zellart, die Blastkolonie bildenden Zellen (BL-CFC) nachgewiesen. Diese exprimieren unter anderem die Gene CD34 und VEGFR-2, die sowohl auf hämatopoetischen und Endothelzellen gefunden werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von hämatopoetischen beziehungsweise Endothelzellwachstumsfaktoren aus diese BL-CFC primitive, definierte, hämatopoetische Zellen sowie Endothelzellvorläufer werden (Choi et al., 1998; Kennedy et al., 1997). Die aus den Blastkolonien gebildeten Endothelzellen waren adherent und wurden an Hand der Expression charakteristischer Marker wie CD31, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie2 sowie der Aufnahme von Ac-LDL detektiert. Die hämatopoetischen Zellen blieben in Suspension und wurden durch die Expression der Gene  $\beta$ H1,  $\beta$ -major und c-fms charakterisiert. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die hämatopoetischen Zellen und Endothelvorläuferzellen in den Blastzellkolonien gleichen Ursprungs sind. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es sich bei den BL-CFC um Hämangioblasten handelt (Choi et al., 1998).

## 1.2 Endothelvorläuferzellen

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Vaskulogenese auf die frühe Embryonalentwicklung beschränkt sei und im ausgewachsenen Lebewesen nicht mehr stattfindet. Durch die Entdeckung von Endothelvorläuferzellen (EPC), basierend auf der Expression von VEGFR-2 und CD34, wird in neuerer Zeit davon ausgegangen, dass auch im adulten Organismus Vaskulogenese durch die Ausbildung neuer Gefäße mit Hilfe von Endothelvorläuferzellen stattfinden kann (Asahara et al., 1997). Bisher ist aber noch nicht eindeutig geklärt, ob diese Zellen in schon vorhandene Gefäßsysteme mit integriert werden können oder mittels der EPC gar neue Gefäße gebildet werden. Die Endothelvorläuferzellen sollen auch eine Rolle bei der Tumorangiogenese spielen. Tumorzellen scheinen durch Ausschüttung von angiogenen Faktoren in der Lage zu sein die Endothelvorläuferzellen zu mobilisieren, und sie dazu zu veranlassen, dass sie zum Tumorgewebe migrieren. Durch die gleichzeitige Co-mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen ist es den EPC dann möglich in das bestehende Gefäßsystem des Tumors zu integrieren (Rafii et al., 2002). Die Endothelvorläuferzellen werden wie auch die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark gebildet. Die Definition von Endothelvorläuferzellen ist bisher noch nicht einheitlich, wodurch Vergleiche zwischen den Ergebnissen einzelner Gruppen erschwert werden. Zudem gibt es bisher noch keine einheitliche Beschreibung der Endothelvorläuferzellen. Es werden viele

verschiedene Isolationsmethoden verwendet beziehungsweise die Zellen werden an Hand verschiedener Marker isoliert. Zudem werden unterschiedliche Ressourcen wie Knochenmark, Nabelschnurblut und peripheres Blut für die Gewinnung eingesetzt, wodurch nicht gesichert ist, dass die daraus isolierten EPC den selben Differenzierungsgrad aufweisen. Endothelvorläuferzellen werden z.B. aus peripherem Blut mittels CD34 Magnetbeads isoliert (Asahara et al., 1997), oder es werden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut gewonnen, in Endothelzellmedium kultiviert und die adherenten Zellen als EPC klassifiziert (Badorff et al., 2003). Des Weiteren werden EPC direkt aus dem Knochenmark über CD34 Isolation (Bagley et al., 2003) oder aus mit G-CSF mobilisiertem Blut über eine Isolation mittels des Oberflächenmarker AC133 gewonnen (Gehling et al., 2000). Es gibt bisher keine einheitliche Methode wie Endothelvorläuferzellen zu gewinnen sind, außerdem bleibt die genaue Definition der Endothelvorläuferzellen weiterhin im Unklaren.

### **1.3 Vaskulogenese und Angiogenese**

Das Gefäßsystem in Säugern wird schon im frühen Stadium der Embryonalentwicklung gebildet. Diesen Vorgang nennt man Vaskulogenese. Wie in Abschnitt 1.1.1 dargestellt, werden aus Stammzellen über mehrere Differenzierungsstufen Endothelzellen gebildet, wodurch es zusammen mit Bindegewebszellen zur Ausbildung von Blutgefäßen kommt. Im Gegensatz hierzu bezeichnet die Angiogenese den Vorgang aus einem schon vorhandenen Gefäßsystem neue Verzweigungen durch Aussprossung zu bilden, wodurch neue Gefäßsysteme entstehen. Der Vorgang der Angiogenese stellt einen invasiven zellulären Prozess dar, der die Aktivität vieler Moleküle wie Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme, Proteine der Extrazellulärmatrix sowie Adhäsionsproteine benötigt (Blood and Zetter, 1990; Ingber and Folkman, 1989a; Ingber and Folkman, 1989b). Die Angiogenese kann in verschiedene einzelne Schritte unterteilt werden, siehe hierzu Abbildung 4 (Sage, 1997). Auf einen angiogenen Reiz hin beginnen die Endothelzellen nach ihrer Aktivierung mit der Lyse der extrazellulären Matrix und lösen die Zelladhäsion. Danach kommt es zur Proliferation und Migration in das umgebende Gewebe. Als letzter Schritt kommt es zur Lumenbildung und zum Stopp des Wachstums der Zellen. Es entsteht eine neue Gefäßkapillare.

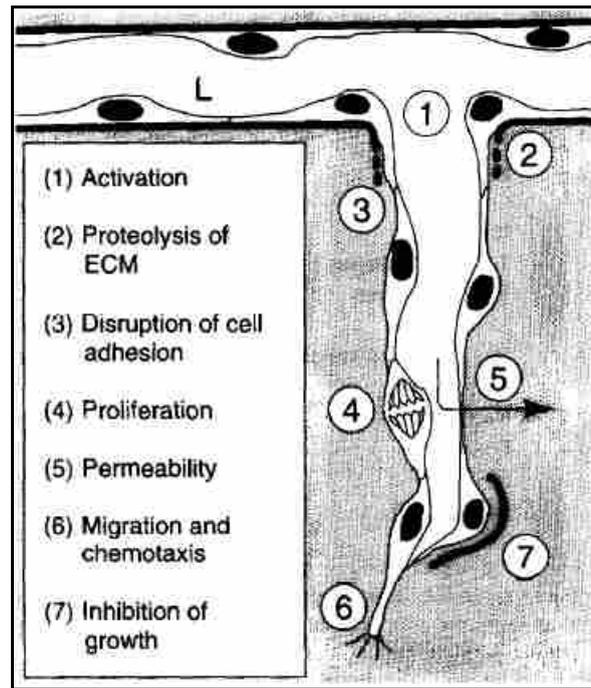


Abbildung 4: Prozess der Angiogenese (Sage, 1997). Nach Aktivierung der Endothelzellen lysieren diese die Extrazellulärmatrix und die Zelladhäsion wird gelöst. Die Endothelzellen beginnen zu proliferieren und zu migrieren. Als letzter Schritt kommt es zur Lumenbildung und zum Stopp des Wachstums der Zellen. Es entsteht eine neue Gefäßkapillare.

Angiogenese findet vor allem im Dottersack und im Embryo, während der Organogenese, sowie in der Wachstumsphase statt. Zudem spielt die Angiogenese beim Erwachsenen in physiologischen Prozessen wie dem Menstruationszyklus und der Schwangerschaft eine wichtige Rolle. Des weiteren sind pathophysiologische Vorgänge wie Tumorwachstum, Bildung von Metastasen, Wundheilung und rheumatoide Arthritis durch eine deutliche Angiogenese charakterisiert oder werden durch diese verursacht (Carmeliet and Jain, 2000; Polverini, 2002).

### 1.3.1 Tumorangiogenese

Tumore weisen auf Grund ihres extremen Zellwachstums große Bereiche auf, die nicht mit Sauerstoff beziehungsweise Nährstoffen versorgt werden können, sofern nicht ein Anschluss an das existierende Blutsystem sowie innerhalb des Tumorgewebes ein eigenes Blutsystem gebildet wird. Tumore ohne diesen Anschluss können nur bis zu einer Größe von  $1-3 \text{ mm}^3$  wachsen (Folkman and Ingber, 1992). Die Regulation der Angiogenese wird sowohl durch pro- und antiangiogenetische Faktoren gesteuert (Bikfalvi, 1995). Speziell bei der Tumorangiogenese kommt es in Folge von hypoxischen Zuständen im Tumorgewebe zur

Ausschüttung von Mediatoren aus den Wirtszellen und aus den Tumorzellen. Hierdurch werden die Endothelzellen zur Proliferation und Migration stimuliert. Die Endothelzellen wachsen in Richtung des Stimulus, sodass die hypoxischen Bereiche im Tumorgewebe wieder mit Nährstoffen versorgt werden. Die Endothelzellen im Tumorgewebe unterscheiden sich von denen in normalen Geweben. Sie scheinen ständig aktiviert zu sein, um so die Blutversorgung während des andauernden Wachstum des Tumors sichern zu können (Bergers and Benjamin, 2003). Zudem ist das Gefäßsystem im Tumor relativ chaotisch im Vergleich zu der geordneten Struktur in den normalen Geweben (Baluk et al., 2003), siehe hierzu Abbildung 5.

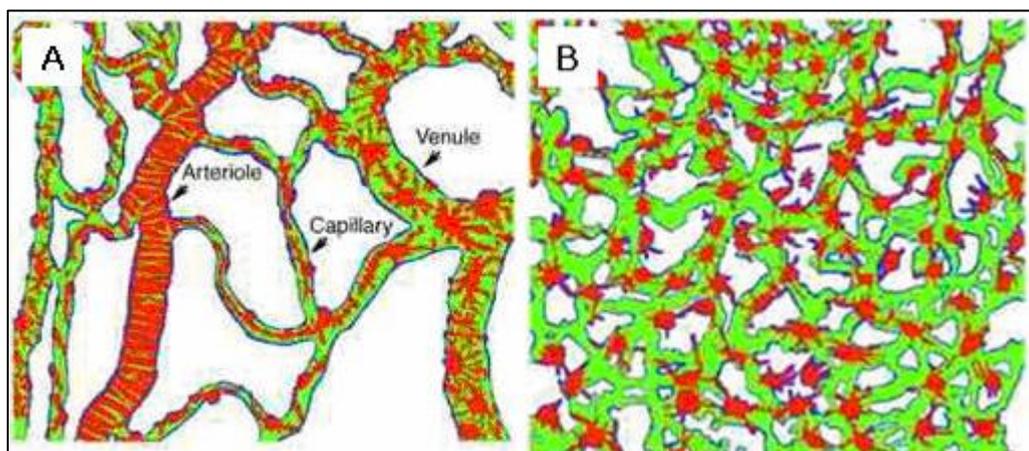


Abb. 5: Unterschied in der Gefäßstruktur von Normal- und Tumorgewebe. Endothelzellen sind grün, Perizyten rot und die Basalmembran der Gefäße blau dargestellt. **A:** Gefäßstruktur im Normalgewebe. Arterien sind gut auf Grund ihrer Größe und Struktur zu unterscheiden. **B:** Gefäßstruktur im Tumorgewebe. In dieser desorganisierten Struktur lassen sich die einzelnen Gefäßarten kaum auf Grund der Größe und Form unterscheiden. Zudem sind die Perizyten nur locker mit den Endothelzellen verbunden. (Baluk et al., 2003).

#### 1.4 Rolle der Endothelvorläuferzellen in der Angiogenese

In früheren Arbeiten zur Isolation von Endothelvorläuferzellen wurde der Oberflächenmarker CD34 eingesetzt. Da dieser auch von reifen Endothelzellen exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass bei der Isolation von Endothelvorläuferzellen aus dem Blut auch zirkulierende Endothelzellen mit isoliert werden können. Durch die Entdeckung des Oberflächenproteins AC133 (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997) konnte ein neues Molekül identifiziert werden, das als spezifischer Marker für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen angesehen wird. Hierbei handelt es sich um ein glykosyliertes Transmembranprotein mit fünf transmembranen Domänen und einem Molekulargewicht von 120 kDa. Der Anteil an AC133 positiven Zellen im Knochenmark liegt bei ca. 0,5 % und im

mobilisierten Blut bei 1,4 % (de Wynter et al., 1998). Mit Hilfe dieses Oberflächenrezeptors konnte eine neue Zellpopulation von AC133 positiven, CD34 positiven und VEGFR-2 positiven Zellen isoliert werden, bei denen es sich scheinbar um Endothelvorläuferzellen (EPC) handelt (Peichev et al., 2000).

Kontrovers bleibt aber immer noch die Rolle der EPC in der Angiogenese. Bei *in vivo* Untersuchungen von transplantierten EPC wurden unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Zum einen konnte eine Einlagerung dieser Zellen in das vorhandene Blutsystem detektiert werden. Asahara et al. konnten Endothelvorläuferzellen in Entzündungsorten auf der Haut und im Herzen bei Mausmodellen nachweisen, zudem wurden teilweise EPC in Tumorgefäßen nachgewiesen (Asahara et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Murohara et al. erzielt. Sie zeigten, dass CD34 positive Zellen, isoliert aus humanem Nabelschnurblut, in einem Ischämiemodell in Ratten an der Ausbildung neuer Gefäße beteiligt waren (Murohara et al., 2000). In einem speziellen Angiogenesemodell konnte gezeigt werden, dass in Id-Gen mutieren Mäusen, Knochenmarkszellen eine wichtige Rolle bei der Tumorangiogenese spielen (Lyden et al., 2001). Peters et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass Knochenmarkszellen in das Tumorendothel eingebaut wurden. Aber diese Gruppe zeigte auch, dass dies nur zu einem sehr geringen Teil, in ca. 5% der Gefäße, auftrat (Peters et al., 2005). Eine andere Forschergruppe konnte einen Einfluss von Endothelvorläuferzellen bei der Vaskularisierung von ischämischem Gewebe feststellen (Murohara et al., 2000). Mehrere andere Gruppen zeigten, dass die Endothelvorläuferzellen nicht direkt in das Gefäßsystem integrierten, sondern außerhalb der Gefäße im umliegenden Gewebe gefunden wurden (Rajantie et al., 2004; Voswinckel et al., 2003; Ziegelhoeffer et al., 2004). Durch die unterschiedlichen Ressourcen aus denen Endothelvorläuferzellen gewonnen werden und durch die unterschiedlichen Definitionen was genau als Endothelvorläuferzellen bezeichnet wird, werden Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen erschwert.

## 1.5 Ziel der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit sollen die Endothelvorläuferzellen (EPC) genauer charakterisiert werden und ihre Rolle im Rahmen der Angiogenese weiter geklärt werden. Hierzu werden mit Hilfe des spezifischen Oberflächenmarkers AC133 Endothelvorläuferzellen aus humanem peripherem Blut sowie Nabelschnurblut isoliert. AC133 wird speziell auf Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert. Somit können die hier gesuchten Zellen mittels spezifischer Antikörper gegen AC133 gut aus dem Blut isoliert werden. Diese aus den beiden Ressourcen gewonnenen EPC sollen dann auf die Expression einzelner Oberflächenmarker mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sowie der FACS Analyse hin untersucht werden. Zudem soll die Veränderung der Expression dieser Marker in der Kokultur mit unterschiedlichen Zellarten analysiert werden, und die Differenzierung der Vorläuferzellen untersucht werden. Hierbei werden unterschiedliche Marker betrachtet, die zum einen spezifisch für Stamm- und Vorläuferzellen und zum anderen spezifisch für Endothelzellen sind. Mit Hilfe der Affymetrix Chip Analyse soll die Genexpression der Vorläuferzellen analysiert werden sowie Aussagen über vergleichbare Expressionsprofile mit anderen Zelltypen getroffen werden. Hierdurch soll der Verwandtschaftsgrad der Vorläuferzellen zu anderen Zelltypen geklärt werden. Die Vorläuferzellen sowie humane mikrovaskuläre Endothelzellen sollen in einem Mausmodell auf ihre Lokalisation und Rolle bei der Tumorangio-genese hin untersucht werden. Hierzu werden diese Zellen i.v. über die Schwanzvene der Maus appliziert und einzelne Gewebe entnommen. Diese werden mittels histologischer Untersuchungen auf das Vorhandensein von humanen Zellen hin analysiert. Um eine Aussage über den Einfluss von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bei der Angiogenese treffen zu können, wird ein ähnlicher Versuch mit GFP-Knochenmarkszellen aus der Maus durchgeführt. Zudem wird versucht die i.v. applizierten Zellen *in vivo* durch ein Imaging System zu detektieren. Der schematische Ablauf der Arbeit ist in Abbildung 6 dargestellt. Insgesamt soll mittels dieser Versuche eine Aussage über den Einfluss dieser Vorläuferzellen bei der Tumorangio-genese getroffen werden können.

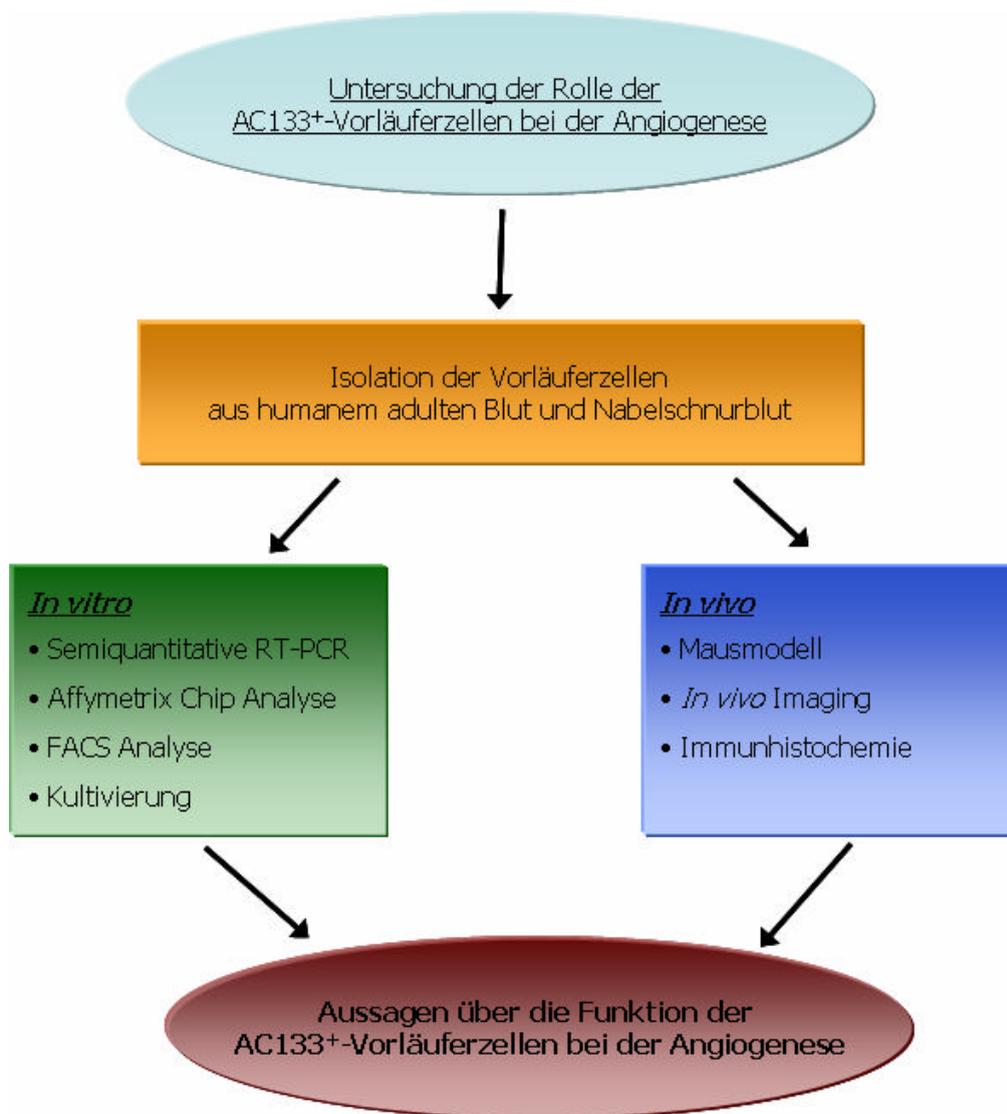


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe der vorliegenden Arbeit.

## 2. Material und Methoden

Tab. 1: Lieferanten von Pufferlösungen, Zusätzen und Medien		
AlamarBlue		Biosource
bFGF		R+D
Biotect Schutzmedium		Biochrom
Collagen G		Biochrom
dH <sub>2</sub> O (DNase, RNase frei)		PAA Laboratories
DMEM / HAM´S F-12 (1:1) Medium		PAA Laboratories
Dulbecco´s PBS (1X)		GibcoBRL
Earle´s Medium M199		PAA Laboratories
ECGS		Sigma
FCS		GibcoBRL
Heparin		Sigma
HEPES		Biochrom
Humanserum		Eigene Herstellung
Ketavet (Ketaminhydrochlorid)		Bayer
L-Ascorbinsäure		Sigma
L-Glutamin		PAA Laboratories
Natriumpyruvat		Sigma
Nicht essentielle Aminosäuren		PAA Laboratories
Penicillin/ Streptomycin		PAA Laboratories
Rompun (Xylazinhydrochlorid)		Bayer
RPMI 1640		PAA Laboratories
SCF		Strathmann Biotec
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)		ICN Biochemicals
Trypsin/EDTA (10X)		PAA Laboratories
VEGF 165		Proqinase, Freiburg

<b>Tab.2: Plastikware</b>		
Mikroreaktionsgefäße		Eppendorf
Röhrchen (15, 50 ml)		TPP
div. Sterilfilter		Pall Life Sciences
Transwellplatten		Corning Inc. Costar®
Zentrifugationsröhrchen (500 ml)		Corning Inc. Costar®
div. Zellkulturflaschen		Corning Inc. Costar®

<b>Tab.3: Materialien für AC133 Zellisolation</b>		
AC133 Cell Isolation Kit		Milteny Biotech
Biocoll Separationslösung 1077 g/ml		Biochrom
Leucosep® Röhrchen		Greiner-bione
MACS Magnet und Ständer		Milteny Biotech
MACS Separationssäulen LS		Milteny Biotech
MACS Separationssäulen MS		Milteny Biotech
S-Monovetten (mit Citrat)		Sarstedt

<b>Tab.4: Materialien für RNA Isolation</b>		
2-Mercaptoethanol		Sigma
QIAshredder Mini Column		Qiagen
RNase-freies DNase Set		Qiagen
RNeasy® Mini Kit		Qiagen

<b>Tab.5: Materialien für Messung der RNA - Konzentration</b>		
RNA 6000 Ladder		Agilent Technologies
RNA 6000 Nano LabChip® Kit		Agilent Technologies

<b>Tab.6 : Materialien für cDNA Synthese</b>		
Oligo(dT)20 Primer (50µM)		Qiagen
Superscript™ First-Strand Synthesis System		Qiagen

<b>Tab.7 : Materialien für Semiquantitative PCR</b>		
Assay-on-Demand		Applied Biosystems
Optische Folie		Applied Biosystems
TaqMan® 2X PCR Mastermix		Applied Biosystems
TaqMan® GAPDH Kontrollreagenzien		Applied Biosystems

<b>Tab.8: Materialien für Zellfärbung</b>		
Calcein AM		Molecular Probes
CFSE DA		Molecular Probes

<b>Tab.9: Materialien für Cytospin</b>		
Deckgläschen		Menzel-Gläser
Filterkarten 26x45mm (4,5mm Ø)		Kendro Lab.
Formaldehydlösung 37 %		Merck
Mikroreaktionsgefäß		FRÖTEK- Kunststofftechnik
Objektträger SuperFrost®Plus		Menzel-Gläser

<b>Tab.10: Materialien für Durchflusszytometrie</b>		
FACS Clean Solution		Becton Dickinson
FACS Rinse Solution		Becton Dickinson
FACS Röhrchen		Becton Dickinson

**Tab.11: Materialien für Immunhistochemie**

Aceton	Merck
Einbetthüllen Histomold	Leica
Fettstift	SCI Science Service
Glycerin 87 %	Merck
Hoechst 33342	Cambrex
Korkplättchen	Enno Vieth
Methanol	Merck
Mowiol® 4-88	Calbiochem
n-Pentan	Merck
TissueTek®	Sakura

**Tab.12: Geräte**

Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Cryostat Jung Frigocut 2800E	Leica
FACSCalibur™	Becton Dickinson
Fluoreszenzmeßgerät Flx800	Bio-Tek Instruments
Laser LGA131	Laser Technologies
Mikroskop Axiophot	Zeiss
Mikroskop Zeiss Stemi SV6	Zeiss
TaqMan® ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Wasserbad	GFL®
Zellzähler CASY®	Schärfe System
Zentrifugen	Heraeus

**Tab.13: Primärzellen/ Zelllinien**

B16F10	Melanomzellen	ATCC (CRL-6475)
HL60	Promyeloblasten	ATCC (CCL-240)
MVEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen	Eigene Herstellung
AC133 positive	Isoliert aus humanem Blut	Eigene Herstellung
PBMC	Isoliert aus humanem Blut	Eigene Herstellung

Tab.14: Mausstämme		
C57BL/6w	Wildtyp	Jackson Laboratory
C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J	transgen	Jackson Laboratory
NMRI nu/nu	Nacktmaus	Taconic M&B

Tab.15: Verwendete Antikörper				
Anwendung	Antikörper	Markierung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Durchflusszytometrie	Maus anti-Human AC133	PE	1:10	Miltenyi Biotech
	Maus anti-Human AC133	Biotin	1:10	Miltenyi Biotech
	Maus anti-Human CD34	PE	1:10	Miltenyi Biotech
	Maus anti-Human CD34	FITC	1:10	Miltenyi Biotech
	Maus anti-Human CD31	-	50 µg/ml	Becton Dickinson
	Maus anti-Human vWF	-	40 µg/ml	Chemicon
	Maus anti-Human cKit	PE	1:10	DakoCytomation
	Maus anti-Human Tie2	-	1:10	Diaclone
	Maus anti-Human CD45	FITC	1:10	Miltenyi Biotech
	Maus anti-Human CD13	-	10 µg/ml	Leinco Technologies
	Maus anti-Human VEGFR-2	-	10 µg/ml	Reliatech
	Anti-Biotin Komplex	FITC	1:10	Miltenyi Biotech
	Ziege anti-Maus IgG	FITC	1:10	Becton Dickinson

Anwendung	Antikörper	Markierung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
	Isotypkontrolle Maus IgG	-	1:10	Immunotech
	Isotypkontrolle Maus IgG	PE	1:10	Immunotech
<b>Immunhistochemie</b>	Ratte anti-Maus CD31	-	5 µg/ml	Becton Dickinson
	Smooth muscle Actin	Cy3	11 µg/ml	Sigma
	Ziegenerum	-	1:50	Jackson Immuno Research

## 2.1 Isolation von Vorläuferzellen aus Blut

### 2.1.1. Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Trennung der PBMC (peripheral blood mononuclear cells), welche Lymphozyten und Monozyten umfassen, von den restlichen Bestandteilen des Blutes (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Plasma) wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzt. Hierbei wurde das Blut auf eine Separationslösung geschichtet, so dass bei der folgenden Zentrifugation die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte in 4 Schichten aufgetrennt wurden. In der obersten Schicht wird das Blutplasma mit den Thrombozyten angereichert, in der darunter liegenden Schicht sammeln sich die peripheren mononuklearen Zellen. Darunter befindet sich eine Schicht mit Separationslösung und als unterste Schicht findet man die Erythrozyten, die mit Granulozyten bedeckt sind (siehe hierzu die Abbildung 7A).

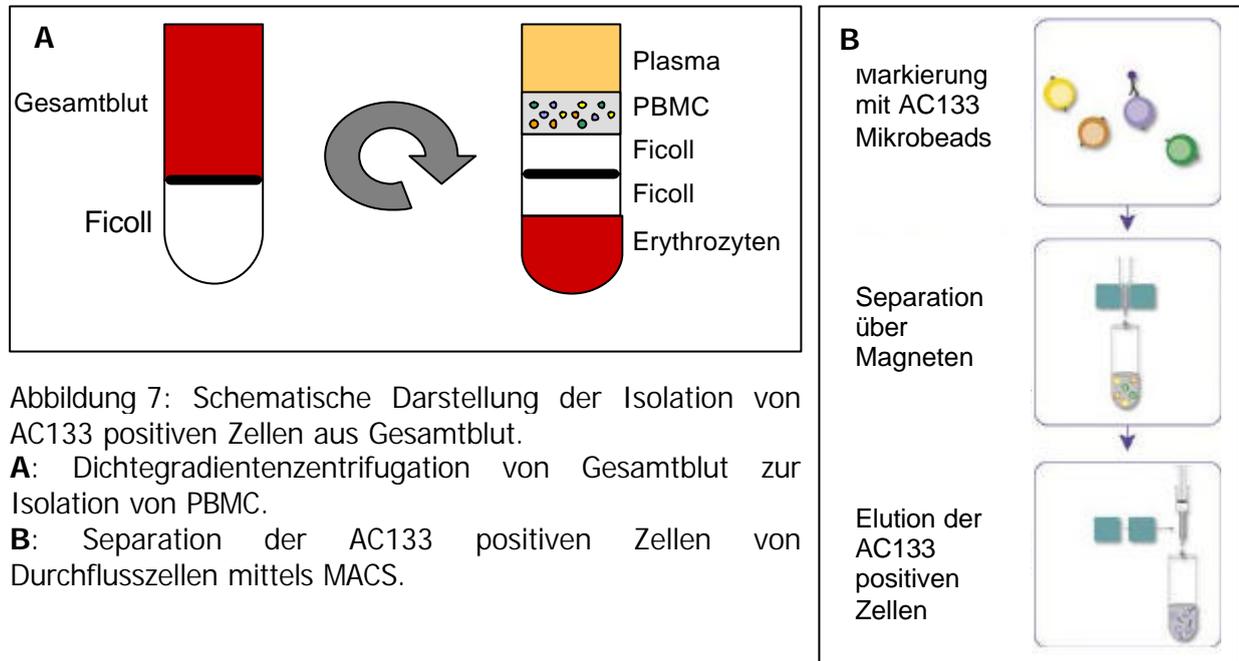
Zur Separation wurden Leucosep®-Röhrchen verwendet. Diese besitzen eine poröse Trennscheibe, wodurch das Übersichten der Separationslösung mit dem Blut erleichtert wird. 15 ml der Biocoll 1.077 g/ml Separationslösung wurden in ein 50 ml Leucosep®-Röhrchen gegeben und für 1 min bei 1000 g zentrifugiert, sodass sich die Lösung unterhalb der porösen Trennscheibe befand. Danach wurden 30-40 ml Blut auf die Trennscheibe

pipettiert und bei 800 g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert, um ein erneutes Vermischen der Schichten zu vermeiden. Nach der Trennung wurde der größte Teil des Plasmas abgesaugt und die weiße Zellschicht, die die PBMC enthielt, abgenommen. Diese Schicht wird in PBS/ 2 mM EDTA/ 0,5 % BSA aufgenommen und bei 160 g für 10 min gewaschen. Danach erfolgten weitere Waschschrte zweimal bei 200 g und einmal bei 240 g für je 8 min. Die gewonnenen PBMC wurden mit Hilfe des Zellzählers CASY® gezählt und für die Isolation der AC133 positiven Zellen aus diesen Zellen weiter verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.1.2 Isolation von AC133 positiven Zellen

Zur weiteren Auftrennung der PBMCs aus der Dichtegradientenzentrifugation wurden AC133 positive Zellen mit Hilfe von AC133-Antikörpern, gekoppelt an Magnetpartikel, isoliert. Hierzu wurden  $1 \times 10^8$  PBMC in 300  $\mu$ l 4 °C kaltem Puffer (PBS/ 2 mM EDTA/ 0,5 % BSA) aufgenommen und auf Eis gestellt. Jeweils 100  $\mu$ l des FcR-Blocking Lösung und der AC133 Mikrobead Lösung wurden zu diesen  $1 \times 10^8$  Zellen pipettiert. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 min inkubiert. Bei höheren Ausgangszellzahlen wurden die Volumina entsprechend angepasst. Zellzahlen kleiner als  $1 \times 10^8$  wurden ebenfalls mit 100  $\mu$ l FcR-Blocking Lösung beziehungsweise AC133 Mikrobeads sowie 300  $\mu$ l Puffer versetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 50 ml Puffer aufgenommen und bei 250 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l pro  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen und auf eine Isolationssäule aus beschichtetem magnetisierbarem Feindrahtgewebe, die vorher in das Magnetfeld des MACS Separators gestellt wurde, gegeben. Zuvor wurde die Säule mit Puffer äquilibriert. Bis zu einer Gesamtzellzahl von maximal  $2 \times 10^8$  Zellen wurde die MS Säule und darüber bis maximal  $2 \times 10^9$  Zellen wurde die LS Säule verwendet. Die MS Säule wurde mit 500  $\mu$ l und die LS Säule mit 5 ml Puffer äquilibriert. Nachdem die Zellsuspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde mit 500  $\mu$ l (MS Säule) beziehungsweise 3 ml (LS Säule) Puffer 4x gespült. Die Säule wurde dann aus dem Magnetfeld genommen und eine neue äquilibrierte Säule in das Feld gestellt. Die Zellen wurden aus der ersten Säule mittels 1 ml beziehungsweise 5 ml Puffer und einem Kolben herausgedrückt und auf die neue Säule gegeben. Nach weiteren 4 Waschschrten wurde auch diese Säule aus dem Magnetfeld genommen und 2 ml beziehungsweise 6 ml Puffer auf die Säule pipettiert. Nachdem ca. 1ml der Lösung mittels Gravitation aus der Säule getropft war, wurde der Kolben verwendet und das restliche Volumen mechanisch herausgedrückt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Zellzählung verwendet, und die restlichen Zellen zur

weiteren Untersuchung eingesetzt. Eine schematische Darstellung der Isolation ist in Abbildung 7B dargestellt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der CASY® Zellzähler von Schärfe System entsprechend den Herstellervorschriften eingesetzt.



## 2.2 Semiquantitative Expressionsanalyse

### 2.2.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy™ Systems. Bei einer Zellzahl von kleiner  $5 \cdot 10^6$  Zellen wurde das Zellpellet in 350  $\mu$ l GITC-Puffer mit 1 % 2-Mercaptoethanol lysiert und mittels QiaShredder homogenisiert. Bei  $5 \cdot 10^6$  bis  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurde 700  $\mu$ l GITC mit 1 % 2-Mercaptoethanol eingesetzt. Zu den lysierten Zellen wurde 1:1 70 % Ethanol hinzugegeben, und die gesamte Lösung auf die RNeasy™ Mini Säule pipettiert und bei 14.000 g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit je 350  $\mu$ l RW1 Puffer für 1 min und zweimal mit 500  $\mu$ l RPE Puffer für 1 min beziehungsweise im letzten Schritt für 2 min ebenfalls bei 14.000 g gewaschen. Die genomische DNA wurde direkt auf der Säule mittels Zugabe von DNase I abgebaut. Der Verdau der DNA erfolgte nach dem ersten Waschschrift durch Zugabe einer Lösung von 10  $\mu$ l einer 2,7 U/ $\mu$ l DNase I Lösung und 70  $\mu$ l RDD Puffer auf die Säule und anschließender Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Durch die nachfolgenden Waschschriffe bei der RNA Isolation wurde die DNase I mit entfernt. Die RNA

wurde am Ende der Isolationsschritte mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O eluiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2 Messung der RNA-Konzentration**

Die Gesamt-RNA Konzentration wurde mit Hilfe der Aligent 2100 Bioanalyser bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach dem „RNA 6000 Nano Assay“ Protokoll und mit Hilfe der Komponenten des RNA 6000 Nano LabChip® Kits. Die Analyse mittels des Bioanalyzers erfolgt nach dem Prinzip der Elektrophorese. Die RNA Proben werden mit Hilfe eines Spannungsfeldes ihrer Größe nach getrennt und mittels eines Lasers können die einzelnen RNA Fragmente, die mit einem interkalierenden Farbstoff markiert wurden, detektiert werden. Die Ergebnisse werden dann als Histogramm und als Bandendarstellung ausgegeben.

Hierzu wurden 550 µl der RNA 6000 Nano Gel Matrix in ein Filterzentrifugenröhrchen pipettiert und für 10 min bei 1500 g zentrifugiert. 65 µl des zentrifugierten Gels wurde mit 1 µl RNA 6000 Nano Farbstoffkonzentrat versetzt. Das Farbstoffkonzentrat wurde zuvor 30 min auf Raumtemperatur gebracht und kurz gemischt. Der Gel-Farbstoff-Mix wurde für 10 min bei 13000 g zentrifugiert und diente anschließend zur Beladung des Chips. Es wurden 5 µl RNA 6000 Nano Marker in jedes der 12 Probenwells sowie in das Well für den Größenmarker pipettiert. Jeweils 2 µl der RNA-Proben und des Größenmarkers wurden auf 70 °C für 2 min erhitzt und danach sofort auf Eis abgekühlt. Je 1 µl der denaturierten RNA und des Markers wurden in die entsprechenden Wells pipettiert, und der Chip für 1 min bei 2400 rpm geschüttelt. Danach wurde der Chip im Bioanalyser mit Hilfe der 2100 Expert Software analysiert.

### **2.2.3 Reverse Transkription der mRNA**

Die bei der RNA Isolation gewonnene Gesamt-RNA diente als Grundlage für die reverse Transkription. Hierbei wurde mit Hilfe von Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer und dem Enzym Reverse Transkriptase Superscript™ II RT die mRNA in cDNA umgeschrieben. Es wurden 40 µl Gesamt-RNA mit 4 µl Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer versetzt und für 10 min bei 70 °C erhitzt, um linearisierte, einzelsträngige RNA beziehungsweise Primer zu erhalten. Die RNA wurde danach sofort auf Eis abgekühlt.

Zu dieser Lösung wurden

- 8 µl 10X RT -Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)
- 8 µl DTT (0,1 M)
- 8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 4 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 2 µl Superscript™ II RT (50 U/µl)
- 6 µl DNase/RNase-freies dH<sub>2</sub>O

zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 40 °C für 50 min, und anschließend wurde der Ansatz auf 70 °C für 15 min erhitzt, um cDNA-mRNA Doppelstränge zu trennen und die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

#### 2.2.4 semi-quantitative RT-PCR (TaqMan®)

Die cDNA wurde mit Hilfe der semi-quantitativen PCR auf die Genexpression einzelner Gene hin untersucht. Für die Durchführung wurde der TaqMan® ABI Prism 7000 SDS verwendet. Hierbei ist es durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden sowie den entsprechenden Primerpaaren möglich, eine Aussage über die Menge an cDNA, welche proportional zur Menge der mRNA sein sollte, und somit über die Expression eines Gens zu treffen.

Es wurden die Gene AC133, CD34, vWF, CD31 und als Referenzgen GAPDH betrachtet. Jeder PCR-Ansatz wurde in Tripletts in eine 96-well Platte pipettiert, die mit einer durchsichtigen optischen Folie verschlossen wurde. Die Ansätze wurden für 10 min bei 95 °C denaturiert und dann 40 Temperaturzyklen (15 sec 95 °C, 60 sec 60 °C) unterzogen.

Ein PCR-Ansatz bestand aus:

cDNA-Probe	5	µl
TaqMan® Universal Mastermix	12,5	µl
20X Assay on Demand	1,25	µl
DNase/RNase-freies dH <sub>2</sub> O	6,25	µl

Der GAPDH PCR-Ansatz bestand aus:

cDNA-Probe	5	µl
TaqMan® Universal Mastermix	12,5	µl
Forward Primer (10 µM)	0,5	µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5	µl
GAPDH Sonde (5 µM)	1,5	µl
DNase/RNase-freies dH <sub>2</sub> O	5,75	µl

Im TaqMan® Universal Mastermix sind die Enzyme AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® UNG sowie dNTPs mit dUTP, ROX (passive Referenz) und Pufferkomponenten enthalten. Der 20X Assay on Demand Mix beinhaltet die PCR Primer sowie die FAM markierte Sonde.

Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die Differenz (Delta C<sub>t</sub>) aus dem vorher festgelegten Schwellenwert (C<sub>t</sub>) des untersuchten Gens und dem Referenzgen GAPDH gebildet.

$$\text{Delta } C_t = C_{t \text{ Gen}} - C_{t \text{ GAPDH}}$$

Die relative Expression ergab sich dann mittels der Formel:

$$\text{rel. Expression} = 2^{-\text{Delta } C_t}$$

### 2.2.5 Affymetrix Chip Analyse

Mit Hilfe der Affymetrix Analyse sollten die AC133 positiven Zellen aus Nabelschnurblut sowie die Durchflusszellen auf die Expression einzelner Gene hin untersucht werden. Zudem wurden Expressionsdaten von verschiedenen Zelltypen analysiert, um möglicherweise Aussagen über den Verwandtschaftsgrad der AC133 positiven Zellen mit anderen Zelltypen treffen zu können. Es wurden der HG-U 133 2.0 (enthält 39500 Gene des humanen Genoms) sowie der saTIVa Chip (enthält ca. 6400 Gene wichtiger Signalwege sowie Gene für spezielle Targets) von Affymetrix eingesetzt.

Die Prozessierung der isolierten RNA erfolgte nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll und unter Verwendung der empfohlenen Kits (vgl. GeneChip® Expression Analysis Manual, rev3, section 2). Hierbei wurde die zelluläre RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente anschließend als Vorlage für eine *in vitro* Transkription zur Synthese biotin-markierter cRNA. Die cRNA wurde fragmentiert und auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgetragenen DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch die Bindung eines Phycoerythrin gekoppelten Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des GeneArray Scanner 3000 gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional. Die Array-Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Expressionist Analyst Pro Software.

## 2.3 Zellfärbung

### 2.3.1 FACS Analyse

Mittels FACS können einzelne Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und ihrer emittierten Fluoreszenz analysiert werden. Letzteres erfolgt durch Verwendung von Antikörpern, an die Fluorochrome gekoppelt sind. Hierdurch wird es möglich die Expression und die Dichte von Molekülen auf der Zelloberfläche und in der Zelle zu analysieren. Die Methode erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie verschiedener Fluorochrome für mehrere tausend Einzelzellen. Im Durchfluss werden die FITC-markierten Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, und entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission durch die Fluorochrome. Das gestreute und emittierte Licht wird durch Photodetektoren erfasst, und mit Hilfe der Software CellQuest Pro™ werden die Daten ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem Punktdiagramm beziehungsweise Histogramm.

Die aus humanem adultem Blut und Nabelschnurblut isolierten Zellen sowie die bei der Isolation gewonnenen Durchflusszellen wurden phänotypisch analysiert. Hierzu wurden die isolierten Zellen aliquotiert und in 100 µl PBS<sup>-</sup> aufgenommen und mit dem entsprechenden Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es wurden  $1-2 \cdot 10^5$  AC133 positive sowie  $1-2 \cdot 10^6$  Durchflusszellen pro Antikörperinkubation eingesetzt. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Waschschriff mit 2 ml PBS<sup>-</sup>. Sofern der Primärantikörper keine direkte Fluoreszenzmarkierung aufwies, wurde ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, eingesetzt. Die Inkubation mit diesem Antikörper wurde ebenfalls in 100 µl PBS<sup>-</sup> für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Danach wurde zweimal gewaschen, um die nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin mit 4 % Formaldehyd (in PBS<sup>-</sup>) fixiert und im FACSCalibur™ analysiert. Als Kontrolle der unspezifischen Bindungen und der Eigenfluoreszenz der Zellen wurden entsprechende Isotypkontrollen als Primärantikörper eingesetzt. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

### 2.3.2 Beladung von Zellen mit Fluoreszenzreagenzien

Die aus dem humanem Blut gewonnenen AC133 positiven Zellen sowie die MVEC wurden mit Calcein AM beziehungsweise CFDA SE (Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidylester) inkubiert. Diese nicht-fluoreszierenden Farbstoffe gelangen während der Inkubation mit der Zellsuspension über Diffusion ins Cytoplasma und werden dort durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Die freigesetzten Carboxylatgruppen des Calceins verhindern eine Diffusion aus dem Zytoplasma in das Medium. Zudem werden sie dadurch in fluoreszierende Farbstoffe umgewandelt, wodurch eine Detektion der markierten Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen möglich wurde.

Die beiden verwendeten Farbstoffe wurden auf ihre Intensität hin untersucht. Es wurde eine Verdünnungsreihe der beiden Farbstoffe mit den Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  hergestellt. Je  $3,5 \cdot 10^5$  AC133 positiven Zellen wurden mit den einzelnen Konzentrationsstufen von Calcein AM im Verhältnis 1:1 in PBS<sup>-</sup> für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS<sup>-</sup> inkubiert und danach in 2 ml PBS<sup>-</sup> bei 120 g gewaschen. Die Inkubation mit CFDA SE erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden  $3,5 \cdot 10^5$  Ac133 positive Zellen im Verhältnis 1:1 mit den verschiedenen Konzentrationen an Farbstoff für 15 min in PBS<sup>-</sup> bei 37 °C inkubiert, danach erfolgte ein Waschschrift mit 2 ml PBS<sup>-</sup> bei 120 g und eine weitere Inkubation mit auf 37 °C vorgewärmten Dulbecco´s M199 Medium für 30 min bei 37 °C. Die Zellen wurden danach ebenfalls in PBS<sup>-</sup> gewaschen. Nun wurden die markierten Zellen in Transwells (Durchmesser 6,5 mm, Porengröße von 0,4  $\mu\text{M}$ ) in dem entsprechenden Kulturmedium ausgesät (siehe Tabelle 16). In die Transwells wurden  $4 \cdot 10^5$  PBMC pipettiert und die Zellen wurden für 4 Tage bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90 % r.H. kultiviert. Nach dieser Kulturperiode wurden die PBMC durch Abnahme der Transwells entfernt, und die Fluoreszenzintensität der AC133 positiven Zellen in einem Fluoreszenzmessgerät bei 485/528 nm (Ex/Em) gemessen.

#### 2.3.2.1 Bestimmung der Toxizität von Calcein AM

$2 \cdot 10^5$  beziehungsweise  $4 \cdot 10^5$  PBMC sowie  $3 \cdot 10^4$  MVECs wurden in 200  $\mu\text{l}$  PBS<sup>-</sup> aufgenommen und in 1,5 ml Gefäße pipettiert. Die PBMC dienten als Kontrollzellen für die im Versuch verwendeten AC133 positiven Zellen. Es wurde eine Verdünnungsreihe von Calcein AM mit den Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  in PBS<sup>-</sup> hergestellt und im Verhältnis 1:1 mit den Zellsuspensionen versetzt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS<sup>-</sup>. Danach wurden die Zellen zweimal in 1 ml PBS<sup>-</sup>

gewaschen und in 500 ml Dulbecco´s M199 Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in Triplets in eine 24 Well Platte ausgesät und für 4 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % r.H. kultiviert. Die Aufnahme des Farbstoffs Calcein AM wurde mit einem Fluoreszenzmessgerät bei 485/528 nm (Ex/Em) gemessen. Um die Vitalität zu bestimmen wurden nach der Messung die Zellen mit AlamarBlue, einem Mitochondriums-spezifischen Farbstoff, im Verhältnis 1:10 versetzt und für 2 h inkubiert,. Die Zellmenge wurde durch eine Fluoreszenzmessung bei 528/590 nm (Ex/Em) bestimmt.

### **2.3.2.2 Bestimmung der optimalen Fluoreszenzfarbstoffkonzentration**

Eine Verdünnungsreihe von Calcein AM mit den Konzentrationen 0 µM; 0,2 µM; 0,6 µM; 1 µM; und 2 µM wurde in PBS hergestellt und mit  $2 \cdot 10^6$  PBMC im Verhältnis 1:1 für eine Stunde in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, mittels Cytospin auf Objektträger transferiert und mit 'Mounting Medium' eingedeckelt. Die Aufnahme von Calcein AM wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dokumentiert.

### **2.3.2.3 Markierung des Zellen mit Calcein AM**

Für die *in vivo* Versuche wurden AC133 positive Zellen sowie MVEC mit Calcein AM gefärbt. Hierzu wurden die Zellen in 0,5 µM Calcein AM für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS inkubiert und danach zweimal in PBS gewaschen. Die markierten Zellen wurden in 400 µl PBS aufgenommen. Die Applikation der Zellen in die Nacktmaus erfolgte i.v. über die Schwanzvene.

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % r.H. kultiviert. Die einzelnen Zelltypen und die verwendeten Medien sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Es erfolgte bei allen verwendeten Zelllinien und Primärzellen alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel und sofern 80-90 % Konfluenz erreicht wurde, wurden die Zellen mittels einer 1x konzentrierten Trpsin/EDTA-Lösung passagiert. Bei der Suspensionszelllinie HL60 wurde die Zellen durch Aufteilung der Zellsuspension auf neue Flaschen passagiert. Die AC133 positiven Zellen wurden nicht passagiert, da ihre Teilungsrate nur sehr gering war. In diesem Fall wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage zur Hälfte vorsichtig abgenommen durch frisches Medium ersetzt.

<b>Tabelle 16: Übersicht über verwendete Zelltypen und deren Kulturbedingungen.</b>		
<b>Zelltyp</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Medienzusammensetzung</b>
B16F10 (Murines Melanom)	ATCC (CRL-6475)	DMEM / HAM'S F-12 (1:1) Medium 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamine
HL60 (Humaner Promyeloblast)	ATCC (CCL-240)	RPMI 1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin 25mM HEPES
MVEC (Mikrovasculäre Endothelzellen)	Isolierung aus Vorhaut	Earle's Medium M199 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % HS (hitzeinaktiviert) 10 µg/ml ECGS 0,5 % (v/v) Biotect Schutzmedium 5 U/ml Heparin 1,27 mM L-Ascorbinsäure 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) Nicht essentielle Aminosäuren 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin Kulturflaschen gecoatet mit 3 % Collagen G in PBS (mit Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ) für 5 min bei RT

AC133 positive (Endotheliale Vorläuferzellen)	Isoliert aus humanem adultem Blut und Nabelschnurblut	Earle´s Medium M199 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % HS (hitzeinaktiviert) 10 µg/ml ECGS 0,5 % (v/v) Biotect Schutzmedium 5 U/ml Heparin 1,27 mM L-Ascorbinsäure 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) Nicht essentielle Aminosäuren 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin 50 ng/ml VEGF 165 5 ng/ml bFGF 10 ng/ml SCF Kulturschale gecoatet mit 10 µg/ml Fibronectin für 10 min bei RT
PBMC (periphere mononukleäre Blutzellen)	Isoliert aus humanem adultem Blut und Nabelschnurblut	Earle´s Medium M199 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % HS (hitzeinaktiviert) 10 µg/ml ECGS 0,5 % (v/v) Biotect Schutzmedium 5 U/ml Heparin 1,27 mM L-Ascorbinsäure 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) Nicht essentielle Aminosäuren 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin

#### 2.4.2 Herstellung von Humanserum

Für die Herstellung von Humanserum wurden je Spender 400 ml Blut abgenommen und sofort in 500 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Das Blut wurde zur Koagulation 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 15 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen, in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und wiederum für 15 min bei 2000 g zentrifugiert. Erst danach wurden die Seren der einzelnen Spender vereinigt, um eventuelle Blutgruppenunverträglichkeiten zu vermeiden. Die gepoolten Seren wurden für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und danach mit 0,2 µm Filterkartuschen sterilfiltriert. Aliquots à 50 ml wurden bei -20 °C gelagert.

## **2.5 Tiermodelle**

### **2.5.1 Zucht des GFP-Mausstammes**

Verwendet wurde der Mausstamm C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/. Dieser Stamm exprimiert eGFP (enhanced green fluorescent protein) hemizygot, sodass sämtliches Gewebe mit Ausnahme der Haare und der Erythrozyten unter UV-Licht grün leuchten. Die Expression des GFP Proteins unterliegt der Kontrolle durch den  $\beta$ -Actin Promotor aus Huhn und wird verstärkt durch den Cytomegalovirus Enhancer. Die Mäuse, die das Protein homozygot exprimieren, sterben innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Geburt. Im ersten Wurf wurden 7 Mäuse geboren, wobei 5 innerhalb der ersten 2 Wochen starben. Die Expression des eGFP-Proteins wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt, indem eine Schwanzbiopsie entnommen wurde, und diese auf die Expression hin untersucht wurde. Bei den 2 Jungtieren handelte es sich um eGFP negative Tiere. Auf Grund dessen wurde das erwachsene weibliche Tier für die Isolation von eGFP Knochenmark verwendet. Das männliche Tier wurde weiterhin für die Zucht hemizygot exprimierender Tiere eingesetzt.

### **2.5.2 Entnahme von Knochenmark aus dem Oberschenkel der Maus**

Die Knochenmarkszellen wurden aus den beiden Oberschenkelknochen der C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J Maus isoliert und für die i.v. Injektion in C57BL/6 Mäuse eingesetzt. Die Gelenke an den Enden des präparierten Knochens wurde mit Hilfe einer Schere entfernt. Das Knochenmark wurde durch Zuhilfenahme einer Spritze mit einer aufgesetzten 27 G Kanüle mit 5 ml PBS/2 mM EDTA in ein 50 ml Röhrchen herausgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde für eine Minute stehen gelassen, sodass zum Teil vorhandene Knochen- beziehungsweise Fleischstücke sich am Boden des Röhrchen absetzen konnten. Die Zellsuspension wurde vorsichtig abgenommen und in PBS/2 mM EDTA gewaschen und vorsichtig resuspendiert, um eine gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten. Die Zellzahl wurde im Casy® Zellzähler bestimmt.

### **2.5.3 Herstellung von Allotransplantaten in Mäusen**

B16F10 Tumorzellen wurden für 3-4 Passagen kultiviert und bei ca. 80 % Konfluenz trypsiniert, um die Zellen in ihrem proliferativen Stadium zu erhalten. Für den Versuch mit

den humanen Calcein AM gefärbten Zellen wurden  $0,5 * 10^6$  B16F10 Tumorzellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und subkutan in die NMRI nu/nu Nacktmäuse injiziert. Für den Versuch mit den eGFP-Knochenmarkszellen wurden  $1-2 * 10^6$  B16F10 Tumorzellen in 50  $\mu$ l PBS aufgenommen und subkutan in C57BL/6w Mäuse injiziert.

#### **2.5.4 Injektion von humanen Zellen in tumortragende Nacktmäuse**

Die AC133 positiven Zellen aus der Nabelschnur wurden isoliert und dann in M199 Magermedium (M199, 2% FCS, 1,27 mM Ascorbinsäure) bei RT maximal über Nacht gelagert, um Veränderungen in ihrer Aktivität zu vermeiden. Die Endothelzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die AC133 positiven Zellen und die Endothelzellen gefärbt. Hierzu wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5  $\mu$ M Calcein AM inkubiert, gewaschen, in 400  $\mu$ l PBS aufgenommen und i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Knochenmarkszellen der GFP-Maus wurden ebenfalls am Tag der Injektion entnommen. Es wurden je Gruppe 3 Mäuse verwendet, denen AC133 positive Zellen, beziehungsweise MVEC i.v. gespritzt wurden. Für die Injektion der MVEC direkt in den Tumor beziehungsweise die Tumorperipherie wurde eine Maus eingesetzt. Für den Versuch mit den eGFP-Knochenmarkszellen wurden 2 Gruppen von tumortragenden Mäusen verwendet. Zum einen wurden 3 C57BL/6w Mäuse mit 4 Tage alten ( $1 * 10^6$  B16F10 Zellen implantiert) und zum anderen wurden 4 C57BL/6w Mäuse mit 8 Tage alten ( $2 * 10^6$  B16F10 Zellen implantiert) Allogtransplantaten verwendet, um den Einfluss der unterschiedlich stark ausgebildeten Gewebeorganisation im Tumor auf den Einbau der eGFP-Knochenmarkszellen zu untersuchen. Die Zeitpunkte und Zellzahlen der verschiedenen Zellarten sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

<b>Tabelle 17: Zeitlicher Ablauf der i.v. Injektion von Calcein AM gefärbten Zellen beziehungsweise eGFP-Knochenmarkszellen sowie Angabe über die eingesetzte Zellzahlen.</b>		
Zellart	Injektionszeitpunkt	Injizierte Zellen pro Maus
AC133 positive i.v.	Tag 5	$1,0 * 10^6$
	Tag 6	$8,0 * 10^5$
	Tag 7	$3,0 * 10^5$
	Tag 8	$5,7 * 10^5$
MVECs i.v.	Tag 5	$1,0 * 10^6$
	Tag 6	$1,0 * 10^6$
	Tag 7	$1,0 * 10^6$
	Tag 8	$1,0 * 10^6$
MVECs direkt in den Tumor	Tag 5	$2,5 * 10^5$
	Tag 7	$1,0 * 10^6$
eGFP-Knochenmarkszellen	Tag 4	$3,5 * 10^6$ (1 Maus)
	Tag 4	$1,5 * 10^6$ (1 Maus)
	Tag 8	$3,5 * 10^6$ (3 Mäuse)

### 2.5.5 *In vivo* Imaging von Mäusen

Die mit den GFP-Knochenmarkszellen behandelten C57Bl6 Mäuse sowie die Kontrolltiere wurden mit einem 1:1 Gemisch aus 2 % Rompun (Xylazinhydrochlorid), 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, und 100 mg/ml Ketavet (Ketaminhydrochlorid), 1:5 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, narkotisiert und die Haut über und um dem Tumor herum wurde rasiert. Die narkotisierten Mäuse wurden mittels eines Imagingsystems, bestehend aus dem Laser 131LGA und der Kamera Dual Mode cooled CCD camera (Mod. C4880 von Hamamatsu) auf das Vorhandensein von GFP positiven Zellen im Tumorgewebe untersucht. Zudem wurden der Tumor entnommen und getrennt analysiert, um auch die Innenseite untersuchen zu können. Des weiteren wurde die einzelnen Organe im Abdomen mit dem Imagingsystem analysiert. Die Mäuse beziehungsweise die Tumore und Abdomen wurden zudem mittels des Fluoreszenzmikroskops Stemi SV6 auf GFP positive Zellen hin untersucht. Die erzeugten Bilder wurde gespeichert und mit den Bildern der Kontrollmäuse, die keine GFP-Knochenmarkszellen gespritzt bekommen hatten, verglichen.

## 2.6 Anfertigung von Gefrierschnitten aus Mausgewebe

Hierzu wurden die jeweiligen Gewebe (Lunge, Thymus, Tumor) aus den Mäusen entnommen. Die Gewebe wurden in kleine Plastikschaalen in TissueTek eingebettet und sofort in einer Lösung aus n-Pentan und Trockeneis tiefgefroren. Zur besseren Justierung der Schnitte im Kryostat wurden auf die eingebetteten Gewebe vor dem Einfrieren noch ein Korkplättchen gelegt. Die Lagerung der gefrorenen Gewebe erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zum Schneiden der Gewebe wurde der Kryostat Jung Frigocut 2800E verwendet. Die Gewebe wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschnitten. Es wurden  $10\text{ }\mu\text{m}$  Schnitte angefertigt, und diese auf Objektträger transferiert. Die Lagerung erfolgte wiederum bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.7 Immunhistochemie von Gefrierschnitten

Die entnommenen und geschnittenen Gewebe wurden hierbei auf das Vorhandensein von Calcein AM gefärbten beziehungsweise eGFP-transfizierten Zellen hin untersucht. Zudem wurden bestimmte Zellstrukturen des Gewebes immunhistologisch angefärbt, um eine bessere Aussage über die Lage der gesuchten Zellen zu erhalten.

Die Gefrierschnitte wurden für 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und danach in einer eiskalten Aceton/Methanol Lösung (1:1) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert und permeabilisiert. Die Schnitte wurden in einer Färbekammer in 1X TBS für 5 min unter leichten Schwenken gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Die unspezifischen Bindestellen auf den Gewebeschnitten wurden mittels Ziegen- oder fötalem Kälberserum (2 % in 1X TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blockierungsschritt wurde der Primärantikörper zugeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper wurde in 2 % fötalem Kälberserum in TBS vorgenommen. Die Antikörper und deren jeweiligen Verdünnungen sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgte ein Waschschrift für 5 min in TBS. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, und danach wurden die Schnitte wiederum für 5 min in 1X TBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Es schloss sich eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 ( $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Nach einem erneuten Waschschrift für 5 min in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Mounting Medium (2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ) und einem Deckgläschen eingedeckelt. Der Nachweis der Antikörperfärbung erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Zeiss-Axiophot).

### 3. Ergebnisse

Um die Rolle zirkulierender Endothelvorläuferzellen besser verstehen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Vorläuferzellen isoliert und charakterisiert werden. In Kultivierungsexperimenten sollte ihre weitere Differenzierung untersucht werden. Schließlich sollte die Rolle der Vorläuferzellen im Tumorwachstumsgeschehen aufgenommen werden.

#### 3.1 Isolation von humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnur- und adultem Blut

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Abnahme, die aus Nabelschnurblut innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt, da ansonsten die RNA zu stark degradiert war und die Zellvitalität zurückging. Die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurden von den Erythrozyten, Thrombozyten und den Granulozyten mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Anschließend wurden mittels Magnetbeads, die anti-AC133 Antikörper auf ihrer Oberfläche trugen, aus den PBMC die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen über einen Magneten separiert. Die Reinheit der Population wurde mittels FACS ermittelt und lag bei über 85 %.

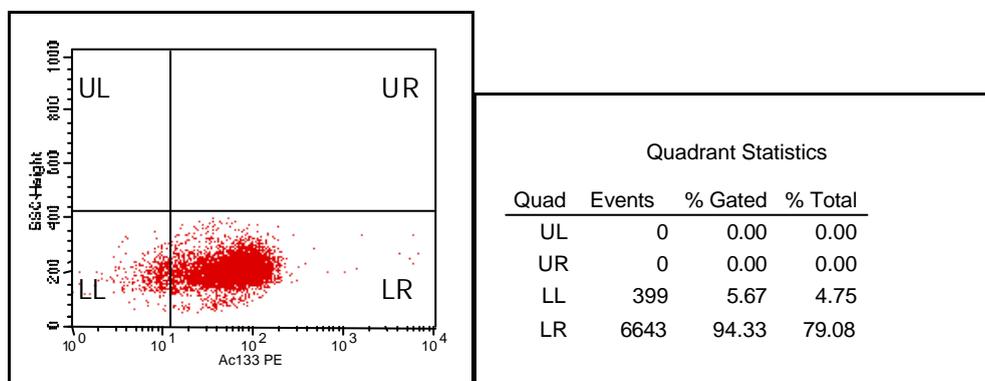


Abbildung 8: Beispiel einer FACS Analyse von AC133 isolierten Blutzellen. Lage der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen dargestellt in einem dot-plot Diagramm. Färbung mit anti-AC133 Antikörper Phycoerythrin markiert. Die Reinheit lag bei 94 %, siehe Feld LR (lower right).

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden durchschnittlich  $1,44 \cdot 10^6$  PBMC/ml adultem Blut ( $\pm 0,6 \cdot 10^6$ , n=67) isoliert und aus diesen konnten durchschnittlich  $1,2 \cdot 10^3$  ( $\pm 1,09 \cdot 10^3$ , n=68) AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen/ml adultem Blut gewonnen werden. Dies entsprach einem Anteil an positiven Zellen von 0,08 % ( $\pm 0,06$  %). Aus dem Nabelschnurblut konnten durchschnittlich  $5,5 \cdot 10^6$  ( $\pm 4,5 \cdot 10^6$ , n=38) PBMC pro ml Blut isoliert werden, und

daraus wurden durchschnittlich  $4,89 \cdot 10^4$  ( $\pm 4,08 \cdot 10^4$ ,  $n=38$ ) AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen/ml Blut gewonnen, was einem Anteil von 1,08 % ( $\pm 0,6$  %) entsprach. Im Laufe der Isolationsversuche aus dem humanem adultem Blut konnten die Ergebnisse der Zellzahlen der AC133 positiven Zellen verbessert werden. Im ersten Drittel der Isolationsversuche wurden durchschnittlich 0,05 % AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus einem ml Blut gewonnen und im letzten Drittel steigerte sich dieser Wert auf durchschnittlich ca. 0,11 % (siehe Abbildung 9). Bei der Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut konnte kaum eine Steigerung in der Ausbeute erreicht werden, da hier bereits die Technik schon weitgehend optimiert war. Hier wurden im ersten Drittel der Isolationen durchschnittlich ca. 0,9 % positive Zellen gewonnen und im letzten Drittel konnte der Anteil positiver Zellen auf durchschnittlich 1,15 % gesteigert werden (siehe Abbildung 10).

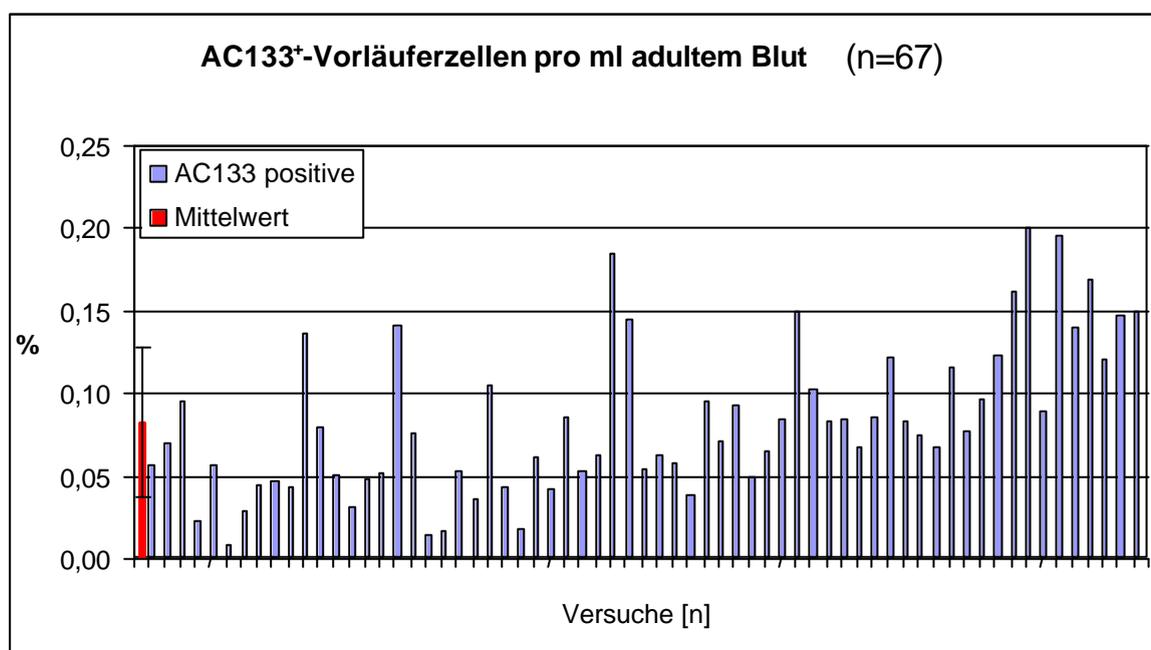


Abbildung 9: Der prozentuale Anzahl an AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in humanem adultem Blut. Der Anteil an AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen steigerte sich im Verlauf der Isolationsversuche. Der durchschnittliche Wert lag bei 0,09 % (roter Balken).

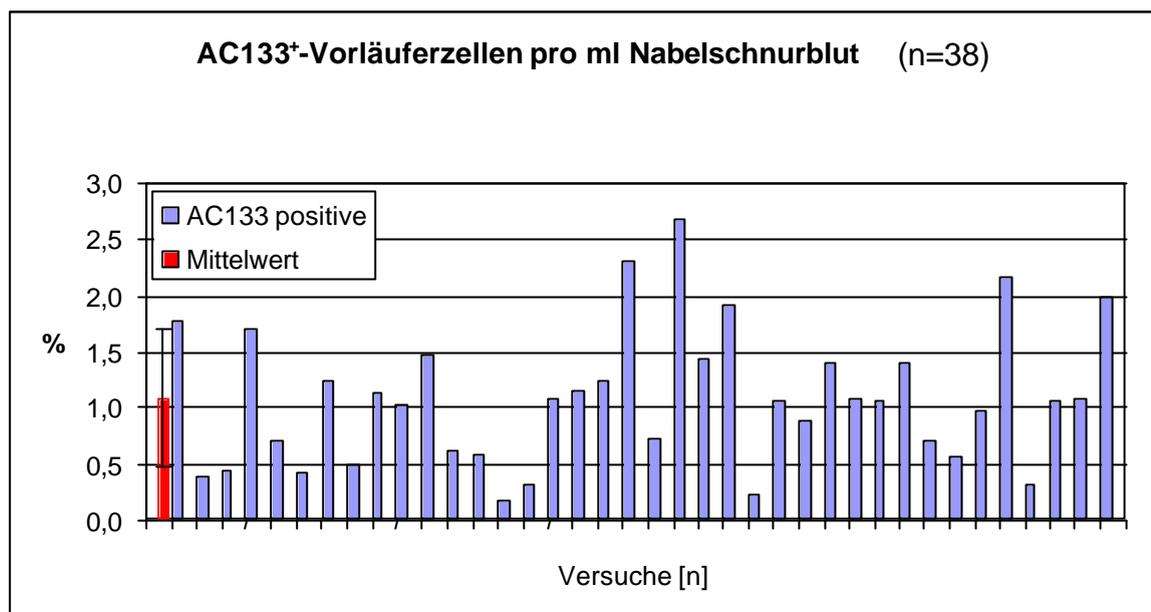


Abbildung 10: Der prozentuale Anzahl an AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in humanem Nabelschnurblut. Der Anteil an isolierten Zellen variierte stark im Verlaufe der Isolationsversuche, was auf die unterschiedlichen Lagerungszeiten der Blutproben zurückzuführen war. Der durchschnittliche Wert der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen lag bei 1,08 % (roter Balken).

### 3.2 Expressionsanalyse bestimmter Gene mit Hilfe der Real Time RT - PCR

Zur weiteren Charakterisierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen auf RNA-Ebene wurde die Gesamt-RNA aus lysierten Zellen mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gewonnen. Durch eine reverse Transkription wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Expressionsstärke der einzelnen Gene wurde mit Hilfe spezifischer Primer und Sonden untersucht und ins Verhältnis zur Expressionsstärke des Referenzgens GAPDH gesetzt, um eine semiquantitative Aussage zu erhalten. Zur Kontrolle wurden zunächst einige dieser Primer/Sonden-Kombinationen, die von Applied Biosystems hergestellt wurden, untersucht. Hierzu wurden für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Ausgangs-cDNA bei beiden Sequenzen (Ziel- und Referenzsequenz) die Ct-Werte ermittelt, und diese dann gegen den Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen. Der Ct-Wert gibt die Zykluszahl an, bei der ein zum ersten Mal ein Signal oberhalb des eingestellten Schwellenwertes detektiert wird. Die Differenz der beiden Steigungen der Ausgleichsgeraden musste im Bereich von +/- 0,1 liegen, um von einer Effizienz von annähernd 100 % ausgehen zu können. Dadurch wird erreicht, dass unterschiedliche Ct-Werte von Ziel- und Referenzsequenz nicht auf schlechte Primer beziehungsweise Sondenbindungen zurückzuführen sind, sondern auf Grund der unterschiedlich starken Expression der beiden Gene entstehen. Wie in Abbildung 11 zu sehen

ist, wiesen alle getesteten Primer/Sonden eine Effizienz von 100 % auf. Die Differenz der Steigungen der Ausgleichsgeraden von CD34 und GAPDH lag bei 0,06. Bei der Untersuchung der Primer und Sonden von vWF und GAPDH betrug die Differenz 0,11. Dieser Wert wurde auch bei der Differenz der Steigungen von CD31 und GAPDH erreicht. Insgesamt ließ sich somit feststellen, dass alle Primer und Sonden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden konnten. Die Effizienz der AC133 Primer/Sonden wurde auf Grund der geringen Menge an Probenmaterial nicht getestet.

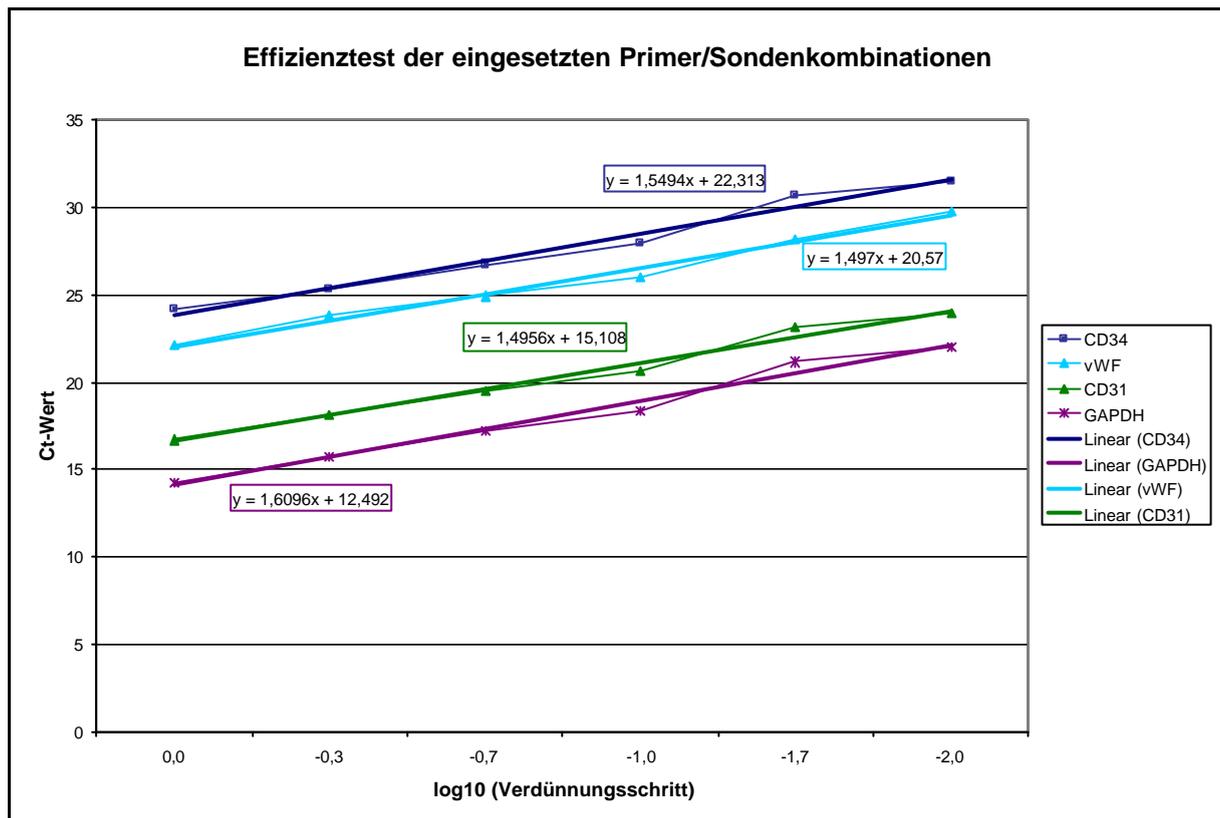


Abbildung 11: Effizienztest der verwendeten Primer/Sonden Kombinationen. Es wurden mittels cDNA aus MVEC die Primer und Sonden für die Gene CD34, CD31, vWF und GAPDH auf ihre Effizienz hin analysiert. Die Differenz der Steigungen der einzelnen Ausgleichsgerade mit der Steigung der Ausgleichsgerade des Haushaltsgens GAPDH musste bei ca. 0,1 liegen, um eine Effizienz von ca. 100 % zu erreichen. Dies war bei allen verwendeten Primer/Sonden Kombinationen der Fall.

### 3.2.1 Genexpression in humanem adultem Blut

Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden direkt nach der Isolation weiter für die RNA-Isolation verwendet, um eine Degradation von RNA zu vermeiden. Die Qualität und Quantität der RNA wurde mit Hilfe des Aligent 2100 Bioanalyzers bestimmt, der auch geringe Mengen an RNA nachweisen kann. Die Konzentration lag zwischen 8-30 ng/µl. Durch das Verhältnis von 18s

rRNA zu 28s rRNA können Rückschlüsse auf den Grad der Degradierung der RNA gezogen werden. Bei den hier gemessenen Proben wurde ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 erreicht, was einer sehr guten Qualität der RNA-Probe entspricht. Ein Beispiel einer Qualitäts- und Quantitätsbestimmung mittels des Agilent Bioanalyzers ist in Abbildung 12 dargestellt.

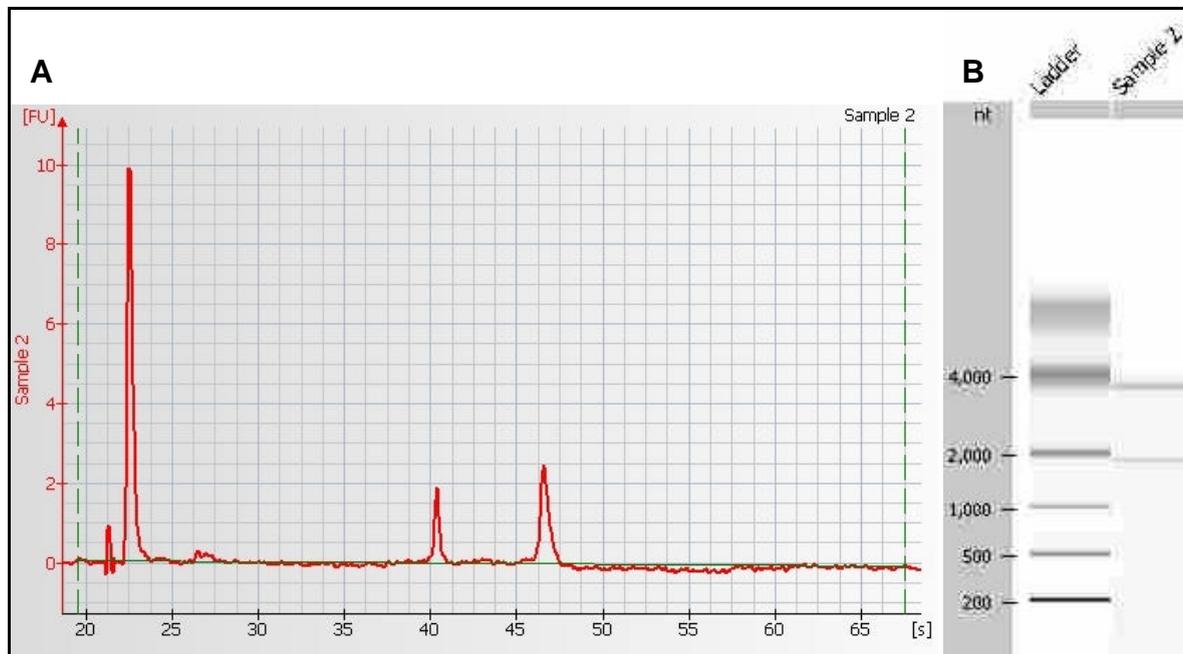


Abbildung 12: Ergebnis einer Qualitäts- und Quantitätsbestimmung isolierter RNA. A: Grafische Darstellung der Peaks der 18s rRNA (bei 40 sec) und 28s rRNA (bei ca. 46 sec) in einem Histogramm. Das Verhältnis der beiden rRNA lag bei 1,8, was auf eine gute Qualität der RNA hinwies. B: Darstellung des Lauf im Gel. Links ist der Marker angegeben und rechts die Probe, gut zu erkennen sind die Banden der 18s rRNA bei ca. 2000 nt und der 28s rRNA bei ca. 4000 nt.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Gene AC133, CD34, vWF und CD31 auf AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus adultem Blut sind der Abbildung 13 zu entnehmen. Die direkt nach der Isolation gewonnenen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen exprimierten AC133, bezogen auf GAPDH sehr schwach. CD34, hingegen wurde vergleichbar stark wie das Haushaltsgen GAPDH exprimiert. CD31 mRNA konnte ebenfalls nachgewiesen werden, vWF mRNA wurde nicht gefunden.

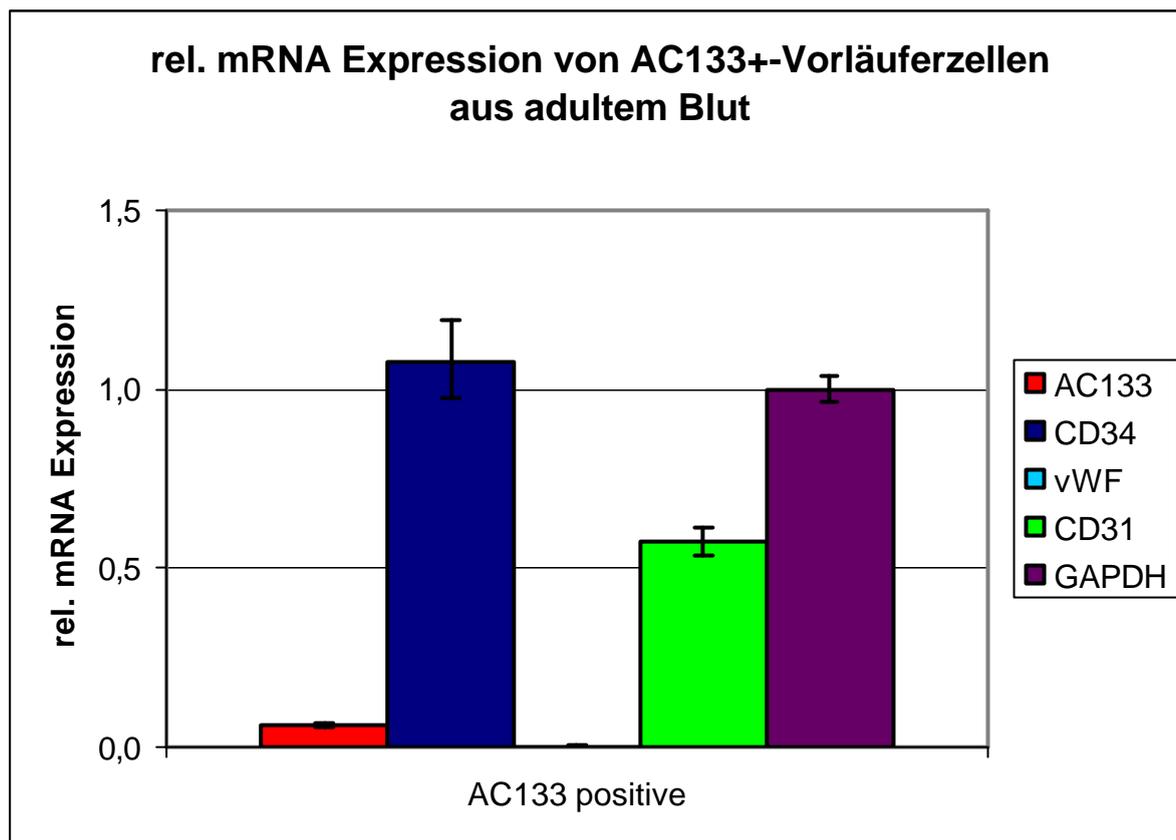


Abbildung 13: Bestimmung der relativen Expression von AC133, CD34, vWF und CD31 auf AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus humanem, adultem Blut. AC133 Expression konnte nachgewiesen werden, war aber deutlich schwächer als die Expression der Haushaltsgens GAPDH. CD34 wurde sehr stark exprimiert und lag im Bereich der Expression von GAPDH. vWF konnte nicht nachgewiesen werden, die Expression von CD31 betrug ca. 50 % der Expression von GAPDH.

### 3.2.2 Expression in humanem Nabelschnurblut

Die mRNA in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut wurde ebenfalls mittels des Agilent Bioanalyzers auf Konzentration und Reinheit untersucht. Die Konzentration schwankte zwischen 7 und 34 ng/μl je nach Probe. Das Verhältnis von 18s rRNA zu 28s rRNA lag bei diesen RNA-Proben bei 1,8 bis 2,0. Dies zeigte, dass auch die aus dem Nabelschnurblut gewonnene RNA eine gute Qualität aufwies. Aus der mRNA wurde cDNA revers transkribiert und diese im TaqMan® eingesetzt. Das Expressionsprofil der Gene AC133, CD34, vWF und CD31 ähnelte dem Profil in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem adultem Blut. AC133 wurde schwach exprimiert, CD31 konnte detektiert werden aber vWF wurde auch in diesen Zellen nicht exprimiert. CD34 hingegen wurde überexprimiert, siehe hierzu die Abbildung 14.

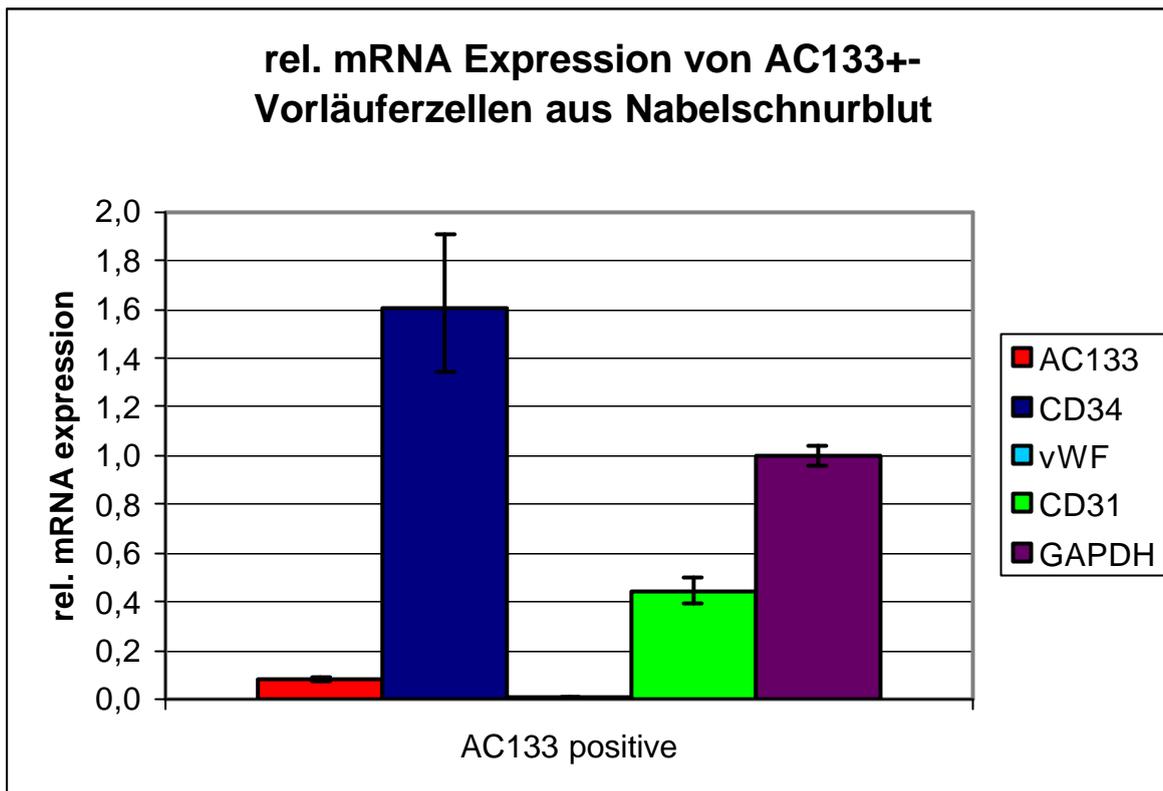


Abbildung 14: Bestimmung der relativen Expression von AC133, CD34, vWF und CD31 auf AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen isoliert aus Nabelschnurblut. AC133 Expression konnte nachgewiesen werden, war aber deutlich schwächer als die Expression der Haushaltsgens GAPDH. CD34 hingegen wurde um die Hälfte im Vergleich zu GAPDH überexprimiert. vWF konnte nicht nachgewiesen werden, die Expression von CD31 lag bei ca. 50 % der Expression von GAPDH.

### 3.2.3 Kultivierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in Kokultur mit verschiedenen Zelltypen

Da die Kultur von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen ohne Kokulturzellen starke Vitalitätsverluste sowie eine schlechte Proliferationsfähigkeit innerhalb der Kultivierungsperiode aufzeigte (Daten nicht gezeigt), wurden die aus dem Nabelschnur- und dem adulten Blut isolierten Vorläuferzellen mit verschiedenen Zelllinien im Transwell kokultiviert. Hierdurch wurde erreicht, dass die von den kokultivierten Zellen ausgeschütteten Faktoren zusätzlich zu denen im Medium enthaltenen für die Vorläuferzellen zur Verfügung standen. Mit Hilfe dieses Experimentes sollte der Einfluss der Zelllinien auf die Differenzierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen untersucht werden. Hierzu wurde die Änderung der Expressionsstärken einzelner Oberflächenproteine analysiert. Es wurde vier Wochen lang jede Woche eine Probe entnommen, die mRNA daraus isoliert und cDNA hergestellt, um Veränderungen in der Expression der Gene AC133, CD34, vWF und CD31 zu betrachten und den Einfluss der

kokultivierten Zellen auf die Genexpression zu untersuchen. Einerseits wurden die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit MVEC kultiviert, um festzustellen, ob sie sich hierdurch hin zu Endothelzellen differenzieren lassen, andererseits wurden die AC133<sup>-</sup>-PBMC verwendet, da diese die „natürliche“ Umgebung der aus dem Blut isolierten Zellen widerspiegeln. Drittens wurde mit HL60 Zellen, einer humane Promyeloblasten-Zelllinie, kokultiviert, um den Einfluss von Vorläuferzellen auf das Expressionsmuster der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu untersuchen. Zudem wurde bei jeder Probennahme die Vitalität der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bestimmt. Sie lag bei allen untersuchten Proben im gesamten Untersuchungszeitraum meist bei über 90 % (Daten nicht gezeigt). Ein Abfall in der Expression der untersuchten Gene auf Grund von Vitalitätsverlusten konnte somit ausgeschlossen werden.

### **3.2.3.1 mRNA Expression bestimmter Gene in kultivierten AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus adultem Blut**

Die Kokultur von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) führte zu einem starken Anstieg in der Expression von CD31 innerhalb der ersten 3 Wochen. Zudem wurde die Expression von AC133 und CD34 innerhalb der ersten Woche herunterreguliert und war nicht mehr nachweisbar. Bei der Kokultur mit PBMC wurde ebenfalls ein Anstieg der CD31 Expression detektiert, dieser war aber geringer als bei der Kokultur mit MVEC. Schließlich zeigte die Kokultur mit der Promyeloblasten-Zelllinie HL60, dass nun alle untersuchten Gene nur noch schwach exprimiert wurden. Zudem ließ sich hier eine Verringerung der CD31 Expression innerhalb der Kultivierungsperiode erkennen. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Kultur von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus adultem Blut in grafischer Form.

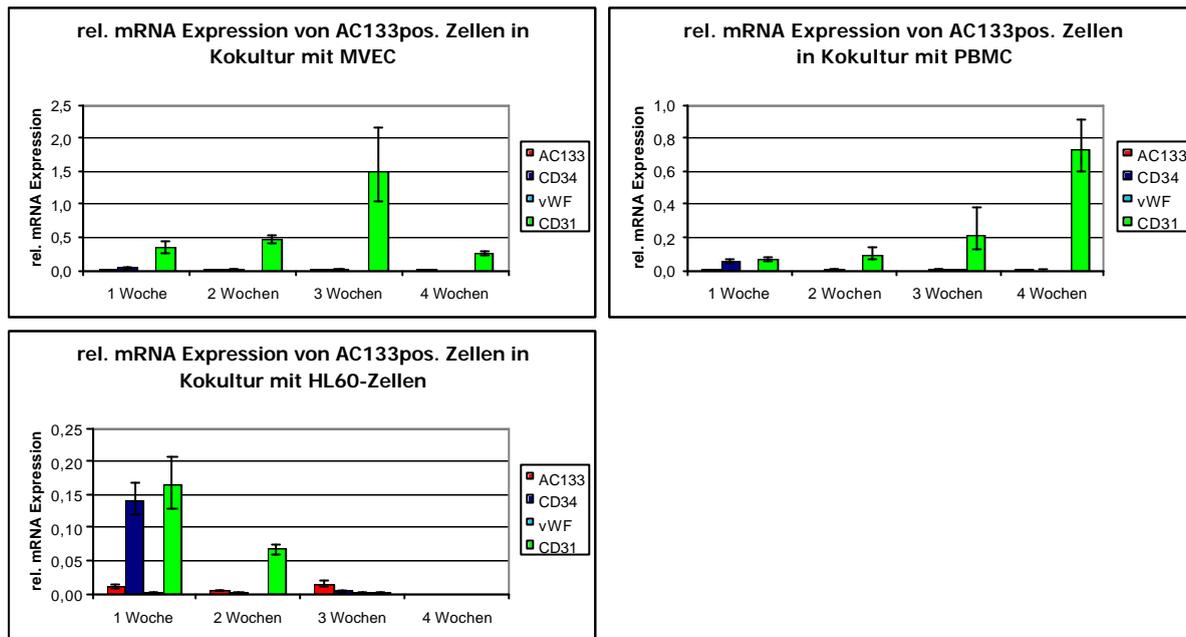


Abbildung 15: Kokultivierung von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit unterschiedlichen Zellarten. AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus adultem Blut wurden mit verschiedenen humanen Zelllinien kokultiviert und die mRNA zu bestimmten Zeitpunkten isoliert. Einzelne Gene wurden auf ihren Expressionsverlauf innerhalb der Kultivierungsperiode hin analysiert. Es zeigte sich, dass durch die Kokultur mit MVEC die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen die Genexpression von AC133 und CD34 herunter regulierten, und die CD31 Expression innerhalb der ersten 3 Wochen stark anstieg, in der 3. Woche wurde CD31 um die Hälfte stärker exprimiert als das Referenzgen GAPDH. Bei der Kultur mit PBMC ließ sich ebenfalls ein Anstieg der CD31 Genexpression nachweisen, wenn auch bis zur 4. Woche keine Überexpression nachgewiesen werden konnte. AC133 und CD34 waren ebenfalls nach der ersten Woche nicht mehr detektierbar. Bei der Kultur mit HL60 Zellen wurden die betrachteten Gene nur sehr schwach exprimiert. Es konnte auch keine Zunahme der Expression von CD31 nachgewiesen werden. VWF konnten bei allen drei Varianten im gesamten Verlauf der Kultivierung nicht detektiert werden.

### 3.2.3.2 mRNA Expression bestimmter Gene in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Wurden AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut kultiviert, so ergaben sich Ergebnisse, wie sie in Abbildung 9 dargestellt sind. Die Kokultur mit MVEC zeigte einen starken Anstieg in der CD31 Expression im Verlauf der Kultivierungsperiode, ähnlich wie bei AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus adultem Blut isolierten. vWF wurde auch hier nicht exprimiert, und die Expression der Gene AC133 und CD34 war innerhalb einer Woche nicht mehr nachweisbar. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich bei der Kokultur mit PBMC. CD31 stieg innerhalb der 4 Wochen stark an und erreichte das Expressionsniveau von GAPDH. CD34, AC133 und vWF waren nicht mehr detektierbar. Bei der Kokultur der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit HL60 Zellen ergaben sich Differenzen, je nachdem, ob adultes oder Nabelschnurspenderblut eingesetzt

wurde. Die Expression von CD31 war stärker und nahm in der 4. Woche stark zu. AC133 und CD34 konnten schon nach einer Woche nicht mehr detektiert werden.

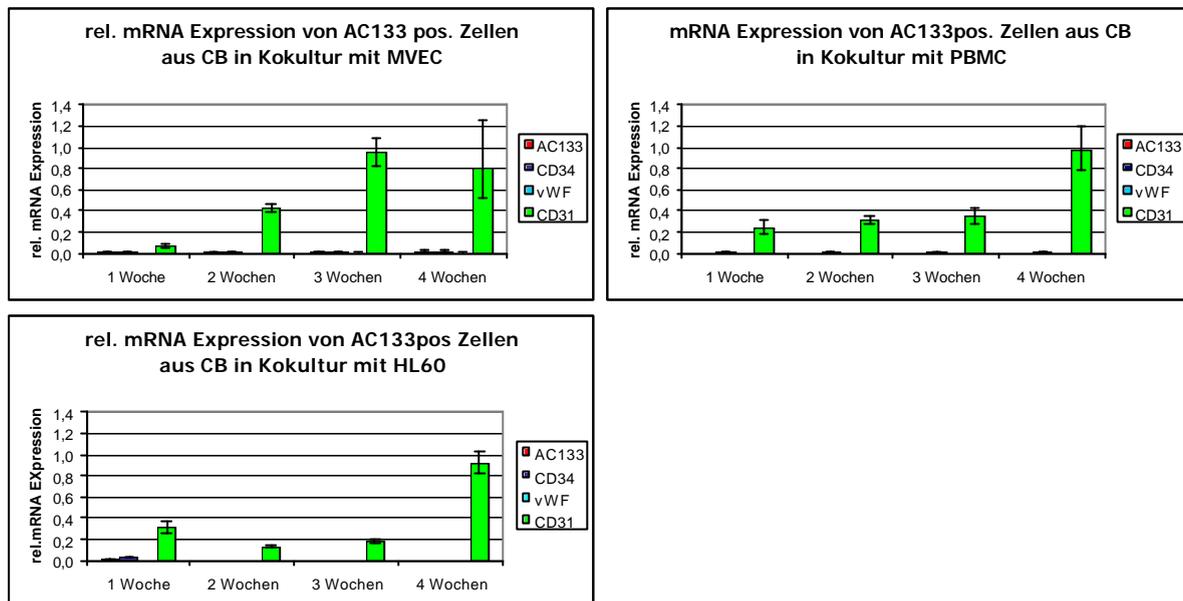


Abbildung 16: AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut wurden mit verschiedenen humanen Zelllinien kokultiviert und die mRNA zu bestimmten Zeitpunkten isoliert. Einzelne Gene wurden auf ihre Expression hin untersucht und der Verlauf der Expression innerhalb der Kultivierungsperiode analysiert. Es zeigte sich, dass durch die Kokultur mit MVEC die AC133 positiven Zellen die Genexpression von AC133 und CD34 runterregulierten, und die CD31 Expression innerhalb der Kultivierungsperiode stark ansteigt. Bei der Kultur mit PBMC ließ sich ebenfalls ein Anstieg der CD31 Genexpression nachweisen. AC133 und CD34 konnten hier ebenfalls innerhalb der ersten Woche nicht mehr detektiert werden. Bei der Kultur mit HL60 Zellen wurden die betrachteten Gene nur sehr schwach exprimiert. Die Expression von CD31 nahm innerhalb der ersten 3 Wochen ab und erst in der 4. Woche ließ sich eine starke CD31 Expression nachweisen. vWF konnten bei allen drei Varianten im gesamten Verlauf der Kultivierung nicht detektiert werden.

### 3.3 Affymetrix Chip Analyse der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen

Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden mit Hilfe des HG-U 133 Plus 2.0 Chips sowie eines speziell für Schering entwickelten Chips saTIVA auf ihr Expressionsmuster hin untersucht. Hierbei sollte durch den Vergleich mit den Expressionsprofilen anderer humaner Zelltypen der Verwandtschaftsgrad der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit diesen Zelltypen geklärt werden. Zusätzlich sollten einige Gene in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen gefunden werden, die sich in ihrem Expressionsmuster stark von denen der anderen Zelltypen unterscheiden. Es wurden MVEC, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, T-Helferzellen (TH-1), dendritische Zellen, humanes Knochenmark sowie die bei der Isolation gewonnenen AC133<sup>-</sup>-PBMC zum Vergleich

mit den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eingesetzt. Zudem wurden die Tumorzelllinien EO-1 (eosinophile Leukämiezelllinie), THP-1 (monozytische Leukämiezelllinie) sowie HL60 (promyeloblastische Leukämiezelllinie) als Vertreter der Blutkrebszelllinien in den Vergleich mit einbezogen.

### 3.3.1 Vergleich der Ergebnisse aus der Taqman Analyse mit denen der Chip Analyse

Bei der Betrachtung der Gene AC133, CD34, CD31 und vWF war zu sehen, dass das Expressionsprofil im Affymetrix Array HG-U 133 Plus 2.0 mit dem der TaqMan® Analyse vergleichbar war.

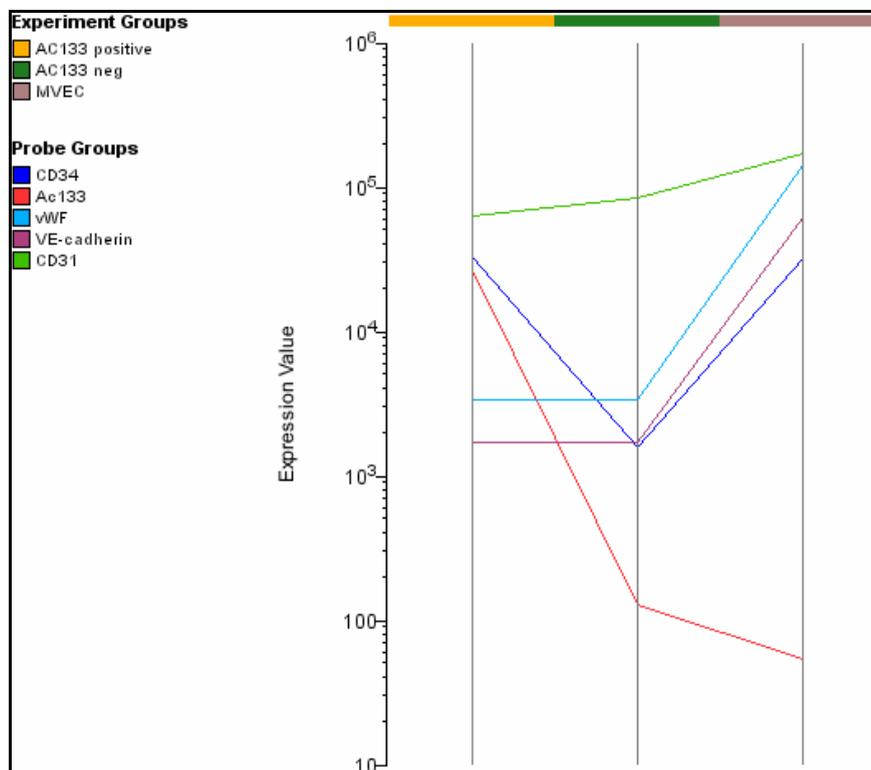


Abbildung 17: Expressionsvergleich einzelner Gene in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, AC133 negativen (PBMC) und MVEC mittels Affymetrix. Es wurden die Gene AC133, CD34, CD31, vWF und VE-Cadherin mit Hilfe des HG-U 133 Plus 2.0 analysiert. Es ist gut zu erkennen, dass AC133 (rot) ausschließlich in den mit AC133 Mikrobeads isolierten Zellen exprimiert wurde. CD34 (dunkelblau) wird in AC133 positiven und MVEC exprimiert, nicht aber in AC133 negativen. Die endothelzellspezifischen Gene vWF (hellblau) und VE-Cadherin (violett) wurden nur in MVEC detektiert und CD31 (grün) wurde am stärksten in MVEC exprimiert.

Es konnte auch hier die Expression von AC133 nur bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und nicht bei den AC133<sup>-</sup>-PBMC nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, trat AC133 nicht in MVEC

auf. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, unterschieden sich die Expressionsmuster beider Zellarten um den Faktor  $>200$ , wobei AC133 in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen relativ zu GAPDH nur gering exprimiert wurde. Die Genexpression von CD34 wurde nicht in PBMC, aber in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte durch die Daten der TaqMan® Analyse bestätigt werden. Die Expression von CD31 war in allen drei Zelltypen zu erkennen, war aber in MVEC am stärksten. Insgesamt bestätigen sich die Daten der Affymetrix Analyse und der semiquantitativen RT-PCR Untersuchung gegenseitig.

### **3.3.2 Untersuchung des Verwandtschaftsgrades der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit anderen Zelltypen**

Die Untersuchung des Verwandtschaftsgrades der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurde mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis (PCA)) durchgeführt. Die PCA erlaubt die Analyse und die Darstellung multidimensionaler Datensätze, die bei Genexpressionsanalysen aus  $m$  Beobachtungen (Anzahl der Proben) und  $n$  Variablen (Anzahl der untersuchten Gene) auf einem Chip bestehen. Das Ziel der PCA ist dabei die Reduktion der Dimensionalität einer komplexen Datenmatrix durch die Identifikation neuer Variablen, den Principal Components, in denen Informationen konzentriert werden (Sturn et al., 2002). Die PCA erlaubt die Darstellung grundlegender Muster der Genexpression. Geringe Unterschiede in den Daten werden schwächer bewertet. Die Darstellung der Principal Components geschieht als Punkte in einem dreidimensionalen Koordinatensystem. Punkte, die in diesem Koordinatensystem nah beieinander liegen, haben ähnliche Eigenschaften, beruhen daher auf ähnlichen Expressionsdaten. Punkte mit größerer Distanz zueinander sind sich nicht ähnlich und beruhen auf unterschiedlichen Expressionsdaten.

Die Ergebnisse der PCA sind in Abbildung 18 dargestellt. Es konnte eine deutliche Trennung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen von den MVEC sowie den Promyeloblastenzelllinien HL60, THP-1 und EOL-1 nachgewiesen werden. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen lagen in der Nähe der gesamten PBMC beziehungsweise der T-Zellen/ T-Helferzellen und Monozyten/ Makrophagen sowie dendritischen Zellen. Zudem war ihr Expressionsmuster dem der Knochenmarkszellen relativ ähnlich. Insgesamt ließ sich aber erkennen, dass das Expressionsmuster der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in dieser Multivariantenanalyse keinem der anderen Expressionsmuster der betrachteten Zelltypen glich, sondern eine eigenständige Population darstellte.

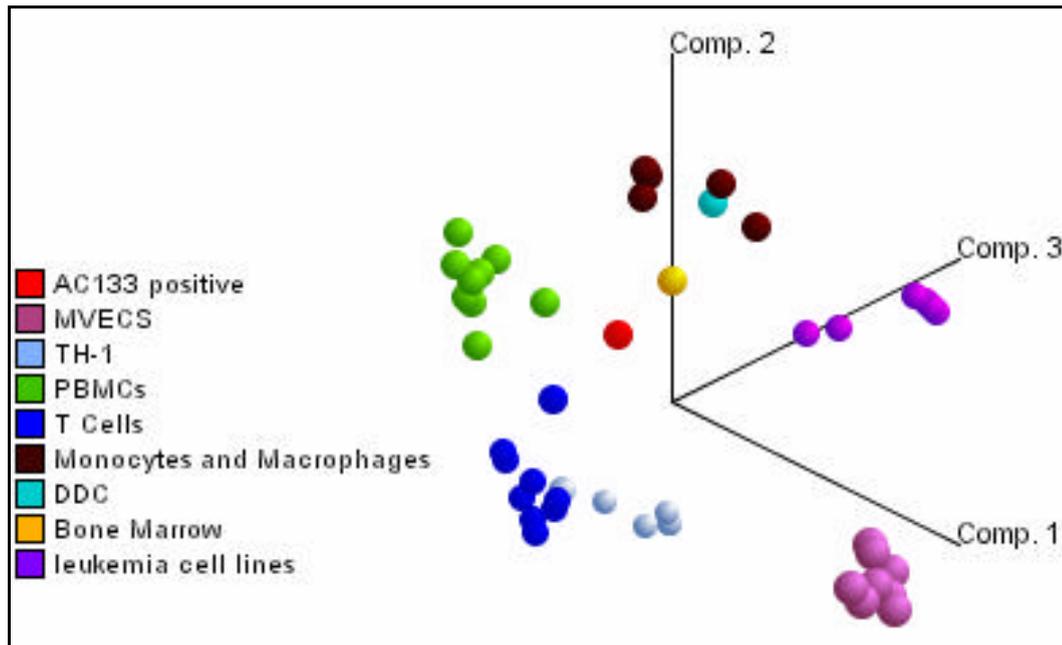


Abbildung 18: Lage der Expressionsmuster der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

### 3.3.3. Analyse der differentiellen Genexpression von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit MVEC

Durch die Analyse mit Hilfe der Expressionist Analyst 2.0 Software konnten bei der Betrachtung der Genexpression auf dem HG-U 133 Plus 2.0 Chip von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu MVEC 1181 mindestens 10fach überexprimierte Gene gefunden werden. Einige dieser überexprimierten Gene sind in Tabelle 18 aufgelistet. Unter diesen Genen wird zum Beispiel Angiopoietin 1 von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu den MVEC stark exprimiert. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das eine große Rolle in der Gefäßentwicklung und bei der Angiogenese spielt (Suri et al., 1996). Angiopoietin 1, ein Ligand des Tie2 Rezeptors spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen den Endothelzellen und umgebender Matrix sowie dem Mesenchym (Suri et al., 1996). Ein weiteres stark exprimiertes Gen ist Epiregulin. Es spielt möglicherweise eine Rolle bei der Zelldifferenzierung sowie als Mitogen bei der Zellproliferation und/oder Angiogenese (Shelly et al., 1998; Shirasawa et al., 2004). Auch fms-related Tyrosinkinase 3 ist hochreguliert. Es spielt eine Rolle bei der Regulation der hämatopoetischen Zellproliferation (Small et al., 1994). Das überexprimierte Gen Junctional adhesion molecule 2 (JAM2) dient als Adhäsionsligand und wird auf Endothelzellen sowie Leukozyten und Thrombozyten exprimiert (Aurrand-Lions et al., 2002). Das Gen für das Protein Myeloperoxidase, welches ebenfalls überexprimiert wird, spielt eine große Rolle bei Entzündungsreaktionen und wird von

Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten exprimiert (Eiserich et al., 2002; Murao et al., 1988).

<b>Tabelle 18: Auswahl aus in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mindestens 10fach überexprimierten Gene im Vergleich zu mikrovasulären Endothelzellen (MVEC).</b>			
<b>Gen</b>	<b>Accession Nr</b>	<b>biologische Funktion</b>	<b>Literaturstelle</b>
Acrosin binding protein	NM_032489	unbekannt	(Ono et al., 2001)
Angiopoietin 1	NM_001146	Zelldifferenzierung, Signaltransduktion	Suri et al., 1996
Chordin-like 1	NM_145234	Embryonalentwicklung	(Nakayama et al., 2001)
Corticotropin releasing hormone binding protein	NM_001882	Signaltransduktion	(Linton et al., 1990)
Epiregulin	NM_001432	Regulation: Zelldifferenzierung, -proliferation, Zellzyklus	Shelly et al., 1998; (Shirasawa et al., 2004)
fms-related tyrosine kinase 3	NM_004119	Regulation der Zellproliferation	Small et al., 1994
junctional adhesion molecule 2	NM_021219	Zell-Zell Adhäsion	Aurrand-Lions et al., 2002
Myeloperoxidase	NM_000250	Anti-Apoptose, Antwort auf oxidativen Stress	Eiserich et al., 2002; Murao et al., 1988
Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C	NM_000908	Skelettentwicklung	(Nakayama, 2005)

### **3.3.4. Analyse der differentiellen Genexpression von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit PBMC**

Einige der auf dem HG-U 133 Plus 2.0 Chip mindestens 10fach überexprimierten Genen in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) sind in Tabelle 19 dargestellt. Insgesamt konnten 313 Gene gefunden werden. Das Protein Chordin-

like 1 wird vor allem während der frühen Entwicklungsphase in embryonalem Gewebe exprimiert. Die Expression nimmt in späteren Phasen ab und das Protein wird nur sehr gering in adulten Geweben, unter anderem in Stromazellen im Knochenmark, exprimiert (Nakayama et al., 2001). Corticotropin releasing hormone binding protein bindet das Corticotropin releasing hormone, welches vor allem während der Schwangerschaft gebildet wird. Durch die Bindung wird das Hormon im Serum inaktiviert und somit wird möglicherweise eine falsche Stimulation der Nebennierenhypophyse in der Schwangerschaft verhindert (Linton et al., 1990). Das Gen für  $\alpha 9$  Integrin ermöglicht unter anderem die Zell-Zell sowie Zell-Matrix Adhäsion von neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen (Ross et al., 2005). Wie auch bei dem Vergleich mit MVEC wurde hier ebenfalls Myeloperoxidase 25fach in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen überexprimiert.

**Tabelle 19: Auswahl aus in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mindestens 10fach überexprimierten Gene im Vergleich zu peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)**

Gen	Accession Number	Kategorie	Literaturstelle
Chordin-like 1	NM_145234	Embryonalentwicklung	Nakayama et al., 2001
Corticotropin releasing hormone binding protein	NM_001882	Signaltransduktion	Linton et al., 1990
Frizzled homolog 7	NM_008057	Metabolismus	(Sagara et al., 1998)
Integrin, alpha 9	NM_002207	Zell-Matrix Adhäsion	Ross et al., 2005
Meis1	NM_002398	Transkriptionsregulation	(Thorsteinsdottir et al., 2001)
Myeloperoxidase	NM_000250	Anti-Apoptose, Antwort auf oxidativen Stress	Eiserich et al., 2002; Murao et al., 1988
Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C	NM_000908	Skelettentwicklung	(Nakayama, 2005)

### 3.3.5 Analyse der differentiellen Genexpression von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit den Promyeloblastenzelllinien

In der Tabelle 20 sind einige der insgesamt 46 Gene, die auf dem saTIVA Chip mindestens 10fach in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu den Tumorzelllinien EO-1 (eosinophile Leukämiezelllinie), THP-1 (monozytische Leukämiezelllinie) sowie HL60 (promyeloblastische Leukämiezelllinie) überexprimiert wurden, aufgelistet. Unter anderem wurde ADAM8, das möglicherweise eine Rolle bei dem Übergang von Leukozyten aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe spielt, exprimiert (Schlomann et al., 2002). Des Weiteren wurde Angiopoietin 1 in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wie auch schon bei dem Expressionsvergleich mit MVEC überexprimiert. CD62, auch L-Selectin genannt, spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (Genbacev et al., 2003). Calgranulin A und B wurden ebenfalls in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu den Tumorzelllinien überexprimiert, diese Proteine werden vor allem von Makrophagen und von Epithelzellen gebildet (Broome et al., 2003). Calgranulin A und B wird eine Rolle bei der Interaktion von Monozyten und Epithelzellen zugewiesen (Broome et al., 2003). Cytokin-like 1 wurde auch in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen überexprimiert, es spielt bei der Signaltransduktion beziehungsweise der Rezeptorbindung eine Rolle und tritt ausschließlich in CD34<sup>+</sup> Knochenmarks- und Nabelschnurblutzellen auf (Liu et al., 2000). Des Weiteren wurde RhoH überexprimiert. Es wird ausschließlich in Zellen hämatopoetischer Herkunft gebildet und hat möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Proliferation hämatopoetischer Zellen (Gu et al., 2005a; Gu et al., 2005b). Der Sphingosine-1-phosphate (S1P) Rezeptor EDG1 wird vor allem in Endothelzellen gebildet und reguliert die Differenzierung dieser Zellen (Takuwa et al., 2002).

<b>Tabelle 20: Auswahl aus in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mindesten 10fach überexprimierten Gene im Vergleich zu den Tumorzelllinien EO-1, HL60 und THP-1.</b>			
<b>Gen</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Literaturstelle</b>
ADAM8	NM_001109	Proteolyse	(Schlomann et al., 2002)
Angiopoietin 1	NM_001146	Zelldifferenzierung, Signaltransduktion	Davis et al., 1996; Kim et al., 2000; Maisonpierre et al., 1997; Suri et al., 1996
CD62	NM_000655	Zell-Zell Interaktion	(Genbacev et al., 2003)
Calgranulin A	NM_002964	Entzündungsantwort	(Broome et al., 2003)

Gen	Accession Number	Kategorie	Literaturstelle
Calgranulin B	NM_002965	Entzündungsantwort	(Broome et al., 2003)
Cytokin-like 1	NM_018659	Signaltransduktion	(Liu et al., 2000)
EDG1	NM_001400	Signaltransduktion , Zelladhäsion	(Takuwa et al., 2002)
RhoH	NM_004310	T-Zelldifferenzierung	(Gu et al., 2005a; Gu et al., 2005b)

### 3.3.6 Analyse der differentiellen Genexpression von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit Knochenmarkszellen

Bei der Expressionsanalyse von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu Knochenmarkszellen wurden auf dem saTIVA Chip 14 Gene gefunden, die mindestens 8fach in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen überexprimiert wurden. (Die Zahl der 10fach überexprimierten lag bei 4 Genen). Einige der Gene sind in Tabelle 21 aufgelistet. Wie auch schon bei dem Vergleich mit Tumorzelllinien konnte hier Cytokin-like 1 gefunden werden. Des Weiteren wurde G protein-coupled receptor 56 überexprimiert. Dieses Protein ist möglicherweise notwendig für Zell-Zell Interaktionen und wird vor allem in Makrophagen, aber nur geringfügig in Monozyten im Blut exprimiert (Shashidhar et al., 2005).

**Tabelle 21: Auswahl aus in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mindestens 8fach überexprimierten Gene im Vergleich zu Knochenmarkszellen.**

Gen	Accession Number	Kategorie	Literaturstelle
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	NM_000866	Signaltransduktion	(Lanfumej and Hamon, 2004)
Cytokin-like 1	NM_018659	Signaltransduktion	(Liu et al., 2000)
G-protein coupled receptor 56	NM_005682	Zelladhäsion/ Zell-Zell Signaling	(Shashidhar et al., 2005)

### 3.4 Untersuchung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und der AC133<sup>-</sup>-PBMC auf die Expression von Oberflächenproteinen

Nach der Untersuchung der Genexpression wurde auch die Expression einiger Gene auf Proteinebene analysiert. Mit Hilfe geeigneter Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die

AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowie die AC133<sup>-</sup>-PBMC auf das Vorhandensein bestimmter Oberflächenproteine im FACS untersucht. Um falsch-positive Ergebnisse durch die Eigenfluoreszenz und die unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurden entsprechende Isotypkontrollen eingesetzt. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und die AC133<sup>-</sup>-PBMC aus humanem adultem Blut und Nabelschnurblut wurden getrennt voneinander betrachtet, aber mit den selben Antikörpern auf die Expression definierter Oberflächenproteine untersucht.

Die Größe und Granularität der Zellen wurden in einem Punktdiagramm (dot plot) dargestellt, um die einzelnen mononukleären Blutzelltypen besser erkennen zu können. Wie in der Abbildung 19 zu sehen ist, wurden bei der Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen die Monozyten und Makrophagen abgetrennt. Die Fraktion der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen befand sich vor allem im Bereich der Lymphozyten.

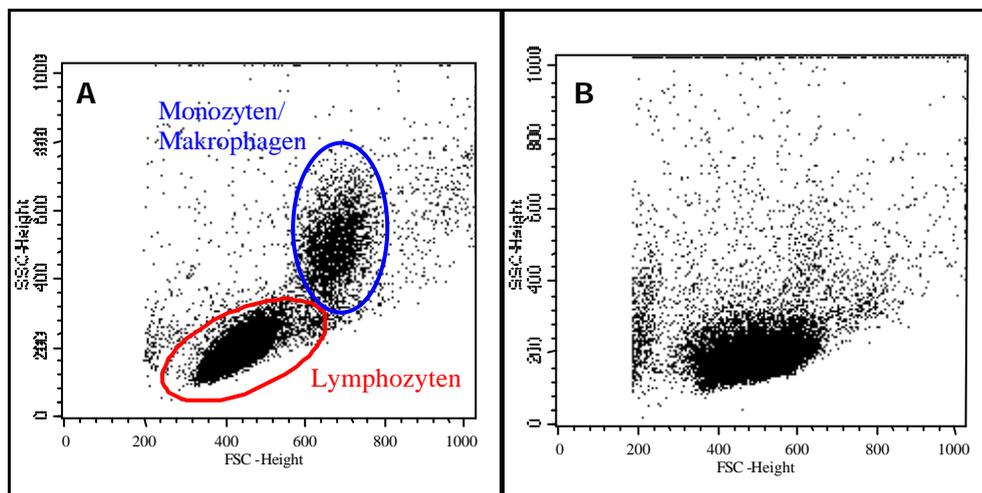


Abbildung 19: Punktdiagramm vor und nach der Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus peripheren mononukleären Zellen, dargestellt im Bezug auf Größe, angegeben durch die Vorwärtslichtstreuung (FSC) und Granularität, angegeben durch die Seitwärtslichtstreuung (SSC). **A:** Darstellung der PBMC nach der Gewinnung mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Blut. **B:** Lage der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nach der Isolation. Es ist gut zu erkennen, dass nach der Isolation ein großer Teil der PBMC, die Monozyten/Makrophagen-Fraktion, nicht mehr vorhanden war.

### 3.4.1 Oberflächencharakterisierung von isolierten Zellen aus humanem adultem Blut

Zur weiteren Charakterisierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus humanem adultem Blut wurden die Antikörper AC133, CD34, cKit, CD45, CD13 und CD31 sowie die endothelzellspezifischen Antikörper vWF und VEGFR-2 verwendet. Zusätzlich wurden die bei

der Isolation gewonnenen AC133<sup>-</sup>-PBMC mit den gleichen Antikörpern behandelt, um die Expression auf diesen Zellen ebenfalls zu untersuchen. Wie in Abbildung 20 zu sehen, exprimierten die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen die Oberflächenrezeptoren AC133, CD34, cKit und CD13. CD31 wurden nur schwach und VEGFR-2 gar nicht detektiert. Die Expression von CD45 konnte detektiert werden, war aber deutlich geringer als bei den AC133<sup>-</sup>-PBMC.

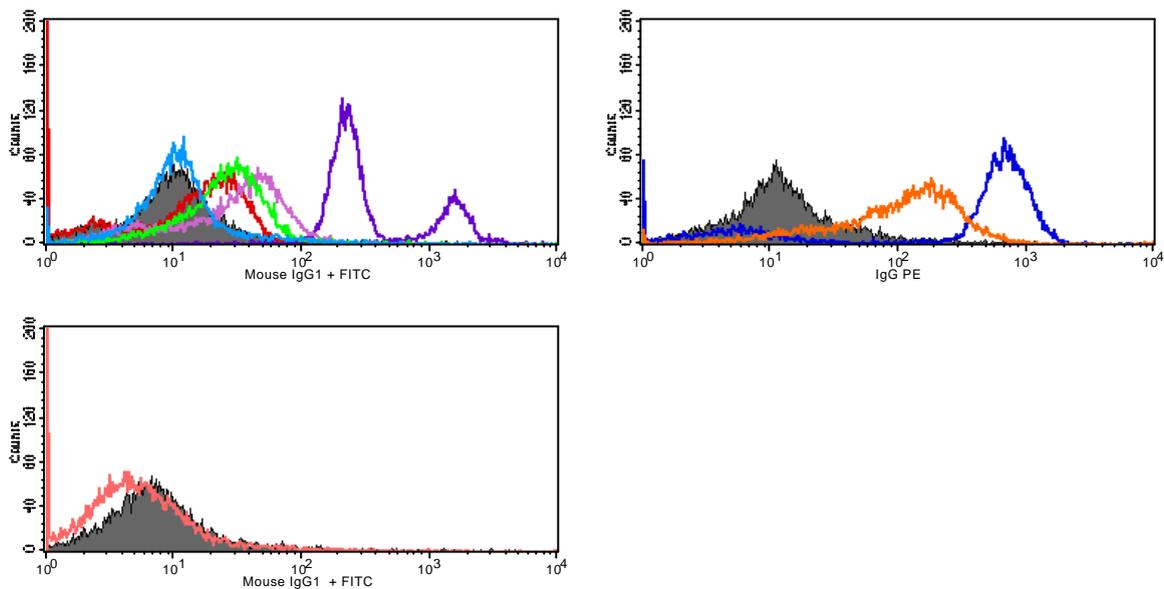


Abbildung 20: Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen auf AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus peripherem Blut, detektiert mittels FACS. Die Expression von AC133 (rot), CD34 (blau), cKit (orange), CD13 (pink), CD31 (grün) und CD45 (violett) konnte nachgewiesen werden, die Oberflächenproteine vWF (hellblau) und VEGFR-2 (rosa) konnten gar nicht detektiert werden. Die Isotypkontrolle (grau unterlegt) diente als Negativkontrolle.

Bei den AC133<sup>-</sup>-PBMC konnte keine Färbung mit den Antikörpern gegen AC133, CD34 sowie VEGFR-2 gezeigt werden, der PAN-Leukozytenmarker CD45 wurde, wie zu erwarten war, hingegen stark exprimiert, siehe Abbildung 21. Zudem wurden cKit, CD31 und CD13 auf einem Teil der AC133<sup>-</sup>-PBMC exprimiert.

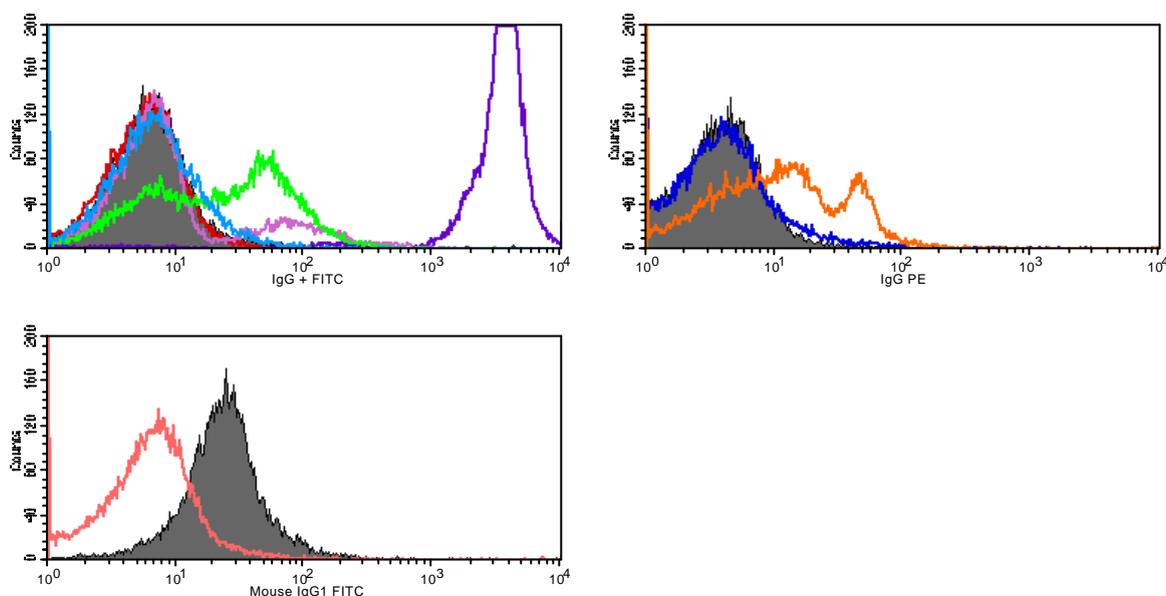


Abbildung 21: Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen auf AC133<sup>+</sup>-PBMC Zellen, detektiert mittels FACS. Das Oberflächenprotein CD45 (violett) konnte auf alle Zellen sehr deutlich nachgewiesen werden. Hingegen wurden cKit(orange), CD31 (grün) und CD13 (pink) nur auf einem Teil der Zellpopulation exprimiert. Die Expression von AC133 (rot), CD34 (blau) sowie VEGFR-2 (rosa) konnte nicht nachgewiesen werden. Die Isotypkontrolle (grau unterlegt) diente als Negativkontrolle.

Die Ergebnisse der FACS Analyse der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem humanem adultem Blut sowie der bei der Isolation anfallenden AC133<sup>+</sup>-PBMC sind qualitativ in Tabelle 22 zusammengefasst. Nicht vorhandene Proteine werden mit „-“ angegeben. Proteine, die nur auf einem Teil der AC133<sup>+</sup>-PBMC exprimiert werden, werden mit „(+)“ angegeben und überall exprimierte mit „+“ beziehungsweise stark exprimierte mit „++“.

Tab.22: Expression verschiedener Oberflächenproteine auf AC133 positiven beziehungsweise AC133 <sup>+</sup> -PBMC aus humanem adultem Blut.								
Zelltyp	Oberflächenprotein							
	AC133	CD34	cKit	CD45	CD13	CD31	vWF	VEGFR-2
AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen	+	++	+	+	+	+	-	-
AC133 <sup>+</sup> -PBMC	-	-	(+)	++	(+)	(+)	-	-

### 3.4.2 Oberflächencharakterisierung von isolierten Zellen aus humanem Nabelschnurblut

Um einen möglichen Unterschied in der Expression der Oberflächenproteine bei AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnur gegenüber denen aus adultem Blut festzustellen, wurden die aus Nabelschnurblut isolierten Zellen mit den gleichen Antikörpern analysiert. Es wurden die Antikörper AC133, CD34, CD45, CD13 und CD31 sowie die endothelzellspezifischen Antikörper vWF und VEGFR-2 verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zu sehen. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut wiesen ebenfalls eine deutliche Expression von AC133 und CD34 auf. Die Oberflächenproteine CD31 und vWF wurden nicht nachgewiesen. Die Proteine CD45 und CD13 wurden hingegen detektiert. Zudem konnten der endothelzellspezifische Rezeptor VEGFR-2, wenn auch nur sehr schwach, ebenfalls nachgewiesen werden.

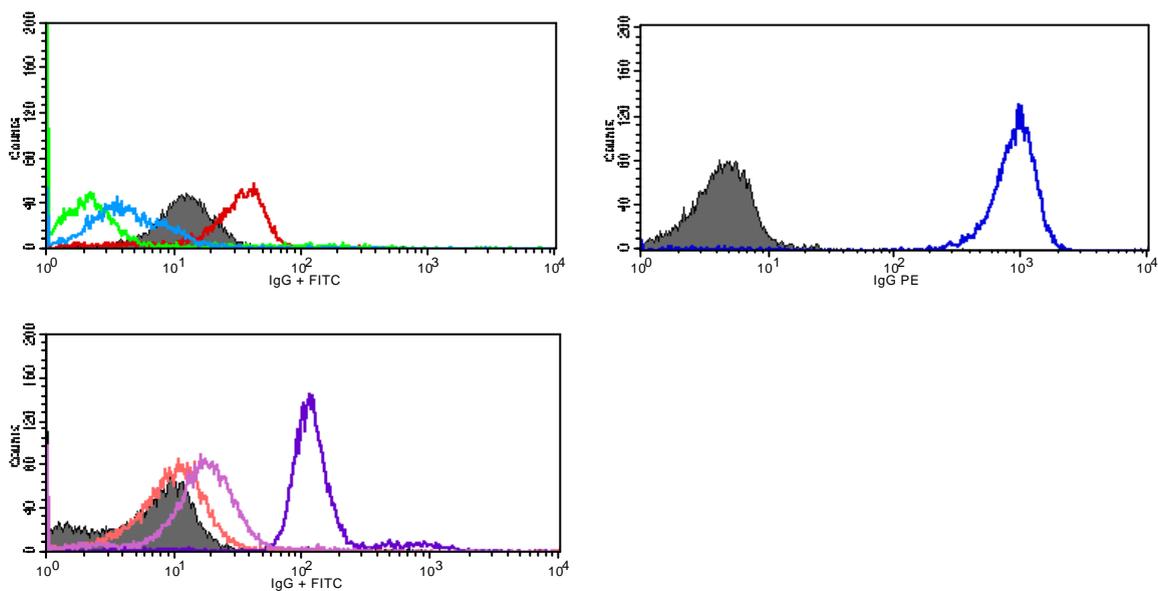


Abbildung 22: Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen auf AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut., detektiert mittels FACS. AC133 (rot), CD34 (blau) und CD45 (violett) Expression konnte nachgewiesen werden, die Oberflächenproteine VEGFR-2 (rosa) und CD13 (pink) konnten nur sehr schwach, vWF (hellblau) und CD31 (grün) konnten gar nicht detektiert werden. Die Isotypkontrolle (grau unterlegt) diente als Negativkontrolle.

Die AC133<sup>-</sup>-PBMC aus dem Nabelschnurblut wiesen keine AC133 und CD34 Expression auf, zusätzlich konnten auch die Proteine VEGFR-2 und vWF nicht detektiert werden. Hingegen wurden CD45 und CD13 sehr stark exprimiert und CD31 konnte ebenfalls nachgewiesen

werden, wenn auch die Expression der Proteine nur auf einem Teil der AC133<sup>-</sup>-PBMC vorhanden war, siehe hierzu Abbildung 23.

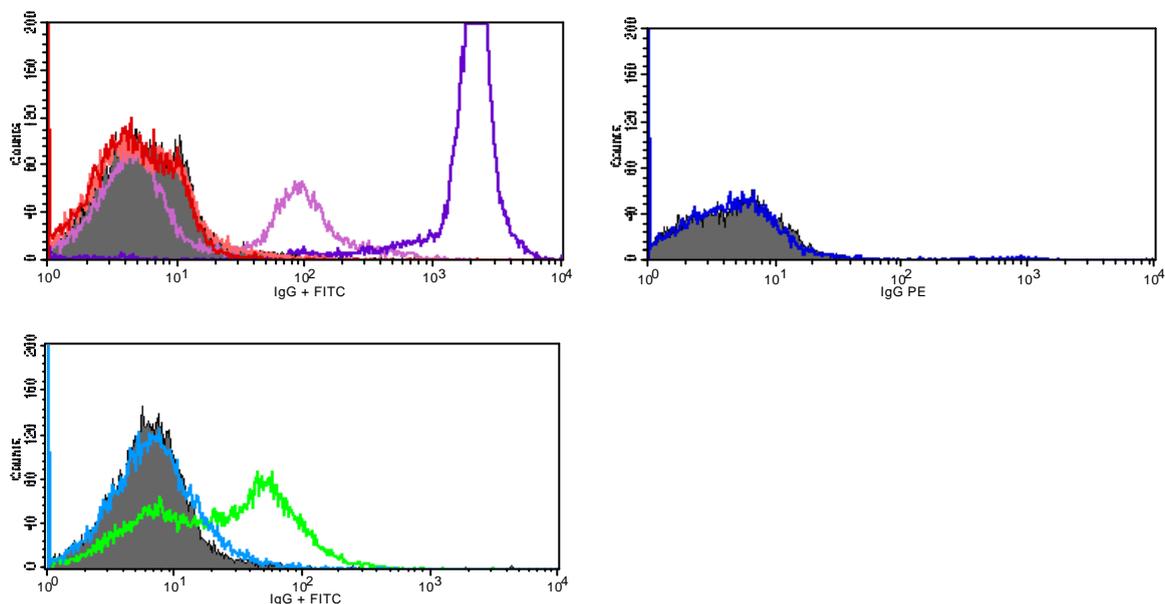


Abbildung 23: Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen auf AC133<sup>-</sup>-PBMC Zellen aus Nabelschnurblut, detektiert mittels FACS. Die Proteine CD45 (violett) und CD13 (pink) wurden sehr stark exprimiert. Des weiteren wurde CD31 auf der Zelloberfläche einiger Zellen exprimiert. Die Expression von AC133 (rot), VEGFR-2 (rosa), vWF (hellblau) und CD34 (blau) konnte nicht nachgewiesen werden. Die Isotypkontrolle (grau unterlegt) diente als Negativkontrolle.

Die Ergebnisse der FACS Analyse der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem humanem Nabelschnurblut sowie der bei der Isolation anfallenden AC133<sup>-</sup>-PBMC sind qualitativ in Tabelle 23 zusammengefasst. Nicht vorhandene Proteine werden mit „-“ angegeben. Proteine, die nur auf einem Teil der AC133<sup>-</sup>-PBMC exprimiert werden, werden mit „(+“ angegeben und überall exprimierte mit „+“ beziehungsweise stark exprimierte mit „++“.

Tab.23: Expression verschiedener Oberflächenproteine auf AC133 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen beziehungsweise AC133 <sup>-</sup> -PBMC aus humanem Nabelschnurblut.							
Zelltyp	Oberflächenprotein						
	AC133	CD34	CD45	CD13	CD31	vWF	VEGFR-2
AC133 <sup>+</sup> - Vorläuferzellen	+	++	+	+	-	-	+
AC133 <sup>-</sup> -PBMC	-	-	++	(+)	(+)	-	-

### 3.5 Einbau von markierten Zellen in Mausgewebe

Nach der *in vitro* Charakterisierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sollte ihr Verhalten *in vivo* analysiert werden. In einem Mausmodell wurde der Einbau von humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowie humanen mikrovaskuläre Endothelzellen untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob und wo diese Zellen im Tumorgewebe beziehungsweise im Lungengewebe eingelagert werden. Als weitere Vorläuferzellart wurde der Einbau von fluoreszierenden Knochenmarkszellen in Tumor- und Normalgewebe analysiert.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollte geklärt werden, ob AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen spezifisch in das Gefäßsystem mit eingebaut werden und wie sich dieser Einbau von anderen Zellarten unterscheidet.

#### 3.5.1 Dotierung von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen

AC133 positive Zellen und MVEC wurden mit dem Ziel in tumortragenden Nacktmäuse gespritzt, um diese nach 4 Tagen innerhalb des Tumors zu detektieren. Hierzu wurden die Zellen zuvor mit nicht-fluoreszierendem Acetoxymethylester von Calcein inkubiert, der zellpermeabel ist. In intakten Zellen wird der Acetoxymethylester durch intrazelluläre Esterasen in einen fluoreszierenden Farbstoff gespalten. Das fluoreszierende Carboxylat des Calceins ist nicht membrangängig und verbleibt für mehrere Tage in der Zelle. Dort kann es mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes oder unter dem Mikroskop nachgewiesen werden.

Es wurden zwei verschiedene Farbstoffe getestet, zum einen Calcein AM und zum anderen Carboxy-Fluoreszin-Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE). Zuerst wurden die Signalstärken der beiden Farbstoffe in den Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht. Es wurden 20 µM, 10 µM, 5 µM, 3 µM, 1 µM sowie 0 µM Farbstoff eingesetzt. Zunächst wurden  $3,5 \cdot 10^5$  AC133 positive Zellen aus adultem Blut isoliert und zum einen mit Calcein AM sowie zum anderen mit CFDA SE inkubiert. Die AC133 positiven Zellen wurden nun für 4 Tage mit PBMC in Kokultur inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenzintensität der Markierung gemessen. Es zeigte sich, dass die Signalstärke bei der Färbung mit Calcein AM um mehr als den Faktor 10 höher lag, als die bei der Färbung mit CFDA SE, siehe hierzu Abbildung 24A. Für die weiteren Versuche wurde auf Grund dieses Ergebnisses nur noch Calcein AM eingesetzt.

Um toxische Effekte des Calcein AM gegen die verwendeten Zellen zu untersuchen, wurden PBMC, als Vergleichszellen für die AC133 positiven Zellen, sowie MVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calcein AM inkubiert. Nach 4 Tagen wurde die Fluoreszenzintensität des Calceins sowie die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe von AlamarBlue gemessen.

2 und  $4 \times 10^5$  PBMC sowie  $3 \times 10^5$  MVEC wurden mit Calcein AM in den Konzentrationen 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  sowie 0  $\mu\text{M}$  inkubiert.

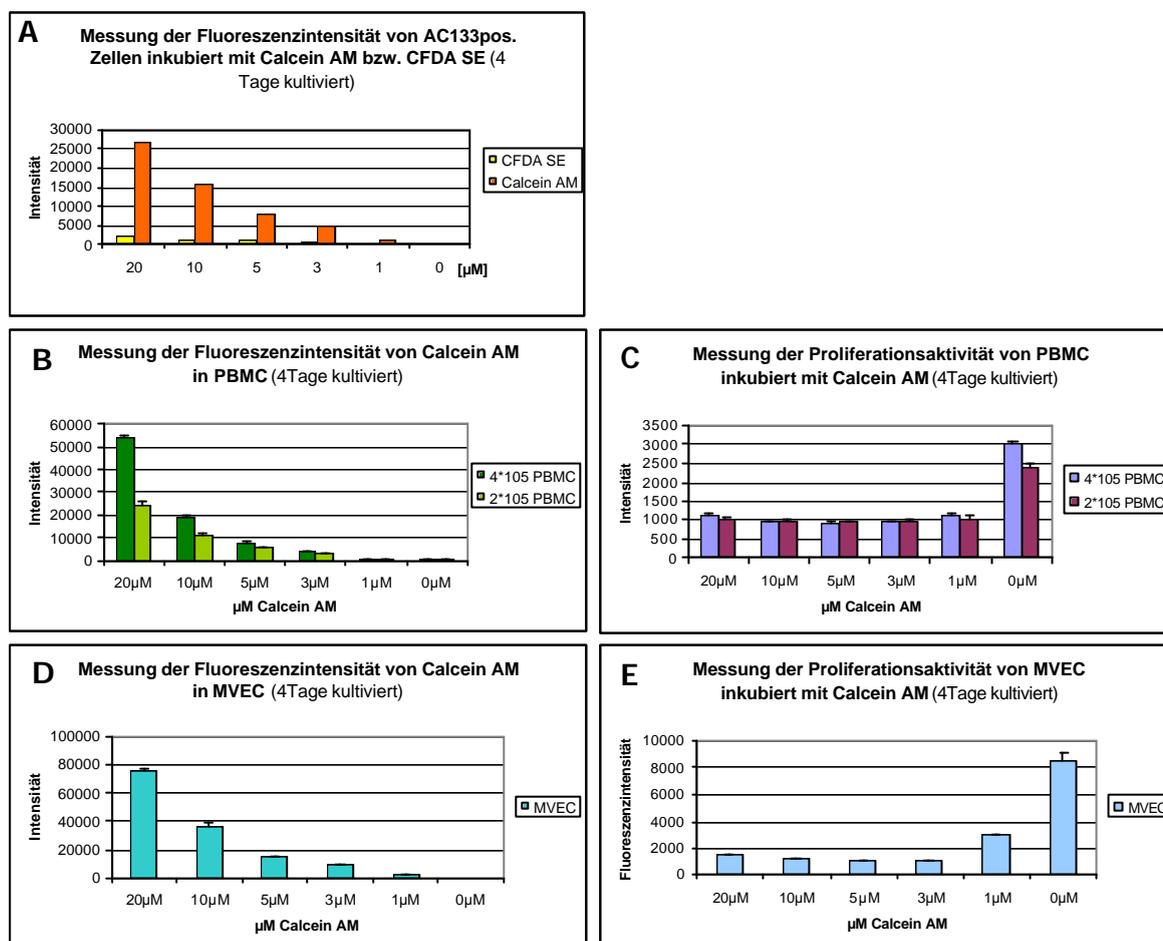


Abbildung 24: Markierung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen.

**A:** Bestimmung der Fluoreszenzintensität von Calcein AM und CFDA SE in AC133+-Vorläuferzellen. Nach 4 Tagen Kultivierung der AC133+-Vorläuferzellen in Kokultur mit PBMC wurden die Fluoreszenzintensität der beiden Farbstoffe gemessen. Die Intensität von Calcein AM lag über den Faktor 10 höher als bei CFDA SE.

**B und C:** Bestimmung der Signalstärke und Toxizität von Calcein AM. Es wurden  $2 \times 10^5$  beziehungsweise  $4 \times 10^5$  PBMC mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calcein AM inkubiert und für 4 Tage kultiviert. Danach wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit AlamarBlue und die Fluoreszenzintensität der Calcein AM gefärbten Zellen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der PBMC schon ab einer Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Calcein AM stark abnahm. Zudem konnte bei einer Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Calcein AM noch ein Fluoreszenzsignal gemessen werden.

**D und E:** Bestimmung der Signalstärke und Toxizität von Calcein AM. Es wurden  $3 \times 10^5$  MVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calcein AM inkubiert und für 4 Tage kultiviert. Danach wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit AlamarBlue und die Fluoreszenzintensität der Calcein AM gefärbten Zellen gemessen. Die Vitalität der PBMC nahm schon ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Calcein AM stark ab. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Calcein AM konnte noch ein Fluoreszenzsignal gemessen werden.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, war die Fluoreszenzintensität von Calcein AM stark konzentrationsabhängig, und es konnte noch bei einer Inkubation mit  $1\mu\text{M}$  ein Signal nachgewiesen werden. Des Weiteren war Calcein AM toxisch für die Zellen. Schon ab  $1\mu\text{M}$  erfolgte eine Reduktion der Vitalität bei beiden untersuchten Zelltypen, wie an der Fluoreszenzintensität der AlamarBlue Messung erkennbar war (Abbildung 12 C und E). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde eine Verdünnungsreihe von Calcein AM von  $0\mu\text{M}$  bis  $1\mu\text{M}$  hergestellt, und die PBMC mit diesen Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden danach mittels der Cytospin-Technik auf Objektträger übertragen und mit einem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht, um die Nachweismethode für Calcein AM gefärbte Zellen bei Tumorschnitten nachzustellen.

Die Färbung der PBMC mit den unterschiedlichen Calcein AM Konzentrationen von  $0\mu\text{M}$ ;  $0,1\mu\text{M}$ ;  $0,3\mu\text{M}$ ;  $0,5\mu\text{M}$ , und  $1\mu\text{M}$  führte zu folgender Einschätzung: Keine erkennbare Färbung der Zellen bei  $0$  und  $0,1\mu\text{M}$ . Ab  $0,3\mu\text{M}$  wurden gefärbte Zellen sichtbar. Diese waren bei einer Konzentration von  $0,5\mu\text{M}$  Calcein AM gut zu erkennen. Das stärkste Signal war bei  $1\mu\text{M}$  zu detektieren. Da Calcein AM schon ab einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  für die PBMC als toxisch nachgewiesen wurde, wurde für die weiteren Versuche  $0,5\mu\text{M}$  Calcein AM eingesetzt. Für mikroskopische Zwecke sollte damit eine ausreichende Signalstärke erreicht sein, siehe hierzu auch Abbildung 25.

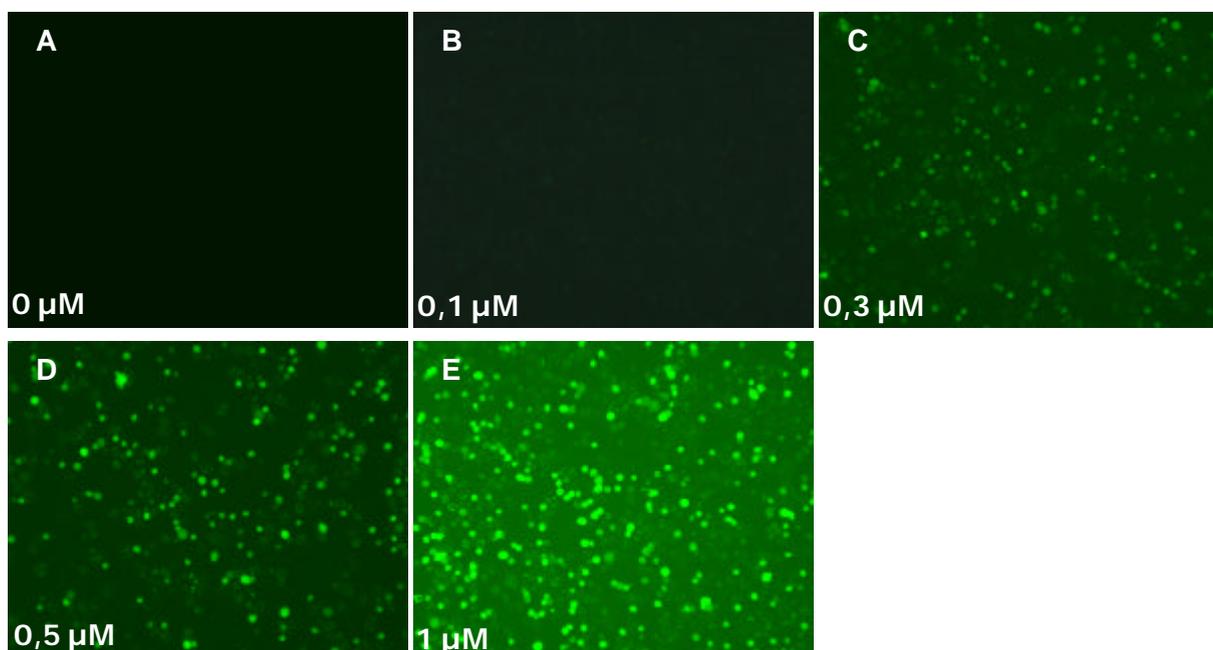


Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Konzentration von Calcein AM. Es wurden PBMC für eine Stunde bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calcein AM inkubiert und nach mehreren Waschschritten mittels Cytospin auf einen Objektträger transferiert. Die Intensität der fluoreszierenden Zellen wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops dokumentiert. Bild **A-E**: Eingesetzt Konzentrationen von Calcein AM waren  $0\mu\text{M}$ ;  $0,1\mu\text{M}$ ;  $0,3\mu\text{M}$ ;  $0,5\mu\text{M}$  und  $1\mu\text{M}$ . (Vergrößerung  $200\times$ )

Für die Markierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und der MVEC wurde somit Calcein AM mit einer Konzentration von 0,5 µM eingesetzt.

### **3.5.2 Einbau von Calcein AM gefärbten Zellen in Mausgewebe**

Für diesen Versuch wurden Nacktmäuse eingesetzt, um nach der Applikation von humanen Zellen in die Mäuse Immunreaktionen zu vermeiden. Der Nacktmaus wurde eine Woche vor der Applikation der humanen Zellen B16F10, Melanomzellen des C57Bl6 Mausstammes, subkutan injiziert. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowie MVEC wurden mit Calcein AM angefärbt und über die Schwanzvene in die Tumortragenden Nacktmäuse gespritzt. Zudem wurde zur Kontrolle in eine Maus gefärbte MVEC Zellen direkt in den Tumor beziehungsweise in die Tumorperipherie appliziert. Diese Applikationsart sollte als Positivkontrolle für den Einbau der Calcein AM gefärbte Zellen in das Mausgewebe dienen.

#### **3.5.2.1 Applikation von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen**

Es wurden 3 Tiere für die Injektion von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen verwendet und  $3 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen je Maus an 4 Tagen hintereinander i.v. appliziert. Die genauen Zellzahlen sind der Tabelle 17 in Abschnitt 2.5.4 zu entnehmen. Am 5. Tag wurden der Tumor entnommen, in Einbettmedium eingefroren und geschnitten. Zudem wurde Lungengewebe entnommen, um festzustellen, ob die applizierten AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in den Kapillaren der Lunge stecken geblieben waren. Um ein Bild von der Kolo-kalisation zu erhalten, wurde in den Gefrierschnitten das Mausendothel mit anti-CD31 Antikörper sowie die glatten Muskelzellen mit anti- $\alpha$ -smooth muscle actin angefärbt.

Die Immunhistologischen Ergebnisse des Einbaus der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in den Tumor ist in Abbildung 26 dargestellt. AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden in der äußeren Schicht des Tumors gefunden. Allerdings war der Einbau irregulär. Die Zellen wurden nicht spezifisch in das Mausendothel eingebaut. Sie befanden sich auch nicht in der Nähe der glatten Muskelzellen. Innerhalb des Tumors wurden keine Calcein AM gefärbten Zellen detektiert.

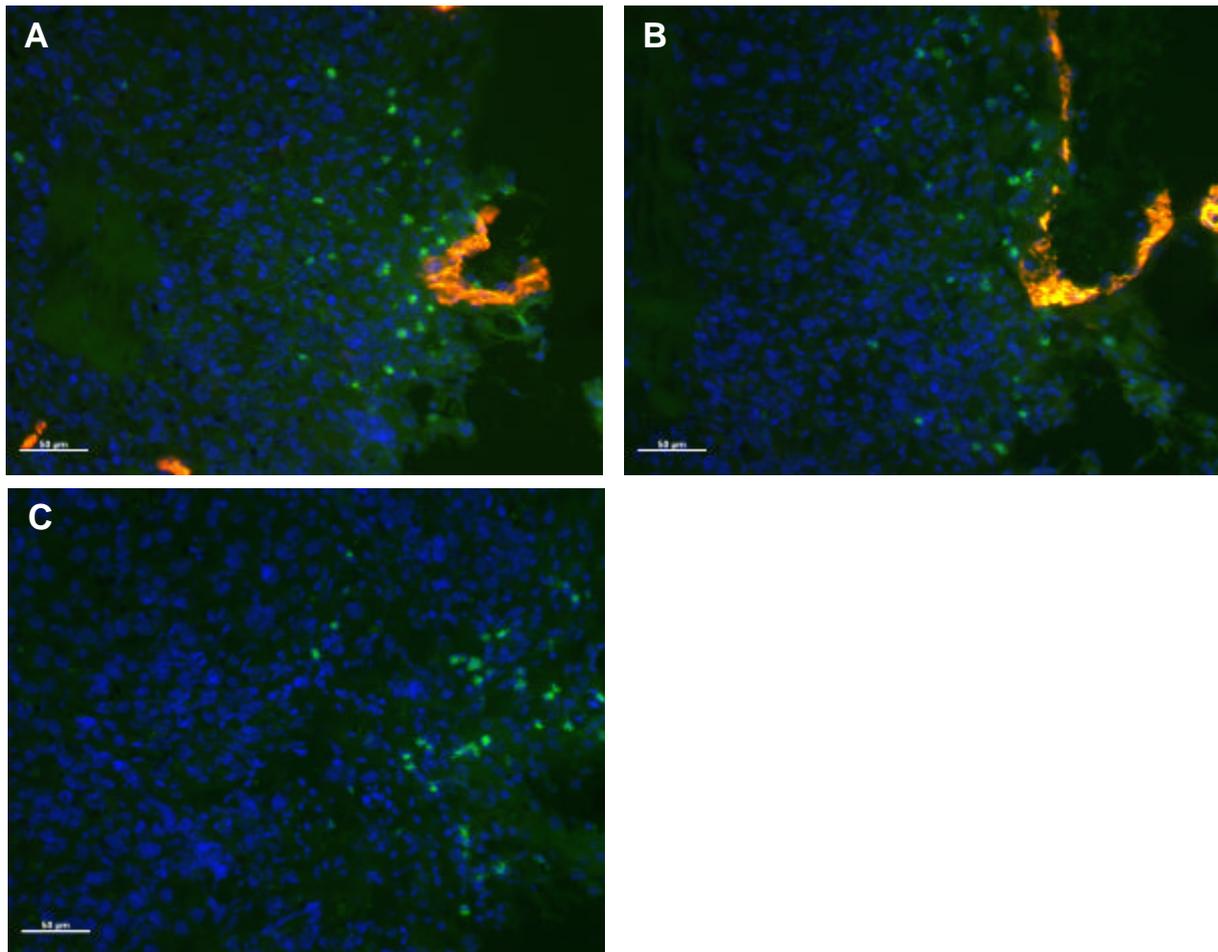


Abbildung 26: Einbau von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in Tumorgewebe. Die Zellen wurden zuvor mit 0,5 µM Calcein AM gefärbt (grün) und i.v. in die Schwanzvene gespritzt. Die Tumorschnitte wurden mit **A**: Ziege anti-Maus CD31 Cy3 markiert (rot), **B**: anti- $\alpha$ -smooth muscle actin Cy3 markiert (rot), **C**: nur dem Strep-Biotin Cy3 Komplex als Kontrolle gefärbt. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden nur in der äußeren Schicht des Tumors eingebaut. Sie wurden nicht spezifisch in die Blutgefäße eingebaut, da keine Überlappung der beiden Fluoreszenzfarben erkennbar war, siehe Abbildung A. Der Einbau der Zellen erfolgte in der Peripherie von Endothelzellen sowie smooth muscle Zellen. (Schichtdicke der Schnitte: 10 µm, Balken: 50 µm, Vergrößerung 200x)

### 3.5.2.2 Applikation von mikrovaskulären Endothelzellen

Für die Untersuchung des Einbaus von mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) in das Tumorgewebe wurden drei Mäusen an 4 Tagen hintereinander jeweils  $1 \cdot 10^6$  Calcein AM gefärbte Zellen pro Maus i.v. injiziert. Tumor und Lungengewebe wurden am 5. Tag entnommen, eingefroren und histologisch untersucht.

Die MVEC wurden, ähnlich den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, nicht in das Mausendothel mit eingebaut, sondern waren außerhalb von Endothel und glatter Muskelzellen diffus verteilt.

Auch die MVEC waren nur in der äußeren Schicht des Tumorgewebes zu finden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 27 dargestellt.

Bei der Applikation von Calcein AM gefärbte MVEC direkt in den Tumor beziehungsweise in die Tumorperipherie wurden ein vergleichbares Ergebnis erzielt. MVEC ( $2,5 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$ ) wurden nur zweimal intratumoral injiziert, um eine Verletzung des Tumorgewebes, die durch mehrfache Injektion entsteht, zu vermeiden. Die MVEC wurden auch hier nicht spezifisch in das Blutgefäßsystem der Maus eingebaut, wenn gleich die direkt applizierten MVEC verstärkt in der Nähe der Mausendothelzellen zu finden waren, siehe Abbildung 28 A. Eine direkte Nähe zu den glatten Muskelzellen konnte nicht nachgewiesen werden, siehe Abbildung 28 B.

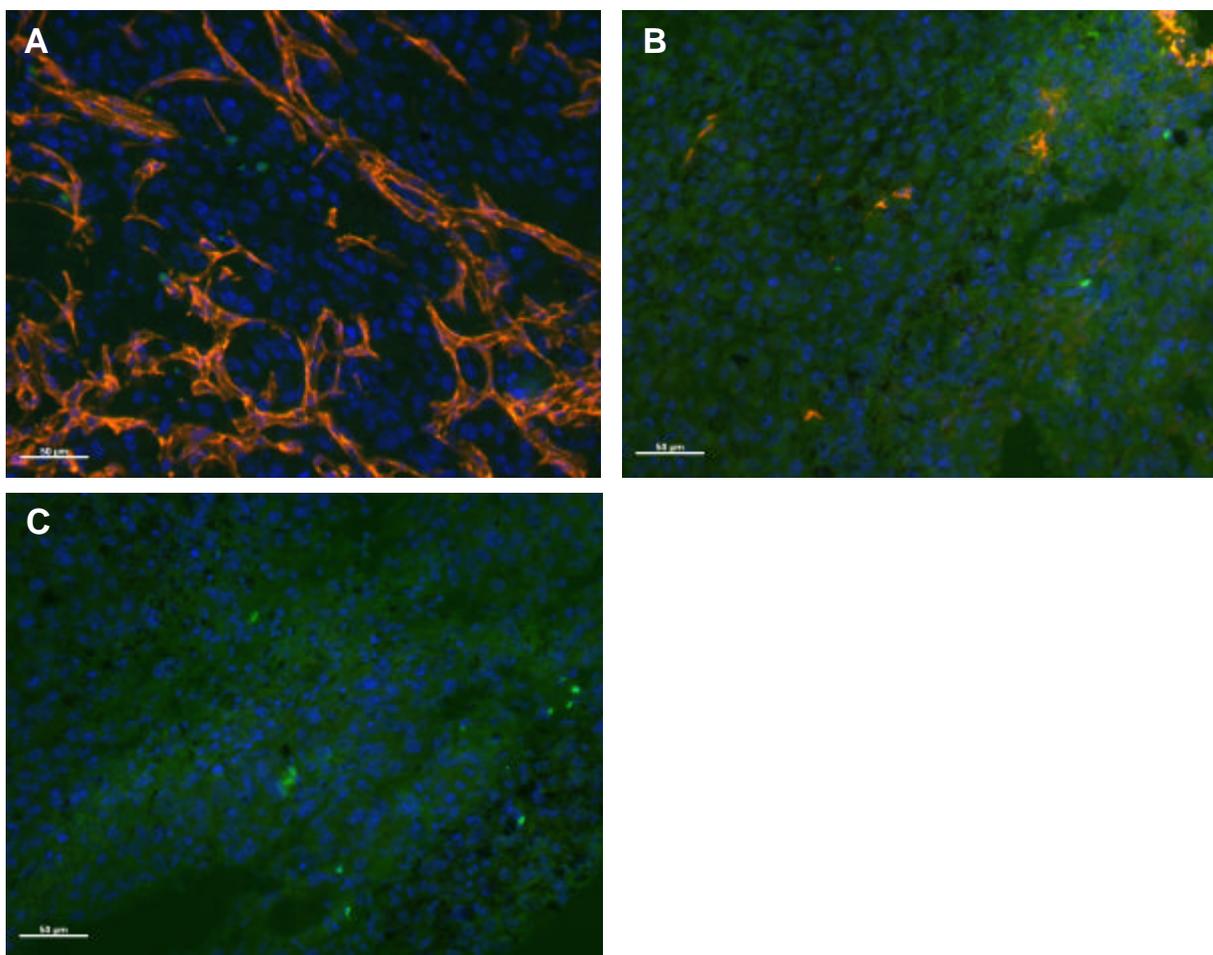


Abbildung 27: Einbau von MVEC in Tumorgewebe. Die Zellen wurden zuvor mit  $0,5 \mu\text{M}$  Calcein AM gefärbt (grün) und i.v. in die Schwanzvene gespritzt. Die Tumorschnitte wurden mit **A**: Ziege anti-Maus CD31 Cy3 markiert (rot), **B**:  $\alpha$ -smooth muscle actin Cy3 markiert (rot) sowie **C**: nur dem Strep-Biotin Cy3 Komplex als Kontrolle gefärbt. Wie in Bild A beziehungsweise B zu sehen ist, erfolgte kein spezifischer Einbau der MVEC in das Mausendothel beziehungsweise in der Nähe von glatten Muskelzellen, zudem waren die MVEC nur in der äußeren Schicht des Tumorgewebes zu finden. (Schichtdicke der Schnitte:  $10 \mu\text{m}$ , Balken:  $50 \mu\text{m}$ , Vergrößerung  $200\times$ )

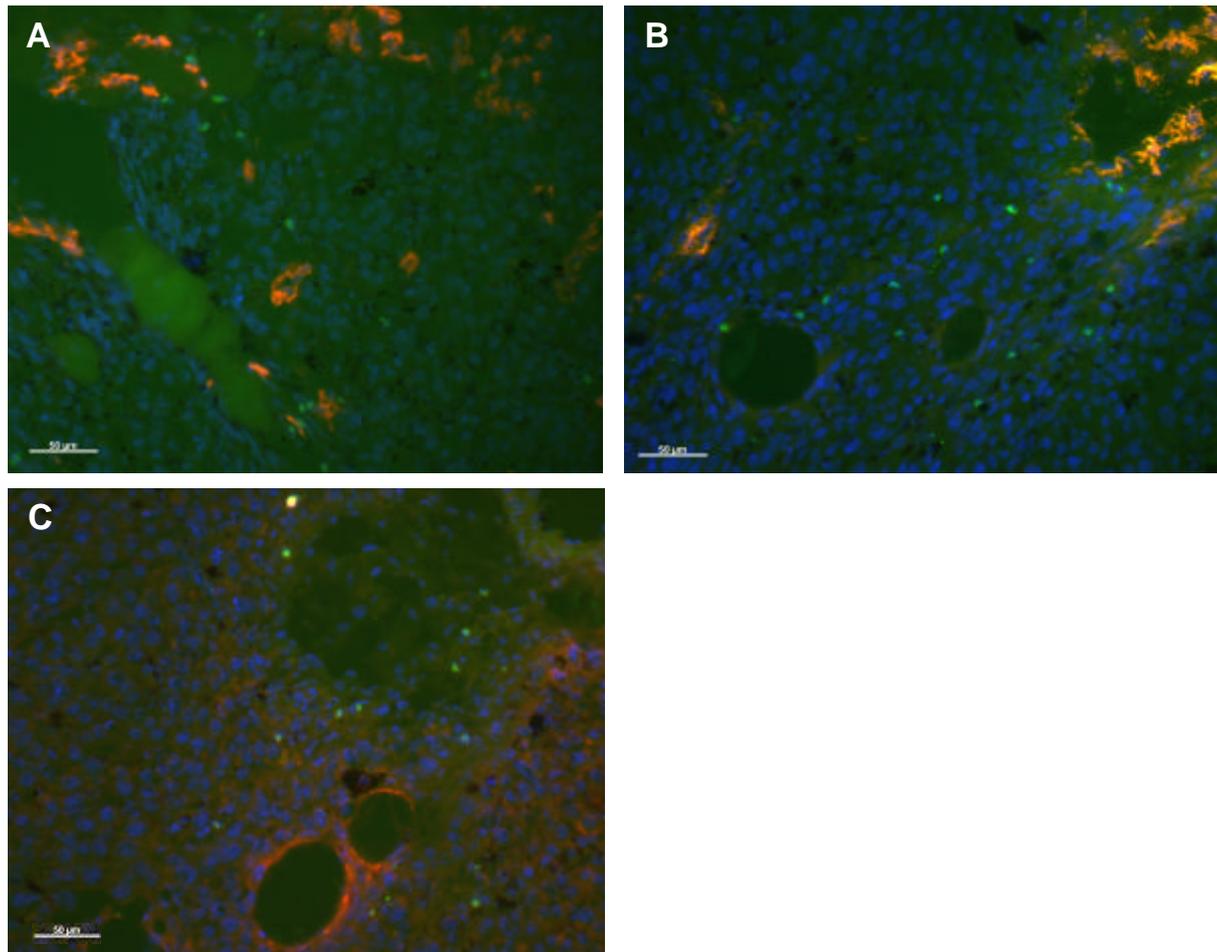


Abbildung 28: Einbau von MVEC in Tumorgewebe. Die Zellen wurden zuvor mit  $0,5\ \mu\text{M}$  Calcein AM gefärbt (grün) und direkt in den Tumor beziehungsweise die Tumorperipherie gespritzt. Die Tumorschnitte ( $10\ \mu\text{m}$ ) wurden mit **A**: Ziege anti-Maus CD31 Cy3 markiert (rot), **B**:  $\alpha$ -smooth muscle actin Cy3 markiert (rot) sowie **C**: nur dem Strep-Biotin Cy3 Komplex als Kontrolle gefärbt. (Schichtdicke der Schnitte:  $10\ \mu\text{m}$ , Balken:  $50\ \mu\text{m}$ , Vergrößerung 200x)

Somit lassen sich sowohl AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowie MVEC auch 4 Tage nach ihrer Injektion in Tumorgewebe nachweisen. Allerdings wurden die Zellen nicht spezifisch in das Blutgefäßsystem des Tumors eingebaut, sondern waren in der äußeren Schicht des Tumorgewebes unspezifisch verteilt. Zudem ließ sich keine räumliche Nähe der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sowie der MVEC zu den glatten Muskelzellen um die Gefäße feststellen. Bei der Applikation der MVEC direkt in den Tumor beziehungsweise die Tumorperipherie wurden die Zellen zum Teil in den Blutgefäßen detektiert.

Um festzustellen, ob i.v. applizierte Zellen zum Teil in den kleinen Kapillargefäßen der Lunge stecken blieben und sich somit nicht mehr in den Tumor einlagern konnten, wurden Lungenschnitte untersucht. Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, ließen sich keine fluoreszierenden Zellen finden. Die grüne Färbung des Gewebes ist nicht auf das

Vorhandensein von Calcein AM markierten Zellen zurückzuführen, sondern wird durch Eigenfluoreszenz des Lungengewebes hervorgerufen. Dies wird bei der Betrachtung von Lungengewebe einer Nacktmaus, die keine Calcein AM gefärbten Zellen i.v. appliziert bekommen hatte, deutlich. Auch hier ist die grüne Eigenfluoreszenz der Lunge zu erkennen, siehe Abbildung 29 D. Die Kapillargefäße der Lunge wurden durch die Färbung mit dem spezifischen Antikörperkomplex anti-CD31 sowie Cy3 markierten Sekundärantikörper detektiert, siehe Abbildung 29 A beziehungsweise D.

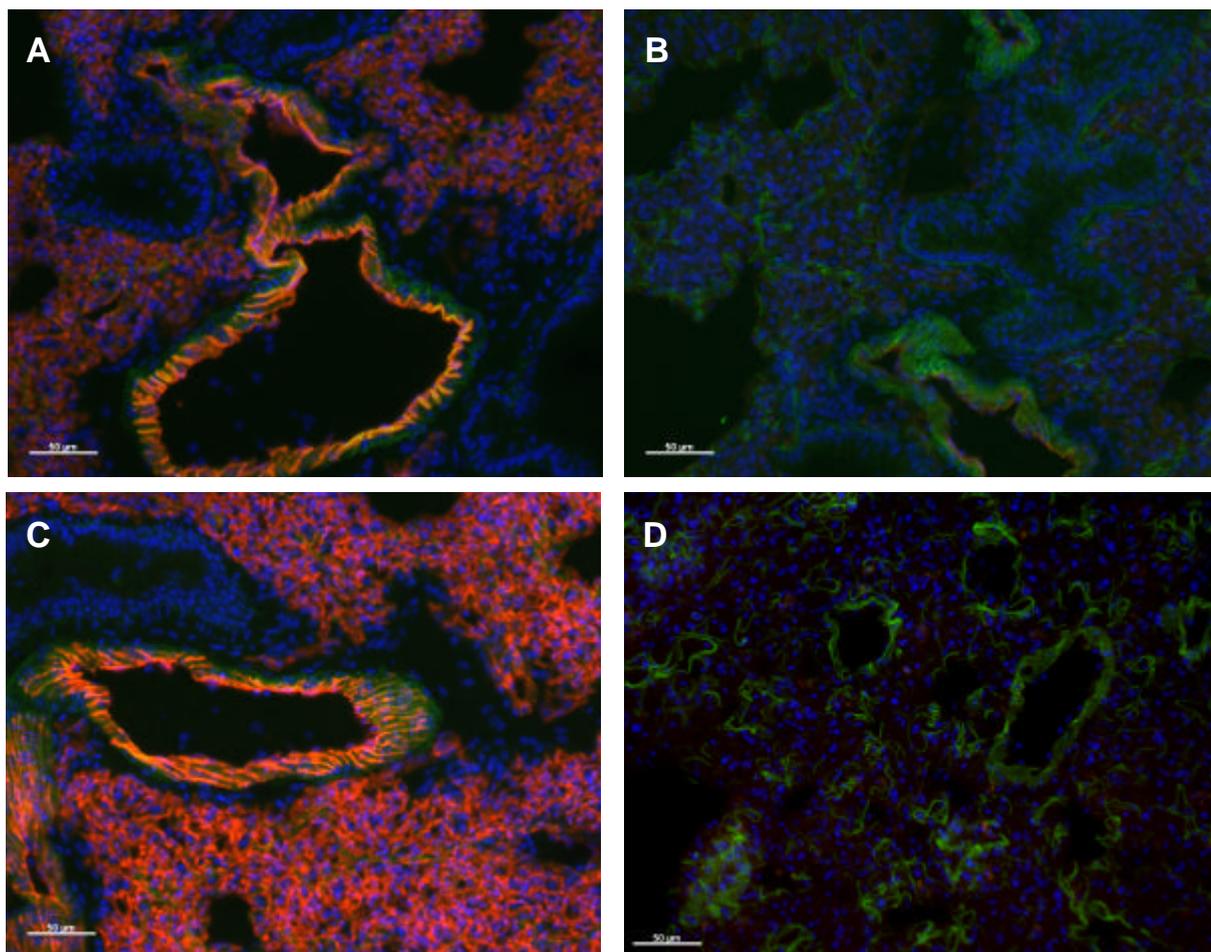


Abbildung 29: Untersuchung von Lungengewebe auf das Vorhandensein von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen.

In Bild **A** wurde zusätzlich das Mausendothel mit anti-CD31 Antikörper und spezifischem Cy3 markiertem Sekundärantikörper angefärbt (rot). In Bild **B** wurde zur Kontrolle nur der Sekundärantikörper eingesetzt. Die Färbung des Gewebes ist auf Eigenfluoreszenz zurückzuführen und nicht auf den möglichen Einbau von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen. Dies wird durch die Ergebnisse in Bild **C** beziehungsweise **D** verdeutlicht. Hier wurde Lungengewebe einer Maus, die keine Calcein AM gefärbten Zellen i.v. injiziert bekommen hatte, mit anti-CD31 (C) beziehungsweise nur mit dem Cy3 markierten Sekundärantikörper (D) angefärbt. Auch hier konnte die Eigenfluoreszenz des Lungengewebes nachgewiesen werden. (Schichtdicke der Schnitte: 10 µm, Balken: 50 µm, Vergrößerung 200x)

### 3.5.3 *In vivo* Imaging der mit eGFP Knochenmarkszellen behandelten Mäuse

Hierbei sollte untersucht werden, in welche Gewebe die applizierten GFP positiven Knochenmarkszellen eingelagert wurden, beziehungsweise ob mit dieser Methode ein Nachweis der GFP positiven Zellen möglich ist. Die aus der eGFP-Maus gewonnenen Knochenmarkszellen wurden i.v. in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert. Nach einer Wartezeit von 3 Tagen wurden die Mäuse mit Hilfe eines *in vivo* Imaging Laser Systems sowie eines Fluoreszenzmikroskops auf das Vorhandensein von GFP-Zellen im Tumorgewebe untersucht. Am letzten Versuchstag wurden die Mäuse getötet und der Bauchraum geöffnet, um festzustellen, ob sich GFP-Zellen in anderen Organen eingelagert hatten. Zudem wurde der Tumor entnommen und separat unter dem Mikroskop und dem *in vivo* Imager betrachtet. Sofern eine ausreichende Menge an GFP-Zellen in das Gewebe einwanderten, konnte eine Detektion mit Hilfe dieser Techniken erwartet werden.

Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchung mit Hilfe der Lasers ergaben keinen Einbau von GFP positiven Zellen in den Tumor oder auch in die anderen Gewebe. Außer der Lunge und der Gallenblase wurde keine Fluoreszenz detektiert. Dies was aber auf die Eigenfluoreszenz des Lungengewebes sowie der Gallenflüssigkeit zurückzuführen war, da auch in den Kontrolltieren eine Fluoreszenz dieser Gewebe gezeigt werden konnte.

Neben der Technik des *in vivo* Imaging wurden die Gewebe auch mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Tumor wurde zuvor herauspräpariert und getrennt untersucht. Wie in Abbildung 30 B zu erkennen ist, konnten kein positives Signal detektiert werden. Die Fluoreszenzmikroskopie des Abdomens zeigte ebenfalls keine GFP positiven Zellen im Bauchraum. Es konnte nur die Eigenfluoreszenz der Gallenblase gezeigt werden. Die Analyse des Abdomens einer Kontrollmaus zeigte, dass es sich hier wirklich um Eigenfluoreszenz handelte und nicht um ein positives Signal auf Grund von eingewanderten GFP-Zellen handelt, siehe Abbildung 30 B.

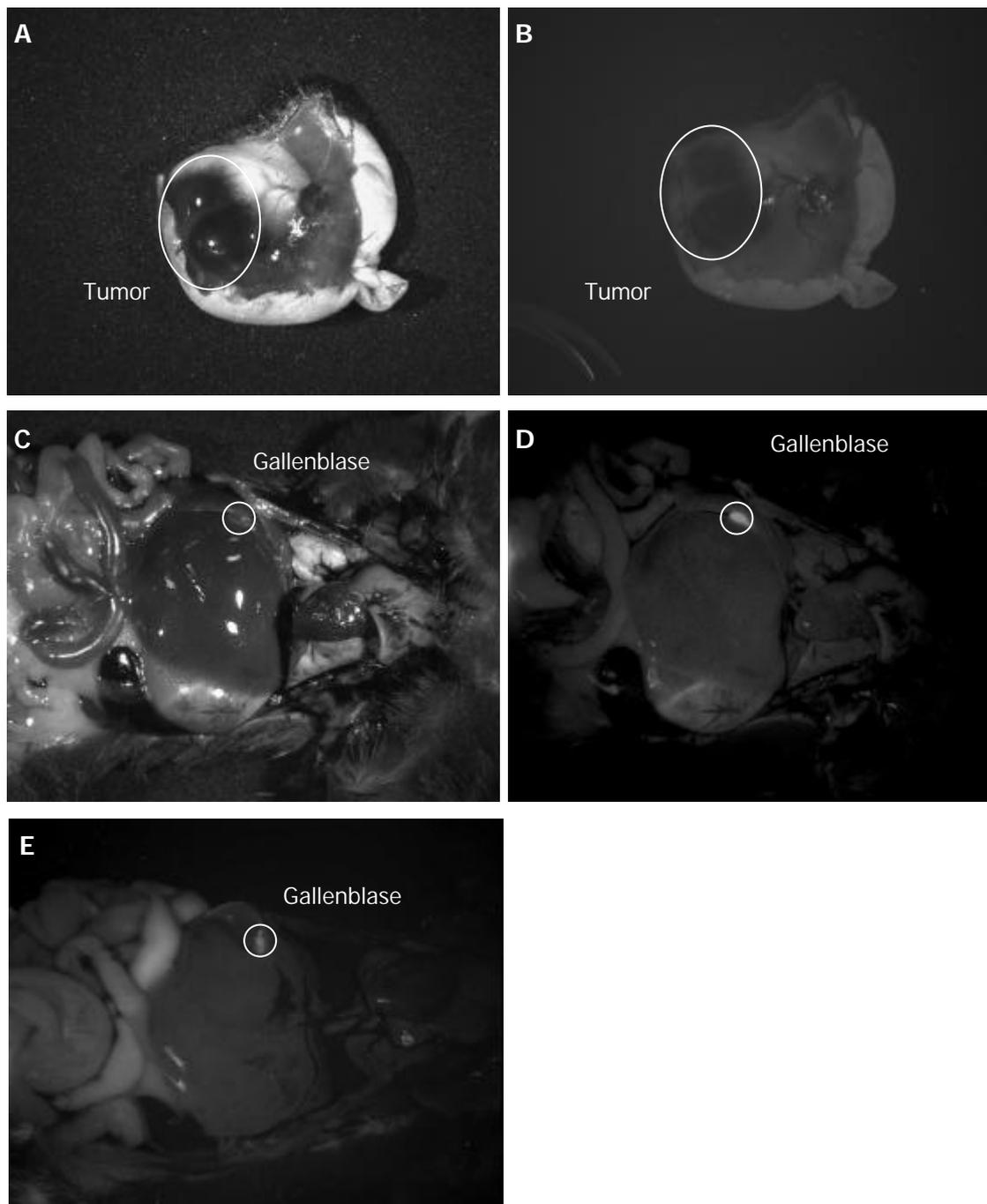


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopie des herauspräparierten Tumors und geöffneten Abdomens einer mit GFP-Zellen i.v. injizierten Maus sowie einer Kontrollmaus.

**A:** Durchlichtaufnahme des herauspräparierten Tumors, die Haut leuchtet weiß.

**B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Tumors. Es konnten keine GFP positiven Bereiche detektiert werden. Die hellen Punkte neben dem Tumor wurden durch Reflexionen des Gewebes hervorgerufen.

**C:** Durchlichtaufnahme des geöffneten Abdomens.

**D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Abdomens, die Gallenblase leuchtete deutlich positiv. Dies war auf die Eigenfluoreszenz der Gallenflüssigkeit zurückzuführen, da auch die Gallenblase der Kontrollmaus fluoreszierte.

### 3.5.4 Immunhistologische Untersuchung der mit eGFP Knochenmarkszellen behandelten Mäuse

Da mit Hilfe des *in vivo* Imaging auf Grund der geringen Eindringtiefe der Analyseapparaturen keine GFP positiven Zellen detektiert werden konnten, wurden zusätzlich Gewebeschnitte des Tumors und einzelner Organe angefertigt.

Zur Untersuchung des Einbaus von Knochenmarkszellen in Tumore beziehungsweise andere Gewebe wurden hierzu Knochenmarkszellen aus eGFP-Mäusen isoliert. Dieser Mausstamm exprimiert das GFP-Protein in allen Zellen außer Haaren und Erythrozyten. Es wurde aus den beiden Oberschenkelknochen der GFP-Maus das Knochenmark isoliert und dann i.v. über die Schwanzvene in jeweils drei C57Bl6 Mäuse gespritzt, denen zuvor B16F10 Tumorzellen subkutan transplantiert wurden. Eine Gruppe erhielt eine Transplantation von  $2 \cdot 10^6$  B16F10 Tumorzellen 8 Tage vor der i.v. Applikation der fluoreszierenden Knochenmarkszellen, und die Mäuse der anderen Gruppe erhielten jeweils  $1 \cdot 10^6$  Tumorzellen 4 Tage vor der i.v. Applikation. Hierdurch sollte der Einfluss des Vaskularisierungsgrades des Tumors auf den Einbau der eGFP-Zellen untersucht werden. Zudem wurde in jeder Gruppe eine Kontrollmaus mitgeführt, der keine Knochenmarkszellen injiziert wurden. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen sind den Abbildungen 31 und 32 zu entnehmen.

Die Tumorschnitte der ersten Gruppe wiesen deutliche eGFP positive Zellen auf. Der Einbau von Knochenmarkszellen in das Tumorgewebe konnte somit nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, dass die Knochenmarkszellen nur im äußeren Rand des Tumors eingebaut wurden. Durch das gleichzeitige Anfärben der Mausendothelzellen mit einem anti-CD31 Primärantikörper gefolgt von einem Cy3 markierten Sekundärantikörper wurde untersucht, ob die applizierten Knochenmarkszellen in das Blutgefäßsystem des Tumors mit eingebaut wurden. In den histologischen Schnitten in Abbildung 31 A ist zu erkennen, dass kein spezifischer Einbau der GFP positiven Zellen in die Blutgefäße nachzuweisen war.

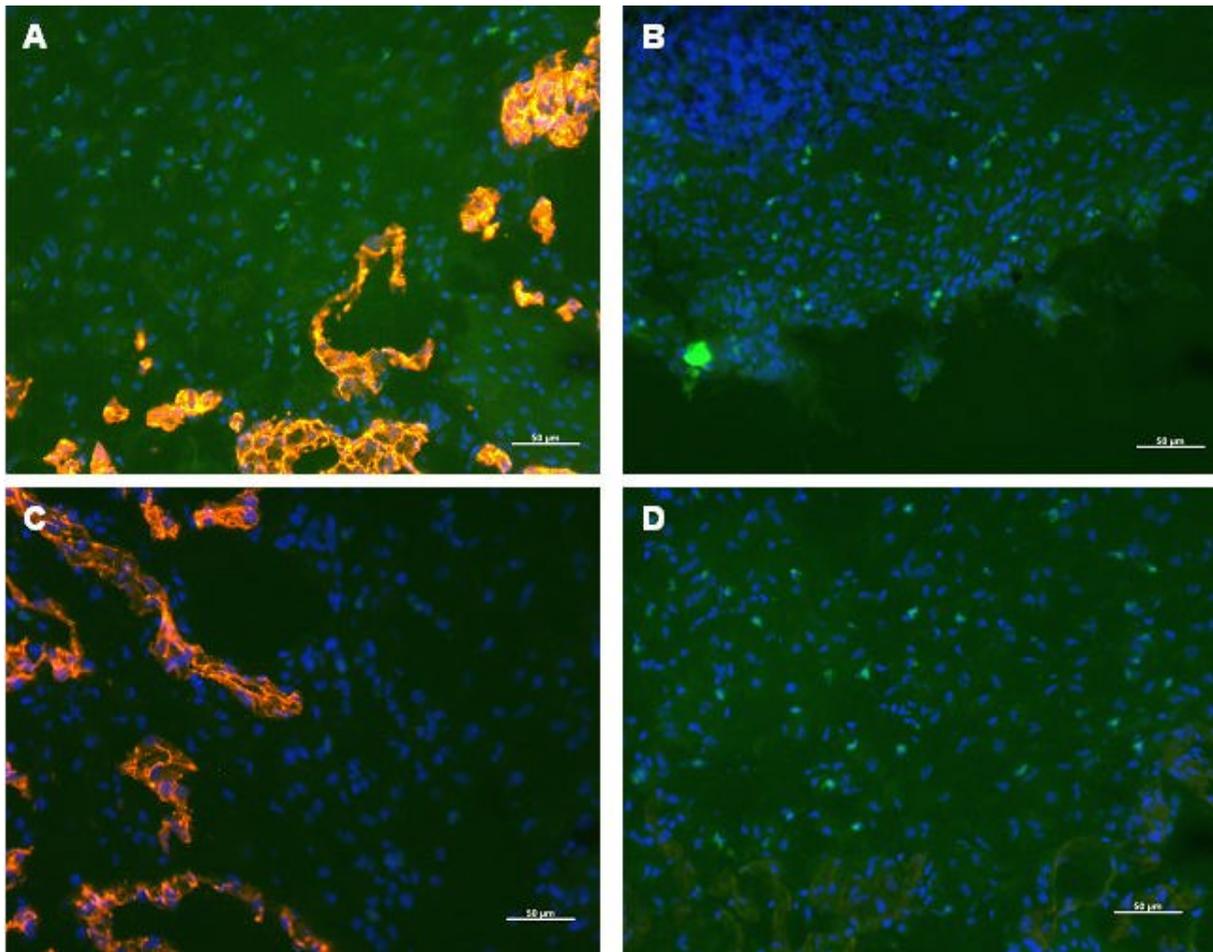


Abbildung 31: Nachweis von eGFP exprimierenden Knochenmarkszellen in B16F10 Tumorschnitten mittels Immunhistochemie. Das eGFP Knochenmark wurde 8 Tage nachdem der B16F19 Tumor s.c. gesetzt wurde i.v. in die C57Bl6 Mäuse gespritzt und 7 Tage nach Injektion wurden die Tumore entnommen. eGFP positive Zellen erscheinen grün. Die Gewebeschnitte wurden zusätzlich mit anti-CD31 und einem Cy3 markierten Sekundärantikörper inkubiert, um die Mausendothelzellen sichtbar zu machen (rot). Eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) wurde zur besseren Visualisierung ebenfalls durchgeführt. **A** und **B**: Die eGFP Zellen (grün) waren gut nachweisbar und konnten fast ausschließlich am Tumorrand nachgewiesen werden. Zudem konnte kein Einbau der eGFP Zellen in die Gefäße detektiert werden. **C**: Tumorschnitt einer Kontrollmaus, die kein eGFP Knochenmark injiziert bekommen hat. Grün fluoreszierende Zellen konnten nicht nachgewiesen werden, auch hier wurde eine Färbung der Endothelzellen mit anti-CD31 (rot) durchgeführt. **D**: Als Kontrolle der Spezifität des Sekundärantikörpers gegen den CD31 Primärantikörper wurde hier nur der Sekundärantikörper eingesetzt. Die hier fehlende Rotfärbung zeigte, dass es sich bei der Rotfärbung auf den anderen Schnitten, um eine spezifische Färbung der Endothelzellen auf Grund des CD31-Cy3 Komplexes aus Primär- und Sekundärantikörper handelte. Die eGFP markierten Zellen sind gut zu erkennen. (Schichtdicke der Schnitte: 10 µm, Balken: 50 µm, Vergrößerung 200x)

Die Ergebnisse der zweiten Mäusegruppe, die einen weniger entwickelten Tumor trugen, zeigten vergleichbare Resultate, wie in Abbildung 32 dargestellt ist. Auch hier wanderten GFP positive Zellen in den äußeren Bereich des Tumors ein. Wie in der ersten Gruppe ließ sich

auch hier kein spezifischer Einbau der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in das Blutgefäßsystem des Tumors feststellen.

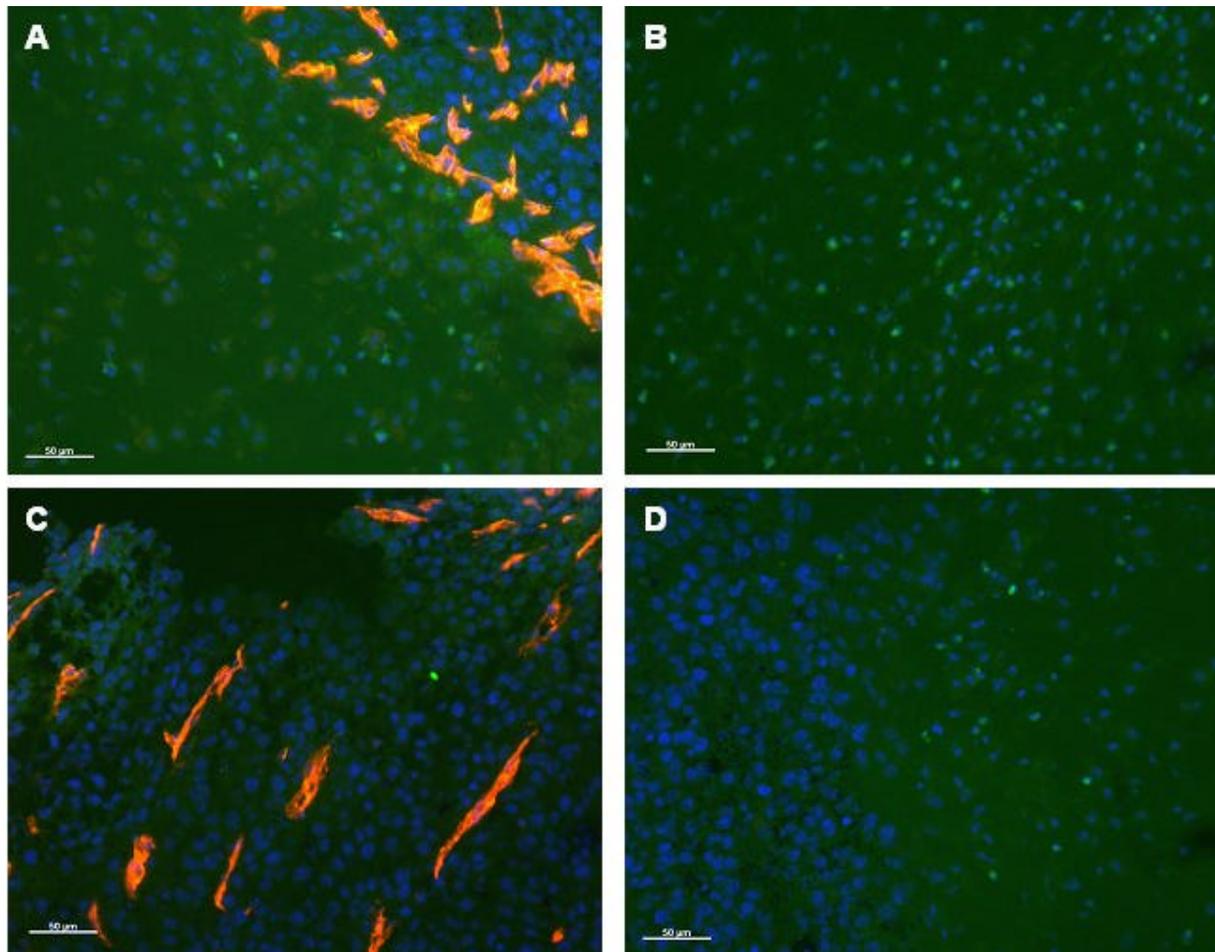


Abbildung 32: Nachweis von eGFP exprimierenden Knochenmarkszellen in B16F10 Tumorschnitten mittels Immunhistochemie. Das eGFP Knochenmark wurde 4 Tage nachdem der B16F19 Tumor s.c. gesetzt worden war i.v. in die C57Bl6 Mäuse gespritzt. 7 Tage nach Injektion wurden die Tumore entnommen und histologisch aufgearbeitet. eGFP positive Zellen erscheinen grün. Die Gewebeschnitte wurden zusätzlich mit anti-CD31 Antikörpern (rot) und mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. **A** und **B**: Die eGFP Zellen (grün) sind gut nachweisbar und befinden sich ausschließlich außerhalb des Tumors beziehungsweise am Tumorrand. Es konnte auch kein Einbau der eGFP Zellen in die Gefäße nachgewiesen werden. **C**: Tumorschnitt einer Kontrollmaus, die keine eGFP Knochenmarkszellen injiziert bekommen hatte. Grün fluoreszierende Zellen konnten nicht nachgewiesen werden, auch hier wurde eine Färbung der Endothelzellen mit anti-CD31 (rot) durchgeführt. **D**: Als Kontrolle der Spezifität des Sekundärantikörpers gegen den anti-CD31 Primärantikörpers wurde hier nur der Sekundärantikörper eingesetzt. Es konnte keine Färbung von Endothelzellen nachgewiesen werden. (Schichtdicke der Schnitte: 10  $\mu$ m, Balken: 50  $\mu$ m, Vergrößerung 200x)

Neben der Betrachtung des Tumors wurden auch Lungen- und Thymusgewebe auf mögliche GFP positive Zellen hin untersucht. Es wurden Gefrierschnitte angefertigt und

immunhistologisch analysiert. Wie in Abbildung 33 A beziehungsweise B zu erkennen ist, konnten keine GFP positiven Knochenmarkszellen in Lungengewebe nachgewiesen werden. Die schwache Grünfärbung ist auf die Eigenfluoreszenz des Lungengewebes zurückzuführen (siehe auch Abbildung 29 D). Bei der Analyse des Thymusgewebes wurden GFP positive Zellen gefunden, siehe hierzu Abbildung 33 C. Im Thymusgewebe der Kontrollmaus, die keine Knochenmarkszellen injiziert bekam, konnten keine GFP positiven Zellen detektiert werden. Durch die gleichzeitige Färbung der Blutgefäße mit anti-CD31 Antikörpern konnte festgestellt werden, dass im Thymusgewebe wie auch im Tumor kein spezifischer Einbau der Knochenmarkszellen in das Blutgefäßsystem statt fand, siehe Abbildung 33 C und D.

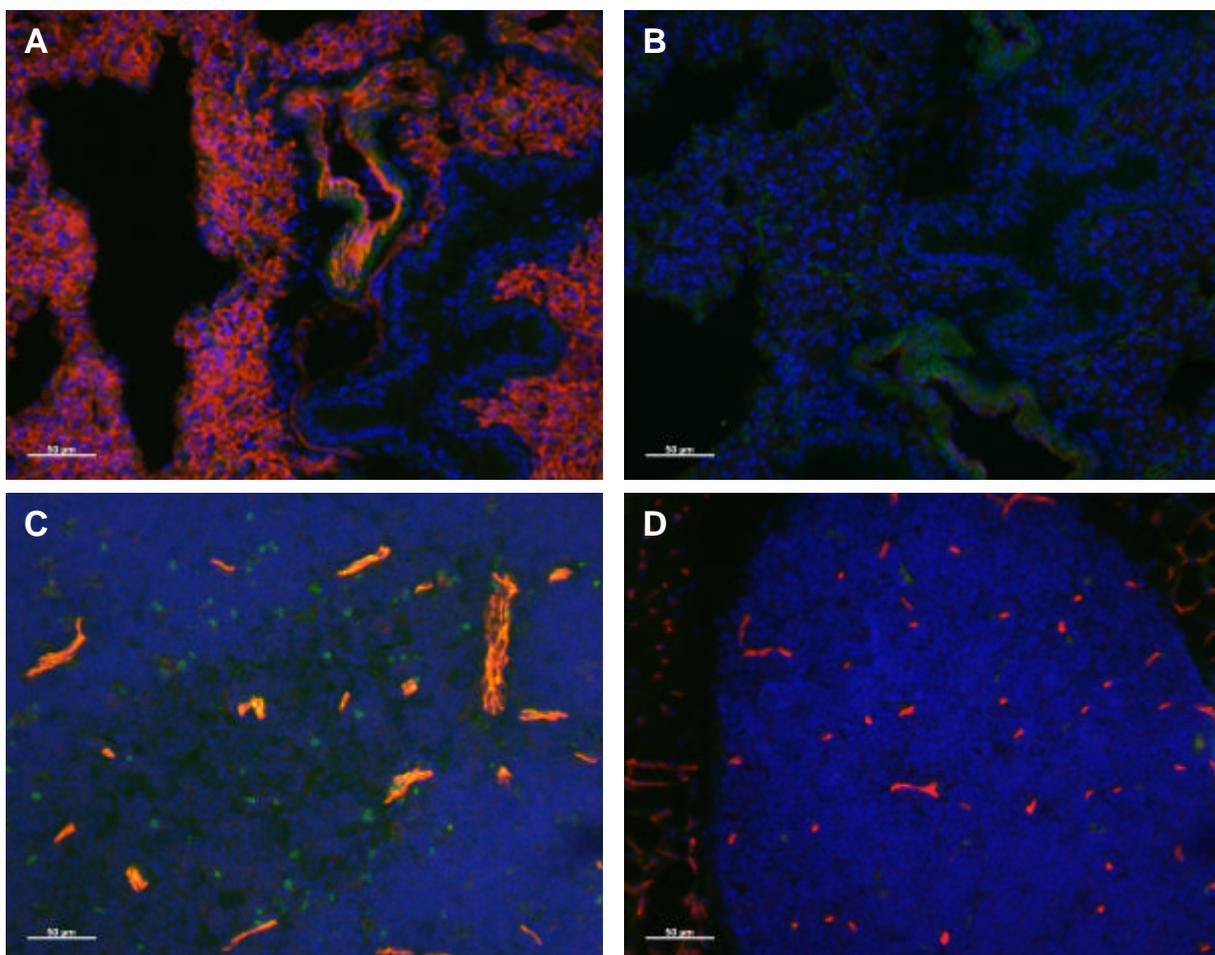


Abbildung 33: Einbau von eGFP exprimierenden Knochenmarkszellen in Lunge und Thymus. Die eGFP Knochenmarkszellen wurden i.v. gespritzt und nach einer Inkubationszeit von 3 beziehungsweise 7 Tagen wurden Lunge sowie Thymus entnommen und mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein von eGFP Zellen hin untersucht. **A:** Schnitt durch die Lunge eines Tieres, das i.v. eGFP Zellen injiziert bekommen hat. Es sind keine eGFP Zellen (grün) zu finden. Eine Färbung der Endothelzellen mit einem anti-CD31 Antikörper und einem Cy3 markierten Sekundärantikörper (rot) machte die Blutgefäße sichtbar. **B:** Lungenschnitt ohne CD31 Färbung: Es konnten keine eGFP Zellen detektiert werden. **C:** Gewebeschnitt des Thymus aus einer mit eGFP Zellen behandelten Maus. Es sind deutlich grün gefärbte eGFP Knochenmarkszellen zu erkennen. Es erfolgte kein spezifischer Einbau in

die Gefäße (rot), es sind nur vereinzelt grün markierte Zellen in beziehungsweise an den anti-CD31 gefärbten Endothelzellen (rot) zu erkennen. **D**: Thymusschnitt aus einer Maus, die nicht mit eGFP Knochenmarkszellen behandelt wurde. Der Schnitt dient als Kontrolle dafür, dass es sich bei den grün leuchteten Zellen in Bild C um eGFP-Zellen und nicht um die Eigenfluoreszenz einzelner Zellen handelt. (Schichtdicke der Schnitte: 10 µm, Balken: 50 µm, Vergrößerung 200x)

Insgesamt lässt sich bei der histologischen Untersuchung der mit GFP-Knochenmarkszellen behandelten Mäusen feststellen, dass GFP-Zellen in das Tumorgewebe eingebaut wurden. Der Einbau dieser Zellen erfolgte ohne erkennbare Spezifität in die Blutgefäße des Tumors. Neben der Analyse von Tumorgewebe wurde auch Lungen- und Thymusgewebe untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass keine GFP positiven Zellen in die Lunge einwanderten beziehungsweise in den Kapillaren stecken blieben. GFP-Knochenmarkszellen konnten hingegen im Thymus nachgewiesen werden. Der Einbau erfolgte irregulär und GFP positive Zellen konnten nur teilweise in Gefäßen detektiert werden.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, die aus humanem adulten Blut und Nabelschnurblut gewonnen wurden. Es sollte geklärt werden, ob es sich bei diesen Zellen um endotheliale Vorläuferzellen handelte, oder welchen anderen Typ an Vorläuferzellen sie darstellten. Die Charakterisierung der Zellen wurden mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sowie der FACS Analyse durchgeführt. Um eine Aussage treffen zu können in wie weit die Vorläuferzellen in Richtung dieser Zellarten differenzieren, wurde die Änderung in der Genexpression einzelner Oberflächenproteine bei der Kokultur mit anderen Zellarten wie MVEC, PBMC oder HL60 untersucht. Aussagen über die Differenzierung wurde an Hand spezifischer Marker für Stamm- und Vorläuferzellen (AC133, CD34 und cKit) sowie an Hand von Endothelzellmarkerproteinen (CD31, vWF, VEGFR-2) getroffen. Somit wurden bei Zellen, die weniger die Vorläuferzellmarker und mehr die Endothelzellmarker exprimierten, angenommen, dass diese Zellen in Richtung der reifen Endothelzellen differenzierten. Die Genexpression der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurde mittels Affymetrix Chip Analyse genauer analysiert. Neben den *in vitro* Versuchen wurden auch *in vivo* Modelle zur Klärung der Funktion der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eingesetzt. Hierbei wurde die Lage der Vorläuferzellen in Mausgeweben wie Tumor und Lunge untersucht. Zudem wurde als Vergleichszellen zu den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen der Einbau markierter syngener Knochenmarkszellen in Mausgewebe betrachtet.

### 4.1 Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen

Die Aufreinigung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem humanen peripheren Blut beziehungsweise dem Nabelschnurblut erfolgte mit Hilfe der Magnetbeadtechnik, wodurch eine hohe Homogenität der Probe von durchschnittlich 90 % erreicht wurde. Im Laufe der Arbeit wurde die Isolation der Zellen aus dem Blut mehrfach wiederholt, da nur eine sehr geringe Anzahl an Blutzellen AC133 positiv sind. Aus dem humanem peripheren Blut wurden 0,09 % ( $\pm 0,06$  %) AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen pro ml Blut isoliert, der Anteil an diesen Zellen lag im Nabelschnurblut mit 1,08 % ( $\pm 0,6$  %) über ein 10faches höher. Verglichen mit der Literatur ist diese Ausbeute sehr zufrieden stellend. Dort finden sich Angaben zum Anteil der im peripherem Blut vorkommenden AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei 0,002 % und in mit G-CSF mobilisiertem Blut bei 0,02 % (Peichev et al., 2000). Matsumoto et al. isolierten 0,035 % ( $\pm 0,011$  %) AC133<sup>+</sup> Zellen aus peripherem Blut (Matsumoto et al., 2000). Die Anzahl der

gewonnenen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nahm im Laufe der Isolationsversuche aus dem peripheren Blut kontinuierlich zu, was auf Optimierungsmaßnahmen wie die Verwendung von Leucosep® Röhrchen sowie eine zunehmende Routine bei der Durchführung zurückzuführen war. Die Ausbeute der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen variierte sehr stark. Dies ist vermutlich auch auf eine schwankende Qualität der Blutproben zurückzuführen. Dies zeigt sich auch sehr deutlich bei der Isolation von Zellen aus dem Nabelschnurblut. Diese Proben wurden direkt nach einer Geburt entnommen und bis zu maximal 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Blutproben von erwachsenen Spendern wurden hingegen immer frisch gewonnen und maximal 2 Stunden gelagert. Somit konnte hier eine gleich bleibende Qualität erreicht werden, und Schwankungen in der Ausbeute verringert werden. Insgesamt muss also bei der Isolation von Zellen aus Blut darauf geachtet werden, dass Blutproben maximal 8-12 Stunden gelagert werden und das Blut während der Entnahme mit Antikoagulantien (Citrat beziehungsweise EDTA) versetzt wird. Je frischer die Blutprobe ist, desto leichter lassen sich die einzelnen Phasen bei der Dichtezentrifugation auftrennen und desto höher ist dadurch auch die Ausbeute. Bei einer frischen Probe kann davon ausgegangen werden, dass kein Abbau an RNA stattgefunden hat und somit nicht degradierte RNA für die semiquantitative RT-PCR verwendet werden kann. Zudem sind die Oberflächenproteine auf diesen Zellen erhalten, was für die Proteinexpressionsanalyse per FACS Voraussetzung ist.

## 4.2 Expressionsanalyse auf Translationsebene mittels FACS Analyse

Es wurden die Proteine AC133, CD34, cKit, CD45, CD13 und CD31 sowie die endothelzellspezifischen Antikörper vWF und VEGFR-2 genauer betrachtet. Zum Vergleich und als Kontrolle für die Isolation wurden die bei der MACS Isolation anfallenden AC133<sup>-</sup>-PBMC (AC133 negative mononukleäre Blutzellen) in den Untersuchungen mitgeführt. Das Oberflächenprotein AC133 wird spezifisch auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert, zudem kommt es auch auf Stamm- und Vorläuferzellen nicht hämatopoetischer Gewebe vor wie zum Beispiel neuronalen, embryonalen Stammzellen und adulten mesenchymalen multipotenten Vorläufern vor (Jiang et al., 2002; Kaufman et al., 2001; Uchida et al., 2000). Bei dem Zelloberflächenmarker CD34 handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein, das zur Familie der Sialomucine gehört. CD34 kommt auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, auf Endothelzellen und auf embryonalen Fibroblasten vor (Brown et al., 1991; Fina et al., 1990). Ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen sind CD34 negativ (Civin and Loken, 1987)]. Ein weiteres wichtiges Molekül von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ist c-Kit (CD117). Hierbei handelt es sich um

ein Typ III Protein aus den Rezeptortyrosinkinase-Familie. c-Kit wird von benignen und transformierten hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie auf Endothelzellen und Neuronen exprimiert (Ashman et al., 1991; Broudy, 1997; Broudy et al., 1992). c-Kit und sein Ligand, das Zytokin Stem Cell Factor (SCF) spielen eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese. Weitere betrachtete Marker sind das Oberflächenprotein CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM), ein Adhäsionsprotein, welches sowohl auf Endothelzellen als auch auf Blutplättchen und Leukozyten exprimiert wird sowie CD13, ein Oberflächenprotein, das vor allem auf Monozyten und Makrophagen vorkommt. Zudem wird CD13 auf Vorläufer- und Endothelzellen exprimiert (Santiago-Schwarz et al., 1997; van Hensbergen et al., 2004)]. CD45, ein Oberflächenprotein, das auf allen Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) vorkommt (Nakano et al., 1990), wird ebenfalls in die Analyse mit einbezogen. Mit Hilfe dieser Auswahl an Oberflächenproteinen soll es möglich sein, Hinweise auf den Ursprung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu bekommen und so möglicherweise festzustellen, ob es sich bei diesen Zellen um endotheliale oder hämatopoetische Zellen handelt.

Die Expressionsanalyse der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut ergab, dass die Proteine AC133 und CD34 auf der Oberfläche exprimiert wurden, wie mit Hilfe der FACS Analyse detektiert werden konnte. Zudem ließen sich auch c-Kit und CD13 nachweisen. Auch der Pan-Leukozyten Marker CD45 wurde, wenn auch deutlich schwächer als bei den AC133<sup>-</sup>-PBMC, detektiert. Zudem wurde CD31 auf den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nachgewiesen. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen mehrerer anderer Gruppen (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Yin et al., 1997) und weist auf den Ursprung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen hin. Hingegen konnten die endothelspezifischen Marker VEGFR-2 und vWF nicht nachgewiesen werden. Ein technischer Fehler kann ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Antikörper in Vorversuchen mit MVEC ein deutliches Signal ergaben (Daten nicht gezeigt). Als Vergleichszellen wurden die bei der Isolation der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen gewonnenen AC133<sup>-</sup>-PBMC verwendet. Diese Zellpopulation, die aus Lymphozyten und Monozyten besteht, exprimierten wie erwartet den Leukozytenmarker CD45 sehr stark sowie den Monozytenmarker CD13 auf einem kleinen Teil der Zellpopulation. Weder AC133 noch CD34 wurden auf den PBMC exprimiert, was darauf hindeutet, dass keine Vorläuferzellen mehr in den AC133<sup>-</sup>-PBMC zu finden waren und somit die Ausbeute an AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nach der Isolation sehr hoch war. cKit und CD31 wurde wie auch schon CD13 nur auf einem Teil der Zellsuspension gefunden. Dies deckt sich mit der Aussage, dass diese Marker nur auf bestimmten Blutzellarten exprimiert werden (CD31 auf Leukozyten und CD13 speziell auf Monozyten) (Knapp et al., 1989).

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass mit Hilfe der MACS Isolationstechnik die gesuchten hämatopoetischen Zellen aus dem peripheren Blut isolieren ließen, und dass diese sowohl Vorläufer- als auch spezifische Blutzellmarker auf der Oberfläche trugen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Gruppen (Gehling et al., 2000; Massa et al., 2005; Peichev et al., 2000) VEGFR-2 nicht auf der Oberfläche der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem humanem peripheren Blut exprimiert wurde. Die fehlende Expression des Oberflächenproteins VEGFR-2 deutet möglicherweise daraufhin, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher um hämatopoetische als um endotheliale Vorläuferzellen handeln könnte.

Die Untersuchung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut ergab ein vergleichbares Bild. Auch hier wurde AC133 und CD34 deutlich detektiert und vWF konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripherem Blut wurde hier CD31 auf den Zellen nicht exprimiert. Zudem wurde VEGFR-2, wenn auch nur sehr schwach, auf den Zellen exprimiert. Die Blutzellmarker CD13 und CD45 wurden auch hier mit Hilfe des FACS detektiert. Es zeigt sich somit, dass sich die isolierten Zellen aus dem peripherem Blut und dem Nabelschnurblut stark ähneln, nur die Expression von CD31 und VEGFR-2 war unterschiedlich. Möglicherweise befinden sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut in einem früherem Stadium der Differenzierung, was die unterschiedliche Expression einzelner Oberflächenproteine erklären würde.

Zur weiteren Charakterisierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden einige der in der FACS Analyse betrachteten Proteine auf mRNA Ebene genauer untersucht.

#### **4.3 Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene mittels real time RT - PCR**

Mit der semiquantitativen RT-PCR wurde die Expression der mRNA von AC133, CD34, vWF und CD31 analysiert. Als Referenzgen wurde das ubiquitär exprimierte Haushaltsgen GAPDH betrachtet. Die verwendeten Primer und Sonden Kombinationen waren zuvor auf ihre Transkriptionseffizienz hin untersucht worden, um sicherzustellen, dass eine schwache Expression nicht auf ungeeignete Primer beziehungsweise Sonden zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der FACS Analyse konnte mit Hilfe des Taqman auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Zudem zeigte sich auch hier, dass die Expression der betrachteten Gene in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut und aus dem Nabelschnurblut vergleichbar waren. CD31 wurden in beiden Zellpopulationen 50 % geringer exprimiert als GAPDH und vWF konnte gar nicht nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied war in der Expression von CD34 zu erkennen. Dieses Gen wurde in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem

Nabelschnurblut zu 50 % exprimiert. In Zellen aus dem peripheren Blut war die Expression vergleichbar hoch wie die von GAPDH. Das Gen AC133 selbst wurde in den Nabelschnurblutzellen ebenfalls etwas stärker exprimiert als in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem adulten Blut. Diese Daten deuten wie auch schon bei der FACS Analyse der Oberflächenproteine daraufhin, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut um weniger differenzierte Zellen handelt, da sie die Vorläuferzellmarker AC133 und CD34 stärker exprimierten.

#### **4.4 Analyse der Genexpression in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in der Kokultur mit unterschiedlichen Zellarten**

Neben der Untersuchung der Genexpression in frisch isolierten AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurden diese Zellen mit unterschiedlichen Zelltypen kokultiviert, und die Veränderung in der Genexpression über den Zeitraum von 4 Wochen betrachtet. Hierdurch sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die unterschiedlichen kokultivierten Zelltypen auf die Genexpression und somit auch auf die Differenzierung der Vorläuferzellen haben.

Zur Betrachtung kamen drei unterschiedliche Kokultur-Systeme. Es wurden zum einen PBMC eingesetzt, um das natürliche Umfeld der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Blut widerzuspiegeln, zum anderen wurden MVEC als kokultivierte Zellart verwendet, um festzustellen, ob sich die Vorläuferzellen in Richtung der Endothelzellen differenzieren lassen. Als dritten Zelltyp wurden HL60 Zellen, eine humane Promyeloblasten-Zelllinie, eingesetzt, um den Einfluss von anderen Vorläuferzellen auf das Expressionsmuster der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu untersuchen.

Die Kultivierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut mit MVEC führte nicht zu einer Expression von vWF. Die Expression von CD31 konnte innerhalb von 3 Wochen um das 3fache gesteigert werden. Nach der 4. Woche war ein Abfall der CD31 Expression zu verzeichnen. Dies lässt sich aber durch einen zunehmenden Vitalitätsverlust der kokultivierten MVEC erklären. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von AC133 und CD34 innerhalb der ersten Woche bis unter die Nachweisgrenze absank. Die Expressionsabnahme dieser Vorläuferzellmarker und die Expressionssteigerung des CD31 Proteins deutet daraufhin, dass die Vorläuferzellen differenzierten.

Bei der Kokultivierung von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit PBMC war das Ergebnis ähnlich. Auch hier wurden AC133 und CD34 innerhalb der ersten Woche herunterreguliert und waren nicht mehr detektierbar. Die Expression von CD31 stieg im Verlauf der Kultur an, aber im Vergleich

zur Kokultur von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit MVEC war sie um ca. die Hälfte geringer. Die Expression von vWF konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Wie auch schon bei der Kokultur mit MVEC deuten diese Ergebnisse auf eine Differenzierung der Vorläuferzellen hin. Die Kultivierung mit HL60 Zellen führte zu einer geringeren Veränderung in der Expression der betrachteten Gene als bei den beiden anderen Kultivierungsansätzen. Es gab keinen Anstieg in der CD31 Expression. Hingegen ließ sich AC133 noch nach der dritten Kultivierungswoche nachweisen. Der Expressionswert entsprach dem von frisch isolierten AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen. Der Nachweis der Oberflächenproteins AC133 und der fehlende Anstieg in der CD31 Expression weisen daraufhin, dass bei der Kokultur mit HL60 Zellen der Differenzierungszustand erhalten blieb, wie er bei frisch isolierten Zellen auftrat.

Die Kultivierung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut mit den gleichen Zellarten, die schon bei der Kultur der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut verwendet wurden, ergab ein vergleichbares Resultat. Auch hier war ein Abfall der AC133 und CD34 Expression innerhalb der ersten Woche bei allen 3 Kulturansätzen zu erkennen. Zudem konnte bei allen keine Expression von vWF nachgewiesen werden. Die Expression von CD31 war ebenfalls vergleichbar. Sie nahm bei der Kokultur mit MVEC und PBMC stark zu und bei der Kokultur mit den Promyeloblastenzellen ließ sich innerhalb der ersten 3 Wochen eine leichte Abnahme der Expression erkennen. Nach der 4. Woche wurde CD31 ähnlich dem Referenzgen GAPDH exprimiert.

Es lässt sich somit feststellen, dass sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut in Kultur in Richtung reiferer Zellen differenzieren ließen, wobei aber nicht geklärt werden konnte, ob sich diese Zellen hin zu Endothelzellen oder hämatopoetischen Zellen entwickeln.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in unterschiedliche Richtungen differenzieren lassen, und dass sich dies durch eine Kokultur mit unterschiedlichen Zellarten beeinflussen lässt. Hierbei spielen höchstwahrscheinlich die Wachstumsfaktoren, die von den kokultivierten Zellen ausgeschüttet werden, eine wichtige Rolle. Sawano et al. konnte an Hand der Expression von spezifischen Markern zeigen, dass sich CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut in Kultur mit hämatopoetischen Zytokinen (IL-3, IL-6, Flt-3 Ligand, GM-CSF und M-CSF) in Makrophagen ähnliche Zellen differenzierten. Die Differenzierung von Endothelvorläuferzellen hin zu Endothelzellen wie sie u.a. Asahara et al. (Asahara et al., 1997) und Gehling et al. (Gehling et al., 2000) zeigen konnten, lässt sich hier aber nicht eindeutig feststellen, da die Expression von CD31 auch bei der Kokultur mit PBCM zunahm und zudem keine Expression von vWF nachgewiesen werden konnte. Zudem wird CD31 auch auf Leukozyten exprimiert, sodass es möglich wäre, dass sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen trotz der Kokultur mit MVEC weiter in Richtung der Blutzellen differenzierten.

Eine auf CD31 stützende Aussage, dass AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sich in Endothelzellen differenzieren lassen, ist somit nicht ausreichend. Da zudem keine Expression von vWF nachweisbar war, kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu Endothelzellen differenzierten. Während der Kultur mit MVEC nahm zwar die Zahl an adhärennten Zellen zu, es waren aber immer noch eine Vielzahl an Suspensionszellen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Des weiteren konnten auch bei der Kultur mit PBMC adhärennte Zellen detektiert werden. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass die adhärennten Zellen bei der MVEC Kokultur aus den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen ausdifferenzierte Endothelzellen waren.

#### 4.5 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix

Zur weiteren Klärung dieser Entwicklung wurde mit Hilfe der mRNA der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden zudem verschiedene Zellarten mit einbezogen, um eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu anderen Zellarten treffen zu können. Des weiteren sollte festgestellt werden, ob es für AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen spezifische Gene gibt, die nur in diesen exprimiert werden. Als Vergleichszellen wurden MVEC, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, T-Helferzellen (TH-1), dendritische Zellen (DDC), humanes Knochenmark sowie die bei der Isolation gewonnenen AC133<sup>-</sup>-PBMC zum Vergleich mit den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eingesetzt. Zudem wurden die Tumorzelllinien EO-1 (eosinophile Leukämiezelllinie), THP-1 (monozytische Leukämiezelllinie) sowie HL60 (promyeloblastische Leukämiezelllinie) als Vertreter der Blutkrebszelllinien mit in den Vergleich einbezogen.

Zunächst wurden die Ergebnisse aus der TaqMan® Analyse mit denen der Array Analyse verglichen. Hierbei wurden die Gene betrachtet, die auch schon im TaqMan® untersucht wurden. Es konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. AC133 wurde ausschließlich in den mit AC133 Mikrobeads isolierten Zellen exprimiert. Zudem wurde CD34 in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sehr stark und vWF gar nicht exprimiert. CD31 konnte in allen betrachteten Zellarten nachgewiesen werden. Als weiteres Endothelzell spezifisches Gen wurde VE-Cadherin mit einbezogen. Hierbei handelt es sich um ein Adhäsionsprotein, das speziell auf Endothelzellen exprimiert wird (Salomon et al., 1992). VE-Cadherin wurde nur auf MVEC exprimiert und nicht auf den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen beziehungsweise AC133<sup>-</sup>-PBMC.

Zur Klärung des Verwandtschaftsgrades der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit anderen Zelltypen wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analyse) durchgeführt. Diese

Analysemethode erlaubt die Darstellung grundlegender Muster der Genexpression. Geringe Unterschiede in den Daten werden schwächer bewertet. Die Darstellung der Principal Components geschieht als Punkte in einem dreidimensionalen Koordinatensystem. Punkte, die in diesem Koordinatensystem nah beieinander liegen, haben ähnliche Eigenschaften, beruhen daher auf ähnlichen Expressionsdaten. Punkte mit größerer Distanz zueinander sind sich nicht ähnlich und beruhen auf unterschiedlichen Expressionsdaten. Bei der Hauptkomponentenanalyse wurde festgestellt, dass sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen von den betrachteten Vergleichszellen stark unterscheiden und eine eigenständige Population darstellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen einen höheren Verwandtschaftsgrad mit den Blutzellen als mit den mikrovaskulären Endothelzellen aufweisen. Die Genexpression der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen ähnelt auch nicht der Expression der untersuchten Leukämiezelllinien. Diese Betrachtung der Affymetrix Daten bestätigt das kürzlich veröffentlichte Ergebnis, dass AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher als hämatopoetische Vorläuferzellen zu betrachten sind denn als Endothelvorläuferzellen (Toren et al., 2005).

Des Weiteren wurde die Genexpression der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen auf den Affymetrix Chips HG-U 113 Plus 2.0 und saTIVA gemessen und mit der Expression in mikrovaskulären Endothelzellen, peripheren mononukleären Blutzellen, drei unterschiedlichen Promyeloblastenzelllinien und Knochenmarkszellen verglichen. Ziel war es Gene zu finden, die in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen stark überexprimiert sind. Einige dieser Gene wurden mit Hilfe der Literatur genauer betrachtet, um so einen weiteren Hinweis auf die Rolle der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu finden.

### **Im Vergleich mit mikrovaskulären Endothelzellen**

Bei der Betrachtung der Genexpression auf dem HG-U 133 Plus 2.0 Chip konnten 1181 Gene gefunden werden, welche mindestens 10fach in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu MVEC überexprimiert wurden. Hier soll nur eine Auswahl besprochen werden. Unter anderem wurde Angiopoietin 1 überexprimiert. Dieses Protein wird vor allem in periendothelialen Zellen exprimiert, wohingegen Angiopoietin 2 bevorzugt in Endothelzellen exprimiert wird (Davis et al., 1996; Kim et al., 2000; Maisonpierre et al., 1997). Angiopoietin 1 spielt als Ligand des Tie2 Rezeptors, einem Oberflächenprotein, das fast ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird, eine wichtige Rolle bei der Vaskulogenese sowie der Angiogenese (Suri et al., 1996). Durch die Bindung von Angiopoietin 1 an Endothelzellen wird das Blutgefäß stabilisiert, dieser Effekt wird durch den natürlichen Antagonisten Angiopoietin 2 umgekehrt. Die Destabilisierung ist ein wichtiger Schritt bei der Angiogenese

(Holash et al., 1999; Maisonpierre et al., 1997). Ein weiteres überexprimiertes Gen ist Epiregulin, einer der Liganden der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (Shelly et al., 1998). Es spielt eine Rolle bei der Produktion von Zytokinen aus dem Knochenmark stammender Makrophagen (Shirasawa et al., 2004). Neben Epiregulin wurde auch fms-related Tyrosinkinase 3 (FLT3) überexprimiert. Dieses Protein wird ausschließlich von CD34<sup>+</sup> Blut- beziehungsweise Knochenmarkszellen exprimiert und dient als Wachstumsfaktorrezeptor auf diesen Vorläuferzellen (Small et al., 1994). Junctional adhesion molecule 2 (JAM2), das ebenfalls mindestens 25fach überexprimiert wurde, gehört zur Familie der Adhäsionsproteine. Es wird vor allem auf Endothelzellen und auch Lymphozyten exprimiert und hat möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Transmigration von Lymphozyten durch die Gefäßwand (Aurrand-Lions et al., 2002). Ein weiteres stark exprimiertes Protein ist die Myeloperoxidase (MPO). Es wird ausschließlich in Leukozyten gebildet und hat mit seiner mikrobiziden Eigenschaft eine wichtige Funktion bei Entzündungsreaktionen (Eiserich et al., 2002).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass eine Vielzahl der in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei dem Vergleich von Endothelzellen und AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen stark überexprimierten Genen auch in hämatopoetischen Zellen gebildet werden. Zudem spielen viele dieser Gene eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und weiteren dabei wichtigen Abläufen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher um hämatopoetische Vorläuferzellen handelt, die nur einen geringen endothelialen Charakter aufweisen.

### **Im Vergleich mit peripheren mononukleären Blutzellen**

Neben dem Vergleich mit Endothelzellen wurde auch die Genexpression in mononukleären Blutzellen analysiert, um Gene zu finden, die nur spezifisch in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und nicht in Endothel- sowie Blutzellen exprimiert werden. Es wurden insgesamt 313 Gene gefunden, die in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu PBMC 10fach überexprimiert wurden. Eines dieser Gene ist Chordin-like 1, welches hauptsächlich in mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Im adulten Körper kommt es nur noch sehr selten vor und wird dort unter anderem in Stromazellen des Knochenmarks exprimiert (Nakayama et al., 2001). Die Expression dieses Proteins weist auf die Verwandtschaft der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit den mesenchymalen Stammzellen hin. Ein weiteres überexprimiertes Gen ist das  $\alpha 9$  Integrin, welches insbesondere von neutrophilen Granulozyten gebildet wird. Mit Hilfe dieses Proteins werden unter anderem Zell-Zell sowie Zell-Matrix Adhäsionen dieser Zellen mit Endothelzellen ermöglicht (Ross et al., 2005). Die starke Überexpression dieses Gen in

AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu PBMC deutet darauf hin, dass die Vorläuferzellen möglicherweise Granulozytenvorläufer oder eine verwandte Zellart bilden. Ein weiteres Indiz, dass es sich bei AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen um Zellen einer hämatopoetischen Linie und nicht um Endothelzellvorläufer handelt, ist die Überexpression von Myeloperoxidase (MPO). Dieses Gen wurde auch bei der Betrachtung des Expressionsvergleiches mit MVEC gefunden. Die Expression in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen kann als hoch spezifisch angesehen werden. MPO wird ausschließlich in Leukozyten gebildet und spielt eine wichtige Funktion bei Entzündungsreaktionen (Eiserich et al., 2002).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass auch bei diesem Vergleich mehrere überexprimierte Gene gefunden werden konnten, die daraufhin weisen, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher um hämatopoetische und nicht um endotheliale Vorläuferzellen handelt.

### **Im Vergleich mit Leukämiezelllinien**

Zum Expressionsvergleich mit Leukämiezelllinien wurden die Zelllinien EO-1 (eosinophile Leukämiezelllinie), THP-1 (monozytische Leukämiezelllinie) sowie HL60 (promyeloblastische Leukämiezelllinie) eingesetzt. Eines der 46 Gene, die mindestens 10fach in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu den Leukämiezelllinien überexprimiert wurde, ist ADAM8. Dieses Protein spielt möglicherweise bei dem Übergang von Leukozyten aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe eine Rolle (Schlomann et al., 2002). Zudem wurde wie auch schon bei dem Vergleich mit MVEC Angiopoietin 1, das hauptsächlich in periendothelialen Zellen vorkommt, überexprimiert (Hattori et al., 2001; Kim et al., 2000). CD62 (L-Selectin) wurde ebenfalls mindestens 10fach überexprimiert. Dieses Protein ist wichtig für den Zell-Zell Kontakt von Leukozyten und Endothelzellen (Genbacev et al., 2003). RhoH, ein GTP-Bindungsprotein, welches ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vorkommt, wurde ebenfalls in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen überexprimiert. RhoH spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Proliferation von hämatopoetischen Zellen (Gu et al., 2005a; Gu et al., 2005b)

Bei diesem Vergleich konnten mehrere Gene gefunden werden, die ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, oder eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Endothel mit Blutzellen spielen. Somit lässt sich auch bei dem Vergleich mit Leukämiezelllinien auch Hinweise auf den hämatopoetischen Ursprung der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen finden.

### **Im Vergleich mit Knochenmarkszellen**

Die Differenzen in der Genexpression verglichen mit Knochenmarkszellen waren geringer. Daher wurden statt >10fach die >8fach überexprimierten Gene genauer betrachtet, um eine größere Anzahl an möglicherweise relevanten Genen zu erhalten. Unter diesen konnten insgesamt 14 >8fach überexprimierte Gene in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Vergleich zu Knochenmarkszellen gefunden werden. Nur 4 davon waren >10fach überexprimiert.

Eines der >8fach überexprimierten Gene ist Cytokin-like 1, welches auch schon bei dem Vergleich mit den Tumorzelllinien überexprimiert wurde. Dieses Protein wird ausschließlich in CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark gebildet und dient möglicherweise als Zytokin (Liu et al., 2000). Des Weiteren wurde G protein-coupled receptor 56 in den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen überexprimiert. Dieses Protein ist möglicherweise notwendig für Zell-Zell Interaktionen und wird vor allem in Makrophagen, aber nur geringfügig in Monozyten im Blut exprimiert (Shashidhar et al., 2005).

Insgesamt konnten mit Hilfe der Affymetrix Analyse eine Vielzahl von Hinweisen gefunden werden, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher um hämatopoetische Vorläuferzellen, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen, als um Endothelvorläuferzellen handelt. Viele der überexprimierten Gene werden auch von Makrophagen, Granulozyten und anderen Blutzellen gebildet. Zudem wurden einige Gene gefunden, die für Proteine codieren, die wichtig bei Zell-Zell Interaktionen von verschiedenen hämatopoetischen Zellen mit Endothelzellen sind. Hierdurch wird es beispielsweise den hämatopoetischen Zellen ermöglicht durch die Gefäßwand zu den Entzündungsherden zu migrieren.

### **4.6 Einbau von humanen Zellen in Mausgewebe**

Die Hinweise, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen um hämatopoetische und nicht um endotheliale Vorläuferzellen handelt, wurden in einem *in vivo* Modell weiter verfolgt. Es wurde zum einen der Einbau humaner Zellen analysiert, zum anderen wurde der Einbau syngener Knochenmarkszellen als Kontrollzellen zu den humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen untersucht. Hierbei sollte mit Hilfe eines Mausmodells untersucht werden, ob sich AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen beziehungsweise mikrovaskuläre Endothelzellen in das Tumorgewebe einbauen und detektiert werden lassen. Zudem wurde Lungengewebe untersucht, um festzustellen, ob die i.v. applizierten humanen Zellen in den Kapillargefäßen stecken blieben.

Die zu injizierenden Zellen wurden zuvor mit Calcein AM angefärbt. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, das durch zelleigene Esterasen im Zytoplasma gespalten wird und so in ein fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird, der nicht mehr durch die Zellmembran diffundieren kann. Dieser Farbstoff ist bis zu zwei Wochen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. Neben der optimalen Konzentration wurde auch die Toxizität des Farbstoffes untersucht. Eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Calcein AM war am besten für die Färbung von MVEC und PBMC beziehungsweise AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen geeignet. Die so angefarbten Zellen waren über den Untersuchungszeitraum vital und gut mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nachweisbar.

Die Analyse der Integration von AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in Maustumorgewebe zeigte, dass die Vorläuferzellen nur in der äußeren Region des Tumorgewebes detektiert wurden. Zudem ließ sich mit Hilfe einer Färbung mit anti-Maus CD31 Antikörpern erkennen, dass kein spezifischer Einbau der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in die Blutgefäße erfolgte. Die Zellen wurden zum größten Teil im Stroma gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Forschungsgruppen erreicht. Voswinckel et al. zeigten in einem Mausmodell für regeneratives Lungenwachstum, dass der Einbau von Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark in das neu entstehende Lungengewebe ein sehr seltener Prozess war und kaum zur Vaskularisierung beitrug (Voswinckel et al., 2003). Ranjantie et al. konnte ebenfalls in einem Mausmodell zeigen, dass genetisch markierte syngene Knochenmarkszellen keine signifikante Rolle bei der Tumor- oder Zytokin induzierten Neoangiogenese spielten. Die Knochenmarkszellen exprimierten hämatopoetische Marker wie CD45 und CD11b, sodass es sich bei diesen Zellen möglicherweise eher um Vorläuferzellen für hämatopoetische Effektorzellen handelt (Ranjantie et al., 2004). Die Gruppe um Peters konnte zwar in einer Untersuchung von Patienten, die nach einer Knochenmarkstransplantation Lymphome, Karzinome oder Sarkome entwickelten, zeigen, dass solche Knochenmarkszellen in das Gefäßsystem des Tumorgewebes eingebaut wurden. Der Anteil war aber mit unter 5 % sehr gering. Dies deutet darauf hin, dass auch im Menschen der Einfluss von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bei der Angiogenese im Erwachsenen gering ist (Peters et al., 2005).

Neben der Untersuchung des Einbaus von Vorläuferzellen in Tumorgewebe wurde auch der Einbau von differenzierten humanen Endothelzellen in Tumorendothel untersucht. Hierbei wurden MVEC vor der i.v. Gabe mit Calcein AM angefärbt, i.v. beziehungsweise intratumoral appliziert und am Ende des Versuches wurde das Tumorgewebe sowie Lungengewebe aus der Nacktmaus auf humane MVEC hin untersucht. Es konnte wie schon bei dem Versuch mit AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen kein signifikanter Einbau von MVEC in das Gefäßsystem des Tumors detektiert werden. Die Zellen wurden zum größten Teil im Stroma gefunden. Es ließen sich

auch hier keine Zellen im Lungengewebe nachweisen. Zusätzlich wurden MVEC direkt in den Tumor beziehungsweise die Tumorperipherie gespritzt. Diese Applikationsart diente als Positivkontrolle für den Einbau der Calcein AM gefärbten Zellen in das Mausgewebe. Auch hier wurden die MVEC bevorzugt im Stroma gefunden. Einige wenige Zellen fanden sich in der Wand beziehungsweise in der Nähe der Gefäßwand von Blutgefäßen.

Im Zusammenhang mit Organtransplantationen wurde die Rolle von nicht körpereigenen Endothelzellen bei der Gefäßbildung beschrieben. Hillebrands et al. zeigten in einem Rattenmodell, dass bei der allogenen Transplantation von Aorten die Endothelzellen in den Spenderaorten nach einiger Zeit durch die körpereigenen Endothelzellen ersetzt wurden (Hillebrands et al., 2001). Sofern keine Immunsuppressiva verabreicht wurden, nekrotisieren die Spenderendothelzellen innerhalb von zwei Wochen und wurden durch die Endothelzellen des Organempfängers ersetzt. Lagaaij et al. (Lagaaij et al., 2001) konnten ähnliche Ergebnisse bei der Betrachtung von Nierentransplantationen im Menschen feststellen. Auch hier wurden die Endothelzellen in der Spenderniere nach einiger Zeit durch die autologen Zellen des Empfängers ersetzt. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass es eine Korrelation zwischen körpereigenen Endothelzellen im Transplantat und Organabstoßung gibt. Ein hoher Grad an körpereigenen Endothelzellen im Transplantat korrelierte mit der vaskulären Abstoßung. Als mögliche Erklärung gab diese Gruppe an, dass durch die Abstoßungsreaktion das Endothel im Transplantat geschädigt wird und dann durch körpereigene Endothelzellen ersetzt wird (Lagaaij et al., 2001). Dies wäre somit auch eine mögliche Erklärung, warum kein Einbau von Calcein AM markierten Endothelzellen in das Tumorgefäßsystem detektiert wurde. Die über die Schwanzvene verabreichten humanen Endothelzellen wurden nicht spezifisch zu dem Angiogeneseherd im Tumor gelockt, sondern nur zufällig und unspezifisch in das Tumorgewebe eingebaut. Körperfremde Endothelzellen scheinen somit keine große Rolle bei der Entwicklung eines neuen Gefäßsystems zu spielen.

#### **4.7 Einbau von syngenem Knochenmarkszellen in Mausgewebe**

Neben der Untersuchung des Einbaus von humanen Zellen in Mausgewebe wurde auch der Einbau von Mausknochenmarkszellen in verschiedene Mausgewebe analysiert. Murine Knochenmarkszellen als ein Pool von Vorläuferzellen wurden hierbei als Vergleichszellen zu den humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eingesetzt. Hierzu wurden aus einer transgenen Maus, die das Protein GFP in allen Geweben (außer Haaren und Erythrozyten) exprimiert, Knochenmarkszellen entnommen und i.v. in eine tumortragende Maus des gleichen Stammes appliziert. Nach einer Zeitspanne von 4 Tagen wurden der Tumor, die Lunge und der

Thymus auf das Vorhandensein von GFP positiven Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie hin untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass GFP positive Zellen im Tumor auftraten. Wie schon bei der Analyse mit humanen Zellen beobachtet, wurden die Knochenmarkszellen nicht direkt in die Gefäßwand integriert, sondern waren vor allem im Stroma des Tumorgewebes wieder zu finden. Auch im Thymusgewebe waren GFP positive Zellen vorhanden, die ebenfalls zum größten Teil nicht in den Blutgefäßen eingebaut wurden. Als Kontrolle wurde das Lungengewebe analysiert. Hierbei konnten keine GFP positiven Zellen detektiert werden. So kann davon ausgegangen werden, dass die applizierten Knochenmarkszellen nicht einfach in den Kapillargefäßen der Lunge stecken blieben und folglich für einen möglichen Einbau in das Tumorgewebe zur Verfügung standen.

Da Knochenmarkszellen weder in das Blutgefäßsystem im Thymus noch in das Gefäßsystem des hier untersuchten Tumors eingebaut wurden, konnte eine direkte Rolle bei der Angiogenese hier also nicht gestützt werden. Bei dem Thymus handelt es sich um ein Organ, in dem T-Lymphozytenvorläufer einwandern und dort in reife T-Lymphozyten differenzieren. Bei den GFP positiven Zellen im Thymusgewebe handelt es sich möglicherweise um T-Lymphozytenvorläufer aus den applizierten Knochenmarkszellen, die auf Grund des im Vergleich zum humanem Thymusgewebe verwandten Milieus mit in das Thymusgewebe der Maus einwanderten. Im Tumorgewebe wird eine Vielzahl von Zytokinen ausgeschüttet, wodurch mittels Chemotaxis verschiedene Zelltypen unter anderem hämatopoetische Zellen, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen, angelockt werden (Coussens et al., 1999; Coussens and Werb, 2002). Das Vorhandensein der GFP positiven Knochenmarkszellen im Tumorgewebe könnte somit darauf zurückzuführen sein, dass es sich hier um Zellen handelt, die eine wichtige Funktion bei Entzündungsreaktionen haben.

Bei dem Vergleich der Integration von humanen AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen in den Tumor mit dem von Mausknorpelmarkszellen war gut erkennbar, dass die beiden Zellarten ähnlich eingebaut wurden. Die Zellen wurden nicht spezifisch in das Endothel eingebaut, sondern irregulär in das Stroma des Tumorgewebes. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen eher um Vorläuferzellen des Immunsystems handelt als um endotheliale Vorläuferzellen. De Palma et al. konnten zeigen, dass Monozyten, die den Rezeptor Tie2 exprimierten, im Tumorgewebe gefunden wurden, aber nicht direkt in die Blutgefäße integriert wurden. Sie hatten indirekt einen positiven Einfluss auf die Angiogenese (De Palma et al., 2005). Es wäre somit denkbar, dass AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, da sie ähnlich den Monozyten nicht direkt in die Gefäßwand integrierten, ebenfalls Zellen des Immunsystems sind, die eine indirekte Rolle in der Tumorangiogenese spielen. Ein weiteres Indiz für diese These liefert die Arbeit von Modarai et al., welche zeigte, dass Tie2

exprimierende Knochenmarkszellen bei der Vaskularisierung eines Thrombus eine Rolle spielten. Sie stellten fest, dass diese Zellen nicht direkt in die Gefäßwand des Blutsystems eingebaut wurden, sondern nur in der Nähe der neu gebildeten Blutgefäße auftraten. Zudem wiesen diese Zellen einen Makrophagen Phänotyp auf. Die Gruppe spekulierte, dass der Revaskularisierungsprozess mittels reifer Endothelzellen stattfand, und dass die Tie2 exprimierenden Knochenmarkszellen einen Stimulus für diese Revaskularisierung lieferten (Modarai et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei der Tumorangio-genese weiter geklärt. In den bisherigen Studien zur Funktion von Endothelvorläuferzellen, wie die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen auch genannt werden, konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Einige Forschergruppen zeigten, dass CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, die auch als endotheliale Vorläuferzellen bezeichnet werden, sowie Knochenmarkszellen einen direkten Beitrag bei der Vaskularisierung von ischämischem Gewebe oder Tumorgewebe leisten. Die endothelialen Vorläuferzellen konnten in den neu gebildeten Blutgefäßen nachgewiesen werden (Asahara and Kawamoto, 2004; Asahara et al., 1999; Asahara et al., 1997; Lyden et al., 2001; Murohara et al., 2000).

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung und der Rolle der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei der Tumorangio-genese. Die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen konnte mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sowie einer Affymetrix Chip Analyse auf DNA-Ebene als Zellen identifiziert werden, die eher hämatopoetischen Ursprungs sind, als dass es sich bei diesen Zellen um endotheliale Vorläufer handelt. Bei der Kokultivierung der Zellen mit reifen Endothelzellen, mononukleären Blutzellen sowie Promyeloblastenzellen wurden gezeigt, dass sich diese Zellen in unterschiedliche Richtungen differenzieren lassen, aber eine eindeutige Differenzierung hin zu Endothelzellen konnte nicht beobachtet werden. Mit Hilfe der *in vivo* Modelle wurde zudem festgestellt, dass sich die AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen nicht direkt in die neu entstandenen Blutgefäße integrierten sondern irregulär im Stroma des Tumorgewebes eingebaut wurden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen anderer Forschergruppen. Ziegelhoeffer et al. zeigten in einem Mausmodell für Ischämie sowie einem Tumormodell, dass GFP positive Zellen aus dem Knochenmark nicht mit Endothelzellen oder glatten Muskelzellen in dem Tumorgewebe oder dem ischämischen Gewebe kolokalisierten (Ziegelhoeffer et al., 2004). Voswinkel et al. konnten in einem Modell für nachwachsendes Lungengewebe zeigen, dass transplantierte syngene Knochenmarkszellen nicht direkt in die Gefäße eingebaut wurden (Voswinkel et al., 2003). Einen direkten Einfluss von Knochenmarkszellen bei der Neoangiogenese durch Einbau dieser Zellen in neu entstehende Gefäße konnten Rajantie et al. ebenfalls nicht feststellen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass ein

Großteil der im Tumorgewebe gefundenen Knochenmarkszellen nicht Vorläufer für Endothelzellen sondern für hämatopoetische und periendotheliale Zellen waren (Rajantie et al., 2004).

Aus Grund der erzielten Ergebnisse und der Resultate, die andere Gruppen zeigen konnten, lässt sich insgesamt feststellen, dass es sich bei AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen um hämatopoetischen Vorläuferzellen und nicht wie zuvor vermutet, um endotheliale Vorläuferzellen handelt. Diese hämatopoetischen Vorläufer werden, wie in den *in vivo* Versuchen gezeigt werden konnte, ins Stroma von Tumoren eingebaut und haben dort möglicherweise einen indirekten Einfluss auf die Tumorangiogenese. Hinweise auf einen indirekten Einfluss von hämatopoetischen Vorläuferzellen bei der Tumorangiogenese konnte die Gruppe um de Palma zeigen. Monozyten, die den Angiopoietin Rezeptor Tie2 exprimierten, konnten im Stroma des Tumorgewebes nachgewiesen werden. Zudem wurde durch Knockout dieser Zellen in einem Mausmodell gezeigt, dass die Vaskularisierung eines Tumors verhindert werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass diese hämatopoetischen Zellen einen indirekte Rolle bei der Tumorangiogenese spielen (De Palma et al., 2005).

## 5. Ausblick

Im Blickpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung sowie die Klärung der Funktion der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei der Tumorangiogenese. Die Klärung der Rolle von Vorläuferzellen als Surrogatmarker für antiangiogene Therapien bei Tumorpatienten stand hier nicht im Vordergrund. Um diese Vorläuferzellen als Surrogatmarker zu nutzen, wäre es denkbar direkt aus dem humanen Blut mittels PCR das Gen AC133 nachzuweisen. Hierdurch würde man eine einfache standardisierbare Methode für die Klinik erhalten. Da im Laufe dieser Arbeit gezeigt wurde, dass AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen keine direkte Rolle bei der Tumorangiogenese zu spielen scheinen, sollte in zukünftigen Arbeiten weiter geklärt werden, ob es eine indirekte Rolle der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei der Tumorangiogenese gibt. Dies wäre beispielsweise durch eine Generierung eines Mausstammes, der keine AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bilden kann, denkbar.

## Zusammenfassung

Die Bedeutung der klinischen Forschung an Stamm- und Vorläuferzellen besonders im Bereich der Geweberegeneration hat mit der Verbesserung der analytischen Instrumente zugenommen. Stammzellen für mesodermale Zellarten sind im menschlichen Körper im Knochenmark zu finden, wo sie durch verschiedene Stimuli für physiologische und pathologische Prozesse aktiviert werden können. Stammzellen aus adulten Organismen werden in endodermale, ectodermale und mesodermale Stammzellen, welche endotheliale Vorläuferzellen bilden, unterschieden. Diese Vorläuferzellen wurden in der vorliegenden Arbeit auf Transkriptions- und Translationsebene charakterisiert. Ihre Funktion bei der Angiogenese, speziell der Tumorangiogenese war von besonderem Interesse. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Klärung, ob sich endotheliale Vorläuferzellen als Surrogatmarker für antiangiogene Therapien verwenden lassen.

Die Endothelvorläuferzellen wurden aus humanem peripherem Blut sowie Nabelschnurblut mittels des Oberflächenproteins AC133, welches Stamm- und Vorläuferzellen charakterisiert, isoliert und als AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bezeichnet. Die Expression spezifischer Proteine für Stamm- und Vorläuferzellen (AC133, CD34 und cKit) und für bestimmte Blutzellarten (CD45 und CD13) wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sowie der FACS Analyse nachgewiesen. Endothelzell-spezifische Marker (VEGFR-2 und vWF) konnten nur zum Teil detektiert werden. Die Kokultur der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit anderen Zellen (Endothelzellen, mononukleäre Blutzellen und Promyeloblasten) führte zu einer Änderung in der Expressionsstärke dieser Marker. Die Affymetrix Chip Analyse zeigte eine Überexpression hämatopoetischer Proteine in AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen. Dies drückt einen höheren Verwandtschaftsgrad zu hämatopoetischen als zu endothelialen Zellen aus. Die Rolle dieser Zellen bei der Tumorangiogenese wurde im Mausmodell untersucht. Histologisch wurde ein irregulärer Einbau der AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Stroma des Tumorgewebes nachgewiesen. Endothelzellen (MVEC), welche in einem Parallelversuch injiziert wurden, fanden sich teilweise in den Gefäßen. Zur weiteren Klärung der Rolle von Vorläuferzellen wurden murine GFP<sup>+</sup> transfizierte Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in einem syngenem Modell eingesetzt. Sie wurden im Stroma des Tumorgewebes sowie im Thymus detektiert.

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass es sich bei den AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen um endotheliale Vorläuferzellen handelt, konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Zellen eher hämatopoetische Vorläuferzellen sind. Es ließ sich kein direkter Einfluss bei der Tumorangiogenese nachweisen. Ein Einsatz der Vorläuferzellen als Surrogatmarker für antiangiogene Therapien ist somit eher unwahrscheinlich. In zukünftigen Arbeiten sollte geklärt werden, ob durch den Einbau der Zellen ins Stroma des Tumorgewebes ein indirekter Einfluss auf die Angiogenese besteht. Dies wäre beispielsweise durch die Generierung eines Mausstammes, der keine AC133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bilden kann, möglich.

## Literatur

- Asahara, T. and Kawamoto, A. (2004) Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C572-579.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. and Isner, J.M. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, **85**, 221-228.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. and Isner, J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 964-967.
- Ashman, L.K., Cambareri, A.C., To, L.B., Levinsky, R.J. and Juttner, C.A. (1991) Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood*, **78**, 30-37.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Lamagna, C., Ozaki, H., Kita, T. and Imhof, B.A. (2002) Junctional adhesion molecules and interendothelial junctions. *Cells Tissues Organs*, **172**, 152-160.
- Badorff, C., Brandes, R.P., Popp, R., Rupp, S., Urbich, C., Aicher, A., Fleming, I., Busse, R., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2003) Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, **107**, 1024-1032.
- Bagley, R.G., Walter-Yohrling, J., Cao, X., Weber, W., Simons, B., Cook, B.P., Chartrand, S.D., Wang, C., Madden, S.L. and Teicher, B.A. (2003) Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res*, **63**, 5866-5873.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M. and McDonald, D.M. (2003) Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, **163**, 1801-1815.
- Bergers, G. and Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, **3**, 401-410.
- Bikfalvi, A. (1995) Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur J Cancer*, **31A**, 1101-1104.
- Blood, C.H. and Zetter, B.R. (1990) Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 89-118.

- Broome, A.M., Ryan, D. and Eckert, R.L. (2003) S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem*, **51**, 675-685.
- Broudy, V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, **90**, 1345-1364.
- Broudy, V.C., Lin, N., Zsebo, K.M., Birkett, N.C., Smith, K.A., Bernstein, I.D. and Papayannopoulou, T. (1992) Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood*, **79**, 338-346.
- Brown, J., Greaves, M.F. and Molgaard, H.V. (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, **3**, 175-184.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- Choi, K. (1998) Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol*, **76**, 947-956.
- Choi, K. (2002) The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res*, **11**, 91-101.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C. and Keller, G. (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, **125**, 725-732.
- Civin, C.I. and Loken, M.R. (1987) Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int J Cell Cloning*, **5**, 267-288.
- Coussens, L.M., Raymond, W.W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Caughey, G.H. and Hanahan, D. (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, **13**, 1382-1397.
- Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860-867.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. and Yancopoulos, G.D. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, **87**, 1161-1169.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi, L.S., Politi, L.S., Sampaolesi, M. and Naldini, L. (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, **8**, 211-226.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Roca, C. and Naldini, L. (2003) Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*, **9**, 789-795.
- de Wynter, E.A., Durig, J., Cross, M.A., Heyworth, C.M. and Testa, N.G. (1998) Differential response of CD34+ cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP-1 alpha

- and the expression of MIP-1 alpha receptors on these immature cells. *Stem Cells*, **16**, 349-356.
- Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Lusic, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R. and Freeman, B.A. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, **296**, 2391-2394.
- Ferrari, N., Glod, J., Lee, J., Kobiler, D. and Fine, H.A. (2003) Bone marrow-derived, endothelial progenitor-like cells as angiogenesis-selective gene-targeting vectors. *Gene Ther*, **10**, 647-656.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A. and Greaves, M.F. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, **75**, 2417-2426.
- Folkman, J. and Ingber, D. (1992) Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, **3**, 89-96.
- Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K. and Fiedler, W. (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, **95**, 3106-3112.
- Genbacev, O.D., Prakobphol, A., Foulk, R.A., Krtolica, A.R., Ilic, D., Singer, M.S., Yang, Z.Q., Kiessling, L.L., Rosen, S.D. and Fisher, S.J. (2003) Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, **299**, 405-408.
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M.L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H. and Rafii, S. (2001) Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*, **88**, 167-174.
- Gu, Y., Jasti, A.C., Jansen, M. and Sieftring, J.E. (2005a) RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **105**, 1467-1475.
- Gu, Y., Zheng, Y. and Williams, D.A. (2005b) RhoH GTPase: a key regulator of hematopoietic cell proliferation and apoptosis? *Cell Cycle*, **4**, 201-202.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G., Moore, M.A. and Rafii, S. (2001) Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, **193**, 1005-1014.
- Hillebrands, J.L., Klatter, F.A., van den Hurk, B.M., Popa, E.R., Nieuwenhuis, P. and Rozing, J. (2001) Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest*, **107**, 1411-1422.

- Holash, J., Wiegand, S.J. and Yancopoulos, G.D. (1999) New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, **18**, 5356-5362.
- Ingber, D.E. and Folkman, J. (1989a) How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, **58**, 803-805.
- Ingber, D.E. and Folkman, J. (1989b) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol*, **109**, 317-330.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**, 41-49.
- Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R. and Thomson, J.A. (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10716-10721.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. and Wiles, M.V. (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, **13**, 473-486.
- Keller, G.M. (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 862-869.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N. and Keller, G. (1997) A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*, **386**, 488-493.
- Kim, I., Kim, H.G., Moon, S.O., Chae, S.W., So, J.N., Koh, K.N., Ahn, B.C. and Koh, G.Y. (2000) Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res*, **86**, 952-959.
- Knapp, W., Rieber, P., Dorken, B., Schmidt, R.E., Stein, H. and vd Borne, A.E. (1989) Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today*, **10**, 253-258.
- Lagaaij, E.L., Cramer-Knijnenburg, G.F., van Kemenade, F.J., van Es, L.A., Bruijn, J.A. and van Krieken, J.H. (2001) Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*, **357**, 33-37.
- Lanfume, L. and Hamon, M. (2004) 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **3**, 1-10.
- Linton, E.A., Behan, D.P., Saphier, P.W. and Lowry, P.J. (1990) Corticotropin-releasing hormone (CRH)-binding protein: reduction in the adrenocorticotropin-releasing

- activity of placental but not hypothalamic CRH. *J Clin Endocrinol Metab*, **70**, 1574-1580.
- Liu, X., Rapp, N., Deans, R. and Cheng, L. (2000) Molecular cloning and chromosomal mapping of a candidate cytokine gene selectively expressed in human CD34+ cells. *Genomics*, **65**, 283-292.
- 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, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A., Hajjar, K.A., Manova, K., Benezra, R. and Rafii, S. (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, **7**, 1194-1201.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**, 55-60.
- Massa, M., Rosti, V., Ramajoli, I., Campanelli, R., Pecci, A., Viarengo, G., Meli, V., Marchetti, M., Hoffman, R. and Barosi, G. (2005) Circulating CD34+, CD133+, and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2-Positive Endothelial Progenitor Cells in Myelofibrosis With Myeloid Metaplasia. *J Clin Oncol*, **23**, 5688-5695.
- Matsumoto, K., Yasui, K., Yamashita, N., Horie, Y., Yamada, T., Tani, Y., Shibata, H. and Nakano, T. (2000) In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells*, **18**, 196-203.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K. and Buck, D.W. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, **90**, 5013-5021.
- Modarai, B., Burnand, K.G., Sawyer, B. and Smith, A. (2005) Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation*, **111**, 2645-2653.
- Murao, S., Stevens, F.J., Ito, A. and Huberman, E. (1988) Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1232-1236.
- Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K. and Imaizumi, T. (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, **105**, 1527-1536.
- Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S. and Kato, Y. (1990) Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn*, **40**, 107-115.

- Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T. (1994) Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, **265**, 1098-1101.
- Nakayama, N., Han, C.E., Scully, S., Nishinakamura, R., He, C., Zeni, L., Yamane, H., Chang, D., Yu, D., Yokota, T. and Wen, D. (2001) A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol*, **232**, 372-387.
- Nakayama, T. (2005) The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocr J*, **52**, 11-21.
- Ono, T., Kurashige, T., Harada, N., Noguchi, Y., Saika, T., Niikawa, N., Aoe, M., Nakamura, S., Higashi, T., Hiraki, A., Wada, H., Kumon, H., Old, L.J. and Nakayama, E. (2001) Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3282-3287.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A. and Rafii, S. (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, **95**, 952-958.
- Peters, B.A., Diaz, L.A., Polyak, K., Meszler, L., Romans, K., Guinan, E.C., Antin, J.H., Myerson, D., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. and Lengauer, C. (2005) Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*, **11**, 261-262.
- Polverini, P.J. (2002) Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ*, **66**, 962-975.
- Rafii, S., Heissig, B. and Hattori, K. (2002) Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*, **9**, 631-641.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminante, A., Ozerdem, U., Alitalo, K. and Salven, P. (2004) Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*, **104**, 2084-2086.
- Risau, W. and Flamme, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 73-91.
- Ross, E.A., Douglas, M.R., Wong, S.H., Ross, E.J., Curnow, S.J., Nash, G.B., Rainger, E., Scheel-Toellner, D., Lord, J.M., Salmon, M. and Buckley, C.D. (2005) Interaction between integrin  $\alpha_9\beta_1$  and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) inhibits neutrophil apoptosis. *Blood*.
- Sabin, F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contributions to embryology* **9**, 213-216.

- Sagara, N., Toda, G., Hirai, M., Terada, M. and Katoh, M. (1998) Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 117-122.
- Sage, E.H. (1997) Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends in Cell Biology*, **7**, 182-186.
- Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R.O. and Geiger, B. (1992) Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* **102 ( Pt 1)**, 7-17.
- Santiago-Schwarz, F., Borrero, M., Tucci, J., Palaia, T. and Carsons, S.E. (1997) In vitro expansion of CD13+CD33+ dendritic cell precursors from multipotent progenitors is regulated by a discrete fas-mediated apoptotic schedule. *J Leukoc Biol*, **62**, 493-502.
- Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A., Antropova, O., Zeuschner, D., Knight, C.G., Docherty, A.J., Lambert, M., Skelton, L., Jockusch, H. and Bartsch, J.W. (2002) The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem*, **277**, 48210-48219.
- Shaked, Y., Bertolini, F., Man, S., Rogers, M.S., Cervi, D., Foutz, T., Rawn, K., Voskas, D., Dumont, D.J., Ben-David, Y., Lawler, J., Henkin, J., Huber, J., Hicklin, D.J., D'Amato, R.J. and Kerbel, R.S. (2005) Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell*, **7**, 101-111.
- Shashidhar, S., Lorente, G., Nagavarapu, U., Nelson, A., Kuo, J., Cummins, J., Nikolich, K., Urfer, R. and Foehr, E.D. (2005) GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. *Oncogene*, **24**, 1673-1682.
- Shelly, M., Pinkas-Kramarski, R., Guarino, B.C., Waterman, H., Wang, L.M., Lyass, L., Alimandi, M., Kuo, A., Bacus, S.S., Pierce, J.H., Andrews, G.C. and Yarden, Y. (1998) Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem*, **273**, 10496-10505.
- Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y. and Imaizumi, T. (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, **103**, 2776-2779.
- Shirasawa, S., Sugiyama, S., Baba, I., Inokuchi, J., Sekine, S., Ogino, K., Kawamura, Y., Dohi, T., Fujimoto, M. and Sasazuki, T. (2004) Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13921-13926.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajczak, M.Z., Gewirtz, A.M. and et al. (1994) STK-1, the human homolog of Flk-

- 2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 459-463.
- Stainier, D.Y., Weinstein, B.M., Detrich, H.W., 3rd, Zon, L.I. and Fishman, M.C. (1995) Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development*, **121**, 3141-3150.
- Sturn, A., Quackenbush, J. and Trajanoski, Z. (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, **18**, 207-208.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, **87**, 1171-1180.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M. and Asahara, T. (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, **5**, 434-438.
- Takuwa, Y., Takuwa, N. and Sugimoto, N. (2002) The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem (Tokyo)*, **131**, 767-771.
- Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F. and Sauvageau, G. (2001) Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, **21**, 224-234.
- Toren, A., Bielora, B., Jacob-Hirsch, J., Fisher, T., Kreiser, D., Moran, O., Zeligson, S., Givol, D., Yitzhaky, A., Itskovitz-Eldor, J., Kventsel, I., Rosenthal, E., Amariglio, N. and Rechavi, G. (2005) CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia. *Stem Cells*, **23**, 1142-1153.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. and Weissman, I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14720-14725.
- van Hensbergen, Y., Broxterman, H.J., Rana, S., van Diest, P.J., Duyndam, M.C., Hoekman, K., Pinedo, H.M. and Boven, E. (2004) Reduced growth, increased vascular area, and reduced response to cisplatin in CD13-overexpressing human ovarian cancer xenografts. *Clin Cancer Res*, **10**, 1180-1191.
- Voswinckel, R., Ziegelhoeffer, T., Heil, M., Kostin, S., Breier, G., Mehling, T., Haberberger, R., Clauss, M., Gaumann, A., Schaper, W. and Seeger, W. (2003) Circulating vascular

- progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth. *Circ Res*, **93**, 372-379.
- Wiles, M.V. and Keller, G. (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, **111**, 259-267.
- Williams-DA, S.-C. a. (1995). *Blood: Principles and practice of hematology* (Philadelphia, J. B. Lippincott Company).
- Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y. and Jain, R.K. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, **10**, 145-147.
- Yano, M., Iwama, A., Nishio, H., Suda, J., Takada, G. and Suda, T. (1997) Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood*, **89**, 4317-4326.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D.W. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **90**, 5002-5012.
- Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinckel, R., Helisch, A. and Schaper, W. (2004) Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*, **94**, 230-238.

---

## Lebenslauf

Name: Jörg Frauenschuh  
Geboren: 19. März 1975 in Freiburg  
Familienstand: verheiratet

### Schulausbildung

---

1986 - 1994 Faust Gymnasium, Staufen

### Universität

---

10/1995 – 03/2002 Studium: Medizinische Biotechnologie an der TU Berlin  
03/2000 - 07/2000 Studienarbeit: „Investigation of cross-protection directed at the M-protein C-region“ and „Investigation of the contribution of C-region peptides to protective immunity induced by the heteropolymer“, Lab. Molecular Immunology, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australien  
08/2001 -03/2002 Diplomarbeit: „Untersuchung der Expression von Fibronectin Spleißvarianten in endometriotischen Zellen“, AREVIA GmbH, Berlin  
Seit 04/2004 Aufbaustudium: Wirtschaftsingenieur (Abendform), Technische Fachhochschule Berlin

### Promotion

---

06/2002 – 11/2005 Titel: „In vivo und in vitro Charakterisierung von Endothelvorläuferzellen“, CRBA Oncology, Schering AG, Berlin & FG medizinische Biotechnologie der Technischen Universität Berlin

### Anstellung

---

Seit 12/2005 Dossier Manager Regulatory Affairs Spec. Therapeutics & Oncology, Schering AG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2002 bis Dezember 2005 mit Schwerpunkt in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin unter Anleitung von Herrn Dr. Karl-Heinz Thierauch durchgeführt.

## **Eidestattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir nicht vorgenommen worden. Weiterhin versichere ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet noch ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Berlin, den 22. Dezember 2005

Jörg Frauenschuh