

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch)

**MESENCHYMALE STAMMZELLINIEN
IN DER LYMPHANGIOGENESE
UND IHRE ANWENDUNG IN EINER
STAMMZELLBASIERTEN SUIZIDGENTHERAPIE
DES PANKREASKARZINOMS**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Hanno Nieß
aus Mainz
2009

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stephan Irler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling

Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dr. phil. Claudius Conrad

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2009

*Meiner Mutter und
meinem Vater*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gliederung	1
1.2	Mesenchymale Stammzellen	1
1.2.1	Biologie mesenchymaler Stammzellen	4
1.2.1.1	Oberflächenmarker	4
1.2.2	Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen	4
1.2.3	Mesenchymale Stammzellen in der therapeutischen Medizin	8
1.2.4	Stammzellen und Krebs und der Begriff der „Krebsstammzelle“	9
1.3	Lymphangiogenese	12
1.3.1	Historischer Überblick über die Lymphgefäßerforschung	12
1.3.2	Entwicklung des Lymphgefäßsystems	14
1.3.3	Physiologie des Lymphsystems	16
1.3.4	Regenerative und tumorassoziierte Lymphangiogenese	18
1.3.5	Marker der Lymphangiogenese	19
1.3.5.1	Der Tyrosinkinaserzeptor VEGFR-3/FLT4 und seine Ligan- den VEGF-C und VEGF-D	19
1.3.5.2	Der prospero-related Homeobox Transkriptionsfaktor (Prox1)	22
1.3.5.3	Das Glykoprotein Podoplanin/T1alpha	24
1.3.5.4	Der „lymphatic vessel Hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)“	25
1.4	Angiopoietin-1 und sein Rezeptor Tie2/Tek	26
1.5	Pankreaskarzinom	27
1.5.1	Epidemiologie	27
1.5.2	Tumorbiologie	28
1.5.3	Pathologie	30
1.5.4	Tumormikromilieu, desmoplastische Reaktion und Tumorangiogenese .	30
1.5.5	Therapie	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Verwendete Software	33
2.1.2	Materialien zu den Versuchen der Lymphangiogenese	33

2.1.2.1	Untersuchte Zelllinien und verwendete Zellmedien	33
2.1.2.2	Durchflußzytometrie	35
2.1.2.3	RNA-Isolierung	35
2.1.2.4	RT-PCR	36
2.1.2.5	Taqman® quantitative Polymerase Kettenreaktion	36
2.1.2.6	Migration-Assay	37
2.1.2.7	Murines Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese . .	37
2.1.2.8	Immunhistochemie	37
2.1.3	Materialien der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms	38
2.1.3.1	Verwendete Zelllinien und Erläuterung der Genkonstrukte . .	38
2.1.3.2	Migration-Assay	41
2.1.3.3	Murines Orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom . . .	41
2.1.3.4	Fluoreszenzmikroskopie	41
2.1.3.5	Immunhistochemie	42
2.1.3.6	Taqman® quantitative Polymerase Kettenreaktion	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Methoden der Versuche zur Lymphangiogenese	43
2.2.1.1	Konditionierung der mesenchymalen Stammzellen <i>in vitro</i> . .	43
2.2.1.2	Morphologische Untersuchung	44
2.2.1.3	Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell scan, FACS)	44
2.2.1.4	RNA Isolierung	44
2.2.1.5	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	45
2.2.1.6	Taqman® Quantitative Polymerase Kettenreaktion	47
2.2.1.7	Migration-Assay in modifizierter Boyden-Kammer	50
2.2.1.8	Murines Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese . .	51
2.2.1.9	Immunhistochemie	53
2.2.2	Methoden der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms	54
2.2.2.1	Migration-Assay in modifizierter Boyden-Kammer	54
2.2.2.2	Murines orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom	55
2.2.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	58
2.2.2.4	Immunhistochemie	58
2.2.2.5	Taqman-PCR	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Versuche zur Lymphangiogenese	60
3.1.1	Konditionierung mesenchymaler Stammzellen	60

3.1.1.1	Morphologische Veränderung der V54/2	60
3.1.1.2	Durchflußzytometrische Untersuchung (FACS) der konditionierten V54/2	61
3.1.1.3	RT-PCR der konditionierten Balb/c	63
3.1.1.4	Migration-Assay vor und nach Konditionierung von V54/2	64
3.1.2	Funktionelle Expression von CCR7 auf V54/2	65
3.1.2.1	Taqman-PCR und Durchflusszytometrie	65
3.1.2.2	CCL19 induzierte Migration der V54/2 in modifizierter Boydenkammer	66
3.1.3	Stammzellgabe im murinen Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese	68
3.1.3.1	Entwicklung des Durchmessers des Mausschwanzes	68
3.1.4	Immunhistologische Präparate des ödematösen Mausschwanzes	69
3.1.4.1	Anti-Podoplanin-Färbung	69
3.1.4.2	Anti-GFP-Färbung	70
3.1.4.3	Funktionalität der Lymphgefäße	70
3.2	Stammzellbasierte Suizidgentherapie	74
3.2.0.4	Migration-Assay der p53 ^{-/-} C57BL/6 MSC mit Genkonstrukten	74
3.2.1	Orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom	77
3.2.1.1	Tumorgewicht	77
3.2.1.2	Fluoreszenzmikroskopie	80
3.2.1.3	Immunhistologie anti-RFP	83
3.2.1.4	Quantitative Taqman®-PCR RFP	83
4	Diskussion	86
4.1	Lymphangiogenese	86
4.2	Stammzellbasierte Suizidgentherapie	92
5	Synoptische Zusammenfassung	97
5.1	Zusammenfassung der Versuche zur Lymphangiogenese	97
5.2	Zusammenfassung der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie	98
	Literaturverzeichnis	100
A	Abkürzungsverzeichnis	I
B	Danksagung	V
C	Lebenslauf	VII

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Gliederung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung des biologischen Verhaltens von bereits etablierten, klonalen, mesenchymalen Stammzellreihen. Mesenchymale Stammzellen zeigen ein hohes Maß an Plastizität *in vitro* und *in vivo* und beteiligen sich an physiologischen sowie pathologischen Vorgängen in Säugetieren.

In unseren Experimenten versuchten wir sowohl neue Erkenntnisse zur Stammzellplastizität zu gewinnen und auch Stammzellen hinsichtlich eines therapeutischen Einsatzes in der Tumorthherapie zu evaluieren. Dieser Ansatz wurde schwerpunktmäßig an zwei verschiedenen Themen behandelt:

1. Der Beitrag von mesenchymalen Stammzellen zur Bildung neuer Lymphgefäße (Lymphangiogenese) und ihr therapeutischer Einsatz in der regenerativen Lymphangiogenese.
2. Die Rolle der mesenchymalen Stammzellen in der tumorassoziierten Blutgefäßneubildung (Angiogenese) des Pankreaskarzinoms und ihre Verwendung zur Überbringung eines Suizidgens zur Therapie des Pankreaskarzinoms.

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Ende des 19. Jahrhunderts studierte der deutsche Pathologe Julius Friedrich Conheim in Tierversuchen die Wundheilung und beobachtete, dass nach intravenöser Farbinjektion die an der distalen Wundheilung beteiligten Fibroblasten aus dem Knochenmark über das Blut zur Wunde gelangten. Unbewusst benannte er damit das Knochenmark als das Hauptreservoir der mesenchymalen Stammzellen, die der Bildung einer Reihe an Tochterzellen dienen, u.a. auch der von Conheim beschriebenen Fibroblasten (Prockop, 1997).

Stammzellen sind gering- bis undifferenzierte Zellen, die unter bestimmten äußeren Einflüssen in Tochterzellen verschiedener Gewebelinien mit unterschiedlichen Phänotypen und

meist höherer Spezialisierung differenzieren können. Außerdem verfügen sie definitionsgemäß (im Gegensatz zu Progenitorzellen) über die Fähigkeiten der Produktion eines identischen Zellklons und damit zur Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation (Horwitz, 2005). Die Fähigkeit der Produktion sowohl eines identischen Zellklons und einer höher spezialisierten Tochterzelle wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet. Mit jedem Differenzierungsschritt verlieren die Zellen an Potenz, gewinnen jedoch an Spezialisierung.

Neben den embryonalen Stammzellen, von denen die Zygote als Ursprungszelle aller menschlichen Zellen die potenteste (= totipotent) ist, sind Stammzellen mit hoher Potenz auch noch im erwachsenen Organismus als so genannte adulte Stammzellen zu finden. Adulte Stammzellen können aus verschiedenen Geweben isoliert werden. Unter anderem wurden hämatopoetische, neuronale, gastrointestinale, epidermale, hepatische und mesenchymale Stammzellen beschrieben (Gage, 2000; Potten, 1998; Watt, 1998; Schmelzer et al., 2007; Pittenger et al., 1999). Die lange geglaubte Beschränkung dieser gewebstämmigen Stammzellen als reine Progenitorzellen ihres angestammten Gewebes kann heute nicht mehr standhalten. So konnte z.B. demonstriert werden, dass sich neurale Stammzellen in hämatopoetische, also in ein Gewebe von unterschiedlichem embryonalen Keimblattursprung, transdifferenzieren können (Bjornson et al., 1999).

Bei der Entdeckung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) lieferten Versuche von Urist et al. in der Mitte des 20. Jahrhunderts weitere Hinweise. Die Autoren berichteten, dass die Transplantation von unfraktioniertem Knochenmark in heterotope Gewebe des Wirtstieres eine Änderung des Phänotyps der transplantierten Zellen und die Formierung von Knochen- und Knorpelgewebe bewirkt (Urist und McLean, 1952; Tavassoli und Crosby, 1968). Diese Versuche gaben erste Hinweise auf die Heterogenität der knochenmarksstämmigen Zellen und auf die Existenz von einer distinkten Stammzellpopulation die nicht zu den damals bereits bekannten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen gehört.

Die erstmalige, genauere Beschreibung der Zellpopulation, die heute als mesenchymale Stammzellen bekannt ist, gelang Friedenstein und Petrakova in ihren Arbeiten der 1960er und 1970er Jahre. Nach Ausstreuung von Knochenmarksaspiraten verschiedener Säugetiere in der Zellkultur bildeten sich adhärent wachsende, fibroblastenartige Zellen, welche als „Fibroblastic colony forming cells (FCFC)“ und später als „Colony forming units-fibroblasts (CFU-F)“ bezeichnet wurden. Alle restlichen Zellen, u.a. auch die hämatopoetischen Stammzellen, wuchsen nicht adhärent und wurden somit durch Mediumwechsel verworfen. Die adhärent wachsenden Zellen zeigten nach einigen Tagen eine hohe Teilungsrate und differenzierten spontan zu morphologisch erkennbaren Knochen- und Knorpelgeweben, was in Tierversuchen durch Reimplantation in ihren respektiven Wirt und konsekutiver Differenzierung zu Osteoblasten bestätigt werden konnte (Friedenstein et al., 1974, 1976, 1968, 1966). *In vivo*, im Knochenmark, und *in vitro*, direkt nach ihrer Isolation, scheinen die Zellen mitotisch inaktiv

zu sein, um erst nach ein paar Tagen in Kultur mitotisch aktiv zu werden (Castro-Malaspina et al., 1980).

In ihrer weiteren Erforschung stellte sich heraus, dass die mesenchymalen Stammzellen die Vorläuferzellen für die verschiedensten Bindegewebszellen darstellen, zu denen neben den Osteoblasten unter anderem Adipozyten, Chondrozyten, Tenozyten, glatte Myozyten und eben die von Conheim beschriebenen Fibroblasten gehören. MSC mit ähnlichen biologischen Eigenschaften lassen sich neben dem Knochenmark auch aus verschiedenen anderen Geweben isolieren. Hierzu gehören unter anderem:

- Fettgewebe (Gronthos et al., 2001)
- Blut (Zvaifler et al., 2000)
- Lunge (in 't Anker et al., 2003)
- Fetales Lebergewebe (Campagnoli et al., 2001).

Pittenger gelang 1999 die Isolation einer einzelnen, pluripotenten, mesenchymalen Stammzelle, die zur Differenzierung in die verschiedenen Bindegewebszelllinien befähigt ist, und beantwortete damit die Frage, ob es sich bei den mesenchymalen Stammzellen lediglich um eine Mischkultur unterschiedlicher, bereits auf eine Zelllinie beschränkter, Progenitorzellen handelt, oder ob eine einzige, zur Differenzierung in alle Zellreihen fähige, adulte Stammzelle existiert. Die Häufigkeit der pluripotenten mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark gab Pittenger in seinen Arbeiten mit 0,001-0,01% aller zellkerntragenden Zellen an (Pittenger et al., 1999).

Die typischerweise $CD34^+$ mesenchymalen Stammzellen machen einen Teil des unterstützenden Stromas der $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen aus, jedoch ist ihre Interaktion mit diesen nicht vollständig verstanden. Klar ist, dass beide Zellen aus einer gemeinsamen $CD34^+ CD38^-$ fetalen Vorläuferpopulation ausgehen, die sich weiter in $CD50^-$ mesenchymale Vorläufer und $CD50^+$ hämatopoetischen Vorläufer unterteilen lässt (Waller et al., 1995). Interessanterweise gelang es Lange et al. zu zeigen, dass eine $CD34^-$ Stammzelle aus dem peripheren Blut einer Maus *in vitro* in eine $CD34^+$ Stammzelle transdifferenzieren kann und *in vivo* zur vollständigen Hämatopoese befähigt ist (Lange et al., 1999). Außerdem konnten Huss et al. in einem ähnlichen Versuch mit einer aus dem peripheren Blut eines Hundes isolierten, monoklonalen $CD34^-$ Stammzelle darlegen, dass diese nicht nur zur vollständigen hämatopoetischen Rekonstitution befähigt ist, sondern zudem über mesenchymale Eigenschaften verfügt (Huss et al., 2000).

1.2.1 Biologie mesenchymaler Stammzellen

1.2.1.1 Oberflächenmarker

Zur Identifikation und Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen dienen die exprimierten bzw. nicht exprimierten Oberflächenmarker (CD=cluster of differentiation). So zeigen knochenmarksstämmige MSC typischerweise eine Expression von $CD29^+$ (Integrin β 1), $CD44^+$ („Knochenmark-Homing-Faktor“), $CD73^+$ (SH3/SH4), $CD90^+$ (Thy-1), $CD105^+$ (SH2, Endoglin), $CD106^+$ (VCAM-1), $CD117^+$ (C-Kit), $CD120a^+$, $CD124^+$, $CD166^+$ (ALCAM), MHC-I $^+$, STRO-1 $^+$ und Sca-1 $^+$ (Baddoo et al., 2003; Boiret et al., 2005; Conget und Minguell, 1999; Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 2003; Pittenger et al., 1999) Wichtig für eine korrekte Identifikation ist auch, welche Marker durch MSC nicht exprimiert werden. Hier werden vor allem die hämatopoetischen Marker $CD34^-$ (Hauptmarker der hämatopoetischen Stammzellen), $CD45^-$ („Pan-Leukozytenmarker“), $CD33^-$ (myelomonozytäre Zellen), $CD14^-$ und $CD11b^-$ (Makrophagenmarker) und die endothelialen Marker $CD31^-$ (PECAM-1), $CD133^-$ (Marker für HSC und Endotheliale Progenitorzellen) zu Hilfe gezogen (Pittenger et al., 1999).

Da es sich aber, wie bereits erwähnt, bei den mesenchymalen Stammzellen um eine heterogene Population handelt, zusammengesetzt aus Stammzellen, die zwar von der gleichen pluripotenten Vorläuferzelle ausgehen, jedoch durch unterschiedlich stark ausgeprägte linien-spezifische Differenzierung geprägt sind, besteht bezüglich der Oberflächenmarker eine hohe Variabilität und es bestehen verschiedene Postulate über die optimale Auswahl der verwendeten Marker zur Detektierung der frühen, pluripotenten Zellen. Ferner exprimieren MSC, die nicht aus dem Knochenmark isoliert werden, leicht unterschiedliche Oberflächenmarker, weisen aber teilweise eine ähnliche Plastizität auf (Zuk et al., 2002). Leider ist zudem noch kein Marker gefunden worden, der exklusiv auf MSC vertreten ist und somit eine positive Selektion dieser Zellen erlauben würde. Verschiedene Autoren postulieren verschiedene Kombinationen der genannten Marker als Arbeitsgrundlage zur Identifikation der frühen, hochpotenten MSC. Die von Pittenger 1999 verwendete Kombination von $CD105^+$ und $CD73^+$ scheint in seinen Experimenten ausreichend gewesen zu sein, um die pluripotenten Stammzellen zu beschreiben. Große Hoffnungen wurden in den Antikörper Stro-1, dessen Substrat nicht bekannt ist, als Mittel zur Detektion multipotenter MSC gesetzt (Dennis et al., 2002). Da eine sich schnell teilende und ebenfalls multipotente Subpopulation der MSC negativ für STRO-1 ist, gibt es hierzu jedoch konträre Meinungen (Colter et al., 2001).

1.2.2 Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen

Das Potential adulter MSC in höher spezialisierte Zellen zu differenzieren, kann sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* untersucht werden. In beiden Fällen sind es die Umgebungseinflüsse, in

der so genannten „Stammzellnische“, die eine mesenchymale Stammzelle zur Differenzierung anregen. *In vitro* kann dies artifiziell unter Zugabe oder Weglassen verschiedener Mediatorstoffe erreicht werden, wie z.B. durch Zugabe von Dexamethason und Insulin die Adipogenese angeregt wird (Pittenger et al., 1999). Anscheinend haben aber auch interzelluläre Kontakte und die zellumgebende Matrix einen großen Einfluss auf die Zelldifferenzierung. So formen z.B. konfluent gewachsene MSC-Kulturen besonders leicht Osteoblasten.

Die Differenzierung der Zellen wird durch die geänderte Zellmorphologie in Richtung der spezialisierten Zelle, mit Nachweis der für sie typischen Expressionsmuster von Genen, bestätigt. So ist z.B. die Expression von Glykosaminoglykanen und Kollagen II bezeichnend für eine chondrogene Differenzierung (Pittenger et al., 1999).

Zu Beginn dieses Jahrhunderts gelang Wissenschaftlern eine Reihe von Erfolgen in der Beschreibung der Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen. So konnte die Arbeitsgruppe um Catherine Verfaillie adulte mesenchymale Stammzellen isolieren, die sich neben den mesenchymalen Zelltypen auch in Zellen ektodermalen, entodermalen und viszeromesodermalen Ursprungs differenzieren ließen. Diese $CD34^-$, $CD44^-$, $CD45^-$, $c-Kit^-$, $MHC\ I^-/II^-$, $Flk-1^+$, $Sca-1^+$, $Thy-1^+$, $CD13^+$ und stage-specific antigen I^+ (SSEA- I^+) Zellen wurden daher als multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC) bezeichnet (Jiang et al., 2002). Ob es sich bei den MAPC um Vorläuferzellen der mesenchymalen Stammzelle oder eine Subpopulation dieser handelt, ist bis heute nicht klar.

Mesenchymale Stammzellen konnten in weiteren Experimenten zudem in kontrahierende Myozyten und Kardiomyozyten, Hepatozyten und sogar Neurone und verschiedene Gliazellen differenziert werden (Makino et al., 1999; Ott et al., 2005; Jackson et al., 2001; Ferrari et al., 1998; Petersen et al., 1999; Sanchez-Ramos et al., 2000; Azizi et al., 1998; Hermann et al., 2004).

Im Kreis der Forscher, die sich mit der Thematik von Stammzellplastizität beschäftigen, herrscht jedoch Uneinigkeit über einige der Ergebnisse, besonders bezüglich der neuronalen Differenzierungsfähigkeit. So konnte z.B. gezeigt werden, dass ein Teil der Phänotypänderungen der MSC in den *in vitro* Experimenten zur neuronalen Differenzierung auf der Toxizität der verwendeten Medien basiert und ein funktioneller elektrophysiologischer Phänotyp im Sinne schneller Natriumkanäle ausbleibt. Auch besteht Kritik an manchen der Versuche *in vivo*, bei denen die Kritiker eine Fusion von MSC mit differenzierten Parenchymzellen als Fehlinterpretation von echter Differenzierung sehen (Weimann et al., 2003; Alvarez-Dolado et al., 2003). Daraufhin durchgeführte Studien an Stammzellmodellen lieferten jedoch Ergebnisse, die eine Zellfusion als alleinigen Grund der Morphologieänderung ausschließen konnten (Janus et al., 2003; Brittan et al., 2005). Vielmehr konnte echte Differenzierung der MSC durch Gen-suppression und Genaktivierung gezeigt werden (Egusa et al., 2005). Auch erhielt die Theorie

der multipotenten MSC im Gegensatz zur heterogenen Population von linienbeschränkter Progenitorzellen in den genannten Experimenten viel Unterstützung.

Mesenchymale Stammzellen und Gefäße

Huss et al. untersuchten die mesenchymale Stammzelllinie RM26, die aus dem peripheren Blut von Mäusen isoliert wurde, auf ihr angiogenetisches Potential. Die Autoren fanden bei dieser Stammzelllinie, neben der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die typisch für mesodermale und myeloische Stammzellen sind, auch die Expression von verschiedenen endothelialen Markern. Zu den Markern, die diese Zellen *in vitro* exprimierten, gehörten CD31 (PECAM-1), Tie-1 und VEGFR-1. Des Weiteren war in dieser Zelllinie SCL, der Hauptregulator von Hämangioblasten, den Vorläuferzellen der Endothelzellen, exprimiert. Die Zellen waren in der Lage, innerhalb von kürzester Zeit röhrenartige Strukturen in einem Matrigel-Assay zu formen und sie änderten ihre Morphologie hin zu der von Endothelzellen. *In vivo* sahen Huss et al. eine Integration der Stammzellen in der Ausbildung von Kollateralen in einem Mausmodell zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Hier beteiligten sich die Zellen wahrscheinlich jedoch nicht direkt als Endothelzellen sondern eher als Perizyten an der Arteriogenese. Sie steigerten den kollateralen Blutfluss und integrierten sich zudem in die geschädigte Muskulatur (Huss et al., 2004).

Verschiedene andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls in den von ihnen untersuchten mesenchymalen Stammzelllinien eine Differenzierung zu Endothelzellen durch entsprechende *in vitro* Kultivierung beobachten (Oswald et al., 2004; Silva et al., 2005). Viel häufiger als die Differenzierung zu Endothelzellen wird jedoch die Differenzierung zu Perizyten beobachtet. Als solche beteiligen sich mesenchymale Stammzellen auch fördernd an der Tumorangiogenese und exprimieren den Hauptwachstumsfaktor der Angiogenese: den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Beckermann et al., 2008).

Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite zeigt eine Auswahl der möglichen Zelllinien, zu denen eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen werden konnte.

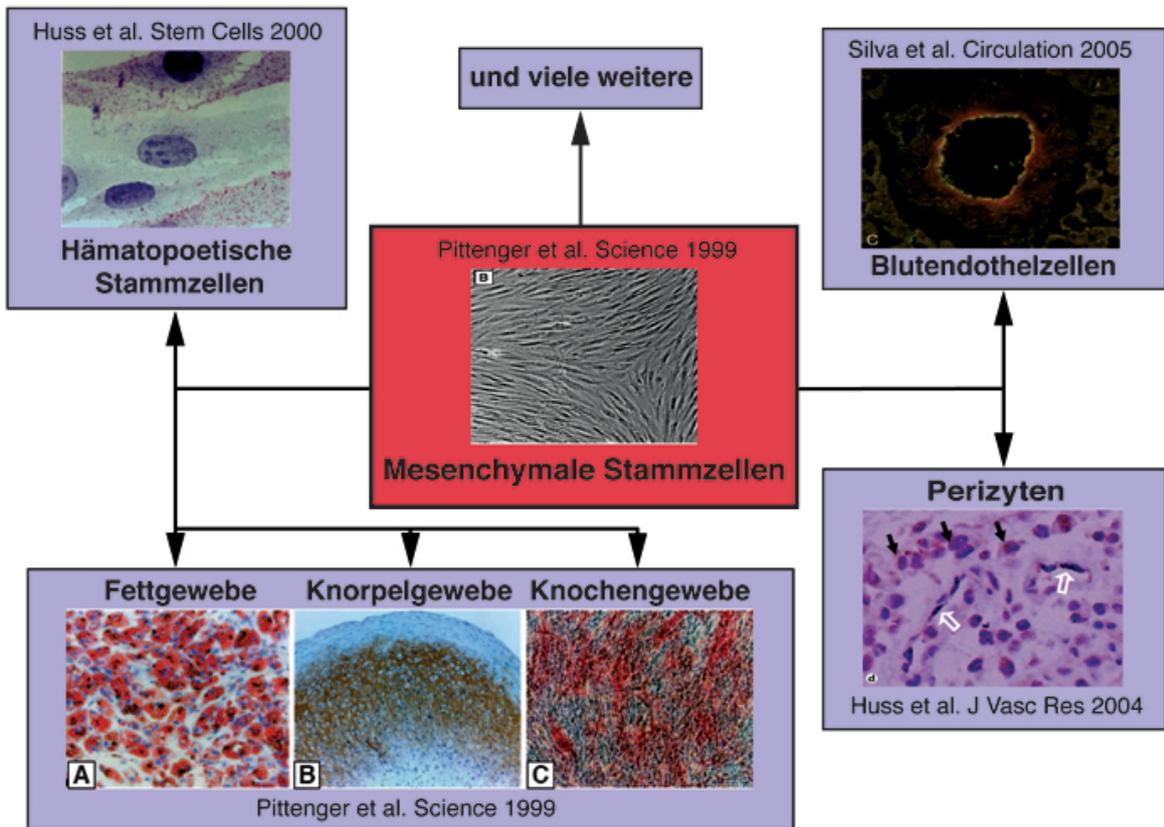


Abbildung 1.1: Plastizität mesenchymaler Stammzellen (unvollständig)

1.2.3 Mesenchymale Stammzellen in der therapeutischen Medizin

Die relative Einfachheit, mit der sich MSC aus adulten Organismen isolieren lassen, sowie ihr hohes Differenzierungspotential, haben die Hoffnung einer möglichen Applikation von MSC in der regenerativen Medizin geschürt. So wurden MSC in einer Reihe von Tierexperimenten auf ihr therapeutisches Potential in verletzten und kranken Geweben untersucht. Mehrere Arbeitsgruppen konnten durch intravenöse oder intraventrikuläre Infusion, intramyokardiale Injektion oder zytokinvermittelte Mobilisation von MSC aus dem Knochenmark ischämisches Myokardium regenerieren und dadurch das Überleben und die Herzfunktion der Tiere verbessern (Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001). Hierbei konnten MSC durch Differenzierung in funktionelle Kardiomyozyten, als auch Endothelzellen und Perizyten zur Verbesserung der Blutversorgung beitragen. Sie waren in bedeutend höherem Maße in verletztem Gewebe gegenüber gesundem Myokardgewebe zu finden, was für die chemotaktische Wirkung der Zytokine aus dem Infarktgebiet spricht.

Wie bereits im vorigen Kapitel erwähnt, konnten Huss et al. zeigen, dass die intravenöse Gabe von MSC im Tierversuch zu einer Besserung der Kollateralenausbildung mit gesteigertem Blutfluss und gleichzeitig verbesserter Muskelfunktion in einem pAVK-Modell führt. Eine therapeutische Anwendung von MSC scheint auch hier viel versprechend.

In der neurologischen Forschung konnten Hofstetter et al. eine Verbesserung der Heilung von verletztem Rückenmark durch Applikation von MSC in Versuchen an Ratten erzielen (Hofstetter et al., 2002). Es gilt jedoch hervorzuheben, dass die aus den MSC entstandenen neuronartigen Zellen nicht über die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie Neuronen verfügen und daher nicht als funktionelle Neuronen anzusehen sind. Die Erholung der Tiere wurde nichtsdestotrotz durch die Stammzellapplikation beschleunigt, was darauf hindeutet, dass MSC nicht ausschließlich durch die Versorgung mit Progenitorzellen von Parenchymzellen zur Geweberegeneration beitragen, sondern dies möglicherweise auch unter Schaffung eines proliferationsfördernden Mikromilieus durch Sekretion von Zytokinen und der Bereitstellung von Stromazellen bewerkstelligen. Auch ihre immunsuppressive Wirkung und Funktion als Leitstruktur sind denkbare heilungsfördernde Faktoren.

Die tierexperimentellen Erfolge führten zu ersten klinischen Studien mit MSC als therapeutischem Mittel. Horwitz konnte mit der Transplantation von unfraktioniertem Knochenmark am Menschen erste klinische Erfolge bei der Behandlung von Osteogenesis imperfecta, einer Erbkrankheit, die von Osteopenie durch einen Defekt des von Osteoblasten produzierten Kollagen I geprägt ist, erzielen (Horwitz et al., 1999). Hier siedelten sich die transplantierten MSC im Knochenmark der Empfänger an und bildeten intakten Knochen.

Es folgten Studien zur stammzellbasierten Therapie des Myokardinfarkts durch verschiedene Arbeitsgruppen. In einer Studie von Wollert et al. konnte beispielsweise durch die intrakoro-

nare Infusion der Knochenmarkszellen nach Herzkatheter eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion erreicht werden (Wollert et al., 2004). Interessanterweise scheint die Infusion von unfraktionierten Knochenmarkszellen der Gabe von G-CSF, das vor allem die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut mobilisiert, überlegen zu sein (Zohlhofer et al., 2006). So zeigten Untersuchungen von Ripa et al. im Rahmen der STEMMI-Studie eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden mesenchymalen Stammzellen und der Ejektionsfraktion nach intravenöser G-CSF Gabe nach einem akuten Herzinfarkt. Die Autoren hypothetisierten, dass die niedrige Anzahl zirkulierender MSC für eine hohes Maß an „Stammzellhoming“ spricht und dadurch die Ejektionsfraktion gesteigert wird (Ripa et al., 2007).

1.2.4 Stammzellen und Krebs und der Begriff der „Krebsstammzelle“

Mesenchymale Stammzellen zeigen ein gerichtetes Migrationsverhalten zu malignen Tumoren, wobei das Mikromilieu des Tumors einen ähnlich chemotaktischen Reiz auf die Stammzellen ausübt wie eine heilende Wunde dies tut (Dvorak, 1986). Hierbei spielen besonders die inflammatorischen Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Integrine eine Rolle, die der Tumor im Zuge seines ständigen Wachstums exprimiert und die seiner Gewebsinvasion, Motilität und Interaktion mit der extrazellulären Matrix dienen. Diese Faktoren sind für die Invasion von Immunzellen in das inflammatorische „Mikroenvironment“ des Tumors verantwortlich und damit wahrscheinlich auch für die Anziehung der mesenchymalen Stammzellen. Besonders der, durch Gewebehypoxie innerhalb des Tumors hochregulierte, Transkriptionsfaktor HIF- α aktiviert viele Gene von pro-angiogenetischen, chemotaktischen Substanzen, wie u.a. VEGF, TNF- α , „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ und verschiedene weitere Faktoren, die zur Anregung des NF κ B führen. Dieser wiederum regt u.a. die Expression der Substanzen RANTES (CCL5), MIP-2 (CXCL2), MIP-1 α (CCL3), MCP-1 (CCL2) und Il-8 (CXCL8) an, die einen erwiesenen migratorischen Anreiz auf Leukozyten haben und deren Rezeptoren auch auf den mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden können (Ubogu et al., 2006; Montecucco et al., 2006; Gregory et al., 2006; Lehman et al., 2006)

Das Migrationsverhalten von mesenchymalen Stammzellen im Tumormikromilieu ist jedoch nicht gleichermaßen intensiv erforscht worden wie das Migrationsverhalten der Immunzellen. Menon et al. konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen *in vitro* ein gerichtetes, cytokinvermitteltes Migrationsverhalten durch Induktion mit Tumorzellmedium ausführen. Insbesondere heben die Autoren die Wichtigkeit des „Stroma derived factor -1 (SDF-1)“ im Migrationsverhalten der Stammzellen hervor. Dies spricht für die Wichtigkeit des Tumorstromas in der Rekrutierung von knochenmarkstämmigen MSC (Menon et al., 2007). Weitere Informationen zum Tumormikromilieu erfolgen in Kapitel „Tumormikroenvironment und desmoplastische Reaktion“(Kapitel 1.5.4 auf Seite 30).

Basierend auf den Forschungsergebnissen zum Migrationsverhalten von Leukozyten und hämatopoetischen Stammzellen lassen sich zudem Vermutungen über weitere beteiligte Liganden-Rezeptorenpaare anstellen. So spricht vieles für eine wichtige Rolle der Il-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, die beide auf MSC vertreten sind und *in vitro* durch Stimulation dieser Rezeptoren mit Il-8 eine Migrationssteigerung zeigen (Ringe et al., 2007). Zudem scheint CD97, der Rezeptor von epidermalen Wachstumsfaktoren, dessen Expression mit gesteigerter Angiogenese von Tumoren und erhöhter Leukozyteninvasion in Verbindung gebracht wurde, ebenfalls bei der Migration von MSC beteiligt zu sein, da dessen Ligand CD55 auf MSC exprimiert wird (Leemans et al., 2004; Galle et al., 2006). Neben den Cytokinrezeptoren scheinen auch Adhäsionsmoleküle in ihrer Interaktion mit den „Chemoattractants“ der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle im Migrationsverhalten der MSC im Tumor zu spielen. Besonders hervorzuheben gilt hier das Adhäsionsmolekül CD44, dessen Ligand Hyaluronsäure in der Tumorangio-genese eine zentrale Rolle einnimmt und welcher ebenfalls auf den MSC präsent ist (Simpson et al., 2002; Herrera et al., 2007). VEGF-A, ein wichtiges Molekül der Tumorangio-genese, hat ebenfalls, über dessen Signalwirkung auf den PDGF-Rezeptor, eine chemotaktische Wirkung auf MSC (Ball et al., 2007).

Es gibt eine Reihe an Hinweisen, die darauf hindeuten, dass die mesenchymalen Stammzellen im Tumor eine Reihe an Funktionen übernehmen, die den Tumor in seinem Wachstum fördern (Zhu et al., 2006). Zudem steigern MSC beispielsweise bei Brustkrebs über den CC-Ligand 5 die Metastasierungsrate (Karnoub et al., 2007). Des Weiteren ist eine Tie2⁺ Population von mesenchymalen Stammzellen an der Bildung von Perizyten der Tumorgefäße beteiligt und fördert dadurch die Tumorangio-genese (De Palma et al., 2005).

Maligne Tumore haben mit adulten Stammzellen viele Charakteristika gemein. Der dadurch entstandene Begriff der „Krebsstammzelle“ soll an dieser Stelle kurz erläutert werden. Tumorzellen verfügen ebenso wie Stammzellen durch Umgehung der entsprechenden zelleigenen Kontrollmechanismen über ungehinderte Zellteilung. Im Fall der Stammzelle ermöglicht ihnen u.a. die Verwendung von microRNA den G1/S-Phasen Checkpoint des Zellzyklus zu umgehen und sie erreichen somit nahezu ungehinderte Selbsterneuerung (Hatfield et al., 2005). Die Frage nach dem Ursprung von Tumorzellen birgt nun zwei mögliche Theorien: entweder akquirieren differenzierte somatische Zellen durch Dedifferenzierung Stammzeleigenschaften, oder die malignen Zellen gehen direkt aus Stammzellen hervor (Passegue, 2006). Da Stammzellen im Vergleich zu den differenzierten Gewebszellen eine weitaus längere Überlebenszeit aufweisen, erhöht sich dadurch auch die Wahrscheinlichkeit der Akquirierung und Anhäufung von genetischen Defekten, die bestimmte Krebsarten im Rahmen der „Mehrschrittkarzinogenese“ ausmachen (Lee et al., 2008). Die Arbeiten von Bonnet et al. lieferten im Jahre 1997 erste Hinweise, die zur Hypothese der Krebsstammzelle führten und diese unterstützten. Die Autoren konnten eine CD34⁺⁺ CD38⁻ Stammzelle isolieren und charakterisieren, die im Tier-

modell zur Entwicklung einer AML befähigt war (Bonnet und Dick, 1997).

Der Begriff der Krebsstammzelle besagt nun im Genauen, dass die heterogene Population der Zellen, die einen Tumor ausmachen, von einer kleinen Subpopulation an Zellen ausgeht und unterhalten wird. Des weiteren ist diese Subpopulation zur Selbsterneuerung befähigt und für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums, ähnlich wie Stammzellen in der Organogenese, durch Produktion der heterogenen Zelllinien eines Tumors verantwortlich (Clarke et al., 2006).

Mit dem Nachweis von $CD44^+ CD24^{-/low} Lineage^-$ Krebszellen, die Stammzellcharakteristika zeigten, gelang erstmals der Nachweis von Krebsstammzellen aus soliden Tumoren, in diesem Fall aus humanen Mammakarzinomen (Al-Hajj et al., 2003). Neben weiteren soliden Tumoren gelang schließlich auch die Isolation einer möglichen Krebsstammzelllinie bei Pankreaskarzinomen (Li et al., 2007). In dieser Arbeit wurden diese Zellen als $CD44^+ CD24^+ ESA^+$ charakterisiert. Der Arbeitsgruppe von Heeschen gelang die Isolation einer weiteren, distinkten Krebsstammzelllinie, positiv für CD133, isoliert ebenfalls aus Pankreaskarzinomen (Hermann et al., 2007). Die Charakterisierung der spezifischen Oberflächenmarker ermöglichte die Unterscheidung dieser Zellen von den „normalen“ Tumorzellen. Transplantationen von sehr wenigen (Hundertern) dieser Krebsstammzellen, die positiv für diese Oberflächenmarker waren, führten im Tiermodell zur Formierung eines soliden Tumors mit all seinen Zelltypen, wohingegen die Transplantationen sehr vieler (mehrerer Zehntausend) Tumorzellen desselben Tumors, die negativ für diese Oberflächenmarker waren, zu keiner Formierung eines soliden Tumors im Tiermodell führten.

Ein weiteres, hypothetisiertes Merkmal der Krebsstammzellen ist ihre Resistenz gegen Chemotherapeutika (Donnenberg und Donnenberg, 2005). Chemotherapeutika wirken zwar auf die hochproliferativen aber vergleichsweise differenzierten Tumorzellen, nicht jedoch auf die Krebsstammzellen. Darin sehen viele Wissenschaftler die Ursache der häufig beobachteten Tumorrezidive nach Chemotherapie, da diese von der überlebenden, tumorigenen Stammzellpopulation ausgehen (Lee et al., 2008).

Neben der Fähigkeit der Selbsterneuerung haben Stammzellen und Krebsstammzellen auch die Fähigkeit der Gewebemigration bzw., im Falle von Krebs, der Gewebsinvasion und Metastasenbildung gemein. So scheinen im speziellen die Krebsstammzellen die Ausgangszellen von Fernmetastasen des Primärtumors zu sein (Hermann et al., 2007). Im Speziellen sehen die Autoren die Positivität der Zellen auf $CXCR4^+$, einem Rezeptor von u.a. „stromal derived factor-1 (SDF1)“, als wichtigen Faktor der zur Metastasierungsfähigkeit der Stammzellen führt. Einerseits konnten nur $CXCR4^+$ Zellen metastasieren und andererseits konnte durch Blockade von $CXCR4$ die Metastasierung unterdrückt werden.

1.3 Lymphangiogenese

„Die Lymphgefäße, so unbeeindruckt sie mich ließen, als sie mir im Jahre 1909 erstmals unter dem Mikroskop aufgezeigt wurden, – jedoch, so sollte ich bald erkennen, ebenso schwer zu erfassen oder rätselhaft erscheinen sie denen die sie studiert haben – verloren über all die Jahre nichts von ihrer spannenden Art.“

Otto Frederic Kampmeier (1910-1981); in München promovierter und auf dem Gebiet der Lymphgefäßerforschung tätiger, US-amerikanischer Anatom (Witte, 2001)

1.3.1 Historischer Überblick über die Lymphgefäßerforschung

Die ältesten überlieferten Beschreibungen von lymphatischen Strukturen stammen aus einer Arbeit von Hippokrates aus dem 5. Jahrhundert v. Chr., in der er die Existenz von Lymphknoten mit dem Satz „Alle Menschen haben Drüsen, kleiner oder größer, in der Achselhöhle und in vielen anderen Teilen des Körpers“ beschreibt (Jones, 1948). Die erste Beschreibung der weitaus weniger auffallenden, da viel feineren Struktur der Lymphgefäße wird indes Herophilus, einem in Alexandria lebenden Anatomen des 3. Jahrhunderts n. Chr. zugeschrieben (von Staden, 1989).

Erst im Mittelalter rückten Lymphgefäße als anatomische Forschungsobjekte wieder in das Blickfeld der Wissenschaftler. Der italienische Arzt Gasparo Aselli (1581-1626) liefert in seinem post mortem erschienenen Werk „De lactibus sive Lacteis venis“ eine genauere Beschreibung von Lymphgefäßen (Asellius, 1627). In seinen Versuchen aus dem Jahre 1622 berichtete er während Vivisektionen an kürzlich gefütterten Hunden von weißen, milchigen Adern („venae albae et lacteae“), die er weiter beschreibt, als „...zahlreiche Stränge,...überaus dünn und bewundernswert weiß, über das gesamt Mesenterium und den Darm gestreut, von fast zahllosen Anfängen ausgehend. [Wenn durchtrennt] strömt sogleich eine weiße, milch- oder kremeartige Flüssigkeit hervor.“ (Ambrose, 2006).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts stand die Erforschung der embryologischen Entwicklung des Lymphgefäßsystems im Mittelpunkt eines Disputs, der erst in der heutigen Zeit annähernd als beendet anzusehen ist. Im Jahre 1902 formulierte die an der Johns Hopkins Medical School tätige Wissenschaftlerin Florence R. Sabin die These, dass von den Endothelzellen der embryonalen Venen die primitiven Lymphbläschen „aussprossen“ und somit den Ursprung der Lymphgefäße, die im weiteren Verlauf aus den Lymphbläschen aussprossen, im Menschen darstellen („zentrifugale Theorie“) (Sabin, 1904, 1902). Sie stellte ihre Theorie nach Versuchen mit Tinte-Injektionen an Schweineembryos auf.

Kurz nach der Verfassung dieser Theorie waren es die beiden Wissenschaftler Huntington und McClure, die eine Gegentheorie aufstellten. Ihren Versuchen an Katzen zufolge entwi-

ckelten sich die primären Lymphgefäße, unabhängig von Blutgefäßen, peripher aus dem Mesenchym und erlangen erst in ihrer weiteren Entwicklung Anschluss an das Blutgefäßsystem („zentripetale Theorie“) (Huntington und McClure, 1910). Die Uneinigkeit der Anhänger der beiden Theorien hielt über viele Jahrzehnte bis heute an, wobei beide Theorien durch Erkenntnisse der letzten zehn Jahre Unterstützung gefunden haben.

Die Erforschung der Lymphgefäße litt über weite Strecken des 20. Jahrhunderts an einem Mangel an identifizierten Faktoren, die ihre Unterscheidung von Blutgefäßen und damit eine positiven Selektion ermöglichten. Es dauerte bis zur modernen Ära der Genforschung, die durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und durch ergänzende Tierversuche mit *knock-out* Modellen neue Erkenntnisse für die Lymphgefäßforschung bringen konnte.

Kaipainen et al. konnten 1995 mit ihrer Zuordnung des Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor-3 (VEGFR-3), auch fms-like-tyrosinereceptor-4 (FLT4) genannt, zu entwickelten Lymphendothelien den ersten weitestgehend lymphspezifischen Marker beschreiben (Kaipainen et al., 1995). Der Arbeitsgruppe von Jeltsch et al. gelang es 1997 schließlich, den von Joukov et al. entdeckten Gefäßwachstumsfaktor „Vascular Growth Factor-C (VEGF-C)“ als den Hauptwachstumsfaktor der Lymphangiogenese und Liganden des VEGFR-3 zu identifizieren (Joukov et al., 1996; Jeltsch et al., 1997).

Es folgten die Entdeckung und Beschreibung einer Vielzahl weiterer Marker, die eine Unterscheidung von Lymph- und Blutendothelzellen zuließen und deren genaue Beschreibung in dieser Einleitung gesondert dargelegt wird. Zusammengefasst gehören zu ihnen unter anderen:

- das Glykoprotein Podoplanin (Wetterwald et al., 1996; Breiteneder-Geleff et al., 1997)
- der Hyaluronsäurerezeptor LYVE-1 (Banerji et al., 1999)
- der Transkriptionsfaktor Prox-1 (Oliver et al., 1993; Wigle und Oliver, 1999)
- der CC Chemokinligand CCL21 (Gunn et al., 1998)
- das zytoplasmatische Protein Desmoplakin (Ebata et al., 2001)
- das Adhäsionsmolekül Integrin $\alpha 9\beta 1$ (Huang et al., 2000)

Zudem konnten in den letzten Jahren, neben den oben erwähnten VEGFR-3 und VEGF-C, etliche weitere Rezeptor-Ligandenpaare mit zugehörigen Signalkaskaden und Genen identifiziert werden, die zwar nicht spezifisch für die Lymphangiogenese sind, aber für das korrekte Wachstum und Überleben des Lymphgefäßsystems und der einzelnen Lymphendothelzellen essentiell sind. Hierzu zählen unter anderem:

- Angiopoietin-1 und -2 mit ihrem Tyrosinkinaserzeptor Tie-2 (Gale et al., 2002)
- der Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D) (Veikkola et al., 2001)
- das Adapterprotein SLP76 und der Tyrosinkinaserzeptor SYK (Abtahian et al., 2003)

- das Gen *Net* (Ayadi et al., 2001)
- das Gen *FOXC2* (Fang et al., 2000)
- und viele andere

Die erfolgreiche Isolation von Lymphendothelzellen aus humanen dermalen Mikrovaskulärzellen (HDMEC), einer Mischkultur von Lymph- und Blutendothelzellen, durch Kriehuber et al. im Jahre 2001 und die dadurch verbundene Verfügbarkeit von reinen LEC-Zellkulturen trug wesentlich zur Akquirierung einer solchen Flut an spezifischen Lymphmarkern und Regulationsmechanismen bei (Kriehuber et al., 2001).

1.3.2 Entwicklung des Lymphgefäßsystems

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, herrscht über den zellulären Ursprung des Lymphsystems noch keine einhellige Meinung. Mit Hilfe der neu entdeckten lymphatischen Marker konnte Sabins Theorie der aussprossenden venösen Endothelzellen in verschiedenen Experimenten Unterstützung finden. So gilt Sabin's Theorie zum Ursprung der primitiven Lymphbläschen aus Venen heute weitestgehend als gesichert (Makinen et al., 2007). Jedoch die Schlussfolgerung, dass sich das gesamte Lymphsystem aus diesen aussprossenden Zellen ableitet, ist damit nicht bewiesen. Im Gegenteil, Versuche von Wilting et al. haben die Existenz von so genannten Lymphangioblasten, direkten Vorläuferzellen der Lymphendothelzellen mit mesodermalem Ursprung, in den Flügelanlagen von Vogelembryos gezeigt. Auffallend ist auch die Tatsache, dass deren Auftreten dem der Formierung der Lymphbläschen vorausgeht (Schneider et al., 1999). So konnten die Autoren in weiteren Versuchen einen dualen Ursprung des Lymphsystems der untersuchten Vögel, sowohl aus Blutendothelzellen als auch aus mesodermalen Lymphangioblasten finden (Wilting et al., 2006).

Kerjaschki et al. konnten zudem über die Existenz von lymphendothelialen Progenitorzellen und deren Beteiligung an Lymphangiogenese bei ihrer Analyse von abgestoßenen menschlichen Nierentransplantaten berichten und damit die Frage nach dem zellulären Ursprung des Lymphgefäßsystems beim Menschen neu entfachen (Kerjaschki et al., 2006).

Es gilt heute als gesichert, dass das Lymphsystem des Menschen seine Entwicklung zum Ende der 6. Embryonalwoche beginnt (Moore und Persaud, 2003). Aus Versuchen an Mausembryos ist bekannt, dass LYVE-1 der erste lymphendotheliale Marker ist, der von einigen venösen Endothelzellen der vorderen Kardinalvene an Embryonaltag 9.0 - 9.5 exprimiert wird (Wigle et al., 2002). Dies kann als erstes Zeichen der Kompetenz von Blutendothelzellen zur Differenzierung zu Lymphendothelzellen und als eine Quelle dieser gedeutet werden. Der lymphendotheliale Marker LYVE-1 wird in Kapitel 1.3.5.4 auf Seite 25 näher erläutert.

Wenige Stunden später kommt es in einer distinkten, an einer Seite der vorderen Kardinalvene gelegenen, Endothelzellgruppe zur Expression des lymphspezifischen Transkriptionsfak-

tors Prox1 (siehe Kapitel 1.3.5.2 auf Seite 22). Die Wichtigkeit dieses Transkriptionsfaktors wurde in einem *knock-out* Mausmodell durch Wigle et al. gezeigt, in dem die homozygoten $\text{prox1}^{-/-}$ Mausembryonen über keinerlei Lymphsystem verfügten und an Embryonaltag 14.5 versterben. Anscheinend ist die Expression von Prox1 jedoch nicht ausschlaggebend für die Aussprossung der Endothelzellen aus der vorderen Kardinalvene, wohl jedoch für die polarisierte, gerichtete Art der Aussprossung dieser und für deren Entwicklung zu ausgereiften Lymphendothelzellen (Wigle et al., 2002). Interessanterweise entwickeln sich laut Wigle et al. die LYVE-1⁺ Blutendothelzellen nicht zwangsläufig später zu Lymphendothelzellen, die Prox1⁺ Blutendothelzellen indes schon. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Tatsache, dass in LYVE-1^{-/-} *knock-out* Mäusen in denen es zu keiner LYVE-1 Expression kommt, die Entwicklung des lymphatischen Systems nicht beeinträchtigt ist (Gale et al., 2007).

Kompetenz, im Sinne der Zytologie, ist die Fähigkeit einer Zelle auf ein bestimmtes Induktionssignal zu antworten (Oliver und Alitalo, 2005). Die molekularen Voraussetzungen für den Kompetenzerwerb der primitiven Endothelzellen der Kardinalvene und der damit verbundenen Fähigkeit, auf ein lymphspezifisches Induktionssignal zu antworten, sind nicht vollständig verstanden (Oliver, 2004). Im Gegensatz zu der Theorie des Kompetenzerwerbs der Blutendothelzellen der Kardinalvene steht die Theorie der primären Heterogenität der primitiven venösen Endothelzellpopulation. Diese Population ist laut dieser Theorie aus einer Subgruppe von Endothelzellen, die für die Ausbildung von Blutendothelzellen vorbestimmt sind, und einer Subgruppe von distinkten lymphendothelialen Progenitorzellen zusammengesetzt (Oliver, 2004).

Bei der Erforschung der Faktoren, welche die Aussprossung der LEC vorantreiben, konnten Karkkainen et al. die entscheidende Rolle der Funktion von VEGF-C in seiner Interaktion mit dem, auf den Endothelzellen exprimierten, VEGFR-3 zuschreiben (siehe Kapitel 1.3.5.1 auf Seite 19). VEGF-C wird im umgebenden Mesenchym gebildet und gelangt auf parakrinem Wege zu den aussprossenden Endothelzellen. Der so entstehende Konzentrationsgradient von VEGF-C wirkt als chemotaktischer Reiz und führt die Zellen zum Ort der maximalen VEGF-C Konzentration und somit zum Ort der Bildung der primitiven Lymphbläschen (Karkkainen et al., 2004).

Nach erfolgter Aussprossung aus der Kardinalvene ist eine Trennung des neu gebildeten primitiven Lymphsystems vom Blutsystem entscheidend. Hierbei spielen das Adapterprotein Slp76 (SRC homology 2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) und der Tyrosinkinaserzeptor Syk eine wichtige Rolle. Interessanterweise ist es die Expression von slp76 auf hämatopoetischen Knochenmarksstammzellen, die eine Trennung von Blut- und Lymphsystems bewirkt (Abtahian et al., 2003).

1.3.3 Physiologie des Lymphsystems

Das erwachsene Lymphsystem ist ein baumartig gegliedertes Gefäßsystem, das seinen Anfang bei den blind endenden Lymphkapillaren im peripheren Bindegewebe und in nahezu allen Organen nimmt. Lediglich das zentrale Nervensystem, die Retina und avaskuläre Gewebe wie Knorpel, Epidermis und Kornea verfügen nicht über Lymphkapillaren (Tortosa, 2006; Tobler, 2006). Histologisch sind die Lymphkapillaren durch eine einschichtige Lage von Lymphendothelzellen (LEC) ausgekleidet, besitzen eine perforierte, unvollständige Basalmembran und sind von größerem Durchmesser als Blutkapillaren (Leak, 1976). Die Lymphkapillaren sind durch elastische Filamente mit dem umliegenden Bindegewebe verbunden, sodass bei steigendem Gewebedruck die Kapillarwände auseinander gezogen werden und die interstitielle Flüssigkeit durch das vergrößerte Lumen abfließen kann (Leak, 1968). Messungen von Lymphkapillaren in der menschlichen Haut durch Fischer et al. ergaben einen mittleren Durchmesser von $54,8 \mu\text{m}$. Die Flussgeschwindigkeit in diesen Kapillaren ließ sich durch Erhöhung des interstitiellen Drucks mittels subepidermaler Injektion von $10 \mu\text{l}$ eines 150.000 Dalton schweren Fluoreszenz-Dextran Konjugats von $9,7 \mu\text{m/s}$ in Ruhe auf $510 \mu\text{m/s}$ nach Injektion steigern (Fischer, 1996).

Mehrere Lymphkapillaren konfluieren in ihrem weiteren Verlauf zu einem Präkolektor, dessen mikroskopische Struktur eine irreguläre und unvollständige Anordnung von glatten Muskelzellen (SMC) als Perizyten in der Gefäßwand aufweist. Laut histologischen Studien von Sacchi et al. am Lymphsystem der Leistenregion des Menschen beträgt der Durchmesser der Präkolektoren zwischen 35 und $150 \mu\text{m}$, in manchen Fällen bis zu $300 \mu\text{m}$. Außerdem tragen Präkolektoren, ebenso wie Venen, die für den zentripetal gerichteten Flüssigkeitstransport notwendigen, irregulär angeordneten, intraluminalen Klappen. Die Untersuchung der dünnen Endothelschicht der Präkolektoren weist mit ihren vielen pinozytären Einschlüssen, ihrer unvollständigen Basalmembran und ihren Ankerfilamenten eine große Ähnlichkeit zur Morphologie der Lymphkapillaren auf. Eine Fortsetzung der interstitiellen Flüssigkeits- und Proteinabsorption trotz Vorhandensein von Perizyten und Gefäßklappen in den Präkolektoren ist daher wahrscheinlich (Sacchi, 1997).

Mehrere Präkolektoren transportieren die Lymphe zu einem Kolektor, dessen Morphologie mit dreischichtigem Wandaufbau und ebenfalls vorhandenen intraluminalen Klappen an die einer Vene erinnert. Jedoch sind die Klappen in ihrer Anzahl häufiger und die Wanddicke geringer im Vergleich zu Venen gleicher Größe (Gray, 2005). Ihr häufig stern-, kreuz- und schlitzförmiges, jedoch selten rundes Lumen variiert im Durchmesser zwischen 150 und $350 \mu\text{m}$ (Suami, 2007; Boggon und Palfrey, 1973).

Lymphgefäße regulieren den Lymphfluss sowohl durch tonische Änderungen der Gefäßwandspannung als auch durch phasische Kontraktionen dieser (Gashev, 2001). Verantwortlich für

die Kontraktilität der Gefäßwand sind die perivaskulären glatten Muskelzellen, welche durch verschiedene humorale und neurale Metabolite, wie z.B. Thromboxan A₂, oder Stickstoffmonoxid zur Kontraktion, bzw. zur Relaxierung angeregt werden (Sinzinger, 1984; Gasheva, 2006). Die Lymphflussgeschwindigkeit hängt jedoch auch von passiven Faktoren wie der Beschaffenheit des Gefäßbettes und der Aktivität der umliegenden Skelettmuskulatur ab und ist somit regional verschieden (Gashev, 2004).

Die Lymphgefäße durchfließen auf ihrem zentral gerichteten Weg die aus B- und T-Zellen zusammengesetzten Lymphknoten, welche die regionalen Orte der Immunantwort darstellen (Tortosa, 2006). Die antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen (DC), welche durch die inflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 aus Monozyten heranreifen, sowie Lymphozyten gelangen so über die Lymphgefäße zu den T-Zell-Arealen der Lymphknoten und bewirken dort eine Freisetzung der T-Zellen über die hochendothelialen Venolen. Diese gelangen so über den Blutstrom zu den entzündeten Arealen, um dort die Immunantwort zu bewirken.

Der CC-Chemokinrezeptor CCR7 und sein Ligand CCL21 spielen bei der Regulation dieser Migration- und Invasionsvorgänge durch ihre chemotaktische Wirkung eine wichtige Rolle. Der Rezeptor wird während des Reifungsprozesses der DC auf deren Oberfläche hoch reguliert (Dieu et al., 1998) und ermöglicht durch Interaktion mit dem von Lymphendothelzellen exprimierten CCR7-Liganden CCL21 deren Eintreten in die Lymphbahn. Die inflammatorischen Zytokine bewirken eine lokale Hochregulation von CCL21 durch die umliegenden Lymphendothelzellen und erhöhen so die Anzahl der invadierenden DC (Martín-Fondecilla et al., 2003). CCR7 ist zudem auf den zirkulierenden T-Zellen exprimiert und ermöglicht diesen das Eintreten in die Lymphknoten, ebenfalls durch CCR7/CCL21-Interaktion an den CCL21-exprimierenden Endothelzellen der hochendothelialen Venolen (Stein et al., 2000).

Interessanterweise benötigen die T-Zellen, ebenso wie die DC, die CCR7-Expression jedoch auch, um vom entzündeten Gewebe in den afferenten Lymphstrom zu gelangen (Bromley et al., 2005). Das Fehlen von CCR7 oder seiner Liganden im Tierexperiment führt zu schweren Störungen in der Immunantwort, vor allem bedingt durch die fehlerhafte Entwicklung der Lymphknoten und der Unfähigkeit der DC-Zellen und T-Zellen, in sekundäre lymphatische Organe zu gelangen (Gunn et al., 1999) (Forster et al., 1999).

Eine weitere wichtige Molekülklasse für die Invasionsfähigkeit der Immunzellen in die Lymphstrombahn sind die endothelialen Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-selectin. Johnson et al. konnten in einer Stimulation *in vitro* von isolierten LEC, vor allem mit TNF- α und TNF- β , eine Hochregulation dieser Adhäsionsmoleküle detektieren. Zudem konnten sie im Tierversuch in Mäusen erfolgreich die Lymphgefäßinvasion von CD11c⁺ DC stoppen, indem sie ICAM-1- und VCAM-1-neutralisierende Antikörper verwendeten (Johnson et al., 2006).

1.3.4 Regenerative und tumorassoziierte Lymphangiogenese

Lymphangiogenese ist ein wichtiger Kontributor zur Wundheilung indem es unter anderem den Gewebsdruck in der Wunde normalisiert und für den Abtransport von Zelldebrít und Immunzellen mitverantwortlich ist. Die Aktivierung oder Inhibierung der regenerativen Lymphangiogenese kann die Wundheilung entscheidend beschleunigen, bzw. verlangsamen und folglich eine Wunde chronifizieren. VEGF-C gilt als der hauptverantwortliche Mediator der regenerativen Lymphangiogenese und beschleunigt den Heilungsprozess (Saaristo et al., 2006).

In Wunden, die durch Stanzbiopsien der Haut mit nachfolgender Bildung von Granulationsgewebe erzeugt wurden, bilden sich nach der gängigen Lehrmeinung neue LymphgefäÙe an den Wundrändern aus bereits existierenden LymphgefäÙen. Aus den neuen LymphgefäÙen, die das Granulationsgewebe durchqueren, sprossen schließlich weitere LymphgefäÙe aus. Die Bildung der LymphgefäÙe scheint der Bildung der BlutgefäÙe zeitlich und örtlich zu folgen und die LymphgefäÙe bilden sich mit der Formation von Narbengewebe vollständig zurück (Paavonen et al., 2000).

Interessanterweise ist eine LYVE-1⁺ Podoplanin⁺ und CD11b⁺ Subpopulation von knochenmarkstämmigen, aktivierten Makrophagen maßgeblich an der Lymphangiogenese im Wundmilieu beteiligt. Sie leisten ihren Beitrag nicht nur durch ihre Sekretion der Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D, sondern darüber hinaus als direkte Quelle neuer Lymphendothelzellen, wie in Studien zur entzündungsassoziierten Lymphangiogenese an der normalerweise avaskulären Kornea von Mäusen gezeigt wurde. Diese Studien zeigten zudem das spontane Entstehen von LymphgefäÙen im Korneastroma ohne initialen Kontakt zu prä-existierenden LymphgefäÙen im Limbusbereich („Lymphvaskulogenese“). Dieser Prozess zeigte sich unabhängig von der Präsenz des VEGF-C (Maruyama et al., 2005).

Auch die bereits erwähnten Arbeiten von Kerjaschki et al. lassen auf knochenmarkstämmige Zellen, die eventuell als Makrophagen klassifiziert werden können, als eine Quelle der Lymphendothelzellen bei der *de-novo* Lymphangiogenese in der abstoÙungsassoziierten Lymphangiogenese von humanen Nierentransplantaten schließen (Kerjaschki et al., 2006).

Die Wichtigkeit der erwähnten Makrophagen zeigt sich in der schlechten Wundheilung von Patienten mit Diabetes mellitus. Diese scheint zum Teil durch das hyperglykämieinduziert verminderte Vorkommen und der verminderten Aktivität von LYVE-1⁺ Podoplanin⁺ und CD11b⁺ Makrophagen im Wundmilieu bedingt zu sein (Maruyama et al., 2007).

LymphgefäÙe sind neben ihrer physiologischen Rolle an einer Reihe pathologischer Vorgänge des Körpers beteiligt. Viele maligne Tumore nutzen das LymphgefäÙssystem als Metastasierungsroute durch den menschlichen Körper. Die Metastasierung erfolgt dabei klassischerweise über die drainierenden Lymphknoten, auch „Sentinel“-Lymphknoten genannt, dann über entfernte Lymphknoten und schließlich zu entfernten Organen.

Interessanterweise enthalten die meisten Tumore nur nicht-funktionstüchtige Lymphgefäße innerhalb des Tumorgewebes, die im Gegensatz zu den funktionsfähigen, peritumoralen Lymphgefäßen mit größter Wahrscheinlichkeit nicht für die lymphatische Metastasierung verantwortlich sind (Padera et al., 2002). So konnte die Arbeitsgruppe von Padera et al. bei einigen Patienten mit malignen Lungentumoren (sowohl Adeno-, Plattenepithel-, als auch Bronchioalveoläres Karzinom) eine lymphatische Metastasierung nachweisen, obwohl in den histologischen Präparaten keine lymphatischen Marker innerhalb des Tumorgewebes nachweisbar waren.

VEGF-C spielt in der tumorassoziierten Lymphangiogenese eine wichtige Rolle. So exprimieren eine Vielzahl von Tumoren den lymphatischen Wachstumsfaktor, teilweise in exzessivem Maße (Salven et al., 1998). Eine erhöhte Konzentration von VEGF-C korreliert zudem in den meisten Fällen mit einer erhöhten Metastasierungsrate, erhöhter peritumoraler Lymphgefäßdichte sowie mit schlechterem Patientenüberleben (Ohta et al., 1999; Wang et al., 2007). Zu den untersuchten Tumoren gehören beispielsweise: Magenkarzinom, Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Kolorektales Karzinom und viele weitere (Yonemura et al., 1999; Ohta et al., 2000; Skobe et al., 2001; Tsurusaki et al., 1999; Akagi et al., 2000).

Die Rolle des VEGFR-3 in der tumorassoziierten Lymphangiogenese konnte durch Versuche von He et al. verdeutlicht werden. Hier ließ sich im Mausversuch durch Suppression der Signalkaskade von VEGFR-3 die lymphatische Metastasierungsrate von subkutan injizierten Lungenzellen reduzieren (He et al., 2002).

Ähnlich wie bei der Chemotaxis der Immunzellen scheint eine Expression von CCR7 auf den Tumorzellen die lymphatische Invasionsfähigkeit und damit verbundene Metastasierungsrate zu begünstigen (Wiley, 2001).

1.3.5 Marker der Lymphangiogenese

1.3.5.1 Der Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR-3/FLT4 und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D

Der Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3, bei seiner Entdeckung noch fms-related tyrosinekinase 4 genannt, ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor der Klasse III und das dritte Mitglied der VEGF-Rezeptorenfamilie. Die weiteren Mitglieder dieser Rezeptorengruppe sind die „fms related tyrosinekinase 1“ (FLT1, VEGFR-1) und der „kinase insert domain receptor“, auch „fetal liver kinase-1“ genannt (KDR, FLK, VEGFR-2). Die VEGF-Rezeptoren gehören zur Gruppe der „platelet derived growth factor receptors“ (Karkkainen und Petrova, 2000).

VEGFR-3/FLT4 wurde erstmals 1992 aus der cDNA der erythroiden Leukämiezellreihe HEL durch Aprelikova et al. geklont und als FLT4 benannt (Aprelikova et al., 1992). Sein

Genlocus liegt auf Chromosom 5q33-qter und phenotypisch verfügt der Rezeptor über sieben immunglobulinartige, extrazellulär liegende Schleifen-Domänen (Pajusola et al., 1992). Seine beiden Liganden sind die Gefäßwachstumsfaktoren „vascular endothelial growth factor-C“ (VEGF-C) und „vascular endothelial growth factor-D“ (VEGF-D), die vor allem von perivaskulären glatten Muskelzellen und im Mesenchym gebildet werden (Kukk et al., 1996; Dumont et al., 1998).

VEGF-C und -D gehören ebenso wie VEGF-A, VEGF-B und placenta derived growth factor (PlGF) zur VEGF-Familie, einer Untergruppe der „platelet derived growth factors“. (Ferrara und Henzel, 1989; Olofsson et al., 1996; Maglione et al., 1991)

Joukov et al. gelang 1996 die Klonierung von VEGF-C aus cDNA der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 ohne sich der Entdeckung des wichtigsten Induktors und Regulators der Lymphangiogenese bewusst zu sein. Die Beschreibung von VEGF-C als den ersten lymphspezifischen Wachstumsfaktor gelang erst ein Jahr später der Arbeitsgruppe von Jeltsch et al. VEGF-C ist außerdem ein Ligand des VEGFR-2, der auf Blut- und Lymphendothelzellen exprimiert ist. VEGF-C wird durch das *VEGF-C*-Gen, welches auf Chromosom 4q34 liegt, kodiert (Joukov et al., 1996; Paavonen et al., 1996; Jeltsch et al., 1997)

Kaipainen et al. konnten die Expression von VEGFR-3 bereits 1995 hauptsächlich den Endothelzellen von Lymphgefäßen in Erwachsenen zuweisen und entdeckten damit den ersten Marker, der eine weitestgehend sichere Unterscheidung zwischen Blut- und Lymphendothelzellen zuließ. VEGFR-3 wird neben den Lymphendothelzellen auch von venösen Endothelzellen in Knorpelkanälen der Wirbelkörper, im Nebennierenmark, im Milzsinus sowie auf den Kapillarendothelzellen von fenestrierten Kapillaren exprimiert. Außerdem ist der Rezeptor auf Endothelzellen aus Tumorgefäßen nachgewiesen worden. Dies sind die Ausnahmen der Spezifität von VEGFR-3 in seiner Funktion als lymphendothelialer Marker (Kaipainen et al., 1995; Partanen et al., 2000).

In der murinen Embryonalphase ist der Rezeptor noch auf den im Mesenchym befindlichen Angioblasten, den Vorläuferzellen der Blutendothelzellen, und auf den Endothelzellen der Kardinalvenen exprimiert. Jedoch wird er mit deren Reifung zu adulten Endothelzellen herunter reguliert und ist schließlich nur noch auf Lymphendothelzellen zu finden (Kaipainen et al., 1995).

Der VEGFR-3 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung sowohl des Blut- und Lymphgefäßsystems, als auch bei der Angiogenese und Lymphangiogenese durch Tumore (Valtola et al., 1999; Karpanen et al., 2001; Veikkola et al., 2001). *VEGFR-3^{-/-} knock-out* Mäuse sterben zwischen den Embryonaltagen 9-12 an kardiovaskulärem Versagen. Die Autoren resümieren, dass die Entwicklung primitiver Blutgefäße (Vaskulogenese) und deren initiale Aussprossung (Angiogenese) in diesen Tieren nicht beeinträchtigt zu sein scheint, wohl jedoch die

Ausreifung und der Umbauprozess der primitiven Gefäßstrukturen und die damit verbundene Formierung größerer Gefäßstrukturen (Dumont et al., 1998).

Im Vergleich zu dem ebenfalls auf den Blutendothelien der Kardinalvene exprimierten VEGFR-2, ebenfalls ein Rezeptor für VEGF-C, ist der VEGFR-3 für die Lymphangiogenese entscheidender. Beweisend hierfür ist die Beobachtung, dass eine spezifische Stimulation des VEGFR-3, ohne VEGFR-2 Stimulation, zu einer ungestörten Lymphgefäßbildung führte (Veikkola et al., 2001).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutsamkeit des VEGFR-3 ist die Feststellung, dass das hereditäre Lymphödem, eine Erkrankung die durch entstehende lymphödematöse Schwellungen der Extremitäten gekennzeichnet ist, in vielen Fällen auf einer heterozygoten Mutation des *VEGFR-3*-Gens, die zu einer Beeinträchtigung der Rezeptoraktivität führt, basiert (Karkkainen et al., 2000).

Beide Liganden von VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D, besitzen das Potential, die Bildung von sowohl Lymph- als auch Blutgefäßen anzuregen, jedoch tun sie dies nicht in gleichem Maße (Cao et al., 1998; Witzgenbichler et al., 1998; Marconcini et al., 1999). Die Unerlässlichkeit und hervorstechende Rolle von VEGF-C in der Entwicklung eines funktionsfähigen Lymphsystems zeigen Versuche an *VEGF-C^{-/-} knock-out* Mäusen, die um den Embryonaltag 15 versterben und bei denen das Aussprossen der Lymphendothelzellen zur Bildung der primitiven Lymphbläschen ausbleibt. Die Bildung von Blutgefäßen bleibt bei *VEGF-C^{-/-} knock-out* Mäusen jedoch unbeeinträchtigt. Hervorzuheben gilt, dass die Endothelzellen der embryonalen Kardinalvene eine unverändert starke Expression von Prox-1 in den Bereichen der normalerweise stattfindenden Aussprossung der Lymphbläschen zeigen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen trotz des *VEGF-C^{-/-} knock-out* ihre Kompetenz zur lymphendothelialen Differenzierung nicht verloren haben. Vielmehr ist es die koordinierte Aussprossung der Lymphendothelzellen, die durch das Fehlen von VEGF-C beeinträchtigt ist. Genauer scheint es die fehlende *chemotaktische* Wirkung von VEGF-C zu sein, die ein Ausbleiben der Migration der LEC aus der Kardinalvene in das umliegende Mesenchym bewirkt und zur Apoptose der *Prox1⁺* Zellen führt.

Heterozygote *VEGF-C^{+/-}* Mäuse überleben zwar, zeigen allerdings kutane Lymphgefäßhyperplasien und leiden unter Lymphödemem. Andererseits zeigen transgene Mäuse mit künstlicher kutaner Überexpression von VEGF-C eine Hyperplasie in den dermalen Lymphgefäßen (Karkkainen et al., 2004; Jeltsch et al., 1997)

In einem anderen Versuchsansatz durch Mäkinen et al. wurde ein löslicher Antikörper, bestehend aus einem Konjugat aus der ligandenbindenden Domäne des VEGFR-3 und dem Fc-Fragment eines Immunglobulin G erstellt, um so die Wirkung von VEGF-C und VEGF-D lokal aufheben zu können. In transgenen Mäusen wurde eine gezielte Expression des Antikörpers alleine im Hautgewebe erreicht. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der beiden Liganden

im Gewebe, in diesem Fall speziell im Hautgewebe, ein Ausbleiben der Lymphgefäßbildung zur Folge hat. Ein *knock-out* Modell mit VEGF-D^{-/-} Mäusen bringt erstaunlicherweise Mäuse mit einem normalen Lymphgefäßsystem hervor, was auf die prominente Rolle von VEGF-C und weniger wichtige Rolle von VEGF-D in der Lymphgefäßentwicklung schließen lässt (Makinen et al., 2001a; Baldwin et al., 2005).

In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass isolierte Lymphendothelzellen durch die Wirkung von VEGF-C am VEGFR-3 vor Apoptose durch Nährstoffentzug bewahrt werden können. Zudem zeigen die Zellen unter Stimulation mit VEGF-C ein stärkeres Proliferationsverhalten. Außerdem bewirkt VEGF-C eine erhöhte Migrationfähigkeit der Lymphendothelzellen *in vitro* (Makinen et al., 2001b).

VEGF-C bewirkt zudem ein erhöhtes Heilungspotential in diabetischen Wunden. Dies beruht wahrscheinlich auf der positiven Wirkung von VEGF-C auf Angiogenese und Lymphangiogenese in der Wunde, sowie der gesteigerten Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen und Makrophagen an den Wundrand (Saaristo et al., 2006).

Die Bedeutung von VEGF-C in der Tumorlymphangiogenese wird in Kapitel 1.3.4 auf Seite 18 dargelegt.

1.3.5.2 Der prospero-related Homeobox Transkriptionsfaktor (Prox1)

Der prospero-related Homeobox Transkriptionsfaktor Prox1 ist das in Säugetieren vorkommende Homolog zum *prospero*-Gen der Drosophila Fliege (Oliver et al., 1993). Prox1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener Gewebe und Organe:

- In der Pankreasentwicklung bewirkt die Aktivität von Prox1 die Entstehung der epithelialen Morphologie und ist für die Bildung von Inselzellen wichtig (Wang et al., 2005).
- In der Retina bewirkt die Aktivität von Prox1 die Beendigung des Zellzyklus und steigert die Proliferation der retinalen Progenitorzellen und fördert zudem die Bildung von Horizontalzellen (Dyer et al., 2003).
- In der Linse bewirkt Prox1-Aktivierung die Verlängerung und Differenzierung der Linsenfasern (Wigle et al., 1999).
- In der Leberentwicklung fördert Prox1-Aktivität die Migrationsfähigkeit von Hepatozyten (Sosa-Pineda et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, konnten Wigle et al. feststellen, dass die Expression von Prox1 der ausschlaggebende Faktor ist, der die Endothelzellen der Kardinalvene zur Entwicklung der primitiven Lymphbläschen bewegt (Wigle und Oliver, 1999) (siehe Kapitel 1.3.2 auf Seite 14). Homozygote Prox 1^{-/-} Mäuse zeigen eine Letalität von 100%, eine mangelhafte Aussprossung

von Endothelzellen aus der Kardinalvene und ein Ausbleiben der sonst typischen konsekutiven Expression anderer lymphatischer Marker. Stattdessen zeigten die ausgesprossenen Zellen in den $Prox1^{-/-}$ Tieren, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, weiterhin einen blutendothelialen Phänotyp und eine ungerichtete Aussprossung. Heterozygote $Prox1^{+/-}$ Mäuse überleben nur teilweise und leiden durch die Mutation an lymphatischem Aszites und Lymphödemen, bedingt durch ein fehlorganisiertes, abnormal strukturiertes und durch rupturierte Gefäße gekennzeichnetes Lymphgefäßsystem.

Interessanterweise zeigen diese Mäuse in ihrem weiteren Verlauf im Erwachsenenalter eine Entwicklung von Adipositas, was auf einen möglichen Zusammenhang von Lymphgefäßfunktion und Adipogenese bzw. funktionsbeeinträchtigter Lymphgefäße und morbider Fettleibigkeit schließen lässt (Harvey et al., 2005).

Der Mechanismus der zur Expression von $Prox1$ in den Blutendothelzellen der Kardinalvene und damit zu deren lymphendothelialer Kompetenz führt, ist noch unklar. Jedoch gibt es erste Hinweise aus *in vitro* Versuchen. Dort zeigen isolierte Endothelzellen eine gesteigerte Expression von $Prox1$ unter Stimulation mit Interleukin-3 und Interleukin-7. Eine Beteiligung dieser Regulationsmechanismen *in vivo* ist jedoch noch nicht gezeigt worden (Grogger et al., 2004; Al-Rawi et al., 2005).

$Prox1$ reguliert in Lymphendothelzellen eine Vielzahl an Genen. So kommt es in $Prox1^{+}$ Zellen z.B. zur Expression von $p57Kip2$, sowie weiteren Regulationsmolekülen des Zellzyklus wie Cyclin E1 und Cyclin E2 (Petrova et al. 2002). Zudem führt die Aktivität von $Prox1$ zur Expression von lymphgefäßtypischen Genen für *VEGFR-3*, *Podoplanin*, *Integrin α -9*, dem Adrenomedullinrezeptor „*Calcitonin receptor-like receptor (calcr1)*“ und vielen weiteren (Fritz-Six et al., 2008; Hong et al., 2002).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die künstliche Zuführung von $Prox1$ in adulte Blutendothelzellen, die konstitutiv kein $Prox1$ exprimieren, zu einer Reprogrammierung dieser Zellen mit konsekutiver Transkription lymphendothelialer Gene und der Ausbildung eines lymphendothelialen Phänotypes führen. Bemerkenswerterweise war diese Charakteristik nur auf Endothelzellen beschränkt, nicht jedoch auf andere getestete Zelltypen, wie z.B. epitheliale Zellen. Die Expression von $Prox1$ führte in den adulten Blutendothelzellen ferner zu einer Suppression von Genen, die charakteristisch für Blutendothelzellen sind, wie den Transkriptionsfaktor STAT6 und dessen Transkriptionsprodukte (Petrova et al., 2002).

Als Regulator von Zellzyklusgenen gilt $Prox1$ zudem als potentielles Tumorsuppressorgen. Eine niedrige Expression von $Prox1$ in hepatozellulären Karzinomen korreliert mit schlechterer Prognose und schnellerem Tumorwachstum. Zudem wurde in Pankreaskarzinomen des Menschen eine herabgesetzte $Prox1$ -Aktivität mit Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors detektiert. Eine weiterführende Untersuchung von mRNA verschiedener humaner Tu-

morzellreihen zeigte verschiedene Mutationen von Prox1, die dessen Aktivität herabsetzen (Shimoda et al., 2006; Takahashi et al., 2006).

1.3.5.3 Das Glykoprotein Podoplanin/T1alpha

Podoplanin ist ein ca. 38 kDa großes Glykoprotein der Zelloberfläche, welches 1996 unter dem Namen „E11 Antigen“ durch Wetterwald et al. als Osteoblastenmarker in Ratten beschrieben wurde. Homologe von Podoplanin wurden später in verschiedenen Organen unterschiedlicher Säugetiere entdeckt. Als Besonderheit konnten die Autoren damals schon seine zusätzliche Expression in Lymphgefäßen detektieren, was durch spätere Untersuchungen von Angiosarkomen, insbesondere Karposisarkomen, bestätigt werden konnte (Wetterwald et al., 1996; Breiteneder-Geleff et al., 1999).

Untersuchungen von isolierten Lymph- und Blutendothelzellen zeigten die unterschiedliche Expression von Podoplanin und damit verbundene hohe Potenz von Podoplanin zur Unterscheidung von Lymph- und Blutendothelzellen (Petrova et al., 2002; Hirakawa et al., 2003).

Podoplanin erhielt seinen Namen bei der Untersuchung seines Vorkommens auf Podozyten in der Puromycin-Nephritis in Ratten, einem Tiermodell zur Erforschung der Minimal-Change-Glomerulonephritis. Hier scheint die Aktivität des 43kDa großen Podoplanins der Ratte herabgesetzt, was eine Abflachung der Podozytenfüße zur Folge hat (lat.: *pes planus*) (Breiteneder-Geleff et al., 1997).

Das Podoplanin-Homolog T1 α kann in Ratte und Maus auf der Oberfläche von Typ I Pneumozyten und im sich entwickelnden Gehirn gefunden werden und spielt als Differenzierungs-gen bei der Lungenreifung eine entscheidende Rolle. Homozygote T1 $\alpha^{-/-}$ Mäuse versterben perinatal an respiratorischem Versagen, da ihre distale Lungenmorphologie durch zu enge Luftwege und nicht ausgereiften Pneumozyten Typ I gestört ist (Dobbs et al., 1988; Rishi et al., 1995; Ramirez et al., 2003).

Studien von Schacht et Ramirez zeigten unter Verwendung des selben Tiermodells die Wichtigkeit von T1 α /Podoplanin für eine korrekte Lymphgefäßentwicklung und ihre Vernachlässigbarkeit für die Blutgefäßentwicklung. Im Gegensatz zu Prox1 $^{-/-}$ Mäusen war die Aussprossung der primitiven Lymphbläschen in T1 α /Podoplanin $^{-/-}$ Mäuse nicht beeinträchtigt und ein peripheres Lymphgefäßsystem konnte sich entwickeln. Allerdings stellten die Autoren ein fehlerhaftes Ausbildungsmuster mit gestörtem Flüssigkeitstransport als Indiz für beeinträchtigte Funktion des peripheren Lymphgefäßsystems fest. Wie zu erwarten demonstrierten die T1 α /Podoplanin $^{-/-}$ Feten periphere Lymphödeme, histologisch insbesondere durch unterbrochene Lymphgefäße gekennzeichnet.

In weiterführenden *in vitro* Versuchen konnte die Wichtigkeit von T1 α /Podoplanin in Endothelzellen für die Restrukturierung des Zytoskeletts gezeigt werden. Auf diesem Wege steigert

Podoplanin die Ausbildung von migrationsdienlichen Zellprotrusionen, die Zelladhärenz und die Ausbildungsfähigkeit von röhrenartigen Strukturen (Schacht et al., 2003).

T1 α konnte in Rattenfetten zudem im Thymusstroma und T-Zell-abhängigen Lymphknotenarealen, im Plexus choroideus, im Ziliarepithel des Auges, im Oesophagus, im Darm und in den Niere gefunden werden (Farr et al., 1992; Williams et al., 1996).

Weitere Homologe, bzw. Synonyme von Podoplanin sind das murine Glykoprotein 38, das humane Glykoprotein 36, das canine Glykoprotein 40 und das murine OTS-8 Gen (Zimmer et al., 1997, 1999; Nose et al., 1990).

1.3.5.4 Der „lymphatic vessel Hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)“

Der Hyaluronsäure-Rezeptor LYVE-1 gehört zur Familie der „Link Proteine“ und wurde im Jahre 1999 als CD-44-Homolog aus der cDNA von HUVEC durch Banerji et al. geklont. Es konnte gezeigt werden, dass LYVE-1 eine hohe Spezifität für die Expression auf Lymphendothelzellen zeigt. LYVE-1 ist außerdem auf den Endothelzellen von Lebersinusoiden, den hochendothelialen Venolen der Lymphknoten und auf aktivierten Gewebsmakrophagen exprimiert (Banerji et al., 1999; Mouta Carreira et al., 2001; Wrobel et al., 2005; Schledzewski et al., 2006).

Hyaluronsäure spielt bei der Entwicklung mesenchymaler Gewebe wie Knorpel und Muskel eine wichtige Rolle. Im Erwachsenen fördert Hyaluronsäure durch Bildung einer extrazellulären Matrix die Migrationsfähigkeit von Fibroblasten und Epithelzellen in Gebieten von Entzündung und Wundheilung. CD 44, ebenfalls ein Hyaluronsäure-Rezeptor, ist essentiell für das Rollverhalten und dem damit verbundenen Homing-Prozess von hyaluronsäuretragenden Leukozyten in Blutgefäßen entzündlicher Areale (Pure und Cuff, 2001).

Lymphgefäße spielen eine entscheidende Rolle beim Transport der kurzlebigen Hyaluronsäure aus dem peripheren Gewebe zu den Lymphknoten, in denen die Hyaluronsäure degradiert wird. Daher liegt die Vermutung nahe, dass LYVE-1 beim Transport von Hyaluronsäure, bzw. der hyaluronsäuretragenden Immunzellen durch das Lymphgefäßsystem eine Rolle spielt. (Fraser et al., 1988; Prevo et al., 2001)

LYVE-1^{-/-} Mäuse zeigen jedoch ein morphologisch unverändertes Lymphgefäßsystem und keine der oben genannten, bekannten Funktionen sind eingeschränkt: es kommt weder zum Arrest des Hyaluronsäureabtransports, noch ist die Bewegung von Immunzellen in den Lymphgefäßen eingeschränkt. Die physiologische Funktion von LYVE-1 ist daher zurzeit nicht vollständig verstanden (Gale et al., 2007).

1.4 Angiotensin-1 und sein Rezeptor Tie2/Tek

Der Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2 ist ein spezifischer Rezeptor für Angiotensin-1 und wurde durch Schnürch et al. auf Endothelzellen entdeckt (Schnürch und Risau, 1993). Der Ang-1/Tie2 Signalweg spielt bei der embryonalen Gefäßentwicklung eine entscheidende Rolle und Ang-1 gilt als einer der zentralen Wachstumsfaktoren der Angiogenese (Sato et al., 1995). Seine Wirkung am Tie2-Rezeptor bewirkt eine „Reifung“ der noch prämaternen Neovaskularisationen. Somit hat Ang-1 einen stabilisierenden Einfluss auf neu entstehende Gefäße (Suri et al., 1996).

Eine Deletion von Ang-1 führt, ebenso wie eine Deletion von Tie2, in *knock-out* Modellen zum embryonalen Versterben mit schweren Defekten in der Gefäßausbildung und Mikrozirkulation. Zu den bekannten Regulatoren, die zur Expression oder Inhibierung von Tie2 und/oder Ang-1 führen, gehören unter anderem VEGF, $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$ und Hypoxie (Metheny-Barlow et al., 2004; Wen et al., 2003). Neben Ang-1 bindet Tie2 auch Ang-2, -3 und -4. Diese wirken entweder als reine Agonisten, bzw. Antagonisten, oder haben eine gemischte Wirkung (Davis et al., 1996).

Die genaue Funktion von Tie1, einem weiteren Rezeptor aus der selben Rezeptorenfamilie wie Tie2, ist nicht genau bekannt. Hypothesiert wird die Ausbildung von Heterodimeren zwischen Tie1 und Tie2 und eine damit verbundene Kofunktion des Tie1 zum Hauptrezeptor Tie2 (Yuan et al., 2007). Auch eine ligandenunabhängige Stimulation der Tie1-Signalkaskade scheint wahrscheinlich (Wong et al., 1997). Auffallend ist, dass Tie1 nur bei Aktivierung von Tie2 phosphoryliert wird. Analog ist auch die Aktivität von Tie1 herunterreguliert, wenn die Aktivität von Tie2 ebenfalls herunterreguliert ist.

Die Rezeptorwirkung von Ang-2 ist ambivalent. Unter normoxischen Bedingungen ist Ang-2 ein Antagonist am Tie2-Rezeptor. Unter hypoxischen Bedingungen und speziell unter dem Einfluss von VEGF wirkt Ang-2 jedoch agonistisch am Tie2-Rezeptor. Ang-2 bewirkt eine Destabilisierung der Gefäße und fördert somit das Aussprossen neuer Gefäße (Maisonpierre et al., 1997).

Unter hypoxischen Bedingungen bewirkt Ang-1, sowie wahrscheinlich auch Ang-2, eine zelluläre Expression des „New Ets-related factor-2 (NERF2)“ und des „E74-like factor-1 (ELF-1)“, die beide zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren gehören. Diese können an den Promoter von Tie2 binden und dessen Expression fördern (Dube et al., 2001, 1999). Die Bindung von Ang-1 an den Tie2-Rezeptor bewirkt eine Dimerbildung der Rezeptoren, wobei diese Dimerbildung zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase und zur Autophosphorylierung der Rezeptoren führt. Diese Phosphorylierungsstelle dient als Bindungsstelle verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, die in Endothelzellen zur Proliferation, Differenzierung und zum Überleben der Zelle führten (Partanen et al., 1996).

In den Perizyten wird die Expression von Tie2 durch Hypoxie und Stimulation mit VEGF hochreguliert (Park et al., 2003). Ang-1, das von Endothelzellen ausgeschüttet wird, scheint eine wichtige Rolle in der Rekrutierung der Perizyten zur Stabilisierung der Gefäße zu spielen und hat einen direkten chemotaktischen Reiz auf Mesenchymzellen. Darüber hinaus induziert Ang-1 in Mesenchymzellen sogar deren Differenzierung zu vaskulären, glatten Muskelzellen (SMC), einer Art von Perizyten (Makinde und Agrawal, 2008).

Tie2 kann auch auf 2-5% der Monozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden. Tumore, die eine hohe Menge an Ang-2 exprimieren, rekrutieren besonders stark die Tie2⁺ Monozyten zum Tumor. Diese haben dort einen proangiogenetischen Effekt und fördern das Tumorstadium (De Palma et al., 2007; Lewis und Hughes, 2007; Venneri et al., 2007).

1.5 Pankreaskarzinom

1.5.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom gehört weltweit zu den am häufigsten zum Tode führenden malignen Erkrankungen. Alleine in Europa versterben jedes Jahr 50.000 Menschen an dieser Erkrankung (Fernandez et al., 1994b). Im Jahr 2007 war das Pankreaskarzinom bei Männern in den USA mit einem Anteil von 6% die vierthäufigste todbringende, maligne Erkrankung. Bei Frauen lag der Anteil im Jahre 2007 ebenfalls bei 6% und war somit die fünfthäufigste todbringende, maligne Erkrankung (Jemal et al., 2007). Die 5-Jahresüberlebensrate nach chirurgischer Resektion liegt aufgrund der aggressiven Tumorbiologie und der frühen, unbemerkten Metastasierung nur zwischen 11 und 21% (Yeo et al., 1995; Sperti et al., 1996). Ohne chirurgische Intervention ist die Überlebenszeit noch kürzer.

Der Häufigkeitsgipfel des Pankreaskarzinoms liegt zwischen dem 65. und 80. Lebensjahr. Männer scheinen 1,7-mal häufiger betroffen zu sein als Frauen (Hiddemann, 2004). Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten Tabakrauchen, hoher Fleisch- und Fettkonsum, geringe Nahrungsaufnahme von Vitamin C, chronische Pankreatitis und in 10% der Fälle lässt sich eine familiäre, genetische Prädisposition vermuten. (Ahlgren, 1996; Lyon et al., 1993; Bansal und Sonnenberg, 1995; Fernandez et al., 1994a; Petersen und Hruban, 2003; Schenk et al., 2001)

In Familien mit einer erhöhten Inzidenz für Pankreaskarzinome ließen sich nur in seltenen Ausnahmen so genannte „Suszeptibilitätsgene“ finden. Hier scheinen insbesondere Mutationen der Tumorsuppressorgene *brca2* und *p16*, die bei der Entstehung des familiären Mammakarzinoms (*brca2*) und des familiären Melanoms (*p16*) nachgewiesen werden können, ebenfalls beim Pankreaskarzinom eine Rolle zu spielen (Goggins et al., 1996; Rozenblum et al., 1997).

Pankreaskarzinome haben zudem eine erhöhte Inzidenz im Rahmen der folgenden hereditären Syndrome: multiple endokrine Neoplasien Typ 1 (MEN1, mit Mutation im *men1*-Gen), hereditäre Pankreatitis (*PRSS1*-Mutation), hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom (HNP-CC, Mutation in den *MSH2*- und *MLH1*-Genen), von-Hippel-Lindau-Syndrom, Ataxia teleangiectasia (Mutation im *atm*-Gen) und Peutz-Jeghers-Syndrom (*STK11/LKB1*-Mutation) (Jaffee et al., 2002; Hiddemann, 2004).

1.5.2 Tumoriologie

Es bestehen Hinweise, dass das Pankreaskarzinom nach der so genannten „Mehrschrittkarzinogenese“ entsteht (Hiddemann, 2004). Hierbei kommt es im Gangepithel durch zelluläre Anhäufung von Gendefekten zu klonalen, neoplastischen Hyperplasien. Durch zusätzliche Gangläsionen mit Nachweis von Atypien entstehen so genannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien („PanIN“), die in ein invasives Pankreaskarzinom übergehen können (van Heek et al., 2002). Die Theorie der „Mehrschrittkarzinogenese“ basiert auf der Beobachtung, dass die Anzahl an Gendefekten in den Epithelzellen mit dem „Grading“ der PanIN positiv korreliert. Diese PanIN stellen neben den muzinös-zystischen Neoplasien (MCN) und intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) die häufigste Vorstufe zum Pankreaskarzinom dar (Maitra et al., 2003; Brugge et al., 2004; Hezel et al., 2006).

Eine Genmutation, die in nahezu allen Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden kann, ist die des Protoonkogens *k-ras*, welches zur RAS-Familie gehört und viele Zellfunktionen, wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Überleben vermittelt. Die Mutation von *k-ras* bewirkt seine dauerhafte Aktivierung und macht es von der Stimulation durch externe Wachstumsfaktoren unabhängig. Dies scheint eine der ersten und entscheidenden Genmutationen im Rahmen der Pankreaskarzinomentwicklung zu sein, da sie bereits bei PanIN nachgewiesen werden kann. Auch für das weitere Wachstum und die Unterhaltung des Tumors ist die dauerhafte Aktivierung von *k-ras* unabdingbar (Almoguera et al., 1988; Kalthoff et al., 1993; Campbell et al., 1998; Malumbres und Barbacid, 2003; Wittinghofer et al., 1997; Moskaluk et al., 1997).

In 96% der Pankreaskarzinome findet sich eine Genmutation des Tumorsuppressorgens *p16^{INK4A}*. Das Tumorsuppressorgen *p16^{INK4A}*, auch bekannt als „Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)“, kodiert über verschiedene Splicevarianten für Inhibitoren der „Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)“ und ist so an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Genauer inhibiert *p16^{INK4A}* die CDK-vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastomproteins und arretiert somit die Zelle vor dem Eintritt in die S-Phase. Eine Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens ist mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entstehung verschiedener Krebsentitäten assoziiert, vor allem für die Entstehung von malignen Melanomen. Auch für das Pankreaskarzinom zeigt sich ein 13-fach erhöhtes Risiko bei den Mutationsträgern (Schutte et al., 1997; Goldstein et al., 1995; Serrano et al., 1993).

In 50% der Fälle von Pankreaskrebs ist das Tumorsuppressorgen *DPC4* („deleted in pancreatic carcinoma locus 4“, auch *SMAD4* genannt) mutiert, bzw. deletiert (Hahn et al., 1996a,b).

Zusammenfassend lassen sich die Genmutationen des Pankreaskarzinoms in eine frühe und eine späte Phase unterteilen. Zur frühen Phase gehört die Mutation von *k-ras*, die Telomerverkürzung und der Verlust von *p16^{INK4A}*; zur späten Phase gehört der Verlust von *p53* und von *DPC4/SMAD4*. Durch Anhäufung dieser Genmutationen entsteht wahrscheinlich aus normalem Pankreasgewebe über PanIN ein invasives Pankreaskarzinom (Kleeff et al., 2007).

Ungewissheit besteht über den zellulären Ursprung des Pankreaskarzinoms und über die mögliche Existenz einer einzelnen Zelle, die für die Tumorentstehung verantwortlich ist („cell of origin“, „cancer stem cell“ (s. „Stammzellen und Krebs und der Begriff der Krebsstammzelle“ Kapitel 1.2.4 auf Seite 9)).

Bei der Suche nach einer Antwort auf diese Frage fällt auf, dass Pankreastumorzellen eine Abhängigkeit von den Signalkaskaden *Notch*, *Sonic Hedgehog (Shh)* und wahrscheinlich auch *Wnt* aufweisen (Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003; Miyamoto et al., 2003). *In vitro* können Pankreaskarzinomzellen durch Blockierung der *Shh* Signalkaskade zur Apoptose gebracht werden und sie verlieren ihre Tumorigenität *in vivo*. Von diesen o.g. Regulationsmechanismen ist zudem bekannt, dass sie eine große Bedeutung während der Organogenese des Pankreas haben (Ingham und McMahon, 2001). Hier befähigt die Unterdrückung von *Notch* eine Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Pankreasepithelzellen. Auch die *Shh* Signalkaskade muss unterdrückt sein, um eine normale Pankreasentwicklung zu ermöglichen (Hebrok et al., 1998). Die embryonalen Regulationsmechanismen spielen in differenzierten, adulten Pankreasepithelzellen keine Rolle. Es ist jedoch bekannt, dass bei Gewebsschädigung *Shh* und *Wnt* kurzfristig die Proliferations- und Teilungsfähigkeit von gewebständigen Stammzellen vermitteln, um so Heilung zu induzieren (Machold et al., 2003; Reya et al., 2003).

In Anbetracht des erhöhten Karzinomrisikos im Rahmen von Prozessen chronischer Entzündung, wie etwa bei chronischer Pankreatitis, führt möglicherweise die Entkopplung von dauerhaft durch *Wnt*- und *Hgg*-stimulierten Gewebstammzellen zur Entstehung des Tumors. Es wird hypothetisiert, dass diese Entkopplung durch die oben beschriebenen, akquirierten Gendefekte vermittelt wird und diese die Zelle in einem ständigen Proliferations- und Teilungszyklus „gefangen“ halten. Im Einklang mit dieser Hypothese steht auch die Tatsache, dass Gewebe mit einem hohen Zellumsatz, also auch einer hohen Stammzellstimulation, eine erhöhte Rate an malignen Tumoren aufweisen. Als Beispiele hierfür zählen Haut, Magen-Darm-Trakt und Lunge (Beachy et al., 2004).

In der Frage nach der möglichen „cell of origin“ des Pankreaskarzinoms sollte daher eine Stammzelle in Betracht gezogen werden. Als Kandidat einer solchen, möglichen Krebsstammzelle wird beim Pankreaskarzinom zur Zeit die zentroazinäre Zelle diskutiert (Lee et al., 2008).

1.5.3 Pathologie

In über 90% der Fälle entsteht das Pankreaskarzinom aus dem exokrinen Teil des Pankreas. Histologisch zeigt es sich meist als Adenokarzinom (80%), seltener sind weitere Sub- und Mischtypen und als sehr selten gelten das Plattenepithelkarzinom und die nichtepithelialen Sarkome und Lymphome des Pankreas. Abzugrenzen ist das exokrine Pankreaskarzinom von den selteneren endokrinen malignen Neoplasien, Papillenkarzinomen und distalen Gallengangskarzinomen (Cubilla und Fitzgerald, 1984).

In seinem lokalen Wachstum infiltriert das Pankreaskarzinom das peripankreatische Gewebe. Betroffen sind vor allem die Gallengänge und das Duodenum. Zusätzlich infiltriert es häufig die Adventitia der angrenzenden Gefäße, hier insbesondere die V. mesenterica superior, bzw. V. portae und das Perineurium angrenzender Nerven, was häufig mit Schmerzen verbunden ist. Die häufig befallenen Lymphknotenstationen befinden sich entlang der umliegenden Arterien (A. mesenterica superior, A. lienalis, A. hepatica comunis, Truncus coeliacus), in der paraaortalen/parakavalen Region und in der Leberpforte. In 50% der Fälle von chirurgischer Resektion finden sich Lymphknotenmetastasen. Fernmetastasen des Pankreaskarzinoms befinden sich fast immer in Leber und Milz. Häufig liegen bei den Patienten eine Peritonealkarzinose und Lungenmetastasen, selten Knochen- und Hirnmetastasen vor. Unbehandelt hat das Pankreaskarzinom eine schnell eintretende Letalität von annähernd 100% (Hiddemann, 2004; Cubilla und Fitzgerald, 1984; Beazley und Cohn, 1981).

1.5.4 Tumormikromilieu, desmoplastische Reaktion und Tumorangiogenese

Als Besonderheit des invasiven Pankreaskarzinoms gilt die ausgeprägte Bildung von tumorumgebendem, kollagenreichen Bindegewebe. Dies wird als desmoplastische Reaktion bezeichnet (Bhowmick und Moses, 2005). Die Interaktionen der Tumorzellen mit dem umgebenden Bindegewebe scheinen ein entscheidender Faktor für das Tumorwachstum zu sein. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Grad an reaktivem Stroma als prognostischer Marker von Prostatakarzinomen verwendet werden kann (Bacac et al., 2006). In diesem speziellen Fall verhindert das Tumorstroma die Apoptose, fördert die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und verstärkt die Invasivität der Tumorzellen (Ayala et al., 2006; Tuxhorn et al., 2002; Hart et al., 2005).

Interessanterweise unterscheidet sich das tumorumgebende Bindegewebe biologisch von gesundem Bindegewebe. So scheint in den Zellen des Tumorstromas ein ähnliches Muster an Genmutationen wie in den Tumorzellen selber vorzuherrschen. Auch in seiner Funktion unterscheidet sich das Tumorstroma von gesundem Bindegewebe. Gesunde Fibroblasten können *in vitro* das Tumorwachstum hemmen, wohingegen die tumorassoziierten Fibroblasten das

Tumorstromas fördern. *In vivo* bewirkt eine Bestrahlung des Brustdrüsenstromas vor Implantation von nicht malignen Epithelzellen eine Ausbildung von großen Tumoren. Dies deutet auf eine strahleninduzierte Modulation der normalerweise inhibierenden Eigenschaften des gesunden Stromas auf die Proliferationsfähigkeit von Epithelzellen hin (Chung, 1995; Sadlonova et al., 2005; Barcellos-Hoff und Ravani, 2000).

Im Pankreaskarzinom besteht das Tumorstroma hauptsächlich aus pankreatischen Stellatumzellen, peritumoralen Nerven, Endothelzellen und Makrophagen. Unter diesen Stromazellen wird speziell der Stellatumzelle eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung zugeschrieben. Sie sind im normalen Pankreasgewebe zwar kaum nachweisbar, in krankhaft verändertem Pankreasgewebe hingegen vermehrt anzutreffen. *In vitro* können Pankreastumorzellen einen aktivierenden Einfluß auf Stellatumzellen ausüben. Stellatumzellen können so nach ihrer Aktivierung eine Reihe an extrazellulären Matrixproteinen, u.a. Kollagene, produzieren und wichtige fibrosefördernde Entzündungsmediatoren, hier im speziellen TGF β , ausschütten (Farrow et al., 2008; Apte et al., 2004; Bachem et al., 2005; Aoki et al., 2006).

Der Ursprung der mesenchymalen Stellatumzellen wird im Knochenmark vermutet. Die Signifikanz der Knochenmarksbeteiligung an der Bildung des Tumorstromas zeigen Untersuchungen an orthotopen Pankreastumormodellen. Hier machen knochenmarkstämmige Myofibroblasten, die aus der Differenzierung von Stellatumzellen entstehen können, einen Anteil von 25% der Tumorstromazellen aus (Farrow et al., 2008; Direkze et al., 2004). Die Beteiligung von mesenchymalen Stammzellen am Tumorstromawachstum ist bereits im Kapitel „Stammzellen und Krebs und der Begriff der „Krebsstammzelle““ (Kapitel 1.2.4 auf Seite 9) erläutert.

Ein weiterer wichtiger Beitrag des Stromas im Hinblick auf das Tumorstromawachstum ist seine Beteiligung an der Ausbildung von neuen, tumoreigenen Blutgefäßen. Dieser Prozess, der in der Regel durch Aussprossung von präexistierenden Gefäßen abläuft, wird Angiogenese genannt. Ein hoher Grad an Angiogenese korreliert beim Pankreaskarzinom, wie bei vielen anderen Tumoren, mit einer schlechten Prognose (Karademir et al., 2000).

Der Hauptaktivator der Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Dieser wird, vor allem durch Hypoxie induziert, von Pankreaskarzinomzellen ebenso wie von anderen Tumoren und gesunden Geweben, sezerniert und bewirkt so die Bildung von neuen Blutgefäßen (Itakura et al., 1997).

Die Tumorangio-genese ist Ziel verschiedener neuartiger Therapieversuche. Vor allem die Inhibierung von VEGF mittels Antikörper, bzw. die Hemmung seiner Rezeptoren oder deren Signalkaskade, bewirkte in Tierversuchen mit orthotopen Pankreaskarzinomen viel versprechende Ergebnisse bezüglich der Hemmung des Wachstums von Tumoren, deren Metastasen und der Steigerung ihrer Sensibilität gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (Bruns et al., 2004, 2000, 2002; Manegold et al., 2008; Conrad et al., 2007; Wilkowski et al., 2006).

Auf die Beteiligung von mesenchymalen Stammzellen an der Angiogenese wurde bereits im Kapitel „Differenzierungspotential“ (Kapitel 1.2.2 auf Seite 4) eingegangen.

1.5.5 Therapie

Der einzig kurative Ansatz des Pankreaskarzinoms ist die chirurgische Resektion. Bei der häufigen Lokalisation des Tumors im Pankreaskopfbereich findet die Resektion in der Operation nach Kausch-Whipple statt (Warshaw und Fernandez-del Castillo, 1992). Die klassische Operation umfasst die Resektion des Pankreaskopfes, des Duodenums, des distalen Gallengangs, der Gallenblase, 2/3 des Magens und der peripankreatischen Lymphknotenstationen, entsprechend der Tumorlokalisation (Whipple et al., 1935). Die Darmpassage wird durch eine modifizierte Anastomose nach Billroth (II) zwischen Magenrest und einer Jejunumschlinge wieder hergestellt. Zusätzlich werden an der blind endenden Darmschlinge biliodigestive- und pancreaticodigestive Anastomosen gebildet.

In der pyloruserhaltend modifizierten Operation nach Kausch-Whipple wird, im Gegensatz zur klassischen Operation, der Magen belassen und die Anastomosierung erfolgt mit einer „end-to-side“ Anastomose zwischen Pylorus und Jejunum. Die biliodigestive- und pancreaticodigestive Anastomose erfolgt an der blind endenden Jejunumschlinge.

Leider befinden sich zum Diagnosezeitpunkt nur 15-35% der Tumore in einem resektablen Stadium und daher entziehen sich die meisten Tumore einer kurativen Therapie (Gebhardt et al., 2003; Camacho et al., 2005).

Trotz der Schwere des Eingriffes konnte die perioperative Sterblichkeitsrate in großen Zentren durch Optimierung der Operationstechnik auf unter 5% gesenkt werden (Yeo et al., 1997; Buchler et al., 2003). Zu den palliativen Therapieverfahren zählen die Strahlentherapie und die Chemotherapie, wobei sich bei letzterem Gemcitabin als Therapiestandard durchgesetzt hat. Beide Verfahren werden auch in Kombination mit der chirurgischen Resektion in einem adjuvanten und neoadjuvanten Vorgehen verwendet (Scheithauer et al., 1999; Oettle und Neuhaus, 2007).

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Software

Die hier vorliegende Arbeit wurde mit TeXShop für Macintosh, einer L^AT_EX-Anwendung, gesetzt (General Public License, entwickelt von Richard Koch). Für die statistischen Auswertungen und einen Teil der Abbildungen verwendete ich die Software „Prism 5.0 for Mac“ der Firma GraphPad. Andere Grafiken und Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme Photoshop CS3 und Illustrator CS3 von Adobe erstellt. Für die Zitationen benutzte ich das unter General Public License stehende Programm JabRef, Version 2.4.2.

2.1.2 Materialien zu den Versuchen der Lymphangiogenese

2.1.2.1 Untersuchte Zelllinien und verwendete Zellmedien

V54/2

Die humane Zelllinie V54/2 wurde 2002 durch Conrad et al. etabliert (Conrad et al., 2002). Hier ist zur Vervollständigung die genaue Methode dargelegt.

Nach Gabe von granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) an einen gesunden Stammzellspender wurde diesem peripheres Blut abgenommen und der Ficoll Gradient, der die mononukleären Zellen des Blutes darstellt, isoliert. Nach CD6-Depletion und gründlichem Waschen mit PBS und Thrombowash wurden die Zellen für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Aus dem resuspendierten Überstand wurden 2×10^7 Zellen in fibronectinbeschichtete Zellkulturflaschen gegeben. Dem Zellmedium RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe) mit HEPES und 15% inaktiviertem Kälberserum (PAN-Systems, Nürnberg) wurde eine Mischung an Interleukinen hinzu gegeben: 10 ng/ml IL-1 β (Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA), 100 ng/ml IL-3 (Sandoz, Basel, CH), 10 ng/ml IL-6 (Genzyme), 1 ng/ml IL-7 (Boehringer Mannheim), 10 ng/ml IL-8 (Boehringer Mannheim) und 10 ng/ml IL-11 (Becton Dickinson). Die adhären

wachsenden, fibroblastenartigen Zellen wurden anschließend mit SV40 large-T Antigen immortalisiert. Hierzu wurden sie mit 5 μ l pUC IN-1 wt DNA (Superfect® Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in Verdünnungsreihen geklont und subgeklont sowie ihre Klonalität mittels der Einzigartigkeit der Inserierungsstelle des large-T-Antigens sichergestellt. Auf diese Weise konnte die Arbeitsgruppe um Conrad den Zellklon V54/2 etablieren. Ferner konnte Conrad der Zellreihe V54/2, nach Ermittlung der Oberflächenmarker und Beobachtung der biologischen Eigenschaften, mesenchymale Charakteristika nachweisen. So zeigten sich die Zellen positiv für den mesenchymalen Marker CD105, jedoch negativ für die leukozytären und monozytären Marker CD14, CD45 und HLA-DR. Außerdem zeigte V54/2 eine enorme Plastizität, die der von mesenchymalen Stammzellen ähnelt (Conrad, 2004).

Mesenchymale Stammzellen der Balb/c

Die mesenchymalen Stammzellen der Balb/c Maus wurden nach Beschreibung von Thalmeier et al. isoliert (Thalmeier et al., 1996). Die Etablierung dieser Stammzellreihe wurde von Herrn Prof. Huss durchgeführt. Hier ist ebenfalls die Methode der Vollständigkeit halber aufgeführt. Knochenmarksaspirat wurde von einer drei Monate alten Balb/c Maus gewonnen und nach oben beschriebener Methode wurden die mononukleären Zellen isoliert. Die weiterführenden Schritte der Stammzelletablierung sind dieselben, wie bei der oben beschriebenen Isolierung von V54/2. Huss et al. immortalisierten die Zellen ebenfalls mit SV40 und klonierten sie durch Verdünnungsreihen. Eine anschließende Charakterisierung zeigte mesenchymalen Phänotyp und Differenzierungspotential.

Lymphendothelzellen

Lymphendothelzellen wurden unter Modifikation der von Kriehuber et al. beschriebenen Methode aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) isoliert (Kriehuber et al., 2001). Hierzu ließen wir HDMEC (PromoCell, Heidelberg, Deutschland, Kat. Nr. C-12210) über 3-4 Zellpassagen in NUNClon 80 cm²-, bzw. 175 cm²-Zellkulturflaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark, Kat. Nr. 178905, bzw. 178883) mit „Endothelial Growth Medium MV“ (PromoCell) wachsen. Nach Verwerfung des gebrauchten Mediums und Spülung mit Hepes BSS wurden anschließend die adhärennten Zellen mittels fünfminütiger Zugabe von 5 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst und danach das Trypsin mit der entsprechenden Menge an „Trypsin Neutralizing Solution“ neutralisiert. Trypsin, Hepes BSS und die Trypsin Neutralizing Solution sind Teil des „Detach Kit-125“ von PromoCell (Kat. Nr. C-41210). Anschließend wurden die Zellen in „FalconTM Conical Tubes“ (50 ml, Becton Dickenson, Kat. Nr. 352070) zentrifugiert und in Hepes BSS resuspendiert. Daraufhin inkubierten wir die Zellen für eine Stunde mit einem biotinylierten Antikörper gegen VEGFR-3/Flt4 (R&D Systems, Minneapolis, Kat. Nr. BAM3492) und anschließend mit „Streptavidin-MicroBeads“ (Kat. Nr. 130-048-

101). Die so markierten Lymphendothelzellen konnten nun mit einem „MiniMACS-Magneten“ (Kat. Nr. 130-090-312) und „MS columns“ (Kat. Nr. 130-042-201, beides von Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) von den Blutendothelzellen getrennt werden und in Kultur gegeben werden. Hierfür verwendeten wir wiederum „Endothelial Growth Medium MV“ der Firma PromoCell. Die Reinheit der Lymphendothelzellen wurde mittels Durchflußzytometrie nach Verwendung eines murinen Antikörpers gegen humanes Podoplanin (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland, Kat. Nr. NB100-57407) und eines Zweitantikörpers gegen murines IgG1 (Becton Dickenson, Kat. Nr. 340270) ermittelt; sie betrug $> 95\%$.

Zellmedium und Konditionierungsmedium

Alle verwendeten Stammzelllinien wurden in RPMI 1640 (PromoCell, Kat. Nr. C-76010) mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Lot Nr. 923 FF), 1% L-Glutamine (Gibco Invitrogen, Kat. Nr. 25030-024) und 1% Gentamycin (PromoCell, Kat. Nr. C-42060) gehalten. HDMEC und LEC wuchsen in „Endothelial Cell Growth Medium MV“ (PromoCell, Kat. Nr. C-22010). Diesem Medium wurde nach Herstellerangaben der „Supplement Mix“ (PromoCell, Kat. Nr. C-39225) zugegeben. Die entstandene Lösung enthielt so laut Hersteller: Endothelial Cell Growth Supplement-H 0.4%, FCS 5 %, Epidermal Growth Factor 10 ng/ml und Hydrokortison 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In den Konditionierungsversuchen wurde der humane, VEGFR-3-spezifische Ligand VEGF-C (Cys156Ser) (R&D Systems, Kat. Nr. 752-VC-025) und VEGF-C der Ratte (Milentyi Biotech, Kat. Nr. 130-094-092) verwendet. Der Überstand von HDMEC und LEC wurde vor der Zugabe zu den Stammzellen mit einem 0,2 μm Spritzenvorsatzfilter von Sartorius (Göttingen, Kat. Nr. 16532K) steril filtriert.

2.1.2.2 Durchflußzytometrie

Für die Versuche mittels Durchflußzytometrie benutzten wir den „Fluorescent Activated Cell Scan (FACScan)“ von Becton Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA, USA). Der verwendete FACS-Puffer, ebenfalls von Becton Dickinson Immunocytometry Systems, ist aus PBS, 2% fetalem Kälberserum und 0.05% Natriumacid (Kat. Nr. 342003) zusammengesetzt. Die Antikörper gegen Podoplanin, VEGFR-2 und VEGFR-3 stammen von BD Pharmingen. Der Antikörper gegen humanes CCR7 wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. E. Kremmer zur Verfügung gestellt. Zur Datenanalyse wurde CellQuestTM Version 3.2.1f1. von BD Biosciences benutzt.

2.1.2.3 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung von RNA aus den untersuchten Zellen wurde das „RNeasy Mini Kit (50)“ der Firma Qiagen aus Hilden, Deutschland verwendet (Kat. Nr. 74104). Zur Pufferung wurden

die im Set enthaltenen RNA-Lysis-and-Tissue-Puffer (RLT-Puffer, Kat. Nr. 79216), RPE-Puffer und RW1-Puffer gebraucht. Zudem wurde dem RLT-Puffer nach Herstellervorgaben β -Mercaptoethanol (Firma Sigma, Kat. Nr. M6250) zugegeben. Die Homogenisierung der RNA erfolgte mittels des „QIAshredders“ (50), ebenfalls von der Firma Qiagen (Kat. Nr. 79654). Das „DNA-free DNase kit“ stammt von der Firma Ambion (Austin, TX, USA, Kat. Nr. AM1906).

2.1.2.4 RT-PCR

Zur Umschreibung der mRNA in cDNA wurde die moloney-Murine Leukämie Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT, Kat. Nr. M1701) mit dem zugehörigen 5x Puffer, sowie desoxy-Nukleotidtriphosphate (Kat. Nr. C1141) und RNasin® Ribonuklease-Inhibitor (Kat. Nr. N2111, alles von der Firma Promega aus Madison, WI, USA) verwendet. Die Oligo(dT)₁₅-Primer stammen von der Firma Roche (Kat. Nr. 10814270001). Für die PCR wurde die rekombinante Taq DNA Polymerase (Kat. Nr. R001A) mit dazugehörigem 10x Puffer und desoxy-Nukleotidtriphosphat-Mix der Firma TaKaRa (Shiga, Japan) eingesetzt. Die verwendeten Primer für die untersuchten murinen Gene Podoplanin, Prox-1 und VEGFR-3 wurden bei der Firma Thermo-Electron (Ulm, Deutschland) bestellt und hatten folgende Sequenzen:

Podoplanin:	forward 5'- CGC TCT CTC TGC GTT GGT A -3'
	reverse 5'- ATG TGG ACC GTG CCA GTG T -3'
VEGFR-3 /FLT-4	forward 5'- CCT TGA CCA TTG GAA CTC C -3'
	reverse 5'- CCA ATC TCT TCG TCG TGC A -3'
Prox-1:	forward: 5'- GGC AGA GAC CTT AAA ACA GG - 3'
	reverse: 5'- GAC TCT GAA ATG GAT AAG CCA -3'

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Biometra® „Personal Cycler“ (Kat. Nr. 050-550) durchgeführt. Als „DNA-Leiter“ diente der „DNA Molecular Weight Marker V“ der Firma Roche (Kat. Nr. 821705). Zudem kam Bromphenolblau und Ethidiumbromid der Firma Sigma zur Verwendung.

2.1.2.5 Taqman® quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die Reagenzien der Reverse Transkriptase-Reaktion, die der Taqman® PCR vorausgeht waren von folgenden Herstellern:

- die Reverse Transkriptase „SuperScriptTM“ stammte von Invitrogen, Carlsbad;
- der Nukleotidtriphosphatmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (25 mM) stammte von Qiagen, Hilden;
- die Hexamernukleotide in zufälligen Sequenzen (10x) bezogen wir von Roche, Mannheim;
- der RNAsin Ribonuklease Inhibitor war von Promega, Madison;
- das Acrylamid entstammte der Firma Roth, Karlsruhe.

Die quantitative RT-PCR wurde mit Hilfe eines „TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System“ und der hitzeaktivierten Taq DNA Polymerase (Amplitaq Gold) durchgeführt (beides von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die „96-well Optical Reaction Plate“ stammte, ebenso wie der „Taqman® Universal Mastermix“ und die sequenzspezifischen Oligonukleotide für CCR7 mit dazugehörigen Taqman Fluoreszenzsonden, von Applied Biosystems.

2.1.2.6 Migration-Assay

Die verwendeten „FlouroBlockTM 8 μ m 96 well“ Migrationsplatten stammten von Becton Dickinson (Kat. Nr. 351164). Der Farbstoff Calcein wurde von Molecular Probes, Invitrogen (Kat. Nr. C-3099) bereitgestellt. Als Kontrollzellen wurden HT 1080 (Fibrosarkomzellen) verwendet. Das Assay-Medium in der oberen Kammer bestand aus RPMI 1640 + 0,1% BSA (serumfrei) + 10 mM HEPES. Das humane VEGF-C für das Versuchsassay und die Konditionierung stammt von R&D Systems, Kat. Nr. 2179-VC. Die untersuchten Zellen waren die humane mesenchymale Stammzelllinie V54/2, unbehandelt, bzw. mit humanem VEGF-C (R&D Systems) vorbehandelt. Ausgelesen wurde mittels „TECAN GENios Plus ELISA reader“ (TECAN, Grödig, Österreich) mit dazugehöriger „XFluor 4“ Software (TECAN).

2.1.2.7 Murines Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese

Verwendet wurden C57Black/6 Mäuse, sowohl männlichen, als auch weiblichen Geschlechts im Alter von ca. 8 Wochen. Die Tierversuche fanden unter Zustimmung der Tierschutzkommission des Freistaates Bayern statt (Az. 55.2-1-54-2531-135-06). Das verwendete Operationsmikroskop stammt von Zeiss, Jena. Die Lymphgefäßanfärbung am Mausschwanz erfolgte mit Methylthioniniumchlorid (Methylenblau Vitis® 1%, Neopharma, Berlin). Zur Verwendung kamen Skalpelle N° 11 mit Griff der Firma Feather Safety Razor (Japan, Kat. Nr. EF7281A).

2.1.2.8 Immunhistochemie

Die zur Entparafinisierung verwendeten Chemikalien Xylol (Kat. Nr. A0663) und Ethanol (Kat. Nr. A1613) wurden von Appllichem, Darmstadt hergestellt. Von der Firma Dako aus

Hamburg wurden der Proteinblocker (X 0909) und das hintergrundreduzierende Antikörper-Verdünnungsmedium (Kat. Nr. S3022) verwendet. Der TRIS-Puffer wurde aus den Einzelkomponenten TRIZMA Base (Kat. Nr. T-1503), TRIZMA Hydrochlorid (Kat. Nr. T-3253) der Firma Sigma und Natrium Chlorid (Kat. Nr. 1.06404.1000) der Firma Merck aus Darmstadt gemischt. Von Merck stammten zudem die „Kaisers Glyceringelatine“ (Kat. Nr. 1.09242.0100) und die Brij® 35-Lösung (30%, Kat. Nr. 1.01894.1000). Das Wasserstoffperoxyd wurde von der Firma Fluka, (Hannover, Kat. Nr. 95313) bezogen.

Zur primären Antigenmarkierung wurden die Antikörper anti-GFP von Abcam (Kat. Nr. Ab6673) und anti-Podoplanin von Acris Antibodies (Hiddenhausen, Kat. Nr. DM3501) angewandt. Der anti-GFP Antikörper entstammte der Ziege und wurde daher mit Hilfe des, in dem „Vectastain ABC elite goat kits“ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA, Kat. Nr. PK6105) enthaltenen, Sekundärantikörpers markiert. Der anti-Podoplanin Antikörper entstammte einem Hamster als Wirtstier und bedurfte daher zur Markierung des „Vectastain ABC elite standard kits“ von Vector Labs (Kat. Nr. PK6100). Die Antigendemarkierung erfolgte bei der anti-Podoplaninfärbung mittels saurem Pepsin der Firma Sigma (Kat. Nr. P6887) und bei der anti-GFP-Färbung mittels TRS6 der Firma Dako (Kat. Nr. S 1699).

2.1.3 Materialien der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgenherapie des Pankreaskarzinoms

2.1.3.1 Verwendete Zelllinien und Erläuterung der Genkonstrukte

p53^{-/-} C57BL/6 Mesenchymale Stammzelllinie

Diese Stammzelllinie wurden uns freundlicherweise von Dr. Christoph Klein zur Verfügung gestellt. Die Stammzelllinie entstammt dem Knochenmark einer p53^{-/-} C57Black/6 knock-out Maus (Jacks et al., 1994). Mäuse mit einem homozygoten p53-knock-out sind überlebensfähig, entwickeln jedoch solide Tumore in einer hohen Rate im Alter von ca. 8 Monaten (Zambetti et al., 2006).

Die Isolation der mesenchymalen Stammzellen erfolgte aus den adhärent wachsenden, fibroblastenartigen Zellen des Knochenmarkaspirats. Die Isolierung und Klonierung wurde auf dieselbe Art, wie unter 2.1.2.1 auf Seite 33 beschrieben, durchgeführt. Eine Immortalisierung mittels SV40 war aufgrund des p53^{-/-} knock-outs nicht mehr nötig. Die klonalen mesenchymalen Stammzellen dieser Maus zeigen in Zellkultur ein uneingeschränktes, undifferenziertes Wachstum bis in hohe Passagen.

Die nun folgend beschriebenen, gentechnisch modifizierten mesenchymalen Stammzelllinien wurden alle von Dr. Peter J. Nelson hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vollständigkeit halber ist hier ihre Herstellung beschrieben.

C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺

Die oben beschriebene mesenchymale Stammzelllinie *p53^{-/-}* wurde stabil mit dem „green fluorescent protein (GFP)“ mittels non-retroviralem Gentransfer transfiziert. GFP stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und absorbiert Licht maximal bei 400nm Wellenlänge und emittiert grüne Fluoreszenz einer Wellenlänge von 508 nm (Morise et al., 1974). Die Zellen sind somit unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/TK⁺

Diese mesenchymale Stammzelllinie wurde gentechnisch so modifiziert, dass sie das Suizid-Gen *Thymidinkinase* des Herpes simplex Virus (HSV-*TK*) exprimieren kann. Es gilt jedoch hervorzuheben, dass die HSV-*TK* nur unter Kontrolle des gefäßspezifischen Promotors *Tie2* exprimiert wird. *Tie2* ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor für Angiotensin I und II auf Endothelzellen und Perizyten und ist für die koordinierte und gerichtete Blutgefäßentstehung und -heranreifung unerlässlich (Dumont et al., 1994). Für mehr Informationen zum Angiotensin-1/*Tie2*-System, siehe Kapitel 1.4 auf Seite 26.

Die therapeutische Implikation des Genkonstrukts ist folgende: kommt es nach Rekrutierung und Integration der transplantierten mesenchymalen Stammzelle in das Gefäßsystem des wachsenden Tumors, so folgt daraufhin die Differenzierung der Zelle zu einer „Gefäßzelle“ (Endothelzelle oder Perizyte). Die Differenzierung ist mit einer Hochregulation bestimmter angiogenesespezifischer Gene verbunden, zu denen unter anderem auch das Gen für den *Tie2*-Rezeptor gehört. Über den *Tie2*-Promoter wird dann die HSV-*TK* abgelesen und exprimiert (siehe Abb. 2.1 auf der nächsten Seite).

In einem adulten Säugetier mit alleiniger Tumorerkrankung findet, abgesehen von der Angiogenese im Rahmen des Menstruationszyklus und der Wundheilung, neben der Tumorangiogenese keine Angiogenese statt. Das angiogenetische Potenzial des Menstruationszyklus und der Wundheilung ist im Vergleich zur Tumorangiogenese relativ gering.

Daher ist unsere Hypothese, dass das Genkonstrukt nur in den an der Tumorangiogenese beteiligten Stammzellen „angeschaltet“ wird. Dies ermöglicht eine systemische Therapie mit der „Prodrug“ Ganciclovir (GCV), das im nativen Zustand keine apoptotische Wirkung auf Säugetierzellen hat. Wird es jedoch von der HSV-*TK* dreifach phosphoryliert, so nimmt es als GCV-Triphosphat die Struktur eines Analogons von dGTP an und hemmt so den Einbau von dGTP in den wachsenden Strang durch die DNA-Polymerase und führt infolgedessen zum Strangabbruch (Mesnil und Yamasaki, 2000; Frank et al., 1984). Der dadurch in den betroffenen Zellen ausgelöste Zelltod ist von apoptotischer Natur und unabhängig von der *p53*-Signalkaskade (Wallace et al., 1996; Hamel et al., 1996).

Durch den „Bystander Effekt“ kommt es zudem in den benachbarten Zellen ebenfalls zur Apoptose und – vorausgesetzt dies findet im Tumorgebiet statt – demzufolge zum Absterben

von Tumorzellen (Freeman et al., 1993). Da GCV eine 1000fach höhere Affinität zur HSV-*Tk* im Vergleich zur eukaryonten *Tk* hat, wird es praktisch nur in den transfizierten Zellen phosphoryliert und besitzt keinen generell zytotoxischen Effekt (Oliver et al., 1985). Bei optimaler Funktion des beschriebenen Konstrukts wird GCV also nicht in transplantierten Zellen mit Genkonstrukt phosphoryliert, die keine Aktivierung des Tie2-Systems erfahren haben, also kein „Homing“ in die Angiogenese des Tumors vollzogen haben.

Außer dem „therapeutischen“ Abschnitt Tie2/TK enthält das Genkonstrukt zudem *BsrS2*, ein Resistenzgen gegen den Translationsinhibitor Blastocidin. *BsrS2* kodiert für eine Blastocidin-Deaminase, die Blastocidin deaktivieren kann (Izumi et al., 1991). Da *BsrS2* in diesem Konstrukt unter Kontrolle des ständig aktivierten CMV- und EM7-Promoters exprimiert wird, sind alle erfolgreich transfizierten Zellen resistent gegen Blastocidin. Wenn nun Blastocidin zur Zellkultur hinzu gegeben wird, gehen nahezu alle nicht erfolgreich transfizierten Zellen in Apoptose; durch diese Positivselektion wird eine Transfektionsrate von annähernd 100% erreicht.

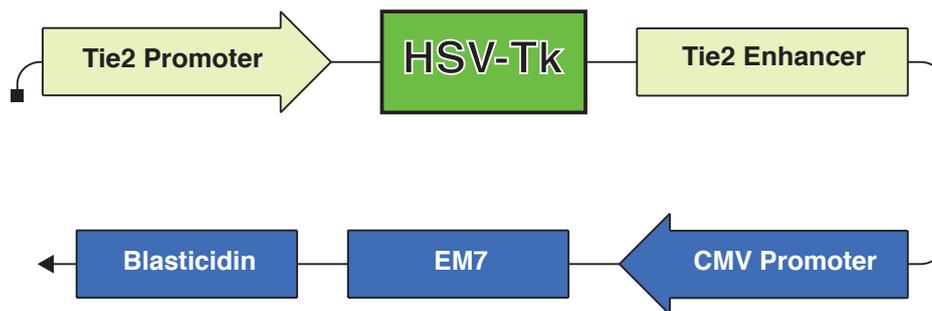


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Genkonstrukts der C57BL/6 $p53^{-/-}$ Tie2/*Tk*⁺ mesenchymalen Stammzellen

C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺

Diese Zelllinie wurde ebenfalls gentechnisch modifiziert und trägt prinzipiell das gleiche Genkonstrukt wie die oben beschriebene Zelllinie C57BL/6 $p53^{-/-}$ Tie2/TK⁺. Es wurde jedoch statt der Sequenz der HSV-TK die DNA-Sequenz des „red fluorescent protein“ (RFP) als so genanntes „Reportersystem“ inseriert. So verlieren die Zellen zwar ihre therapeutische Wirkung, können jedoch mittels Fluoreszenzmikroskopie als rot fluoreszierende Zellen detektiert werden. So kann das „angeschaltete“ Genkonstrukt im Tumor dargestellt werden. C57BL/6 $p53^{-/-}$ Tie2/RFP⁺ tragen zudem das oben beschriebene Bsr2/Blasticidin-Resistenzgen (siehe Abb. 2.2 auf der nächsten Seite)

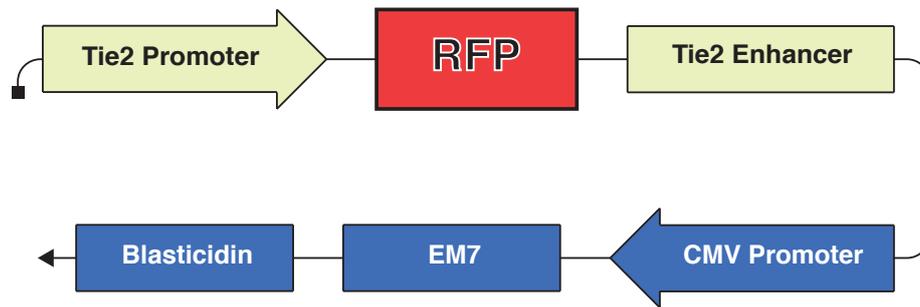


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Genkonstrukts der C57BL/6 $p53^{-/-}$ Tie2/RFP⁺ mesenchymalen Stammzellen

2.1.3.2 Migration-Assay

Fluoreszenzplatten, -reader und -software sind die gleichen wie unter 2.1.2.6 auf Seite 37 beschrieben. Als Migrationsanreiz wurde Überstand von in Kultur befindlichen Panc02-Pankreaskarzinomzellen verwendet.

2.1.3.3 Murines Orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom

Für dieses Tiermodell wurden C57Black/6-Mäuse verwendet. Die syngene Pankreastumorzelllinie Panc02 wurde uns freundlicherweise von Dr. Christian Bauer zur Verfügung gestellt. Die Spritzen (Insulinspritzen, 1ml) und Injektionsnadeln (30 G) stammen von BD Biosciences (Spanien). Die manuelle Spritzenpumpe stammt von der Hamilton Syringe Company, USA. Das Cutasept® F stammt von Bode Chemie, Hamburg, die Wattebäusche von NOBA Verbandmittel GmbH. Prolene 4-0 wurde von der Braun AG (Melsungen) bestellt.

Für die Narkose wurden folgende Medikamente gebraucht:

- Atropinsulfat der Firma Braun (Melsungen),
- Ketavet® der Firma Pfizer Pharmacia (Karlsruhe),
- und Xylazin (Rompun®) der Bayer AG (Leverkusen).

Vor der intravenösen Stammzellinjektion wurde ein „Falcon™ Cell Strainer“ mit einer Porengröße von $100\mu m$ der Firma Becton Dickinson (Kat. Nr. 352360) verwendet. Die Tierexperimente erfolgten unter Zustimmung der Tierschutzkommission des Freistaates Bayern (Az. 55.2-1-2531-50-07).

2.1.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Verwendet wurde Tissue-Tek O.C.T.® der Firma Miles Inc. (Elkhart, IN, USA, Kat. Nr. 4583), ein Kryotom der Firma Leica und „VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium with

DAPI“ der Firma Vector Labs (Kat. Nr. H-1500). Zur Betrachtung der Präparate wurde ein Aufricht-Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 der Firma Zeiss (Göttingen) verwendet und mit der AxioCam MR (ebenfalls von Zeiss) abfotografiert. Die Bilder wurden schließlich mit der Software Photoshop (CS3, Adobe Systems Inc., USA) bearbeitet.

2.1.3.5 Immunhistochemie

Alle verwendeten Chemikalien zur Entparafinisierung und Fixierung der histologischen Schnittpräparate waren dieselben wie unter 2.1.2.8 auf Seite 37 beschrieben. Der Primärantikörper anti-RFP wurde von MBL International (Woburn, MA, USA, Kat. Nr. PM005) bestellt und entstammt einem Hasen als Wirtstier. Der mit „Horseradish-peroxidase (HRP)“-Polymeren konjugierte Sekundärantikörper gegen Hamster IgG stammt aus dem „SuperPicTure® Kit (DAB, rabbit)“ von Invitrogen (Kat. Nr. 87-9263). Ebenfalls von Invitrogen stammt das Chromogen AEC (3-Amino, 9-Ethyl Carbazol) (Kat. Nr. 00-1122). Das Protex II wurde von der Firma Quartett aus Berlin, mit Katalognummer 401600292 bereitgestellt. Wir bezogen das Hematoxylin von der Firma Vector Labs aus Burlingame, CA, USA (Kat. Nr. H3401).

2.1.3.6 Taqman® quantitative Polymerase Kettenreaktion

Alle verwendeten Materialien stimmen mit den unter 2.1.1.5 beschriebenen Materialien überein. Die für RFP spezifischen Oligonukleotide wurden ebenfalls von Applied Biosystems bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Versuche zur Lymphangiogenese

2.2.1.1 Konditionierung der mesenchymalen Stammzellen *in vitro*

Zur Untersuchung des Differenzierungspotentials der untersuchten Stammzelllinien V54/2 (human) und Balb/c (murin), wurden sie mit verschiedenen Faktoren *in vitro* kokultiviert.

Der für die Stammzellen der Balb/c verwendete Versuchsansatz sah folgende Versuchsgruppen vor:

- Gruppe 1: Kontrollgruppe, keine Zugabe von Faktoren
- Gruppe 2: Zugabe von Ratten-VEGF-C 100 ng/ml
- Gruppe 3: Zugabe von humanem VEGF-C (C156S) 100 ng/ml
- Gruppe 4: Zugabe von 20% mikrofiltriertem Überstand von in Kultur befindlichen HD-MEC
- Gruppe 5: Zugabe von 20% reinem Endothelzellmedium

Die Kokultivierung startete bei Zellpassage 10 und wurde über fünf Wochen bis Passage 24 fortgeführt. Die adhärenen Zellen wurden bei 70% konfluentem Wachstum nach vorheriger Verwerfung des Mediums und der darin befindlichen, nicht-adhärenen Zellen und Spülung mit 3 ml PBS durch Zugabe von drei Millilitern Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% vom Kulturflaschenboden gelöst. Nach drei Minuten im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und mikroskopischer Kontrolle der Ablösung wurde die Reaktion mit 6 ml RPMI 1640 + 10% FCS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml FalconTM-Tube für drei Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nach Bedarf im Verhältnis 1:5, bzw. bei hoher Zellzahl im Verhältnis 1:10 durch Aufnahme mit frischem Kulturmedium und Zuführung in neue Kulturflaschen passagiert.

Bei jedem Wechsel des Kulturmediums, bzw. bei jeder Passagierung der Zellen wurden die oben genannten Faktoren in den Konzentrationen 100 ng/ml für VEGF-C bzw. 20% für Endothelzellmediumüberstand zugefügt. Die Zellpassagierung und Faktorenzugabe wurde durchschnittlich 2-3 Mal pro Woche durchgeführt. Die Konzentrationen des VEGF-C und VEGF-C (Cys156Ser) von 100 ng/ml wurde entsprechend der von Mäkinen et al. untersuchten Rezeptoraktivität von VEGF-C am VEGFR-3 gewählt (Mäkinen et al., 2001b).

Der gleiche Versuchsplan wurde an der humanen Stammzelllinie V54/2 angewandt. Jedoch wurde anstatt der Gruppe „Ratten-VEGF-C“ eine Gruppe mit Überstand von isolierten, in Kultur befindlichen Lymphendothelzellen (LEC) kultiviert.

2.2.1.2 Morphologische Untersuchung

Die humane Stammzelllinie V54/2 wurde am Ende des Konditionierungsversuchs, der unter Kapitel 2.2.1.1 auf der vorherigen Seite beschrieben ist, auf morphologische Veränderungen im Phasenkontrastmikroskop bei 50-facher Vergrößerung untersucht. Hierzu wurden die Zellen in ihren Zellkulturflaschen belassen und ungefärbt betrachtet.

2.2.1.3 Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell scan, FACS)

Mittels FACS-Analyse lässt sich eine Zellpopulation durch die Analyse bestimmter Oberflächenmoleküle in verschiedene Untergruppen aufteilen. Um dies zu erreichen, müssen die Zellen vorher mit einem entsprechenden Antikörper, der auf das gesuchte Antigen reagiert, markiert werden und dieser wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert werden.

Im ersten Schritt wurden die Zellen im sog. forwardscatter auf ihre Größe und im sog. side-wardscatter auf ihre Granularität hin untersucht. Um eine Ergebnisverfälschung zu vermeiden kann durch die Festlegung von Gates Zelldetritus von der FACS-Analyse ausgeschlossen werden.

In der anschließenden FACS-Analyse wurden die Zellen einzeln auf die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes untersucht und jede Zelle durch die Software entsprechend in einen so genannten „Dotplot“ aufgetragen. Es können auf diese Weise zwei verschiedene Farbkanäle untersucht werden, die dann auf Abszisse und Ordinate des Dotplots abgebildet werden und jeweils verschiedene Oberflächenmarker repräsentieren.

In unseren Versuchen untersuchten wir die humane, mesenchymale Stammzelllinie V54/2 auf die Oberflächenmarker Podoplanin, VEGFR-2, VEGFR-3 und CCR7. Zur Positivkontrolle verwendeten wir HDMEC, da wir nicht über ausreichend LEC als besser geeignete Positivkontrolle verfügten. Als „Negativkontrolle“ verwendeten wir unkonditionierte V54/2. Durch die Positiv- und Negativkontrollen ist es möglich, die Gates für einen positiven Ausschlag auf Abszisse und Ordinate festzulegen. Auf die konditionierten Zellen angewendet, können die Gates so die Zellpopulation z.B. in VEGFR-3⁺ und VEGFR-3⁻ Subpopulationen unter Angabe der prozentualen Anteile unterscheiden.

2.2.1.4 RNA Isolierung

Die Zellen wurden mittels Trypsin aus den Zellkulturflaschen gelöst und zu einem Pellet zentrifugiert. Nach Verwerfung des flüssigen Überstandes wurde das Pellet mit 700 μ l des β -Mercaptoethanol/RLT-Puffer Gemisches resuspendiert und mit einer Insulinspritze vorsichtig homogenisiert.

Im nächsten Schritt wurden die Suspensionen in jeweils eine Shredder-Sonde gegeben und für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Verwerfung des oberen Filterteils wurde durch die Zugabe von 700 μl Ethanol 70% pro Probengefäß die DNA und RNA ausgefällt. Die Lösung wurde nun in die „RNeasy Mini Spin Columns“ gegeben und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Die flüssige Phase am Säulenboden wurde verworfen und der Filter in ein neues Gefäß gegeben. In jeden Filter wurden nun 700 μl des RW1-Puffers gefüllt und erneut bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Wieder wurde die Flüssigkeit verworfen und der Filter auf eine neue Säule gesetzt. Im nächsten Schritt wurden 500 μl RPE-Puffer in jeden Filter gegeben und wiederum bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend der Filter für zwei Minuten trocken zentrifugiert. Wieder wurde der Filter auf eine unbenutzte Säule gesetzt und diesmal 50 μl RNase freies Wasser zupipettiert, in dem sich das DNA/RNA Gemisch in fünf Minuten auflöste. Erneut wurden die Proben für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Daraufhin wurde die DNA mit Hilfe der DNase eliminiert. Dafür mischten wir den DNA/RNA Gemischen jeweils 5 μl DNase1-Puffer (10x) bei. Anschließend wurde jeder Probe 1 μl DNase (2 Units) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 5 μl „DNase Inactivation Buffer“ (10x) beigemischt, um die DNase-Reaktion zu stoppen. Nach Vortex-Benutzung und zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die ausgefällte DNA bei 8000 x g abzentrifugiert. Sie setzte sich als Pellet am Boden des Behälters ab. Die RNA befand sich in der flüssigen Phase. Als Nächstes wurde die Gesamtmenge und RNA-Konzentration mittels optischer Dichtemessung bestimmt. Hierzu wurde das Gesamtvolumen der einzelnen Proben gemessen und 2 μl RNA jeder Probe mit 98 μl Wasser gemischt und anschließend photometrisch die RNA-Konzentration gemessen. Durch Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der einzelnen Proben ließ sich so die Gesamtmenge isolierter RNA errechnen.

2.2.1.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mittels der RT-PCR lassen sich Gene auf RNA-Strängen amplifizieren und anschließend durch Gel-Elektrophorese optisch darstellen.

Zu diesem Zweck musste die RNA zuerst mit Hilfe der reversen Transkriptase des MMLV-Virus in cDNA umgeschrieben werden. Durch die Verwendung von Poly-dT-Primern ließ sich spezifisch die messenger RNA (mRNA) umschreiben, da die Primer nur am Poly-A-Schwanz der mRNA ansetzen können. Die RT-PCR von mRNA bringt speziell die aktivierten Genabschnitte zum Ausdruck, da mRNA das Translationsprodukt der DNA in der Säugetierzelle darstellt. Zur Umschreibung wurden pro Probengefäß 1 μl dNTPs, 2 μl des 5x Puffers, 1 μl Oligo-dTs, 0,25 μl RNasin und 0,5 μl MMLV gegeben. Im nächsten Schritt wurden 0,5 μg der jeweiligen RNA in 5,5 μl RNase freiem Wasser verdünnt und in die Probengefäße gegeben.

Nun wurde die Mischung zur Umschreibung für eine Stunde bei 42 °C im Personal Cycler® der Firma Biometra inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die „klassische“ PCR (Mullis et al., 1986). Sie wurde durch die Hitze beständige DNA-Polymerase Taq als Enzym der DNA-Replikation vollzogen.

Die drei Einzelschritte eines PCR-Zyklus haben folgendes Ziel: zuerst erfolgt die Aufschmelzung des Doppelstranges bei Temperaturen >90 °C um die Primeranlagerung zu ermöglichen. Diese Primer sind spezifisch auf die Sequenz des gesuchten Gens abgestimmt und binden dieses durch ihre komplementäre Basensequenz. Es wird sowohl ein Primer für das 5'- und das 3'- Ende des gesuchten Gens verwendet, denn so kann die Elongation in beide Richtungen vollzogen werden. Die Primer lagern sich in Abhängigkeit ihrer Länge und ihrer Basenzusammensetzung bei Temperaturen um 60 °C an. Diese sog. „Annealing“-Phase stellt den zweiten Schritt eines PCR-Zyklus dar. Je nach verwendeter Taq wird nun die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms gebracht, und der Elongationsschritt, der dritte und letzte Schritt eines PCR-Zyklus, wird vollzogen. Durch die Wiederholung dieser Zyklen wird das gesuchte Gen, soweit vorhanden, um ein Vielfaches multipliziert und kann dadurch, nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarose-Gel, sichtbar gemacht werden.

In unseren Untersuchungen wurde für die PCR pro Probe ein Mastermix mit folgendem Inhalt angelegt: 1,25µl 10x Puffer, 8,5µl Wasser, 0,1µl dNTPs, je 0,05µl des entsprechenden forward und reverse Primers, 0,05µl der Taq-Polymerase. Diesem Mastermix wurden pro Versuchsansatz 2,5µl der vorher synthetisierten cDNA bzw. Wasser als Negativkontrolle beigegeben und in ein dünnwandiges Probegefäß gefüllt. Im programmierten Cycler wurde nun die Polymerase Kettenreaktion nach oben beschriebenem Prinzip automatisiert durchgeführt. Genauer gesagt erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt von 95 °C für 3 Minuten. Anschließend wurde 35x der folgende Zyklus vollzogen: 30 Sekunden Denaturierung des Doppelstranges bei 95 °C, 30 Sekunden Primeranlagerung bei 60 °C und eine Minute Elongation durch die Taq-Polymerase bei 72 °C. Zum Schluss wurde ein weiterer Elongationsschritt bei 72 °C für 10 Minuten durchgeführt. Das Herunterkühlen der Proben auf 4°C stoppte schließlich die Reaktion.

Nun konnten die einzelnen Proben, nach Anfärbung mit Bromphenolblau, auf ein ethidiumbromidhaltiges, 1,8-prozentiges Agarose-Gel aufgetragen werden und in TBE-Puffer bei 100V für 40 Minuten aufgetrennt werden. Wir trugen zudem pro verwendetem Primerpaar eine Negativkontrolle mit Wasser und eine „DNA-Leiter“ auf. Die fotografische Dokumentation des Agarosegels unter UV-Licht machte die Einzelbanden sichtbar. Durch den Vergleich mit der standardisierten „DNA-Leiter“ wurde die Basenpaarlänge der gesichteten DNA Banden bestimmt und damit die Genabschnitte identifiziert.

Auf diese Weise untersuchten wir die konditionierten murinen Stammzellen Balb/c auf die Expression der lymphatischen Marker Podoplanin, Prox-1 und VEGFR-3.

2.2.1.6 Taqman® Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Eine quantitative PCR ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen PCR die Bestimmung der Menge von bestimmten Genen (Gibson et al., 1996). Bei der Methode Taqman® von Applied Biosystems wird dies mithilfe fluoreszierender Sonden erreicht. Die Einzelschritte der PCR gleichen denen der konventionellen PCR mit der Ausnahme, dass bei der quantitativen PCR nach jedem Zyklus die Menge des Amplifikationprodukts durch Fluoreszenzmessung bestimmt wird.

Die von Applied Biosystems hergestellten Taqman® Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzreporter markiert. Dieser Reporter bestand in unseren Versuchen entweder aus dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM, bei der Sonde des gesuchten Gens CCR7, Extinktion bei 490 nm, Emission bei 530 nm) oder dem Fluoreszenzfarbstoff VIC (bei der Sonde des Referenzwertes 18 S rRNA, Extinktion bei 530 nm, Emission bei 575 nm). Am 3'-Ende der Sonde ist ein Fluoreszenzquencher, in unserem Fall Tetramethylrhodamin (TAMRA) angehängt, der die Energie des Reporters bei intakter Sonde durch strahlungsfreien Energietransfer (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, FRET) aufnimmt und somit dessen Fluoreszenz unterdrückt. Die Taqman® Sonden sind vom Hersteller so konstruiert, dass sie sich in der Phase der Primeranlagerung an den Einzelstrang anlagern können (s. 2.3 auf der nächsten Seite). In der Elongationsphase synthetisiert die Taq DNA Polymerase nun den Tochterstrang und trennt mit ihrer 5'-3'- Exonukleaseaktivität den Fluoreszenzreporter von der angelagerten Sonde ab, sobald sie diese erreicht. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher kommt es nun zur Abgabe der Fluoreszenzstrahlung durch den Reporter (s. 2.3 auf der nächsten Seite). Durch die Detektion dieser Fluoreszenz lässt sich die Menge an Amplifikationsprodukten ermitteln.

Durch die räumliche Nähe unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Nach Ablösung des Reporters von der Sonde durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase wird die Fluoreszenz ungehindert und messbar freigegeben. In den Versuchen zur Lymphangiogenese untersuchten wir mit dieser Methode die Expression von CCR7 sowohl bei V54/2, als auch Balb/c mesenchymalen Stammzellen. Beide Zellreihen wurden in unkontrolliertem Zustand untersucht. Zuerst erfolgte die Ablösung der Zellen aus der Zellkulturflasche und die anschließende RNA Isolierung, wie oben beschrieben, mit abschließender Lösung der RNA in 33 μ l RNase freiem Wasser.

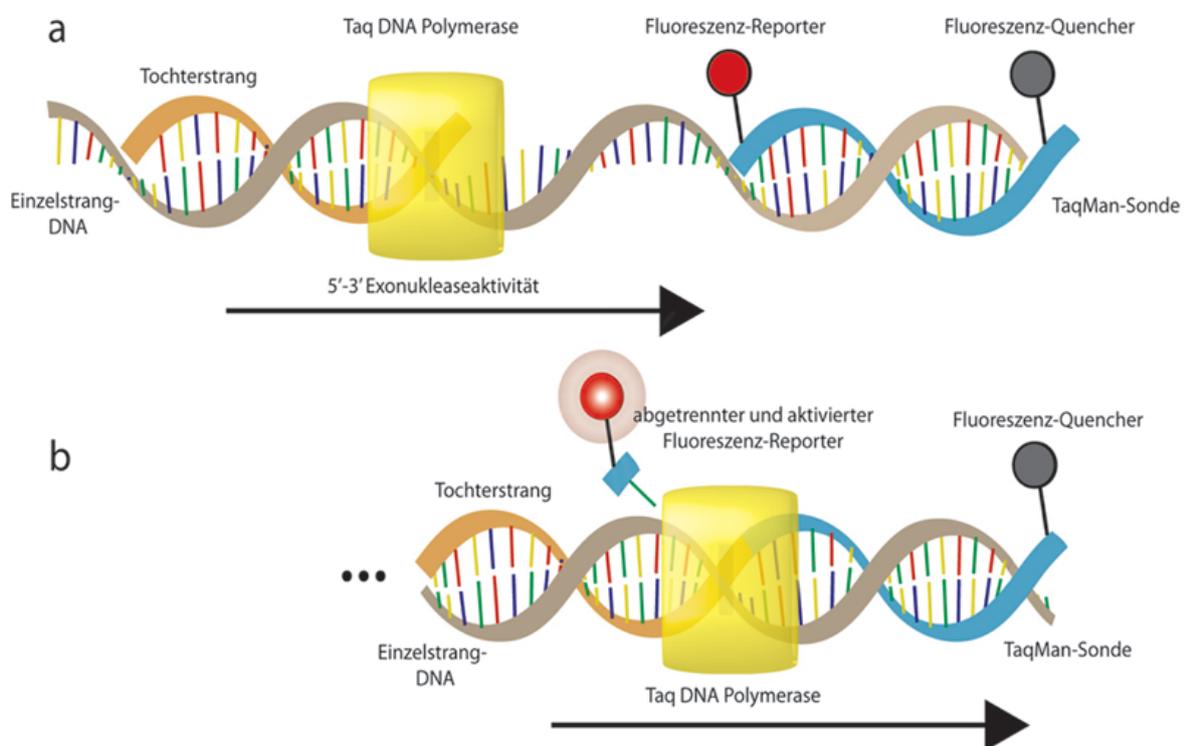


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Elongationsschrittes mit angelagerter TaqMan®-Sonde

Bei der reversen Transkriptase Reaktion wurde pro untersuchte RNA zusätzlich eine Probe ohne Zugabe der reversen Transkriptase als RT^- -Ansatz durchgeführt. Da die später verwendete Taqman Sonde für 18 S rRNA nicht cDNA spezifisch ist, kann durch die RT^- -Ansätze eine Kontaminierung der Probe mit eukaryonter DNA, welche die spätere Messung verfälschen würde, detektiert werden. Für diesen Ansatz wurden $3 \mu l$ der gelösten RNA entnommen und mit Wasser auf $30 \mu l$ verdünnt. Die nun folgende reverse Transkriptase Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers Applied Biosystems durchgeführt.

Der verwendete Mastermix für eine RT-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen: Puffer für den ersten Strang (5x) 60,4%, dTT 13,4 mM, dNTPs 1,5 mM, Acrylamid $0,7 \mu M$, random Hexamerprimer (10x) 3,4% und RNAsin $2,5 U/\mu l$. Zu den RT^+ -Ansätzen wurde zusätzlich $1 \mu l$ der SuperscriptTM reversen Transkriptase hinzu gegeben. Die Reaktion erfolgte, wie oben beschrieben, für eine Stunde bei $42^\circ C$. Die real-time PCR Reaktion wurde ebenfalls nach dem Protokoll des Hersteller Applied Biosystems durchgeführt. Hierzu verdünnten wir die RT^+ Proben um den Faktor 10 mit RNase freiem Wasser. Die RT^- -Ansätze wurden schon beim RT^- Ansatz 1:10 verdünnt. Nun wurde für jeden Versuchsansatz folgender Mastermix angesetzt: TaqMan® Universal Mastermix $10 \mu l$, forward Primer 300 nM, reverse Primer 300 nM, Sonde 100 nM. Anschließend wurde mit Wasser auf $20 \mu l$ aufgefüllt. Nachfolgend wurden jeweils $20 \mu l$ des Mastermixes mit $2,2 \mu l$ des verdünnten cDNA Ansatzes vermischt und auf die Versuchsplatte gegeben. Es wurden jeweils RT^+ , RT^- und „non-template controls“ (NTC) von jedem untersuchten Gen angesetzt. Die NTC enthielten keine cDNA in ihrem Ansatz und dienten der Kontrolle der Sondenreinheit.

Das Taqman® PCR Gerät wurde folgendermaßen programmiert: Nach den initialen Phasen von 2 Minuten bei $50^\circ C$ und 10 Minuten bei $95^\circ C$ wurde 40 Mal der Zyklus von 15 Sekunden bei $95^\circ C$ und 60 Sekunden bei $60^\circ C$ wiederholt.

Auf diese Weise wurde die RNA mehrerer Kulturen Balb/c und V54/2 MSC auf die Gene CCR7 und ?Actin untersucht.

Zur Quantifizierung des PCR-Produkts musste nun die Kinetik der Reaktion beobachtet und der Zyklus bestimmt werden, bei dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet (sog. CT-Wert, Cycle Threshold) und die exponentielle Phase der Replikation beginnt. Vor der Berechnung ist es wichtig zu kontrollieren, dass die NTC negativ sein müssen und die CT-Werte der RT^- -Ansätze sich um mindestens 5 Zyklen von denen der RT^+ -Ansätze unterscheiden sollten. Die Errechnung der Menge des PCR-Produkts erfolgte nun nach der Formel:

$$dCT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen})$$

Hierbei stellt dCT den korrigierten CT-Wert dar. Es ist wichtig anzumerken, dass die DNA sich in der exponentiellen Phase verdoppelt und daher die CT-Werte einen exponentiellen

Faktor von 2 darstellen. Daher werden die CT-Werte in der Regel folgendermaßen dargestellt: 2^{dCT} . Negative Proben werden mit einem CT-Wert von 40 angegeben, da dies die maximale Anzahl an durchgeführten Zyklen darstellt.

2.2.1.7 Migration-Assay in modifizierter Boyden-Kammer

Das Migration-Assay (auch Chemotaxis-Assay) dient der Untersuchung der Auswirkung chemotaktischer Reize bestimmter Zytokine bzw. Mischungen dieser auf eine untersuchte Zellreihe und wurde erstmals durch Boyden beschrieben (Boyden, 1962). Zur Verwendung kommen zwei vertikal angeordnete Kammern, welche durch einen Filter getrennt sind, der nur durch aktive Migration der Zellen überwunden werden kann (siehe Abb. 2.4). In die obere Kammer werden die untersuchten Zellen gegeben, in die untere Kammer die Zytokine. Dieser *in vitro* Versuchsaufbau gibt Aufschlüsse über das wahrscheinliche Verhalten der Zellen *in vivo*, besonders im Hinblick auf das so genannte „Homing“, also der aktiven Migration und Invasion der Stammzellen in das respektive, zytokinausschüttende Zielgewebe, wie z.B. Wundgewebe oder maligne Tumore.

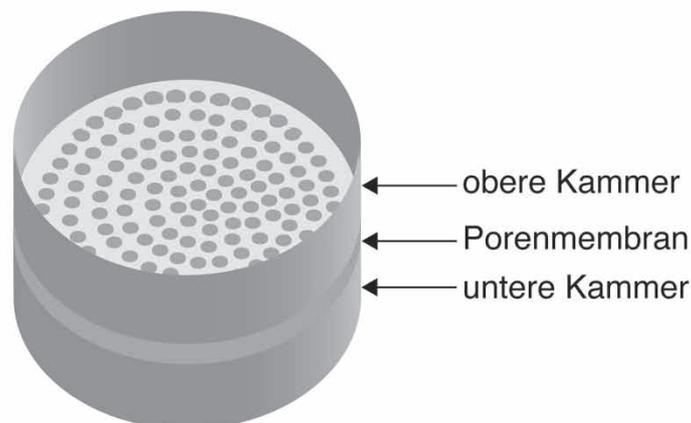


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer modifizierten Boydenkammer (leer)

Für die Versuche zur Lymphangiogenese untersuchten wir mit Hilfe dieser Methode die Auswirkungen die VEGF-C als bekannt chemotaktisches Zytokin auf die humane, mesenchymale Stammzelllinie V54/2 hat. Zum einen verwendeten wir unbehandelte V54/2 und zum anderen mit humanem VEGF-C vorbehandelte V54/2.

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt: in Kultur befindliche V54/2 wurden für eine Stunde mit dem „Labeling Medium“, bestehend aus RPMI 1640 + 10% FCS und $10 \mu\text{g/ml}$ Calcein (gelöst in DMSO), bei 37°C inkubiert. Daraufhin verdünnten wir die Zellen zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Assay-Medium, bestehend aus RPMI 1640 + 0,1%

BSA + 10mM Hepes. In die unteren Kammern füllten wir jeweils 180 μl des Assay-Mediums, gemischt mit 300 ng humanem VEGF-C. Die zusätzliche Messung der Kontrollzelllinie HT1080 (Fibrosarkomzelllinie), die gegen Medium migriert, diente der Funktionalitätsprüfung des Versuchsaufbaus.

Nun wurde die Platte ohne Erschütterung in den 37 °C vorgewärmten Fluoreszenz-ELISA-Reader gestellt und in einer ersten Messung der Fluoreszenz in der unteren Kammer bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm Wellenlänge der Nullwert gemessen. Nach vier Stunden wurde erneut die Fluoreszenz gemessen, um die migrierten Zellen zu detektieren.

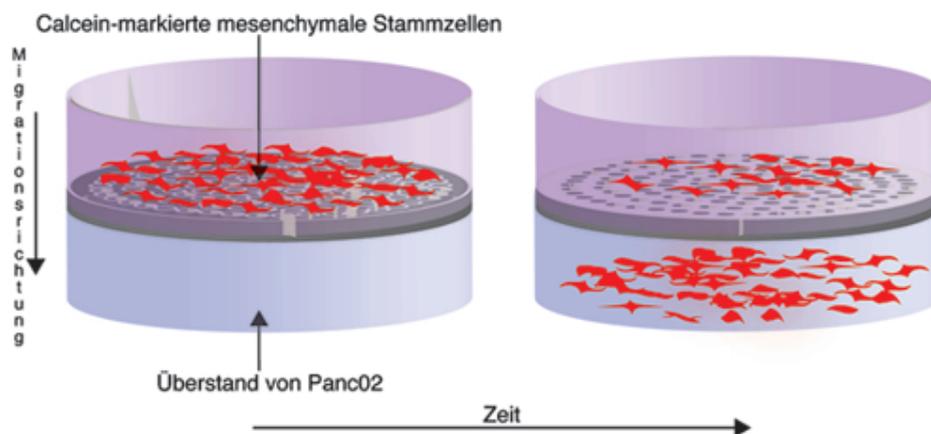


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Chemotaxis-Assays mit calceinmarkierten Zellen gegen Überstand von Panc02. Die Fluoreszenz wird in der unteren Kammer ausgelesen und so wird eine Zunahme der Zellzahl in der unteren Kammer detektiert.

Die Migrationsindizes errechneten sich nach Abzug der Nullwertmessungen (Hintergrundfluoreszenz) als Verhältnis von Fluoreszenzintensität untersuchter Zelllinien gegen Assay-Medium angereichert mit VEGF-C und Fluoreszenz der Zellen gegen reines Assay-Medium. Es wurden drei unabhängige Versuchsansätze mit unabhängigen Messungen vollzogen und die Mittelwerte errechnet. Die statistische Analyse der Migrationsindizes zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des doppelseitigen t-Tests für ungepaarte Stichproben. Die Signifikanztestung und graphische Aufbereitung der Versuchsergebnisse erfolgte durch das Programm „Prism 5.0 for Mac“. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

2.2.1.8 Murines Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese

Verwendet wurde ein modifiziertes Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese nach Boardman und Schwartz (Boardman und Swartz, 2003). Wir randomisierten 8 Tiere in zwei

Gruppen, die beide der nachfolgend beschriebenen Operation unterzogen wurden. Die Verumgruppe erhielt im Versuchsverlauf fünf subkutane Gaben von 1×10^7 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ mesenchymalen Stammzellen, gelöst in 100 μ l PBS.

Die Operation wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden die Versuchstiere durch das volatile Anästhetikum Isofluran® in Vollnarkose versetzt. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops wurde ein 2 mm breiter Hautlappen, 1 cm vor dem proximalen Ende des Mausschwanzes gelegen, in seiner gesamten Zirkumferenz entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die darunter liegenden Strukturen, wie z.B. Venen und Nerven, unverletzt blieben. Zur Anfärbung der Lymphgefäße wurden nun wenige μ l Methylenblau intradermal in das distale Ende des Mausschwanzes injiziert. Nach wenigen Minuten stellten sich die tiefliegenden Lymphgefäße in der Operationswunde mikroskopisch dar und wurden durchtrennt. Der Operationserfolg wurde durch die Beobachtung verifiziert, dass kein Methylenblau über den proximalen Wundrand hinaus abtransportiert wurde. In den darauf folgenden 21 Tagen bildeten alle operierten Tiere ein makroskopisch sichtbares Lymphödem distal der Operationswunde aus. Diese Ödeme wurden nun im Abstand von 7-11 Tagen, immer vor der respektiven Stammzellinjektion, mittels digitaler Schublehre in ihrem Durchmesser vermessen und protokolliert. Dabei wurde zum einen direkt distal der Operationsstelle, erfahrungsgemäß dem maximalen Durchmesser des Ödems, gemessen und 1 cm im weiteren Schwanzverlauf nach distal. Zur verbesserten Auswertung untersuchten wir jedes Tier in seinem Verlauf gesondert. Wir führten vor den Operationen Messungen an den definierten Messpunkten durch und protokollierten diese Werte als Ausgangswerte. Die später gemessenen Durchmesser wurden mit den Initialwerten ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Zunahme des gesamten Schwanzdurchmessers an der respektiven Stelle betrachtet. Die Einzelmessungen der n=4 Versuchstiere jeder Gruppe wurden gemittelt und mit Standardabweichung durch das Programm „Prism 5.0 for Mac“ graphisch aufbereitet. Die Signifikanztestung erfolgte durch den doppelseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben. Hierbei wurden die Mittelwerte der Verumgruppe mit denen der Kontrollgruppe zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt verglichen und das Ergebnis bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

Das Experiment wurde 56 Tage nach der Operation beendet und die Tiere mittels CO₂-Asphyxie getötet. Anschließend wurden die Mausschwänze entfernt und für 24 Stunden in Formaldehyd eingelegt. Daraufhin wurden sie fließend gewässert und anschließend zur Dekalzifizierung des Knochens bei 37 °C für fünf Tage in EDTA eingelegt. Im nächsten Schritt wurden die Schwänze in Parafin eingebettet und bei - 20 °C gelagert, um dann in 5 μ m dicken Schnitten auf Objektträger gebracht zu werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das oben beschriebene Tiermodell zur Darstellung von C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ mesenchymalen Stammzellen verwendet. Hierbei wurden n=4 Tiere operiert und wöchentlich eine Stammzellgabe von 1×10^7 der genannten Stammzellen

subkutan durchgeführt. Die anschließende Einbettung der Mausschwänze in Parafin erfolgte ebenso wie oben beschrieben und die gewonnenen Schnittpräparate dienen zur immunhistochemischen Darstellung des Fluoreszenzproteins GFP.

2.2.1.9 Immunhistochemie

Die ABC-Komplex-Methode

Immunhistochemie umfasst verschiedene Methoden zur Darstellung von Proteinen in einem mikroskopischen Schnittpräparat. Elementar für die Immunhistochemie ist die Verwendung von Antikörpern, die ein Epitop (monoklonale Antikörper) oder mehreren Epitope (polyklonale Antikörper) des gesuchten Proteins spezifisch und kovalent binden. Um die Antikörper unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, gibt es verschiedene Methoden (direkte und indirekte). Prinzipiell wird jedoch in allen Methoden ein Enzym (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Glucose Oxidase) entweder in einem Zwischenschritt oder direkt an den bindenden Antikörper konjugiert, welches eine farbproduzierende Reaktion katalysiert und somit unter dem Mikroskop sichtbar wird.

Bei der von Hsu beschriebenen und von uns verwendeten ABC-Komplex-Methode, einer indirekten Methode, wird ein unkonjugierter Primärantikörper zur Erkennung des gesuchten Proteins und in einem zweiten Schritt ein Sekundärantikörper zur Erkennung des Primärantikörpers angewandt (Hsu und Raine, 1981). Dieser Sekundärantikörper ist reaktiv mit dem F_c-Fragment von Immunglobulin G des Wirtstieres (in unserem Fall Ziege, bzw. Hamster), von dem der Primärantikörper stammt. Der Sekundärantikörper ist mit dem Vitamin Biotin konjugiert, das eine starke Bindung mit dem Hühnereiweiß-Protein Avidin eingehen kann, welches vier Bindungsstellen für Biotin hat. Dies macht man sich zu Nutzen und konjugiert die Peroxidase mit Avidin und Biotin und bildet so den ABC-Komplex, der durch das Avidin an das Biotin des Sekundärantikörper irreversibel bindet. Durch die vielen Bindungsstellen des Avidins vernetzen sich so die Proteine und bilden Komplexe mit mehreren Peroxidasen, was zu einer Verstärkung des späteren Farbsignals führt. Durch Zugabe von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Chromogen erhält man so eine Rotfärbung, katalysiert durch die Peroxidasen des ABC-Komplexes.

Zur Darstellung der injizierten Stammzellen wählten wir das Antigen GFP, welches durch die injizierten Stammzellen konstitutiv exprimiert wird. Zur Darstellung der Lymphgefäße wählten wir den lymphspezifischen Oberflächenmarker Podoplanin.

Die entnommenen Mausschwänze wurden wie unter 2.2.1.8 dekalzifiziert. Daraufhin wurden sie für 24 Stunden in Formalin eingelegt und anschließend fließend gewässert. Im nächsten Schritt erfolgte die Einbettung der Tumore in Parafin und die Zwischenlagerung bei -20 C , bis sie in dünnen Schnitten (ca. $5\ \mu\text{m}$) auf Objektträger gebracht wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 30 Minuten in 99% Xylol entparafiniert und anschließend in einer Ethanol-Verdünnungsreihe dehydratisiert. Die Antigendemaskierung erfolgte bei der anti-GFP-Färbung im Mikrowellenverdau mit TRS6 für 2x15 Minuten bei 800 Watt mit 20-minütiger Auskühlphase. Bei der anti-Podoplanin Immunhistochemie verwendeten wir für den Antigenverdau saures Pepsin für 30 Minuten. Daraufhin folgte eine Waschung für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer und eine Blockierung der endogenen Peroxidase durch ein 10-minütiges Bad in 7,5% Wasserstoffperoxyd (H_2O_2). Nach fließender Wässerung für 10 Minuten und pH-Ausgleich durch eine erneute 10-minütige Waschung mit TRIS-Puffer, wurde im nächsten Schritt die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Applikation des Dako®-Proteinblockers für 10 Minuten erwirkt.

Anschließend wurden die Präparate mit dem Primärantikörper gegen GFP in 1:25-, bzw. gegen Podoplanin in 1:40-Verdünnung in Dako®-Medium, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wuschen wir die Präparate für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer/ Brij®-Lösung 0,05% und inkubierten sie daraufhin mit dem biotinylierten Sekundärantikörper aus dem passenden „Vectastain ABC-Kit“ (Ziege oder Hamster) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer/ Brij®-Lösung 0,05% gaben wir die passenden ABC-Komplexe auf die Präparate und ließen sie für 30 Minuten einwirken. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer/ Brij®-Lösung 0,05% inkubierten wir die Präparate mit dem Chromogen AEC für 10 Minuten. Nach darauf folgender Wässerung für 10 Minuten wurde mit Hematoxylin gegengefärbt und erneut gewässert. Abschließend wurden die Präparate in Kaisers®-Glyceringelatine eingedeckt und unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet.

2.2.2 Methoden der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms

2.2.2.1 Migration-Assay in modifizierter Boyden-Kammer

Wir verwendeten die, unter Kapitel 2.2.1.7 auf Seite 50, beschriebene Methode der modifizierten Boydenkammer, um das Migrationsverhalten der murinen Stammzelllinien zum Tumormilieu zu untersuchen.

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt: C57BL/6 p53^{-/-} /Tie2/RFP⁺ und C57BL/6 p53^{-/-} /Tie2/TK⁺ wurden für eine Stunde mit dem „Labeling Medium“, bestehend aus RPMI 1640 + 10% FCS und 10 μ g/ml Calcein (gelöst in DMSO), bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml in Assay-Medium, bestehend aus RPMI 1640 + 0,1% BSA + 10mM Hepes, verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 50 μ l in die obere Kammer der „Transwells“ der Fluoreszenzplatte gegeben. In die untere Kammer wurde Überstand von Panc02 Pankreaskarzinomzellen in absteigenden Konzentrationen (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 0%), gemischt mit RPMI 1640 + 10% FCS, gegeben.

Dieser Überstand enthält mutmaßlich Zytokine und soll so die chemotaktische Wirkung des Tumors *in vivo* simulieren. Da es sich um die gleichen Tumor- und Stammzellen handelt, die auch in dem Tierversuch verwendet wurden, lassen sich Rückschlüsse auf das Verhalten der Stammzellen im Tiermodell *in vivo* ziehen. Der Überstand wurde in verschiedenen Verdünnungen in die untere Kammer eingegeben, um einen Anstieg der Migration gegen höhere Konzentrationen an Tumorzellüberstand besser erkennen zu können.

Zur Kontrolle ließen wir die jeweils untersuchten Zelllinien C57BL/6 p53^{-/-} /Tie2/RFP⁺ und C57BL/6 p53^{-/-} /Tie2/TK⁺ gegen reines Medium migrieren und konnten so einen „Indexwert“, d.h. einen Wert, der die natürliche Migration der Zellen zu dem Medium widerspiegelt, ermitteln. Um die Aussagekraft des Experiments zu erhöhen, wurde es in Triplets, also drei identischen Versuchsansätzen auf derselben Migrationsplatte, durchgeführt. Der so genannte Migrationsindex errechnete sich schließlich aus gemessener Fluoreszenz nach vier Stunden abzüglich des respektiven Nullwerts, dividiert durch die nullwertkorrigierte Fluoreszenz der Indexgruppe (ohne Panc02-Überstand).

Statistisch wurden die Messwerte mit Hilfe des Programms „Prism 5.0 for Mac“ analysiert und graphisch aufbereitet. Zur Testung der Messwerte auf statistische Signifikanz wurden sie einer zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) durch das Programm „Prism“ unterzogen. Die Migrationsindizes wurden mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests für ungepaarte Stichproben statistisch aufgearbeitet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant, ein p-Wert von $\leq 0,001$ als hoch signifikant erachtet.

2.2.2.2 Murines orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom

Es wurden 2-3 Monate alte C57BL/6 Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von Atropin, Ketamin (100mg/kg Mausgewicht) und Xylazin (5mg/kg Mausgewicht) in Narkose versetzt. Die Operationsstelle am linken Oberbauch wurde rasiert. Nach Hautdesinfektion wurde mit einem 1cm langen Schnitt am linken Oberbauch das Pankreas freigelegt. Im nächsten Schritt wurden mit einer 1ml Spritze und 30 G Injektionsnadel 150.000 Panc02 Pankreaskarzinomzellen, gelöst in 40 μ l PBS, intrapankreatisch und milznah injiziert (siehe Abb. 2.6 auf der nächsten Seite). Zur genauen Dosierung kam eine kalibrierte Spritzenpumpe, die auf Knopfdruck das gewünschte Volumen appliziert, zur Verwendung. Wir achteten bei der Injektion darauf, keine Karzinomzellen intraperitoneal zu streuen oder in die Milz zu injizieren. Um auslaufende Tumorzellen aufzufangen wurde zu diesem Zweck nach der Injektion ein Wattebausch für eine Minute auf die Injektionsstelle gehalten.

Darauf folgte der peritoneale und kutane Wundverschluss durch Einzelknopfnah mit Prolene® 4-0. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde jedem Tier 1 mg Tramadol s.c. verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur platzierten wir die Tiere während



Abbildung 2.6: Intrapankreatische Injektion von Panc02 Pankreaskarzinomzellen bei vollnarkotisierter C57BL/6 Maus

der Aufwachphase unter eine Wärmelampe. Die Tiere wurden täglich auf Schmerzzustände, blutige Stühle und andere post-operative Komplikationen untersucht und wären entsprechend behandelt, bzw. euthanisiert worden, wenn dies der Fall gewesen wäre.

Zwei Wochen nach der Operation wurden die Tiere in die einzelnen Versuchsgruppen randomisiert. Die intravenösen Injektionen erfolgten in eine der Schwanzvenen der Mäuse. Um Embolie auslösende Zellklumpen zu vermeiden filterten wir die Zellsuspension zuvor mit einem „Falcon ® Cell Strainer“ mit einer Porengröße von $100\mu\text{m}$. Abbildung 2.7 zeigt die Pankreastumore nach 28 Tagen.



Abbildung 2.7: Pankreastumore der unbehandelten Kontrollgruppe nach 28 Tagen

Wir führten zwei Einzelexperimente an diesem Tiermodell durch. Die untersuchte Zielgröße war in allen Versuchen das Tumorgewicht, das nach Autopsie der Versuchstiere am vorher festgelegten Versuchsende bestimmt wurde. Wir berechneten die mittleren Tumorgewichte jeder einzelnen Versuchsgruppe und verglichen diese mit dem der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms „Prism 5.0 for Mac“ aufgearbeitet und graphisch dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit Hilfe des doppelseitigen t-Tests für ungepaarte

Stichproben, wobei immer die Mittelwerte zweier Gruppen miteinander verglichen wurden. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Versuch #1

In der ersten Versuchsreihe wurden die Tiere in folgende Versuchsgruppen aufgeteilt:

- Gruppe 1: Kontrollgruppe, ohne Stammzellinjektion, ohne GCV-Gabe
- Gruppe 2: Injektion von $0,5 \times 10^6$ C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ i.v.
- Gruppe 3: Injektion von $0,5 \times 10^6$ C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ i.v.
- Gruppe 4: Injektion von $0,5 \times 10^6$ C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ + 7,5 mg GCV i.v.

Die Injektionen erfolgten erstmals zwei Wochen nach der Operation und wurden innerhalb von zwei Wochen sieben Mal durchgeführt. Die GCV Gabe in Gruppe 4 erfolgte in diesem Versuch direkt nach der Stammzellgabe. Die Mäuse wurden 28 Tage nach der Operation durch CO₂-Asphyxie sakrifziert und obduziert. Bei allen Tieren war ein Tumor sofort makroskopisch sichtbar. Wir wogen die Tumore sofort nach Entnahme und präparierten die Tumore der Tiere aus den Gruppen 2 und 3 für die Fluoreszenzmikroskopie.

Versuch #2

In einem zweiten Versuchsansatz wurde wiederum das oben beschriebene Tiermodell verwendet. Wieder wurde nach zwei Wochen mit den Stammzellinjektionen begonnen und technisch wie oben beschrieben verfahren. Allerdings wurde in diesem Versuch das Injektionsregime wie folgt geändert: Die Stammzellinjektionen erfolgten nur einmal wöchentlich. Die GCV-Gabe erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen, beginnend am vierten Tag nach Stammzellinjektion (siehe Abb. 2.8 auf der nächsten Seite).

Die Tiere wurden zwei Wochen nach Tumorimplantation in folgende Versuchsgruppen randomisiert:

- Gruppe 1: Kontrollgruppe, ohne Stammzellinjektionen, ohne GCV-Injektionen
- Gruppe 2: Injektion von 7,5 mg GCV i.v., keine Stammzellgabe
- Gruppe 3: Injektion von $0,5 \times 10^6$ C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ i.v.
- Gruppe 4: Injektion von $0,5 \times 10^6$ C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ + 7,5 mg GCV i.v.

Zum vorher festgelegten Versuchende, fünf Wochen nach der Tumorimplantation, wurden alle Tiere sakrifziert und es wurde wie nachfolgend beschrieben verfahren. Zuerst wurden alle Tumore gewogen und ihre Gewichte dokumentiert. Im nächsten Schritt wurden die Tumore der Gruppen 1 und 3 geteilt und jeweils ein Teil für die RNA-Isolierung aus dem Tumorgewebe RNase-frei gelagert und eingefroren. Die restlichen Tumore und Restteile der Tumore aus Gruppen 1 und 3 wurden in Formalin eingelagert und nach 24 Stunden in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnittpräparate angefertigt und diese für immunhistochemische Untersuchungen verwendet.

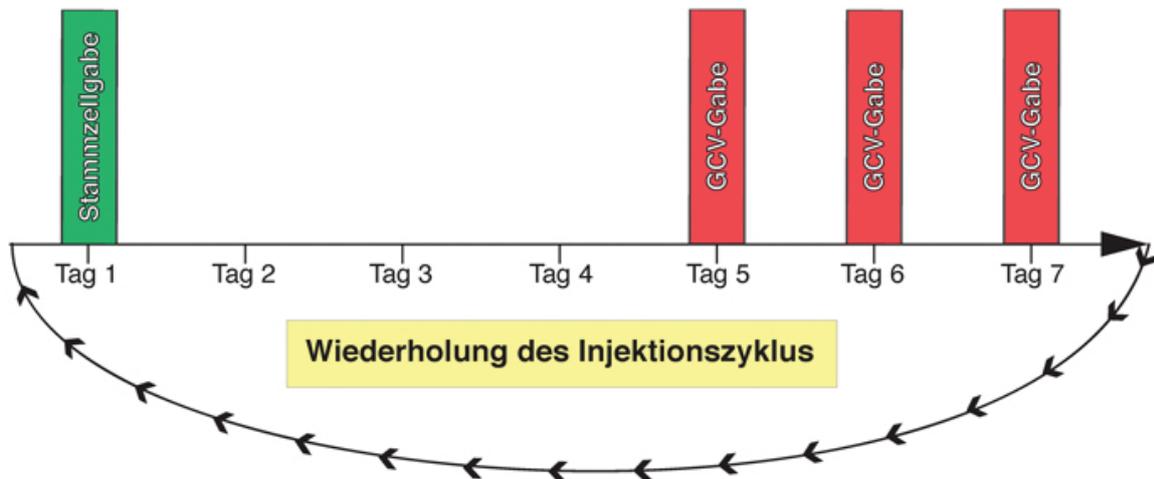


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Injektionsschemas von Versuch #2

2.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die im Tiermodell isolierten Tumore wurden in Tissue-Tek O.C.T® eingebettet, in Alufolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie mit einem Krytom in $5\mu\text{m}$ Schnitten auf Objektträger gebracht. Es wurde zu jedem Zeitpunkt darauf geachtet, die Schnitte vor direkter Lichteinstrahlung zu schützen. Kurz vor der Betrachtung im Mikroskop wurden mittels 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol (DAPI) die Zellkerne blau angefärbt und die Präparate mit einem Deckel abgedeckt. Die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop ermöglichte nun die Detektion der Stammzellen in ihrem respektiven Fluoreszenzspektrum. Durch die Betrachtung der blauen Fluoreszenz des DAPI ließen sich die gefundenen Fluoreszenzsignale in ihrer Relation zum Zellkern darstellen. Mit der Digitalkamera des Mikroskops wurden die Bilder auf dem Computer abgespeichert und anschließend die entsprechenden Bilder aus DAPI und rotem bzw. grünem Fluoreszenzkanal mit Hilfe der Software „Photoshop“ zusammengefügt.

2.2.2.4 Immunhistochemie

Die Dehydrierung und Entparafinisierung der Präparate erfolgte wie unter 2.2.1.9 auf Seite 53 beschrieben.

Im Fall der anti-RFP Färbung stammte der primäre Antikörper gegen RFP aus dem Wirtstier Hamster. Der verwendete Zweitantikörper musste daher reagibel auf das F_c -Fragment von IgG des Hamsters sein und entstammte in unserem Fall aus dem Wirtstier Hase. Der Zweitantikörper war bei dem von uns verwendeten Kit direkt mit einem Polymer von Horseradish Peroxidasen konjugiert und wurde in diesem Zustand vom Hersteller geliefert. Es

bedurfte daher keiner Zugabe des oben beschriebenen ABC-Komplexes oder anderer Avidin-Biotin-Systeme.

Im Detail wurde bei den anti-RFP-Färbungen der Tumore wie folgt vorgegangen: Die entnommenen Tumore wurden über 24 Stunden in Formalin eingelegt und anschließend fließend gewässert. Im nächsten Schritt erfolgte die Einbettung der Tumore in Parafin und die Zwischenlagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bis sie in dünnen Schnitten (ca. $5\text{ }\mu\text{m}$) auf Objektträger gebracht wurden. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 30 Minuten in 99% Xylol entparafinisiert und anschließend in einer Ethanol-Verdünnungsreihe dehydratisiert. Zur Antigendemaskierung führten wir anschließend einen Mikrowellenverdau in Protex II® bei 800 Watt für 2x15 Minuten mit 20-minütiger Auskühlphase durch. Daraufhin folgte eine Waschung für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer und eine Blockierung der endogenen Peroxidase durch ein 10-minütiges Bad in 7,5% Wasserstoffperoxyd. Nach fließender Wässerung für 10 Minuten und pH-Ausgleich durch eine erneute 10-minütige Waschung mit TRIS-Puffer wurde im nächsten Schritt die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Applikation des Dako®-Proteinblockers für 10 Minuten erwirkt.

Der primäre Antikörper gegen RFP wurde nun in einer Verdünnung von 1:40 auf die Präparate gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wuschen wir die Präparate für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer/ Brij®-Lösung 0,05% und inkubierten sie daraufhin mit dem HRP-Polymer-konjugierten Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einer 2x5-minütigen Waschung der Präparate mit TRIS Puffer/Brij®-Lösung erfolgte die Zugabe des Chromogen AEC in wässriger Form für 10 Minuten. Nach weiteren 10 Minuten fließender Wässerung wurden die Präparate durch ein 30-sekündiges Bad in Hematoxylin gegengefärbt. Abschließend erfolgte eine erneute fließende Wässerung mit anschließender Eindeckung in Kaisers® Glyceringelatine und Betrachtung unter einem Lichtmikroskop.

2.2.2.5 Taqman-PCR

Mit Hilfe der Taqman® quantitativen PCR untersuchten wir die Tumorgewebe auf das Vorhandensein von mRNA des Fluoreszenzfarbstoffes RFP, der durch die Gabe von C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ mesenchymalen Stammzellen in den Tumor gelangte.

Die Methode der Taqman® PCR ist unter 2.2.1.6 auf Seite 47 detailliert beschrieben. Neben den verwendeten Sonden und Oligonukleotiden, die natürlich für RFP spezifisch sein müssen, unterschied sich auch die untersuchte Referenzmessung zur Normalisierung der gemessenen Werte. Hier verwendeten wir β Actin als „Housekeeping“ Gen. Da die Sonde für β Actin ebenfalls nicht cDNA spezifisch war, mussten wir in einem RT⁻-Ansatz eine Kontaminierung mit eukaryonter DNA ausschließen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Versuche zur Lymphangiogenese

Die Ergebnisse der Versuche zur Lymphangiogenese bestehen vorrangig aus *in vitro* Daten, die sich aus den Kokultivierungen der verschiedenen mesenchymalen Stammzelllinien, sowohl der humanen Stammzelllinie V54/2 als auch der murinen Stammzelllinien C57BL/6 p53^{-/-} und Balb/c, ergaben. Ziel dieser *in vitro* Untersuchungen war die Feststellung einer möglichen phänotypischen Änderung der MSC zu einem lymphendothelialen Phänotyp. Dieser wurde von uns durch die Expression der bekannten, und in der Einleitung beschriebenen, lymphspezifischen Marker VEGFR-3, Podoplanin, Lyve-1 und Prox-1 definiert. Wir untersuchten diese Marker auf Proteinebene durch FACS-Analyse und auf mRNA-Ebene durch RT-PCR und verglichen in diesen Untersuchungen jeweils die unkonditionierten Zellen mit den Zellen der verschiedenen Gruppen, die einer Kokultivierung unterzogen wurden.

Des Weiteren untersuchten wir die Stammzellen auf das Vorhandensein von CCR7, einem Chemokinrezeptor der mit der Lymphangiogenese in Verbindung gebracht wurde und eventuell eine Funktion der Stammzellen *in vivo* vermittelt.

Neben den *in vitro* Daten wurde die Stammzellintegration in einem Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese an der Maus erforscht und ein möglicher Einfluss der Stammzellen auf die Regenerationsfähigkeit der Lymphgefäße untersucht.

3.1.1 Konditionierung mesenchymaler Stammzellen

3.1.1.1 Morphologische Veränderung der V54/2

Die beiden Abbildungen 3.1 a) und -b) vergleichen das morphologische Erscheinungsbild derselben humanen mesenchymalen Stammzelllinie V54/2 in nativem Zustand, vier Wochen in Kultur befindlich (a), und nach 4-wöchiger Konditionierung mit 20%igem Überstand von isolierten humanen Lymphendothelzellen (b). Die Zellen befanden sich in derselben Zellpassage. Man erkennt einen Unterschied in der Morphologie, der sich in der Ausbildung von

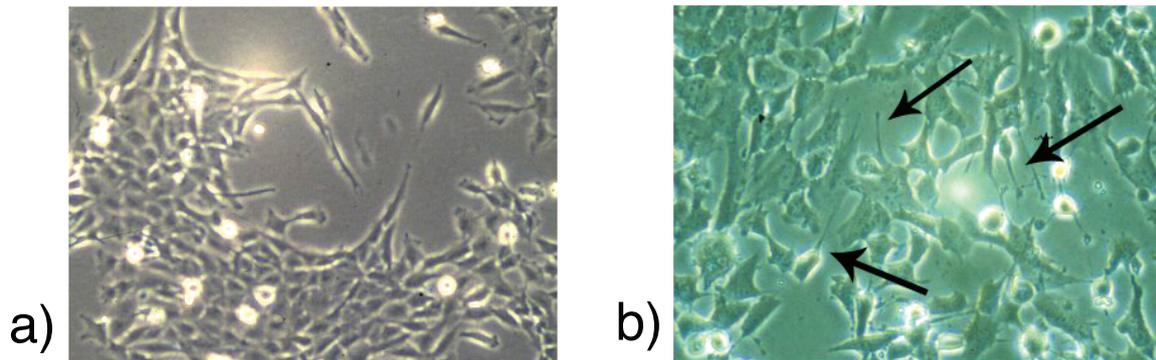


Abbildung 3.1: Vergleich zwischen unkontrollierten (a) und kontrollierten (b) V54/2

spindelartigen Zellprotrusionen durch die kontrollierten Zellen ausdrückt. Diese spindelartigen Zellfortsätze ließen an den Phänotyp von Endothelzellen erinnern, wie in verschiedenen Publikationen beschrieben wurde (Oswald et al., 2004).

3.1.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchung (FACS) der kontrollierten V54/2

In der FACS-Analyse wurden die kontrollierten V54/2 auf die Expression der Oberflächenmarker Podoplanin, VEGFR-2 und VEGFR-3 hin untersucht. Auf diese Weise wurden folgende Versuchsgruppen untersucht:

- V54/2 unkontrolliert
- HDMEC (Positivkontrolle)
- V54/2 kontrolliert mit 20% HMVEC-Überstand
- V54/2 kontrolliert mit 100 ng/ml humanem VEGF-C (C156S)
- V54/2 kontrolliert mit 20% Lymphendothelzellüberstand

Podoplanin

In Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite sind von links nach rechts die oben beschriebenen Versuchsgruppen dargestellt. Innerhalb der Gates ist der Anteil der positiven Zellen in Prozent angegeben. Die Gates sind nach ungefärbten V54/2 (nicht in Abbildung) gesetzt worden.

Von den unkontrollierten Zellen exprimierten nur wenige Podoplanin als Oberflächenmarker. Die humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) zeigten wie erwartet einen hohen Prozentsatz an Podoplanin⁺ Zellen. Man erkennt in den kontrollierten Zellen, dass die Proportionen der Podoplanin-positiven Zellen in der Gruppe der mit HDMEC-Überstand kontrollierten V54/2 um das 2,3-fache, in der Gruppe der mit VEGF-C (C156S)

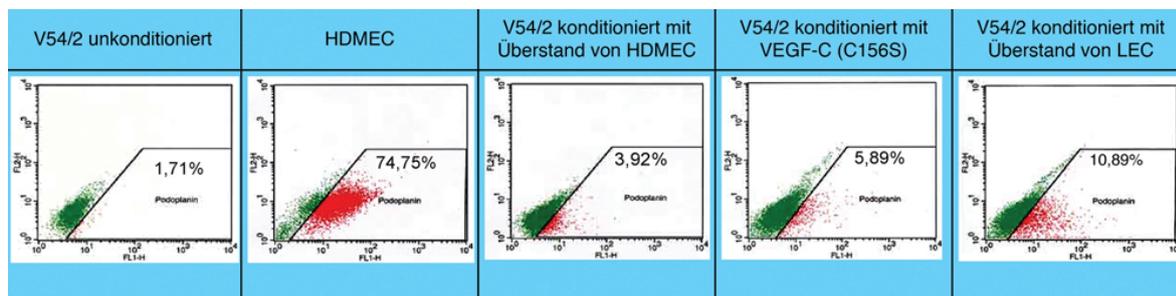


Abbildung 3.2: FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf Podoplanin

konditionierten V54/2 um das 3,4-fache und in der Gruppe der mit LEC-Überstand konditionierten V54/2 um das 6,4-fache im Vergleich zur unkonditionierten Gruppe angestiegen waren.

VEGFR-2

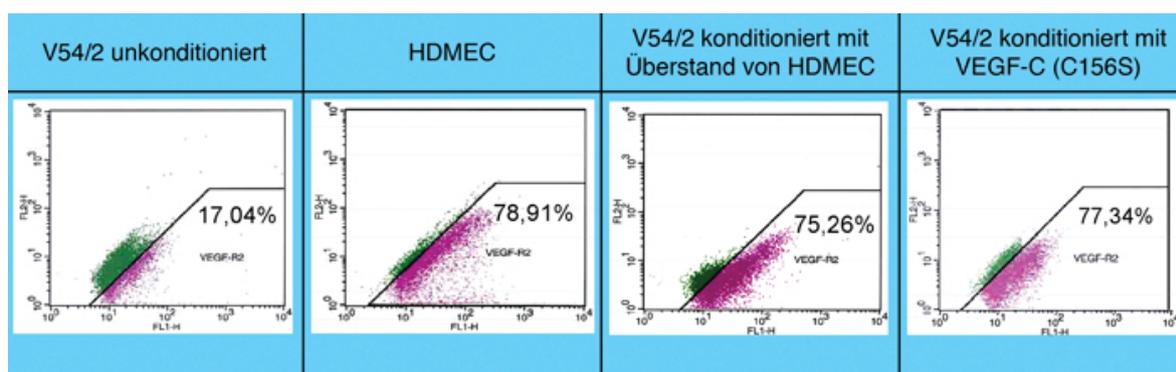


Abbildung 3.3: FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf VEGFR-2

In Abbildung 3.3 sind ebenfalls die Versuchsgruppen, die zu Beginn des Unterkapitels genannt wurden, aufgetragen. Für die Versuchsgruppe der mit LEC-Überstand konditionierten V54/2 waren nicht genug Zellen vorhanden.

HDMEC, als Mischkultur aus dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, exprimierten den Oberflächenrezeptor VEGFR-2, der sowohl auf Blut- als auch Lymphendothelzellen vorhanden ist, in einem hohen Maße. Die mit Überstand von HDMEC konditionierten V54/2 zeigten eine Subpopulation von VEGFR-2⁺ Zellen, die um das 4,4-fache höher war als die der unkonditionierten Zellen. Ebenso zeigten die mit VEGF-C (C156S) konditionierten V54/2 einen erhöhten Prozentsatz an VEGFR-2⁺ Zellen. Dieser war um das 4,5-fache im Vergleich zu den unkonditionierten Zellen erhöht.

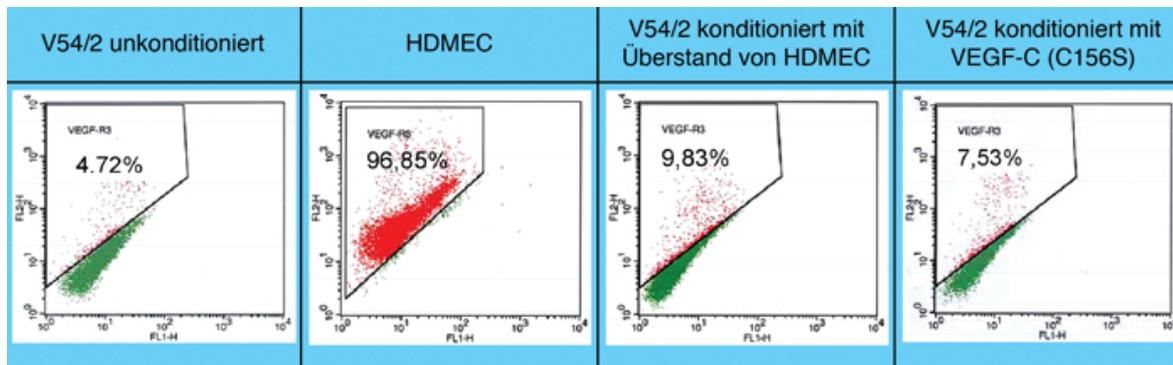
VEGFR-3

Abbildung 3.4: FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf VEGFR-3

Wiederum zeigt Abbildung 3.4 die zu Anfang des Kapitels genannten Versuchsgruppen von links nach rechts aufgereiht. Erneut geben die Prozentzahlen innerhalb der Gates den prozentualen Anteil an positiv erkannten Zellen an.

Die Analyse der konditionierten, humanen mesenchymalen Stammzelllinie V54/2 auf das Vorhandensein des lymphspezifischen Oberflächenrezeptors VEGFR-3 ergab eine Steigerung der Rezeptor⁺ Zellen von 4,72% in unconditioniertem Zustand auf 9,83% durch Konditionierung mit Überstand von HDMEC. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 2,1. Durch Konditionierung mit VEGF-C (C156S) steigerte sich die Proportion der VEGFR-3⁺ Zellen um das 1,6-fache.

3.1.1.3 RT-PCR der konditionierten Balb/c

In der konventionellen RT-PCR wurden die über vier Wochen konditionierten, mesenchymalen Stammzellen der Balb/c Maus auf die Expression von mRNA der Gene Podoplanin, Prox-1 und VEGFR-3 hin untersucht. In Abbildung 3.5 auf der nächsten Seite sind in der oberen Reihe die verschiedenen Versuchsgruppen der Konditionierung aufgetragen. Die drei nachfolgenden Reihen stellen die Ergebnisse der PCR in Hinsicht auf das Vorhandensein von mRNA für Podoplanin, Prox-1 und VEGFR-3 dar. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wurde Podoplanin in den Zellen, die mit Überstand von HDMEC konditioniert wurden und in den Zellen, die mit humanem VEGF-C (C156S) konditioniert wurden, nachgewiesen. Prox-1 zeigte sich nur in den Zellen, die mit Überstand von HDMEC konditioniert wurden. Messenger RNA des VEGFR-3 konnte hingegen in allen Zellreihen nachgewiesen werden, sogar in den unconditionierten.

	Balb/c unkonditioniert	Balb/c konditioniert mit Ratten-VEGF-C	Balb/c konditioniert mit Überstand von HDMEC	Balb/c konditioniert mit humanem VEGF-C (C156S)	Balb/c konditioniert mit Endothelzellmedium
Podoplanin	 (-)	 (-)	 (+)	 (+/-)	 (-)
Prox-1	 (-)	 (-)	 (+)	 (-)	 (-)
VEGFR-3	 (+)	 (+)	 (+)	 (+)	 (+)

Abbildung 3.5: Konventionelle RT-PCR der konditionierten Balb/c mesenchymalen Stammzellen

3.1.1.4 Migration-Assay vor und nach Konditionierung von V54/2

Im Chemotaxis-Assay wurde der Migrations-Anreiz des VEGF-C auf die humane, mesenchymale Stammzelllinie V54/2 untersucht. Die Zellen wurden zum einen in unkonditioniertem Zustand dem Assay unterzogen und zum anderen nach Konditionierung mit humanem VEGF-C. Die dargestellten Migrationsindizes stellen die gemittelten Verhältnisse zwischen Migration gegen reines Assay-Medium und Migration gegen Assay-Medium, das mit VEGF-C angereichert wurde, dar. Die einzelnen Werte wurden vorher durch Abzug der respektiven „0h“-Werte korrigiert.

In Abbildung 3.6 auf der nächsten Seite repräsentieren die Balken die Mittelwerte von mehreren, unabhängigen Versuchsansätzen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Signifikanzmessung erfolgte durch zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) der dargestellten Gruppe, verglichen mit der respektiven Kontrollgruppe. Der abgebildete p-Wert bezieht sich auf das Vorhandensein von VEGF-C in dem Assay-Medium.

Die blau dargestellte Gruppe der unkonditionierten V54/2 zeigte einen Migrationsindex von maximal 1,33 nach 2 Stunden gegen VEGF-C. Dies bedeutet, dass das Migrationsverhalten gegen VEGF-C im Vergleich zu reinem Medium um den Faktor 1,33 erhöht war. Noch stärker zeigte sich dieses Verhalten bei den Zellen der Gruppe von Stammzellen, die vorher mit VEGF-C konditioniert wurden. Hier stieg der Index nach zwei Stunden auf einen maximalen Mittelwert von 3,23. Nach drei Stunden sanken die Migrationsindizes in beiden Gruppen wieder auf ca. 1,1 ab, und damit befanden sie sich wieder in der Nähe des Migrationsverhaltens der unkonditionierten Stammzellen gegen reines Medium ohne VEGF-C.

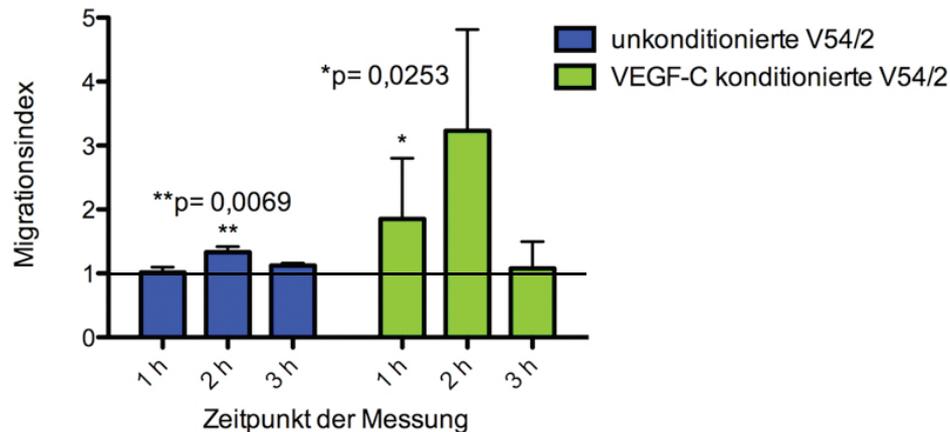


Abbildung 3.6: Migrationsindizes der V54/2 gegen mit VEGF-C angereichertem Kulturmedium in unkonditioniertem Zustand (blau) und nach Konditionierung mit VEGF-C (grün)

Zusammenfassung des Migrations-Assays:

- VEGF-C steigert das Migrationsverhalten der humanen mesenchymalen Stammzelllinie V54/2, sowohl in unkonditioniertem Zustand, als auch nach Konditionierung mit humanem VEGF-C.
- Die Konditionierung durch VEGF-C führt zu einer zusätzlichen Verstärkung des Migrationsverhaltens.
- Drei Stunden nach Versuchsbeginn sinkt die Stärke der Migration wieder auf das Normalniveau zurück.

3.1.2 Funktionelle Expression von CCR7 auf V54/2

3.1.2.1 Taqman-PCR und Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Taqman® quantitativen PCR untersuchten wir die Expression des CC Chemokinrezeptors 7 auf den mesenchymalen Stammzelllinien V54/2 und Balb/c. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der mit Lymphangiogenese in Verbindung gebracht wurde (Kerjaschki et al., 2004). CCR7⁺ Zellen wurden von den Autoren in direkter Nähe von neu geformten Lymphgefäßen gefunden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass isolierte Lymphendothelzellen einen Liganden von CCR7, nämlich SLC/CCL21, exprimieren.

Zum Nachweis der CCR7 Expression auf den humanen mesenchymalen Stammzellen V54/2, führten wir eine durchflusszytometrische Untersuchung (FACS-Analyse) der Zellen mit einem Antikörper gegen humanes CCR7 durch.

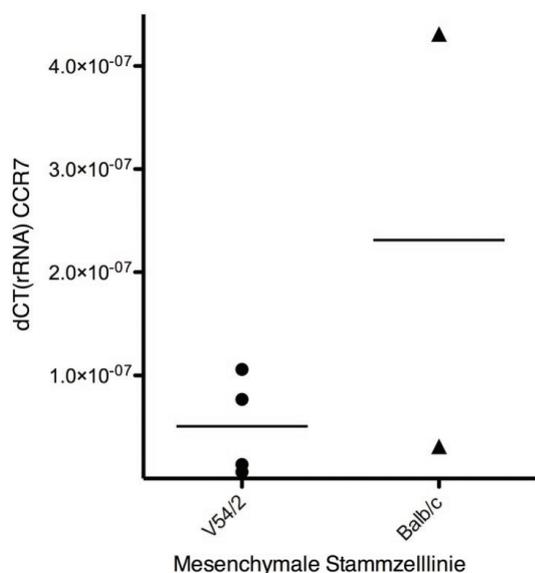


Abbildung 3.7: Taqman® quantitative PCR von CCR7 mRNA der V54/2 und Balb/c MSC

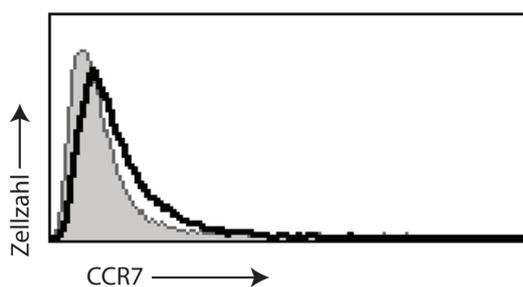


Abbildung 3.8: FACS Analyse der V54/2 auf CCR7-Expression

In Abbildung 3.7 sind die einzelnen Messwerte von jeweils unterschiedlichen RNA Proben, korrigiert mit rRNA als Housekeeping Gen, aufgetragen. Punkte repräsentieren Proben der humanen, mesenchymalen Stammzelllinie V54/2, Dreiecke die der murinen, mesenchymalen Stammzelllinie Balb/c. Die Querbalken stellen die Mittelwerte der Einzelmessungen dar. Alle Proben waren positiv, da sie über der „Nulllinie“ (bei 1.0×10^{-11}) liegen.

In Abbildung 3.8 ist ein Histogramm der durchflusszytometrisch akquirierten Einzelmesswerte dargestellt. Man erkennt in diesem Histogramm zwei Gipfel. Dies bedeutet, dass sich eine Subpopulation der V54/2 als positiv für den CC Chemokinrezeptor 7 darstellte.

3.1.2.2 CCL19 induzierte Migration der V54/2 in modifizierter Boydenkammer

CCL19 ist, neben CCL21, ein Ligand des CCR7. Durch die Verwendung der modifizierten Boydenkammer untersuchten wir die Migration der Zellen gegenüber CCL19.

Abbildung 3.9 auf der nächsten Seite stellt die Migrationsindizes der Sarkomzellen HT1080 (als Kontrollzellen) und der humanen, mesenchymalen Stammzelllinie V54/2 gegenüber CCL19 als Migrationsanreiz dar.

Der Migrationsindex der V54/2 ist das nullwertkorrigierte Verhältnis aus gemessener Fluoreszenz der V54/2 gegen Assay-Medium mit CCL19 und Assay-Medium ohne CCL19. Die dargestellte Migration der HT1080 gegen FCS diente der Kontrolle des Versuchsaufbaus. Ein

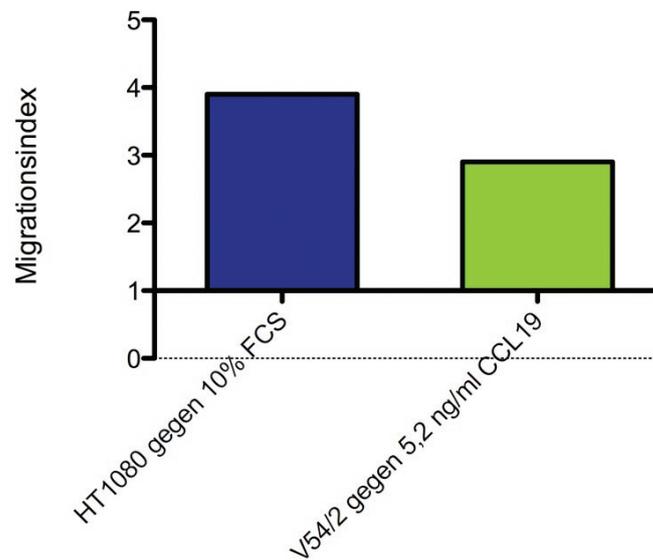


Abbildung 3.9: CCL19-induzierte Migration der V54/2 in modifizierter Boydenkammer

Migrationsindex der V54/2 von 2,9 bedeutet, dass die Stammzellen ein 2,9-fach erhöhtes Migrationsverhalten durch das Vorhandensein von CCL19 zeigten.

Zusammenfassung der Untersuchungen zum CCR7:

- Messenger RNA von CCR7 war sowohl in den humanen, mesenchymalen Stammzellen V54/2, als auch in den murinen, mesenchymalen Stammzellen Balb/c nachweisbar.
- Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich, dass CCR7 zudem auf der Oberfläche der V54/2 exprimiert war.
- Die Stammzelllinie V54/2 zeigte ein verstärktes Migrationsverhalten gegen Kulturmedium, das einen Liganden des CCR7, nämlich CCL19, enthält.

3.1.3 Stammzellgabe im murinen Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese

In diesem Tiermodell wurde die Auswirkung von subkutaner Stammzellgabe auf das Regenerationsvermögen der Lymphgefäße am Mausschwanz getestet. Alle Tiere der Versuchsgruppen wurden einzeln in ihrem Verlauf untersucht und protokolliert. Die Durchmesser der Mausschwänze vor Operationsbeginn wurden als Nullwerte festgelegt und dienten als Vergleich zur weiteren Entwicklung der Durchmesser unter Ödembildung.

3.1.3.1 Entwicklung des Durchmessers des Mausschwanzes

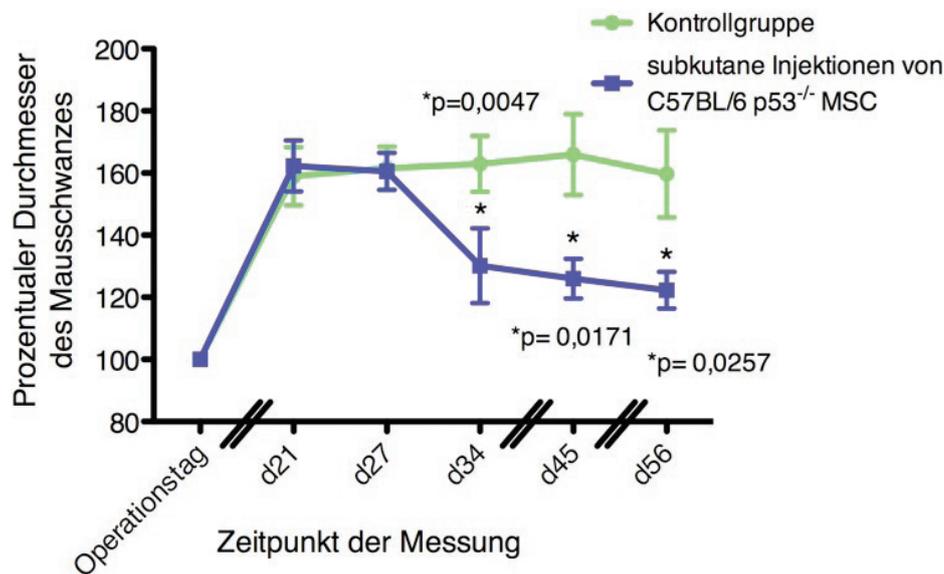


Abbildung 3.10: Entwicklung der Durchmesser der Mausschwänze unmittelbar distal der Operationsstelle; in Kontrollgruppe (grün) und unter subkutaner Gabe von mesenchymalen Stammzellen (blau)

In den Abbildungen 3.10 und 3.11 auf der nächsten Seite sind die post-operativen Verläufe der Mausschwanzdurchmesser aufgetragen. Die Werte errechneten sich als Mittelwerte aus den Einzelmessungen der respektiven Versuchsgruppe. Die vertikalen Balken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. In Abbildung 3.10 sind die Durchmesser der Schwanzödeme direkt distal der Operationsstelle aufgetragen, in Abbildung 3.11 die Ödemb Durchmesser 1 cm distal der Operationsstelle. Die Signifikanztestung erfolgte mit dem ungepaarten, doppelseitigen t-test der Mittelwerte zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppe bei einem Konfidenzintervall von 95%.

Die am Operationstag gemessenen Durchmesser wurden als Ausgangswert mit 100% festgelegt. Im weiteren Verlauf bildeten alle Mäuse Lymphödeme aus, die einen Zuwachs des

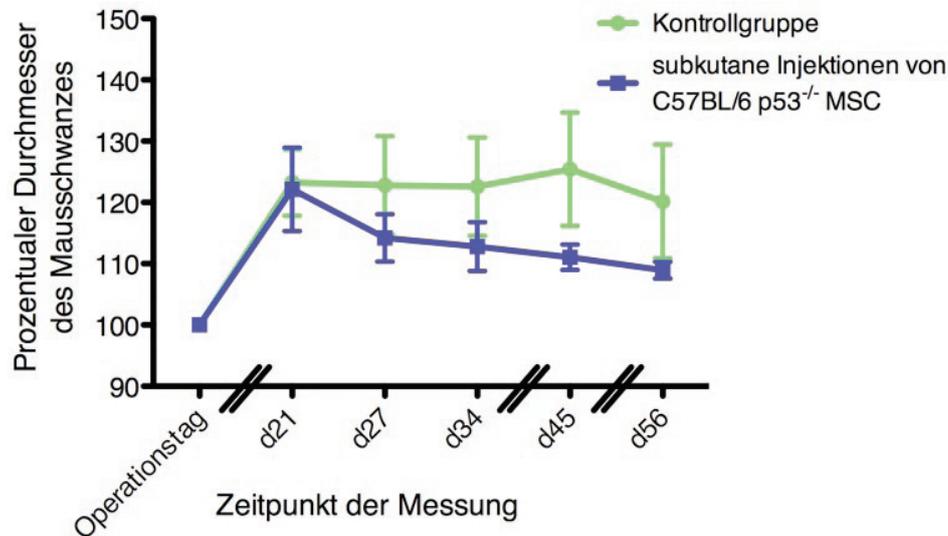


Abbildung 3.11: Entwicklung der Durchmesser der Mausschwänze 1 cm distal der Operationsstelle; in Kontrollgruppe (grün) und unter subkutaner Gabe von mesenchymalen Stammzellen (blau)

Gesamtdurchmessers direkt distal der Operationsstelle auf ca. 160% im Mittel bewirkten. Die beiden Gruppen wurden nach 14 Tagen randomisiert und unterschieden sich in ihren Durchmessern nicht signifikant voneinander. Am Tag 34 nach Operation war in der Gruppe der Stammzellinjektionen ein signifikant niedrigerer Schwanzdurchmesser distal der Operationsstelle zu messen (siehe Abb. 3.10 auf der vorherigen Seite). Dieser durchschnittliche Durchmesser sank im weiteren Verlauf auf ca. 120% des Ausgangswertes ab, wobei der mittlere Durchmesser der Kontrollgruppe immer noch ca. 160% des Ausgangswertes betrug. Die Messungen im Abstand von einem Zentimeter distal der Operationsstelle ergaben Ergebnisse, die denen an der Operationsstelle ähneln (siehe Abb. 3.11). Allerdings unterschieden sich hier die mittleren Durchmesser nicht signifikant voneinander, und die Änderungen der Durchmesser spielten sich in einem niedrigeren Bereich ab.

3.1.4 Immunhistologische Präparate des ödematösen Mausschwanzes

3.1.4.1 Anti-Podoplanin-Färbung

Die beiden repräsentativen Schnittpräparate aus den Abbildungen 3.12 und 3.13 auf der nächsten Seite zeigen die Podoplanin⁺ Strukturen an der ehemaligen Operationsstelle. Man erkennt deutlich, dass Podoplanin, wie erwartet, ausschließlich innerhalb von lumenartigen Strukturen zu liegen kommt und damit die Lymphgefäße markiert. Auffällig ist der deutliche Unterschied in der Anzahl der Podoplanin⁺ Strukturen zwischen den beiden Versuchsgruppen mit und

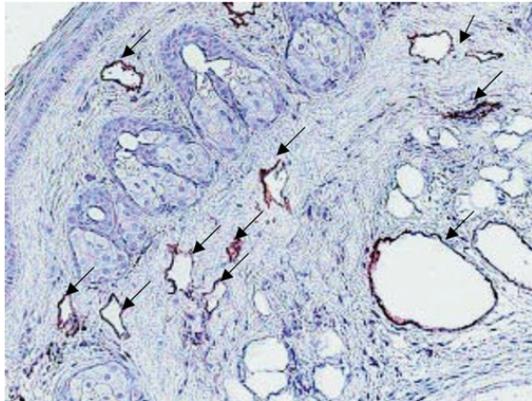


Abbildung 3.12: Immunhistochemische Färbung von Podoplanin an einem Mausschwanz der Therapiegruppe

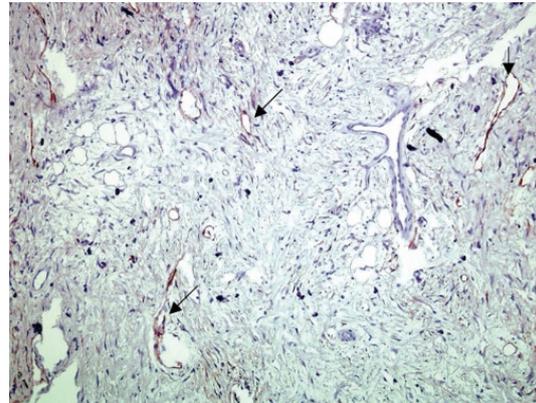


Abbildung 3.13: Immunhistochemische Färbung von Podoplanin an einem Mausschwanz der Kontrollgruppe

ohne Stammzellinjektionen. In dem Präparat des Mausschwanzes mit Stammzellinjektionen ist eine deutlich höhere Zahl an Podoplanin⁺ Strukturen zu erkennen.

3.1.4.2 Anti-GFP-Färbung

In einem weiteren Versuch wurden die unter 2.1.3.1 auf Seite 38 beschriebenen C57BL/6 p53^{-/-} mesenchymalen Stammzellen mit GFP⁺ als Reportersystem, in das Gewebe distal des Lymphödems injiziert. Es erfolgte eine wöchentliche Injektion von 1×10^6 Zellen, gelöst in $100 \mu\text{l}$ PBS. Zur Detektierung der Zellen wurde das Verfahren der Immunhistochemie auf den angefertigten Paraffinschnitten angewendet.

In Abbildung 3.14 auf der nächsten Seite ist ein Paraffinschnitt eines Mausschwanzes zu sehen, der wöchentlichen Injektionen mit GFP⁺ Stammzellen unterzogen wurde. Das Bild zeigt eine 200-fache Vergrößerung und wurde mit einem Antikörper gegen GFP angefärbt.

Die GFP-markierten Strukturen kamen in dem hier gezeigten Präparat subdermal zu liegen. Vereinzelt kann eine Nähe zu lumenartigen Strukturen erkannt werden. Allerdings lässt sich keine genauere Aussage zu den GFP⁺ Zellen machen.

3.1.4.3 Funktionalität der Lymphgefäße

In Abbildung 3.15 auf der nächsten Seite ist schematisch die Funktionalitätsprüfung der Lymphgefäße durch Methylenblauinjektion dargestellt. An Tag 56 des Experiments wurden die Mausschwänze auf den lymphatischen Abtransport von Methylenblau untersucht. Links ist ein Tier der Therapiegruppe, rechts ein Tier der Kontrollgruppe repräsentativ dargestellt.

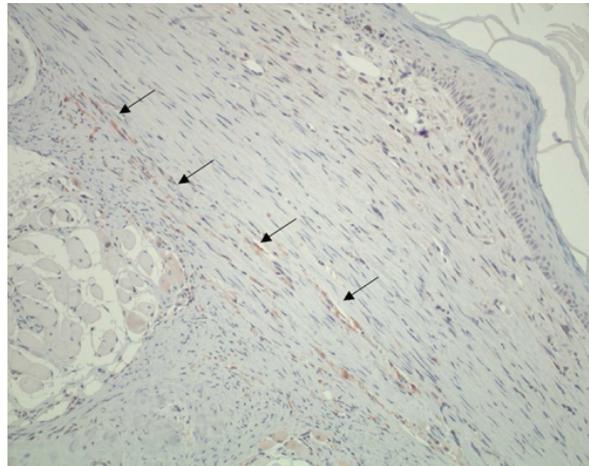


Abbildung 3.14: Anti-GFP-Immunhistologie des ödematösen Mausschwanzes nach subkutaner Gabe GFP-markierter Stammzellen

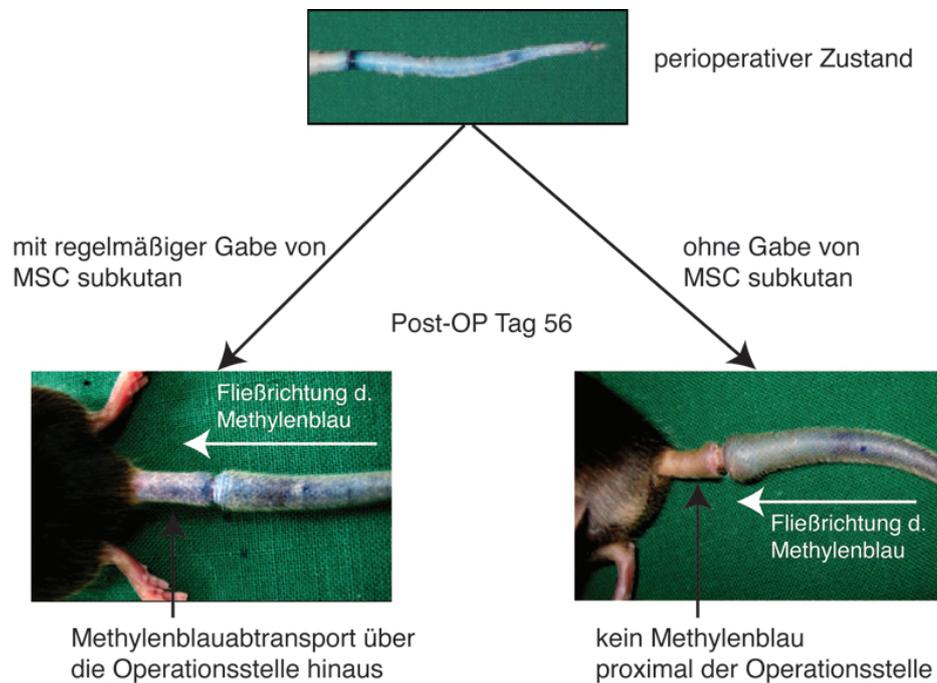


Abbildung 3.15: Funktionalitätsprüfung der Lymphgefäße an den Mausschwänzen von Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe

Man erkennt, dass es bei dem Tier der Therapiegruppe (mit Stammzellinjektionen) zum Abtransport des Methylenblau über die Operationsstelle hinaus kam. Dies spricht für das Vorhandensein von intakten Lymphgefäßen an der Stelle der Operation. Bei dem Tier der Kontrollgruppe (ohne Stammzellinjektionen) kam es indes zum Abbruch des Methylenblauabtransports von der distalen Einspritzstelle nach proximal. Dies spricht für das Fehlen von intakten Lymphgefäßen. Auch nach einer halben Stunde konnte kein Abtransport beobachtet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich der Stammzellgabe im murinen Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese:

- Durch die regelmäßige subkutane Gabe von mesenchymalen Stammzellen reduzierte sich das experimentelle Lymphödem, gemessen am Durchmesser des Mausschwanzes, signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.
- Immunhistochemisch war sich auf Höhe der Operationsstelle eine vermehrte Anzahl an Podoplanin⁺ Lymphgefäßen bei Tieren der Therapiegruppe im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe zu finden.
- Die injizierten GFP⁺ Stammzellen ließen sich durch immunhistochemische Markierung des GFP im Subkutangewebe darstellen. GFP⁺ Lymphendothelzellen konnten mit dieser Methode nicht erkannt werden.
- Durch distale, intradermale Injektion von Methylenblau an den Mausschwänzen am 56. postoperativen Tag zeigte sich ein lymphatischer Abtransport des Methylenblau über die Operationsstelle hinaus nur in der Therapiegruppe, nicht jedoch in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Versuchen der Lymphangiogenese:

- Die humane, mesenchymale Stammzelllinie V54/2 änderte durch Konditionierung mit Überstand von isolierten Lymphendothelzellen ihren Phänotyp zu einem Phänotyp mit endothelialen Charakteristika.
- In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigten V54/2 durch Konditionierung mit VEGF-C (C156S), Überstand von HDMEC und Überstand von LEC eine Steigerung der Expression von VEGFR-2, VEGFR-3 und Podoplanin.
- V54/2 zeigten im Migration-Assay in einer modifizierter Boydenkammer ein signifikant verstärktes Migrationsverhalten zu Kulturmedium, das mit VEGF-C angereichert wurde.
- Die murinen, mesenchymalen Stammzellen Balb/c zeigten durch Konditionierung mit VEGF-C (C156S) und Überstand von HDMEC eine Hochregulation der mRNA der lymphendothelialer Marker Podoplanin und Prox-1. Dies konnte mit Hilfe von reverser Transkriptase PCR festgestellt werden. Messenger RNA des VEGFR-3 war sowohl auf den unkonditionierten, als auch konditionierten Zellen zu finden.
- Der CC Chemokinrezeptor 7 (CCR7), der mit Lymphangiogenese in Verbindung gebracht wird, konnte per Taqman® PCR und durchflusszytometrischer Analyse sowohl auf den humanen V54/2 als auch auf den murinen Balb/c mesenchymalen Stammzelllinien nachgewiesen werden.
- Der Ligand des CCR7, CCL19, zeigte im Migrations-Assay einen verstärkten Migrationsanreiz für V54/2.
- Im murinen Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese bewirkte die regelmäßige subkutane Stammzellinjektion einen Rückgang des Lymphödems. Immunhistochemisch konnte in der Therapiegruppe eine erhöhte Anzahl an Lymphgefäßen nachgewiesen werden.
- Die injizierten Stammzellen zeigten sich im Subkutangewebe des Mausschwanzes.
- Die Funktionalität der Lymphgefäße der Therapiegruppe konnte mit intradermalen Injektionen von Methylenblau am distalen Schwanzende durch Abtransport über das Operationsgebiet bestätigt werden.

3.2 Ergebnisse der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms vorgestellt. Im Mittelpunkt der Versuche stehen die durch PD Dr. P. J. Nelson gentechnisch hergestellten, mesenchymalen Stammzellen, die ein Tie2-getriggertes Suizidgenkonstrukt, bzw. Reportergenkonstrukt tragen, die unter 2.1.3.1 auf Seite 38 erläutert wurden. Diese Stammzellen wurden in einem Tiermodell mit orthotoper Transplantation von syngenem Pankreastumorzellen „Panc02“ *in vivo* untersucht. Mittels dieses Tiermodells wurden mehrere Einzelexperimente durchgeführt, um sowohl eine mögliche Integration der Stammzellen in den wachsenden Tumor und die daraus resultierenden Auswirkungen zu detektieren, als auch eine denkbare therapeutische Wirkung des Suizidgens *Tymidinkinase* zu erkennen und, falls dies der Fall ist, eine Optimierung des Therapieregimes zu erwirken. Für den Nachweis der Stammzellen und die Funktionalität des Genkonstruktes bedienten wir uns verschiedener Methoden, deren Ergebnisse nacheinander vorgestellt werden. Mit dem Chemotaxis-Assay stand uns zudem ein *in vitro* Modell zur Untersuchung des Migrationsverhaltens mesenchymaler Stammzellen unter den chemotaktischen Einflüssen der Pankreaskarzinomzellen zur Verfügung.

3.2.0.4 Migration-Assay der p53^{-/-} C57BL/6 MSC mit Genkonstrukten

Im Migration-Assay lassen sich Aussagen über das aktive Migrations- und Invasionsverhalten von Zellen gegenüber bestimmten chemotaktischen Reizen treffen. In unserem Experiment inkubierten wir die beiden mesenchymalen Stammzelllinien C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ bzw. C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/*Tk*⁺, durch einen Filter mit 8 μ m Poren getrennt, mit Überstand der ebenfalls im Tierexperiment verwendeten Pankreastumorzelllinie „Panc02“. Der Überstand wurde in einer Verdünnungsreihe mit Assay-Medium gemischt in die Kammern der Migrationsplatte gegeben.

In Abbildung 3.16 auf der nächsten Seite sind jeweils die Mittelwerte der drei individuellen Messungen der Fluoreszenz in der unteren Kammer, gemessenen zu den Zeitpunkten 0h und 4h, aufgetragen. Die Balken stellen die Standardabweichung dar. Signifikanzermittlung erfolgte durch die zweifaktorielle ANOVA-Testung (Varianzanalyse) mit einem Konfidenzintervall von 95%. Sowohl die Variable Zeit, als auch die Variable Panc02-Überstand zeigten sich in beiden Versuchsansätzen als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Wie die beiden Graphiken in Abbildung 3.16 auf der nächsten Seite erkennen lassen, migrierten die respektiven Stammzelllinien verstärkt zu dem Überstand von Panc02 - Pankreaskarzinomzellen, je höher dessen Konzentration war. Dies stellte sich durch die signifikant höhere Fluoreszenz der Gruppen mit hoher Konzentration an Panc02-Überstand,

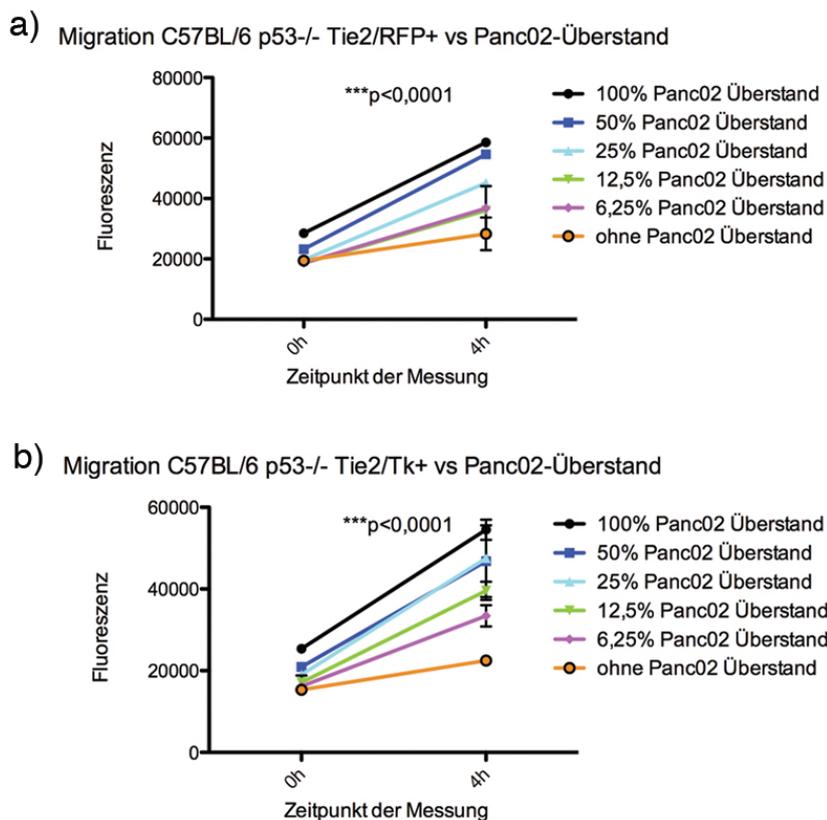


Abbildung 3.16: Migration der C57BL/6 p53^{-/-} MSC gegen Überstand von Panc02

gemessen in der unteren Kammer der Migrationsplatte, im Vergleich zur Fluoreszenz der Gruppe ohne Panc02-Überstand (Indexgruppe) dar. Diese Indexgruppe repräsentierte die Migration der Stammzellen zu dem reinen Assay-Medium. Die Messung bei 0h jeder Gruppe stellte die jeweilige Hintergrundfluoreszenz dar und ist von dem Wert bei 4h abzuziehen. Aus diesen korrigierten Werten ließen sich die so genannten Migrationsindizes für jede Versuchsgruppe bilden (siehe Abbildung 3.17 auf der nächsten Seite). Der Migrationsindex wurde durch das Verhältnis zwischen hintergrundkorrigierter Fluoreszenz jeder Versuchsgruppe und der hintergrundkorrigierten Fluoreszenz der Indexgruppe bestimmt.

In Abbildung 3.17 auf der nächsten Seite sind die Migrationsindizes der drei Einzelversuche im Mittel aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen ungepaarten t-tests, bei einem Konfidenzintervall von 95%, ermittelt. Unter (a) erkennt man, dass die Migration bei höheren Panc02 Konzentrationen signifikant zunahm. So folgten die C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ mesenchymalen Stammzellen bei 25% Panc02-Überstand einem signifikant stärkeren Migrationsdrang als bei 12,5% bzw. 6,25%. Bei 100% Panc02-Überstand war bei derselben Zellreihe ebenfalls ein statistisch signifikant höherer Migrationsindex als bei 6,25% zu verzeichnen. Da die Versuchsmedien, abgesehen

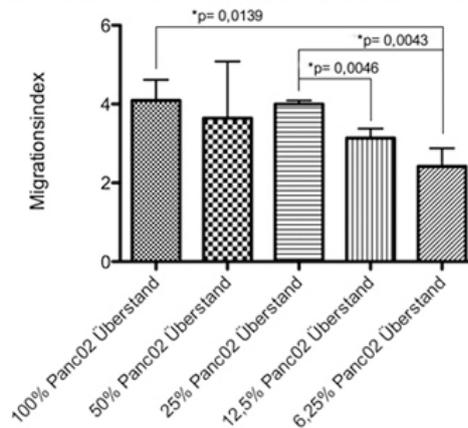
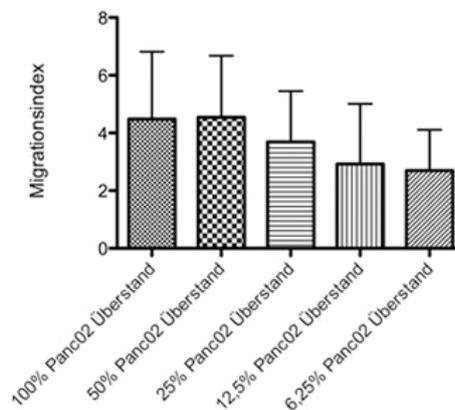
a) Migrationsindizes C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk vs. Panc02-Überstandb) Migrationsindizes C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP vs. Panc02-Überstand

Abbildung 3.17: Migrationsindizes der transfizierten, murinen, mesenchymalen Stammzelllinien gegen Überstand von Panc02

von dem Zusatz von Panc02-Überstand (welche ebenfalls in Assay-Medium in Kultur gehalten wurden), die gleichen waren, ist der Unterschied im Migrationsverhalten wahrscheinlich auf die von den Panc02 ausgeschütteten Zytokine zurückzuführen. Unter (b) zeigt sich ein ähnliches Bild. Alle Versuchsgruppen zeigten einen Migrationsindex > 2 an, was für eine doppelt so starke Migration der Zellen gegen den Panc02-Überstand im Vergleich zu reinem Assay-Medium spricht. Allerdings ließen sich bei den C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ mesenchymalen Stammzellen keine statistisch signifikante Unterschiede untereinander feststellen.

3.2.1 Orthotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom

3.2.1.1 Tumorgewicht

Versuch #1

In dieser Versuchsreihe wurden die Mäuse zwei Wochen nach Tumorimplantation in die verschiedenen, unter Kapitel 2.2.2.2 auf Seite 55 beschriebenen, Versuchsgruppen randomisiert und zu diesem Zeitpunkt wurde mit den intravenösen Stammzellinjektionen begonnen. Die Injektionen erfolgten im Durchschnitt jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg. Anschließend wurden die Mäuse sakrifiziert und die Hauptzielgröße „Tumorgewicht“ sofort ermittelt.

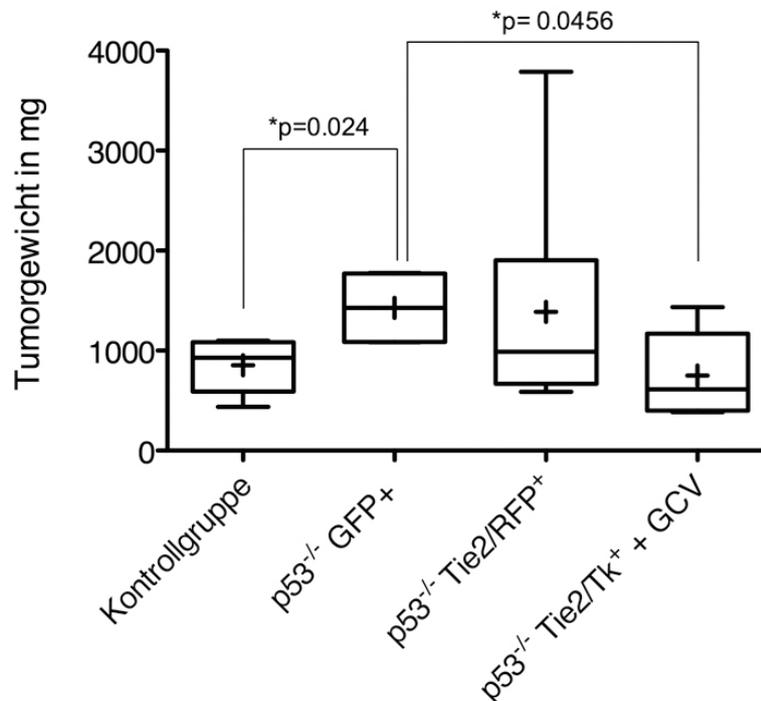


Abbildung 3.18: Pankreastumorgewichte aus Versuch #1

In Abbildung 3.18 stellen die Boxen die 25.-75. Perzentile dar. Die Balken zeigen das minimale und maximale Tumorgewicht jeder Versuchsgruppe, das Kreuz den Mittelwert und die horizontale Linie den Median. Die Signifikanztestung erfolgte durch den ungepaarten, zweiseitigen t-Test (Konfidenzintervall 95%) jeder Gruppe mit der Kontrollgruppe, bzw. der Gruppen untereinander.

Die Versuchsgruppe der mit C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ mesenchymalen Stammzellen behandelten Tiere zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ein statistisch signifikant größeres mittleres Tumorgewicht. Die Versuchsgruppe, der C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ i.v.

Gruppenvergleiche des Tumorgewichts zu Versuch #1	p-Wert
„Kontrollgruppe“ vs. „p53 ^{-/-} GFP ⁺ - Gruppe“	*p = 0,0240
„Kontrollgruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ -Gruppe“	p = 0,3165
„Kontrollgruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/Tk ⁺ + GCV-Gruppe („Therapiegruppe“)	p = 0,6439
„p53 ^{-/-} GFP ⁺ - Gruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/RFP-Gruppe“	p = 0,9512
„p53 ^{-/-} GFP ⁺ - Gruppe“ vs. „Therapiegruppe“	*p = 0,0456
„p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ - Gruppe“ vs. „Therapiegruppe“	p = 0,2964

Tabelle 3.1: Statistik zu Versuch#1

verabreicht wurde, erzielte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ebenso ein im Mittelwert größeres Tumorgewicht, das jedoch keine statistische Signifikanz erbrachte. Die Therapiegruppe, der C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ + GCV infundiert wurde, wies einen gering niedrigeren, statistisch insignifikanten Tumorwachstum als die Kontrollgruppe auf. Zudem offenbarte sie ein statistisch signifikant niedrigeres mittleres Tumorgewicht als die mit C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ behandelte Versuchsgruppe, was eventuell für das Aufheben eines möglichen stammzellvermittelten Tumorwachstums durch die Suizidgentherapie spricht. In Abbildung 3.19 sind die entnommenen Tumore, nach Versuchsgruppe geordnet, fotografisch abgebildet.

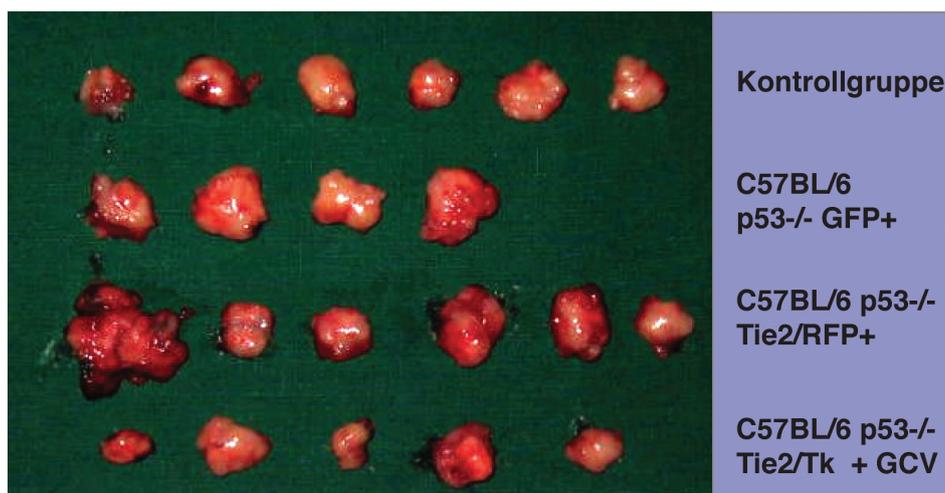


Abbildung 3.19: Fotografische Darstellung der entnommenen Tumore

Versuch #2

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Injektionsregime auf eine Stammzellgabe wöchentlich verringert und die Gabe von GCV auf drei konsekutive Tage, vier Tage nach Stammzellgabe, umgestellt (siehe Abbildung 2.8 auf Seite 58). Zusätzlich zum ersten Versuch wurde eine Versuchsgruppe mit alleinigen GCV-Injektionen, ohne vorige Stammzellgabe, in den Versuchsplan aufgenommen, und die Versuchsgruppe der C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ MSC Injektionen wurde abgeschafft. Wir legten das Versuchsende auf das Ende des dritten Behandlungszyklus fest und entschieden uns wiederum für das Tumorgewicht als Hauptzielgröße. Mit den Injektionen begannen wir abermals zwei Wochen nach Tumorimplantation.

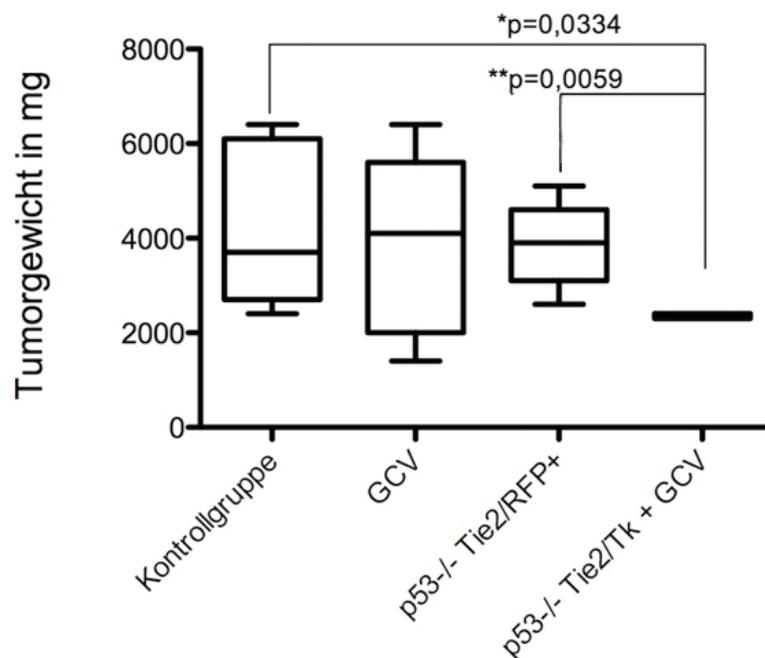


Abbildung 3.20: Tumorgewichte aus Versuch #2

Die Boxen in Abbildung 3.20 stellen die 25.-75. Perzentile dar und die Balken das minimale und maximale Gewicht jeder Versuchsgruppe. Die horizontale Linie in den Boxen zeigt den Median. Signifikanztestung erfolgte durch den ungepaarten, zweiseitigen t-Test (Konfidenzintervall 95%) jeder Gruppe mit der Kontrollgruppe und untereinander.

Versuch #2 zeigte ein statistisch signifikant niedrigeres mittleres Tumorgewicht in der mit C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ - und GCV-Injektionen behandelten „Therapiegruppe“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem unterschieden sich die mittleren Tumorgewichte der Therapiegruppe und der mit C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ behandelten Gruppe signifikant voneinander. Die Gruppen der alleinigen Ganciclovirgabe und alleiniger Stammzellgabe (C57BL/6

Gruppenvergleiche des Tumorgewichts zu Versuch #2	p-Wert
„Kontrollgruppe“ vs. „GCV-Gruppe“	$p = 0,7247$
„Kontrollgruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ -Gruppe“	$p = 0,6857$
„Kontrollgruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/Tk ⁺ + GCV-Gruppe“ („Therapiegruppe“)	$*p = 0,0334$
„GCV-Gruppe“ vs. „p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ -Gruppe“	$p = 0,9903$
„GCV-Gruppe“ vs. „Therapiegruppe“	$p = 0,1057$
„ p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ - Gruppe“ vs. „Therapiegruppe“	$*p = 0,0059$

Tabelle 3.2: Statistik zu Versuch#2

p53^{-/-} Tie2/RFP⁺) unterschieden sich weder signifikant von der Kontrollgruppe noch untereinander. Der Unterschied im mittleren Tumorgewicht zwischen der GCV-Gruppe und der Therapiegruppe war nicht signifikant.

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Tumorgewicht :

- Das verwendete Tiermodell hatte eine hohe Validität, da alle Modelltiere zum Versuchsende nach 4, bzw. 5 Wochen einen makroskopisch sichtbaren Tumor exprimierten.
- Durch die intravenöse Gabe der „nicht-therapeutischen“ Stammzellen C57BL/6 p53^{-/-} RFP⁺ in großer Zahl wurde das Tumorstadium, gemessen am Tumorgewicht, signifikant beschleunigt
- Dieser Effekt konnte in der Therapiegruppe, der die „therapeutischen“ C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ mesenchymalen Stammzellen verabreicht wurde, durch die Gabe von Ganciclovir aufgehoben werden.
- Durch die Änderung des Injektionsregimes, gekennzeichnet durch weniger Stammzellapplikationen und mehr Ganciclovir-Gaben, konnte das Tumorstadium in Versuch 2 signifikant gehemmt, oder rückgängig gemacht werden.

3.2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Pankreaskarzinome, die in Versuch #1 isoliert wurden, präparierten wir wie beschrieben durch Einlage in Tissue-Tek® mit anschließender Kühlung in flüssigem Stickstoff. Die Tu-

more wurden als $5\mu m$ dicke Kryoschnitte auf Objektträger aufgetragen. Nach Anfärbung der Zellkerne mit DAPI untersuchten wir sie in der Fluoreszenzmikroskopie auf die, durch die Stammzellen exprimierte Fluoreszenzfarbstoffe GFP bzw. RFP.

C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺

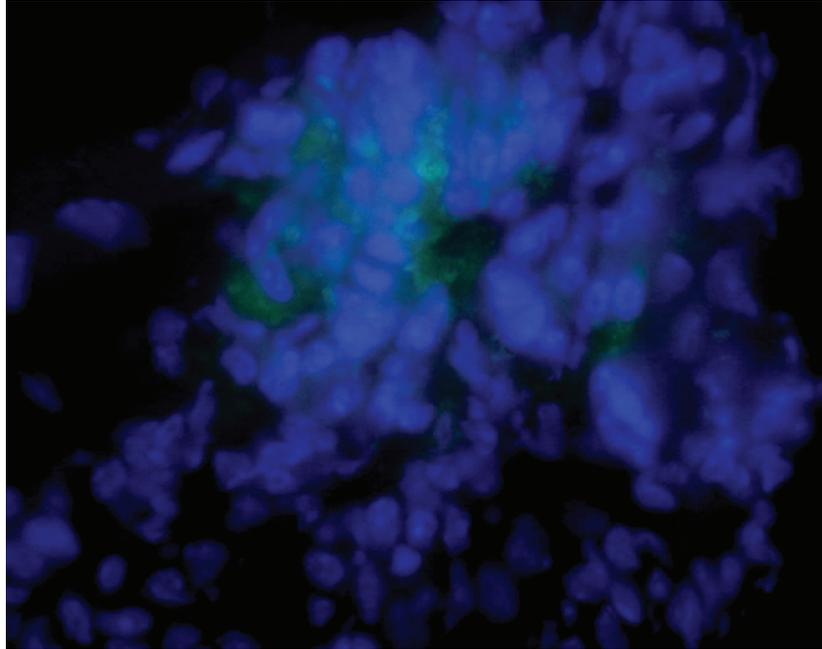


Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopie Pankreastumor GFP⁺

In Abbildung 3.21 sind die Einzelbilder der respektiven Fluoreszenzkanäle DAPI und GFP zusammengesetzt. Die Vergrößerung beträgt den Faktor von ungefähr 1000.

In allen Tumoren, der mit C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ injizierten Gruppe, aus Versuch #1 des orthotopen Tiermodells zum Pankreaskarzinom stellten sich grün fluoreszierende Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Die grünen Fluoreszenzsignale korrelierten mit der Anwesenheit von DAPI⁺ Zellkernen. Da das GFP dauerhaft und ohne Promoterkontrolle exprimiert wurde, diente dieses Modell zur Detektion der Stammzellen ohne eine Aussage zur möglichen Differenzierung und Integration machen zu können.

C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺

Wir konnten zudem in Präparaten, der mit C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ behandelten Gruppe, des Versuchs #1 zum orthotopen Pankreaskarzinom rot fluoreszierende Zellen finden. Da der Farbstoff RFP unter Kontrolle des Tie2-Promoters exprimiert wird, spricht dies zum einen für ein funktionierendes Genkonstrukt und zum anderen dafür, dass sich die Stammzellen möglicherweise an der Angiogenese des Tumors beteiligen, da Tie2 in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt.

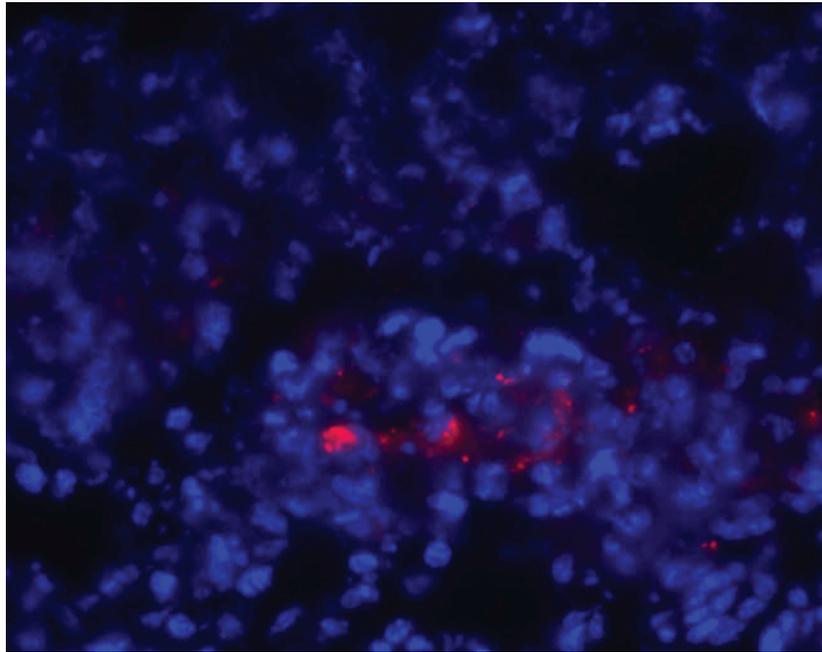


Abbildung 3.22: Fluoreszenzmikroskopie Pankreaskarzinom RFP⁺

Wieder wurden die Bilder der respektiven Fluoreszenzkanäle von DAPI und RFP übereinander gelegt. Vergrößerung: ca. 600fach.

Zusammenfassung der Fluoreszenzmikroskopie:

- Die C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ markierten mesenchymalen Stammzellen konnten unter anderem im Pankreastumor entdeckt werden. Dies spricht für eine Rekrutierung der intravenös applizierten Stammzellen in den Tumor.
- Mögliche Differenzierungen der Stammzelle konnten durch die C57BL/6 p53^{-/-} GFP⁺ MSC nicht gezeigt werden.
- Die C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ genkonstrukt-tragenden mesenchymalen Stammzellen konnten in geringerer Zahl ebenfalls im Tumor gesichtet werden.
- Aufgrund der Kopplung des RFP an den angiogenese-spezifischen Promoter Tie2 sprach die Detektierung der Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie für eine mögliche Beteiligung der MSC an der Tumorangiogenese.
- RFP Signale konnten in keinem anderen Organ gesichtet werden, was für die Spezifität des Genkonstrukts im Tumor spricht.

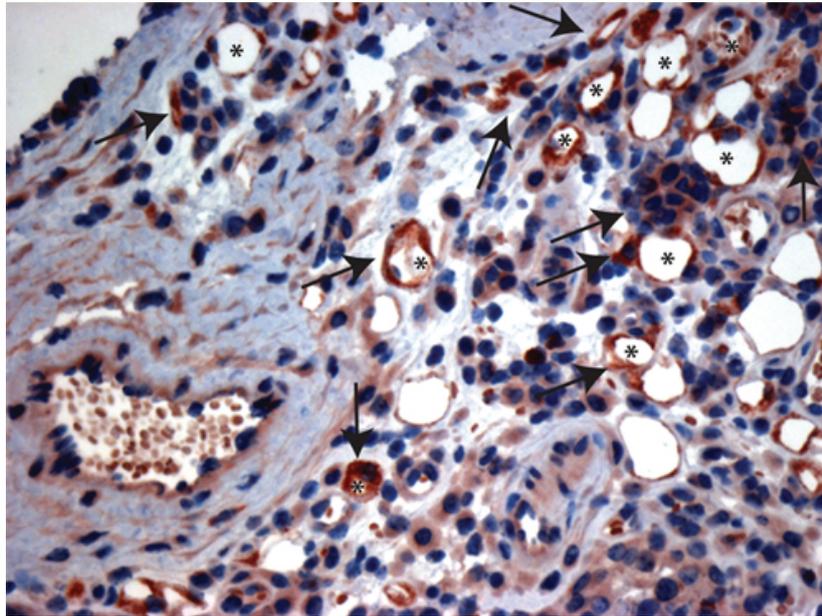


Abbildung 3.23: Immunhistochemie anti-RFP des Pankreastumor

3.2.1.3 Immunhistologie anti-RFP

Abbildung 3.23 zeigt ein Schnittbild eines Pankreaskarzinoms aus einem, mit C57BL/6 $p53^{-/-}$ RFP⁺ behandelten Tier, in 400-facher Vergrößerung. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin. In der Abbildung ist die Peripherie des Tumors zu erkennen.

Neben der direkten Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 3.22 auf der vorherigen Seite), ließen sich die verabreichten Stammzellen, unter besserer Beurteilbarkeit der Morphologie, durch Markierung mit einem anti-RFP Antikörper immunhistochemisch nachweisen. In diesem Schnittbild erkennt man die rot gefärbten Zellen (durch Pfeile markiert) in der Nähe von gefäßartigen Strukturen (durch * markiert). Dies spricht wiederum für ein funktionsfähiges Genkonstrukt und lässt den Rückschluss zu, dass das Genkonstrukt der „therapeutischen“ Stammzelllinie C57BL/6 $p53^{-/-}$ Tie2/*Tk*⁺ ebenfalls zur Wirkung kommt. Die Tatsache, dass die Angiogenese vorrangig in der Tumorperipherie stattfindet, bestätigt die Theorie, dass sich die Stammzellen unter anderem an der Angiogenese des Tumors beteiligen, da wir sie wie in diesem Schnittbild in der Tumorperipherie wiederfanden.

3.2.1.4 Quantitative Taqman®-PCR RFP

Zur Quantifizierung der Menge an RFP im Tumorgewebe wurde ein Teil der Tumore aus Kontrollgruppe und stammzellbehandelter Gruppe nach Entnahme einer RNA Isolierung unterzogen. Anschließend wurde mittels Taqman® quantitativer PCR die Menge von RFP-mRNA

gemessen. Jeder Tumor wurde in zwei identischen, unabhängigen Experimenten untersucht und die Hintergrund-korrigierten CT-Werte wurden mit bActin als „Housekeeping“-Gen abgeglichen und anschließend gemittelt.

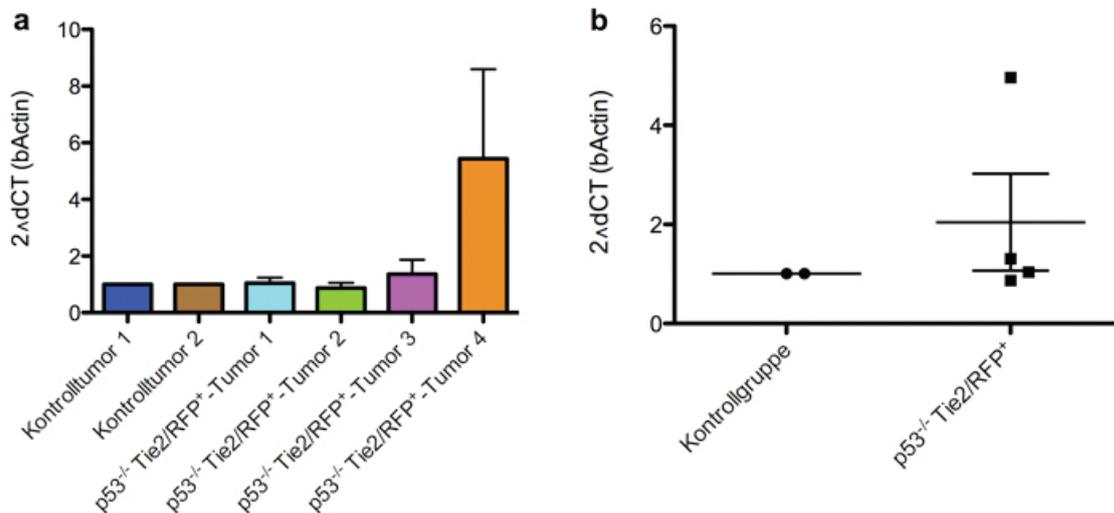


Abbildung 3.24: Quantitative RT-PCR (Taqman) der Tumore auf RFP-RNA

Dargestellt sind in Abbildung 3.24, unter (a) die Mittelwerte der Einzelmessungen der CT-Werte der Tumore mit Standardabweichung, angegeben als Potenz von 2, abgeglichen mit dem „Housekeeping“-Gen bActin. Unter (b) sind dieselben Messwerte gruppiert aufgetragen. Der Balken repräsentiert den Mittelwert mit Standardabweichung, die Punkte die Mittelwerte der Einzelmessungen. Zu erkennen ist, dass vor allem in Tumor #4 eine vielfach erhöhte Konzentration von RFP-mRNA im Tumorgewebe ermittelt wurde. Die Kontrolltumore exprimierten wie erwartet kein RFP, da sie nicht mit den entsprechenden Stammzellen behandelt wurden. Jedoch auch die Tumore #1 und #2 der Stammzell-behandelten Gruppe zeigten keine Expression von RFP-RNA. In Tumor #3 konnte eine RFP-Expression mit einem $2^{\Delta dCT}$ Wert von 1,3 festgestellt werden. In Tumor #4 belief sich die RFP-Expression auf einen $2^{\Delta dCT}$ Wert von 4,9.

Zusammenfassung der quantitativen RT-PCR (TaqMan®) Untersuchung auf RFP:

- Die Kontrolltumore zeigten wie erwartet keine RFP-Expression. Dies spricht für die hohe Spezifität der Methode.
- Von den Tumoren, die C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ mesenchymale Stammzellen erhielten, konnte nur in zwei von vier Tumoren eine messbar erhöhte RFP-RNA-Konzentration detektiert werden. Diese beliefen sich auf die $2^{\Delta dCT}$ Werte von 1,3 bzw. 4,9.

Zusammenfassung der Versuche zur stammzellbasierten Suizidtherapie des Pankreaskarzinoms:

- Die beiden Stammzelllinien C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ und C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/*Tk*⁺ zeigten im Chemotaxis-Assay in einer modifizierten Boyden-Kammer eine verstärkte Migration zu Überstand von Panc02 Pankreaskarzinomzellen.
- Die Gabe von nicht-therapeutischen, immortalisierten mesenchymalen Stammzellen führte im Tierversuch mit orthotopem Pankreaskarzinom zu einem beschleunigten Wachstum der Tumore, gemessen an deren Gewicht.
- Die Gabe von C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/*Tk*⁺ mesenchymalen Stammzellen mit anschließender Gabe von Ganciclovir konnte diesen Effekt aufheben und führte bei entsprechend optimiertem Injektionsregime zu einer Reduktion des Tumorgewichts.
- Die intravenös applizierten, GFP-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie in den Tumoren nachgewiesen werden.
- Die intravenös applizierten C57BL/6 p53^{-/-} Tie2/RFP⁺ mesenchymalen Stammzellen ließen sich ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie in den Tumoren nachweisen. Dies spricht für die Funktionalität des Genkonstrukts.
- In der Immunhistochemie zeigte sich das RFP in Zellen in unmittelbarer Nähe von gefäßartigen Strukturen in der Tumorperipherie.
- RNA, die für das RFP kodiert, ließ sich mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (TaqMan®) in zwei der vier untersuchten Tumore nachweisen.

Kapitel 4

Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit untersucht die mögliche Beteiligung von klonalen, mesenchymalen Stammzellen an der Lymphangiogenese und deren Integration in das wachsende Pankreaskarzinom im Tiermodell. Zudem prüften wir einen Einsatz von gentechnisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Zu diesem Zweck wurden die Stammzellen mit dem Suizidgen „*Thymidinkinase*“ des Herpes simplex Virus unter Kontrolle des Promoters „Tie2“ transfiziert und ließen sich so nach Anschaltung des Genkonstrukts im Tumor durch Gabe von Ganciclovir abtöten.

4.1 Lymphangiogenese

Über den zellulären Ursprung von Lymphendothelzellen und anderen Zellen der Lymphangiogenese, insbesondere auch über die Beteiligung von Stammzellen an dieser, herrscht Uneinigkeit. Aus der Embryologie ist bekannt, dass Lymphendothelzellen zum Großteil durch Ausprossung von venösen Endothelzellen entstehen (Srinivasan et al., 2007; Karkkainen et al., 2004). Allerdings gibt es auch Daten, die einen mesodermalen Ursprung von einigen Lymphendothelzellen im Embryo einer Maus zeigten und somit einen dualen Ursprung der Lymphendothelzellen im Säugetier vermuten lassen (Buttler et al., 2008). In gleicher Weise ist dies auch schon bei Vögeln gezeigt worden (Wilting et al., 2006).

Die Beteiligung von Stammzellen an der Lymphangiogenese wurde erst durch wenige Arbeitsgruppen erforscht und auch hier ist die Datenlage kontrovers. He et al. zum Beispiel zeigten, dass knochenmarksstämmige, endotheliale Progenitorzellen (EPC) an der Tumorumlymphangiogenese und Bildung von lymphatischen Metastasen nicht signifikant beteiligt sind. Vielmehr waren es die bereits existierenden Lymphendothelien, die im Tumor wiedergefunden werden konnten (He et al., 2004). Diese Daten wurden an chimären Mäusen gewonnen, die nach Myeloablation mit fluoreszenzmarkierten Knochenmarkszellen transplantiert wurden. Weder in einem Tumormodell, noch durch VEGF-C Überexpression wurden in diesen Mäusen fluoreszenzmarkierte Zellen in Lymphgefäßen entdeckt.

Andere Arbeitsgruppen hingegen haben gezeigt, dass Stammzellen möglicherweise doch eine Rolle in der Lymphangiogenese spielen. Sowohl im Tierversuch als auch beim erwachsenen Menschen wurden zirkulierende, lymphendotheliale Vorläuferzellen (Lymphangioblasten bzw. circulating endothelial progenitor cells) nachgewiesen, die zum Teil aus dem Knochenmark stammen und zur entzündungs-assoziierten Lymphangiogenese beitragen (Kerjaschki et al., 2006; Religa et al., 2005).

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bereits existierende Endothelzellen nicht als die einzige Quelle von Lymphendothelzellen gelten können. So wurde die Existenz von mesenchymalen Zellen mit lymphendothelialen (LYVE-1⁺, Prox-1⁺) und makrophagenartigen (F4/80⁺) Charakteristika nachgewiesen und über deren Beteiligung an der embryonalen, entzündungs-assoziierten und tumor-assoziierten Lymphangiogenese berichtet (Buttler et al., 2008; Schledzewski et al., 2006; Schoppmann et al., 2002). Außerdem gibt es Hinweise, die darauf hindeuten, dass diese lymphatischen Vorläuferzellen nach Infektion mit HHV-8 möglicherweise die Ursprungszellen des Kaposi-Sarkoms darstellen. Dies wurde in Studien an Patienten nach Nierentransplantationen mit nachfolgender Immunsuppression gezeigt. Die Spindelzellen des Kaposi-Sarkoms weisen stark positive lymphatische Marker auf, wobei die genaue Histogenese bis heute jedoch nicht vollständig geklärt ist (Buttler et al., 2008; Barozzi et al., 2003; Pyakurel et al., 2006).

Auch unterscheidet sich der Mechanismus der Lymphgefäßentstehung durch mesenchymale Vorläuferzellen von dem der aussprossenden Endothelzellen. Die lymphatischen Vorläuferzellen zeigen eher eine gerichtete Migration von Einzelzellen im Bindegewebe in Richtung des interstitiellen Flusses mit anschließender Bildung eines Gefäßlumens. Erst danach erfolgt die Vereinigung mit den existierenden Lymphgefäßen. Dieser Mechanismus konnte in einem, dem unseren Modell sehr ähnlichen, Tiermodell am Mausschwanz gezeigt werden (Rutkowski et al., 2006). Im Gegensatz dazu sprossen bereits existierender Endothelzellen vom intakten Gefäß aus. Es existieren zwei denkbare Mechanismen mithilfe derer die makrophagen-ähnlichen Mesenchymzellen die Lymphangiogenese fördern könnten: Zum einen durch die eigene Transdifferenzierung in Endothelzellen und Integration in Lymphgefäße, zum anderen durch parakrine Stimulation der Zellteilung von existierenden Lymphendothelzellen, z.B. durch die Ausschüttung von VEGF-C (Buttler et al., 2008).

Unsere Versuche zeigen erstmals, dass neben den oben erwähnten Zellen auch mesenchymale Stammzellen, sowohl humanem als auch murinen Ursprungs, *in vitro* zur Differenzierung zu Zellen mit lymphendothelialen Charakteristika befähigt sind. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass zirkulierende und gewebestämmige Stamm- und Progenitorzellen an der Lymphangiogenese beteiligt sind. Bei den Versuchen *in vitro* lag unser Hauptaugenmerk auf der lymphatischen Differenzierung der Stammzellen. Wir versuchten dies durch Kokultivierungen mit verschiedenen Faktoren zu erreichen. Dabei untersuchten wir neben den humanen auch

murine Stammzelllinien für die geplanten Tierversuche. Zu den *in vitro* applizierten lymph-induktiven Faktoren gehörten Überstände einer Mischkultur aus mikrovaskulären Lymph- und Blutendothelzellen (HDMEC) und daraus isolierten Lymphendothelzellen (LEC). Wir wählten diese Zellreihen aufgrund der Annahme, dass sie wichtige, „pro-angiogene“ Faktoren parakrin sezernieren. Desweiteren gaben wir humanes hoch aufgereinigtes VEGF-C sowohl vom Wildtyp, als auch in der Splicevariante VEGF-C (C156S), das nur den VEGFR-3 bindet, zu den Zellen hinzu.

Wir konnten mit Hilfe des mikroskopischen Vergleichs der humanen Stammzelllinie V54/2 in unkonditioniertem Zustand und nach Konditionierung mit Überstand von LEC eine Änderung der Morphologie mit endothelialem Phänotyp beobachten. Diese endotheliale Morphologie ist der von Blutendothelzellen ähnlich Oswald et al. (2004). Die FACS-Analyse derselben Zelllinie, zudem mit weiteren lymph-induktiven Faktoren, bestätigte die vermutete Änderung des Phänotyps. So zeigten die Zellen durch die Konditionierung mit den Überständen, bzw. mit VEGF-C (C156S) eine prozentuale Erhöhung der Podoplanin⁺-, VEGFR2⁺- und VEGFR3⁺-Fraktion. Podoplanin, vor allem in Kombination mit VEGFR-3, gilt als ein weitestgehend lymphspezifischer Marker. Somit lässt sich die Ausbildung eines lymphendothelialen Phänotyps durch die Konditionierung vermuten. Ferner lassen unsere Daten der FACS-Analyse die Vermutung zu, dass zu einer solchen Phänotypänderung besonders der Signalprozess am VEGFR-3 nötig ist, da die VEGFR-3 spezifische Splicevariante VEGF-C (C156S) eine ähnliche Potenz zur Induktion von Podoplaninexpression hatte wie die Überstände von HDMEC. Besonders die konditionierung der Stammzellen mit LEC führte zu einer Hochregulierung von Podoplanin, was für noch nicht identifizierte, parakrine Faktoren der LEC spricht und sicher weiterer Forschung bedarf. Ähnliche Ergebnisse sind von *in vitro* Experimenten mit embryonalen Stammzellen bekannt. Hier ist in artifiziell erzeugten Subpopulationen der embryonalen Stammzellen der Signalweg am VEGFR-3 entscheidend für eine lymphendotheliale Differenzierung (Suzuki et al., 2005). Es ist bekannt, dass LEC im Gegensatz zu Blutendothelzellen so gut wie kein VEGF-C produzieren (Kriehuber et al., 2001). Neben VEGF-C sind in der Literatur nur ein paar Wachstumsfaktoren beschrieben, die eine lymphatische Differenzierung bewirken. Zu diesen zählen Mitglieder der Familie der IIGF, der „hepatocyte growth factor“, FGF 2, PDGF und Angiopoietin (Bjorndahl et al., 2005; Cao et al., 2006; Chang et al., 2004; Eriksson und Alitalo, 1999). Der genaue Mechanismus, durch den diese Faktoren die Lymphangiogenese positiv beeinflussen und insbesondere der Einfluss dieser Wachstumsfaktoren auf MSC im Rahmen der Lymphangiogenese sind bisher nicht ausreichend geklärt. Die Erforschung dieser Faktoren und die Suche nach weiteren lymphangiogenetischen Faktoren wären wichtige Schritte, die das Verständnis der Biologie von MSC erweitern und die hier vorliegenden Daten ergänzen würden.

In der embryologischen Entwicklung des Lymphgefäßsystems spielt VEGF-C als chemotak-

tische Substanz, die das Aussprossen der Endothelzellen aus der Kardinalvene bewirkt, eine entscheidende Rolle (Karkkainen et al., 2004). Um der Frage nach gerichtetem Migrationsverhalten der mesenchymalen Stammzellen zu Geweben mit erhöhten Konzentrationen von VEGF-C, nachzugehen, wurden die humanen Stammzellen V54/2 in einer modifizierten Boydenkammer unter Verwendung von VEGF-C untersucht. Sowohl unkonditionierte, als auch die mit VEGF-C vorbehandelten Stammzellen zeigten gegenüber Medium, das mit VEGF-C angereichert wurde, ein stärkeres Migrationsverhalten als gegenüber nativem Medium. Hervorzuheben gilt, dass der Migrationsindex der vorbehandelten Zellen höher war, als jener der nicht vorbehandelten Zellen, was ebenfalls durch einen geänderten Phänotypen in Richtung der Lymphendothelzelle mit konsekutiv verstärkter Migrationsaktivität erklärt werden könnte. Da bekannt ist, dass MSC zur Migration über Endothelzellbarrieren *in vivo* befähigt sind, liegt die Vermutung nahe, dass zirkulierende MSC unter anderem durch den chemotaktischen Reiz von VEGF-C aus den Blutgefäßen und durch das Gewebe zu stattfindender Lymphangiogenese „gelockt“ werden (Schmidt et al., 2006). Aus der Erforschung der Blutgefäße ist bekannt, dass MSC in ihrer Funktion als Perizyten in Tumorgefäßen in hohem Maße VEGF, den Hauptwachstumsfaktor der Angiogenese, bilden (Beckermann et al., 2008). Daher wäre von Interesse, ob MSC auch zur Bildung von VEGF-C befähigt sind und sich so eventuell über einen autokrinen „loop“ zur Differenzierung zu Lymphendothelzellen anregen bzw. diese über einen parakrinen Mechanismus anziehen.

Aus den Vorarbeiten von Kriehuber et al. ist ebenfalls bekannt, dass von den Endothelzellen nur LEC den CCR7-Liganden CCL21 exprimieren und dass dieser möglicherweise der Zellnavigation zu den Lymphgefäßen und deren Integration in diese dient (Kriehuber et al., 2001). Interessanterweise exprimieren die von uns untersuchten mesenchymalen Stammzelllinien V54/2 und Balb/c den CC Chemokine Receptor 7 (CCR7), was wir durch die Experimente mittels quantitativer Taqman®-PCR und FACS Analyse bestätigen konnten. Wir versuchten, die durch Kerjaschki et al. aufgestellte These, der möglichen Rolle von CCR7 in der Rekrutierung zirkulierender, lymphendothelialer Progenitorzellen an der humanen Stammzelllinie V54/2 zu er testen. Es zeigte sich, dass V54/2 im Chemotaxis Versuch eine verstärkte Migration zu dem, neben CCL21 anderen CCR7-Liganden, CCL19 demonstrieren. Eine durch diesen Mechanismus bzw. durch CCL21 vermittelte Invasion der MSC in die sich bildenden Lymphgefäße im Rahmen der von uns vermuteten Beteiligung der MSC an der Lymphangiogenese ist daher möglich (Kerjaschki et al., 2004). Eine Interaktion von CCR7 und dem durch die Lymphendothelzellen exprimierten CCL21, findet im Rahmen der Immunantwort statt. Die Expression von CCR7 durch T-Zellen und dendritischen Zellen ist notwendig, um diesen das Eintreten in Lymphknoten bzw. in Lymphgefäße zu ermöglichen (Stein et al., 2000). Hier wäre ein ähnlicher Mechanismus in den mesenchymalen Stammzellen denkbar.

Mit einem ähnlichen Konditionierungsversuch, allerdings unter leichter Modifikation der

Versuchsgruppen, wurde die murine, mesenchymale Stammzelllinie Balb/c untersucht. Wir konnten nach fünfwöchiger Konditionierung in diesen Zellen mittels RT-PCR eine Hochregulation der Gene für Podoplanin und Prox-1 detektieren. Insbesondere war dies in der Gruppe durch HDMEC-Überstand konditionierten Zellen der Fall. Alle Zellen exprimierten zudem mRNA des VEGFR-3. Außerdem war zu erkennen, dass die Versuchsgruppe, der reines Endothelzellmedium zugegeben wurde, nicht dieselbe Hochregulation lymphatischer Gene zeigte, wie die Gruppe, die mit Überstand von HDMEC inkubiert wurde. Dies deutet auf einen reinen Effekt der durch HDMEC ausgeschütteten Substanzen hin und nicht auf einen Effekt der im Endothelzellmedium enthaltenen Substanzen.

Mesenchymale Stammzellen sind aufgrund ihres hohen Differenzierungspotentials und ihrer immun-modulierenden und proliferations-fördernden Eigenschaften bereits in vielen Krankheitsbildern auf ihre therapeutische Potenz hin untersucht worden. Ihre Gabe fand bei der Therapie der Osteogenesis imperfecta erstmals Übertragung in die klinische Anwendung (Horwitz et al., 1999). Der Einsatz von MSC in der Therapie von chronischem Lymphödem, einer langwierigen und entstellenden Krankheit, die bei vielen Patienten nach Lymphadenektomien zu finden ist, wurde jedoch bisher noch nicht evaluiert. Alle in dieser Arbeit aufgeführten in vitro Daten deuten auf eine lymphendotheliale Potenz der mesenchymalen Stammzellen hin. Zudem konnten wir mit CCR7 und VEGFR-3 zwei Rezeptoren auf den MSC finden, die gegebenenfalls die Migration und Integration der Zellen zu bzw. in die Lymphangiogenese vermitteln könnten. Ob die Stammzellen dadurch jedoch zu einer Verbesserung der Regenerationsfähigkeit von Lymphgefäßen beitragen und über welchen Mechanismus sie sich an der Lymphangiogenese beteiligen, versuchten wir in einem neu etablierten Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese am Mausschwanz zu klären. Wir konnten durch subkutane Injektionen von mesenchymalen Stammzellen distal der Operationswunde einen gesteigerten Abtransport der Lymphe, gemessen an dem niedrigeren mittleren Schwanzdurchmesser im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, erreichen. Bei den Tieren ohne Stammzellinjektion blieb der beobachtete Rückgang des Schwanzödems aus. Ferner konnten wir in immunhistologischen Schnitten eine deutlich erhöhte Anzahl an Podoplanin⁺ Lymphgefäßen auf Höhe der ehemaligen Operationsstelle in der Therapiegruppe erkennen. Die Funktionalität der gesehenen Lymphgefäße ließ sich durch die distale, subdermale Einspritzung von wenigen μ l Methylenblau darstellen. Hier erfolgte ein Abtransport des Farbstoffes über die Operationswunde nur bei Tieren der Therapiegruppe.

Nach Anfärbung von GFP⁺ MSC im Querschnittpräparat des Mausschwanzes der Therapiegruppe konnten die Stammzellen im subdermalen Gewebe wiederentdeckt werden. Trotz weiteren Forschungsbedarfs bezüglich der genauen Funktion von Stammzellen in der Lymphangiogenese, konnten wir eine lymphatische Differenzierung in vitro und eine Förderung der regenerativen Lymphangiogenese in vivo beobachten.

Es liegt die Vermutung nahe, dass mesenchymale Stammzellen eventuell durch Bereitstellung parakriner Faktoren das Migrationsverhalten, die Matrixinvasion, das Proliferationsvermögen und das Überleben der Endothelzellen unterstützen, wie sie dies bei Blutendothelzellen durch z.B. VEGF, bFGF, angiogenin, procathepsin B, Il-11 und bone morphogenic protein 2 erwirken (Potapova et al., 2007).

Die Ergebnisse unserer in vivo Versuche sprechen für einen möglichen therapeutischen Einsatz der Stammzellen bei Patienten mit chronischem Lymphödem, z.B. nach axillärer Lymphknotenexstirpation bei Mammakarzinom. Eine Steigerung des beobachteten Effekts lässt sich möglicherweise durch die Vorbehandlung der Zellen mit VEGF-C, die Kokultivierung mit Endothelzellen oder durch das Einbringen eines VEGF-C produzierenden Genkonstrukts in die Stammzellen bewirken. Die Gewinnung der Stammzellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut der Patienten wäre, ebenso wie die subkutane Applikation der Zellen, ein einfaches und klinisch leicht durchführbares Verfahren.

Die Entdeckung, dass Tumore via VEGF-C-Expression die Lymphangiogenese antreiben und somit die lymphatische Metastasierung von Tumorzellen fördern, führte zu vielen Versuchsansätzen mit dem Ziel der Inhibierung der Wirkung von VEGF-C. Dies wurde mit Hilfe von „small interfering“ RNA (siRNA), löslichen Antikörpern und Endostatinen erreicht. Diese Inhibierung bewirkte im Tierversuch eine geringere Rate an Tumorlymphangiogenese und verbesserte das Überleben der Versuchstiere (Roberts et al., 2006; Fukumoto et al., 2005; Chen et al., 2005). Da wir in dieser Arbeit darlegen konnten, dass MSC die Lymphangiogenese fördern, ist eine Untersuchung dieser in einem Modell zur tumorassoziierten Lymphangiogenese, besonders im Hinblick auf eine therapeutische Intervention, von äußerstem Interesse. Eine therapeutische Anwendung der Stammzellen bei lymphatisch metastasierenden Malignomen durch Einbringen eines Suizidgens mit „anti-lymphangiogenetischem“ Effekt, ähnlich wie in unseren Experimenten zum Pankreaskarzinom, wäre ein denkbarer Therapieansatz in der Onkologie.

4.2 Stammzellbasierte Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom gilt trotz intensiver Erforschung chemotherapeutischer Medikamente, Strahlentherapie und Optimierung der chirurgischen Resektionstechniken immer noch als nahezu unheilbare Krankheit. Vor allem die niedrige Konzentration der Chemotherapeutika im Tumorgebiet und die Ausbildung von Resistenzen gegen die verwendeten Chemotherapeutika schwächen deren Wirksamkeit und verhindern so eine möglicherweise kurative, operative Resektion in einem neoadjuvanten Vorgehen. Viele innovative Forschungsansätze, wie z.B. dem der Tumorstammzellvaccine, sind aufgrund von mangelnder Wirksamkeit an der klinischen Anwendung gescheitert.

In der Onkologie konnten viel versprechende Ergebnisse in der Therapie mancher Tumorentitäten mit anti-angiogenetischen Ansätzen erzielt werden. Erfolgreich in der klinischen Anwendung ist bereits das Medikament Bevacizumab, ein löslicher Antikörper gegen VEGF (Hurwitz et al., 2004). Die anti-angiogenetische Verwendung von gentechnisch veränderten Stammzellen, die mit Hilfe eines Suizidgens die Blutgefäßbildung des Tumors hemmen, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Ein solcher Ansatz wäre allerdings von großem Interesse, da er aufgrund der Tatsache, dass viele Tumore auf Blutgefäße angewiesen sind, eine breite klinische Anwendung finden würde. Allerdings ist nicht gesichert, in welchem Ausmaß zirkulierende Progenitor- und Stammzellen an der Tumorangio-genese beteiligt sind. Die hierzu vorliegenden Arbeiten variieren von einem hohen Anteil der Stammzellen an Tumorgefäßen bis zu einem geringen bis gar keinem. Wie es scheint, ist dies in besonderem Maße von der Tumorentität abhängig (Spring et al., 2005).

Bereits 1992 verwendete die Arbeitsgruppe um Culver die *Thymidinkinase* des Herpes simplex Virus zur Onkolyse. In einem orthotopen Rattengliommodell injizierten sie stereotaktisch und intrakraniell murine Fibroblasten, die einen retroviralen Vektor der HSV-*Tk* produzierten (als sog. „Vector producing cells (VPC)“) und damit die benachbarten Gliomzellen über mehrere Tage transduzierten (Culver et al., 1992). Die nachfolgende Administration von Ganciclovir führte zu einer sukzessiven Regression der Tumore. Die klinische Anwendung dieses neuartigen Therapieansatzes in modifizierter Form an Patienten mit Glioblastomen war jedoch ernüchternd und lieferte keine verbesserte Überlebensrate (Stockhammer et al., 1997; Shand et al., 1999; Rainov, 2000). Die Problematik der verwendeten Methodik lag zum einen darin, dass die Tumorzellen direkt transfiziert werden mussten und zum anderen darin, dass eine zu geringe Transfektionsrate der Tumorzellen vorlag: nur ca. 1% bei Patienten im Gegensatz zu bis zu 20% im Tierversuch (Hutterer et al., 2006).

Trotz der niedrigen Anzahl an transfizierten Tumorzellen kommt es über den Austausch der toxischen Endprodukte des GCV durch Gap-Junctions und Phagozytose durch andere

Zellen zur Abtötung benachbarter, untransfizierter Krebszellen. Dieses Phänomen wird mit dem so genannten „Bystander“-Effekt bezeichnet (Freeman et al., 1993). Es zeigte sich zudem, dass besonders die Transfektion von Endothelzellen der Tumorgefäße mit HSV-*Tk* zu einem sehr starken Bystander-Effekt führt und damit einen großen tumor-toxischen Effekt ausübt (Hutterer et al., 2006). Es bleibt jedoch die Problematik der insuffizient niedrigen direkten Transfektionsrate durch die verwendeten VPC.

Mesenchymale Stammzellen tragen zur Bildung des tumor-umgebenden Gewebes bei und besitzen eine hohe Affinität zu malignen Tumoren. Sie können im Tumor als so genannte „Carcinoma-associated Fibroblasts (CAF)“ nachgewiesen werden und beteiligen sich als solche an der Tumorangiogenese, fördern das Tumorwachstum und exprimieren myofibroblastische Züge (Kuniyasu et al., 2001; Mishra et al., 2008). Aufgrund der relativen Einfachheit der Stammzellgewinnung aus peripherem Blut oder Knochenmark liegt die Überlegung nahe, diese Stammzellen im Rahmen einer stammzellvermittelten Therapie zur Einbringung von tumortoxischen Substanzen zu verwenden. Diese Überlegung lag den Versuchen von Studeny et al. zugrunde, in denen sie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark durch adenoviralen Gentransfer mit INF- β transfizierten und nach Injektion dieser modifizierten Zellen eine Reduktion des Tumorwachstums im Tierversuch erreichen konnten (Studeny et al., 2002). Sie bewiesen damit zum einen das Vorkommen der mesenchymalen Stammzellen im Tumorstroma, und zum anderen die Eignung der Stammzellen als Überbringer von Chemotherapeutika im erweiterten Sinn. Durch die Verwendung der Stammzelle als Vehikel der tumortoxischen Substanz INF- β konnte eine lokale Konzentration dieser Substanz im Tumor erreicht werden, die um ein Vielfaches über der tolerablen Konzentration bei systemischer Gabe von INF- β lag. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die von uns verwendeten mesenchymalen Stammzelllinien C57Black/6 p53^{-/-} Tie2/Tk⁺ und C57Black/6 p53^{-/-} Tie2/RFP in einem modifizierten Migration-Assay zu Überstand der Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 migrierten. Dies spricht für einen aktiven Homing-Mechanismus der Stammzellen und steht im Einklang mit den erwähnten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Stammzellekrutierung in den Tumor erkennen konnten. In dem von uns verwendeten Tiermodell mit orthotopem Pankreaskarzinom konnten wir nach systemischer Applikation von C57Black/6 p53^{-/-} GFP⁺ die Stammzellen mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie im Tumorgewebe wiederfinden.

In unseren Versuchen kombinierten wir die angeführten Vorarbeiten zu einer Suizidgen-therapie mit HSV-*Tk* und benutzten knochenmarksstämmige, mesenchymale Stammzellen als Vehikel zur Überbringung des Suizidgens. In Anlehnung an Vorarbeiten von de Palma planten wir, durch Kopplung des Genkonstrukts an den angiogenetischen Promoter Tie2 eine tumorspezifische Expression des Genkonstrukts zu erwirken. Der Einsatz von Tie2 als Steuerelement des Suizidgens wurde in diesen Versuchen in ähnlicher Weise mit Erfolg erreicht. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen, wurden diese Experimente unter Verwendung einer

unterschiedlichen Stammzelllinie (hämatopoetische Stammzellen) und unterschiedlicher Tumormodelle (Lewis-Lung-Cancer, Mammakarzinom) durchgeführt. Es konnten Ergebnisse in Bezug auf die Tumorintegration und Genkonstrukt-funktionalität erzielt werden, die unseren Ergebnissen ähneln (De Palma et al., 2003).

Die Ergebnisse unserer Versuche am orthotopen Tiermodell zum Pankreaskarzinom in der Maus zeigen, dass mit Hilfe dieses Therapieansatzes bei systemischer Injektion von suizidgen-transfizierten Stammzellen mit anschließender Gabe von Ganciclovir eine Reduktion des Tumorgewichts im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe möglich ist. Durch die Verwendung von RFP als fluoreszierendes „Reporterprotein“ anstelle des Suizidgens HSV-*Tk* unter Kontrolle von Tie2 konnten wir die Funktionalität des verwendeten Genkonstrukts im Pankreastumor bestätigen und aufgrund der Abwesenheit in anderen Organen (v.a. sekundär lymphatischen) eine erhoffte Tumorspezifität des Genkonstrukts bestätigen. In einer klinischen Anwendung würde dies eine effektive Therapie des Tumors bei Schonung der gesunden Organe bedeuten. Es gelang uns zudem die RNA von RFP im Tumorgewebe durch quantitative Taqman® RT-PCR nachzuweisen.

Wie sich gezeigt hat, wird Tie2 sowohl auf Endothelzellen als auch auf Perizyten exprimiert. In den Perizyten bewirkt die Hypoxie und das Vorhandensein von VEGF – beide Zustände sind in Tumoren stark vertreten – eine gesteigerte Expression von Tie2 (Park et al., 2003; Schnürch und Risau, 1993). In mesenchymalen Stammzellen konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Differenzierungsfähigkeit zu Blutendothelzellen nachgewiesen werden (Oswald et al., 2004; Silva et al., 2005). Auch konnte gezeigt werden, dass MSC zu Perizyten, in einem noch größeren Maß als zu Endothelzellen, differenzieren und dadurch die Gefäßreifung fördern. MSC produzieren auf diese Weise auch eigenständig VEGF und regen damit die Angiogenese an (Beckermann et al., 2008).

Aufgrund dieser Tatsachen versuchten wir durch die Kopplung des Genkonstrukts an den Promoter Tie2 neben der Tumorspezifität des Konstrukts vor allem eine Transfektion von späteren Endothelzellen und Perizyten zu erreichen, da in diesen, wie erwähnt, der Bystander-Effekt am Größten ist (Hutterer et al., 2006). In der Tat konnten wir in der immunhistochemischen Färbung von RFP die markierten Zellen perizytär, in der Nähe von Tumorgefäßen finden und schließen daher auf eine teilweise endotheliale bzw. perizytäre Differenzierung der transplantierten Stammzellen.

Durch die Injektion von nicht-therapeutischen Stammzellen wurde ein stärkeres Tumorstadium ausgelöst. Besonders ist dies in Versuch #1 zu erkennen, in dem verhältnismäßig viele Stammzellen injiziert wurden. Dies steht im Einklang mit den beschriebenen Beobachtungen anderer Forschergruppen (Zhu et al., 2006; Djouad et al., 2006). Der genaue Mechanismus hinter dieser Wachstumssteigerung liegt möglicherweise zum einen in den immunsuppressiven Eigenschaften von MSC, zum anderen in der erwähnten Bereitstellung von tumorunterstüt-

zenden Stromazellen (Xu et al., 2007; Mishra et al., 2008). Diese Tatsache sollte die klinische Anwendung der mesenchymalen Stammzellen im Kontext einer Tumorthherapie überdenken lassen und es sollte sichergestellt werden, dass alle injizierten Zellen durch das Suizidgenkonstrukt getötet werden können, da sich dadurch der wachstumsfördernde Effekt aufheben lässt. Dies konnten wir in der Therapiegruppe in Versuch #1 zeigen. Möglicherweise ist jedoch eine vollständige Abtötung der injizierten Zellen durch die Kopplung an den Tie2-Promoter nicht vollständig gegeben. Daher bedarf es einer weiterführenden Analyse der Anzahl überlebender, transplanteder Stammzellen nach GCV-Gabe.

Da Tie2 jedoch nicht ausschließlich auf den Endothelzellen der Angiogenese vertreten ist, sondern auch auf Immunzellen, wie den Tie2-exprimierenden Monozyten (TEM) und Makrophagen, die zum Teil als Perizyten gefäßmodulierend an der Tumorangio-genese beteiligt sind und möglicherweise auch von mesenchymalen Stammzellen ausgehen können, ist nicht nur mit einem anti-angiogenetischen Effekt der therapeutischen Stammzellen zu rechnen, sondern möglicherweise ebenfalls mit einem „anti-Stroma“-Effekt (De Palma et al., 2005; Du et al., 2008). Diese Theorie deckt sich mit der Tatsache, dass sich die RFP-exprimierenden Zellen in den immunhistochemischen Präparaten auch in Gefäßnähe und nicht ausschließlich als Endothelzellen darstellten.

Die Herstellung und Erprobung von weiteren Genkonstrukten, die zum einen andere „targets“ der Angiogenese, wie z.B. VEGF, zum anderen jedoch auch die Beteiligung der Stammzellen am Tumorstroma im Rahmen der desmoplastischen Reaktion, beispielsweise durch den CCL5/RANTES Promoter als konstruktsteuernde Promoter, verwenden sind weitere viel versprechende Ansätze.

Um die Rate an nicht therapeutischen und dadurch möglicherweise tumorfördernden mesenchymalen Stammzellen gering zu halten, wurde, wie in der Zelltransfektion üblich, ein Resistenzmechanismus inseriert. In unserem Fall verwendeten wir den Blasticidin-Resistenzmechanismus. Durch Zugabe von Blasticidin zur Zellkultur erreichten wir so eine sehr hohe Transfektionsrate in vitro und konnten sicherstellen, dass die Injektion von nicht therapeutischen, da nicht erfolgreich transfizierten, Stammzellen gering gehalten wurde.

Ein Punkt, der einer klinischen Anwendung der Stammzellen in der Form wie sie durch uns verwendet wurden im Wege steht, ist, dass in diesen Experimenten immortalisierte Stammzellen verwendet wurden. Diese Zellen bergen zwar ein eventuell erhöhtes karzinogenes Risiko, da bei ihnen durch Deletion von *p53* ein wichtiger Kontrollmechanismus im Zellzyklus außer Kraft gesetzt wurde, eine klinische Anwendung in dieser Form ist jedoch nicht vorgesehen. Aufgrund ihrer schnellen Teilungsrate ohne Differenzierung in Kultur und somit auch vereinfachter, konsekutiver Transfektion mit den Genkonstrukten war ihre Verwendung in unseren Experimenten unerlässlich. Wie Versuche von anderen Arbeitsgruppen gezeigt hatten, ist die durch HSV-*Tk* und GCV ausgelöste Apoptose unabhängig von *p53* (Wallace et al., 1996),

d.h. dass auch die von uns verwendeten Zellen trotz fehlendem p53 durch GCV in Apoptose getrieben werden können. Für eine klinische Anwendung ist ausschließlich die Verwendung von nicht immortalisierten, primären Stammzellen vorgesehen. Allerdings müssen für diese Zellen optimierte und sichere Transfektionsverfahren erprobt werden, um einen schnellen, stabilen und durch eine hohe Transfektionsrate ausgezeichneten Gentransfer zu ermöglichen.

Eine Verbesserung der Modulation der Genexpression in der karzinogenen Stammzellnische, ein effektiverer Gentransfer und die stabile Produktion des Genkonstrukts im vorhergesehenen biologischen Kontext ohne unerwünschte Nebenwirkung können zu neuen Therapieansätzen führen, die ihre Wirksamkeit in der klinischen Anwendung beweisen müssen. Wir konnten zeigen dass mesenchymale Stammzellen eine erstaunliche Plastizität besitzen, die sie zu einem vielversprechenden Ziel für neue therapeutische Strategien in der regenerativen Medizin und der Tumortherapie machen.

Kapitel 5

Synoptische Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den zwei folgenden Themen:

1. Die Beteiligung mesenchymaler Stammzelllinien an der Bildung neuer Lymphgefäße (Lymphangiogenese)
2. Die Anwendung mesenchymaler Stammzelllinien zur Überbringung eines Suizidgens zur Therapie des Pankreaskarzinoms

5.1 Zusammenfassung zum Thema „Mesenchymale Stammzelllinien in der Lymphangiogenese“

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir klonale, mesenchymale Stammzelllinien, sowohl humanem als auch murinem Ursprungs, auf ihr Differenzierungspotential zu Lymphendothelzellen *in vitro*, ihr Migrationsverhalten und ihre therapeutische Gabe in einem Tiermodell zur regenerativen Lymphangiogenese.

Um eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu erwirken, kultivierten wir sie über fünf Wochen entweder mit gereinigtem Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C), Überstand von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), Überstand von isolierten Lymphendothelzellen (LEC) oder reinem Endothelzellmedium. Methodisch wurde ein lymphendothelialer Phänotyp mit Hilfe von FACS-Analysen und RT-PCR durch die Expression eines der lymphendothelialen Marker Podoplanin, Prox-1 oder VEGFR-3 detektiert. Es zeigte sich, dass die Stammzelllinien durch die Konditionierung mit VEGF-C und Überstand von HDMEC bzw. LEC eine Änderung ihres Phänotyps mit erhöhter Expression der lymphendothelialen Marker vollziehen. Des Weiteren bildeten sie spindelartige Zellprotrusionen aus, die im Durchlichtmikroskop an die Morphologie von Endothelzellen erinnern lassen. Mit Hilfe von FACS und Taqman realtime-PCR konnten wir zudem zeigen, dass beide Stammzelllinien CCR7, ein Chemokinrezeptor, der unter anderem der Interaktion mit lymphatischem Endothel dient, exprimieren.

Ferner untersuchten wir die humane Stammzelllinie V54/2 auf ihr Migrationsverhalten zu erhöhten Konzentrationen von VEGF-C in einer modifizierten Boydenkammer. Sowohl un-konditionierte Stammzellen als auch Stammzellen, die mit VEGF-C vorbehandelt wurden, kamen zum Einsatz. Darüber hinaus führten wir ein Migrations-Assay mit CCL19, einem der CCR-7 Liganden, durch. Die Stammzelllinie V54/2 zeigte in diesen Versuchen ein verstärktes Migrationsverhalten zu VEGF-C und CCL19. Die Migration zu VEGF-C ließ sich durch vorherige Konditionierung der Zellen mit VEGF-C steigern.

Nachdem diese Ergebnisse *in vitro* klar zeigten, dass die hier untersuchten mesenchymalen Stammzelllinien zu einer Differenzierung zu Lymphendothelzellen befähigt sind und sie auf „lymphendotheliale Reize“ mit Migration zu diesen reagieren, etablierten wir ein Tiermodell mit regenerativer Lymphangiogenese zur Erforschung der Stammzelllinien *in vivo*. Die subkutane Applikation von Stammzellen über einen Zeitraum von sechs Wochen zeigte in diesem Tiermodell eine verbesserte Regeneration der chirurgisch komplett durchtrennten Lymphgefäße. Es kam zu einem verbesserten Abtransport des subdermal applizierten Methylenblaus in den Tieren, denen Stammzellen appliziert wurden. Diese Beobachtung ging mit einer größeren Anzahl an immunhistochemisch markierten, Podoplanin⁺ Lymphgefäßen in den Schnittpräparaten der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe einher. Außerdem konnten die Stammzellen nach vorheriger Markierung durch stabile Transfektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff GFP in den Schnittpräparaten wiedergefunden werden.

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass MSC durch entsprechende Konditionierung zu Zellen mit lymphendothelialen Charakteristika differenzieren, sie zu Orten von stattfindender Lymphangiogenese migrieren und dort die Regeneration von Lymphgefäßen fördern können. Letzteres könnte für eine mögliche klinische Anwendung der Zellen z.B. bei Patienten mit chronischem Lymphödem von Bedeutung sein. Ferner lassen die hier dargelegten Daten die Verwendung der Zellen für eine anti-lymphangiogene Therapie von lymphatisch metastasierenden Tumoren in Erwägung ziehen.

5.2 Zusammenfassung zum Thema „Die Verwendung mesenchymaler Stammzellen in einer stammzellbasierten Suizidtherapie des Pankreaskarzinoms“

In dieser vorliegenden Arbeit wird die Effektivität von suizidgen-tragenden, mesenchymalen Stammzelllinien zur Behandlung des Pankreaskarzinoms analysiert. Hierzu standen Zellreihen zur Verfügung, in die mittels Elektroporation verschiedene Gene artifiziell eingebracht wurden. Durch die Kopplung der Gene an den Promoter und Enhancer des angiogenese-spezifischen Rezeptors Tie2 wurde bewirkt, dass die transfizierten Zellen nur nach Differenzierung in Tie2⁺

Zellen das eingebrachte Gen exprimieren. Zum einen verwendeten wir Genkonstrukte, welche nach ihrer Aktivierung die Expression eines fluoreszierenden Reporterproteins zur Markierung der Zellen bewirkten. Zum anderen kamen Stammzellen zum Einsatz, in denen nach der Aktivierung über Tie2 das Suizidgen HSV-*Thymidinkinase* exprimiert wurde. Nach der Gabe der Prodrug Ganciclovir bewirkt die Thymidinkinase die Phosphorylierung von GCV, was zum apoptotischen Zelltod in der betroffenen Zelle und über den bystander-Effekt auch in den benachbarten Zellen führt.

Mit Hilfe eines Boydenkammer-Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beschriebenen Stammzellen eine verstärkte Migration zu Überstand der Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 vollziehen, was einem aktiven „Homing“ der Stammzellen zu Tumoren entspricht.

Wir untersuchten anschließend die hier verwendeten Stammzelllinien in einem Tiermodell mit orthotopen Pankreaskarzinomen. Hier zeigte sich, dass durch die Applikation von nicht-therapeutischen Stammzellen das Tumorwachstum signifikant gesteigert wurde. Stammzellen, die konstitutiv das „green fluorescent protein“ exprimieren und den Tieren intravenös verabreicht wurden, konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie in den Tumoren nachgewiesen werden. Dies bestätigte die „Tumoraffinität“ der mesenchymalen Stammzellen. Nach systemischer Verabreichung der Stammzellen, die unter Kontrolle von Tie2 das fluoreszierende Reporterprotein RFP exprimierten, gelang der Nachweis dieses Proteins mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie, Immunhistochemie und in einem Teil der Tumore mittels Taqman realtime PCR. Dies bewies die Funktionalität der gewebe-spezifischen Genexpression in den Stammzellen.

Der therapeutische Effekt der suizidtragenden Stammzellen wurde in dem gleichen Tiermodell evaluiert. Durch die intermittierende Gabe der HSV-*tk*-tragenden Stammzellen und Ganciclovir konnte das Tumorwachstum signifikant gehemmt werden.

Die Ergebnisse der Versuche zur stammzellbasierten Suizidgentherapie zeigen, dass mit dieser Methode ein klinisch potentiell erfolgreiches Mittel zur Therapie von malignen Erkrankungen geschaffen wurde.

Literaturverzeichnis

- Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M. M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E. E., Huang, B., Jackson, D. G., Ferrari, V. A., Tybulewicz, V., Lowell, C. A., Lepore, J. J., Koretzky, G. A. und Kahn, M. L.: Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins slp-76 and syk. In: *Science*, Band 299(5604):S. 247–51, 2003.
- Ahlgren, J. D.: Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. In: *Semin Oncol*, Band 23(2):S. 241–50, 1996.
- Akagi, K., Ikeda, Y., Miyazaki, M., Abe, T., Kinoshita, J., Maehara, Y. und Sugimachi, K.: Vascular endothelial growth factor-c (vegf-c) expression in human colorectal cancer tissues. In: *Br J Cancer*, Band 83(7):S. 887–91, 2000.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. und Clarke, M. F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 100(7):S. 3983–8, 2003.
- Al-Rawi, M. A., Watkins, G., Mansel, R. E. und Jiang, W. G.: The effects of interleukin-7 on the lymphangiogenic properties of human endothelial cells. In: *Int J Oncol*, Band 27(3):S. 721–30, 2005.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. und Perucho, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. In: *Cell*, Band 53(4):S. 549–54, 1988.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J. und Alvarez-Buylla, A.: Fusion of bone-marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. In: *Nature*, Band 425(6961):S. 968–73, 2003.
- Ambrose, Charles T.: Immunology's first priority dispute-an account of the 17th-century rudbeck-barthloin feud. In: *Cellular Immunology*, Band 242(1):S. 1–8, 2006.
- Aoki, H., Ohnishi, H., Hama, K., Shinozaki, S., Kita, H., Yamamoto, H., Osawa, H., Sato, K., Tamada, K. und Sugano, K.: Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. In: *J Cell Biochem*, Band 99(1):S. 221–8, 2006.

- Aprelikova, O., Pajusola, K., Partanen, J., Armstrong, E., Alitalo, R., Bailey, S. K., McMahon, J., Wasmuth, J., Huebner, K. und Alitalo, K.: Flt4, a novel class iii receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. In: *Cancer Res*, Band 52(3):S. 746–8, 1992.
- Apte, M. V., Park, S., Phillips, P. A., Santucci, N., Goldstein, D., Kumar, R. K., Ramm, G. A., Buchler, M., Friess, H., McCarroll, J. A., Keogh, G., Merrett, N., Pirola, R. und Wilson, J. S.: Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. In: *Pancreas*, Band 29(3):S. 179–87, 2004.
- Asellius, Gasparus: *De lactibus sive lacteis venis*. LB Bidellium, Milan, 1627.
- Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K. und Wasylyk, B.: Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1. In: *Embo J*, Band 20(18):S. 5139–52, 2001.
- Ayala, G. E., Dai, H., Tahir, S. A., Li, R., Timme, T., Ittmann, M., Frolov, A., Wheeler, T. M., Rowley, D. und Thompson, T. C.: Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. In: *Cancer Res*, Band 66(10):S. 5159–64, 2006.
- Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C. und Prockop, D. J.: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95(7):S. 3908–13, 1998.
- Bacac, M., Provero, P., Mayran, N., Stehle, J. C., Fusco, C. und Stamenkovic, I.: A mouse stromal response to tumor invasion predicts prostate and breast cancer patient survival. In: *PLoS ONE*, Band 1:S. e32, 2006.
- Bachem, M. G., Schunemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A. und Adler, G.: Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. In: *Gastroenterology*, Band 128(4):S. 907–21, 2005.
- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C. und Phinney, D. G.: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. In: *J Cell Biochem*, Band 89(6):S. 1235–49, 2003.
- Baldwin, M. E., Halford, M. M., Roufail, S., Williams, R. A., Hibbs, M. L., Grail, D., Kubo, H., Stacker, S. A. und Achen, M. G.: Vascular endothelial growth factor d is dispensable for development of the lymphatic system. In: *Mol Cell Biol*, Band 25(6):S. 2441–9, 2005.
- Ball, S. G., Shuttleworth, C. A. und Kielty, C. M.: Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. In: *J Cell Biol*, Band 177(3):S. 489–500, 2007.

- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M. und Jackson, D. G.: Lyve-1, a new homologue of the cd44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. In: *J Cell Biol*, Band 144(4):S. 789–801, 1999.
- Bansal, P. und Sonnenberg, A.: Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. In: *Gastroenterology*, Band 109(1):S. 247–51, 1995.
- Barcellos-Hoff, M. H. und Ravani, S. A.: Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. In: *Cancer Res*, Band 60(5):S. 1254–60, 2000.
- Barozzi, P., Luppi, M., Facchetti, F., Mecucci, C., Alu, M., Sarid, R., Rasini, V., Ravazzini, L., Rossi, E., Festa, S., Crescenzi, B., Wolf, D. G., Schulz, T. F. und Torelli, G.: Post-transplant kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. In: *Nat Med*, Band 9(5):S. 554–61, 2003.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. und Berman, D. M.: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. In: *Nature*, Band 432(7015):S. 324–31, 2004.
- Beazley, R. M. und Cohn, Jr., I.: Pancreatic cancer. In: *CA Cancer J Clin*, Band 31(6):S. 346–58, 1981.
- Beckermann, B. M., Kallifatidis, G., Groth, A., Frommhold, D., Apel, A., Mattern, J., Salnikov, A. V., Moldenhauer, G., Wagner, W., Diehlmann, A., Saffrich, R., Schubert, M., Ho, A. D., Giese, N., Buchler, M. W., Friess, H., Buchler, P. und Herr, I.: Vegf expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. In: *Br J Cancer*, Band 99(4):S. 622–31, 2008.
- Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., Parker, A. R., Shimada, Y., Eshleman, J. R., Watkins, D. N. und Beachy, P. A.: Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. In: *Nature*, Band 425(6960):S. 846–51, 2003.
- Bhowmick, N. A. und Moses, H. L.: Tumor-stroma interactions. In: *Curr Opin Genet Dev*, Band 15(1):S. 97–101, 2005.
- Bjorndahl, M., Cao, R., Nissen, L. J., Clasper, S., Johnson, L. A., Xue, Y., Zhou, Z., Jackson, D., Hansen, A. J. und Cao, Y.: Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 102(43):S. 15593–8, 2005.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. und Vescovi, A. L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. In: *Science*, Band 283(5401):S. 534–7, 1999.

- Boardman, K. C. und Swartz, M. A.: Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. In: *Circ Res*, Band 92(7):S. 801–8, 2003.
- Boggon, R. P. und Palfrey, A. J.: The microscopic anatomy of human lymphatic trunks. In: *J Anat*, Band 114(Pt 3):S. 389–405, 1973.
- Boiret, N., Rapatel, C., Veyrat-Masson, R., Guillouard, L., Guerin, J. J., Pigeon, P., Descamps, S., Boisgard, S. und Berger, M. G.: Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. In: *Exp Hematol*, Band 33(2):S. 219–25, 2005.
- Bonnet, D. und Dick, J. E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. In: *Nat Med*, Band 3(7):S. 730–7, 1997.
- Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. In: *J Exp Med*, Band 115:S. 453–66, 1962.
- Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G. und Kerjaschki, D.: Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. In: *Am J Pathol*, Band 151(4):S. 1141–52, 1997.
- Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., Diem, K., Weninger, W., Tschachler, E., Alitalo, K. und Kerjaschki, D.: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. In: *Am J Pathol*, Band 154(2):S. 385–94, 1999.
- Brittan, M., Braun, K. M., Reynolds, L. E., Conti, F. J., Reynolds, A. R., Poulson, R., Alison, M. R., Wright, N. A. und Hodivala-Dilke, K. M.: Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. In: *J Pathol*, Band 205(1):S. 1–13, 2005.
- Bromley, S. K., Thomas, S. Y. und Luster, A. D.: Chemokine receptor *ccr7* guides t cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. In: *Nat Immunol*, Band 6(9):S. 895–901, 2005.
- Brugge, W. R., Lauwers, G. Y., Sahani, D., Fernandez-del Castillo, C. und Warshaw, A. L.: Cystic neoplasms of the pancreas. In: *N Engl J Med*, Band 351(12):S. 1218–26, 2004.
- Bruns, C. J., Koehl, G. E., Guba, M., Yezhelyev, M., Steinbauer, M., Seeliger, H., Schwend, A., Hoehn, A., Jauch, K. W. und Geissler, E. K.: Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. In: *Clin Cancer Res*, Band 10(6):S. 2109–19, 2004.

- Bruns, C. J., Liu, W., Davis, D. W., Shaheen, R. M., McConkey, D. J., Wilson, M. R., Bucana, C. D., Hicklin, D. J. und Ellis, L. M.: Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. In: *Cancer*, Band 89(3):S. 488–99, 2000.
- Bruns, C. J., Shrader, M., Harbison, M. T., Portera, C., Solorzano, C. C., Jauch, K. W., Hicklin, D. J., Radinsky, R. und Ellis, L. M.: Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody dc101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. In: *Int J Cancer*, Band 102(2):S. 101–8, 2002.
- Buchler, M. W., Wagner, M., Schmied, B. M., Uhl, W., Friess, H. und Z'Graggen, K.: Changes in morbidity after pancreatic resection: toward the end of completion pancreatectomy. In: *Arch Surg*, Band 138(12):S. 1310–4; discussion 1315, 2003.
- Buttler, K., Ezaki, T. und Wilting, J.: Proliferating mesodermal cells in murine embryos exhibiting macrophage and lymphendothelial characteristics. In: *BMC Dev Biol*, Band 8(43):S. 43, 2008.
- Camacho, D., Reichenbach, D., Duerr, G. D., Venema, T. L., Sweeney, J. F. und Fisher, W. E.: Value of laparoscopy in the staging of pancreatic cancer. In: *Jop*, Band 6(6):S. 552–61, 2005.
- Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I. und Fisk, N. M.: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. In: *Blood*, Band 98(8):S. 2396–402, 2001.
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J. und Der, C. J.: Increasing complexity of ras signaling. In: *Oncogene*, Band 17(11 Reviews):S. 1395–413, 1998.
- Cao, R., Bjorndahl, M. A., Gallego, M. I., Chen, S., Religa, P., Hansen, A. J. und Cao, Y.: Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. In: *Blood*, Band 107(9):S. 3531–6, 2006.
- Cao, Y., Linden, P., Farnebo, J., Cao, R., Eriksson, A., Kumar, V., Qi, J. H., Claesson-Welsh, L. und Alitalo, K.: Vascular endothelial growth factor c induces angiogenesis in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95(24):S. 14389–94, 1998.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H. E. und Moore, M. A.: Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (cfu-f) and their progeny. In: *Blood*, Band 56(2):S. 289–301, 1980.

- Chang, L. K., Garcia-Cardena, G., Farnebo, F., Fannon, M., Chen, E. J., Butterfield, C., Moses, M. A., Mulligan, R. C., Folkman, J. und Kaipainen, A.: Dose-dependent response of fgf-2 for lymphangiogenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 101(32):S. 11658–63, 2004.
- Chen, Zhengtang, Varney, Michelle L, Backora, Matthew W, Cowan, Kenneth, Solheim, Joyce C, Talmadge, James E und Singh, Rakesh K: Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-c expression using small interfering rna vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. In: *Cancer Res*, Band 65(19):S. 9004–9011, 2005.
- Chung, L. W.: The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. In: *Cancer Surv*, Band 23:S. 33–42, 1995.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. und Wahl, G. M.: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: Aacr workshop on cancer stem cells. In: *Cancer Res*, Band 66(19):S. 9339–44, 2006.
- Colter, D. C., Sekiya, I. und Prockop, D. J.: Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 98(14):S. 7841–5, 2001.
- Conget, P. A. und Minguell, J. J.: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. In: *J Cell Physiol*, Band 181(1):S. 67–73, 1999.
- Conrad, C: *Vergleichende funktionelle und molekulare Charakterisierung humaner Zelllinienmodelle aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut bezüglich deren Stammzellpotenz und Plastizität*. Dissertation, LMU, 2004.
- Conrad, C., Gottgens, B., Kinston, S., Ellwart, J. und Huss, R.: Gata transcription in a small rhodamine 123(low)cd34(+) subpopulation of a peripheral blood-derived cd34(-)cd105(+) mesenchymal cell line. In: *Exp Hematol*, Band 30(8):S. 887–95, 2002.
- Conrad, C., Ischenko, I., Kohl, G., Wiegand, U., Guba, M., Yezhelyev, M., Ryan, A. J., Barge, A., Geissler, E. K., Wedge, S. R., Jauch, K. W. und Bruns, C. J.: Antiangiogenic and antitumor activity of a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor zd6474 in a metastatic human pancreatic tumor model. In: *Anticancer Drugs*, Band 18(5):S. 569–79, 2007.
- Cubilla, Antonio L. und Fitzgerald, Patrick J.: *Tumors of the exocrine pancreas*. Armed Forces Institute of Pathology under the auspices of Universities Associated for Research

- and Education in Pathology, Washington, D.C., 1984. By Antonio L. Cubilla and Patrick J. Fitzgerald. ill. Atlas of tumor pathology. Second series, fasc. 19 Accepted for publication 1982."
- Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. und Blaese, R. M.: In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. In: *Science*, Band 256(5063):S. 1550–2, 1992.
- 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. und Yancopoulos, G. D.: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. In: *Cell*, Band 87(7):S. 1161–1169, 1996.
- De Palma, M., Murdoch, C., Venneri, M. A., Naldini, L. und Lewis, C. E.: Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. In: *Trends Immunol*, Band 28(12):S. 519–24, 2007.
- De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L. S., Sampaolesi, M. und Naldini, L.: Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. In: *Cancer Cell*, Band 8(3):S. 211–26, 2005.
- De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C. und Naldini, L.: Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. In: *Nat Med*, Band 9(6):S. 789–95, 2003.
- Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I. und Charbord, P.: The stro-1+ marrow cell population is multipotential. In: *Cells Tissues Organs*, Band 170(2-3):S. 73–82, 2002.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. und Caux, C.: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. In: *J Exp Med*, Band 188(2):S. 373–86, 1998.
- Direkze, N. C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M. R. und Wright, N. A.: Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. In: *Cancer Res*, Band 64(23):S. 8492–5, 2004.
- Djouad, F., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Jorgensen, C. und Noel, D.: Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. In: *Transplantation*, Band 82(8):S. 1060–6, 2006.

- Dobbs, L. G., Williams, M. C. und Gonzalez, R.: Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type i cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type ii cells. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 970(2):S. 146–56, 1988.
- Donnenberg, V. S. und Donnenberg, A. D.: Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. In: *J Clin Pharmacol*, Band 45(8):S. 872–7, 2005.
- Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R. S., Werb, Z. und Bergers, G.: Hif1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. In: *Cancer Cell*, Band 13(3):S. 206–20, 2008.
- Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T. N., Libermann, T. A. und Oettgen, P.: Role of the ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific tie2 gene. In: *Circ Res*, Band 84(10):S. 1177–1185, 1999.
- Dube, A., Thai, S., Gaspar, J., Rudders, S., Libermann, T. A., Iruela-Arispe, L. und Oettgen, P.: Elf-1 is a transcriptional regulator of the tie2 gene during vascular development. In: *Circ Res*, Band 88(2):S. 237–244, 2001.
- Dumont, D. J., Gradwohl, G., Fong, G. H., Puri, M. C., Gertsenstein, M., Auerbach, A. und Breitman, M. L.: Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. In: *Genes Dev*, Band 8(16):S. 1897–909, 1994.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M. und Alitalo, K.: Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in vegf receptor-3. In: *Science*, Band 282(5390):S. 946–9, 1998.
- Dvorak, H. F.: Tumors: wounds that do not heal. similarities between tumor stroma generation and wound healing. In: *N Engl J Med*, Band 315(26):S. 1650–9, 1986.
- Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L. und Oliver, G.: Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. In: *Nat Genet*, Band 34(1):S. 53–8, 2003.
- Ebata, N., Nodasaka, Y., Sawa, Y., Yamaoka, Y., Makino, S., Totsuka, Y. und Yoshida, S.: Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. In: *Microvasc Res*, Band 61(1):S. 40–8, 2001.
- Egusa, H., Schweizer, F. E., Wang, C. C., Matsuka, Y. und Nishimura, I.: Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. In: *J Biol Chem*, Band 280(25):S. 23691–7, 2005.

- Eriksson, U. und Alitalo, K.: Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. In: *Curr Top Microbiol Immunol*, Band 237:S. 41–57, 1999.
- Fang, J., Dagenais, S. L., Erickson, R. P., Arlt, M. F., Glynn, M. W., Gorski, J. L., Seaver, L. H. und Glover, T. W.: Mutations in *foxc2* (*mfh-1*), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. In: *Am J Hum Genet*, Band 67(6):S. 1382–8, 2000.
- Farr, A. G., Berry, M. L., Kim, A., Nelson, A. J., Welch, M. P. und Aruffo, A.: Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in t-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. In: *J Exp Med*, Band 176(5):S. 1477–82, 1992.
- Farrow, B., Albo, D. und Berger, D. H.: The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. In: *J Surg Res*, Band 149(2):S. 319–28, 2008.
- Fernandez, E., La Vecchia, C., D’Avanzo, B., Negri, E. und Franceschi, S.: Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Band 3(3):S. 209–12, 1994a.
- Fernandez, E., La Vecchia, C., Porta, M., Negri, E., Lucchini, F. und Levi, F.: Trends in pancreatic cancer mortality in europe, 1955-1989. In: *Int J Cancer*, Band 57(6):S. 786–92, 1994b.
- Ferrara, N. und Henzel, W. J.: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 161(2):S. 851–8, 1989.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. und Mavilio, F.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. In: *Science*, Band 279(5356):S. 1528–30, 1998.
- Fischer, Franzcek U.K.-Herrig I. Constanzo U. Wen S. Schiesser M. Hoffmann U. Bollinger A., M.: Flow velocity of single lymphatic capillaries in human skin. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Band 270(1):S. 358–363, 1996.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. und Lipp, M.: *Ccr7* coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. In: *Cell*, Band 99(1):S. 23–33, 1999.
- Frank, K. B., Chiou, J. F. und Cheng, Y. C.: Interaction of herpes simplex virus-induced dna polymerase with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. In: *J Biol Chem*, Band 259(3):S. 1566–9, 1984.

- Fraser, J. R., Kimpton, W. G., Laurent, T. C., Cahill, R. N. und Vakakis, N.: Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. In: *Biochem J*, Band 256(1):S. 153–8, 1988.
- Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L. und Abraham, G. N.: The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. In: *Cancer Res*, Band 53(21):S. 5274–83, 1993.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A. und Ruadkow, I. A.: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. In: *Exp Hematol*, Band 2(2):S. 83–92, 1974.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. und Kulagina, N. N.: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Exp Hematol*, Band 4(5):S. 267–74, 1976.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. und Frolova, G. P.: Heterotopic of bone marrow.analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. In: *Transplantation*, Band 6(2):S. 230–47, 1968.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky, II, Shapiro und Petrakova, K. V.: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. In: *J Embryol Exp Morphol*, Band 16(3):S. 381–90, 1966.
- Fritz-Six, K. L., Dunworth, W. P., Li, M. und Caron, K. M.: Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. In: *J Clin Invest*, Band 118(1):S. 40–50, 2008.
- Fukumoto, Shunsuke, Morifuji, Masayo, Katakura, Yoshinori, Ohishi, Masamichi und Nakamura, Seiji: Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor c expression in tumor cells. In: *Clin Exp Metastasis*, Band 22(1):S. 31–38, 2005.
- Gage, F. H.: Mammalian neural stem cells. In: *Science*, Band 287(5457):S. 1433–8, 2000.
- Gale, N. W., Prevo, R., Espinosa, J., Ferguson, D. J., Dominguez, M. G., Yancopoulos, G. D., Thurston, G. und Jackson, D. G.: Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor lyve-1. In: *Mol Cell Biol*, Band 27(2):S. 595–604, 2007.
- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M. H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P. A., Wiegand, S. J. und Yancopoulos, G. D.: Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. In: *Dev Cell*, Band 3(3):S. 411–23, 2002.

- Galle, J., Sittig, D., Hanisch, I., Wobus, M., Wandel, E., Loeffler, M. und Aust, G.: Individual cell-based models of tumor-environment interactions: Multiple effects of cd97 on tumor invasion. In: *Am J Pathol*, Band 169(5):S. 1802–11, 2006.
- Gashev, Davis M.J.-Delp M. D. Zawieja D.C., A.A.: Regional variations of contractile activity in isolated rat lymphatics. In: *Micocirculation*, Band 11(6):S. 477–492, 2004.
- Gashev, Zawieja D.C., A.A.: Physiology of human lymphatic contractility: a historical perspective. In: *Lymphology*, Band 34(3):S. 124–134, 2001.
- Gasheva, Zawieja D.C.-Gashev A.A., O.Y.: Contraction-initiated no-dependant lymphatic relaxation: a self-regulatory mechanism in rat thoracic duct. In: *Journal of Physiology*, Band 575:S. 821–832, 2006.
- Gebhardt, C., Kohler, J. und Jurowich, C.: [carcinoma of the pancreas head, papilla vateri, and cystadenocarcinoma—different biologic entities and different results]. In: *Zentralbl Chir*, Band 128(5):S. 396–400, 2003.
- Gibson, U. E., Heid, C. A. und Williams, P. M.: A novel method for real time quantitative rt-pcr. In: *Genome Res*, Band 6(10):S. 995–1001, 1996.
- Goggins, M., Schutte, M., Lu, J., Moskaluk, C. A., Weinstein, C. L., Petersen, G. M., Yeo, C. J., Jackson, C. E., Lynch, H. T., Hruban, R. H. und Kern, S. E.: Germline brca2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. In: *Cancer Res*, Band 56(23):S. 5360–4, 1996.
- Goldstein, A. M., Fraser, M. C., Struewing, J. P., Hussussian, C. J., Ranade, K., Zametkin, D. P., Fontaine, L. S., Organic, S. M., Dracopoli, N. C., Clark, Jr., W. H. und et al.: Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16ink4 mutations. In: *N Engl J Med*, Band 333(15):S. 970–4, 1995.
- Gray, Henry: *Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Elsevier, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 39. Auflage, 2005.
- Gregory, J. L., Morand, E. F., McKeown, S. J., Ralph, J. A., Hall, P., Yang, Y. H., McColl, S. R. und Hickey, M. J.: Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via cc chemokine ligand 2. In: *J Immunol*, Band 177(11):S. 8072–9, 2006.
- Groger, M., Loewe, R., Holnthoner, W., Embacher, R., Pillinger, M., Herron, G. S., Wolff, K. und Petzelbauer, P.: Il-3 induces expression of lymphatic markers prox-1 and podoplanin in human endothelial cells. In: *J Immunol*, Band 173(12):S. 7161–9, 2004.

- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W. und Gimble, J. M.: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. In: *J Cell Physiol*, Band 189(1):S. 54–63, 2001.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A. und Simmons, P. J.: Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. In: *J Cell Sci*, Band 116(Pt 9):S. 1827–35, 2003.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T. und Nakanano, H.: Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. In: *J Exp Med*, Band 189(3):S. 451–60, 1999.
- Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D. und Williams, L. T.: A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive t lymphocytes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95(1):S. 258–63, 1998.
- Hahn, S. A., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Schutte, M., Rozenblum, E., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Yeo, C. J., Hruban, R. H. und Kern, S. E.: Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. In: *Cancer Res*, Band 56(3):S. 490–4, 1996a.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. und Kern, S. E.: Dpc4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. In: *Science*, Band 271(5247):S. 350–3, 1996b.
- Hamel, W., Magnelli, L., Chiarugi, V. P. und Israel, M. A.: Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. In: *Cancer Res*, Band 56(12):S. 2697–702, 1996.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.: The hallmarks of cancer. In: *Cell*, Band 100(1):S. 57–70, 2000.
- Hart, C. A., Brown, M., Bagley, S., Sharrard, M. und Clarke, N. W.: Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process. In: *Br J Cancer*, Band 92(3):S. 503–12, 2005.
- Harvey, N. L., Srinivasan, R. S., Dillard, M. E., Johnson, N. C., Witte, M. H., Boyd, K., Sleeman, M. W. und Oliver, G.: Lymphatic vascular defects promoted by prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. In: *Nat Genet*, Band 37(10):S. 1072–81, 2005.

- Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. A., Nakahara, K., Carthew, R. W. und Ruohola-Baker, H.: Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. In: *Nature*, Band 435(7044):S. 974–8, 2005.
- He, Y., Kozaki, K., Karpanen, T., Koshikawa, K., Yla-Herttuala, S., Takahashi, T. und Alitalo, K.: Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. In: *J Natl Cancer Inst*, Band 94(11):S. 819–25, 2002.
- He, Yulong, Rajantie, Iiro, Ilmonen, Maritta, Makinen, Taija, Karkkainen, Marika J, Haiko, Paula, Salven, Petri und Alitalo, Kari: Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. In: *Cancer Res*, Band 64(11):S. 3737–3740, 2004.
- Hebrok, M., Kim, S. K. und Melton, D. A.: Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development. In: *Genes Dev*, Band 12(11):S. 1705–13, 1998.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. und Storch, A.: Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. In: *J Cell Sci*, Band 117(Pt 19):S. 4411–22, 2004.
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J. und Heeschen, C.: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. In: *Cell Stem Cell*, Band 1(3):S. 313–23, 2007.
- Herrera, M. B., Bussolati, B., Bruno, S., Morando, L., Mauriello-Romanazzi, G., Sanavio, F., Stamenkovic, I., Biancone, L. und Camussi, G.: Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of cd44 following acute tubular injury. In: *Kidney Int*, Band 72(4):S. 430–41, 2007.
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. und Depinho, R. A.: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Genes Dev*, Band 20(10):S. 1218–49, 2006.
- Hiddemann, W.: *Die Onkologie*. Springer, Berlin ; New York, 2004. W. Hiddemann, H. Huber, C. Bartram [Herausgeber]. ill., ports. T. 1. Allgemeiner Teil : Epidemiologie, Pathogenese, Grundprinzipien der Therapie – T. 2. Spezieller Teil : Solide Tumoren, Lymphome, Leukämien.
- Hirakawa, S., Hong, Y. K., Harvey, N., Schacht, V., Matsuda, K., Libermann, T. und Detmar, M.: Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated

- blood vascular and lymphatic endothelial cells. In: *Am J Pathol*, Band 162(2):S. 575–86, 2003.
- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J. und Olson, L.: Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 99(4):S. 2199–204, 2002.
- Hong, Y. K., Harvey, N., Noh, Y. H., Schacht, V., Hirakawa, S., Detmar, M. und Oliver, G.: Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. In: *Dev Dyn*, Band 225(3):S. 351–7, 2002.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E. und Brenner, M. K.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. In: *Nat Med*, Band 5(3):S. 309–13, 1999.
- Horwitz, EM: Clarification of the nomenclature for msc: The international society for cellular therapy position statement. In: *Cytotherapy*, Band 7(5):S. 393–395, 2005.
- Hsu, S. M. und Raine, L.: Protein a, avidin, and biotin in immunohistochemistry. In: *J Histochem Cytochem*, Band 29(11):S. 1349–53, 1981.
- Huang, X. Z., Wu, J. F., Ferrando, R., Lee, J. H., Wang, Y. L., Farese, Jr., R. V. und Sheppard, D.: Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. In: *Mol Cell Biol*, Band 20(14):S. 5208–15, 2000.
- Huntington, GS und McClure, CFW: The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*felis domestica*). In: *American Journal of Anatomy*, Band 10:S. 177–311, 1910.
- Hurwitz, Herbert, Fehrenbacher, Louis, Novotny, William, Cartwright, Thomas, Hainsworth, John, Heim, William, Berlin, Jordan, Baron, Ari, Griffing, Susan, Holmgren, Eric, Ferrara, Napoleone, Fyfe, Gwen, Rogers, Beth, Ross, Robert und Kabbinavar, Fairouz: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. In: *N Engl J Med*, Band 350(23):S. 2335–2342, 2004.
- Huss, R., Heil, M., Moosmann, S., Ziegelhoeffer, T., Sagebiel, S., Seliger, C., Kinston, S. und Gottgens, B.: Improved arteriogenesis with simultaneous skeletal muscle repair in ischemic tissue by scl(+) multipotent adult progenitor cell clones from peripheral blood. In: *J Vasc Res*, Band 41(5):S. 422–31, 2004.
- Huss, R., Lange, C., Weissinger, E. M., Kolb, H. J. und Thalmeier, K.: Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent cd34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. In: *Stem Cells*, Band 18(4):S. 252–60, 2000.

- Hutterer, M., Gunsilius, E. und Stockhammer, G.: Molecular therapies for malignant glioma. In: *Wien Med Wochenschr*, Band 156(11-12):S. 351–63, 2006.
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D. und Hussain, M. A.: In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. In: *J Clin Invest*, Band 111(6):S. 843–50, 2003.
- in 't Anker, P. S., Noort, W. A., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A. B., van Bezooijen, R. L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H. H. und Fibbe, W. E.: Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. In: *Haematologica*, Band 88(8):S. 845–52, 2003.
- Ingham, P. W. und McMahon, A. P.: Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. In: *Genes Dev*, Band 15(23):S. 3059–87, 2001.
- Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., Fujii, H., Matsumoto, Y., Buchler, M. W. und Korc, M.: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. In: *Clin Cancer Res*, Band 3(8):S. 1309–16, 1997.
- Izumi, M., Miyazawa, H., Kamakura, T., Yamaguchi, I., Endo, T. und Hanaoka, F.: Blastocidin s-resistance gene (bsr): a novel selectable marker for mammalian cells. In: *Exp Cell Res*, Band 197(2):S. 229–33, 1991.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. und Weinberg, R. A.: Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. In: *Curr Biol*, Band 4(1):S. 1–7, 1994.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. und Goodell, M. A.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. In: *J Clin Invest*, Band 107(11):S. 1395–402, 2001.
- Jaffee, E. M., Hruban, R. H., Canto, M. und Kern, S. E.: Focus on pancreas cancer. In: *Cancer Cell*, Band 2(1):S. 25–8, 2002.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. K. und Alitalo, K.: Hyperplasia of lymphatic vessels in vegf-c transgenic mice. In: *Science*, Band 276(5317):S. 1423–5, 1997.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. und Thun, M. J.: Cancer statistics, 2007. In: *CA Cancer J Clin*, Band 57(1):S. 43–66, 2007.

- 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. und Verfaillie, C. M.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. In: *Nature*, Band 418(6893):S. 41–9, 2002.
- Johnson, L. A., Clasper, S., Holt, A. P., Lalor, P. F., Baban, D. und Jackson, D. G.: An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. In: *J Exp Med*, Band 203(12):S. 2763–77, 2006.
- Jones, W. H. S.: *Hippocrates*, Band 3. Harvard Univ. Press, Cambridge, 1948. With an English translation by W. H. S. Jones. ill. The Loeb classical library, no. 147-150 Vol. 3 tr. by E. T. Withington. Text in English and Greek. First published 1923-31.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K.: A novel vascular endothelial growth factor, vegf-c, is a ligand for the flt4 (vegfr-3) and kdr (vegfr-2) receptor tyrosine kinases. In: *Embo J*, Band 15(2):S. 290–98, 1996.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M. und Alitalo, K.: Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 92(8):S. 3566–70, 1995.
- Kalthoff, H., Schmiegel, W., Roeder, C., Kasche, D., Schmidt, A., Lauer, G., Thiele, H. G., Honold, G., Pantel, K., Riethmuller, G. und et al.: p53 and k-ras alterations in pancreatic epithelial cell lesions. In: *Oncogene*, Band 8(2):S. 289–98, 1993.
- Karademir, S., Sokmen, S., Terzi, C., Sagol, O., Ozer, E., Astarcioglu, H., Coker, A. und Astarcioglu, I.: Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. In: *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, Band 7(5):S. 489–95, 2000.
- Karkkainen, M. J., Ferrell, R. E., Lawrence, E. C., Kimak, M. A., Levinson, K. L., McTigue, M. A., Alitalo, K. und Finegold, D. N.: Missense mutations interfere with vegfr-3 signalling in primary lymphoedema. In: *Nat Genet*, Band 25(2):S. 153–9, 2000.
- Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., Jeltsch, M., Jackson, D. G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C. und Alitalo, K.: Vascular endothelial growth factor c is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. In: *Nat Immunol*, Band 5(1):S. 74–80, 2004.
- Karkkainen, M. J. und Petrova, T. V.: Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. In: *Oncogene*, Band 19(49):S. 5598–605, 2000.

- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R. und Weinberg, R. A.: Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. In: *Nature*, Band 449(7162):S. 557–63, 2007.
- Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M. J., Kubo, H., Yla-Herttuala, S., Jaattela, M. und Alitalo, K.: Vascular endothelial growth factor c promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. In: *Cancer Res*, Band 61(5):S. 1786–90, 2001.
- Kerjaschki, D., Huttary, N., Raab, I., Regele, H., Bojarski-Nagy, K., Bartel, G., Krober, S. M., Greinix, H., Rosenmaier, A., Karlhofer, F., Wick, N. und Mazal, P. R.: Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. In: *Nat Med*, Band 12(2):S. 230–4, 2006.
- Kerjaschki, D., Regele, H. M., Moosberger, I., Nagy-Bojarski, K., Watschinger, B., Soleiman, A., Birner, P., Krieger, S., Hovorka, A., Silberhumer, G., Laakkonen, P., Petrova, T., Langer, B. und Raab, I.: Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. In: *J Am Soc Nephrol*, Band 15(3):S. 603–12, 2004.
- Kleeff, J., Beckhove, P., Esposito, I., Herzig, S., Huber, P. E., Lohr, J. M. und Friess, H.: Pancreatic cancer microenvironment. In: *Int J Cancer*, Band 121(4):S. 699–705, 2007.
- Kriehuber, E., Breiteneder-Geleff, S., Groeger, M., Soleiman, A., Schoppmann, S. F., Stingl, G., Kerjaschki, D. und Maurer, D.: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. In: *J Exp Med*, Band 194(6):S. 797–808, 2001.
- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V. und Alitalo, K.: Vegf-c receptor binding and pattern of expression with vegfr-3 suggests a role in lymphatic vascular development. In: *Development*, Band 122(12):S. 3829–37, 1996.
- Kuniyasu, H., Abbruzzese, J. L., Cleary, K. R. und Fidler, I. J.: Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. In: *Int J Oncol*, Band 19(4):S. 681–5, 2001.
- Lange, C., Kaltz, C., Thalmeier, K., Kolb, H. J. und Huss, R.: Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived, monoclonal cd34-, sca-1+, thy-1(low), c-kit+ stem cell line. In: *J Hematother Stem Cell Res*, Band 8(4):S. 335–42, 1999.
- Leak, Burke J.F., L.V.: Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. In: *The Journal of Cell Biology*, Band 36:S. 129–149, 1968.

- Leak, L.V.: The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. In: *Federal Proceedings*, Band 35(8):S. 1863–71, 1976.
- Lee, C. J., Dosch, J. und Simeone, D. M.: Pancreatic cancer stem cells. In: *J Clin Oncol*, Band 26(17):S. 2806–12, 2008.
- Leemans, J. C., te Velde, A. A., Florquin, S., Bennink, R. J., de Bruin, K., van Lier, R. A., van der Poll, T. und Hamann, J.: The epidermal growth factor-seven transmembrane (egf-tm7) receptor cd97 is required for neutrophil migration and host defense. In: *J Immunol*, Band 172(2):S. 1125–31, 2004.
- Lehman, N., Di Fulvio, M., McCray, N., Campos, I., Tabatabaian, F. und Gomez-Cambronero, J.: Phagocyte cell migration is mediated by phospholipases pld1 and pld2. In: *Blood*, Band 108(10):S. 3564–72, 2006.
- Lewis, Claire E und Hughes, Russell: Inflammation and breast cancer. microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. In: *Breast Cancer Res*, Band 9(3):S. 209, 2007.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F. und Simeone, D. M.: Identification of pancreatic cancer stem cells. In: *Cancer Res*, Band 67(3):S. 1030–7, 2007.
- Lyon, J. L., Slattery, M. L., Mahoney, A. W. und Robison, L. M.: Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Band 2(6):S. 513–8, 1993.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L., Dudek, H., McMahon, A. P. und Fishell, G.: Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. In: *Neuron*, Band 39(6):S. 937–50, 2003.
- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P. und Persico, M. G.: Isolation of a human placenta cdna coding for a protein related to the vascular permeability factor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 88(20):S. 9267–71, 1991.
- 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. und Yancopoulos, G. D.: Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. In: *Science*, Band 277(5322):S. 55–60, 1997.
- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J. und Hruban, R. H.: Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma

- progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. In: *Mod Pathol*, Band 16(9):S. 902–12, 2003.
- Makinde, T. und Agrawal, D. K.: Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-tie2 receptor in health and disease. In: *J Cell Mol Med*, Band 12(3):S. 810–828, 2008.
- Makinen, T., Jussila, L., Veikkola, T., Karpanen, T., Kettunen, M. I., Pulkkanen, K. J., Kauppinen, R., Jackson, D. G., Kubo, H., Nishikawa, S., Yla-Herttuala, S. und Alitalo, K.: Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble vegf receptor-3. In: *Nat Med*, Band 7(2):S. 199–205, 2001a.
- Makinen, T., Norrmen, C. und Petrova, T. V.: Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. In: *Cell Mol Life Sci*, Band 64(15):S. 1915–29, 2007.
- Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E. C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D., Stacker, S. A., Achen, M. G. und Alitalo, K.: Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the vegf-c/d receptor vegfr-3. In: *Embo J*, Band 20(17):S. 4762–73, 2001b.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. und Ogawa, S.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. In: *J Clin Invest*, Band 103(5):S. 697–705, 1999.
- Malumbres, M. und Barbacid, M.: Ras oncogenes: the first 30 years. In: *Nat Rev Cancer*, Band 3(6):S. 459–65, 2003.
- Manegold, P. C., Paringer, C., Kulka, U., Krimmel, K., Eichhorn, M. E., Wilkowski, R., Jauch, K. W., Guba, M. und Bruns, C. J.: Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor rad001 (everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. In: *Clin Cancer Res*, Band 14(3):S. 892–900, 2008.
- Marconcini, L., Marchio, S., Morbidelli, L., Cartocci, E., Albini, A., Ziche, M., Bussolino, F. und Oliviero, S.: c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor d induces angiogenesis in vivo and in vitro. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 96(17):S. 9671–6, 1999. Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't United states.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F.: Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on t lymphocyte traffic and priming. In: *J Exp Med*, Band 198(4):S. 615–21, 2003.

- Maruyama, K., Asai, J., Ii, M., Thorne, T., Losordo, D. W. und D'Amore, P. A.: Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. In: *Am J Pathol*, Band 170(4):S. 1178–91, 2007.
- Maruyama, K., Ii, M., Cursiefen, C., Jackson, D. G., Keino, H., Tomita, M., Van Rooijen, N., Takenaka, H., D'Amore, P. A., Stein-Streilein, J., Losordo, D. W. und Streilein, J. W.: Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from cd11b-positive macrophages. In: *J Clin Invest*, Band 115(9):S. 2363–72, 2005.
- Menon, L. G., Picinich, S., Koneru, R., Gao, H., Lin, S. Y., Koneru, M., Mayer-Kuckuk, P., Glod, J. und Banerjee, D.: Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. In: *Stem Cells*, Band 25(2):S. 520–8, 2007.
- Mesnil, M. und Yamasaki, H.: Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. In: *Cancer Res*, Band 60(15):S. 3989–99, 2000.
- Metheny-Barlow, Linda J, Tian, Song, Hayes, Andrew J und Li, Lu-Yuan: Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of vegf. In: *Microvasc Res*, Band 68(3):S. 221–230, 2004.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., Ganesan, S., Glod, J. W. und Banerjee, D.: Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. In: *Cancer Res*, Band 68(11):S. 4331–9, 2008.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I. M., Wolfe, M. S., Hruban, R. H., Ball, D. W., Schmid, R. M. und Leach, S. D.: Notch mediates tgf alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. In: *Cancer Cell*, Band 3(6):S. 565–76, 2003.
- Montecucco, F., Bianchi, G., Bertolotto, M., Viviani, G., Dallegri, F. und Ottonello, L.: Insulin primes human neutrophils for ccl3-induced migration: crucial role for jnk 1/2. In: *Ann N Y Acad Sci*, Band 1090:S. 399–407, 2006.
- Moore, Keith L. und Persaud, T. V. N.: The developing human : clinically oriented embryology. Saunders, Philadelphia, Pa., S. xv, 560 p. 7. Auflage, 2003.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. und Winant, J.: Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of aequorea. In: *Biochemistry*, Band 13(12):S. 2656–62, 1974.

- Moskaluk, C. A., Hruban, R. H. und Kern, S. E.: p16 and k-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. In: *Cancer Res*, Band 57(11):S. 2140–3, 1997.
- Mouta Carreira, C., Nasser, S. M., di Tomaso, E., Padera, T. P., Boucher, Y., Tomarev, S. I. und Jain, R. K.: Lyve-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. In: *Cancer Res*, Band 61(22):S. 8079–84, 2001.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Band 51 Pt 1:S. 263–73, 1986.
- Nose, K., Saito, H. und Kuroki, T.: Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (mc3t3-e1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. In: *Cell Growth Differ*, Band 1(11):S. 511–8, 1990.
- Oettle, H. und Neuhaus, P.: Adjuvant therapy in pancreatic cancer: a critical appraisal. In: *Drugs*, Band 67(16):S. 2293–310, 2007.
- Ohta, Y., Nozawa, H., Tanaka, Y., Oda, M. und Watanabe, Y.: Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage i non-small cell lung cancer. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 119(4 Pt 1):S. 804–13, 2000.
- Ohta, Y., Shridhar, V., Bright, R. K., Kalemkerian, G. P., Du, W., Carbone, M., Watanabe, Y. und Pass, H. I.: Vegf and vegf type c play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. In: *Br J Cancer*, Band 81(1):S. 54–61, 1999.
- Oliver, G.: Lymphatic vasculature development. In: *Nat Rev Immunol*, Band 4(1):S. 35–45, 2004.
- Oliver, G. und Alitalo, K.: The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. In: *Annu Rev Cell Dev Biol*, Band 21:S. 457–83, 2005.
- Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E. P., Doe, C. Q. und Gruss, P.: Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. In: *Mech Dev*, Band 44(1):S. 3–16, 1993.
- Oliver, S., Buble, G. und Crumpacker, C.: Inhibition of hsv-transformed murine cells by nucleoside analogs, 2'-ndg and 2'-nor-cgmp: mechanisms of inhibition and reversal by exogenous nucleosides. In: *Virology*, Band 145(1):S. 84–93, 1985.

- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K. und Eriksson, U.: Vascular endothelial growth factor b, a novel growth factor for endothelial cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 93(6):S. 2576–81, 1996.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. und Anversa, P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. In: *Nature*, Band 410(6829):S. 701–5, 2001.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M. und Werner, C.: Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. In: *Stem Cells*, Band 22(3):S. 377–84, 2004.
- Ott, H. C., Davis, B. H. und Taylor, D. A.: Cell therapy for heart failure—muscle, bone marrow, blood, and cardiac-derived stem cells. In: *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, Band 17(4):S. 348–60, 2005.
- Paavonen, K., Horelli-Kuitunen, N., Chilov, D., Kukk, E., Pennanen, S., Kallioniemi, O. P., Pajusola, K., Olofsson, B., Eriksson, U., Joukov, V., Palotie, A. und Alitalo, K.: Novel human vascular endothelial growth factor genes vegf-b and vegf-c localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. In: *Circulation*, Band 93(6):S. 1079–82, 1996.
- Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T. und Alitalo, K.: Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. In: *Am J Pathol*, Band 156(5):S. 1499–504, 2000.
- Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., Choi, N. C., Mathisen, D., Wain, J., Mark, E. J., Munn, L. L. und Jain, R. K.: Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. In: *Science*, Band 296(5574):S. 1883–6, 2002.
- Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R. und Alitalo, K.: Flt4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. In: *Cancer Res*, Band 52(20):S. 5738–43, 1992.
- Park, Yoon Shin, Kim, Nan Hee und Jo, Inho: Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and tie2 mrna in bovine retinal pericytes. In: *Microvasc Res*, Band 65(2):S. 125–131, 2003.
- Partanen, J., Puri, M. C., Schwartz, L., Fischer, K. D., Bernstein, A. und Rossant, J.: Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase tie in a late phase of angiogenic

- capillary growth and endothelial cell survival during murine development. In: *Development*, Band 122(10):S. 3013–3021, 1996.
- Partanen, T. A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S. A., Achen, M. G. und Alitalo, K.: Vegf-c and vegf-d expression in neuroendocrine cells and their receptor, vegfr-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. In: *Faseb J*, Band 14(13):S. 2087–96, 2000.
- Passegue, E.: Cancer biology: a game of subversion. In: *Nature*, Band 442(7104):S. 754–5, 2006. Using Smart Source Parsing Aug 17.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. und Goff, J. P.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. In: *Science*, Band 284(5417):S. 1168–70, 1999.
- Petersen, G. M. und Hruban, R. H.: Familial pancreatic cancer: where are we in 2003? In: *J Natl Cancer Inst*, Band 95(3):S. 180–1, 2003.
- Petrova, T. V., Makinen, T., Makela, T. P., Saarela, J., Virtanen, I., Ferrell, R. E., Finegold, D. N., Kerjaschki, D., Yla-Herttuala, S. und Alitalo, K.: Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the prox-1 homeobox transcription factor. In: *Embo J*, Band 21(17):S. 4593–9, 2002.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. und Marshak, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science*, Band 284(5411):S. 143–7, 1999.
- Potapova, I. A., Gaudette, G. R., Brink, P. R., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S. und Doronin, S. V.: Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. In: *Stem Cells*, Band 25(7):S. 1761–8, 2007.
- Potten, C. S.: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Band 353(1370):S. 821–30, 1998.
- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S. und Jackson, D. G.: Mouse lyve-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. In: *J Biol Chem*, Band 276(22):S. 19420–30, 2001.
- Prockop, D. J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. In: *Science*, Band 276(5309):S. 71–4, 1997.
- Pure, E. und Cuff, C. A.: A crucial role for cd44 in inflammation. In: *Trends Mol Med*, Band 7(5):S. 213–21, 2001.

- Pyakurel, P., Pak, F., Mwakigonja, A. R., Kaaya, E., Heiden, T. und Biberfeld, P.: Lymphatic and vascular origin of kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development. In: *Int J Cancer*, Band 119(6):S. 1262–7, 2006.
- Rainov, N. G.: A phase iii clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. In: *Hum Gene Ther*, Band 11(17):S. 2389–401, 2000.
- Ramirez, M. I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D. C. und Williams, M. C.: T1alpha, a lung type i cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. In: *Dev Biol*, Band 256(1):S. 61–72, 2003.
- Religa, P., Cao, R., Bjorndahl, M., Zhou, Z., Zhu, Z. und Cao, Y.: Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels. In: *Blood*, Band 106(13):S. 4184–90, 2005.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. und Weissman, I. L.: A role for wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. In: *Nature*, Band 423(6938):S. 409–14, 2003.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G. R., Kaps, C. und Sittinger, M.: Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors cxcr1, cxcr2 and ccr2, and migrate upon stimulation with cxcl8 but not ccl2. In: *J Cell Biochem*, Band 101(1):S. 135–46, 2007.
- Ripa, R. S., Haack-Sorensen, M., Wang, Y., Jorgensen, E., Mortensen, S., Bindslev, L., Friis, T. und Kastrup, J.: Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the stem cells in myocardial infarction (stemmi) trial. In: *Circulation*, Band 116(11 Suppl):S. I24–30, 2007.
- Rishi, A. K., Joyce-Brady, M., Fisher, J., Dobbs, L. G., Floros, J., VanderSpek, J., Brody, J. S. und Williams, M. C.: Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type i cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. In: *Dev Biol*, Band 167(1):S. 294–306, 1995.
- Roberts, Nicole, Kloos, Bryan, Cassella, Melanie, Podgrabinska, Simona, Persaud, Kris, Wu, Yan, Pytowski, Bronislaw und Skobe, Mihaela: Inhibition of vegfr-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of vegfr-2. In: *Cancer Res*, Band 66(5):S. 2650–2657, 2006.

- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J. und Kern, S. E.: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. In: *Cancer Res*, Band 57(9):S. 1731–4, 1997.
- Rutkowski, J. M., Boardman, K. C. und Swartz, M. A.: Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Band 291(3):S. H1402–10, 2006.
- Saaristo, A., Tammela, T., Farkkila, A., Karkkainen, M., Suominen, E., Yla-Herttuala, S. und Alitalo, K.: Vascular endothelial growth factor-c accelerates diabetic wound healing. In: *Am J Pathol*, Band 169(3):S. 1080–7, 2006.
- Sabin, FR: On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. In: *American Journal of Anatomy*, Band 1:S. 367–391, 1902.
- Sabin, FR: On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. In: *American Journal of Anatomy*, Band 3:S. 183–195, 1904.
- Sacchi, E.; Agliano M.; Raffaelli N.; Comparini L., G.; Weber: The structure of superficial lymphatics in the human thigh: precollectors. In: *The Anatomical Record*, Band 247:S. 53–62, 1997.
- Sadlonova, A., Novak, Z., Johnson, M. R., Bowe, D. B., Gault, S. R., Page, G. P., Thottassery, J. V., Welch, D. R. und Frost, A. R.: Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. In: *Breast Cancer Res*, Band 7(1):S. R46–59, 2005.
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K. und Joensuu, H.: Vascular endothelial growth factors vegf-b and vegf-c are expressed in human tumors. In: *Am J Pathol*, Band 153(1):S. 103–8, 1998.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. und Sanberg, P. R.: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. In: *Exp Neurol*, Band 164(2):S. 247–56, 2000.
- Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. und Qin, Y.: Distinct roles of the receptor tyrosine kinases tie-1 and tie-2 in blood vessel formation. In: *Nature*, Band 376(6535):S. 70–74, 1995.
- Schacht, V., Ramirez, M. I., Hong, Y. K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., Oliver, G. und Detmar, M.: T1alpha/podoplanin deficiency

- disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. In: *Embo J*, Band 22(14):S. 3546–56, 2003.
- Scheithauer, W., Kornek, G. V., Raderer, M., Hejna, M., Valencak, J., Miholic, J., Kovats, E., Lang, F., Funovics, J., Bareck, E. und Depisch, D.: Phase ii trial of gemcitabine, epirubicin and granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. In: *Br J Cancer*, Band 80(11):S. 1797–802, 1999.
- Schenk, M., Schwartz, A. G., O’Neal, E., Kinnard, M., Greenson, J. K., Fryzek, J. P., Ying, G. S. und Garabrant, D. H.: Familial risk of pancreatic cancer. In: *J Natl Cancer Inst*, Band 93(8):S. 640–4, 2001.
- Schledzewski, K., Falkowski, M., Moldenhauer, G., Metharom, P., Kzhyshkowska, J., Ganss, R., Demory, A., Falkowska-Hansen, B., Kurzen, H., Ugurel, S., Geginat, G., Arnold, B. und Goerdts, S.: Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor lyve-1 is expressed by stabilin-1+, f4/80+, cd11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. In: *J Pathol*, Band 209(1):S. 67–77, 2006.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H. L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N., Furth, M. E. und Reid, L. M.: Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. In: *J Exp Med*, Band 204(8):S. 1973–87, 2007.
- Schmidt, Annette, Ladage, Dennis, Steingen, Caroline, Brixius, Klara, Schinköthe, Timo, Klinz, Franz-Josef, Schwinger, Robert H G, Mehlhorn, Uwe und Bloch, Wilhelm: Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. In: *Eur J Cell Biol*, Band 85(11):S. 1179–1188, 2006.
- Schneider, M., Othman-Hassan, K., Christ, B. und Wilting, J.: Lymphangioblasts in the avian wing bud. In: *Dev Dyn*, Band 216(4-5):S. 311–9, 1999.
- Schnürch, H. und Risau, W.: Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. In: *Development*, Band 119(3):S. 957–968, 1993.
- Schoppmann, S. F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K. und Kerjaschki, D.: Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. In: *Am J Pathol*, Band 161(3):S. 947–56, 2002.
- Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S. B., Kern, S. E.

- und Herman, J. G.: Abrogation of the rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. In: *Cancer Res*, Band 57(15):S. 3126–30, 1997.
- Serrano, M., Hannon, G. J. und Beach, D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin d/cdk4. In: *Nature*, Band 366(6456):S. 704–7, 1993.
- Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Borradori, A., Long, Z., Sorensen, A. G. und Barbier, N.: A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. gli328 european-canadian study group. In: *Hum Gene Ther*, Band 10(14):S. 2325–35, 1999.
- Shimoda, M., Takahashi, M., Yoshimoto, T., Kono, T., Ikai, I. und Kubo, H.: A homeobox protein, prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. In: *Clin Cancer Res*, Band 12(20 Pt 1):S. 6005–11, 2006.
- Silva, G. V., Litovsky, S., Assad, J. A., Sousa, A. L., Martin, B. J., Vela, D., Coulter, S. C., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W. K., Branco, R. V., Oliveira, E. M., He, R., Geng, Y. J., Willerson, J. T. und Perin, E. C.: Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. In: *Circulation*, Band 111(2):S. 150–6, 2005.
- Simpson, M. A., Wilson, C. M. und McCarthy, J. B.: Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. In: *Am J Pathol*, Band 161(3):S. 849–57, 2002.
- Sinzinger, Kaliman J. Mannheimer E., H.: Regulation of human lymph contractility by prostaglandins and thromboxane. In: *Lymphology*, Band 17(2):S. 43–45, 1984.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. und Detmar, M.: Induction of tumor lymphangiogenesis by vegf-c promotes breast cancer metastasis. In: *Nat Med*, Band 7(2):S. 192–8, 2001.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J. T. und Oliver, G.: Hepatocyte migration during liver development requires prox1. In: *Nat Genet*, Band 25(3):S. 254–5, 2000.
- Sperti, C., Pasquali, C., Piccoli, A. und Pedrazzoli, S.: Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: *Br J Surg*, Band 83(5):S. 625–31, 1996.
- Spring, Herbert, Schüler, Thomas, Arnold, Bernd, Hämmerling, Günter J und Ganss, Ruth: Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 102(50):S. 18111–18116, 2005.

- Srinivasan, R. S., Dillard, M. E., Lagutin, O. V., Lin, F. J., Tsai, S., Tsai, M. J., Samokhvalov, I. M. und Oliver, G.: Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. In: *Genes Dev*, Band 21(19):S. 2422–32, 2007.
- Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E. und von Andrian, U. H.: The cc chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (tca-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling t lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. In: *J Exp Med*, Band 191(1):S. 61–76, 2000.
- Stockhammer, G., Brotchi, J., Leblanc, R., Bernstein, M., Schackert, G., Weber, F., Oster-tag, C., Mulder, N. H., Mellstedt, H., Seiler, R., Yonekawa, Y., Twerdy, K., Kostron, H., De Witte, O., Lambermont, M., Velu, T., Laneuville, P., Villemure, J. G., Rutka, J. T., Warnke, P., Laseur, M., Mooij, J. J., Boethius, J., Mariani, L., Gianella-Borradori, A. und et al.: Gene therapy for glioblastoma [correction of gliobestome] multiform: in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. In: *J Mol Med*, Band 75(4):S. 300–4, 1997.
- Studený, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., Zompetta, C., Fidler, I. J. und Andreeff, M.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. In: *Cancer Res*, Band 62(13):S. 3603–8, 2002.
- Suami, Wei-Ren; Mann Bruce; Taylor Ian, Hiroo; Pan: The lymphatic anatomy of the breast and its implications for sentinel lymph node biopsy: A human cadaver study. In: *Annals of Surgical Oncology*, Band Online first, 2007.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. In: *Cell*, Band 87(7):S. 1171–1180, 1996.
- Suzuki, Hiroyuki, Watabe, Tetsuro, Kato, Mitsuyasu, Miyazawa, Keiji und Miyazono, Kohei: Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. In: *Blood*, Band 105(6):S. 2372–2379, 2005.
- Takahashi, M., Yoshimoto, T., Shimoda, M., Kono, T., Koizumi, M., Yazumi, S., Shimada, Y., Doi, R., Chiba, T. und Kubo, H.: Loss of function of the candidate tumor suppressor prox1 by rna mutation in human cancer cells. In: *Neoplasia*, Band 8(12):S. 1003–10, 2006.
- Tavassoli, M. und Crosby, W. H.: Transplantation of marrow to extramedullary sites. In: *Science*, Band 161(836):S. 54–6, 1968.

- Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Hultner, L., Mortensen, B. T., Brechtel, A., Oostendorp, R. A. und Dormer, P.: Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. In: *Exp Hematol*, Band 24(1):S. 1–10, 1996.
- Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L. und Hebrok, M.: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. In: *Nature*, Band 425(6960):S. 851–6, 2003.
- Tobler, M., NE; Detmar: Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis. In: *Journal of Leukocyte Biology*, Band 80(4):S. 691–696, 2006.
- Tortosa, Derrickson B., G.: *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley and Sons, Inc., 11. Auflage, 2006.
- Tsurusaki, T., Kanda, S., Sakai, H., Kanetake, H., Saito, Y., Alitalo, K. und Koji, T.: Vascular endothelial growth factor-c expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. In: *Br J Cancer*, Band 80(1-2):S. 309–13, 1999.
- Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Dang, T. D., Ayala, G. E. und Rowley, D. R.: Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (drs) xenograft model. In: *Cancer Res*, Band 62(11):S. 3298–307, 2002.
- Ubogu, E. E., Callahan, M. K., Tucky, B. H. und Ransohoff, R. M.: Determinants of ccl5-driven mononuclear cell migration across the blood-brain barrier. implications for therapeutically modulating neuroinflammation. In: *J Neuroimmunol*, Band 179(1-2):S. 132–44, 2006.
- Urist, M. R. und McLean, F. C.: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. In: *J Bone Joint Surg Am*, Band 34-A(2):S. 443–76, 1952.
- Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R. und Alitalo, K.: Vegfr-3 and its ligand vegf-c are associated with angiogenesis in breast cancer. In: *Am J Pathol*, Band 154(5):S. 1381–90, 1999.
- van Heek, N. T., Meeker, A. K., Kern, S. E., Yeo, C. J., Lillemoe, K. D., Cameron, J. L., Offerhaus, G. J., Hicks, J. L., Wilentz, R. E., Goggins, M. G., De Marzo, A. M., Hruban, R. H. und Maitra, A.: Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *Am J Pathol*, Band 161(5):S. 1541–7, 2002.
- Veikkola, T., Jussila, L., Makinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T. V., Kubo, H., Thurston, G., McDonald, D. M., Achen, M. G., Stacker, S. A. und Alitalo, K.: Signal-

- ling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. In: *Embo J*, Band 20(6):S. 1223–31, 2001.
- Venneri, Mary Anna, Palma, Michele De, Ponzoni, Maurilio, Pucci, Ferdinando, Scielzo, Cristina, Zonari, Erika, Mazzieri, Roberta, Doglioni, Claudio und Naldini, Luigi: Identification of proangiogenic tie2-expressing monocytes (tems) in human peripheral blood and cancer. In: *Blood*, Band 109(12):S. 5276–5285, 2007.
- von Staden, H.: *Herophilus and The Art of Medicine in Early Alexandria*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989.
- Wallace, H., Clarke, A. R., Harrison, D. J., Hooper, M. L. und Bishop, J. O.: Ganciclovir-induced ablation non-proliferating thyrocytes expressing herpesvirus thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. In: *Oncogene*, Band 13(1):S. 55–61, 1996.
- Waller, E. K., Olweus, J., Lund-Johansen, F., Huang, S., Nguyen, M., Guo, G. R. und Terstappen, L.: The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. In: *Blood*, Band 85(9):S. 2422–35, 1995.
- Wang, J., Kilic, G., Aydin, M., Burke, Z., Oliver, G. und Sosa-Pineda, B.: Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. In: *Dev Biol*, Band 286(1):S. 182–94, 2005.
- Wang, T. B., Deng, M. H., Qiu, W. S. und Dong, W. G.: Association of serum vascular endothelial growth factor-c and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. In: *World J Gastroenterol*, Band 13(12):S. 1794–7; discussion 1797–8, 2007.
- Warshaw, A. L. und Fernandez-del Castillo, C.: Pancreatic carcinoma. In: *N Engl J Med*, Band 326(7):S. 455–65, 1992.
- Watt, F. M.: Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Band 353(1370):S. 831–7, 1998.
- Weimann, J. M., Johansson, C. B., Trejo, A. und Blau, H. M.: Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in purkinje neurons after bone marrow transplant. In: *Nat Cell Biol*, Band 5(11):S. 959–66, 2003.
- Wen, Chun-Yang, Ito, Masahiro, Wang, Hui, Chen, Long-Dian, Xu, Zhao-Min, Matsuu, Mutsumi, Shichijo, Kazuko, Nakayama, Toshiyuki, Nakashima, Masahiro und Sekine, Ichiro: Il-11 up-regulates tie-2 expression during the healing of gastric ulcers in rats. In: *World J Gastroenterol*, Band 9(4):S. 788–790, 2003.

- Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H. und Atkinson, M.: Characterization and cloning of the e11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. In: *Bone*, Band 18(2):S. 125–32, 1996.
- Whipple, A. O., Parsons, W. B. und Mullins, C. R.: Treatment of carcinoma of the ampulla of vater. In: *Ann Surg*, Band 102(4):S. 763–79, 1935.
- Wigle, J. T., Chowdhury, K., Gruss, P. und Oliver, G.: Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. In: *Nat Genet*, Band 21(3):S. 318–22, 1999.
- Wigle, J. T., Harvey, N., Detmar, M., Lagutina, I., Grosveld, G., Gunn, M. D., Jackson, D. G. und Oliver, G.: An essential role for prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. In: *Embo J*, Band 21(7):S. 1505–13, 2002.
- Wigle, J. T. und Oliver, G.: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. In: *Cell*, Band 98(6):S. 769–78, 1999.
- Wiley, H.E.: Expression of cc chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of b16 murine melanoma. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Band 93(21):S. 1638–1643, 2001.
- Wilkowski, Ralf, Thoma, Martin, Bruns, Christiane, Dühmke, Eckhard und Heinemann, Volker: Combined chemoradiotherapy for isolated local recurrence after primary resection of pancreatic cancer. In: *JOP*, Band 7(1):S. 34–40, 2006.
- Williams, M. C., Cao, Y., Hinds, A., Rishi, A. K. und Wetterwald, A.: T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type i cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. In: *Am J Respir Cell Mol Biol*, Band 14(6):S. 577–85, 1996.
- Wilting, J., Aref, Y., Huang, R., Tomarev, S. I., Schweigerer, L., Christ, B., Valasek, P. und Papoutsis, M.: Dual origin of avian lymphatics. In: *Dev Biol*, Band 292(1):S. 165–73, 2006.
- Witte, M. H.: Lymphangiogenesis and lymphangiodyplasia: From molecular to clinical lymphology. In: *Microscopy Research and Technique*, (55):S. 122–145, 2001.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K. und Ahmadian, M. R.: The interaction of ras with gtpase-activating proteins. In: *FEBS Lett*, Band 410(1):S. 63–7, 1997.
- Witzenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M., Principe, N., Kearney, M., Hu, J. S. und Isner, J. M.: Vascular endothelial growth factor-c (vegf-c/vegf-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. In: *Am J Pathol*, Band 153(2):S. 381–94, 1998.

- Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. und Drexler, H.: Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the boost randomised controlled clinical trial. In: *Lancet*, Band 364(9429):S. 141–8, 2004.
- Wong, A. L., Haroon, Z. A., Werner, S., Dewhirst, M. W., Greenberg, C. S. und Peters, K. G.: Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. In: *Circ Res*, Band 81(4):S. 567–574, 1997.
- Wrobel, T., Dziegiel, P., Mazur, G., Zabel, M., Kuliczkowski, K. und Szuba, A.: Lyve-1 expression on high endothelial venules (hevs) of lymph nodes. In: *Lymphology*, Band 38(3):S. 107–110, 2005.
- Xu, G., Zhang, L., Ren, G., Yuan, Z., Zhang, Y., Zhao, R. C. und Shi, Y.: Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Cell Res*, Band 17(3):S. 240–8, 2007.
- Yeo, C. J., Cameron, J. L., Lillemoe, K. D., Sitzmann, J. V., Hruban, R. H., Goodman, S. N., Dooley, W. C., Coleman, J. und Pitt, H. A.: Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. In: *Ann Surg*, Band 221(6):S. 721–31; discussion 731–3, 1995.
- Yeo, C. J., Cameron, J. L., Sohn, T. A., Lillemoe, K. D., Pitt, H. A., Talamini, M. A., Hruban, R. H., Ord, S. E., Sauter, P. K., Coleman, J., Zahurak, M. L., Grochow, L. B. und Abrams, R. A.: Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. In: *Ann Surg*, Band 226(3):S. 248–57; discussion 257–60, 1997.
- Yonemura, Y., Endo, Y., Fujita, H., Fushida, S., Ninomiya, I., Bandou, E., Taniguchi, K., Miwa, K., Ohoyama, S., Sugiyama, K. und Sasaki, T.: Role of vascular endothelial growth factor c expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. In: *Clin Cancer Res*, Band 5(7):S. 1823–9, 1999.
- Yuan, Hai Tao, Venkatesha, Shivalingappa, Chan, Barden, Deutsch, Urban, Mammoto, Tadanori, Sukhatme, Vikas P, Woolf, Adrian S und Karumanchi, S. Ananth: Activation of the orphan endothelial receptor tie1 modifies tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. In: *FASEB J*, Band 21(12):S. 3171–3183, 2007.
- Zambetti, G. P., Horwitz, E. M. und Schipani, E.: Skeletons in the p53 tumor suppressor closet: genetic evidence that p53 blocks bone differentiation and development. In: *J Cell Biol*, Band 172(6):S. 795–7, 2006.

- Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C. und Chen, Y.: Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. In: *Exp Mol Pathol*, Band 80(3):S. 267–74, 2006.
- Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H. D. und Herrler, G.: Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of madin-darby canine kidney cells (type i). In: *Biochem J*, Band 326 (Pt 1):S. 99–108, 1997.
- Zimmer, G., Oeffner, F., Von Messling, V., Tschernig, T., Groness, H. J., Klenk, H. D. und Herrler, G.: Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. In: *Biochem J*, Band 341 (Pt 2):S. 277–84, 1999.
- Zohlhofer, D., Ott, I., Mehilli, J., Schomig, K., Michalk, F., Ibrahim, T., Meisetschlager, G., von Wedel, J., Bollwein, H., Seyfarth, M., Dirschinger, J., Schmitt, C., Schwaiger, M., Kastrati, A. und Schomig, A.: Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. In: *Jama*, Band 295(9):S. 1003–10, 2006.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. und Hedrick, M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Mol Biol Cell*, Band 13(12):S. 4279–95, 2002.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A. und Maini, R. N.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. In: *Arthritis Res*, Band 2(6):S. 477–88, 2000.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

ABC	avitin biotin complex
ALCAM	activated leucocyte adhesion molecule
Ang	Angiopoetin
BEC	blood endothelial cells
CALCRL	Calcitonin receptor-like receptor
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CFU-F	colony forming units-fibroblasts
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	complementary desoxyriboic acid
CT	cycle threshold
CXCR	alpha chemokine receptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenyl-Indol
DC	dentritic cells
DNA	desoxyribonucleic acid
DPC	deleted in pancreatic cancer
FACS	fluorescence activated cell scan
FCFC	fibroblastic colony forming cells
FCS	fetal calf serum
FLK	fetal liver kinase
FLT	fms-like-tyrosinkinaserceptor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GFP	green fluorescent protein
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia induced factor

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	horseraddish peroxidase
HSC	hematopoietic stem cell(s)
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien
KDR	kinase insert domain receptor
LEC	lymphatic endothelial cells
LYVE	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor
MAPC	multipotent adult progenitor cells
MCN	muzinös zystische Neoplasie
MCP	monocyte chemotactic protein
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
M-MLV	Moloney-Murine-Leukämie-Virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymal stem cell(s)
NF- κ B	nuclear factor kappa B-cell
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PCR	polymerase chain reaction
PECAM-1	platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1 (CD31)
PDGF	platelet derived growth factor
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDF	stroma derived factor
Shh	Sonic Hedgehog
TNF	tumor necrosis factor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VPC	vector producing cells

Abbildungsverzeichnis

1.1	Plastizität mesenchymaler Stammzellen (unvollständig)	7
2.1	Schematische Darstellung des Genkonstrukts der C57BL/6 p53 ^{-/-} Tie2/ <i>Tk</i> ⁺ mesenchymalen Stammzellen	40
2.2	Schematische Darstellung des Genkonstrukts der C57BL/6 p53 ^{-/-} Tie2/RFP ⁺ mesenchymalen Stammzellen	41
2.3	Schematische Darstellung des Elongationsschrittes mit angelagerter TaqMan®-Sonde	48
2.4	Schematische Darstellung einer modifizierten Boydenkammer (leer)	50
2.5	Schematische Darstellung des Chemotaxis-Assays mit calceinmarkierten Zellen	51
2.6	Intrapankreatische Injektion von Panc02 Pankreaskarzinomzellen bei vollnarkotisierter C57BL/6 Maus	56
2.7	Pankreastumore der unbehandelten Kontrollgruppe nach 28 Tagen	56
2.8	Schematische Darstellung des Injektionsschemas von Versuch #2	58
3.1	Morphologischer Vergleich zwischen unkontingierten und konditionierten V54/2	61
3.2	FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf Podoplanin	62
3.3	FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf VEGFR-2	62
3.4	FACS-Analyse von konditionierten V54/2 auf VEGFR-3	63
3.5	Konventionelle RT-PCR der konditionierten Balb/c mesenchymalen Stammzellen	64
3.6	Migrationsindizes der V54/2 gegen mit VEGF-C angereichertem Kulturmedium	65
3.7	Taqman® quantitative PCR von CCR7 mRNA der V54/2 und Balb/c MSC	66
3.8	FACS Analyse der V54/2 auf CCR7-Expression	66
3.9	CCL19-induzierte Migration der V54/2 in modifizierter Boydenkammer	67
3.10	Entwicklung der Durchmesser der Mausschwänze unmittelbar distal der Operationsstelle	68
3.11	Entwicklung der Durchmesser der Mausschwänze 1 cm distal der Operationsstelle	69
3.12	Immunhistochemische Färbung von Podoplanin an einem Mausschwanz der Therapiegruppe	70
3.13	Immunhistochemische Färbung von Podoplanin an einem Mausschwanz der Kontrollgruppe	70

3.14	Anti-GFP-Immunhistologie des ödematösen Mausschwanzes nach subkutaner Gabe GFP-markierter Stammzellen	71
3.15	Funktionalitätsprüfung der Lymphgefäße an den Mausschwänzen von Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe	71
3.16	Migration der C57BL/6 p53 ^{-/-} MSC gegen Überstand von Panc02	75
3.17	Migrationsindizes der transfizierten, murinen, mesenchymalen Stammzelllinien gegen Überstand von Panc02	76
3.18	Pankreastumorgewichte aus Versuch #1	77
3.19	Fotografische Darstellung der entnommenen Tumore	78
3.20	Tumorgewichte aus Versuch #2	79
3.21	Fluoreszenzmikroskopie Pankreastumor GFP ⁺	81
3.22	Fluoreszenzmikroskopie Pankreaskarzinom RFP ⁺	82
3.23	Immunhistochemie anti-RFP des Pankreastumor	83
3.24	Quantitative RT-PCR (Taqman) der Tumore auf RFP-RNA	84

Anhang B

Danksagung

Ich möchte *Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch*, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Großhadern, meinen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Arbeit als Doktorand seiner Klinik absolvieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt *Frau Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns*, Oberärztin der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, für das Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit. Die Arbeit in ihrem Labor war sehr lehrreich und mir wurde jede erdenkliche Hilfe gewährt. Besonders dankbar bin ich ihr für ihre Ermutigung und Unterstützung bei der Vorstellung unserer Forschungsarbeit auf medizinischen Kongressen. Sie wird mir in meiner weiteren medizinischen Ausbildung und Tätigkeit stets ein großes Vorbild sein, da sie es durch ihr großes Wissen und Geschick schafft, Forschung und ärztliche Kunst auf sehr hohem Niveau zu vereinen.

Herr Dr. med. Dr. phil. Claudius Conrad war mir in der Forschung und beim Schreiben dieser Arbeit eine sehr große Hilfe. Er hat es geschafft, auch nach seinem Umzug in die USA, dieses Werk mit viel Engagement und Wissen freundschaftlich zu unterstützen. Sein Beistand beschränkte sich dabei nicht nur auf diese Dissertation, sondern bezog sich auch auf viele weitere Probleme, denen man als Student der Medizin begegnet. Auf diese Weise eröffnete er mir Chancen, die mir ohne seine Hilfe wahrscheinlich verwehrt geblieben wären.

Des weiteren danke ich der Arbeitsgruppe um *Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter J. Nelson* und *Frau Priv. Doz. Dr. med. Irene Teichert-von Lüttichau* für die Bereitstellung der transfizierten Stammzelllinien und ihre Hilfe bei der Durchführung der Migration-Assays und der Taqman PCR, die alle in ihrem Labor durchgeführt wurden. Die durch Herrn PD Dr. rer. nat. Peter Nelson entwickelten Genkonstrukte machten einen großen Teil dieser Arbeit aus und die Zusammenarbeit mit ihm war überaus lehrreich und inspirierend für mich. Er stand mir bei Fragen hilfsbereit bei und wird mir mit seinem Einfallsreichtum stets ein Vorbild in meiner weiteren wissenschaftlichen Tätigkeit sein.

Zudem danke ich *Herrn Prof. Dr. med. Ralf Huss* dafür, dass er mir ermöglicht hat, einen Teil dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe am Pathologischen Institut der Universität

München, absolvieren zu können. Die in dieser Arbeit verwendeten Stammzelllinien wurden in seinem Labor etabliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bemerkenswert war außerdem seine große Hilfe bei der Beurteilung der mikroskopischen Präparate.

Aus der klinischen Forschung Chirurgie des Klinikums Großhadern danke ich *Herrn Dr. med. Ivan Ischenko*, der mir mehrfach bei der Pankreastumorzellinjektion geholfen hat. *Herrn Dr. med. Stephan Huber* gilt mein Dank für die vielfältige Unterstützung und Einarbeitung, besonders in der Anfangsphase dieser Dissertation.

Ich danke außerdem *Frau Sabine Moosmann*, *Frau Sabine Sagebiel*, *Frau Anke Mojaat*, *Herrn Janusz Minda* und insbesondere *Frau Birgit Jahn*, die mich mit ihrer medizinisch-technischen Erfahrung im Laufe dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Meinen Eltern *Jutta* und *Joachim Nieß* gilt mein besonderer Dank für ihre langjährige Unterstützung. Ohne ihre umfangreiche materielle und moralische Förderung wären der erfolgreiche Abschluss meines Studiums sowie diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Herr Dipl. ing. Jan-Peter Bohn half mir dabei, diese Arbeit mit dem Programm L^AT_EX in eine geordnete Form zu setzen. Er war so manches Mal mein „Telefonjoker“, wenn ich nicht weiterkam.

Zudem danke ich *meiner Mutter*, *meinem Vater* und *Frau Dinorah Wick* sowie dem Ehepaar *Cosima und Philipp Dinkel* für das Korrekturlesen dieser Dissertation.

Anhang C

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Hanno Nieß
Anschrift: Brudermühlstr. 11a; 81371 München
Geburtsdatum: 05. Juni 1982
Geburtsort: Mainz
Eltern: Joachim Nieß (56), Studiendirektor
Jutta Nieß (55), Logopädin und Gymnasiallehrerin
Geschwister: Dipl. ing. (FH) Timo Nieß (30), Versicherungskaufmann
Lea Nieß (21), Studentin der Humanmedizin

AUSBILDUNG

08/1992-03/2001 Gymnasium Nieder-Olm, Rheinland-Pfalz
07/1998-07/1999 Piedmont Hills Highschool, San Jose, CA, USA
Stipendiat des Rotary International Austauschprogramms
03/2001 Abitur
05/2001-03/2002 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund Mainz
im Rettungsdienst
04/2002-10/2008 Hochschulstudium der Humanmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2004 Physikum
11/2004-10/2009 Arbeit an der experimentellen Doktorarbeit mit dem Thema:
“Mesenchymale Stammzelllinien in der Lymphangiogenese
und deren Nutzung für eine stammzellbasierte
Suizidgentherapie des Pankreaskarzinoms”

- 02/2007-02/2008 Student im Praktisches Jahr
- Medizinische Klinik II der LMU München, Großhadern
Gastroenterologie und Notaufnahme
 - University Hospital der University of Chicago, IL, USA
Pulmonologie und Notaufnahme
(Stipendiat der München-Harvard-Allianz)
 - Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School,
Boston, MA, USA
Gefäßchirurgie, Thoraxchirurgie und Notaufnahme
 - Chirurgische Klinik und Poliklinik der LMU München, Großhadern
Viszeralchirurgie und Gefäßchirurgie
 - Anästhesiologische Klinik der LMU München, Großhadern
 - Anästhesiologische Klinik der University of Otago,
Wellington, Neuseeland
- 10/2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

MEDIZINISCHE TÄTIGKEIT

- 07/2002-01/2003 Ehrenamtliche Arbeit als Rettungssanitäter beim ASB Mainz
- 02/2003-04/2004 Beschäftigung als studentische Aushilfe in der Ambulanz und Nothilfe
der Universitäts-Augenklinik München-Innenstadt
- 04/2004-10/2008 Beschäftigung im studentischen Perfusionsdienst
der Deutschen Stiftung Organtransplantation
- 05/2006-10/2008 Beschäftigung im Telefondienst
der Deutschen Stiftung Organtransplantation
- seit 12/2008 Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums Großhadern
Direktor: Prof. Dr. mult. K.-W. Jauch

AUSZEICHNUNGEN

- 2007 Fritz-Linder-Preis der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie
für den Beitrag „Stem Cell based Tie2/Tk Suicide Gene Therapy
of advanced pancreatic carcinoma“
- 2009 1. Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und
Viszeralchirurgie für die Posterpräsentation „Das Tumorstroma

als Angriffspunkt einer stammzellbasierten CCL5/HSV-TK Suizid-gentherapie in einem murinen Tiermodell zum Pankreaskarzinom“

VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE

ORIGINALARBEITEN

- Conrad C*, Huesemann Y*, **Niess H***, von Lüttichau I, Huss R, Bauer C, Jauch K-W, Klein C, Bruns CJ, Nelson PJ. Targeting of tumor angiogenesis using engineered “Trojan Horse” mesenchymal stem cells. Ready for submission. (*=equal contribution of the authors)
- Zischek C*, **Niess H***, Ischenko I, Conrad C, Huss R, Jauch K-W, Nelson PJ, Bruns CJ. Targeting Tumor Stroma Using Engineered Mesenchymal Stem Cells Reduces the Growth of Pancreatic Carcinoma. *Annals of Surgery*. In press 2009 (*=equal contribution of the authors)
- Conrad C, **Niess H**, Huss R, Huber S, Teichert von Luetlichau I, Nelson PJ, Ott HC, Jauch KW, Bruns CJ. Multipotent Mesenchymal Stem Cells Acquire a Lymphendothelial Phenotype and Enhance Lymphatic Regeneration in vivo. *Circulation*. 2009 Jan 20;119(2):281-9. Epub 2008 Dec 31
- Conrad C, **Niess H**, Jauch K-W, Bruns CJ, Hartl W, Welker L. Overture for Growth Hormone, Requiem for Interleukin-6? *Critical Care Medicine*. 2007 Dec;35(12):2709-13
- Conrad C, Rashmi G, Mohan H, **Niess H**, Bruns C.J., Kopp R, Teichert von Luetlichau I, Guba M, Heeschen C, Jauch K.-W, Huss R, Nelson PJ. Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. *Current Gene Therapy*. 2007 Aug;7(4):249-60. Review.
- Huber S, Bruns CJ, Schmid G, Hermann PC, Conrad C, **Niess H**, Huss R, Graeb C, Jauch KW, Heeschen C, Guba M. Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis. *Kidney International*. 2007 Apr;71(8):771-7.
- Conrad, C., Huss, R., Huber, S., **Niess H.**, Jauch K.-W., Bruns C. Induction of Lymphangiogenesis in Human Adult Mesenchymal Stem Cell Lines. *Langenbecks Archives of Surgery* 2005 390(5): 455.
- Huber S., Schmid G., **Niess H.**, Conrad C., Jauch K.-W., Heeschen C., Bruns C., Guba M. Blockade of mTOR inhibits lymphatic angiogenesis in vivo and in vitro. *Langenbecks Archives of Surgery* 2005 390(5): 467.

BUCHBEITRÄGE

- Conrad C., Lechner S., **Niess H.**, Jauch K.-W., Huss R. Basic biology and animal models in stem cell-mediated tissue regeneration. Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini

KONGRESSBEITRÄGE

- **H. Niess**, C. Zischek, I. Ischenko, M. Eichhorn, K.-W. Jauch, P. J. Nelson, C.J. Bruns. Das Tumorstroma als Angriffspunkt einer stammzellbasierten CCL5/HSV-TK Suizid-gentherapie in einem murinen Tiermodell zum Pankreaskarzinom. Viszeralmedizin 2009, Hamburg 09/2009. Poster.
- **H. Niess**, C. Conrad, R. Huss, I. v. Lüttichau, M. Guba, C. Heeschen, K.-W. Jauch, C.J. Bruns, P. Nelson. Stem Cell based Tie2/TK Suicide Gene therapy of Advanced Pancreatic Carcinoma. Fritz-Linder-Preisträgersitzung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München Mai 2007. Vortrag.
- **H. Niess**, M. Valesky, S. Huber, I. von Teichert-Lüttichau, K.-W. Jauch, R. Huss, P.J.Nelson, C.J. Bruns, C. Conrad, Molekulare Mechanismen von Mesenchymalen Stammzellen in der Lymphangiogenese. Lymphologica, München 03/2007. Vortrag.
- **H. Niess**, C. Conrad, R. Huss, S. Huber, P. Nelson, K.-W. Jauch, C. J. Bruns. Induction of Lymphangiogenesis in Human Adult Mesenchymal Stem Cell Lines and their Therapeutic Potential. 2nd European Conference for Angiogenesis, München 09/2006. Poster.
- **H. Niess**, C. Conrad, R. Huss, I. v. Lüttichau, M. Guba, C. Heeschen, K.-W. Jauch, C.J. Bruns, P. Nelson. Stammzellbasierte Tie2/Tk Suizidgentherapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms. Chirurgische Forschungstage, Münster 08/2006. Vortrag.
- Conrad C., Huber S., **Niess H.**, Huss R., Jauch K.-W., Bruns C. Adult Mesenchymal Stem Cell Lines for regenerative Lymphangiogenesis. Government founded Excellence-Initiative FUTURE, Munich, 30. August 2005
- Conrad C., Huber S., **Niess H.**, Huss, R., Jauch, K.-W., Bruns, C.. Induction of Lymphangiogenesis in Adult Mesenchymal Stem Cell Lines. 4. Annual Meeting of the European Society of Tissue Engineering, München, 31. August – 3. September 2005
- Conrad C., Huss R., Huber S., **Niess H.**, Jauch K.-W., Bruns C. Induction of Lymphangiogenesis in Human Adult Mesenchymal Stem Cell Lines Frankfurter Forschungstage, 30.11.2005 , Poster
- Conrad C., Kopp R., **Niess H.**, Jauch K.-W., Huss R. Das Potetial der mesodermalen CD34- Stammzelllinie RM26 zur endothelialen Differenzierung. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie, Stuttgart, 22.09.2005

- Bruns C.J., Conrad C., **Niess H.**, Lüttichau I., Huss R., Jauch K.-W., Nelson P. Tie2/tk Stem Cell based Suicide Gene therapy of Pancreatic Carcinoma. 27. Deutscher Krebskongress, Berlin, 26.03.06
- Conrad C., **Niess H.**, Huss R., Nelson P. Jauch K.-W., Bruns C.J. Regeneration von Lymphgefäßen durch immortalisierte adulte mesenchymale Stammzellen. 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin 04.05.2006