

**Mesenchymale Stammzellen bei Patienten mit malignen Erkrankungen -
Untersuchung ihrer Eigenschaften und ihres Potentials
als Vehikel einer Tumorthherapie**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biochemikerin Jana Lützkendorf

geboren am 14.06.1977 in Merseburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Moritz
2. Prof. Dr. H.-J. Schmoll
3. Prof. Dr. Dr. W. Wagner

Halle (Saale), 23.06.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 MESENCHYMALE STAMMZELLEN - IHRE CHARAKTERISTIKA UND POTENTIELLE RELEVANZ BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN	1
1.1.1 Generelle Eigenschaften Mesenchymaler Stammzellen.....	1
1.1.2 Vorkommen von MSC im Organismus und Hinweise einer Resistenz von MSC gegenüber Schädigungen.....	3
1.1.3 Integration von MSC in maligne Tumoren.....	3
1.2 GENOTOXISCHE SCHÄDIGUNG VON ZELLEN UND ENTSPRECHENDE ZELLULÄRE REAKTIONSMCHANISMEN	4
1.2.1 Schädigung durch Zytostatika und Zytostatikaresistenz	4
1.2.2 Rolle der Zellzyklusregulation bei Schädigung.....	6
1.2.3 Apoptose als Reaktion auf Schädigungen.....	8
1.3 MSC ALS POTENTIELLE VEHIKEL EINER TUMORTHERAPIE	10
1.3.1 Prinzip einer MSC-basierenden Tumorthherapie	10
1.3.2 Klinische Erfahrungen mit transgenen MSC.....	11
1.3.3 Transgene Modifikation von MSC	12
1.3.4 TRAIL als potentielles Transgen für eine Tumorthherapie.....	14
1.3.5 Das CRC als Beispielerkrankung für eine Tumorthherapie mittels transgener MSC.....	16
1.4 ZIELE DER ARBEIT	17
2 MATERIALIEN	18
2.1 ZELLEN.....	18
2.2 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	18
2.3 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	22
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	24
3 METHODEN.....	25
3.1 KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN.....	25
3.2 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON MSC.....	25
3.3 ERSTELLEN EINER WACHSTUMSKINETIK.....	26
3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE.....	26

3.5	NACHWEIS DES DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS VON MSC.....	27
3.6	RNA-ISOLATION UND RT-PCR	28
3.7	PROTEINISOLIERUNG UND WESTERN BLOT	29
3.8	ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN MITTELS SULFORHODAMIN-B-ASSAY	29
3.8.1	Erstellen einer Wachstumskinetik für den SRB-Assay	30
3.8.2	Untersuchung der Sensitivität von Zellen gegenüber Zytostatika mittels SRB-Assay ..	30
3.8.3	Untersuchung der Sensitivität von Zellen gegenüber löslichem TRAIL	31
3.9	<i>IN-VITRO</i> -MODELL DER RESISTENZ VON MSC GEGENÜBER GENOTOXISCHER SCHÄDIGUNG.....	31
3.10	QUANTIFIZIERUNG DER CISPLATIN-VERMITTELTEN SCHÄDIGUNG UND NACHWEIS VON APOPTOSE	32
3.10.1	Analyse des zellulären Platingehaltes	32
3.10.2	Trypan-Blau-Ausschluss-Test.....	32
3.10.3	Bestimmung der Caspaseaktivität mittels Caspaseassay	32
3.10.4	Färbung mit Annexin V	33
3.10.5	Apoptosenachweis mittels Western Blot-Analyse	33
3.11	UNTERSUCHUNG DER ZELLYKLUSREGULATION	33
3.12	GENERIERUNG TRANSGENER ZELLEN	34
3.12.1	Klonierung der lentiviralen Expressionsplasmide	34
3.12.2	Gewinnung infektiöser lentiviraler Partikel.....	35
3.12.3	Lentivirale Transduktion adhärenter Zellen	35
3.13	IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG FÜR TRAIL	36
3.14	ANALYSE DES WACHSTUMS IN SOFT AGAR	36
3.15	ZWEIDIMENSIONALE KOKULTUR VON <i>TRAIL</i> -MSC MIT CRC-ZELLEN	37
3.16	TIERVERSUCHE	38
3.16.1	Markierung adhärenter Zellen mit fluoreszierendem Farbstoff.....	38
3.16.2	Untersuchungen im subkutanen Mischxenograftmodell.....	38
3.16.3	Analyse des Effekts der systemischen Applikation von WT-MSC und <i>TRAIL</i> -MSC	39
3.16.4	Nicht-invasives <i>in vivo</i> Multispektral-Fluoreszenz-Imaging	39
3.16.5	Histologische und immunhistochemische Untersuchung von Xenograften und Gewebeproben	40
3.17	STATISTISCHE ANALYSE	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	ISOLATION VON MSC AUS DEM KNOCHENMARK BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN ERKRANKUNGEN UND IHRE CHARAKTERISIERUNG	42
4.1.1	Präsenz von CFU-F bei Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung.....	42

4.1.2	Charakteristika der von Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung gewonnenen MSC	43
4.1.3	Sensitivität von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung.....	46
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER RESISTENZ VON MSC FÜR GENOTOXISCHE SCHÄDIGUNG.....	48
4.2.1	Verhalten von MSC in einem <i>In-vitro</i> -Modell der genotoxischen Schädigung	48
4.2.2	Zellulärer Platingehalt in MSC nach Exposition mit Cisplatin.....	49
4.2.3	Apoptotische Schwelle für Cisplatin-induzierte Schädigung in MSC.....	50
4.2.4	Caspase-Aktivitäten in MSC nach Cisplatin-induzierter Apoptose.....	52
4.3	UNTERSUCHUNG DER ROLLE DER ZELLYKLUSREGULATION FÜR DIE RESISTENZ VON MSC GEGENÜBER GENOTOXISCHER SCHÄDIGUNG.....	53
4.3.1	Expression von p53 nach genotoxischer Schädigung.....	53
4.3.2	Zellzyklusverhalten von MSC nach genotoxischer Schädigung.....	54
4.3.3	Charakteristika von MSC nach Schädigungs-assoziiertem, temporärem Zellzyklusarrest.....	57
4.3.4	Ausgewählte Mechanismen der Zellzyklusregulation in MSC nach genotoxischer Schädigung.....	58
4.4	ANALYSE DER TUMORINTEGRATION VON MSC UND IHRES EINFLUSSES AUF DAS TUMORWACHSTUM AM BEISPIEL SUBKUTANER CRC-XENOGRAFTE	59
4.4.1	Tumorintegration von MSC.....	59
4.4.2	Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Tumorwachstum	60
4.5	UNTERSUCHUNG TRANSGENER MSC ALS VEHIKEL EINER TUMORTHERAPIE AM BEISPIEL VON <i>TRAIL</i> -MSC IM CRC-MODELL	62
4.5.1	Sensitivität unterschiedlicher CRC-Zelllinien für sTRAIL	62
4.5.2	Generierung lentiviral <i>TRAIL</i> -exprimierender MSC und deren Charakteristika	62
4.5.3	Einfluss von <i>TRAIL</i> -MSC auf kokultivierte sTRAIL-sensitive CRC-Zellen.....	65
4.5.4	Einfluss von <i>TRAIL</i> -MSC auf kokultivierte sTRAIL-resistente CRC-Zellen.....	68
4.5.5	Sensitivierung <i>TRAIL</i> -MSC-resistenter CRC-Zellen durch Oxaliplatin in subapoptotischer Dosierung	71
4.5.6	Einfluss tumorintegrierter <i>TRAIL</i> -MSC auf das Tumorwachstum in subkutanen CRC-Mischxenograften	74
4.5.7	Effekt systemisch applizierter <i>TRAIL</i> -MSC auf das Wachstum subkutaner CRC-Xenograften	76
4.5.8	Abhängigkeit der Wachstumsinhibierung vom Anteil tumorintegrierter <i>TRAIL</i> -MSC in subkutanen CRC-Mischxenograften.....	78
5	DISKUSSION	80
5.1	CHARAKTERISTIKA VON MSC BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN ERKRANKUNGEN	80
5.2	RESISTENZ VON MSC GEGENÜBER GENOTOXISCHER SCHÄDIGUNG	82

5.3	ZELLZYKLUSREGULATION VON MSC ALS MÖGLICHER RESISTENZMECHANISMUS	84
5.4	FÖRDERUNG DES TUMORWACHSTUMS DURCH TUMORINTEGRIERTE MSC.....	86
5.5	MSC ALS VEHIKEL EINER TUMORTHERAPIE	88
6	AUSBLICK.....	93
7	ZUSAMMENFASSUNG	94
8	LITERATURVERZEICHNIS	96
9	ANHANG	107
	TABELLEN	107
	ABBILDUNGEN	110
	ERKLÄRUNG	116
	DANKSAGUNG	117
	LEBENS LAUF	118
	PUBLIKATIONS LISTE	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Enzymbezeichnungen, Länder, Standard-Maßeinheiten sowie Puffer und Medien werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Für Fachtermini wurden die in der englischen Fachliteratur gebräuchlichen Abkürzungen verwendet. Genbezeichnungen sowie aus dem Englischen oder dem Lateinischen übernommene Begriffe und Namen werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

AAS	Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie
BSA	bovines Serumalbumin
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
CFU-F	Kolonie-bildende Fibroblasten-ähnliche Einheit
CD	Differenzierungscluster
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CKI	Cdk-Inhibitor
CRC	Kolorektales Karzimon
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	<i>death domain</i>
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat; DiI _{C₁₈} (3)
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i>
d(R)	Tag der Rekonstitution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HLA	humanes Leukozytenantigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IC	inhibitorische Konzentration
i. v.	intravenöse Injektion
kDA	Kilo-Dalton

KM	Knochenmark
KM-MNZ	Mononukleäre Zellen des Knochenmarks
KM-MSC	Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks
LPL	Lipoprotein-Lipase
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MNZ	Mononukleäre Zellen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MSC-UKM	MSC von Spendern mit vorangegangener Chemotherapie
MSC-VKM	MSC von Spendern ohne vorangegangene Chemotherapie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
OD	optische Dichte
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Populationsverdopplung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDT	Populationsverdopplungszeit
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumjodid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
s. c.	subkutane Injektion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin-B
Stabw	Standardabweichung
sTRAIL	lösliches TRAIL
TCA	Trichloressigsäure
TGCT	Testikulärer Keimzelltumor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
VSVG	Glycoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Mesenchymale Stammzellen - Ihre Charakteristika und potentielle Relevanz bei malignen Erkrankungen

1.1.1 Generelle Eigenschaften Mesenchymaler Stammzellen

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die zur undifferenzierten, selbsterneuernden Teilung (*self-renewal*) in der Lage sind sowie funktionell ausgereifte Tochterzellen unterschiedlichen Phänotyps hervorbringen können. Der Nachweis des Stammzellcharakters muß *in vivo*, *in vitro* oder nach Transplantation *in vivo* erfolgen (NIH 2001).

Per Definition werden verschiedene Arten von Stammzellen aufgrund ihrer Differenzierungskapazität unterschieden. Totipotente Stammzellen, wie z. B. die Zygote sowie die Blastomeren der Morula bis zum 8-Zell-Stadium, besitzen die Fähigkeit einen kompletten, lebensfähigen Organismus zu bilden, d. h. aus ihnen gehen alle Zelltypen des Embryos sowie die extraembryonalen Gewebe eines Organismus hervor (Carlson 1999). Pluripotente Stammzellen, wie z. B. embryonale Stammzellen, sind in der Lage, in alle Zelltypen der drei Keimblätter zu differenzieren, bilden jedoch keine extraembryonalen Gewebe aus. Die Differenzierungskapazität multipotenter Stammzellen ist auf ausgewählte Zelltypen beschränkt. Einige adulte Stammzellen besitzen die Fähigkeit der Transdifferenzierung, d. h. der Differenzierung von Zellen eines Keimblattes in Zelltypen eines anderen Keimblattes (Anderson *et al.* 2001).

Durch Friedenstein wurden 1970 erstmals durch Plastikadhärenz Zellen aus dem Knochenmark (KM) isoliert, die *in vitro* als Kolonie-bildende Fibroblasten-ähnliche Einheit (*colony-forming unit-fibroblast*, CFU-F) proliferierten (Friedenstein *et al.* 1970). Jeder dieser Kolonien liegt eine als Mesenchymale Stammzelle (MSC) bezeichnete Zelle zugrunde (Caplan 1991; Pittenger *et al.* 1999). Für MSC wurde ein multipotentes Differenzierungspotential belegt, insbesondere die Fähigkeit zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung, die anhand der Expression von Differenzierungsmarkern wie Lipoprotein-Lipase (LPL), *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) oder Osteocalcin sowie anhand zytochemischer Färbungen nachgewiesen wird (Pittenger *et al.* 1999; Wakitani *et al.* 1995). Für MSC wurde ebenfalls die Fähigkeit der Transdifferenzierung (Phinney *et al.* 2007), z. B. in Zellen mit hepatozytärem (Aurich *et al.* 2007) oder neuronalem (Anghileri *et al.* 2008) Charakter beschrieben.

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen hinsichtlich der Charakteristika von MSC sind aufgrund verschiedener Isolationsmethoden, wie Plastikadhärenz, (Friedenstein *et al.* 1976) Dichtegradientenzentrifugation (Pittenger *et al.* 1999) und immunologische Zellseparation

(Reyes *et al.* 2002) sowie differentieller Kultivierungsbedingungen, z. B. Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) oder Wachstumsfaktoren nur bedingt vergleichbar. Bislang wurde für MSC kein unikater Marker identifiziert. *In vitro* zeigen MSC jedoch einen charakteristischen Phänotyp: sie sind negativ für hämatopoetische Marker und exprimieren eine typische Kombination von Oberflächenproteinen, zu denen Adhäsionsmoleküle, wie z. B. CD44, CD105 (Endoglin), CD106 (VCAM-1) und CD166 (ALCAM-1) sowie Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie z. B. Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor, *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor, *transforming growth factor* β -Rezeptor und *fibroblast growth factor*-Rezeptor gehören (Minguell *et al.* 2001). Im Laufe der letzten Jahre wurden neue Oberflächenantigene wie CD271 (Quirici *et al.* 2002) oder MSCA-1 (Battula *et al.* 2007) identifiziert, die eine Anreicherung von MSC aus den mononukleären Zellen des KM (KM-MNZ) erlauben.

Um eine Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Forschergruppen zu ermöglichen, wurden im Rahmen eines Konsensus folgende definierende Charakteristika für MSC benannt (Dominici *et al.* 2006):

- (1) Adhärenz an Plastikoberflächen unter Standard-Kulturbedingungen
- (2) Spezifische Oberflächenantigen-Expression mit mindestens 95 % der Zellen positiv für CD73, CD90 und CD105 und mindestens 98 % der Zellen negativ für CD11b oder CD14, CD19 oder CD79a, CD34, CD45 und HLA-DR
- (3) Multipotentes Differenzierungspotential mit *In-vitro*-Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten und dessen Nachweis mittels zytochemischer Färbung

MSC besitzen einen hypoimmunogenen Charakter. Sie exprimieren nur geringe Mengen HLA Klasse I Moleküle und sind negativ für HLA Klasse II sowie kostimulatorische Moleküle. MSC zeigen *in vitro* immunsuppressive und immunmodulatorische Eigenschaften (Rasmusson 2006). MSC sind zur Migration fähig und exprimieren entsprechende Chemokin-Rezeptoren (u. a. CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6) (Fox *et al.* 2007). Es wurden einige lösliche Faktoren, u. a. PDGF, *bone morphogenic protein-2* und *-4*, *hepatocyte growth factor* und *insulin-like growth factor-1* beschrieben, welche *in vitro* chemotaktische Effekte auf MSC ausüben, wobei deren physiologische Relevanz hinsichtlich der Migration von MSC *in vivo* noch unklar ist (Ponte *et al.* 2007).

Bislang umstritten ist die maligne Transformation von MSC. Eine Transformation humaner MSC wurde nach deren Langzeitkultivierung *in vitro* beobachtet (Rosland *et al.* 2009; Rubio *et al.* 2005). Andere Gruppen konnten dies unter ähnlichen Kulturbedingungen jedoch nicht nachvollziehen (Bernardo *et al.* 2007).

1.1.2 Vorkommen von MSC im Organismus und Hinweise einer Resistenz von MSC gegenüber Schädigungen

MSC können neben dem KM aus vielen anderen Geweben isoliert werden, z. B. Nabelschnurblut, Fettgewebe, Muskel- und Lungengewebe (Barry *et al.* 2004). Aufgrund eines fehlenden unikaten Markers ist das *In-vivo*-Korrelat dieser Zellen bislang nicht sicher identifiziert. Aktuelle Arbeiten legen nahe, dass MSC in vielen Geweben als Gefäß-assoziierte Perizyten existieren (Crisan *et al.* 2008). Im KM scheinen MSC an der Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Homöostase beteiligt zu sein, indem sie die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (HSC) beeinflussen (Valtieri *et al.* 2008). In anderen Organen scheinen MSC an der Geweberegeneration teilzunehmen, wobei nicht sicher geklärt ist, ob es sich hierbei um gewebeständige MSC oder aus dem KM einwanderte MSC handelt (Sasaki *et al.* 2008). Im murinen Modell wurde gezeigt, dass MSC des KM (KM-MSK) nach i. v. Transplantation neben dem KM in Gewebe wie Muskel, Haut, Darm, Leber und Lunge integrierten und dort über einen langen Zeitraum persistierten (Pereira *et al.* 1995; Rochefort *et al.* 2005). Das physiologische Vorkommen von im peripheren Blut zirkulierenden MSC ist bislang jedoch umstritten [Übersicht bei (Fox *et al.* 2007)].

Es existieren Hinweise darauf, dass MSC *in vivo* resistent gegenüber Schädigungen sind. MSC persistieren lebenslang im Organismus und können von Spendern hohen Alters isoliert werden (Nishida *et al.* 1999). Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass MSC von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (Baxter *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 1999) sowie von Patienten mit Malignomen isoliert werden können (Koc *et al.* 2000). Untersuchungen des Chimerismus in Patienten nach allogener KM- oder Blutstammzelltransplantation haben gezeigt, dass die KM-MSK nach myeloablativer Konditionierung vom Empfänger stammen (Koc *et al.* 1999), was ein Hinweis darauf ist, dass MSC die entsprechenden genotoxischen Schädigungen toleriert haben. Das lässt auf eine Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung schließen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen nicht bekannt sind.

1.1.3 Integration von MSC in maligne Tumoren

Für MSC wurde im Tiermodell ein Tropismus für verletzte Gewebestrukturen beobachtet (Fox *et al.* 2007; Ponte *et al.* 2007). In Übereinstimmung mit der These einer Analogie der Wundheilung und des Tumorwachstums (Dvorak 1986) wurde für MSC im Tiermodell eine Einwanderung in maligne Tumoren verschiedener Entitäten beschrieben; MSC migrierten nach systemischer Transplantation zum Tumor (Khakoo *et al.* 2006; Komarova *et al.* 2006) und partizipierten am Tumorstroma (Studený *et al.* 2002).

Das nicht-maligne Zellen aktiv in den Tumor integrieren und an der Ausbildung des Tumorstromas beteiligt sind, ist seit längerem bekannt (Hung *et al.* 2005; Yang, M *et al.* 2003). Aktuell wurde gezeigt, dass nicht-hämatopoetische KM-Zellen als Tumor-assoziierte Fibroblasten (*carcinoma-associated fibroblasts*, CAF) in malignen Tumoren des humanen Organismus zu einem Anteil von 2 - 6 % präsent sind (Avital *et al.* 2007; Cogle *et al.* 2007). Im Tiermodell wurde ein Anteil von bis zu 25 % dem KM entstammende CAF am Tumorstroma beobachtet (Direkze *et al.* 2004). Für MSC erfolgte *in vitro* der Nachweis einer Differenzierung in Zellen mit typischen Eigenschaften von CAF (Jeon *et al.* 2008; Mishra *et al.* 2008). Inwiefern MSC physiologisch in Tumoren des humanen Organismus einwandern und wie groß ihr Anteil am Tumorstroma ist, ist u. a. aufgrund eines fehlenden unikaten Markers bislang ungeklärt (Fox *et al.* 2007).

Die physiologische Relevanz des in einigen Arbeiten verwendeten Anteils von bis zu 75 % MSC an der Gesamttumorzellpopulation (Karnoub *et al.* 2007) ist abhängig vom postulierten Mechanismus der Beteiligung der Zellen am Tumorstroma. Neben der Möglichkeit der Einwanderung in etablierte Tumoren, ist die vorherige Präsenz von MSC am Ort der Tumorentstehung im Sinne einer prämetastatischen Nische denkbar (Psaila *et al.* 2009). Die sekundäre Einwanderung, im Tiermodell z. B. durch i. v.-Injektion von MSC in tumortragende Tiere simulierbar, geht vermutlich mit einem geringen Anteil MSC an der Gesamttumorzellpopulation einher. Dagegen ist das Modell der prämetastatischen Nische mit einem hohen Anteil MSC vereinbar und kann im Tiermodell z. B. durch Kotransplantation von MSC und Tumorzellen simuliert werden. Über den Effekt von MSC auf das Tumorwachstum im Tiermodell liegen unterschiedliche Ergebnisse vor [Übersicht bei (Kidd *et al.* 2008; Lazennec *et al.* 2008)]. Bei unterschiedlichen Entitäten wurde eine Hemmung (Khakoo *et al.* 2006) oder eine Förderung (Djouad *et al.* 2006; Yu, JM *et al.* 2008) des Tumorwachstums durch tumorintegrierte MSC gezeigt. Dieser Einfluss war innerhalb einer Entität z. T. gegensätzlich ausgeprägt und war u. a. von der untersuchten Zelllinie (Karnoub *et al.* 2007) sowie der Untersuchung *in vitro* und *in vivo* abhängig (Ramasamy *et al.* 2007).

1.2 Genotoxische Schädigung von Zellen und entsprechende zelluläre Reaktionsmechanismen

1.2.1 Schädigung durch Zytostatika und Zytostatikaresistenz

Genotoxische Schädigungen können durch endogene sowie exogene Faktoren induziert werden, zu denen Radikale, UV-Strahlung und Chemikalien gehören. In der Tumorthherapie werden durch Zytostatika induzierte genotoxische Schädigungen genutzt, wobei je nach Tumorentität Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen Anwendung finden.

Cisplatin [Übersicht bei (Fuertes *et al.* 2003)] kommt u. a. bei Keimzelltumoren, Ovarial-, Bronchial- und Zervixkarzinomen zum Einsatz. Cisplatin ist ein planares Platinderivat mit zwei Chlor-Liganden und wird in der Zelle aufgrund der geringen Chloridkonzentration hydrolysiert. Dabei werden beide Chloratome durch Wasser- oder Hydroxyl-Gruppen ersetzt und es entsteht eine positiv geladene Monoaqua- oder Diaquaform. Diese reagiert mit nukleophilen Molekülen in der Zelle. Es kommt zur Bildung verschiedener DNA-Platinaddukte, d. h. zu Vernetzungen zwischen DNA-Strängen und innerhalb eines DNA-Stranges sowie zu DNA-Protein-Vernetzungen, welche die Blockierung von Replikation und Transkription zur Folge haben. Nur 5 - 10 % des kovalent in der Zelle gebundenen Platins werden in der DNA-Fraktion detektiert - der größte Teil der Substanz interagiert mit RNA und Proteinen. Jedoch werden die induzierten DNA-Schäden als Auslöser von Apoptose über den intrinsischen Signalweg betrachtet.

Etoposid [Übersicht bei (van Maanen *et al.* 1988)] findet u. a. bei Keimzelltumoren, Bronchial- und Ovarialkarzinomen sowie Hämoblastosen Anwendung und gehört zu den Topoisomerase II-Giften. Im Gegensatz zu Topoisomerase II-Inhibitoren hemmt es nicht die katalytische Aktivität der Topoisomerase II, sondern erhöht die Gleichgewichtskonzentration des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Spaltungskomplexes, indem es die Fähigkeit des Enzyms zur Religation der gespaltenen DNA verringert. Dadurch entstehen Doppelstrangbrüche und die DNA-Reparaturkapazität wird vermindert, was zur Sensibilisierung gegenüber anderen Zytostatika bei Kombinationstherapien führt. Der Signalweg von den Strangbrüchen bis zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose ist bislang nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass durch die Strangbrüche eine Aktivierung der Caspasen erfolgt (Froelich-Ammon *et al.* 1995) oder Apoptose durch das gehäufte Auftreten von chromosomalen Aberrationen nach Reparatur- und Rekombinationsereignissen ausgelöst wird (Burden *et al.* 1998). Etoposid verhindert darüber hinaus das Eintreten in die Mitose, indem es die Zellzyklus-Progression in der späten S- und der G2-Phase blockiert. Auch hier sind die zugrunde liegenden Mechanismen nicht vollständig geklärt (Schmoll *et al.* 1999).

Vincristin [Übersicht bei (Gidding *et al.* 1999)] ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid und zählt zu den wichtigsten Zytostatika zur Behandlung pädiatrischer und adulter Malignome. Die Wirkung von Vincristin beruht auf der Bindung an Tubulin, wodurch die Polymerisation der Mikrotubuli inhibiert wird. Es kommt zur Schädigung der Spindelstruktur, zu Mikrotubuli-Brüchen und zur Inhibierung der Mitose. Die Vincristin-bedingte Störung des normalen Zellzyklus ist der wahrscheinliche Auslöser von Apoptose, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen jedoch nicht vollständig geklärt sind (Jordan *et al.* 2004).

Die höhere Sensitivität vieler Tumorzellen gegenüber Zytostatika verglichen mit nicht-malignen Zellen beruht hauptsächlich auf der hohen Stoffwechselaktivität und Proliferation der malignen Zellen. Die meisten nicht-malignen Zellen sind aufgrund ihrer niedrigen

Teilungsfrequenz resistent gegenüber der Schädigung durch Zytostatika. Eine Ausnahme bilden Gewebe mit hoher Zellteilungsrate, zu denen Epithelien z. B. des Darms sowie das KM gehören.

Eine Resistenz gegenüber Zytostatika kann z. B. durch die geringe intrazelluläre Akkumulation einer Substanz durch verminderte Aufnahme oder erhöhten Export vermittelt sein. Die erhöhte aktive Ausfuhr einer Substanz aus der Zelle kann z. B. durch Proteine der *multidrug resistance-related proteins*-Familie erfolgen und spielt sowohl für Cisplatin (Fuertes *et al.* 2003) und Etoposid (Kellner *et al.* 2002) als auch für Vincristin (Gidding *et al.* 1999) eine Rolle. Weiterhin können eine fehlende Aktivierung oder eine gesteigerte Inaktivierung der Substanz in der Zelle zu Resistenzen führen, z. B. bewirken Thiol-enthaltende Biomoleküle eine Inaktivierung von Cisplatin. Des Weiteren kann eine Resistenz auf die verminderte Aktivität des Zielmoleküls zurückzuführen sein. Speziell für Etoposid wurde die verminderte Topoisomerase II-Aktivität durch Mutationen oder verminderte Expression als Grundlage einer Resistenz beschrieben (Kellner *et al.* 2002). Nach erfolgter genotoxischer Schädigung kann eine vermehrte Reparatur der DNA-Läsionen durch die Zelle zu einer Resistenz führen. Sie wird z. B. bei Cisplatin oder Etoposid beobachtet und ist häufig mit einem Zellzyklusarrest assoziiert (Schmoll *et al.* 1999).

1.2.2 Rolle der Zellzyklusregulation bei Schädigung

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen läßt sich in vier Phasen unterteilen: G1, S, G2 und M [Übersicht bei (Johnson *et al.* 1999; Schafer 1998; Vermeulen *et al.* 2003b)] (Abb. 1-1). In der G1-Phase erfolgen die Prozesse zur Vorbereitung der DNA-Replikation. Sie ist gekennzeichnet durch einen diploiden Chromosomensatz und eine kontinuierliche Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese. Während der S-Phase findet die DNA-Synthese statt. In der G2-Phase werden diverse Kontrollmechanismen in Vorbereitung des Prozesses der Zellteilung vollzogen. Die G2-Phase ist gekennzeichnet durch einen tetraploiden Chromosomensatz. In der M-Phase erfolgt die Mitose. Zusätzlich wird die G0-Phase unterschieden. Zellen in der G0-Phase haben den Zellzyklus verlassen und werden als ruhend (*quiescent*) bezeichnet. Sie besitzen einen diploiden Chromosomensatz und können nur aufgrund ihres geringeren RNA-Gehaltes von G1-Zellen unterschieden werden.

Eine Möglichkeit der Analyse des Zellzyklus besteht in der Messung des DNA-Gehaltes. Der hierfür am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumjodid (PI), ein Molekül, das stöchiometrisch in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert. Eine andere Möglichkeit stellt der Nachweis spezifischer Proteine der einzelnen Zellzyklusphasen (u. a. PCNA, Ki-67) dar.

Zu den wichtigsten Kontrollmechanismen des Zellzyklus gehört die Regulation von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) durch Cycline, Phosphorylierungen und Cdk-Inhibitoren (CKI).

Cdk gehören zur Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen. Sie werden konstitutiv exprimiert und Zellzyklusphasen-spezifisch durch Komplexbildung mit Cyclinen aktiviert (Abb. 1-1). Cycline dagegen werden während des Zellzyklus periodisch exprimiert. Eine Ausnahme bilden die D-Cycline, welche in Abhängigkeit der Präsenz von Wachstumsfaktoren exprimiert werden. Weiterhin wird die Aktivität der Cdk durch spezifische Phosphorylierungen reguliert. Aktivierende Phosphorylierungen erfolgen durch die Cdk-aktivierende Kinase. Spezifische inhibierende Phosphatgruppen werden durch Cdc25 Enzyme dephosphoryliert, um Cdk zu aktivieren. Aktivierte Cdk phosphorylieren anschließend ihre spezifischen Zielproteine. Die negative Regulation der Cdk/Cyclin-Komplexe wird u. a. durch CKI vermittelt. Zu den CKI gehören z. B. die Proteine der Cip/Kip-Familie (p21, p27, p52), welche die Aktivität von Cdk in allen Zellzyklusphasen inhibieren können.

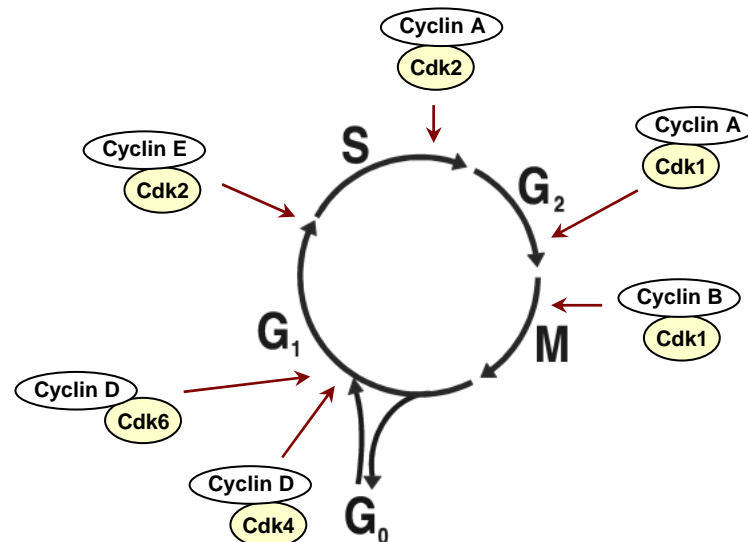


Abb. 1-1: Zellzyklusregulation durch Cdk/Cyclin-Komplexe (modifiziert nach Vermeulen *et al.* 2003b).

Zellzyklus-Kontrollpunkte sind regulatorische Mechanismen, die verhindern, dass die Initiierung einer neuen Phase des Zellzyklus vor Beendigung der vorherigen Phase stattfindet. An diesen Kontrollpunkten kann die Zellzyklusprogression als Reaktion auf Stress, Schädigung oder Nährstoffentzug temporär arretiert werden. Durch DNA-Schäden werden spezifische Kontrollpunkte am G1/S- und G2/M-Übergang und innerhalb der S-Phase aktiviert.

Die durch DNA-Schädigung induzierte Arrettierung des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt ist p53-abhängig, während die Arrettierung am G2/M-Kontrollpunkt p53-unabhängig ist. DNA-Läsionen werden u. a. von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und spezifischen Kinasen erkannt, die Zielproteine wie p53 sowie die Proteinkinasen Chk1 und Chk2 aktivieren. Aktiviertes p53 stimuliert die Transkription von p21, welches Cdk/Cyclin-Komplexe

Zellzyklusphasen-unspezifisch inhibiert sowie die DNA-Synthese durch direkte Interaktion mit PCNA, einer Untereinheit der DNA Polymerase δ , hemmt.

In Gegenwart von p53 erfolgt die Zellzyklusarrestierung am G2/M-Kontrollpunkt initial durch die Inhibierung des Cdk1/Cyclin B-Komplexes durch p21. Anschließend wird die Expression von Cdk1 und Cyclin B durch p53-abhängige Repression der entsprechenden Promotoren reduziert (Lundberg et al. 1999).

In Abwesenheit von p53 wird der Zellzyklusarrest am G2/M-Kontrollpunkt über die Aktivierung von Chk1 und Chk2 vermittelt. Chk1 und Chk2 phosphorylieren Cdc25C, wodurch dieses inhibiert wird. Cdc25C kann daraufhin Cdk1 nicht dephosphorylieren. Der Cdk1/Cyclin B-Komplex bleibt somit inaktiv und der Eintritt in die Mitose kann nicht erfolgen (Lundberg et al. 1999).

Störungen der Zellzyklusregulation sind häufig mit Mutationen, chromosomalen Aberrationen und Aneuploidie assoziiert und können zur Tumorgenese beitragen.

1.2.3 Apoptose als Reaktion auf Schädigungen

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes [Übersicht bei (Adams 2003; Degterev et al. 2003; Elmore 2007)]. Die beiden Hauptsignalwege der Apoptose sind der extrinsische und der intrinsische Weg (siehe Abb. 1-2).

Der intrinsische Signalweg wird durch eine Vielzahl intrazellulärer Stimuli aktiviert, z. B. die Abwesenheit essentieller Wachstumsfaktoren, die eine Suppression antiapoptotischer Faktoren zur Folge haben, oder Schädigungen von DNA durch Toxine oder freie Radikale. Pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie führen in Reaktion auf diese Stimuli zu Veränderungen der mitochondrialen Membranen. Sequestrierte proapoptotische Proteine, z. B. Cytochrom c und Smac/DIABLO, werden vom Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt. Cytochrom c bindet an das Adaptermolekül *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1), welches dadurch aktiviert wird und oligomerisiert. Es kommt zur Rekrutierung der Procaspase-9, des Zymogens der Initiator-Caspase-9, und deren Bindung an das oligomerisierte Apaf-1. Daraufhin entsteht ein als Apoptosom bezeichneter Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und einem Dimer der Caspase-9, welcher als Heptamer vorliegt. Innerhalb des Apoptosoms erfolgt die Aktivierung der Caspase-9, welche anschließend die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert.

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch extrazelluläre Signale über transmembranäre Rezeptoren aktiviert. Diese Todesrezeptoren (*death receptors*, DR) gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren und enthalten eine, als Todesdomäne (*death domain*, DD) bezeichnete, zytoplasmatische Region. Zu den DR gehören der Fas/CD95-Rezeptor, der TNF-Rezeptor und die *TNF-related apoptosis inducing*

ligand (TRAIL)-Rezeptoren (TRAIL-R) 1 und 2. Nach Bindung des Liganden werden Rezeptor-spezifische, DD-enhaltende zytoplasmatische Adaptermoleküle, z. B. FADD, an der Rezeptor-DD gebunden. An die Amino-terminale *death effector domain* von FADD bindet die Procaspase-8, das Zymogen der Initiator-Caspase-8. Im als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichneten Rezeptor-Signal-Komplex kommt es zur autoproteolytischen Aktivierung der Caspase-8, welche nachfolgend die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert. Beim extrinsischen Signalweg werden zwei Typen von Zellen unterschieden. In Typ I Zellen werden nach Formierung des DISC genügend Effektor-Caspasen aktiviert, so dass die Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet wird. In Typ II Zellen ist zur Aktivierung der Effektor-Caspasen eine Amplifikation der DISC-Signale unter Beteiligung des intrinsischen Signalweges notwendig. Dieser Mitochondrium-assoziierte Amplifikationsschritt erfolgt über das proapoptotische Protein Bid, welches zuvor von Caspase-8 aktiviert wurde und die Translokation von Cytochrom c ins Zytosol fördert. Unter Beteiligung des Apoptosoms kommt es zur Aktivierung der Effektor-Caspasen.

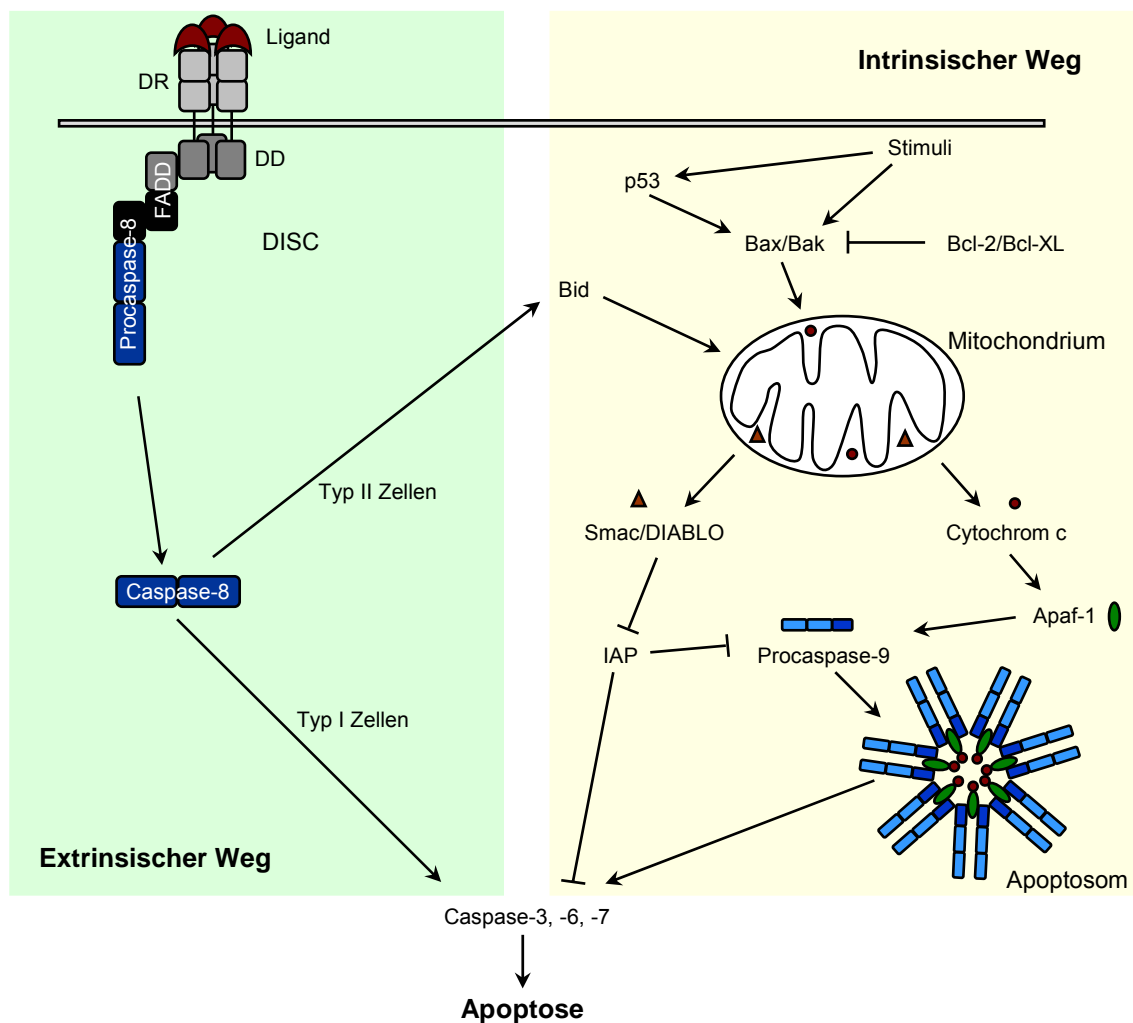


Abb. 1-2: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. IAP - inhibitor of apoptosis protein.

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg resultieren in der Exekutionsphase der Apoptose, welche mit der Aktivierung der Effektor-Caspasen beginnt. Caspase-3, die wichtigste der Effektor-Caspasen, wird durch jede der Initiator-Caspasen aktiviert. Die Effektor-Caspasen aktivieren zytoplasmatische Endonukleasen, z. B. *Caspase-activated DNase*, sowie Proteasen, welche Kernmaterial und zytoplasmatische Proteine degradieren. Zu den wichtigsten Substraten gehören Zytokeratine, PARP und Plasmamembran-stabilisierende Proteine, deren Spaltung zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen führt.

Zu diesen morphologischen Merkmalen apoptotischer Zellen gehören Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Plasmamembran sowie Kernfragmentierung. Diese können teilweise bereits bei niedrigen Vergrößerungen lichtmikroskopisch detektiert werden. Der Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie ist eines der frühen Merkmale apoptotischer Zellen. Phosphatidylserin, welches sich bei vitalen Zellen auf der Membraninnenseite befindet, wird auf der Zelloberfläche präsentiert, noch bevor sich die apoptotischen Zellen aus dem Zellverband lösen. Annexin V bindet selektiv Phosphatidylserin, wodurch die Detektion dieser frühen apoptotischen Zellen ermöglicht wird. Des Weiteren bleibt die Membranintegrität apoptotischer Zellen bis hin zu späten Stadien der Apoptose erhalten, was durch den Ausschluss von Trypan-Blau oder DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden kann, um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Es wurden mehrere Proteine identifiziert, denen innerhalb der Signalwege von Zellzyklus und Apoptose eine duale Funktion zuteil wird (Vermeulen *et al.* 2003a). Eine Schlüsselposition nimmt das Tumorsuppressorprotein p53 ein, welches sowohl einen Zellzyklusarrest als auch eine Apoptoseinduktion hervorrufen kann. Die Determination des entsprechenden Signalweges ist u. a. von Zelltyp, Art und Ausmaß der Schädigung sowie Menge des exprimierten p53 abhängig. Die Apoptoseinduktion kann einerseits über den intrinsischen Signalweg durch p53-vermittelte Verstärkung der Expression des proapoptotischen Proteins Bax bzw. Inhibierung der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 vermittelt sein. Andererseits kann durch p53-vermittelte Expression des Membran-gebundenen Fas die Aktivierung des extrinsischen Signalweges der Apoptose erfolgen (Liebermann *et al.* 2007).

1.3 MSC als potentielle Vehikel einer Tumortherapie

1.3.1 Prinzip einer MSC-basierenden Tumortherapie

Die Grundlage dieser Form der Tumortherapie bildete die Beobachtung, dass MSC in etablierte Tumoren einwandern. Diese Beobachtung machte MSC zu potentiellen Zielzellen für eine Tumortherapie mit tumorintegrierenden Zellen als Therapievehikel. Diese

Therapieform sieht die Gewinnung von MSC und deren Modifikation *in vitro* zur transgenen Expression eines antineoplastischen Faktors vor. Die transgenen MSC sollen im Weiteren Patienten mit soliden Tumoren transplantiert werden. Es wird angenommen, dass die transplantierten MSC spezifisch in den Tumor integrieren und aufgrund der transgenen Expression des antineoplastischen Faktors zu einer Remission führen.

Die Vorteile dieser Therapieform liegen aufgrund der Einwanderung der Zellen in Tumoren darin, dass es sich um eine lokale Therapie mit vermutlich geringer systemischer Toxizität handelt. Ein Nachweis der Funktionalität dieses Ansatzes erfolgte im Tiermodell und lag zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits vor [Übersicht bei (Aboody *et al.* 2008) und (Corsten *et al.* 2008)]. Nach systemischer Transplantation von Interferon- β -transgenen MSC wurde eine Remission humaner orthotoper Xenografte im Mausmodell beobachtet (Studený *et al.* 2002; 2004). Nach Transplantation von Cytosindeaminase-transgenen MSC in Mäuse mit subkutanen Xenograften Kolorektaler Karzinome (CRC) und Applikation des Prodrug 5-Fluorocytosin wurde eine Remission der Xenografte gezeigt (Kucerova *et al.* 2007).

Wesentlich für den Erfolg dieser Therapieform scheint die Effizienz der Einwanderung der transplantierten Zellen in den Tumor zu sein. In Abhängigkeit von Größe und Lokalisation des Tumors kann eine wiederholte Transplantation erforderlich sein. Zu den kritischen Punkten gehören die Verwendung allogener oder autologer MSC, die Methode der transgenen Manipulation, die Auswahl eines geeigneten Transgens sowie die zu transplantierenden Zellzahlen.

1.3.2 Klinische Erfahrungen mit transgenen MSC

Native humane MSC wurden in einigen klinischen Studien eingesetzt [Übersicht bei (Abdallah *et al.* 2009)]. Eine der ersten klinischen Anwendungen fanden MSC in der lokalen (Quarto *et al.* 2001) sowie systemischen (Horwitz *et al.* 1999) Behandlung von Defekten des Skelettsystems. Unter Ausnutzung ihres immunsuppressiven Potentials wurden MSC z. B. zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen (Christopeit *et al.* 2008) sowie zur Prävention oder Behandlung einer *graft-versus-host disease* (Lazarus *et al.* 2005; Le Blanc *et al.* 2008; Ning *et al.* 2008), welche eine der schwersten Nebenwirkungen der Transplantation allogener HSC darstellt, eingesetzt. Allerdings wird vermutet, dass transplantierte MSC ebenfalls den *graft-versus-leukemia* Effekt abschwächen können (Ning *et al.* 2008). Weiterhin wurde ein verbessertes Engraftment nach HSC-Transplantation durch kotransplantierte MSC beobachtet (Ball *et al.* 2007; Koc *et al.* 2000; Lazarus *et al.* 2005; Le Blanc *et al.* 2007).

Es ist nicht sicher, welche zu transplantierenden Zellzahlen für die unterschiedlichen klinischen Anwendungen notwendig sind, um eine Wirksamkeit zu erzielen. In vielen der

genannten Studien wurden Zellzahlen von $1 - 10 \times 10^6$ transplantierten MSC pro kg Körpergewicht verwendet. Anhand dieser Studienprotokolle [u. a. (Horwitz *et al.* 2002; Le Blanc *et al.* 2008)] wird deutlich, dass die Möglichkeit der GMP-gerechten Produktion dieser Zellzahlen besteht. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Zellzahlen auch von Patienten mit Malignomen und nach Chemotherapie gewonnen werden können und ob diese Zellmenge ausreichend für eine Tumortherapie mit transgenen MSC ist.

Transgene humane MSC wurden bisher nur im Rahmen einer einzelnen klinischen Studie transplantiert (Horwitz *et al.* 2002). Die transgene Modifikation erfolgte mittels retroviraler Transduktion, wobei es sich um eine transgene Markierung der Zellen handelte, nicht um ein therapeutisches Transgen. MSC mit transgener Expression eines therapeutischen Transgens wurden nach Kenntnis der Autorin bislang nicht transplantiert.

Innerhalb der bisherigen klinischen Studien wurden keine Nebenwirkungen der transplantierten MSC beobachtet. Insbesondere wurde keine maligne Transformation oder die Bildung von ektopem Gewebe beschrieben. Trotzdem besteht das Risiko potentieller Nebenwirkungen, da über das *In-vivo*-Überleben transplantiert MSC wenig bekannt ist. So wurden *in vitro* eine maligne Transformation nach Langzeitkultivierung (Rosland *et al.* 2009; Rubio *et al.* 2005) sowie im Tiermodell eine myokardiale Kalzifizierung nach lokaler Applikation (Breitbach *et al.* 2007) von MSC beobachtet. Bisher wurde *in vivo* keine Immunantwort nach Transplantation von MSC beschrieben. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass MSC unter bestimmten Bedingungen *in vitro* als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und eine Immunantwort auslösen können (Chan *et al.* 2006; Stagg *et al.* 2006). Es ist demnach nicht völlig ausgeschlossen, dass es nach Transplantation allogener MSC ohne medikamentöse Immunsuppression zu Abstoßungsreaktionen kommen kann. Die Verwendung autologer MSC schließt dieses Risiko nahezu aus und ist somit für Patienten mit Malignomen zu empfehlen. Allerdings war zu Beginn dieser Dissertation nicht bekannt, ob die Gewinnung von MSC von Patienten mit malignen Erkrankungen und insbesondere nach Chemotherapie möglich ist.

1.3.3 Transgene Modifikation von MSC

Die in den genannten Studienprotokollen verwendeten Zellzahlen machen die Expansion der MSC vor deren Transplantation notwendig. Die therapeutische Anwendung transgener MSC setzt daher eine Methode der genetischen Manipulation mit hoher Effizienz voraus, wobei zwei Strategien zur Anwendung kommen können. Eine Möglichkeit besteht in der transgenen Modifikation von MSC vor ihrer Expansion, welche die stabile Expression des Transgens voraussetzt. Eine andere Möglichkeit ist die transgene Modifikation der bereits expandierten MSC, wobei eine transiente Transgenexpression ausreicht.

Durch Transfektion bakterieller Plasmide wurde bei MSC nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz (Haleem-Smith *et al.* 2005) mit transienter Transgenexpression erzielt. Eine stabile Transgenexpression kann durch Selektion der transfizierten Zellen erreicht werden. Aufgrund der begrenzten Proliferationsfähigkeit von MSC *in vitro* kann dann jedoch nur eine begrenzte Zellzahl transgener MSC durch Transfektion generiert werden. Mit adenoviralen Vektoren kann in MSC eine sehr hohe Transduktionseffizienz erreicht werden. Adenoviren integrieren nicht in das Genom der Wirtszellen, das Vektorgenom liegt episomal vor. Die Transgenexpression geht daher mit der Proliferation der Zellen verloren (Thomas *et al.* 2003). Es ist daher davon auszugehen, dass die Expansion adenoviral transduzierter MSC mit dem Verlust der Transgenexpression einhergeht. Eine adenovirale Transduktion nach Expansion der Zellen ist möglich, erfordert jedoch eine große Menge an adenoviralen Vektoren.

Retrovirale und lentivirale Konstrukte integrieren direkt in das Genom der Wirtszelle und ermöglichen die stabile Expression des Transgens. Die Integration retroviraler Vektoren in das Genom der Zielzellen setzt deren Proliferation voraus. Dagegen integrieren lentivirale Vektoren auch in das Genom von sich nicht teilenden Zellen (Lewis *et al.* 1994). Für MSC wurde eine langsame Zellteilung beobachtet (Banfi *et al.* 2000; Guillot *et al.* 2007; Hamada *et al.* 2005) sowie, dass sich einige Zellen in MSC-Populationen in der G0-Phase des Zellzyklus befinden (Conget *et al.* 1999). Für die Generierung transgener MSC kann daher durch die Verwendung lentiviraler Systeme eine höhere Transduktionseffizienz erzielt werden. Retrovirale Vektoren integrieren bevorzugt in Promotor-nahen Regionen, wodurch die Gefahr einer transkriptionellen Inaktivierung der viralen Sequenzen durch DNA-Methylierung besteht (Brenner *et al.* 2003). Die Integrationsstellen lentiviraler Vektoren sind über die transkriptionellen Einheiten verteilt ohne besondere Affinität zu Promotorregionen (De Palma *et al.* 2005), die Gefahr der Inaktivierung der viralen Sequenzen ist somit geringer.

Die ersten lentiviralen Systeme, die für den Gentransfer entwickelt wurden, basierten auf HIV-1. Das parentale HIV-1-Genom besteht aus *cis*-aktiven Elementen und *trans*-Elementen. *Cis*-aktive Elemente sind nicht-kodierende Sequenzabschnitte, die für Vektor-RNA-Synthese, Verpackung, reverse Transkription und Integration benötigt werden. *Trans*-Elemente kodieren enzymatische, strukturelle und akzessorische Proteine (Clements *et al.* 1996). Replikationsinkompetente Vektoren wurden durch die Trennung von *cis*-aktiven Elementen und *trans*-Elementen auf verschiedenen Expressionskassetten erhalten (Srinivasakumar 2001). Mit dem Ziel einer weiteren Minimierung des Risikos der Generierung replikationskompetenter lentiviraler Vektoren wurden vier der akzessorischen Proteine entfernt und die für die Virushülle kodierenden Sequenzen auf einer separaten Expressionskassette von den HIV-1-Verpackungs- und Vektorkassetten getrennt (Cockrell *et al.* 2007).

Den derzeitigen Sicherheitsempfehlungen (Neschadim *et al.* 2007) entsprechen selbst-inaktivierende lentivirale Vektoren mit Verpackungssystemen der 3. Generation [Übersicht bei (Srinivasakumar 2001)], die insgesamt vier Plasmide, ein Expressionsplasmid, zwei Verpackungsplasmide sowie ein Hüllproteinplasmid, umfassen. Selbst-inaktivierende lentivirale Vektoren besitzen eine Deletion in der U3-Region des 3'-*long terminal repeat* (LTR), die nach reverser Transkription zur transkriptionellen Inaktivierung des 5'-LTR führt. Die parentalen HIV-1-Hüllproteine wurden durch artfremde virale Hüllproteine ersetzt (Pseudotypisierung), wodurch der Tropismus des lentiviralen Vektors gegenüber Wirtszellen verändert wurde. Häufig wird das Glycoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSVG) verwendet, welches das Spektrum der Wirtszellen auf eine große Zahl an Zelltypen sowie unterschiedliche Spezies ausweitet. Des Weiteren erhöht VSVG die Stabilität der Vektorpartikel und ermöglicht somit eine Konzentrierung der infektiösen Partikel mittels Ultrazentrifugation.

Zur Gewinnung lentiviraler Partikel werden die vier Plasmide mittels transienter Kotransfektion in Helferzellen eingebracht, in denen die infektiösen Vektorpartikel generiert werden. Die infektiösen Partikel werden von den Helferzellen sezerniert und können durch Abnehmen des überständigen Kulturmediums gewonnen werden. Die Titerbestimmung der Virusstammlösung erfolgt durch Inkubation einer definierten Menge von transduzierbaren Zellen mit einer Verdünnungsreihe des Virus und anschließender Analyse der Transgenexpression.

1.3.4 TRAIL als potentielles Transgen für eine Tumorthherapie

Apoptosis ligand 2 (Apo2L)/TRAIL gehört zur TNF-Familie von Apoptose-induzierenden Liganden und ist ein transmembranäres Protein vom Typ II [Übersicht bei (Almasan *et al.* 2003; LeBlanc *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003a)]. Seine extrazelluläre Carboxy-terminale Domäne kann proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden und liegt anschließend in Vesikel-assoziiierter oder löslicher Form vor. TRAIL bildet Homotrimere, welche an einen aus drei Rezeptormoleküle bestehenden Rezeptorkomplex binden. Bislang wurden vier membranständige homologe humane Rezeptoren für TRAIL identifiziert, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (*decoy receptor 1*, DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) sowie ein löslicher Rezeptor, OPG (Abb. 1-3).

Die Todesrezeptoren DR4 und DR5 enthalten eine DD in ihrer intrazellulären Region. Nach Ligandenbindung kommt es zur Trimerisation der Rezeptor-DD, zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD und zur Formierung des DISC. DcR1 und DcR2 fungieren als Decoy-Rezeptoren zu den DD-enhaltenden Rezeptoren DR4 und DR5 und antagonisieren die Wirkung von TRAIL. Die Rolle des löslichen Rezeptors OPG als Decoy-Rezeptor für

TRAIL ist wegen seiner unter physiologischen Bedingungen geringen Bindungsaffinität unklar (Bouralexis *et al.* 2005).

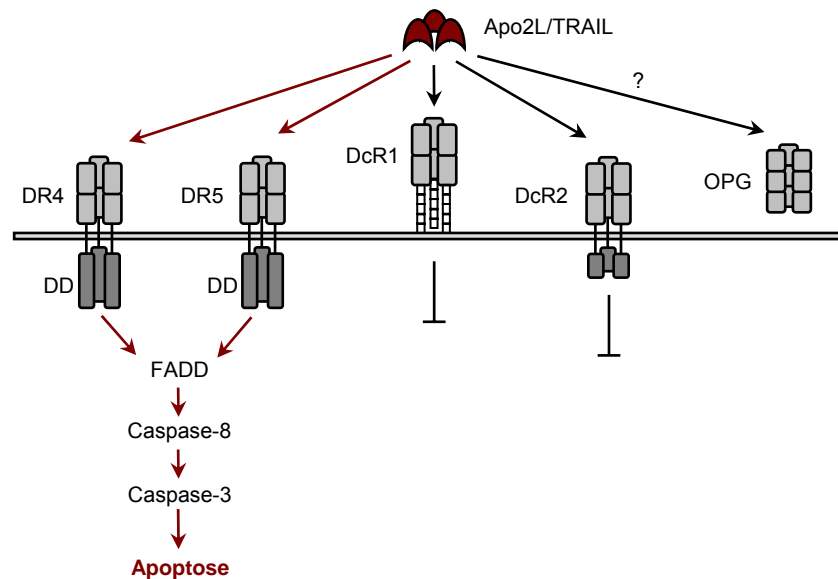


Abb. 1-3: TRAIL und seine Rezeptoren. DR4 und DR5 enthalten eine intrazelluläre DD und induzieren nach Ligandenbindung Apoptose über den extrinsischen Signalweg. DcR1 enthält keine intrazelluläre Domäne und besitzt keine Signalaktivität. DcR2 besitzt eine verkürzte, nicht funktionsfähige intrazelluläre Domäne. Die physiologische Relevanz des löslichen OPG für TRAIL ist nicht bekannt; modifiziert nach (Ashkenazi *et al.* 1998).

Die meisten nicht-malignen Zellen sind gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose wenig sensitiv. Diese Resistenz hat ihre Ursachen vor allem in der vermehrten Expression von Decoy-Rezeptoren (Almasan *et al.* 2003). Die daraus resultierende geringe systemische Toxizität macht TRAIL zu einem potentiellen Faktor für klinische Anwendungen. Gegenwärtig werden klinische Studien mit rekombinantem TRAIL oder DR-Agonisten u. a. bei Patienten mit CRC durchgeführt (Ashkenazi *et al.* 2008). Tumorzellen zeigen ein differentielles Ansprechen auf TRAIL. Viele Tumorzellen sind sensitiv gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, aber es wurden auch zahlreiche TRAIL-resistente Tumorzelllinien beschrieben. Resistenz gegenüber TRAIL kann z. B. durch folgende Mechanismen vermittelt sein: fehlende Expression von Caspase-8, Rekrutierung des antiapoptotischen FLIP anstelle von Caspase-8 zum DISC oder Störungen des intrinsischen Apoptose-Signalweges in Typ II Zellen durch Überexpression von *inhibitor of apoptosis proteins* oder Mutationen in proapoptotischen Proteinen (Wang *et al.* 2003a).

TRAIL-resistente Zelllinien können für TRAIL-induzierte Apoptose durch Behandlung mit Zytostatika in subapoptotischen Konzentrationen oder durch Bestrahlung sensitiviert werden (Marini *et al.* 2005). Diese Sensitivierung wird u. a. durch Aktivierung von p53 und der p53-abhängigen Expression von DR4 und DR5 vermittelt (Wang *et al.* 2003b).

TRAIL ist somit ein vielversprechender Faktor mit Anti-Tumor-Aktivität, da TRAIL aufgrund der relativen Selektivität für maligne Zellen eine geringe systemische Toxizität besitzt,

Apoptose unabhängig von p53 induziert und da TRAIL-resistente Zelllinien durch Zytostatika für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden können.

1.3.5 Das CRC als Beispielerkrankung für eine Tumorthherapie mittels transgener MSC

Das CRC stellt geschlechtsübergreifend die häufigste maligne Erkrankung sowie die zweithäufigste Krebs-bedingte Todesursache in Deutschland dar (RKI 2008). Trotz Fortschritten in der Therapie liegt das 5-Jahres-Überleben in metastasierten Stadien bei weniger als 10 % (Pessino *et al.* 2006; Wolpin *et al.* 2008). In der Behandlung des metastasierten CRC wurde durch den Einsatz von Kombinationstherapien mit Irinotecan oder Oxaliplatin im Vergleich zur Monotherapie mit 5-Fluorouracil oder zu Prodrugs eine Verlängerung der Überlebenszeit erzielt [Übersicht bei (Chau *et al.* 2009; Wolpin *et al.* 2008)]. Zu den neu entwickelten Therapien gehören Antikörpertherapien, z. B. mit Cetuximab, einem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor sowie Bevacizumab, einem Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor*-Rezeptor, die in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt werden.

Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten sind die Therapieoptionen nach einer Standardtherapie in fortgeschrittenen Stadien limitiert, sodass ein Bedarf an neuen Therapien besteht.

Im Tumorstroma humaner CRC-Xenografte wurde ein Anteil von bis zu 10 % dem KM entstammende Stromazellen (Sangai *et al.* 2005) sowie eine Integration von MSC gezeigt (Hung *et al.* 2005). Ein möglicher Ansatz besteht somit in der Verwendung transgener MSC als Vehikel antineoplastischer Faktoren. CRC-Zelllinien zeigen *in vitro* eine differentielle Sensitivität sowohl gegenüber Zytostatika als auch gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Galligan *et al.* 2005; van Geelen *et al.* 2003). TRAIL stellt somit einen relevanten antineoplastischen Faktor dar und kann eine mögliche Option für eine Behandlung des CRC sein, wie bereits der Einsatz von rekombinantem TRAIL in klinischen Studien zeigt (Ashkenazi *et al.* 2008).

1.4 Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation waren die verfügbaren Daten bezüglich der Isolierung von MSC von Patienten mit Malignomen sowie deren Charakterisierung begrenzt. Es lag nach Kenntnis der Autorin keine systematische Untersuchung der Isolierbarkeit von MSC bei Patienten nach vorangegangener Chemotherapie vor. Die publizierten Daten anderer Autoren sowie die erhobenen Daten dieser Arbeitsgruppe ließen jedoch eine Resistenz von MSC gegenüber Schädigungen im Organismus vermuten. Eine systematische Untersuchung der beteiligten Mechanismen lag nach Kenntnis der Autorin nicht vor. Veröffentlichungen der letzten Jahre belegten für adulte Stammzellen, so auch für MSC, die Fähigkeit zur Integration in maligne Tumoren und eröffneten damit die Möglichkeit einer Tumorthherapie durch tumorintegrierende Zellen mit transgener Expression antineoplastischer Faktoren.

Daraus ergaben sich für die vorliegende Dissertation folgende Hypothesen:

- MSC lassen sich aus dem KM nach Chemotherapie isolieren.
- MSC zeigen eine relative Resistenz gegenüber Zytostatika.
- MSC verfügen über spezifische Resistenzmechanismen.
- MSC integrieren in maligne Tumoren, z. B. in das CRC.
- MSC lassen sich nach transgener Modifikation mit *TRAIL* für eine Tumorthherapie des CRC im autologen Verfahren nutzen.

Zunächst sollte bestimmt werden, ob MSC nach Chemotherapie aus dem KM isolierbar sind. Die Zellen sollten im Vergleich zu MSC gesunder Spender hinsichtlich der für MSC beschriebenen Eigenschaften *in vitro* charakterisiert werden.

Ausgehend von der postulierten Resistenz von MSC gegenüber Zytostatikaexposition sollte diese zunächst *in vitro* charakterisiert werden.

Der dritte Schwerpunkt dieser Arbeit war die Identifizierung möglicher Resistenzmechanismen ausgehend von einer Beteiligung der Zellzyklusregulation.

Anschließend sollte die Einwanderung systemisch applizierter MSC in etablierte Tumoren für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell des CRC im Tiermodell bestätigt werden.

Die fünfte Hauptzielstellung war die Untersuchung des Potentials *TRAIL*-transgener MSC als mögliche Vehikel einer Tumorthherapie zur Behandlung des CRC. Dabei sollte eine Methode der transgenen Modifikation mit stabiler Expression des Transgens in MSC unter Beibehaltung der MSC-definierenden Charakteristika etabliert werden. Die Anti-Tumor-Aktivität der *TRAIL*-transgenen MSC sollte *in vitro* sowie *in vivo* an unterschiedlichen CRC-Zelllinien charakterisiert werden.

2 MATERIALIEN

2.1 Zellen

In Tab. 2-1 sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Zelllinien und primären Zellen mit ihrer Herkunft sowie der entsprechenden Referenz bzw. *American Type Culture Collection* (ATCC)-Nummer (<http://www.lgcstandards-atcc.org>) aufgeführt.

Tab. 2-1: Verwendete Zellen

Bezeichnung	Ursprung	Referenz
MSC	humane primäre MSC, aus KM isoliert	(Mueller, LP <i>et al.</i> 2006)
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie	(DuBridge <i>et al.</i> 1987)
2102EP	humane testikuläre Keimzelltumor (TGCT)-Zelllinie	(Andrews <i>et al.</i> 1980)
H12.1	humane TGCT-Zelllinie	(Casper <i>et al.</i> 1987)
Colo205	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-222
Colo320DM	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-220
DLD1	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-221
HCT8	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-244
HCT15	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-225
HT29	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. HTB-38
SW48	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-231
SW480	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-228
HCT116	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-247

2.2 Chemikalien und Materialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, BRD) und Sigma-Aldrich (München, BRD) verwendet. Spezielle Methoden-bezogene Materialien und Kits werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt.

Antikörper

In Tab. 2-2 sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten primären Antikörper zusammengefasst. In der Spalte „Konzentration“ sind entweder die eingesetzten Konzentrationen oder die verwendeten Verdünnungen angegeben.

Tab. 2-2: Primäre Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Appli- kation	Konzen- tration
Maus anti-Actin	C-2	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, BRD)	WB	0,5 µg/ml
Maus anti-Caspase-3	C33	MBL International (Woburn, USA)	WB	0,5 µg/ml
Maus anti-Caspase-8	12F5	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)	WB	0,5 µg/ml
Maus anti-Caspase-9	5B4	MBL International	WB	0,5 µg/ml
Maus anti-CD14 FITC	MφP9	BD Biosciences (Heidelberg, BRD)	FC	1:1
Maus anti-CD14 PE	MφP9	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD19 PE	4G7	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD29 PE	MAR4	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD34 FITC	581	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD34 PE	8G12	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD44 PE	G44-26	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD45 FITC	2D1	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD45 PE	HI30	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD73 PE	AD2	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD90 PE	5E10	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD105	266	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD105 FITC	SN6	AbD Serotec (Düsseldorf, BRD)	FC	1:1
Maus anti-CD166 PE	3A6	BD Biosciences	FC	1:1
Kaninchen anti-GFP	AB3080	Millipore (Billerica, USA)	IHC	1 µg/ml
Maus anti-HLA-DR FITC	L243	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-HLA-DR PerCP	L243	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-p21	70	BD Biosciences	WB	0,25 µg/ml

Tab. 2-2 (Fortsetzung)

Antikörper	Klon	Hersteller	Appli- kation	Konzen- tration
Maus anti-p53	DO-1	Santa Cruz Biotechnology	WB	0,1 µg/ml
Maus anti-PARP	4C10-5	BD Biosciences	WB	0,5 µg/ml
Kaninchen anti-PARP-1	E51	Biomol (Hamburg, BRD)	IHC	1:2000
Maus anti-TRAIL	HS501	Axxora (Lörrach, BRD)	WB	0,5 µg/ml
Maus anti-TRAIL	2E5	Axxora	ZK, ICC	10 µg/ml
Maus anti-TRAIL	ZZ02	Santa Cruz Biotechnology	ICC	10 µg/ml
Maus anti-Tubulin	DM1A	Dianova (Hamburg, BRD)	WB	0,02 µg/ml
Isotypkontrollen				
Control mouse IgG1	MOPC 31C	Ancell (Bayport, USA)	ZK, ICC	10 µg/ml
Mouse γ 1 PerCP	X40	BD Biosciences	FC	1:1
Simultest Control γ 1/ γ 1 FITC, PE	X40	BD Biosciences	FC	1:1

Abkürzungen: FC - Durchflusszytometrie, ICC - Immunzytochemie, IHC - Immunhistochemie, WB - Western Blot, ZK - Zellkultur

Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Tab. 2-3 aufgeführt. In der Spalte „Konzentration“ sind entweder die eingesetzten Konzentrationen oder die verwendeten Verdünnungen angeben.

Tab. 2-3: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Appli- kation	Konzen- tration
Goat Anti-Mouse Ig PE	BD Biosciences	FC	1:1
IRDye 680 Goat Anti-Mouse IgG	LI-COR Biosciences (Bad Homburg, BRD)	ICC	5 µg/ml
Goat Anti-Rabbit IgG-Biotin	Santa Cruz Biotechnology	IHC	0,5 µg/ml
Streptavidin-HRP	Santa Cruz Biotechnology	IHC	0,5 µg/ml
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	WB	0,08 µg/ml
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	WB	0,08 µg/ml

Abkürzungen: FC - Durchflusszytometrie, ICC - Immunzytochemie, IHC - Immunhistochemie, WB - Western Blot

Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden kommerziell (Invitrogen) synthetisiert. Sie sind in Tab. 2-4 mit den jeweiligen Amplifikatlängen und Annealing-Temperaturen zusammengefasst. Die Nukleotidsequenzen wurden den unter Referenz angegebenen Publikationen entnommen bzw. mit Hilfe der mRNA-Sequenzeinträge der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank „Entrez Nucleotide“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) und des Primerdesign Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) generiert.

Tab. 2-4: Verwendete Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Produkt in bp	Ann.-T in °C	Referenz
β-Actin	5'-AGAAGAGCTACGAGCTGCCTGA-3' 5'-CATACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'	378	64	NCBI-Nr. M10277
DsRed	5'-CCACCGGATCCACCATGGCCTCC-3' 5'-CCACCGAATTCTGGCTACAGGAA-3'	870	66	Datenblatt pDsRed2-N1
LPL	5'-ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3' 5'-TACAGGGCGGCCACAAGTTTT-3'	299	63	NCBI-Nr. NM_000237
Osteocalcin	5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3' 5'-CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG-3'	303	63	NCBI-Nr. X53698
PPAR _γ	5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3' 5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC-3'	351	63	(Pittenger et al. 1999)
TRAIL	5'-AAGGAAGGGCTTCAGTGACC-3' 5'-AGTTAGCCAACATAAAAAGGCC-3'	910	64	NCBI-Nr. U37518

Abkürzungen: Ann.-T. - Annealing-Temperatur, bp - Basenpaare

Plasmide

Bei dem verwendeten lentiviralen Expressionssystem handelte es sich um einen lentiviralen Vektor mit selbst-inaktivierender 3'-LTR und einem Verpackungssystem der 3. Generation. Das lentivirale System, bestehend aus dem Expressionsplasmid pFUGW (Lois *et al.* 2002), den Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE und pRSV-Rev (Dull *et al.* 1998) sowie dem Hüllproteinplasmid pVSVG (Lois *et al.* 2002) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim zur Verfügung gestellt.

Weiterhin kamen die kommerziell erhältlichen Plasmide pCR2.1-TOPO (Invitrogen) und pDsRed2-N1 (BD Biosciences) zum Einsatz.

Zytostatika

Cisplatin	(Sigma-Aldrich); Stammlösung 20 mM in Dimethylformamid
Etoposid	(Axxora); Stammlösung 20 mM in Dimethylformamid
Oxaliplatin	(Sigma-Aldrich); Stammlösung 2 mM in 5 % Glukose in dest. H ₂ O
Vincristin	(Sigma-Aldrich); Stammlösung 1 mM in dest. H ₂ O

2.3 Puffer, Lösungen und Medien

Caspase-Lyse-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 1 % Triton X-100
Caspase-Reaktions-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 5 % Glycerol, 5 mM Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 0,1 % 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat; vor Gebrauch frisch zugegeben: 10 mM Dithiothreitol
dest. H ₂ O	„Aqua B. Braun“, steril (B. Braun, Melsungen, BRD)
HBS (2-fach)	283 mM NaCl, 23 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05; sterilfiltriert
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O, 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6,8
PBST	PBS + 0,1 % Tween-20
RIPA-Lyse-Puffer	100 mM NaCl, 50 mM TRIS, 0,5 % Igepal CA-630, 0,5 % Desoxycholsäure, 0,5 % SDS, pH 8,0; vor Gebrauch frisch zugegeben: 0,1 mM Dithiothreitol, 0,4 Units Protease-Inhibitor, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid,
Transfer-Puffer	20 mM TRIS, 150 mM Glycin, 0,05 % SDS, 20 % Methanol

Färbelösungen

Alizarin S	(Sigma-Aldrich); 10 mg/ml in dest. H ₂ O, pH 4,2
DAPI	(Merck, Darmstadt, BRD); Stammlösung 5 mg/ml in dest. H ₂ O
Dil	(Invitrogen); Stammlösung 2,68 mM in Dimethylformamid
Giemsa	0,4 % (Sigma-Aldrich); gebrauchsfertig
Kristallviolett	(Sigma-Aldrich); 0,005 % in dest. H ₂ O
Öl Rot	(Sigma-Aldrich); 7 mg/ml in 50 % Ethanol, filtriert
SRB	(Sigma-Aldrich); 0,4 % in 1 % Essigsäure
Trypan-Blau	0,4 % (Sigma-Aldrich); gebrauchsfertig

Lösungen für die Zellkultivierung

DMEM	1 g/l Glukose, Flüssigmedium (PAA Laboratories, Pasching, Österr.)
FKS	Charge 40F9121K (Invitrogen); vor Gebrauch Hitze-inaktiviert
Ficoll	„Pancoll human“, 1,077 g/ml (PAN-Biotech, Aidenbach, BRD)
MCDB 201	Trockenmedium (Sigma-Aldrich); gelöst in 1 l dest. H ₂ O, pH7,2, sterilfiltriert
Penicillin/Streptomycin	10.000 Units/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories)
Polybrene	(Sigma-Aldrich); Stammlösung 8 mg/ml in dest. H ₂ O
RPMI 1640	Flüssigmedium (PAA Laboratories)
Trypsin-EDTA	0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA (PAA Laboratories)

*Wachstums- und Differenzierungsmedien*Wachstumsmedium für CRC- und TGCT-Zelllinien

RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin

Wachstumsmedium I für MSC - aus Reyes *et al.*

60 % DMEM / 40 % MCDB 201, 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin

5 µg/ml apo-Transferrin

5 ng/ml Selenige Säure

5 µg/ml Linolsäure

5 µg/ml bovines Insulin

100 µM Ascorbinsäure-2-phosphat

1 nM Dexamethason

10 ng/ml PDGF-BB

10 ng/ml EGF

Wachstumsmedium II für MSC, Wachstumsmedium für HEK 293T

DMEM, 15 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin

Adipogenes Differenzierungsmedium

DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin

10 µg/ml bovines Insulin

100 µM Indomethazin

500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin

50 μ M Dexamethason
5 μ M Rosiglitazon (Axxora)

Osteogenes Differenzierungsmedium

DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin
200 μ M Ascorbinsäure-2-phosphat
50 μ M Dexamethason
10 mM Glycerol-3-phosphat

2.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, BRD), Carl Roth und VWR International (Darmstadt, BRD) bezogen. Ausnahmen sind im Text im Abschnitt 3 vermerkt. Sämtliche Zellkulturverbrauchsmaterialien wie Kulturflaschen, Petrischalen, Testplatten, serologische Pipetten sowie Zentrifugenröhrchen wurden von TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Spezielle Methoden-bezogene Geräte sind im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt. Weitere eingesetzte Geräte und Verbrauchsmittel entsprechen den üblichen Laborstandards und sind nicht aufgeführt.

3 METHODEN

3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Arbeiten der Zellkultivierung erfolgten unter Laminar-Flow Sicherheitswerkbänken. Die Wachstumsmedien und Lösungen für die Kultivierung wurden auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥ 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die verwendeten Tumorzelllinien und die Zelllinie HEK 293T wurden im jeweiligen Wachstumsmedium kultiviert. Die Medienwechsel erfolgten täglich. Bei 90 - 100 % Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und passagiert.

3.2 Isolierung und Kultivierung von MSC

Es wurden KM-Aspirate aus dem Beckenkamm freiwilliger Spender gewonnen. Darunter waren Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sowie gesunde Spender. Die KM-Punktionen erfolgten jeweils aus diagnostischen Gründen; sie dienten der Beurteilung der Erkrankung von Patienten, bzw. dem Ausschluss einer Erkrankung in Vorbereitung einer allogenen Stammzelltransplantation bei gesunden Spendern. Nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Spender erfolgte die Punktion durch einen ärztlichen Mitarbeiter der Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Einzelne Spender wurden wiederholt punktiert. Die dabei gewonnenen Zellen wurden als verschiedene Präparationen geführt. Für dieses Studienprotokoll lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor („Untersuchung humaner adulter mesenchymaler Stammzellen *in vitro* und im Tiermodell II“ Antragsfassung vom 03.12.2006; Votum vom 06.12.2006).

Die Isolierung der Zellen basierte auf einer Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung der mononukleären Zellen (MNZ) (Boyum 1968) und anschließender Adhärenzselektion. Das Aspirat (20 - 40 ml) wurde 10 min bei 300 x g zentrifugiert und die Zellfraktion in einem 2-fachen Volumen PBS resuspendiert. 4 ml der Zellsuspension wurden auf 3 ml Ficoll geschichtet und 25 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Interphase, welche die MNZ enthielt, wurde durch vorsichtiges Abheben mit einer Pipette gewonnen. Nach 2-mal Spülen in PBS wurden die Zellen in Wachstumsmedium I oder II aufgenommen und mit einer Dichte von 1 - 2,5 x 10⁵ Zellen/cm² in Zellkulturgefäße ausgebracht. Die nicht-adhären Zellen wurden nach 24 h durch den Wechsel des Mediums entfernt. Die Kultivierung erfolgte unter regelmäßigen Medienwechseln aller 3 d, bis die Zellen innerhalb der Kolonien eine Konfluenz von etwa 50 % erreichten. Es folgte die Passagierung der adhären Zellen mittels Trypsin-EDTA. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und

die Zellen der Passage 1 (P1) in flüssigem Stickstoff kryokonserviert oder für nachfolgende Experimente mit einer Dichte von 200 Zellen/cm² ausplattiert.

Für die vergleichenden Untersuchungen von MSC unbehandelter Spender und MSC von Spendern mit vorangegangener Chemotherapie (Abschnitt 4.1 bis 4.3.1) wurde Wachstumsmedium I verwendet. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung und daraus folgendem Aufwand der Herstellung dieses Mediums erfolgte parallel zu diesen Versuchen eine Optimierung des Wachstumsmediums mit Wechsel zu Wachstumsmedium II. Es wurden mit beiden Wachstumsmedien identische Ergebnisse erzielt, so dass der Wechsel aus Gründen der einfacheren Handhabung erfolgte. Die weitere Kultivierung der MSC (ab 4.3.2) erfolgte daher in Wachstumsmedium II. Im Manuskript wird im Folgenden auf eine Differenzierung zwischen Wachstumsmedium I und II verzichtet.

Um die Anzahl der CFU-F pro 10⁶ MNZ zu ermitteln, wurden die Zellen vor der ersten Passagierung kultiviert bis etwa 50 % der Kolonien eine Konfluenz von mindestens 80 % erreichten. Die Kolonien wurden makroskopisch gezählt und anschließend wie beschrieben passagiert. Für eine Giemsa-Färbung wurden die Kolonien mit PBS gespült, für 2 min mit Methanol fixiert, mit unverdünnter Giemsa-Färbelösung überschichtet und nach 2 min mit H₂O gespült.

3.3 Erstellen einer Wachstumskinetik

Das Proliferationsverhalten von MSC wurde durch Wachstumskinetiken analysiert. Die Zellen wurden mit einer definierten Dichte von 200 Zellen/cm² gesetzt und bei einer Konfluenz der Zellen von 50 % passagiert. Zum Zeitpunkt jeder Passage wurde die Zellzahl ermittelt und die Zellen erneut mit 200 Zellen/cm² ausplattiert. Die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) sowie die Populationsverdopplungszeit (PDT) wurden für jede Passage nach folgenden Formeln (Baxter *et al.* 2004) berechnet:

$$PD = \frac{\lg \left(\frac{\text{Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt der Passage}}{n \text{ Zellen initial gesetzt}} \right)}{\lg 2}$$

$$PDT = \frac{n \text{ Tage zwischen den Passagen}}{\text{zugehörige PD}}$$

3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse der Oberflächenantigenexpression wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Die Zellen wurden in Rundboden-FACS-Röhrchen (BD Biosciences) aliquotiert, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und die Zellpellets mit je 20 µl FITC-, PE- oder PerCP-konjugierten primären Antikörpern (Tab. 2-2)

resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Bei Verwendung des unkonjugierten primären Antikörpers anti-CD105 (Tab. 2-2) wurden die Zellen nach 15 min Inkubation bei 4 °C mit PBS gespült, 5 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend mit 10 µl PE-konjugiertem sekundärem Antikörper (Tab. 2-3) resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert.

Die Zellen wurden mit PBS gespült und am Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit CellQuest Software (beides BD Biosciences) analysiert. Die spezifischen Geräteeinstellungen wurden jeweils mit den Isotypkontrollen vorgenommen und im Verlauf der jeweiligen Messung nicht verändert.

3.5 Nachweis des Differenzierungspotentials von MSC

Für die osteogene und adipogene Differenzierungsinduktion wurden MSC bis zum Erreichen einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Es folgte die Inkubation mit osteogenem bzw. adipogenem Differenzierungsmedium mit Medienwechsel alle 3 d über einen Zeitraum von 10 - 14 d bis die morphologischen Zeichen der Differenzierung, Kalziumablagerungen bzw. Fetteinlagerungen, sichtbar wurden. Die Inkubation der undifferenzierten Kontrollzellen für die zytochemischen Färbungen erfolgte in Wachstumsmedium ohne Passagierung der Zellen.

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte mittels zytochemischer Färbung. Undifferenzierte und differenzierte MSC wurden mit PBS gespült, mit 2 % Formalin in PBS 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und mit PBS gespült. Die Färbung von Ablagerungen von Kalziumhydroxylapatit nach osteogener Differenzierung erfolgte mittels Alizarin S. Die fixierten Zellen wurden mit dest. H₂O gespült und mit Alizarin S-Färbelösung für 5 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde mit dest. H₂O gespült. Die Färbung von Fettvakuolen zum Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgte mittels Öl Rot. Die fixierten Zellen wurden mit 50 % Ethanol gespült und mit Öl Rot-Färbelösung für 10 min bei RT gefärbt. Die Zellen wurden mit 50 % Ethanol und anschließend mit PBS gespült. Für beide Färbungen wurden die gefärbten Zellen lichtmikroskopisch beurteilt und die Färbung fotografisch dokumentiert (AxioCam HR, AxioVision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen).

Für den Differenzierungsnachweis mittels Reverser Transkription und Polymerase-Ketenreaktion (RT-PCR) wurden die differenzierten Zellen mit PBS gespült, mit Trypsin-EDTA von den Zellkulturgefäßen abgelöst und anschließend 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gespült und für die RNA-Isolation verwendet. Als undifferenzierte Kontrolle dienten MSC, welche bei 50 % Konfluenz für die Isolation von RNA aufbereitet wurden.

3.6 RNA-Isolation und RT-PCR

Die Isolation der Gesamt-RNA von Zellen erfolgte anhand einer modifizierten Methode nach Chomczynski (Chomczynski *et al.* 1987) mit TRIZOL Reagenz (Invitrogen) anhand des Protokolls des Herstellers. Die adhärenenten Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Nach der Lyse des Zellpellets in 1,2 ml TRIZOL für 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 250 µl Chloroform und die Inkubation dieser Lösung für 3 min bei RT. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C wurde die obere RNA-enhaltende wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und Inkubation für mindestens 2 h bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 75 % Ethanol gewaschen, 10 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Zur Reduktion einer Kontamination mit genomischer DNA erfolgte eine DNase I Behandlung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (DNA-free Kit; Applied Biosystems, Darmstadt, BRD) nach den Angaben des Herstellers. Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde deren optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gemessen (BioSpec-1601 E; Shimadzu, Duisburg, BRD). Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte anhand der OD_{260} - die $OD_{260} = 1$ entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Anhand des Quotienten OD_{280}/OD_{260} ließ sich eine Verunreinigung durch Proteine abschätzen. Bei einem Quotienten von $OD_{280}/OD_{260} \leq 0,5$ wurde die RNA für nachfolgende Analysen verwendet.

Die Genexpressionsanalysen auf transkriptionaler Ebene wurden mittels RT-PCR mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (GeneAmp RNA PCR Kit; Applied Biosystems) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit den nachfolgend beschriebenen Modifizierungen. Die Reverse Transkription wurde in einem Endvolumen von 10 µl mit 500 ng RNA und Oligo d(T)₁₆ Primern (GeneAmp RNA PCR Kit) im Thermoblock (T-Gradient; Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm durchgeführt: 10 min initiale Extension bei 23 °C, 30 min Reverse Transkription bei 42 °C und 5 min Denaturierung bei 99 °C. Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Zugabe von Reverser Transkriptase. Die Amplifikationsreaktion (Polymerase-Kettenreaktion, PCR) erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl mit folgendem Programm: 5 min initiale Denaturierung bei 95 °C gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 60 s Denaturierung bei 95 °C, 45 s Primerannealing, 80 s Amplifikation bei 72 °C und abschließender terminaler Amplifikation von 5 min bei 72 °C. Die verwendeten Primer mit den jeweiligen Annealingtemperaturen sind in Tab. 2-4 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte im 2%igen Agarosegel.

3.7 Proteinisolierung und Western Blot

Adhärenente Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Das Zellpellet wurde in RIPA-Lyse-Puffer lysiert, das Lysat homogenisiert und die DNA durch mehrfaches Aufziehen durch eine 27G-Kanüle (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) geschert. Nach einer Inkubation der Proben für 45 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C. Der proteinreiche Überstand wurde ohne Störung des Pellets gewonnen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der kolorimetrischen Methode nach Bradford (Bradford 1976) mittels kommerziell erhältlicher Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories, München, BRD) nach den Angaben des Herstellers bei 595 nm (BioSpec-1601 E).

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970). Anschließend wurde das Gel in Transfer-Puffer äquilibriert und die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels Semi-Dry Blot-Kammer (TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories) mit 3 mA/cm² für große Gele und 5,5 mA/cm² für kleine Gele auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membrane; Whatman, Dassel, BRD) transferiert. Es erfolgte zunächst die Färbung mit Ponceau S für 2 min zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung des Gels. Anschließend wurde die Membran bei RT unter ständiger Bewegung wie nachfolgend beschrieben inkubiert. Zunächst erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5 % Trockenmilch in PBST für 1 h. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Tab. 2-2) in 5 % Trockenmilch in PBST für 2 h inkubiert, gefolgt von Spülen mit PBST 3-mal für jeweils 10 min. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Tab. 2-3) in PBST für 1 h mit anschließendem Spülen mit PBST 3-mal für jeweils 10 min. Die Immunkomplexe wurden mittels Chemilumineszenz (RotiLumin, Carl Roth) nach den Angaben des Herstellers auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) detektiert.

3.8 Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels Sulforhodamin-B-Assay

Die Zytotoxizität von Substanzen wurde mit dem Sulforhodamin-B (SRB)-Assay nach Skehan *et al.* (Skehan *et al.* 1990) getestet. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, der auf der stabilen Bindung des Farbstoffes SRB an zelluläres Protein und dem Auswaschen von ungebundenem Farbstoff jeweils in saurem Milieu sowie der nachfolgenden Solubilisierung des an zelluläres Protein gebundenen Farbstoffes in basischem Milieu beruht. Die Menge des gelösten Farbstoffes wird photometrisch erfasst und korreliert linear mit der Zellzahl.

3.8.1 Erstellen einer Wachstumskinetik für den SRB-Assay

Voraussetzung zum Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung mittels SRB-Assay ist das uneingeschränkte Wachstum der Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten über die gesamte Versuchsdauer. Für die verwendeten TGCT-Zelllinien war die optimale Zellzahl (3000 Zellen pro Loch) bekannt (Mueller, T 2005). Für MSC wurde die spezifische Zellzahl mit Hilfe einer Wachstumskinetik ermittelt. Dazu wurden die Zellen in fünf 96-Loch-Mikrotiterplatten mit jeweils 9 unterschiedlichen Zellzahlen (700 - 1500 Zellen pro Loch) pro Spalte gesetzt. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde jeweils eine Platte mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) für mindestens 2 h bei 4 °C fixiert. Die Platten wurden 5-mal mit dest. H₂O gespült (Plate Washer 96 PW; Tecan, Männedorf, Schweiz) und anschließend mit SRB-Färbelösung für 30 min bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Platten durch 5-mal Spülen mit 1 % Essigsäure entfärbt (Plate Washer 96 PW). Nachdem die Platten luftgetrocknet waren, erfolgte die Solubilisierung des Farbstoffes mit 100 µl 10 mM TRIS pro Loch. Die OD wurde bei 570 nm im Mikroplatten-Reader (SpectraFluor Plus; Tecan) gemessen. Die OD-Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Für die nachfolgenden Versuche wurde die Zellzahl eingesetzt, die ein ungehindertes Wachstum über die gesamte Versuchsdauer ermöglichte.

3.8.2 Untersuchung der Sensitivität von Zellen gegenüber Zytostatika mittels SRB-Assay

Die Zellen wurden an Tag 1 mit der für den jeweiligen Zelltyp bestimmten Zellzahl in 96-Loch-Mikrotiterplatten im jeweiligen Wachstumsmedium gesetzt. Nach 24 h (Tag 2) wurden die Zellen für 24 h mit den folgenden Zytostatika behandelt, wobei die verwendeten Konzentrationsbereiche in Klammern angegeben sind: Cisplatin (0,01 -100 µM), Etoposid (0,01 - 100 µM), Vincristin (0,0003 - 3 µM) oder Oxaliplatin (0,001 -100 µM). Dabei wurde pro Konzentration jeweils eine Spalte (8 Löcher) behandelt. Anschließend (Tag 3) wurde das Zytostatikum-enthaltende Medium entfernt, die Zellen mit PBS gespült und in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium weitere 72 h (bis Tag 6) kultiviert. An Tag 6, d. h. 120 h nach initialem Setzen der Zellen, erfolgte nach Entfernung des Wachstumsmediums die Fixierung der Zellen mit 10 % TCA für mindestens 2 h bei 4 °C. Nach 5-mal Spülen zur Entfernung der nicht-adhärenen Zellen mit dest. H₂O (Plate Washer 96 PW) erfolgte die Färbung der Platten mit SRB-Färbelösung für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Platten durch 5-mal Spülen mit 1 % Essigsäure entfärbt (Plate Washer 96 PW). Nachdem die Platten luftgetrocknet waren, erfolgte die Solubilisierung des Farbstoffes mit 100 µl 10 mM TRIS pro Loch. Die OD wurde bei 570 nm im Mikroplatten-Reader (SpektraFluor Plus) gemessen. Die Mittelwerte der OD-Werte der 8 Löcher jeder Spalte wurden ermittelt und die OD-Werte der unbehandelten Kontrolle 100 % gesetzt. Der Anteil überlebender Zellen in Relation zur

unbehandelten Kontrolle wurde semilogarithmisch gegen die Zytostatikakonzentration aufgetragen. Die jeweilige Zytostatikakonzentration, bei der eine Inhibierung des Zellwachstums von 90 % (inhibitorische Konzentration, IC90) bzw. 50 % (IC50) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erfolgte, wurde im Diagramm abgelesen.

Die zusätzlich verwendeten IC90 der CRC-Zelllinien resultierten aus 96 h-Behandlungen und lagen aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Dr. T. Müller, Hämatologisch/Onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor.

3.8.3 Untersuchung der Sensitivität von Zellen gegenüber löslichem TRAIL

MSC wurden mit 2000 Zellen/Loch und CRC-Zelllinien mit 5000 Zellen/Loch in drei 96-Loch-Mikrotiterplatten gesetzt, jeweils eine Spalte pro Zelllinie. Nach 48 h wurde eine Platte (Kontrolle-0 h) mit 10 % TCA für mindestens 2 h bei 4°C fixiert. Eine Platte (Kontrolle-24 h) wurde mit frischem Wachstumsmedium überschichtet und eine Platte (sTRAIL-24 h) wurde mit 100 ng/ml löslichem *Killer*TRAIL (sTRAIL; Axxora) inkubiert. Die Platten Kontrolle-24 h und sTRAIL-24 h wurden nach 24 h Inkubation für mindestens 2 h bei 4°C mit 10 % TCA fixiert. Nach 5-mal Spülen mit dest. H₂O (Plate Washer 96 PW) erfolgte die Färbung aller Platten mit SRB-Färbelösung für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Platten durch 5-mal Spülen mit 1 % Essigsäure entfärbt (Plate Washer 96 PW). Nachdem die Platten luftgetrocknet waren, erfolgte die Solubilisierung des Farbstoffes mit 100 µl 10 mM TRIS pro Loch. Die OD wurde bei 570 nm im Mikroplatten-Reader (SpektraFluor Plus) gemessen. Die OD-Werte der 8 Löcher jeder Spalte wurden gemittelt. Die OD-Werte der Kontrolle-0 h jeder Zelllinie wurde 100 % gesetzt und die OD-Werte der entsprechenden Kontrolle-24 h und der behandelten Zellen (sTRAIL-24 h) wurden in Relation zum jeweiligen Ausgangswert ermittelt.

3.9 *In-vitro*-Modell der Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung

Für das *In-vitro*-Modell der Resistenz wurden MSC der 2. Passage gesunder Spender bei einer Konfluenz von 50 % für 2 h mit 3 µM Cisplatin bzw. 3 µM Etoposid in Wachstumsmedium behandelt. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit PBS gespült und weitere 22 h in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium kultiviert. Diese Behandlung wurde 3-mal wiederholt. Die nachfolgenden Analysen wurden 72 h nach Ende der letzten Behandlung durchgeführt. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Aliquot der jeweiligen MSC-Präparation.

3.10 Quantifizierung der Cisplatin-vermittelten Schädigung und Nachweis von Apoptose

3.10.1 Analyse des zellulären Platingehaltes

MSC und TGCT wurden für 24 h mit 3 μM Cisplatin behandelt und anschließend mit Trypsin-EDTA abgelöst. Nach 2-mal Spülen des Zellpellets mit PBS erfolgte die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Bestimmung des Platingehaltes wurde mittels Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PD Dr. Paschke, Abteilung Medizinisch-Pharmazeutische Chemie, Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Die Messungen erfolgten am AAS-5EA (Analytik Jena, Jena).

3.10.2 Trypan-Blau-Ausschluss-Test

MSC wurden für 24 h mit 20 μM Cisplatin behandelt. TGCT wurden für 24 h mit 3 μM Cisplatin behandelt. Anschließend wurden die flotierenden Zellen gewonnen und mit PBS gespült. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g erfolgte die Resuspension der Zellen in Trypan-Blau-Färbelösung. Die Zellsuspension wurde auf Objektträger gegeben und die Fähigkeit der Zellen zum Farbstoffausschluss innerhalb von 5 min lichtmikroskopisch beurteilt.

3.10.3 Bestimmung der Caspaseaktivität mittels Caspaseassay

Die relative Caspaseaktivität wurde in einem kolorimetrischen Substratspaltungsassay bestimmt. MSC und TGCT wurden in 6-cm-Petrischalen kultiviert und bei Erreichen von 80 % Konfluenz mit 3 μM (TGCT) bzw. 20 μM (MSC) Cisplatin für 24 h behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die flotierenden Zellen durch Absaugen des Mediums verworfen. Die adhären Zellen wurden mit PBS gespült, mit Caspase-Lyse-Puffer lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 16.000 x g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die gewonnenen Extrakte in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde anhand der kolorimetrischen Methode nach Bradford mittels kommerziell erhältlicher Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay) nach den Angaben des Herstellers bei 595 nm (BioSpec-1601 E) bestimmt und auf 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Pro Caspase-Substrat wurde folgender Ansatz in ein Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert: 50 μl Zellextrakt, 50 μl Caspase-Reaktions-Puffer und 5 μl des jeweiligen Caspase-Substrates. Es wurden folgende Substrate der Firma Invitrogen verwendet: Ac-VDVAD-pNA (Caspase-2), Ac-DEVD-pNA (Caspase-3), Ac-IETD-pNA (Caspase-8) und Ac-LEHD-pNA (Caspase-9). Nach Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln über Nacht wurde die OD der Proben im

Mikroplatten-Reader (SpektraFluor Plus) bei 405 nm gemessen und die relativen Caspaseaktivitäten anhand des OD_{405} -Quotienten von behandelter Probe und unbehandelter Kontrolle berechnet. Die errechneten Werte wurden als Faktor der Aktivierung gegenüber der Aktivität der unbehandelten Kontrolle, welche 1 gesetzt wurde, dargestellt.

3.10.4 Färbung mit Annexin V

MSC wurden für 24 h mit 20 μ M Cisplatin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die flotierenden Zellen wurden verworfen und die adhärenen Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und anschließend mit PBS gespült.

Von MSC/CRC-Kokulturen (siehe 3.15) wurden die flotierenden Zellen nach 24 h oder 48 h gewonnen und mit PBS gespült. Als Kontrolle wurden separat kultivierte CRC-Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und anschließend mit PBS gespült.

Für beide Ansätze erfolgte die Probenaufbereitung mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I; BD Biosciences) nach den Angaben des Herstellers. Die Messungen wurden am Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit CellQuest Software durchgeführt.

3.10.5 Apoptosenachweis mittels Western Blot-Analyse

TGCT wurden für 24 h mit 3 μ M Cisplatin behandelt. MSC wurden für 24 h mit 3 μ M bzw. 20 μ M Cisplatin behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die flotierenden Zellen gewonnen und mit PBS gespült. Die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und ebenfalls mit PBS gespült. Adhärenente und flotierende Zellen wurden 5 min bei 300 x g zentrifugiert und separat für die Proteinisolierung gemäß Abschnitt 3.7 verwendet.

3.11 Untersuchung der Zellzyklusregulation

MSC wurden für 24 h mit Cisplatin, Etoposid oder Vincristin in den folgenden Konzentrationen behandelt: 2 μ M, 3 μ M bzw. 20 μ M für Cisplatin; 0,4 μ M, 0,75 μ M bzw. 80 μ M für Etoposid; 0,001 μ M bzw. 3 μ M für Vincristin. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der Behandlung wurden die flotierenden Zellen verworfen und die adhärenen Zellen mit PBS gespült. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine Analyse der Zellen oder die weitere Kultivierung in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium mit einer Analyse zu einem späteren Zeitpunkt.

Für durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Die Probenaufbereitung erfolgte mit Hilfe eines kommerziell

erhältlichen Kits (BD CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit; BD Biosciences) nach den Angaben des Herstellers. Das Kit basierte auf der Färbung der zellulären DNA mit PI. Die Proben wurden anschließend am Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit CellQuest Software analysiert.

Für Western Blot-Analysen wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Die Probenaufbereitung erfolgte gemäß Abschnitt 3.7.

3.12 Generierung transgener Zellen

3.12.1 Klonierung der lentiviralen Expressionsplasmide

Die grundlegenden Methoden der Klonierung erfolgten nach Ausubel *et al.* und Sambrook *et al.* (Ausubel *et al.* 2002; Sambrook *et al.* 1989) und werden im Folgenden nicht ausführlich beschrieben.

Die *TRAIL*-cDNA wurde aus Jurkat-Zell-RNA mittels RT-PCR (*TRAIL*-Primer siehe Tab. 2-4) generiert und durch TOPO TA-Klonierung in das Plasmid pCR2.1-TOPO ligiert. Es folgte die Restriktion mit *EcoRI* (Fermentas, Ontario, CA) und das Auffüllen der stumpfen Enden mit Klenow-Enzym (Fermentas). Aus dem *GFP*-kodierenden lentiviralen Expressionsplasmid pFUGW wurde die *GFP*-cDNA durch *BamHI* (Fermentas)- und *EcoRI*-Verdau herausgeschnitten. Die stumpfen Enden des Plasmidrückgrates wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend die glatten Enden der *TRAIL*-cDNA mit den glatten Enden des Plasmidrückgrates mit Hilfe des Fast-Link DNA Ligation Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers ligiert. Durch Sequenzierung wurde die Insertionsrichtung kontrolliert sowie die Sequenz des generierten *TRAIL*-kodierenden lentiviralen Expressionsplasmides pFUTW auf Mutationen überprüft.

Die cDNA des rot fluoreszierenden Proteins DsRed wurde ausgehend vom Plasmid pDsRed2-N1 mittels PCR gemäß Abschnitt 3.6 gewonnen (*DsRed*-Primer siehe Tab. 2-4). Durch die Primer wurden eine 5'-terminale *BamHI*- und eine 3'-terminale *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt. Nach Restriktion der cDNA mit *BamHI* und *EcoRI* erfolgte die gerichtete Ligation mit dem *BamHI* und *EcoRI* geschnittenen Plasmidrückgrat des pFUGW mittels Fast-Link DNA Ligation Kit. Die korrekte Sequenz des generierten *DsRed*-kodierenden lentiviralen Expressionsplasmides pFUDW wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Strangabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Proben wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Analyse erfolgte durch Mitarbeiter des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung, Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg mittels vollautomatisiertem Sequenzierer (ABI 3100 Genetic Analyzer C; Applied Biosystems).

3.12.2 Gewinnung infektiöser lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel wurden mittels transienter $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion (Chen *et al.* 1987) der Verpackungszelllinie HEK 293T mit einem Vier-Plasmid-Expressionssystem (Mochizuki *et al.* 1998) hergestellt.

HEK 293T-Zellen wurden mit einer Dichte von 60.000 Zellen/cm² in 10-cm-Petrischalen gesetzt. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz in Zentrifugenröhrchen steril wie folgt pipettiert: pro Petrischale 10 µg Expressionsplasmid (pFUGW, pFUDW bzw. pFUTW), je 5 µg der Verpackungsplasmide pRSV-Rev und pMDLg/pRRE sowie 5 µg des Hüllproteinplasmids pVSVG in einem Endvolumen von 800 µl dest. H₂O. Es folgte die Zugabe von 200 µl 1,25 M CaCl₂ und 1 ml HBS (2-fach). Der Ansatz wurde mit einer serologischen Pipette gründlich durchmischt und die Präzipitatbildung lichtmikroskopisch überprüft. Der Transfektionsansatz wurde auf die Petrischalen pipettiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 48 h wurde der virale Partikel enthaltende Überstand gewonnen, 7 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend durch 0,45 µm (PVDF Spritzenfilter; Carl Roth) sterilfiltriert. Das Filtrat wurde 90 min bei 115.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert (Sorvall Discovery 100SE mit Rotor TH-641; Thermo). Die Partikel wurden anschließend in kaltem PBS resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Titerbestimmung für FUGW und FUDW erfolgte mittels serieller 1:10-Verdünnung auf HEK 293T-Zellen. Die Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit den verschiedenen Verdünnungsstufen der Virusstammlösung und 8 µg/ml Polybrene für 24 h inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde die GFP- bzw. DsRed-Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Anhand der GFP- bzw. DsRed-positiven Zellen erfolgte die Berechnung des Titers der Virusstammlösung nach folgender Formel:

$$\text{Virale Partikel}/\mu\text{l} = (\text{Prozentsatz positiver Zellen}) * (n \text{ Zellen initial gesetzt}) * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für FUTW wurde keine Titerbestimmung durchgeführt. Die Transduktion mit FUTW erfolgte mit dem Titer einer parallel präparierten FUGW-Stammlösung unter der Annahme, dass beide Virusstammlösungen einen ähnlichen Titer aufwiesen.

3.12.3 Lentivirale Transduktion adhärenter Zellen

MSC der 1. oder 2. Passage wurden bis zu einer Konfluenz von 50 %, CRC-Zelllinien bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und mit frischem Wachstumsmedium mit 8 µg/ml

Polybrene überschichtet. Die Transduktion erfolgte anschließend mit einer Endkonzentration von etwa 5×10^5 lentiviralen Partikeln/ml. CRC-Zellen wurden mit FUGW oder FUDW transduziert. MSC wurden mit FUGW oder FUTW transduziert. Nach 24 h erfolgte der Wechsel des Wachstumsmediums. Die Expression des Transgens wurde nach weiteren 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie für DsRed und GFP oder mittels immunzytochemischer Färbung und Kokultivierung mit DLD1-Zellen für TRAIL analysiert. Die transgenen Zellen wurden als *GFP*-, *DsRed*- oder *TRAIL*-Zellen bezeichnet. Untransduzierte Zellen wurden als Wildtyp (WT)-Zellen bezeichnet. Im Falle der CRC-Zelllinien erfolgte eine Klonierung der transgenen Zellen mittels limitierender Verdünnung.

3.13 Immunzytochemische Färbung für TRAIL

Die Zellen wurden auf Objektträgern (Chamber Slides) für 24 - 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte entweder die Fixierung mit 2 % Formalin in PBS für 15 min bei RT mit anschließender Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) für 30 s bei RT oder die Fixierung mit Methanol/Aceton (1:1) für 2 min bei RT. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS mit 1 % BSA über Nacht bei RT. Folgende Antikörper (siehe Tab. 2-2) wurden verwendet: anti-TRAIL Klon ZZ02 auf Formalin-fixierten Objektträgern, anti-TRAIL Klon 2E5 auf Methanol/Aceton-fixierten Objektträgern und jeweils Control mouse IgG1 als Isotypkontrolle. Anschließend wurden die Objektträger mit PBST mit 1 % BSA für 30 min gespült. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper IRDye 680 Goat anti-mouse IgG (Tab. 2-3) erfolgte in PBST mit 1 % BSA für 1 h bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Objektträger mit PBST mit 1 % BSA für 30 min gespült. Die Zellkerne wurden mit 1 µg/ml DAPI in PBS für 5 min gefärbt und die Objektträger mit Fluoreszenzeindeckmedium und Deckgläschen abgedeckt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE2000-E; Nikon, Düsseldorf). Für die Aufnahmen wurde für WT-MSC und *TRAIL*-MSC jeweils die gleiche Belichtungszeit gewählt.

3.14 Analyse des Wachstums in Soft Agar

Der Soft-Agar-Assay wurde in 6-Loch-Platten durchgeführt und erfolgte für jede Probe im Triplikat. Als Positivkontrolle diente auf jeder 6-Loch-Platte ein Ansatz mit DLD1-Zellen. Wachstumsmedium und autoklavierte 2%ige Agarose in PBS wurden im Wasserbad bei 42 °C für 30 min erwärmt. Agarose wurde in einer Endkonzentration von 0,5 % in Wachstumsmedium gegeben, gemischt und sofort als Base-Agar in 1,5 ml-Aliquots in die Löcher einer Platte gegeben. Nach dem Auskühlen des Base-Agar wurde Agarose in einer Endkonzentration von 0,35 % in Wachstumsmedium gegeben und gemischt. Pro ml wurden 5000 Zellen darin resuspendiert. Pro Loch wurde 1 ml der Agarose-Zell-Suspension als Top-

Agar auf den Base-Agar geschichtet. Nach dem Auskühlen wurde jede Kavität mit 1 ml Wachstumsmedium überschichtet und die Platten bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥ 95 % Luftfeuchtigkeit für 14 - 21 d inkubiert. Zum Zeitpunkt des makroskopischen sichtbar werdens von Kolonien bei der Positivkontrolle, erfolgte die Färbung der Platte. Hierfür wurde das überständige Medium entfernt und die Löcher wurden einmal mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mit Kristallviolett-Färbelösung für mindestens 1 h bei 4 °C. Nach dem Entfärben mit kaltem dest. H₂O wurde die 6-Loch-Platte fotografiert.

3.15 Zweidimensionale Kokultur von *TRAIL*-MSC mit CRC-Zellen

Folgende Zellen wurden für die Kokulturen verwendet: WT-MSC bzw. *TRAIL*-MSC der Passagen 3 bis 8 und die CRC-Zelllinien DLD1, HCT8, HT29 oder deren *DsRed*-transgene Derivate. MSC und CRC-Zellen wurden jeweils mit Trypsin-EDTA abgelöst, gemischt und in CRC-Wachstumsmedium mit folgenden Zelldichten ausplattiert: 10⁵ MSC/cm² + 5 x 10⁵ DLD1-Zellen/cm², 10⁵ MSC/cm² + 6 x 10⁵ HCT8-Zellen/cm² bzw. 10⁵ MSC/cm² + 6 x 10⁵ HT29-Zellen/cm². Die Kokulturen wurden ohne bzw. mit Zusatz eines *TRAIL*-neutralisierenden Antikörpers (Klon 2E5, Tab. 2-2) angesetzt. MSC/HT29-Kokulturen wurden ohne bzw. mit Zusatz von 3 µM Oxaliplatin angesetzt, welches bis zum jeweiligen Analysezeitpunkt in der Kokultur verblieb.

Um den Effekt von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte CRC-Zellen zu untersuchen, erfolgte nach 24 h Kokultur die Gewinnung der folgenden Proteinlysate: die Gesamtlysate der WT-MSC/CRC-Kokulturen, die Gesamtlysate der *TRAIL*-MSC/CRC-Kokulturen sowie Lysate der flotierenden Zellen von *TRAIL*-MSC/CRC-Kokulturen. Für die Gewinnung der Gesamtlysate wurden zunächst die flotierenden Zellen gewonnen und die adhärenen Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst. Anschließend wurden die flotierenden Zellen mit der Suspension der adhärenen Zellen der jeweiligen Kokultur vereinigt. Für die Gewinnung des Lysates der flotierenden Zellen wurden von separat angesetzten *TRAIL*-MSC/CRC-Kokulturen die flotierenden Zellen gewonnen. Alle gewonnenen Proben wurden mit PBS gespült, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und gemäß Abschnitt 3.7 mittels Western Blot auf Marker für Apoptose analysiert.

Zur Analyse des Wachstums von CRC-Zellen in Kokulturen mit MSC wurden Kinetiken über einen Zeitraum von 72 h erstellt. Die Kokulturen wurden hierfür in 12-Loch-Platten wie oben beschrieben angesetzt - 3 Löcher für WT-MSC/*DsRed*-CRC-Kokulturen und 3 Löcher für *TRAIL*-MSC/*DsRed*-CRC-Kokulturen. Als Kontrollen wurden jeweils 3 Löcher mit separaten Kulturen von MSC und *DsRed*-CRC-Zellen angesetzt. Nach 24 h wurden die flotierenden Zellen der Kokulturen gewonnen und gezählt. Die adhärenen Zellen je eines Loches der WT-MSC/*DsRed*-CRC-Kokulturen sowie der *TRAIL*-MSC/*DsRed*-CRC-Kokulturen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und gezählt. Die übrigen Löcher wurden mit frischem

Wachstumsmedium überschichtet. Die Suspension der adhärennten Zellen wurde mit anti-CD105-FITC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von DsRed und CD105 analysiert (siehe Abschnitt 3.4). Als Kontrolle für die Färbung mit anti-CD105-FITC dienten mit Trypsin-EDTA abgelöste MSC einer separaten Kultur.

Diese Analysen wurden jeweils 48 h und 72 h nach Beginn der Kokultur wiederholt. Die Anzahl der initial gesetzten Zellen wurde 100 % gesetzt und die ermittelten Zellzahlen der adhärennten und flotierenden Zellen zu den jeweiligen Analysezeitpunkten wurden in Relation dazu dargestellt.

Zusätzlich wurden die gewonnenen flotierenden Zellen der Kokulturen mittels Färbung mit Annexin V-FITC gemäß Abschnitt 3.10.4 auf Anzeichen von Apoptose untersucht. Als Kontrolle dienten mit Trypsin-EDTA abgelöste *DsRed*-CRC-Zellen einer separaten Kultur.

3.16 Tierversuche

Es wurden 6 - 8 Wochen alte Nacktmäuse (Athymic Nude-fox n1 nu/nu; Harlan Winkelmann, Borchon, BRD) verwendet. Die Injektionen der Zellen sowie die Präparation der Tumoren und Organe wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. T. Müller, Hämatologisch/Onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Sämtliche Versuche erfolgten gemäß den institutionellen Bestimmungen. Für alle durchgeführten Tierversuche lag eine Genehmigung vor (2-773 MLU „Untersuchung der Tumorinvasion und Anti-Tumor-Aktivität transgener humaner mesenchymaler Stammzellen im Nacktmausmodell“).

3.16.1 Markierung adhärennter Zellen mit fluoreszierendem Farbstoff

Adhärennte MSC wurden für 24 h mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff Dil in einer Konzentration von 2,5 μM in Wachstumsmedium gefärbt. Die Färbung erfolgte unmittelbar vor Verwendung der Zellen und diente der nicht-transgenen Markierung der zu transplantierenden Zellen.

3.16.2 Untersuchungen im subkutanen Mischxenograftmodell

Für Mischxenografte wurden 3×10^6 *DsRed*-CRC-Zellen mit verschiedenen Anteilen *TRAIL*-MSC der Passagen 6 bis 9 bzw. Kontroll-MSC gemischt und an Tag 0 s. c. in die rechte (*TRAIL*-MSC) bzw. linke (Kontroll-MSC) Flanke eines Tieres injiziert. Als Kontroll-MSC dienten WT-MSC oder *GFP*-MSC. Folgende Mengen an MSC wurden verwendet: $7,5 \times 10^5$, $3,33 \times 10^5$, $9,3 \times 10^4$ und $3,03 \times 10^4$ Zellen. Das entsprach einem Anteil von 20 %, 10 %, 3 % bzw. 1 % MSC an der injizierten Gesamtzellpopulation. Die *DsRed*-Fluoreszenzintensität

wurde als Korrelat für die Tumorgroße mittels Nicht-invasivem *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging (siehe 3.16.4) quantifiziert. Die Tiere wurden bei Versuchsende durch Inhalation von Halothan getötet. Die Tumoren wurden präpariert und für histologische Untersuchungen in 5 % Formalin in PBS für mindestens 48 h fixiert. Die Einbettung der Tumoren in Paraffin sowie die Anfertigung von 5 µm-Schnitten erfolgten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Holzhausen, Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.16.3 Analyse des Effekts der systemischen Applikation von WT-MSc und TRAIL-MSc

Für die Analyse der Einwanderung von MSc in etablierte Tumoren wurden subkutane Xenografte durch s. c. Injektion von 3×10^6 DLD1-Zellen generiert. Im Abstand von jeweils 2 d erfolgte 5-mal die Injektion von $2,5 \times 10^5$ GFP-MSc i. v. in die Schwanzvene. Als Kontrolle dienten Tiere ohne i. v. Injektion von MSc. Die Tiere wurden bei Versuchsende durch Inhalation von Halothan getötet. Die Tumoren wurden präpariert und für histologische Untersuchungen in 5 % Formalin in PBS für mindestens 48 h fixiert. Die Einbettung der Tumoren in Paraffin sowie die Anfertigung von 5 µm-Schnitten erfolgten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Holzhausen, Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Für die Analyse der Effektivität systemisch transplanteder TRAIL-MSc wurden subkutane Xenografte durch s. c. Injektion von 5×10^6 GFP-DLD1-Zellen in die linke Flanke generiert. Nach 2, 4, 7, 10 und 15 d erfolgte die Injektion von jeweils $2,25 \times 10^5$ Dil-gefärbten TRAIL-MSc bzw. Dil-gefärbten WT-MSc i. v. in die Schwanzvene. Als Negativkontrollen dienten xenografttragende Tiere bei denen i. v. PBS statt MSc injiziert wurde. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde als Korrelat für die Tumorgroße mittels Nicht-invasivem *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging (siehe 3.16.4) quantifiziert. Die Tiere wurden bei Versuchsende durch Inhalation von Halothan getötet. Die Lungen und Tumoren wurden präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden 20 µm dicke Gefrierschnitte (Kryostat MEV; SLEE Medical, Mainz, BRD) angefertigt.

3.16.4 Nicht-invasives *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging

Die Durchführung des Nicht-invasiven *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging (*In-vivo*-Imaging) erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. T. Müller, Hämatologisch/Onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die benötigte Technik wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

bereitgestellt. Für die Erstellung der Multispektralaufnahmen wurde ein 2.2 CRi Maestro *In-vivo*-Fluoreszenz Imaging System (CRi, Woburn, USA) verwendet. Mit *DsRed*-CRC-Zellen generierte Xenografte wurden mit dem grünen Filtersatz (Anregung: 503 - 550 nm, Emission: 580 nm longpass) analysiert. Mit *GFP*-CRC-Zellen generierte Xenografte wurden mit dem blauen Filtersatz (Anregung: 445 - 490 nm, Emission: 515 nm longpass) analysiert. Die Aufnahmen erfolgten von 550 - 800 nm (grüner Filtersatz) bzw. 500 - 720 nm (blauer Filtersatz) in 10-nm-Schritten mit automatischer Belichtungszeit.

Die Isolation der Fluoreszenzsignale sowie deren Quantifizierung erfolgte mittels Maestro Software v2.22. Durch manuelle Auswahl von Hintergrund, Autofluoreszenz (Tier) und Fluoreszenzprotein-exprimierendem Tumorareal wurden Referenzspektren gewonnen. Die Autofluoreszenz wurde vom Spektrum des Fluoreszenzproteins subtrahiert, um ein pures Spektrum zu erhalten. RGB-Bilder von den puren Fluoreszenzsignalen wurden erstellt (Hintergrund schwarz, Autofluoreszenz weiß, GFP grün, DsRed rot). Für die Quantifizierung wurden die isolierten Fluoreszenzsignale innerhalb einer *region of interest* (ROI) analysiert. Die Auswahl der ROI erfolgte manuell als Rechteck (124 x 135 Pixel), welches, ggf. unter Zuhilfenahme des Graustufenbildes, zentral über dem Tumor platziert wurde. Die totale Signalintensität (Summierung aller Pixelsignale) innerhalb der ROI wurde bestimmt. Um die Abhängigkeit des Signals von der Belichtungszeit auszugleichen, wurde die totale Signalintensität durch die Belichtungszeit geteilt. Die totale Intensität pro Zeiteinheit unmittelbar nach dem Setzen des jeweiligen Xenografts wurde 100 % gesetzt und sämtliche Messwerte dieses Tumors wurden auf diesen Wert normiert. Die Korrelation von totaler Signalintensität und Tumorgroße wurde zuvor in der Arbeitsgruppe anhand subkutaner Tumormodelle demonstriert (Caysa *et al.*).

3.16.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchung von Xenograften und Gewebeproben

Im Fall der Paraffinpräparate (siehe 3.16.2 sowie 3.16.3) erfolgte zunächst die Deparaffinisierung der gewonnenen Tumorgewebeschnitte durch Erhitzen für 1 h bei 50 °C und anschließender Inkubation in Xylol 2-mal für 5 min bei RT. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Es folgte die Rehydrierung durch die absteigende Alkoholreihe durch Inkubation für jeweils 5 min nacheinander in Isopropanol, 96 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol, dest. H₂O und PBS. Anschließend wurden die Schnitte 15 min in Peroxidase-Blockierungslösung (Dako, Hamburg) inkubiert. Nach dem Spülen in PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation mit PBS mit 3 % BSA für 20 min. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 2-2) erfolgte in PBS mit 1 % BSA für 3 h. Die Schnitte wurden 3-mal für 5 min in PBS gespült und anschließend mit dem Biotin-konjugierten sekundären Antikörper (Tab. 2-3) in PBS für 1 h inkubiert. Nach 3-mal

Spülen für 5 min in PBS wurden die Schnitte für 30 min mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat (Tab. 2-3) in PBS inkubiert. Nach 3-mal Spülen für 5 min in PBS wurden die Immunkomplexe mit Hilfe des DAB Systems (Dako) entsprechend den Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Es folgte eine Kernfärbung mit gebrauchsfertiger Hämatoxylin-Lösung (Dako) für 1 min. Die Schnitte wurden in Leitungswasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe durch Inkubation für jeweils 5 min in dest. H₂O, 50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 96 % Ethanol, Isopropanol und Xylol dehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckt, lichtmikroskopisch beurteilt und dokumentiert (AxioCam HR, AxioVision 3.1).

Die Gefrierschnitte (siehe 3.16.3) wurden mit 1 µg/ml DAPI in PBS gefärbt und mit Fluoreszenzeindeckmedium und Deckgläschen abgedeckt. Die Beurteilung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.17 Statistische Analyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und angegeben. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe kommerziell erhältlicher Software (SPSS 16.0; SPSS Inc., Chicago, USA). Hierbei kam ausgehend von einem Levene-Test auf Varianzgleichheit ein t-Test oder ein modifizierter t-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Bei einem p-Wert von < 0,05 wurden die Probenwerte als signifikant betrachtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Isolation von MSC aus dem Knochenmark bei Patienten mit malignen Erkrankungen und ihre Charakterisierung

4.1.1 Präsenz von CFU-F bei Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung

Es sollte untersucht werden, ob MSC aus dem KM von Patienten nach vorangegangener Chemotherapie für potentielle klinische Anwendungen isoliert werden können. Es wurden 17 Spender mit vorangegangener Chemotherapie ausgewählt. Als Kontrollgruppe dienten 16 Spender ohne vorangegangene Chemotherapie und maligne KM-Infiltration. Die Spendercharakteristika sind in Tab. 8-1 und 8-2 im Anhang zusammengefasst.

Außer bei einem Spender wurde in allen Präparationen ein Wachstum von CFU-F nach 3 - 7 d beobachtet (Abb. 4-1). Die durchschnittliche Anzahl der jeweiligen CFU-F pro 10^6 KM-MNZ war unterschiedlich (KM ohne vorangegangene Chemotherapie: $13,3 \pm 12,0$; KM mit vorangegangener Chemotherapie: $7,0 \pm 5,7$). Eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht ($p = 0,073$). Beim Vergleich der Präparationen von Spenderpaaren ohne vorangegangene Chemotherapie und mit vorangegangener Chemotherapie mit ähnlichen demografischen Charakteristika (# 46 vs. # 47, # 68 vs. # 67 und # 75 vs. # 76; # bezeichnet die jeweilige Präparation) wurden nur minimale Varianzen in der Anzahl der CFU-F beobachtet (Tab. 8-1 und 8-2 im Anhang). MSC waren demnach sowohl im KM ohne vorangegangene Chemotherapie als auch im KM mit vorangegangener Chemotherapie eine sehr seltene Zellpopulation. Die im Durchschnitt gewonnene Anzahl von 10 CFU-F pro 10^6 KM-MNZ entsprach einem Anteil von 0,001 % MSC an den gesamten KM-MNZ.

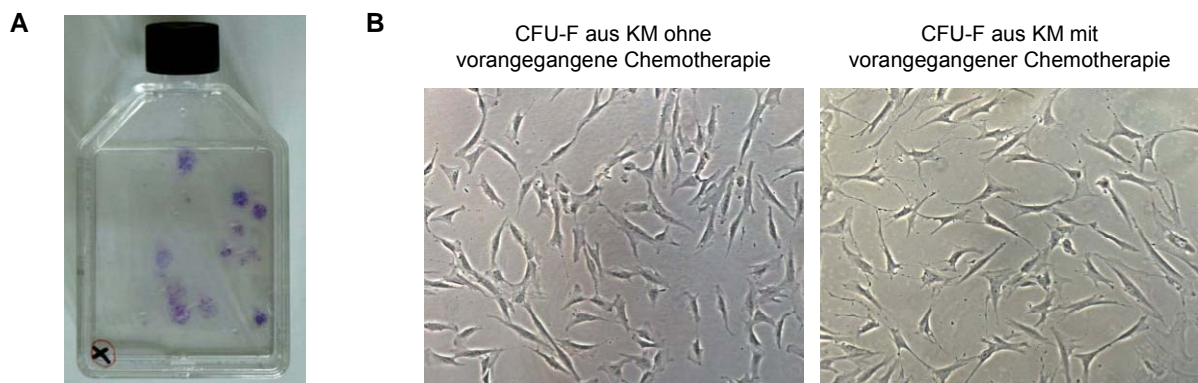


Abb. 4-1: Wachstum von CFU-F aus KM mit vorangegangener Chemotherapie. (A) Mit Giemsa gefärbte Kolonien. (B) Wachstum von CFU-F aus KM ohne vorangegangene Chemotherapie (# 95) und KM mit vorangegangener Chemotherapie (# 78) innerhalb der Kolonien bei 50 % Konfluenz; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach.

In beiden Gruppen war die Konfluenz innerhalb der Kolonien im Mittel nach ähnlicher Kultivierungsdauer erreicht ($p = 0,4$). Sie betrug für Präparationen aus KM ohne

vorangegangene Chemotherapie $11,3 \pm 2,2$ d (Minimum 8 d, Maximum 15 d) und für Präparationen aus KM mit vorangegangener Chemotherapie $12,0 \pm 2,3$ d (Minimum 8 d, Maximum 17 d).

In der Gruppe der Spender ohne vorangegangene Chemotherapie war die Anzahl der CFU-F pro 10^6 KM-MNZ bei Spendern älter als 40 Jahre ($10,2 \pm 7,9$; $n = 9$) geringer als bei Spendern jünger als 40 Jahre ($17,1 \pm 15,7$; $n = 7$). Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,27$). Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich die Anzahl der CFU-F pro 10^6 KM-MNZ zwischen männlichen ($11,4 \pm 7,5$; $n = 10$) und weiblichen ($16,3 \pm 17,7$; $n = 6$) Spendern ($p = 0,54$).

In der Gruppe der Spender mit vorangegangener Chemotherapie ergab die Analyse der Zahl der CFU-F pro 10^6 KM-MNZ bezüglich männlicher ($6,4 \pm 5,9$; $n = 14$) und weiblicher ($9,7 \pm 4,6$; $n = 3$) Spender ($p = 0,39$) sowie Spender älter ($7,1 \pm 6,4$; $n = 9$) und jünger ($6,9 \pm 5,3$; $n = 8$) als 40 Jahre ($p = 0,94$) keine Unterschiede. Auch zeigten sich in dieser Gruppe hinsichtlich der Anzahl der CFU-F pro 10^6 KM-MNZ keine Unterschiede bei Spendern mit ($6,8 \pm 5,9$; $n = 14$) und ohne ($8,0 \pm 6,0$; $n = 3$) maligne Infiltration des KM ($p = 0,78$) sowie bei Spendern mit KM-Aspiration innerhalb von 3 Monaten ($6,2 \pm 5,5$; $n = 9$) oder später als 3 Monate ($7,9 \pm 6,2$; $n = 8$) nach Ende der Chemotherapie ($p = 0,57$).

Diese Ergebnisse belegen, dass CFU-F nach vorangegangener Chemotherapie aus dem KM isoliert werden konnten. Es wurde daher vermutet, dass CFU-F aus KM mit vorangegangener Chemotherapie und CFU-F aus KM ohne vorangegangene Chemotherapie MSC enthalten und dass diese MSC keine Unterschiede in ihren Eigenschaften zeigen. Im Folgenden werden die isolierten Zellen von Spendern mit vorangegangener Chemotherapie als MSC aus vorbehandeltem KM (MSC-VKM) und die Zellen von Spendern ohne vorangegangene Chemotherapie als MSC aus unbehandeltem KM (MSC-UKM) bezeichnet.

4.1.2 Charakteristika der von Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung gewonnenen MSC

Die isolierten Zellen wurden hinsichtlich der für MSC gemäß Konsensus (Dominici *et al.* 2006) definierenden Eigenschaften - Proliferation, multipotentes Differenzierungspotential und spezifische Oberflächenantigenexpression - untersucht.

MSC-VKM und MSC-UKM zeigten eine vergleichbare *In-vitro*-Proliferation (Abb. 4-2). In Tab. 4-1 sind die PD und die jeweiligen PDT zum Zeitpunkt der 2., 5. und 10. Passage zusammengefasst. Zwischen MSC-VKM und MSC-UKM zeichneten sich keine Unterschiede in den ermittelten Werten ab, die entsprechenden p-Werte sind in Tab. 4-1 angegeben. Mit zunehmender Dauer der *In-vitro*-Kultivierung nahm die PDT zu (Tab. 4-1), als Zeichen einer abnehmenden Proliferationskapazität (Abb. 4-2). MSC-VKM konnten wie MSC-UKM im Durchschnitt bis zu einem Faktor von 100×10^6 expandiert werden. Somit ist es möglich

auch von Spendern nach vorangegangener Chemotherapie Zellzahlen von bis zu 10×10^6 MSC pro kg Körpergewicht zu erhalten.

Tab. 4-1: PD und PDT von MSC-VKM und MSC-UKM; MW (\pm Stabw), jeweils n = 3

MSC	PD			PDT [d]		
	MSC-VKM	MSC-UKM		MSC-VKM	MSC-UKM	
Passage 2	3,5 (\pm 0,6)	5,4 (\pm 3,0)	p = 0,38	1,1 (\pm 0,3)	1,0 (\pm 0,2)	p = 0,67
Passage 5	15,2 (\pm 2,0)	15,6 (\pm 3,0)	p = 0,86	1,3 (\pm 0,2)	1,4 (\pm 0,1)	p = 0,47
Passage 10	26,4 (\pm 4,5)	26,6 (\pm 3,9)	p = 0,97	2,0 (\pm 0,5)	1,95 (\pm 0,2)	p = 0,89

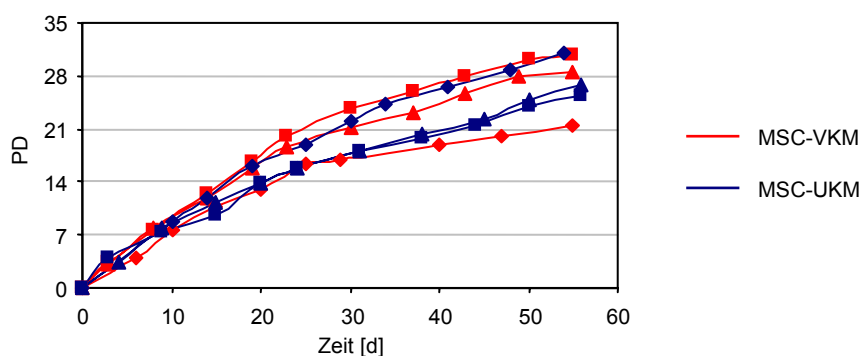


Abb. 4-2: Wachstumskinetiken ausgewählter Präparationen von MSC-VKM (rot; # 47, # 63, # 92) und MSC-UKM (blau; # 61, # 72, # 77).

Die durchflusszytometrische Analyse ergab für MSC-VKM und MSC-UKM einen identischen Phänotyp: CD14⁻, CD19⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺ (Abb. 4-3). Dieses Oberflächenantigenexpressionsmuster entsprach den Konsensus-Kriterien. Hinsichtlich Alter, Geschlecht und *In-vitro*-Kultivierung wurden keine Unterschiede in der Oberflächenantigenexpression der Zellen beobachtet.

Nach adipogener und osteogener Differenzierungsinduktion wurden für MSC-VKM (n = 10) und MSC-UKM (n = 9) die jeweiligen morphologischen Anzeichen einer Differenzierung beobachtet. Bei adipogen differenzierten Zellen handelte es sich um intrazelluläre Fetteinlagerungen, die eine Färbung mit Öl Rot zeigten. Osteogen differenzierte Zellen zeigten Kalziumhydroxylapatitablagerungen, die durch Färbung mit Alizarin S nachgewiesen wurden (Abb. 4-4A, B). Mittels RT-PCR-Analyse wurde die Expression von LPL und PPAR γ 2 nach adipogener Differenzierung sowie die Expression von Osteocalcin nach osteogener Differenzierung detektiert (Abb. 4-4C). Gelegentlich wurde eine geringe Expression von LPL nach osteogener Differenzierung oder eine geringe Expression von Osteocalcin nach adipogener Differenzierung beobachtet.

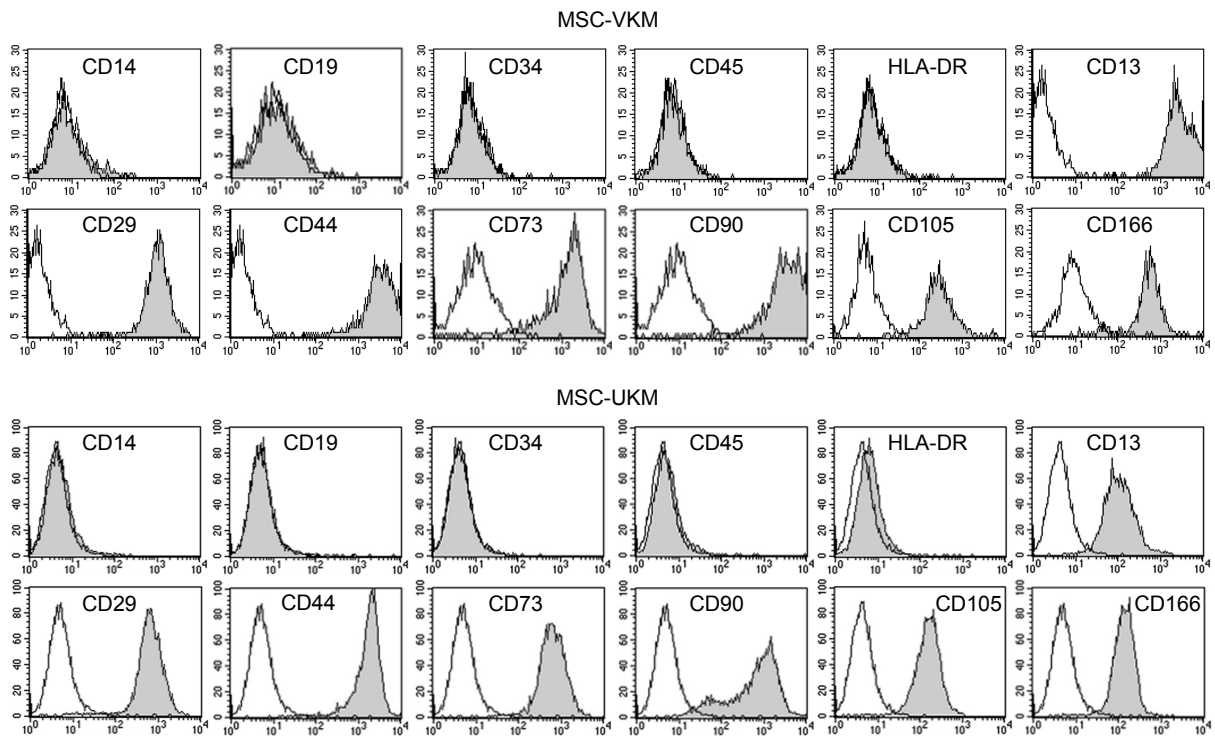


Abb. 4-3: Durchflusszytometrische Analyse von MSC-VKM und MSC-UKM. Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und spezifischem FITC- oder PE-konjugiertem Antikörper (grau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 9 (MSC-VKM) bzw. 11 (MSC-UKM) unabhängigen Versuchen.

Die Öl Rot-Färbung von Fetteinlagerungen bzw. die Alizarin S-Färbung von Kalziumhydroxylapatitablagerungen ging stets mit der Expression von LPL und PPAR γ 2 bzw. Osteocalcin einher (n = 5), so dass im Folgenden der Differenzierungsnachweis ausschließlich mittels zytochemischer Färbung erbracht wurde.

In den hier untersuchten Eigenschaften - Proliferationsfähigkeit, Differenzierungskapazität und charakteristische Oberflächenantigenexpression - ergaben sich keine Unterschiede zwischen MSC-VKM und MSC-UKM. Ebenso wurden bezüglich dieser Eigenschaften keine Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht oder Zeit seit letzter Chemotherapie beobachtet. In Wachstumsmedium I isolierte und kultivierte MSC zeigten diese Eigenschaften ebenso wie MSC, welche in Wachstumsmedium II isoliert und kultiviert wurden. Es wurde somit gezeigt, dass aus dem KM nach vorangegangener Chemotherapie Zellen isoliert werden konnten, welche die für MSC definierenden Kriterien erfüllten. Es ergab sich hieraus die Vermutung, dass MSC resistent gegenüber Chemotherapie sind.

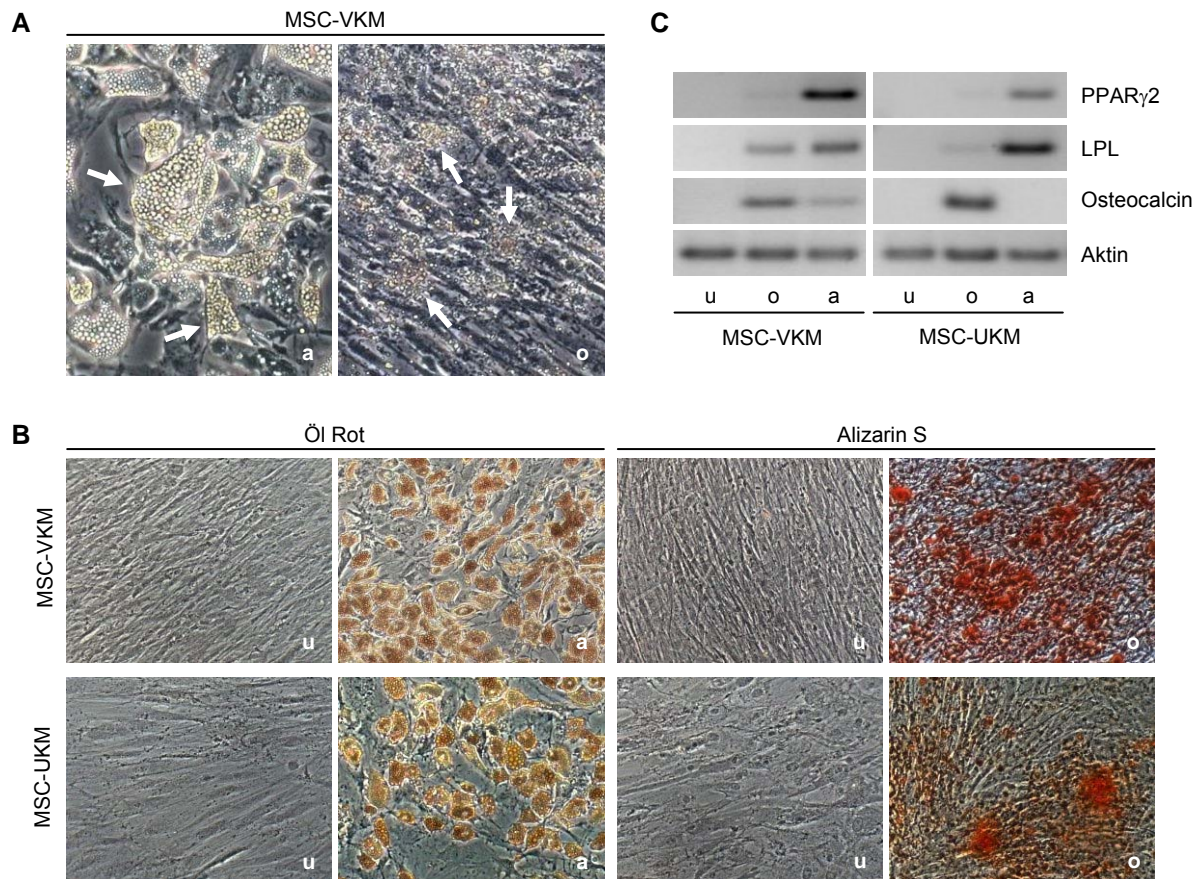


Abb. 4-4: Differenzierungsinduktion in MSC-VKM und MSC-UKM. MSC wurden mit Wachstumsmedium (u), adipogenem (a) und osteogenem (o) Differenzierungsmedium kultiviert. **(A)** Native Zellen; die Pfeile markieren intrazelluläre Fetteinlagerungen bzw. extrazelluläre Kalziumhydroxylapatitablagerungen. Phasenkontrast, Vergrößerung 200-fach. **(B)** Färbung mit Öl Rot bzw. Alizarin S; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach; Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 10 (MSC-VKM) bzw. 9 (MSC-UKM) unabhängigen Versuchen. **(C)** RT-PCR für adipogene (PPAR γ 2, LPL) und osteogene (Osteocalcin) Differenzierungsmarker; Aktin diente als interne Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 5 unabhängigen Versuchen.

4.1.3 Sensitivität von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden SRB-Zytotoxizitätsassays mit drei Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen durchgeführt. Die vorab für MSC durchgeführten Wachstumskinetiken zur Ermittlung der im SRB-Assay einzusetzenden Zellzahl ergaben eine zu setzende Zellzahl von 1000 MSC pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Abb. 8-1 im Anhang).

Sowohl MSC-VKM als auch MSC-UKM zeigten eine reduzierte Sensitivität gegenüber Cisplatin, Etoposid und Vincristin im Vergleich zu sensitiven TGCT-Zellen (Abb. 4-5). Diese reduzierte Sensitivität zeigte sich vor allem bei höheren, in sensitiven Zelllinien Apoptose-induzierenden Konzentrationen der Zytostatika und äußerte sich in erhöhten IC₉₀ für MSC (Tab. 4-2). Für MSC-VKM wurden höhere IC₉₀ für alle drei Substanzen ermittelt als für MSC-UKM. Dieser Unterschied war jedoch nur für Etoposid signifikant ($p = 0,039$; Tab. 4-2).

Der Mittelwert der IC90 für Cisplatin betrug für MSC-VKM und MSC-UKM 20 μM . Für die nachfolgenden Analysen erfolgte daher die Cisplatin-Behandlung von MSC für 24 h mit dieser Konzentration (IC90_{MSC}). Zusätzlich wurden MSC für 24 h mit der für die sensitiven TGCT-Zelllinien ermittelten mittleren IC90 von 3 μM (IC90_{TGCT}) behandelt.

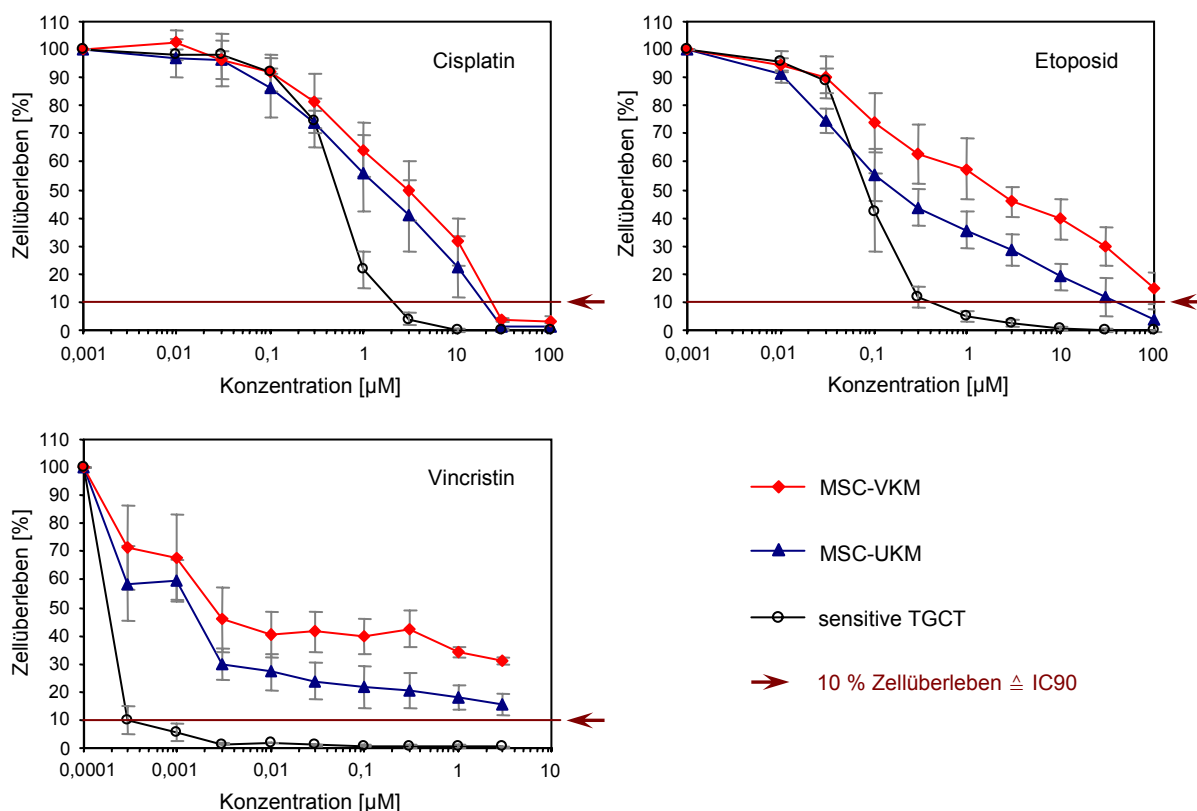


Abb. 4-5: Zytotoxizität von Cisplatin, Etoposid und Vincristin in MSC-VKM und MSC-UKM. Dargestellt sind die Ergebnisse der SRB-Assays für 24 h-Behandlungen mit Cisplatin (MSC-VKM $n = 4$, MSC-UKM $n = 5$), Etoposid und Vincristin (jeweils MSC-VKM $n = 3$, MSC-UKM $n = 4$). Als Vergleich sind die Ergebnisse der SRB-Assays für die sensitive TGCT-Zelllinie 2102EP (Cisplatin und Vincristin jeweils $n = 3$, Etoposid $n = 6$) dargestellt. MW \pm Stabw.

Tab. 4-2: IC50 [μM] und IC90 [μM] nach 24 h-Behandlung mit der jeweiligen Substanz; MW (\pm Stabw); n siehe Abb. 4-5, für H12.1 jeweils $n = 3$

	MSC-VKM	MSC-UKM	2102EP	H12.1	
IC50	Cisplatin	3,3 (\pm 2,2)	1,9 (\pm 1,9)	0,5 (\pm 0,07)	0,9 (\pm 0,06)
	Etoposid	1,9 (\pm 1,4)	0,2 (\pm 0,1)	0,1 (\pm 0,03)	0,5 (\pm 0,2)
	Vincristin	0,004 (\pm 0,005)	0,001 (\pm 0,0003) [†]	0,0002 (\pm 0,00001)	0,0002 (\pm 0,00005)
IC90	Cisplatin	21,5 (\pm 1,3) [‡]	17,0 (\pm 4,3) [‡]	2,0 (\pm 0,5)	3,3 (\pm 0,6)
	Etoposid	96,0 (\pm 6,9) ^{‡, †}	41,0 (\pm 33,0)	0,4 (\pm 0,2)	16,7 (\pm 5,8)
	Vincristin	>3 [‡]	>3 [‡]	0,0005 (\pm 0,0002)	0,0009 (\pm 0,0002)

[‡] $p = 0,039$ vs. MSC-UKM; [†] $p \leq 0,002$ vs. sowohl 2102EP als auch H12.1

Diese Daten belegten eine relative Resistenz von MSC gegenüber verschiedenen Zytostatika *in vitro* und führten zur Fragestellung, ob MSC ihren Stammzellcharakter nach genotoxischer Schädigung durch Behandlung mit Zytostatika *in vitro* beibehalten.

4.2 Charakterisierung der Resistenz von MSC für genotoxische Schädigung

4.2.1 Verhalten von MSC in einem *In-vitro*-Modell der genotoxischen Schädigung

Es wurde ein *In-vitro*-Modell einer chemotherapeutischen Behandlung zur Induktion einer genotoxischen Schädigung entwickelt. Hierfür wurden Aliquots derselben Präparation von MSC-UKM *in vitro* mit Cisplatin bzw. Etoposid behandelt. Das Behandlungsschema beinhaltete die wiederholte Gabe klinisch relevanter Konzentrationen der Zytostatika, welche in Anlehnung an die jeweils erreichten Plasmaspiegel gewählt wurden. Damit wurde ein Schema in Anlehnung an klinische Applikationszyklen entwickelt (Braybrooke *et al.* 2003; Hanada *et al.* 2001; Nagai *et al.* 1998). Die Exposition der Zellen mit 3 μM Cisplatin oder 3 μM Etoposid für 2 h erfolgte 4-mal im Abstand von jeweils 24 h (4 x Cisplatin bzw. 4 x Etoposid). Anschließend wurden die Zellen für die MSC-definierenden Charakteristika Proliferation, Immunphänotyp und Differenzierungskapazität untersucht.

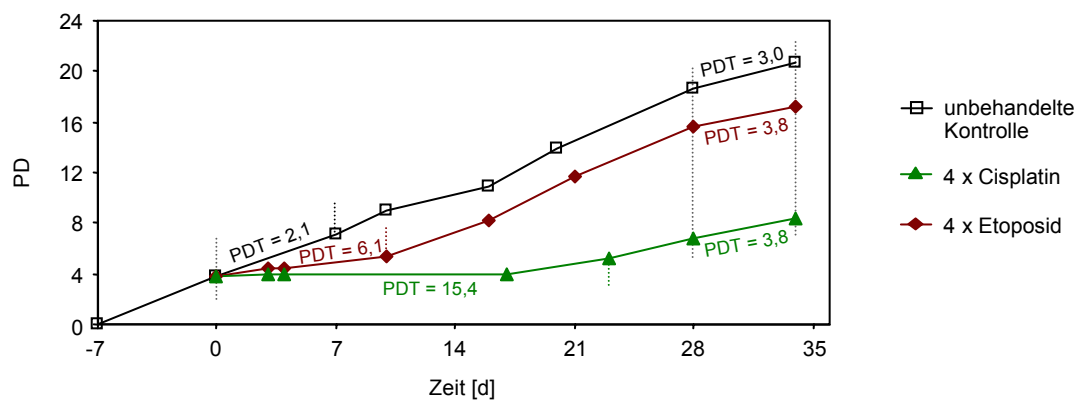


Abb. 4-6: Proliferation von MSC nach genotoxischer Behandlung *in vitro*. Wachstumskinetik; Start der Behandlung zum Zeitpunkt Tag 0; Für die markierten Abschnitte sind die jeweiligen PDT [d] angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 unabhängigen Versuchen.

Hierfür wurden zunächst Wachstumskinetiken vom Zeitpunkt des Setzens der Zellen vor Behandlungsbeginn, wobei Tag 0 den Behandlungsbeginn bezeichnet, durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 4-6 dargestellt. Nach einer stationären Phase von 7 d für Etoposid und 14 d für Cisplatin nach Ende des jeweiligen Behandlungszyklus setzen die behandelten Zellen ihr Wachstum fort. Die Proliferationsrate der behandelten Zellen näherte sich schließlich der Proliferationsrate unbehandelter Kontrollzellen (Abb. 4-6). Diese Annäherung zeigte sich auch anhand der PDT. Ausgehend vom Beginn der Behandlung bis zur detektierbaren erneuten Proliferation betrug die PDT für die unbehandelte Kontrolle 2,1 d (Tag 0 - 7), für 4 x Cisplatin 15,4 d (Tag 0 - 23) und für 4 x Etoposid 6,1 d (Tag 0 - 10). Zum

Endpunkt der dargestellten Kinetik (Tag 28 - 34) betrug die PDT für die unbehandelte Kontrolle 3,0 d und für 4 x Cisplatin und 4 x Etoposid jeweils 3,8 d (Abb. 4-6).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten MSC 72 h nach Behandlung einen unveränderten Immunphänotyp. Sie waren CD11c⁻, CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻ und CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD166⁺ (Abb. 8-2A im Anhang). MSC nach *In-vitro*-Behandlung zeigten nach adipogener bzw. osteogener Differenzierungsinduktion in der zytochemischen Färbung die entsprechenden morphologischen Zeichen einer Differenzierung, d. h. mit Öl Rot gefärbte Einlagerung von Fett bzw. mit Alizarin S gefärbte Ablagerung von Kalziumhydroxylapatit (Abb. 8-2B im Anhang).

Somit konnte gezeigt werden, dass MSC nach Behandlung mit Zytostatika *in vitro* ihre MSC-definierenden Eigenschaften beibehielten. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass MSC resistent gegenüber genotoxischer Schädigung sind. Einer Resistenz von Zellen gegenüber Zytostatika können u. a. Mechanismen der Ausschleusung der Substanz aus der Zelle oder des verringerten Eintritts der Substanz in die Zelle zu Grunde liegen. Es sollte daher beispielhaft der zelluläre Platingehalt von MSC im Vergleich zu Cisplatin-sensitiven TGCT-Zellen nach Behandlung mit äquimolarer Konzentration Cisplatin analysiert werden.

4.2.2 Zellulärer Platingehalt in MSC nach Exposition mit Cisplatin

Mittels AAS wurde der zelluläre Platingehalt der Zellen nach einer 24 h-Behandlung mit Cisplatin in der IC₉₀_{TGCT} (3 µM) bestimmt. Diese Konzentration entspricht der IC₅₀ von MSC. Im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven TGCT-Zelllinien 2102EP und H12.1 zeigten MSC nach dieser Behandlung keinen Unterschied im zellulären Platingehalt (Abb. 4-7).

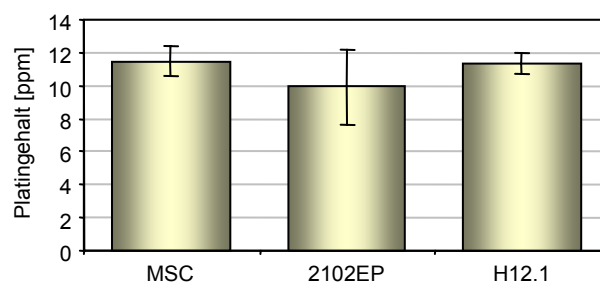


Abb. 4-7: Zellulärer Platingehalt nach 24 h-Behandlung mit Cisplatin in der IC₉₀_{TGCT}. MW ± Stabw (jeweils n = 3).

Dies läßt auf ein gleiches Ausmaß der Schädigung schließen. Der SRB-Assay zeigte jedoch einen unterschiedlichen Einfluss dieser Cisplatin-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von MSC und TGCT-Zellen. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit Cisplatin in der Zelllinien-spezifischen IC₉₀ in der Induktion von Apoptose resultiert (Mueller, T 2005). Es ergab sich die Fragestellung, ob sich MSC und TGCT-Zellen in der Reaktion auf diese Schädigung, z. B. in der Regulation von Apoptose unterscheiden.

4.2.3 Apoptotische Schwelle für Cisplatin-induzierte Schädigung in MSC

Für diese Untersuchungen wurden MSC für 24 h mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ ($20 \mu M$) behandelt. Als Positivkontrolle dienten H12.1-Zellen nach 24 h-Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ ($3 \mu M$). Dabei entstanden jeweils flotierende Zellen, was auf eine Induktion von Apoptose hindeutete. Diese flotierenden Zellen wurden mittels Trypan-Blau-Färbung hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Farbstoffausschluss analysiert. Sowohl bei MSC als auch bei H12.1-Zellen wurde ein hoher Anteil an ungefärbten, somit nicht-nekrotischen Zellen beobachtet. Diese Zellen zeigten für Apoptose typische Membranausstülpungen. Jeweils nur wenige Zellen waren gefärbt und somit vermutlich als nekrotisch einzuordnen (Abb. 4-8A).

Im Weiteren wurden die adhärennten MSC nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ hinsichtlich der Färbung mit Annexin V und PI analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte MSC. Der Anteil PI^- , Annexin V^+ und somit apoptotischer Zellen stieg von 5,1 % bei der unbehandelten Kontrolle auf 30,4 % nach Cisplatin-Behandlung an. Die Anteile PI^+ und Annexin V^+ Zellen sowie PI^+ und Annexin V^- Zellen blieben hingegen konstant (Abb. 4-8B) und repräsentierten vermutlich nekrotische Zellen.

Die Entstehung flotierender Zellen mit der Fähigkeit zum Ausschluss von Trypan-Blau sowie die Anfärbung der adhärennten Zellen mit Annexin V bei Ausschluss von PI ließ somit auf die Induktion von Apoptose in MSC durch Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ schließen.

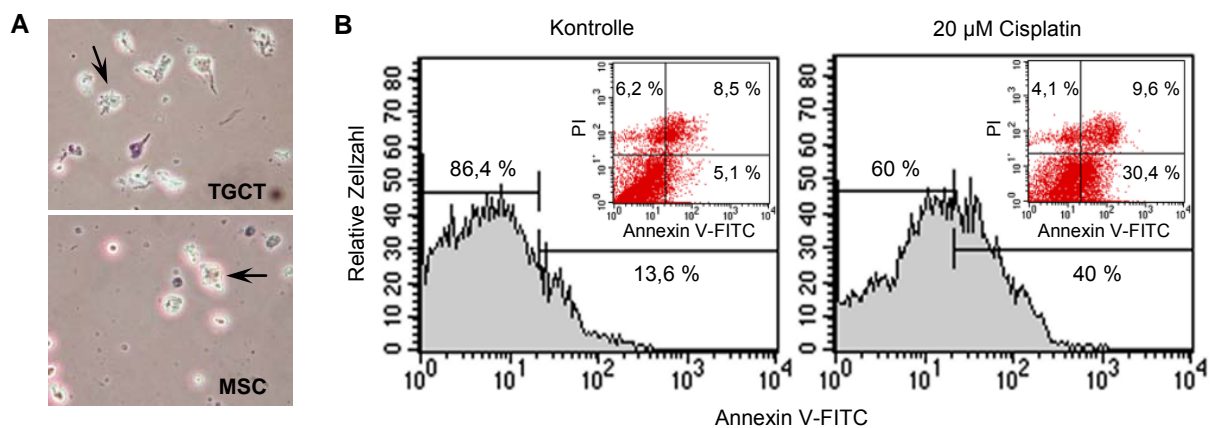


Abb. 4-8: Analyse einer Apoptoseinduktion in MSC nach Behandlung mit Cisplatin. **(A)** Trypan-Blau-Färbung der flotierenden Zellen von H12.1-Zellen und MSC nach Behandlung mit Cisplatin in der jeweiligen IC_{90} ; die Pfeile markieren Beispiele ungefärbter Zellen mit für Apoptose typischen Membranausstülpungen. Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. **(B)** Färbung der adhärennten MSC mit Annexin V-FITC und PI nach Behandlung mit Cisplatin ($IC_{90_{MSC}}$). Als Kontrolle dienten unbehandelte MSC. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Anhand der Analyse einiger typischer Apoptosemarker sollte eine Apoptoseinduktion bestätigt werden. Hierfür wurden MSC für 24 h mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ ($20 \mu M$) behandelt und Proteinlysate der adhärennten und flotierenden Zellen gewonnen. Weiterhin wurden MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ ($3 \mu M$) behandelt. Dabei entstanden keine flotierenden Zellen, so dass nur Lysate der adhärennten Zellen gewonnen wurden. Als

Positivkontrolle dienten Lysate adhärenter und flotierender H12.1-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$. Mittels Western Blot (Abb. 4-9) wurde in MSC nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ eine Zunahme des für Apoptoseinduktion typischen PARP-Spaltfragments (85 kDa) sowie eine Abnahme des intakten PARP (116 kDa) detektiert. Des Weiteren wurde eine Spaltung der Caspasen-9 und -3 gezeigt, welche durch die Abnahme der Procaspase-9 (46 kDa) und Procaspase-3 (32 kDa) sowie die Zunahme der jeweils aktiven Spaltfragmente (Caspase-9: 37 und 35 kDa; Caspase-3: 20 und 17 kDa) gekennzeichnet war. Es zeigte sich jedoch, dass, verglichen mit flotierenden H12.1-Zellen, in flotierenden MSC deutlich weniger der Fragmente der Caspase-9 präsent war. Jedoch war in flotierenden MSC keine Procaspase-9 mehr zu detektieren (Abb. 4-9), d. h. es muß von einer Spaltung ausgegangen werden. Die Spaltung von PARP und der Procaspasen war jeweils in den flotierenden Zellen besonders ausgeprägt. Somit wurde gezeigt, dass es sich bei den nach Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ entstehenden flotierenden Zellen um apoptotische Zellen handelte.

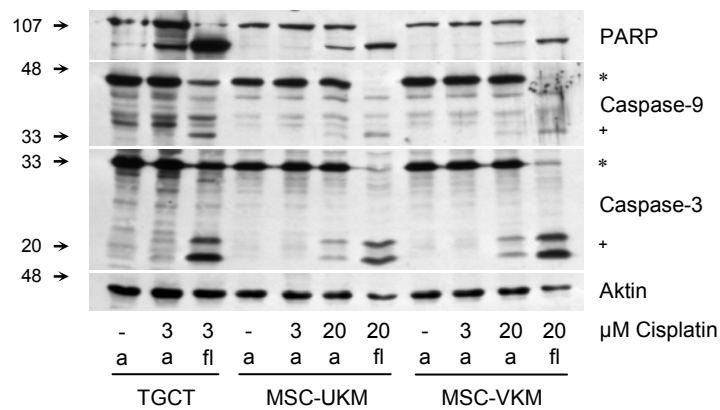


Abb. 4-9: Präsenz relevanter Proteine der Apoptoseinduktion in MSC nach Behandlung mit Cisplatin. MSC wurden mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ sowie der $IC_{90_{TGCT}}$, H12.1-Zellen mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ behandelt. Western Blot-Analyse der Lysate der adhärenter (a) und flotierenden (fl) Zellen; Aktin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. [*] - Procaspase; [+] - gespaltene Fragmente. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 unabhängigen Versuchen

Die Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ führte weder zur Spaltung von PARP noch zur Spaltung der Procaspasen in die aktiven Fragmente (Abb. 4-9). Somit repräsentierte diese, in sensitiven TGCT-Zellen Apoptose-induzierende Konzentration Cisplatin eine für MSC subapoptotische Konzentration.

Zwischen MSC-VKM und MSC-UKM wurden nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ sowie der $IC_{90_{TGCT}}$ keine Unterschiede hinsichtlich der Spaltung von PARP und der Entstehung der aktiven Fragmente der Caspasen beobachtet (Abb. 4-9).

Diese Daten zeigten, dass trotz relativer Cisplatin-Resistenz die Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ zur Induktion von Apoptose führte. Diese Konzentration war jedoch 6-mal höher als die $IC_{90_{TGCT}}$. MSC besaßen somit eine erhöhte Schwelle für Cisplatin-

induzierte Apoptose. Diese könnte auf eine Beeinträchtigung der Apoptoseinduktion zurückzuführen sein, der z. B. eine geringe Enzymaktivität der Caspasen zugrunde liegen kann (Mueller, T *et al.* 2003).

4.2.4 Caspase-Aktivitäten in MSC nach Cisplatin-induzierter Apoptose

Es wurde daher die Aktivität der Caspasen in MSC nach Behandlung mit Cisplatin in der Apoptose-induzierenden Konzentration ($IC_{90_{MSC}}$, 20 μM) in einem Substratspaltungsassay untersucht. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurde sowohl in MSC-UKM als auch in MSC-VKM ein Anstieg der Enzymaktivität für Caspase-2 und Caspase-3 in ähnlichem Ausmaß beobachtet ($p \geq 0,63$). Es wurde keine erhöhte Enzymaktivität der Caspase-8 und Caspase-9 detektiert (Abb. 4-10A). Die völlig fehlende Aktivität der Caspase-9 in apoptotischen MSC stand im Kontrast zu der im Western Blot beobachteten Spaltung der Procaspase-9 (Abb. 4-9). Im Gegensatz dazu ist die Cisplatin-induzierte Apoptose in Cisplatin-sensitiven TGCT-Zellen ($IC_{90_{TGCT}}$, 3 μM) durch eine hohe Aktivität der Caspase-9 gekennzeichnet (Abb. 4-10B). Verglichen mit dieser hohen Caspase-9-Aktivität in apoptotischen TGCT-Zellen ist die Caspase-9-Aktivität in apoptotischen MSC signifikant reduziert ($p < 0,0008$).

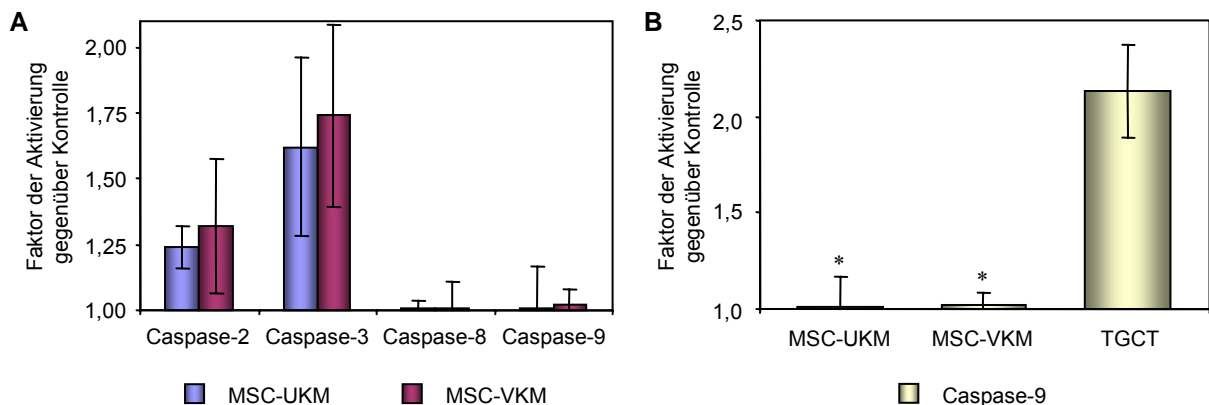


Abb. 4-10: Caspaseaktivität in MSC nach Cisplatin-induzierter Apoptose. Die Enzymaktivitäten der Caspasen sind als Faktor der Aktivierung gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle dargestellt. MW \pm Stabw (jeweils $n = 3$). **(A)** Aktivität der Caspasen-2, -3, -8 und -9 nach Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$. **(B)** Aktivität der Caspase-9 nach Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ und nach Behandlung der Cisplatin-sensitiven TGCT-Zelllinie H12.1 mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$. * $p < 0,0008$ vs. H12.1.

Diese Daten zeigten, dass die Cisplatin-induzierter Apoptose in MSC trotz Spaltung der Procaspase-9 durch eine fehlende Aktivität der Caspase-9 gekennzeichnet war. Trotz dieser fehlenden Caspase-9-Aktivität wurden eine Spaltung und Aktivität der Effektor-Caspase-3 nachgewiesen. Das läßt darauf schließen, dass der relativen Resistenz von MSC andere Mechanismen zugrunde liegen. Schädigungen der DNA resultieren in einer Aktivierung von p53, welches sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine reguliert und zu Veränderungen

der Zellzyklusregulation führen kann. Es sollte daher untersucht werden, ob p53 nach Zytostatikaexposition eine Rolle in MSC spielte.

4.3 Untersuchung der Rolle der Zellzyklusregulation für die Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung

4.3.1 Expression von p53 nach genotoxischer Schädigung

Daraufhin wurde die Expression von p53 in MSC unmittelbar nach Behandlung mit Cisplatin untersucht. Um Rückschlüsse auf eine mögliche antiapoptotische Regulation durch p53 zu ermöglichen, wurden MSC für 24 h mit Cisplatin in Apoptose-induzierender Konzentration ($IC_{90_{MSC}}$, 20 μM) sowie in für MSC subapoptotischer Konzentration ($IC_{90_{TGCT}}$, 3 μM) behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate der adhärennten und flotierenden Zellen mittels Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle diente die TGCT-Zelllinie H12.1 nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$. Sowohl in MSC-UKM als auch in MSC-VKM wurde eine erhöhte Expression von p53 nach Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ beobachtet (Abb. 4-11A). Diese erhöhte p53-Expression war in adhärennten und flotierenden Zellen zu beobachten. Bemerkenswert war, dass auch die Behandlung mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$, einer für MSC subapoptotischen Konzentration, in MSC-UKM und MSC-VKM zu einer erhöhten p53-Expression führte.

In allen bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Analysen ergaben sich keine Unterschiede zwischen MSC-UKM und MSC-VKM. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Untersuchungen entweder mit MSC-UKM oder mit MSC-VKM durchgeführt.

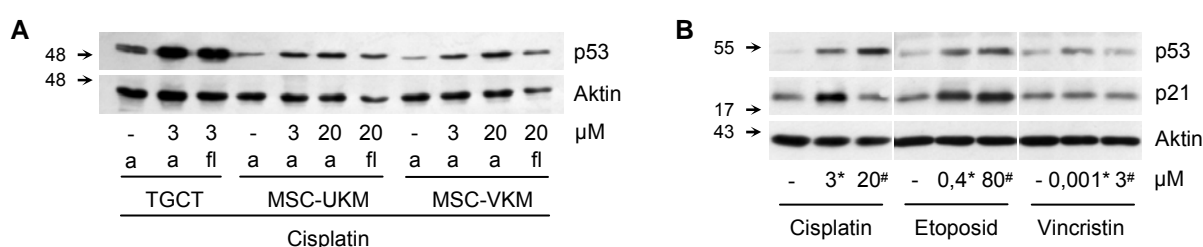


Abb. 4-11: p53-Expression in MSC nach genotoxischer Schädigung. Western Blot-Analyse, Aktin diente als Ladekontrolle, die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. **(A)** Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{MSC}}$ sowie der $IC_{90_{TGCT}}$; Behandlung von H12.1-Zellen mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$; a - adhärennte Zellen, fl - flotierende Zellen. **(B)** Behandlung von MSC mit Cisplatin, Etoposid bzw. Vincristin in den jeweiligen $IC_{90_{MSC}}$ (#) sowie den jeweiligen $IC_{90_{TGCT}}$ (*); Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Als nächstes wurde die p53-Expression in MSC nach Behandlung mit Etoposid und Vincristin untersucht. MSC wurden jeweils 24 h mit der $IC_{90_{MSC}}$ von Etoposid (80 μM als Mittel der Werte für MSC-UKM und MSC-VKM) und mit Vincristin (3 μM als höchste eingesetzte Konzentration in den Zytotoxizitätstests) behandelt. Im Vergleich dazu wurden MSC mit den IC_{90} der sensitiven TGCT-Zelllinie 2102EP von Etoposid (0,4 μM) und Vincristin (0,001 μM)

behandelt (siehe Tab. 4-2). Für Etoposid spiegelte diese Konzentration einen klinisch relevanten Plasmaspiegel der Substanz wider (Braybrooke *et al.* 2003). Es wurden nur die Lysate adhärenter Zellen mittels Western Blot untersucht (Abb. 4-11B). Die Behandlung von MSC mit Etoposid in beiden Konzentrationen führte zu einer vermehrten Expression von p53 gegenüber unbehandelten MSC. Nach Behandlung von MSC mit Vincristin in der $IC90_{TGCT}$ war gegenüber unbehandelten Zellen eine leicht erhöhte p53-Expression zu beobachten, während die Behandlung mit der $IC90_{MSC}$ zu keiner veränderten Expression von p53 führte. Die Analyse der p21-Expression ergab eine erhöhte Menge an p21 nach Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC90_{TGCT}$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine erhöhte Expression von p21 gegenüber unbehandelten Zellen wurde auch nach Behandlung von MSC mit Etoposid in der $IC90_{TGCT}$ und der $IC90_{MSC}$ beobachtet. Die Behandlung von MSC mit Vincristin zeigte keinen Einfluss auf die Expression von p21 (Abb. 4-11B). Für Cisplatin wurde bereits gezeigt, dass es sich bei der $IC90_{TGCT}$ um eine für MSC subapoptotische Konzentration handelte (siehe 4.2.3). Da nach Behandlung von MSC mit Etoposid in der $IC90_{TGCT}$ keine flotierenden Zellen entstanden, wurde davon ausgegangen, dass es sich um eine für MSC subapoptotische Konzentration handelte.

Die generierten Daten zeigen, dass die Exposition von MSC mit Cisplatin und Etoposid in subapoptotischen Konzentrationen sowohl die p53-Expression als auch die Expression von p21 induzierte. Die Expression von p21 als *Downstream*-Signal von p53 ließ darauf schließen, dass MSC funktionelles p53 exprimierten. Es wurde auch gezeigt, dass die p53-Expression unabhängig von Apoptoseinduktion erfolgte. Da p53 sowohl an der Induktion von Apoptose als auch via p21 an der Zellzyklusregulation beteiligt ist, wurde postuliert, dass die gesteigerte Expression von p53 und p21 in MSC nach subapoptotischer genotoxischer Schädigung in Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation stand.

4.3.2 Zellzyklusverhalten von MSC nach genotoxischer Schädigung

Die Zellzyklusanalysen in MSC erfolgten unmittelbar nach deren Behandlung mit Cisplatin, Etoposid und Vincristin. Abb. 4-12 zeigt, dass die Behandlung von MSC mit den $IC90_{MSC}$ aller drei Zytostatika (Cisplatin: 20 μ M; Etoposid: 80 μ M; Vincristin: 3 μ M) verglichen mit unbehandelten Kontrollen zu keiner Akkumulation von Zellen in einer der Zellzyklusphasen führte. Es wurde lediglich ein Anstieg der SubG1-Fraktion beobachtet, der vor allem nach Behandlung mit Vincristin auffällig war. Die SubG1-Fraktion beinhaltet Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt und repräsentiert apoptotische Zellen (Darzynkiewicz *et al.* 1992). Damit wurde bestätigt, dass die $IC90_{MSC}$ aller drei Zytostatika eine Apoptose-induzierende Konzentration repräsentierte.

Die Behandlung von MSC mit Vincristin in der $IC90_{TGCT}$ (0,001 μ M) resultierte in keiner Veränderung der Verteilung der Zellzyklusphasen verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Die Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ ($3 \mu M$) führte zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase. Der S-Phasenanteil stieg von $12,9 \% \pm 1,9 \%$ in den unbehandelten Kontrollen auf $51,4 \% \pm 9,6 \%$ in den behandelten Zellen. Die Behandlung von MSC mit Etoposid in der $IC_{90_{TGCT}}$ ($0,4 \mu M$) führte zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase. Der G2/M-Phasenanteil stieg von $15,2 \% \pm 2,9 \%$ in den unbehandelten Kontrollen auf $48,5 \% \pm 10,8 \%$ in den behandelten Zellen (Abb. 4-12).

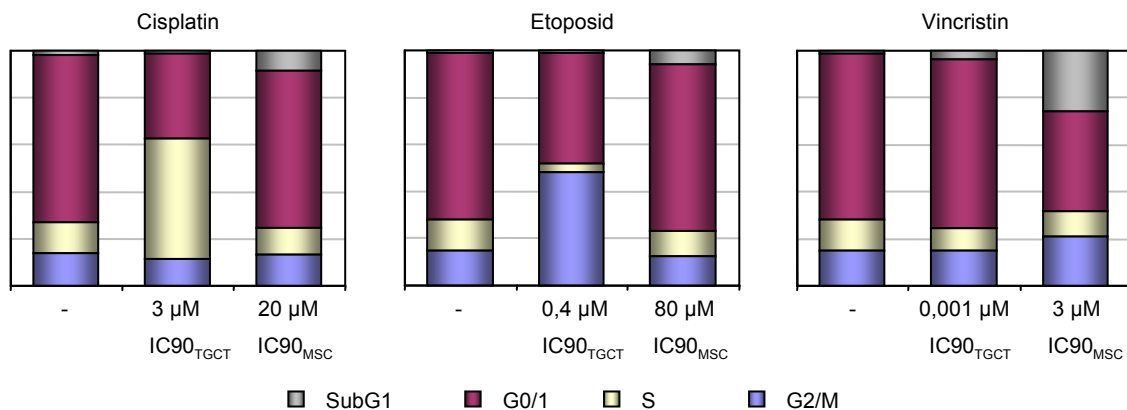


Abb. 4-12: Zellzyklusverteilung in MSC nach genotoxischer Schädigung. Zellzyklusanalyse nach 24 h-Behandlung mit den $IC_{90_{MSC}}$ sowie den $IC_{90_{TGCT}}$; Verteilung der Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen bezogen auf 100 %; MW (jeweils $n \geq 3$).

Somit wurde gezeigt, dass MSC in der Lage waren, nach Behandlung mit Cisplatin und Etoposid in für MSC subapoptotischen Konzentrationen ($IC_{90_{TGCT}}$), welche jedoch in sensitiven TGCT-Zellen zur Apoptoseinduktion führten, einen Zellzyklusarrest zu vollziehen. Diese Arretierung wurde nicht nach Behandlung mit in MSC Apoptose-induzierenden Konzentrationen ($IC_{90_{MSC}}$) dieser Zytostatika beobachtet. Die Behandlung mit Vincristin hatte keinen Einfluss auf die Zellzyklusregulation.

Es wurde beobachtet, dass MSC nach Induktion eines Zellzyklusarrestes durch Behandlung mit $3 \mu M$ Cisplatin bzw. $0,4 \mu M$ Etoposid nach einer Proliferationspause erneut zu proliferieren begannen. Demnach musste es sich um einen temporären Zellzyklusarrest handeln. Es ergab sich die Fragestellung, ob MSC nach temporärem Zellzyklusarrest die MSC-definierenden Eigenschaften beibehalten oder ob der temporäre Zellzyklusarrest mit dem Verlust dieser Charakteristika einhergeht. Hierfür sollten die Zellen nach Induktion eines Zellzyklusarrestes hinsichtlich der MSC-definierenden Eigenschaften untersucht werden. Es wurde zunächst der Zeitpunkt, an dem die Zellen aufgrund erneuter Proliferation eine Konfluenz von etwa 60 % erreicht hatten und passagiert werden mussten, als Tag der Rekonstitution [d(R)] definiert. Es zeigte sich, dass eine Rekonstitution nach 24 h-Behandlung mit $3 \mu M$ Cisplatin erst nach 21 - 28 d und nach 24 h-Behandlung mit $0,4 \mu M$ Etoposid bereits nach 3 d erreicht war. Diese Zeiträume waren jedoch für die geplanten

Untersuchungen nicht praktikabel. In Vorversuchen wurden daraufhin Konzentrationen bestimmt (Cisplatin: 2 μM , Etoposid: 0,75 μM), die an den Plasmaspiegeln beider Zytostatika orientiert waren (Braybrooke *et al.* 2003) und in MSC einen Zellzyklusarrest induzierten sowie eine Rekonstitution des Wachstums nach etwa 14 d ermöglichten.

Zunächst wurde die Kinetik des induzierten Zellzyklusarrestes in Vorversuchen untersucht. Der Zeitpunkt des Behandlungsbeginns wurde jeweils als Tag 0 definiert. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abb. 8-3 im Anhang dargestellt. Die Behandlung von MSC mit 2 μM Cisplatin resultierte unmittelbar nach Ende der Behandlung (Tag 1) in einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase. Nach weiteren 24 h (Tag 2) wurde eine Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase beobachtet, welche 48 h nach Behandlungsende (Tag 3) am deutlichsten ausgeprägt war. Die Behandlung von MSC mit 0,75 μM Etoposid resultierte an Tag 1 in einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase, die bereits an Tag 3 weniger ausgeprägt war. An d(R) zeigten die Zellpopulationen jeweils die ursprüngliche Verteilung der Zellzyklusphasen. Es handelte sich somit um einen temporären Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase an Tag 3 nach Behandlung mit Cisplatin bzw. an Tag 1 nach Behandlung mit Etoposid.

Für die weiteren Zellzyklusanalysen wurden daraufhin Tag 1, Tag 3 und d(R) als Analysezeitpunkte festgelegt. Die Analyse der unbehandelten Kontrolle erfolgte an Tag 1.

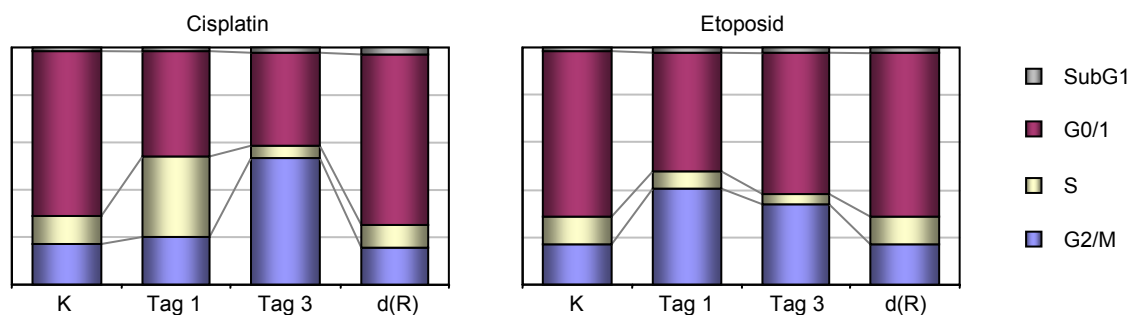


Abb. 4-13: Zeitlicher Verlauf der Zellzyklusverteilung in MSC nach subapoptotischer genotoxischer Schädigung. Verteilung der Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen bezogen auf 100 %, dargestellt sind die MW. K - unbehandelte Kontrolle. MW, Stabw und n siehe Tab. 4-3.

In Abb. 4-13 sind die Mittelwerte aller durchgeführten Zellzyklusanalysen nach 24 h-Behandlung von MSC mit 2 μM Cisplatin bzw. 0,75 μM Etoposid zu den entsprechenden Analysezeitpunkten dargestellt. Die jeweiligen Werte sind in Tab. 4-3 aufgeführt. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erreichte die Veränderung der Verteilung der Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt des Arrestes (Tag 3 für Cisplatin, Tag 1 für Etoposid) statistische Signifikanz (für Cisplatin $p = 0,002$, für Etoposid $p \leq 0,002$). Die Rekonstitution des Wachstums erfolgte im Durchschnitt nach 15,7 d für Cisplatin bzw. nach 13,3 d für Etoposid und ging mit einer normalen Verteilung der Zellzyklusphasen einher. Auffällig war, dass nach Behandlung mit Cisplatin der Anteil der G0/1-Phase von Tag 1 bis Tag 3 trotz intermittierender S-Phasen-Akkumulation nahezu konstant blieb. Demnach schien es sich

zusätzlich zum Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase um eine Arretierung in der G0/1-Phase zu handeln.

Tab. 4-3: Verteilung der Zellzyklusphasen [%] in MSC nach 24 h-Behandlung mit 2 μ M Cisplatin bzw. 0,75 μ M Etoposid; MW (\pm Stabw)

	Tag	SubG1	G0/1	S	G2/M	n
Kontrolle	1	1,5 (\pm 1,2)	69,7 (\pm 7,0)	11,9 (\pm 3,5)	16,9 (\pm 4,9)	29
Cisplatin	1	1,4 (\pm 1,0)	44,7 (\pm 6,1)	34,0 (\pm 12,6)	20,0 (\pm 12,3)	4
Cisplatin	3	2,1 (\pm 1,8)	39,4 (\pm 11,3) [‡]	4,9 (\pm 3,2) [‡]	53,6 (\pm 12,3) [‡]	12
Cisplatin [d(R)]	15,7 (\pm 3,6)	3,0 (\pm 1,1)	71,8 (\pm 4,0)	9,4 (\pm 1,7)	15,7 (\pm 1,5)	6
Etoposid	1	2,4 (\pm 1,6)	49,9 (\pm 4,4) [‡]	7,4(\pm 3,9) [†]	40,3 (\pm 3,3) [‡]	9
Etoposid	3	1,9 (\pm 0,5)	59,9 (\pm 5,3)	4,3 (\pm 1,4)	33,8 (\pm 5,7)	6
Etoposid [d(R)]	13,3 (\pm 5,6)	2,6 (\pm 1,0)	68,9 (\pm 5,2)	11,6 (\pm 5,7)	16,9 (\pm 2,7)	6

[‡] p < 0,0001 vs. Kontrolle; [†] p = 0,002 vs. Kontrolle

Somit wurde gezeigt, dass MSC nach subapoptotischer genotoxischer Schädigung mit Cisplatin bzw. Etoposid einen temporären Zellzyklusarrest vollzogen. Zur Klärung der Fragestellung, ob MSC nach temporärem Zellzyklusarrest die definierenden Charakteristika beibehalten, wurden die Zellen nach Induktion eines Zellzyklusarrestes hinsichtlich der MSC-definierenden Eigenschaften untersucht.

4.3.3 Charakteristika von MSC nach Schädigungs-assoziiertem, temporärem Zellzyklusarrest

Es konnte bereits im Rahmen des *In-vitro*-Modells der Resistenz (siehe 4.2.1) gezeigt werden, dass MSC nach Zytostatikaexposition in subapoptotischen Konzentrationen ihre MSC-definierenden Eigenschaften beibehielten. Das Behandlungsschema des *In-vitro*-Modells der Resistenz, wiederholte Behandlung für 2 h alle 24 h, wich jedoch von dem zur Induktion eines Zellzyklusarrestes verwendeten Modell - einmalige Behandlung für 24 h - ab. Aus diesem Grund wurden MSC nach Induktion eines temporären Zellzyklusarrestes durch Behandlung mit Cisplatin bzw. Etoposid und anschließender Rekonstitution der Proliferation hinsichtlich ihrer MSC-definierenden Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden Wachstums-kinetiken vom Zeitpunkt des Setzens der Zellen vor Behandlungsbeginn durchgeführt, wobei Tag 0 den Behandlungsbeginn bezeichnet. Ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 4-14 dargestellt. Sowohl nach Cisplatin- als auch nach Etoposidexposition wurde vorübergehend eine reduzierte Proliferation beobachtet. Für die PDT im Zeitraum von Tag 0 bis Tag 7

ergaben sich für das dargestellte Experiment (Abb. 4-14) folgende Werte: für die unbehandelte Kontrolle 2,0 d, nach Behandlung mit Cisplatin 31,5 d und nach Behandlung mit Etoposid 4,9 d. Nach Rekonstitution wurde eine nahezu identische Proliferationsrate von Kontrolle und behandelten Zellen beobachtet. Das äußerte sich einerseits in den fast parallelen Kurvenverläufen und andererseits in den PDT. Die PDT betragen von Tag 13 bis Tag 19 für die Kontrollzellen 1,5 d, für Cisplatin-behandelte Zellen 1,7 d und für Etoposid-behandelte Zellen 1,6 d (Abb. 4-14).

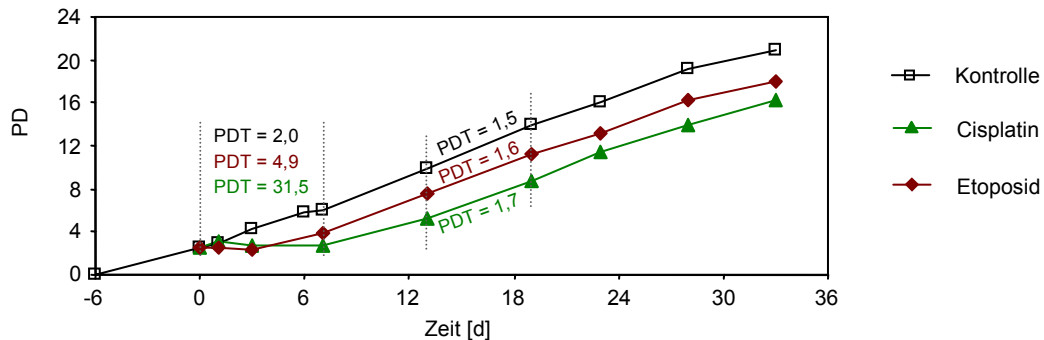


Abb. 4-14: Proliferation von MSC nach Zellzyklusarrest durch genotoxische Schädigung. Wachstumskinetik; Start der jeweiligen Behandlung zum Zeitpunkt Tag 0; für die markierten Abschnitte sind die jeweiligen PDT [d] angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 6 unabhängigen Versuchen (weitere Beispiele siehe Abb. 8-4 im Anhang).

MSC besaßen nach Rekonstitution der Proliferation nach Cisplatin- bzw. Etoposid-induziertem temporärem Zellzyklusarrest eine unveränderte Expression von Oberflächenantigenen (Abb. 8-5A im Anhang). Des Weiteren zeigten diese Zellen nach adipogener bzw. osteogener Differenzierungsinduktion die entsprechenden morphologischen Anzeichen einer Differenzierung (Abb. 8-5B im Anhang). Somit wurde nachgewiesen, dass MSC nach temporärem Zellzyklusarrest die MSC-definierenden Eigenschaften beibehielten. Die Fähigkeit einen temporären Zellzyklusarrest zu vollziehen, könnte somit zur Resistenz von MSC gegenüber genotoxischen Schädigungen beitragen. Da der Zellzyklusarrest in MSC mit einer erhöhten p53- und p21-Expression assoziiert war, sollte überprüft werden, ob es sich bei dem temporären Zellzyklusarrest um einen p53-abhängigen Mechanismus handelt.

4.3.4 Ausgewählte Mechanismen der Zellzyklusregulation in MSC nach genotoxischer Schädigung

Hierfür wurde die Expression ausgewählter p53-regulierter, für die Zellzyklusregulation relevanter Proteinen im Verlauf des temporären Zellzyklusarrestes in MSC untersucht (Abb. 4-15). Eine erhöhte Expression von p53 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde sowohl nach Behandlung mit 2 μ M Cisplatin als auch nach Behandlung mit 0,75 μ M Etoposid an Tag 1 sowie an Tag 3 detektiert. Die Expression von p21 nahm nach

Behandlung mit Cisplatin an Tag 3, d. h. zum Zeitpunkt des ausgeprägten Zellzyklusarrestes zu, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach Behandlung mit Etoposid war die p21-Expression bereits an Tag 1, dem Zeitpunkt des ausgeprägten Zellzyklusarrest erhöht. Sowohl für p53 als auch für p21 wurde jeweils nach Rekonstitution der Proliferation eine Abnahme die Expression etwa auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abb. 4-15). Weiterhin wurde die Expression von Cyclin B und Cdk1 als Beispiel p53-regulierter Proteine der Zellzyklusregulation untersucht. Die Expression von Cyclin B sowie Cdk1 war nach Behandlung von MSC sowohl mit Cisplatin als auch mit Etoposid zum Zeitpunkt des Zellzyklusarrestes reduziert, was auf eine Repression der Promotoren dieser Proteine durch p53 zurückgeführt werden kann. Nach Rekonstitution der Proliferation nahm die Expression beider Proteine zu (Abb. 4-15).

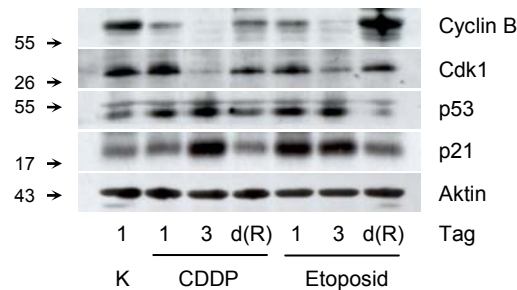


Abb. 4-15: Expression ausgewählter Zellzyklus-regulierender Proteine im Verlauf des temporären Zellzyklusarrestes in MSC. 24 h-Behandlung von MSC mit 2 μ M Cisplatin bzw. 0,75 μ M Etoposid, Behandlungsbeginn an Tag 0; Aktin diente als Ladekontrolle, die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. K - unbehandelte Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 4 unabhängigen Versuchen.

Damit unterstützten diese Beobachtungen die Annahme, dass der in MSC induzierte temporäre Zellzyklusarrest als Reaktion auf eine subapoptotische genotoxische Schädigung p53-vermittelt war.

4.4 Analyse der Tumorintegration von MSC und ihres Einflusses auf das Tumorwachstum am Beispiel subkutaner CRC-Xenografte

4.4.1 Tumorintegration von MSC

Als vierte formulierte Hauptzielstellung sollte im Weiteren untersucht werden, ob MSC nach systemischer Transplantation im gewählten Modell des CRC eine Tumorintegration zeigen. Diese Untersuchung erfolgte anhand subkutaner CRC-Xenografte im Nacktmausmodell. Eine Voraussetzung hierfür war eine Möglichkeit der Identifizierung tumorintegrierter MSC in Tumorgewebeschnitten. Aus diesem Grund wurden zunächst mittels lentiviraler Transduktion *GFP*-exprimierende MSC generiert. 48 h nach Transduktion zeigten 90 - 95 % der MSC die Expression von GFP (Abb. 8-6A im Anhang). *GFP*-MSC zeigten unverändert die Expression der charakteristischen Oberflächenantigene sowie die entsprechenden morphologischen

Zeichen einer Differenzierung nach adipogener bzw. osteogener Differenzierungsinduktion (Abb. 8-6B-D im Anhang). Demnach behielten *GFP*-MSC nach Transduktion die MSC-definierenden Eigenschaften bei und wurden für weitere Versuche verwendet.

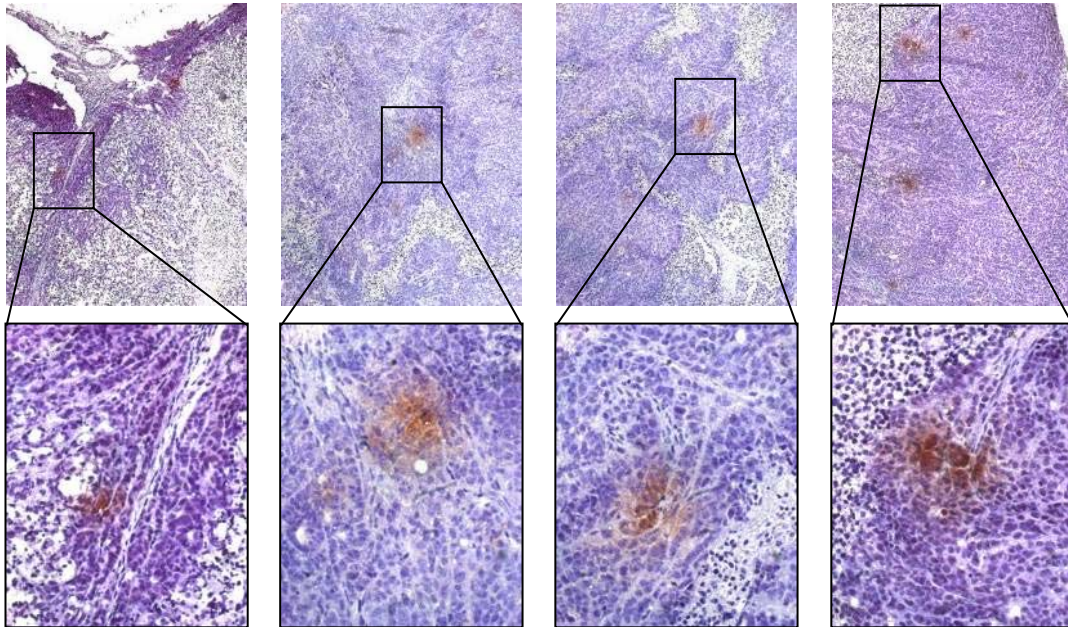


Abb. 4-16: Präsenz systemisch applizierter *GFP*-MSC in subkutanen DLD1-Xenograften. Immunhistochemische Färbung mit anti-GFP; Nachweis der Immunkomplexe mit DAB (braune Färbung); Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin. Lichtmikroskopie, Vergrößerung 100-fach, Bildausschnitte 400-fach.

GFP-MSC wurden Tieren mit subkutanen Xenograften der CRC-Zelllinie DLD1 wiederholt i. v. transplantiert. Tumorpräparate wurden anschließend mittels immunhistochemischer Färbung auf das Vorhandensein GFP-positiver Zellen untersucht. Abb. 4-16 zeigt, dass *GFP*-MSC vorrangig in der Nähe stromaler Septen detektiert wurden.

Es wurde somit gezeigt, dass MSC nach systemischer Transplantation in etablierte subkutane DLD1-Xenografte einwanderten. Diese Integration war jedoch gering. Die Lokalisation der GFP-positiven Zellen ließ auf eine Beteiligung der transplantierten MSC am Tumorstroma schließen. In der Literatur wurde der Einfluss von tumorintegrierten MSC auf das Tumorwachstum bislang kontrovers beschrieben; speziell für das CRC lagen zu diesem Zeitpunkt keine Daten vor. Es sollte daher ein möglicher Effekt tumorintegrierter MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften untersucht werden.

4.4.2 Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Tumorwachstum

Aus der Literatur geht hervor, dass ein Anteil tumorintegrierter MSC am Tumor von bis zu 20 % realistisch ist (Direkze *et al.* 2004). Anhand der erhobenen Daten zur Integration systemisch applizierter MSC in subkutane Xenografte ist fraglich, ob dieser Anteil erreicht werden kann. Die Untersuchungen erfolgten daher im Mischxenograftmodell.

Es wurden Xenografte von lentiviral DsRed-markierten DLD1-Zellen gemischt mit MSC in den folgenden Verhältnissen generiert: 4:1 (20 % MSC), 9:1 (10 % MSC), 33:1 (3 % MSC) und 99:1 (1 % MSC). Als Negativkontrollen dienten Xenografte ohne MSC. Die Tumorgößen wurden durch *In-vivo*-Imaging der DsRed-Fluoreszenzintensität bestimmt (Abb. 4-17). Zum Ende des Versuches (Tag 17) waren deutlich differenzielle Tumorgößen zu beobachten. Im Vergleich zu den Negativkontrollen waren Mischxenografte mit 20 % MSC 2,5-mal größer ($p = 0,085$), Mischxenografte mit 10 % MSC 1,9-mal größer und Mischxenografte mit 3 % MSC 1,4-mal größer. Eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Ein Anteil von 1 % MSC zeigte keinen Effekt auf das Tumorstadium von DLD1-Xenograften (Abb 4-17).

Diese Daten ließen vermuten, dass tumorintegrierte MSC das Wachstum von DLD1-Xenograften fördern. Diese unterstützende Wirkung war abhängig von der Menge der tumorintegrierten MSC. Diese Daten dienten als Basis für weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe außerhalb der vorliegenden Arbeit. Die Methode des *In-vivo*-Imaging erwies sich als geeignete Methode für die Untersuchung des Wachstums subkutaner Xenografte Fluoreszenzprotein-transgener Derivate von Tumorzelllinien für die geplanten Untersuchungen bezüglich der Nutzung von MSC als Vehikel einer Tumorthherapie.

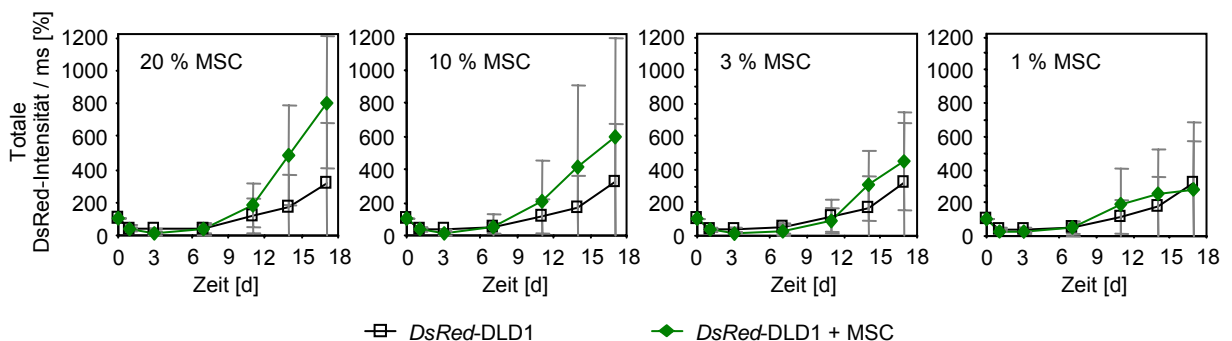


Abb. 4-17: Wachstum von CRC-Xenograften in Abhängigkeit von der Menge tumorintegrierter MSC. *In-vivo*-Imaging von MSC/*DsRed*-DLD1-Mischxenograften mit unterschiedlichen Anteilen MSC und Quantifizierung der *DsRed*-Fluoreszenzintensitäten, MW \pm Stabw (20 % MSC n = 9; 10 % MSC n = 6; 3 % MSC n = 6; 1 % MSC n = 3; Keine MSC n = 4).

In Bestätigung der Arbeiten anderer Autoren wurde am Modell von subkutanen CRC-Xenograften gezeigt, dass MSC nach systemischer Transplantation in maligne Tumoren einwanderten. MSC könnten somit potentielle Vehikel antineoplastischer Faktoren für eine Tumorthherapie sein. Das Modell des CRC war ein geeignetes Modell für die Untersuchung dieses Potentials von MSC.

4.5 Untersuchung transgener MSC als Vehikel einer Tumortherapie am Beispiel von *TRAIL*-MSC im CRC-Modell

4.5.1 Sensitivität unterschiedlicher CRC-Zelllinien für sTRAIL

Aufgrund seiner Charakteristika und seiner Wirkung beim CRC wurde TRAIL als Faktor mit Anti-Tumor-Aktivität zur transgenen Expression in MSC ausgewählt. Zunächst sollte das Potential von TRAIL zur Behandlung des CRC *in vitro* bestätigt werden. Hierfür wurde ein Panel von 9 CRC-Zelllinien für 24 h mit 100 ng/ml sTRAIL behandelt. Für die Zelllinien Colo205, SW48, HCT116, HCT15 und DLD1 wurde nach der Behandlung mit sTRAIL (sTRAIL-24 h), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle-24 h) und der Kontrolle zu Beginn der Behandlung (Kontrolle-0 h), eine Reduktion der Zellzahl festgestellt (Abb. 4-18). Aufgrund dieser Reduktion gegenüber der ursprünglich eingesetzten Zellzahl wurden diese 5 Zelllinien als sensitiv gegenüber der Behandlung mit sTRAIL eingestuft. Die Zelllinien SW480, HCT8, HT29 und Colo320DM zeigten im Vergleich zur Kontrolle-0 h eine Zunahme der Zellzahl während der Behandlung mit sTRAIL, was auf eine Proliferation unter sTRAIL hindeutete. Sie wurden deshalb als sTRAIL-resistent eingestuft. In geringem Maße wurden auch die sTRAIL-resistenten CRC-Zelllinien in ihrem Wachstum eingeschränkt, was sich im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Kontrolle-24 h) in einer reduzierten Zellzahl äußerte (Abb. 4-18).

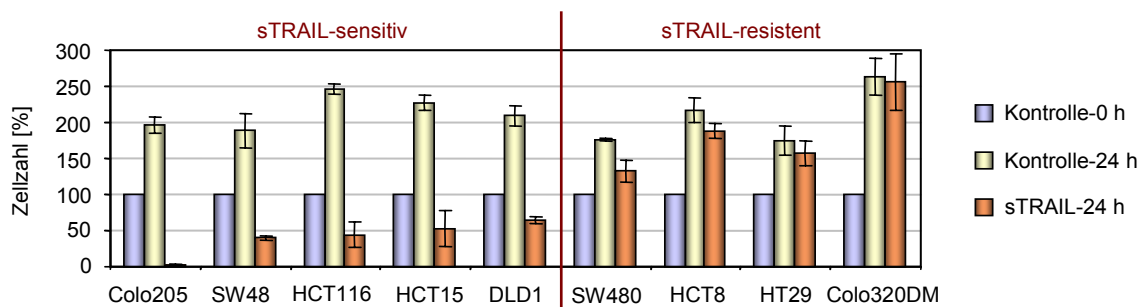


Abb. 4-18: Sensitivität von 9 CRC-Zelllinien gegenüber sTRAIL. Die Zellzahlen nach Behandlung mit sTRAIL (sTRAIL-24 h) sowie der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle-24 h) wurden in Bezug auf die Zellzahl zu Beginn der Behandlung (Kontrolle-0 h) dargestellt; MW \pm Stabw (n = 2).

Somit wurde eine differenzielle sTRAIL-Sensitivität im verwendeten Panel von CRC-Zelllinien gezeigt. Das war eine Bestätigung dafür, dass TRAIL ein vielversprechender Faktor mit Anti-Tumor-Aktivität für eine Behandlung des CRC war.

4.5.2 Generierung lentiviral *TRAIL*-exprimierender MSC und deren Charakteristika

Eine Voraussetzung für den Einsatz *TRAIL*-transgener MSC für eine Behandlung des CRC war die Resistenz von MSC gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Die Behandlung von MSC mit 100 ng/ml sTRAIL für 24 h führte weder zur Entstehung flotierender Zellen noch

zeigte sich eine reduzierte Proliferation der behandelten Zellen (sTRAIL-24 h) im Vergleich zu unbehandelten MSC (Kontrolle-24 h) (Abb. 8-7A, B im Anhang). Demnach waren MSC sTRAIL-resistent und somit geeignete Zielzellen für die transgene Expression von TRAIL.

TRAIL-exprimierende MSC wurden durch lentivirale Transduktion mit dem *TRAIL*-kodierenden lentiviralen Vektor FUTW (Abb. 4-19A) generiert. Vier Passagen nach Transduktion von MSC mit *TRAIL* waren in der immunzytochemischen Färbung zwischen 80 % und 90 % der Zellen positiv für TRAIL. TRAIL wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 4-19B), die beide gegen eine extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL gerichtet waren. In WT-MSC wurde mittels immunzytochemischer Färbung kein TRAIL detektiert (Abb. 4-19B). Im Western Blot zeigten *TRAIL*-MSC eine stabile TRAIL-Expression über bis zu 9 Passagen, wobei die Expression in *TRAIL*-MSC der Passage 9 geringer war als in Zellen der Passage 2. WT-MSC zeigten im Western Blot keine Expression von TRAIL (Abb. 4-19C). Das transgen exprimierte TRAIL wurde als Protein von etwa 34 kDa detektiert. Ein Molekulargewicht von 33 - 34 kDa wird für membranständiges TRAIL angegeben (Mariani *et al.* 1998). Diese Ergebnisse des Western Blot und der Immunzytochemie lassen darauf schließen, dass in *TRAIL*-MSC TRAIL transmembranär exprimiert wurde.

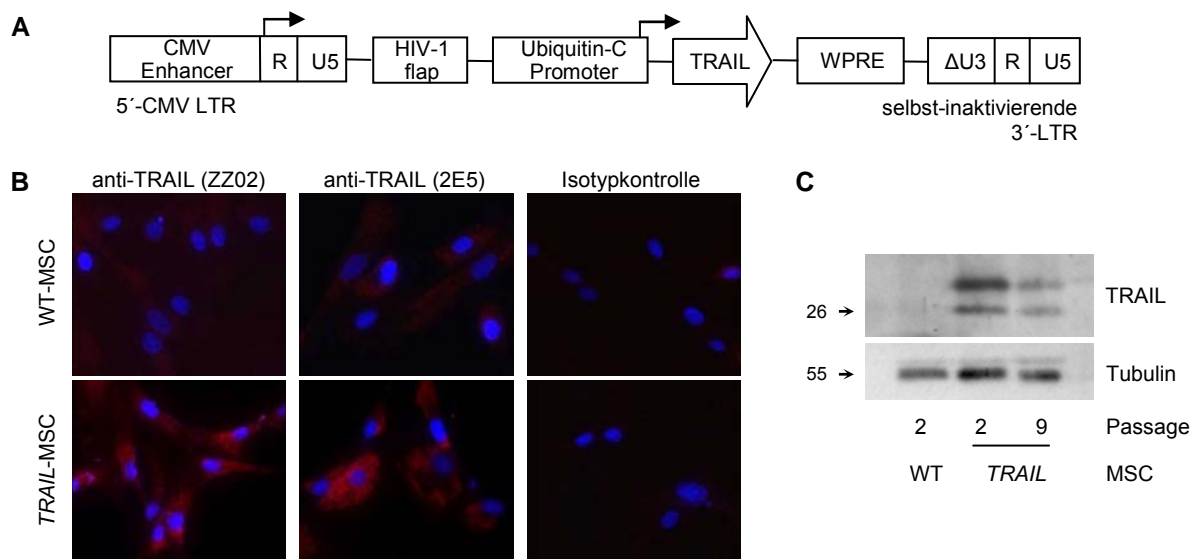


Abb. 4-19: Transgene Expression von TRAIL in MSC nach lentiviraler Transduktion. **(A)** Lentivirales Konstrukt, abgebildet sind die wesentlichen Bestandteile der Expressionskassette des pFUTW. **(B)** Immunzytochemische Färbung mit den angegebenen Antikörpern; Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 600-fach. **(C)** Western Blot-Analyse von *TRAIL*-MSC verschiedener Passagen; Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Während der Kultivierung und Expansion von *TRAIL*-MSC entstanden keine flotierenden Zellen. Kultivierte *TRAIL*-MSC wurden nach mehreren Passagen mit Annexin V gefärbt. Verglichen mit WT-MSC derselben Passage wurde keine vermehrte Färbung mit Annexin V

beobachtet (Abb. 8-7C im Anhang). Demnach wurde keine Apoptose durch transgenes TRAIL in *TRAIL*-MSC induziert.

Somit wurde gezeigt, dass MSC nach lentiviraler Transduktion mit einem *TRAIL*-codierenden Vektor TRAIL stabil exprimierten. Transduzierte MSC zeigten keine Anzeichen von Apoptoseinduktion. Für die weiteren Arbeiten war es erforderlich nachzuweisen, dass MSC nach Transduktion die MSC-definierenden Charakteristika beibehielten.

TRAIL-MSC wurden daher bezüglich der MSC-definierenden Eigenschaften analysiert. Sie zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse das folgende Expressionsmuster: CD14⁻, CD19⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻ und CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺ (Abb. 4-20A). Nach adipogener und osteogener Differenzierungsinduktion zeigten *TRAIL*-MSC in der zytochemischen Färbung mit Öl Rot bzw. Alizarin S die morphologischen Zeichen einer Differenzierung (Abb. 4-20B). *TRAIL*-MSC besaßen somit im Vergleich zu WT-MSC eine unveränderte Oberflächenantigenexpression sowie ein unverändertes Differenzierungspotential (siehe Abb. 4-3 und 4-4).

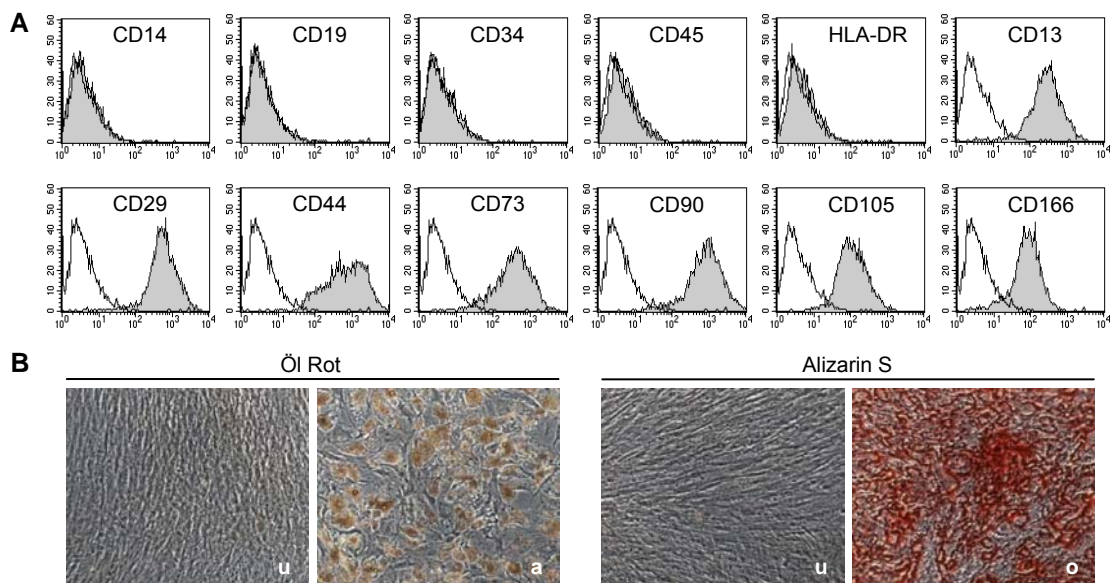


Abb. 4-20: Immunphänotyp und *In-vitro*-Differenzierung von *TRAIL*-MSC (**A**) Durchflusszytometrische Analyse; Dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und spezifischem FITC- oder PE-konjugiertem Antikörper (grau). (**B**) Kultivierung in Wachstumsmedium (u), adipogenem (a) und osteogenem (o) Differenzierungsmedium; Färbung mit Öl Rot bzw. Alizarin S; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 5 unabhängigen Versuchen.

Zum Ausschluss einer malignen Transformation durch in das Genom integrierte virale Sequenzen wurden Wachstumskinetiken und Soft-Agar-Assays durchgeführt. Mittels Soft-Agar-Assay wird die Fähigkeit von Zellen zur Proliferation ohne Adhäsion zu einer Unterlage untersucht, welche ein geeignetes *In-vitro*-Korrelat der Tumorgenität darstellt (Colburn *et al.* 1978; Freedman *et al.* 1974; Shin *et al.* 1975). Die Wachstumskinetiken wurden jeweils von *TRAIL*-MSC und WT-MSC derselben Präparation angefertigt. Es wurden keine Unterschiede im Proliferationsverhalten von *TRAIL*-MSC im Vergleich zu WT-MSC beobachtet (Abb.

4-21A). Im Soft-Agar-Assay bildeten *TRAIL*-MSC im Vergleich zu malignen CRC-Zellen keine Kolonien (Abb. 4-21B). Es wurde daher davon ausgegangen, dass keine maligne Transformation der transgenen MSC vorlag.

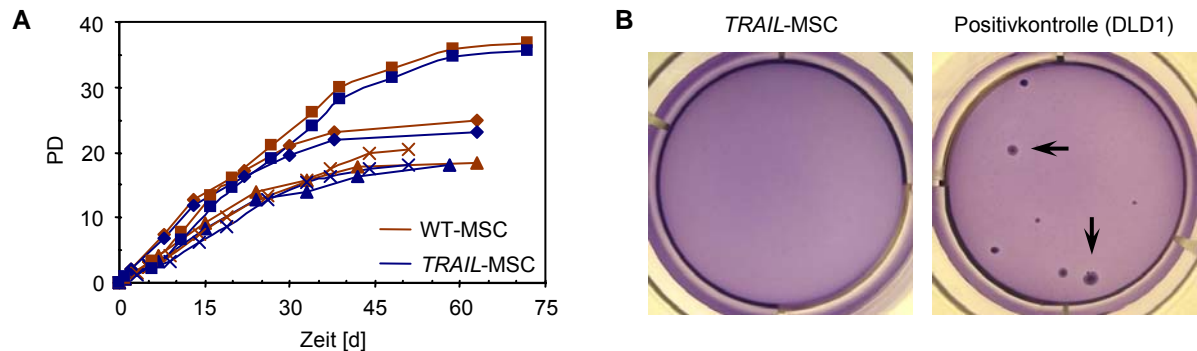


Abb. 4-21: Untersuchungen zum Ausschluss einer malignen Transformation von *TRAIL*-MSC. (A) Wachstumskinetiken von WT-MSC (braun) und *TRAIL*-MSC (blau) ausgewählter Präparationen; Tag 0 bezeichnet den Zeitpunkt der Transduktion. WT-MSC und *TRAIL*-MSC derselben Präparation sind jeweils durch gleiche Symbole gekennzeichnet. (B) Keine Kolonienbildung von *TRAIL*-MSC im Soft-Agar-Assay; DLD1-Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Pfeile markieren entstandene Kolonien. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 unabhängigen Versuchen.

Diese Versuche zeigten, dass *TRAIL*-MSC im Vergleich zu WT-MSC unverändert die MSC-definierenden Charakteristika besaßen. In *TRAIL*-MSC wurde keine Apoptose durch transgenes TRAIL induziert. Weder die lentivirale Transduktion noch die Expression von transgenem TRAIL resultierte in einer malignen Transformation der Zellen. Der nächste Schritt bestand darin, zu untersuchen, ob in MSC exprimiertes TRAIL seine biologische Aktivität beibehält.

4.5.3 Einfluss von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte sTRAIL-sensitive CRC-Zellen

Hierfür wurden *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen im Vergleich zu WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen etabliert. Bereits nach 24 h wurden flotierende Zellen in den *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen beobachtet, während in WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen keine flotierenden Zellen entstanden (Abb. 4-22). Die flotierenden Zellen zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie die Expression von *DsRed*, als Hinweis, dass es sich um DLD1-Zellen handelte. Wurde den *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen der TRAIL-neutralisierende Antikörper zugesetzt, entstanden keine flotierenden Zellen (Abb. 4-22). Deren Entstehung war somit auf die spezifische Aktivität von TRAIL zurückzuführen. Die Inkubation von DLD1-Zellen mit konditioniertem Medium von *TRAIL*-MSC resultierte nicht in der Entstehung flotierender Zellen. Das war ein Zeichen für die Notwendigkeit eines direkten Zell-Zell-Kontaktes von DLD1-Zellen und *TRAIL*-MSC für die Entstehung flotierender Zellen. Es gab somit keine Anzeichen dafür, dass *TRAIL*-MSC lösliches TRAIL sezernierten.

Vielmehr wurde die Vermutung bestätigt, dass das transgen exprimierte TRAIL transmembranär lokalisiert war.

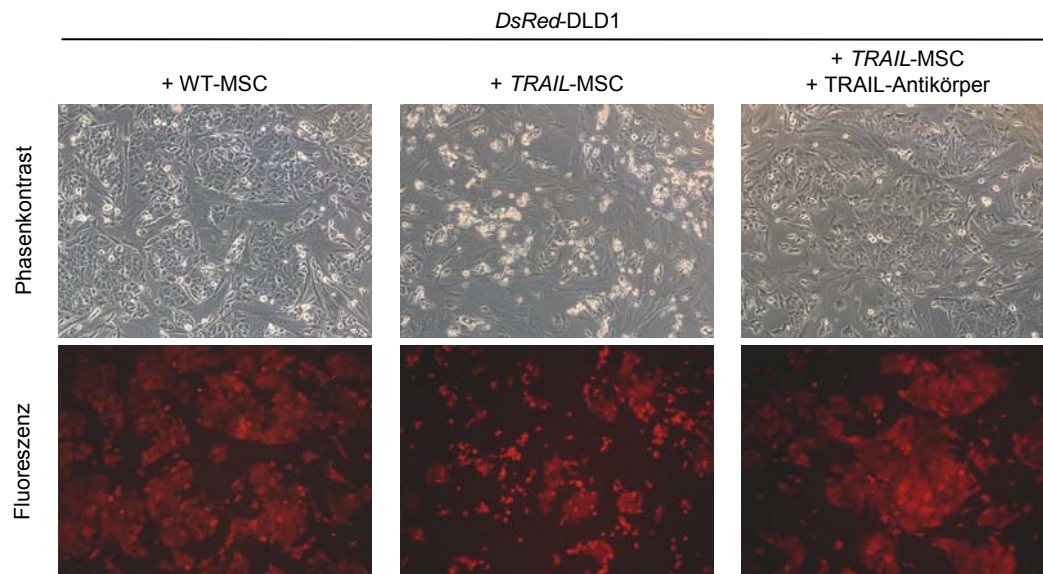


Abb. 4-22: Einfluss von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte DLD1-Zellen. WT-*MSC*/*DsRed*-DLD1-Kokultur und *TRAIL*-*MSC*/*DsRed*-DLD1-Kokultur mit und ohne Zusatz eines *TRAIL*-neutralisierenden Antikörpers. Phasenkontrast- und entsprechende Fluoreszenzaufnahmen nach 24 h, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 8 unabhängigen Versuchen.

Diese Beobachtungen führten zur Vermutung, dass die Entstehung flotierender DLD1-Zellen in Kokultur mit *TRAIL*-MSC auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen war. Dies wurde mittels Annexin V und Western Blot untersucht. Die flotierenden Zellen aus *TRAIL*-*MSC*/*DsRed*-DLD1-Kokulturen zeigten eine Färbung mit Annexin V (Abb. 4-23A). Mittels Western Blot (Abb. 4-23B) wurde in *TRAIL*-*MSC*/DLD1-Kokulturen eine Zunahme des für Apoptoseinduktion typischen PARP-Spaltfragments (85 kDa) sowie eine Abnahme des intakten PARP (116 kDa) detektiert. Des Weiteren wurde eine Spaltung der Caspase-8 sowie der Caspase-3 gezeigt, welche durch die Abnahme der Procaspase-8 (55 kDa) und Procaspase-3 (32 kDa) sowie die Zunahme der jeweils aktiven Spaltfragmente (Caspase-8: 41 kDa; Caspase-3: 17 kDa) gekennzeichnet war. Diese Spaltung von PARP sowie der Caspasen waren in den flotierenden Zellen besonders ausgeprägt (Abb. 4-23B). Die beobachtete Spaltung der Procaspase-8 belegte eine Apoptoseinduktion über den extrinsischen Signalweg. In WT-*MSC*/DLD1-Kokulturen wurde weder eine Spaltung von PARP noch der Procaspasen detektiert (Abb. 4-23B). Die Induktion von Apoptose in DLD1-Zellen erfolgte somit bei Kokultur mit *TRAIL*-MSC, nicht jedoch bei Kokultur mit WT-*MSC*. *TRAIL* wurde nur in den Gesamtlisaten von *TRAIL*-*MSC*/DLD1-Kokulturen nachgewiesen und insbesondere nicht in den flotierenden Zellen der *TRAIL*-*MSC*/DLD1-Kokulturen (Abb. 4-23B). Das war ein Hinweis darauf, dass einerseits in *TRAIL*-*MSC* keine Apoptose induziert wurde und andererseits in WT-*MSC* keine *TRAIL*-Expression durch kokultivierte CRC-Zellen induziert wurde.

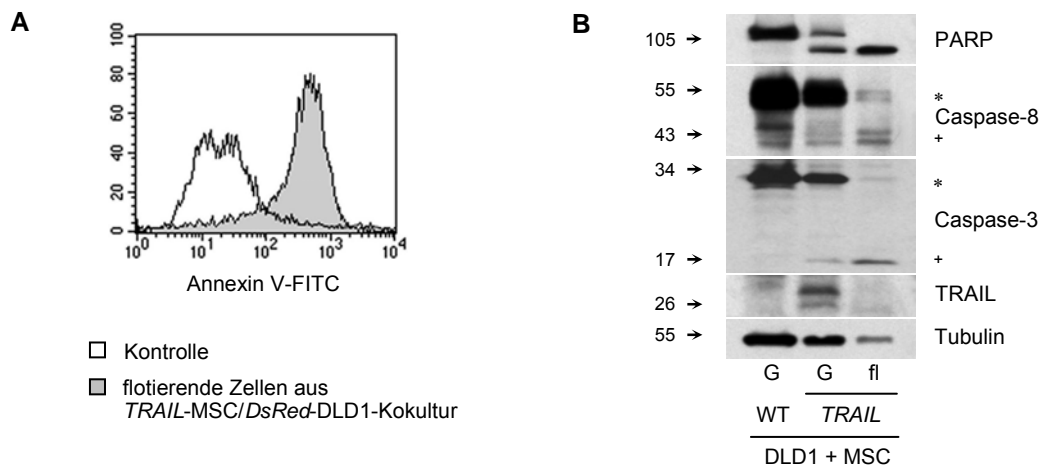


Abb. 4-23: Analyse von Apoptoseinduktion in MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen. **(A)** Färbung der flotierenden Zellen aus *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokultur nach 24 h mit Annexin V-FITC; als Kontrolle dienten separat kultivierte Annexin V-FITC-gefärbte *DsRed*-DLD1-Zellen. Kombinierte Fluoreszenzhistogramme. **(B)** Western Blot-Analyse; Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. G - Gesamtlisat; fl - flotierende Zellen; [*] - Procaspase; [+] - gesplante Fragmente; Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 4 unabhängigen Versuchen.

Das Wachstumsverhalten von DLD1-Zellen wurde im Weiteren vergleichend in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen und WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen über einen Zeitraum von 72 h analysiert. Die Quantifizierung des Anteils der DLD1-Zellen an der Gesamtzellzahl der adhärenen Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Expression von *DsRed* und CD105. Es wurde zuvor nachgewiesen, dass *DsRed*-DLD1-Zellen kein CD105 exprimierten (Abb. 8-8 im Anhang), während MSC positiv für CD105 waren (Abb. 4-3 und 4-20A). Das Prinzip dieser Analyse ist in Abb. 4-24A dargestellt. In *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen wurde während der gesamten Versuchsdauer sowohl eine Abnahme der Gesamtzellzahl adhärenen Zellen als auch eine Abnahme des Anteils *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen beobachtet, als Zeichen dafür, dass die DLD1-Population reduziert wurde. Gleichzeitig nahm die Zahl der flotierenden Zellen zu (Abb. 4-24B). In WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen nahm die Gesamtzellzahl der adhärenen Zellen sowie der Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen zu, was ein Zeichen für die Proliferation der DLD1-Zellen war. Die Zahl der flotierenden Zellen blieb in WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen gering (Abb. 4-24B). Nach 72 h war die Zahl der adhärenen DLD1-Zellen in Kokulturen mit *TRAIL*-MSC (34,4 % ± 33,5 %) signifikant reduziert im Vergleich zu Kokulturen mit WT-MSC (439,7 % ± 144,3 %; p = 0,034, n = 3). Dabei stieg die Zahl der flotierenden Zellen signifikant an (16,6 % ± 10,0 % in Kokulturen mit WT-MSC vs. 240,2 % ± 111,5 % in Kokulturen mit *TRAIL*-MSC; p = 0,026, n = 3).

Es wurde somit einerseits gezeigt, dass in MSC exprimiertes TRAIL biologisch aktiv war und andererseits, dass *TRAIL*-MSC in kokultivierten sTRAIL-sensitiven DLD1-Zellen Apoptose induzierten und so die CRC-Zellpopulation effektiv reduzierten. Es wurde nun untersucht, welchen Effekt *TRAIL*-MSC auf sTRAIL-resistente CRC-Zellen ausübten.

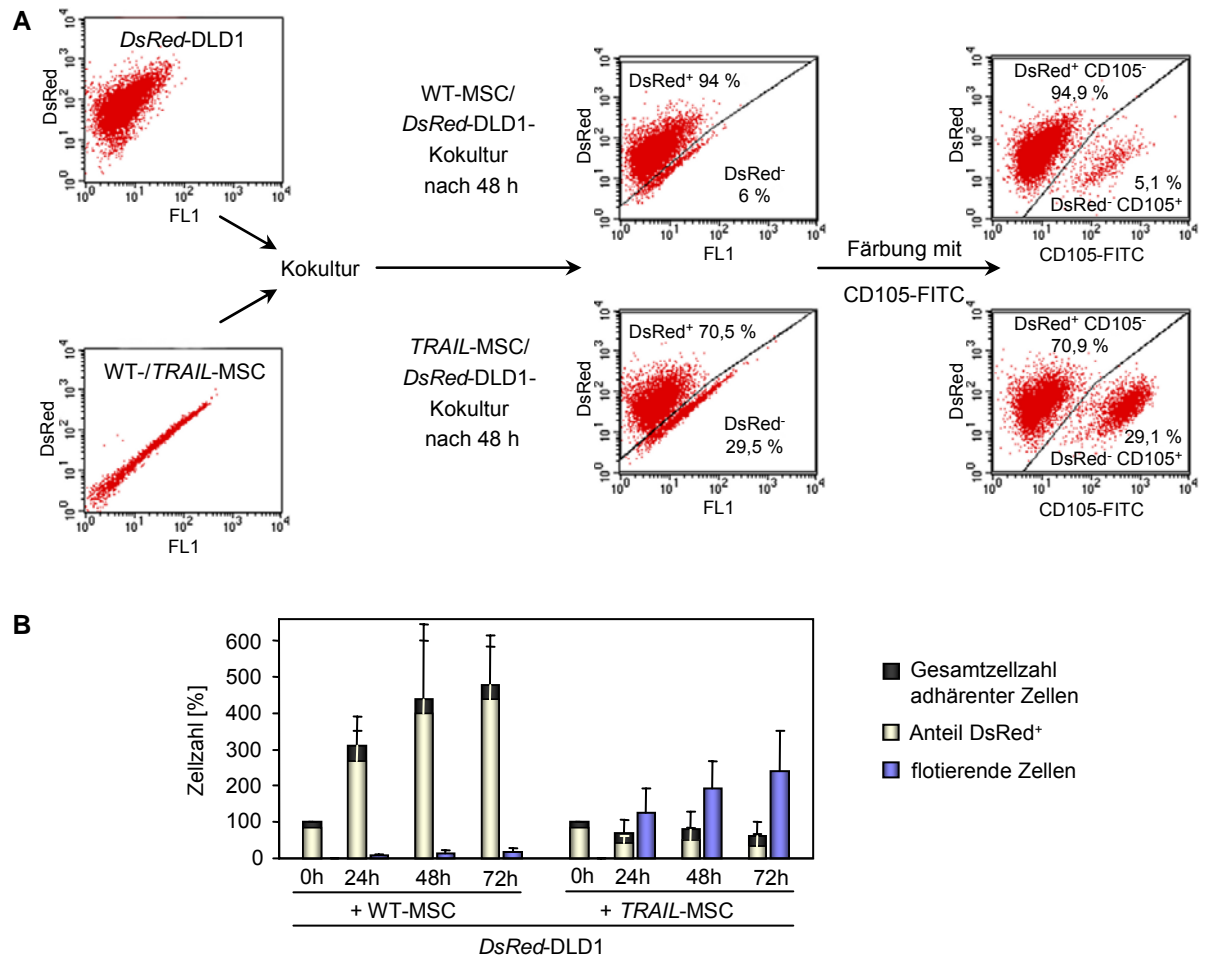


Abb. 4-24: Proliferation von DLD1-Zellen in Kokultur mit WT-MSC und *TRAIL*-MSC. (A) Beispiel für die Quantifizierung des Anteils von CRC-Zellen in MSC/*DsRed*-CRC-Kokulturen. Die einzelnen Populationen (links) sowie die Mischpopulationen (Mitte und rechts) wurden bei identischen Geräteeinstellungen am Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen (DLD1) ist nach 48 h in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen (70,9 %) verglichen mit dem Anteil in WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokulturen (94,9 %) reduziert. FL1 - Fluoreszenz 1. (B) WT-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokultur und *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Kokultur; Zellzahlen nach 24 h, 48 h und 72 h; der Anteil *DsRed*⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl adhärenter Zellen ist als helle Säule dargestellt. MW + Stabw (n = 3).

4.5.4 Einfluss von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte s*TRAIL*-resistente CRC-Zellen

Um den Einfluss von *TRAIL*-MSC auf weitere CRC-Zelllinien inklusive s*TRAIL*-resistente CRC-Zelllinien zu untersuchen, wurde das gesamte Panel der 9 CRC-Zelllinien mit WT-MSC bzw. *TRAIL*-MSC für 24 h kokultiviert. Die Kokulturen wurden anschließend mittels Western Blot hinsichtlich der Spaltung von PARP analysiert (Abb. 4-25). Da einige dieser Zelllinien (Colo205, Colo320DM, SW48) semiadhärent waren, wurden die Gesamtlysate, d. h. adhärenente und flotierende Zellen gemeinsam, für die Analyse verwendet. Nach Kokultur mit *TRAIL*-MSC wurde in allen s*TRAIL*-sensitiven Zelllinien eine Spaltung von PARP, gekennzeichnet durch die Abnahme der Menge des intakten Proteins (116 kDa) und die Zunahme der Menge des Spaltfragmentes (85 kDa), detektiert. Eine Spaltung von PARP wurde zusätzlich in den s*TRAIL*-resistenten Zelllinien SW480 und HCT8 nachgewiesen. Die

sTRAIL-resistenten Zelllinien HT29 und Colo320DM zeigten dagegen keine Spaltung von PARP (Abb. 4-25). Sie waren demnach resistent gegenüber *TRAIL*-MSC. Es wurde somit gezeigt, dass *TRAIL*-MSC nicht nur in allen untersuchten sTRAIL-sensitiven und sondern auch in zwei sTRAIL-resistenten CRC-Zelllinien Apoptose induzierten.

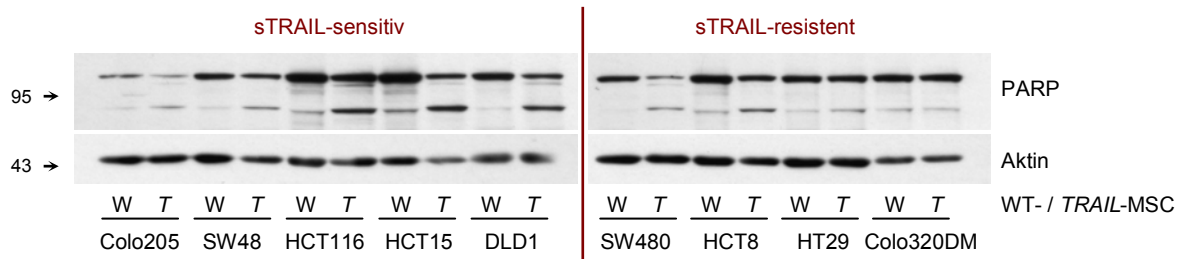


Abb. 4-25: Analyse der Apoptoseinduktion in CRC-Zellen durch *TRAIL*-MSC. Western Blot-Analyse nach 24 h Kokultur mit WT-MSC (W) bzw. *TRAIL*-MSC (T); Aktin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 unabhängigen Versuchen.

Exemplarisch wurden anschließend an der Zelllinie HCT8 weitere Analysen hinsichtlich der Apoptoseinduktion durch *TRAIL*-MSC in sTRAIL-resistenten CRC-Zellen durchgeführt. Die Apoptoseinduktion sollte im Vergleich zur Zelllinie DLD1 charakterisiert und der Effekt auf die Proliferation der HCT8-Zellen analysiert werden. Die direkte Kokultur von *DsRed*-HCT8-Zellen mit *TRAIL*-MSC führte bereits nach 24 h zur Entstehung flotierender Zellen (Abb. 4-26A). Dagegen entstanden bei Zusatz des TRAIL-neutralisierenden Antikörpers in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen sowie in WT-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen keine flotierenden Zellen. Die flotierenden Zellen zeigten die Expression von *DsRed* als Zeichen, dass es sich um HCT8-Zellen handelte (Abb. 4-26A). Die Färbung dieser flotierenden Zellen mit Annexin V ließ auf die Induktion von Apoptose schließen (Abb. 4-26B). In *TRAIL*-MSC/HCT8-Kokulturen wurde mittels Western Blot-Analyse eine Spaltung von PARP sowie von Procaspase-8 und Procaspase-3 detektiert. Diese Spaltungen waren in den flotierenden Zellen besonders ausgeprägt (Abb. 4-26C). In WT-MSC/HCT8-Kokulturen wurde keine Spaltung von PARP und der Procaspasen nachgewiesen (Abb. 4-26C), als Zeichen dafür, dass in Kokulturen mit WT-MSC keine Apoptose induziert wurde.

Die Expression von TRAIL wurde in *TRAIL*-MSC/HCT8-Kokulturen detektiert, nicht jedoch in WT-MSC/HCT8-Kokulturen (Abb. 4-26C). Das war ein Beleg dafür, dass in WT-MSC keine TRAIL-Expression durch kokultivierte CRC-Zellen induziert wurde.

Das Wachstumsverhalten von HCT8-Zellen in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen und WT-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen wurde analog zu DLD1-Zellen (siehe 4.5.3) analysiert. Zuvor wurde gezeigt, dass HCT8-Zellen kein CD105 exprimierten (Abb. 8-8 im Anhang). In *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen wurde nach 24 h eine Abnahme der Gesamtzellzahl der adhären Zellen beobachtet, gefolgt von einer leichten Zunahme nach 48 h. Nach 72 h erreichte die Gesamtzellzahl der adhären Zellen jedoch nur einen Wert von 124 % \pm 7 % der initial gesetzten Zellzahl. Der Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen blieb dabei nahezu konstant.

Die Anzahl der flotierenden Zellen nahm im Verlauf des Versuches zu (Abb. 4-26D). In WT-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokulturen nahm sowohl die Gesamtzellzahl der adhärennten Zellen als auch der Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen zu, was ein Zeichen für die Proliferation der HCT8-Zellen war. Flotierende Zellen wurden nicht beobachtet (Abb. 4-26D).

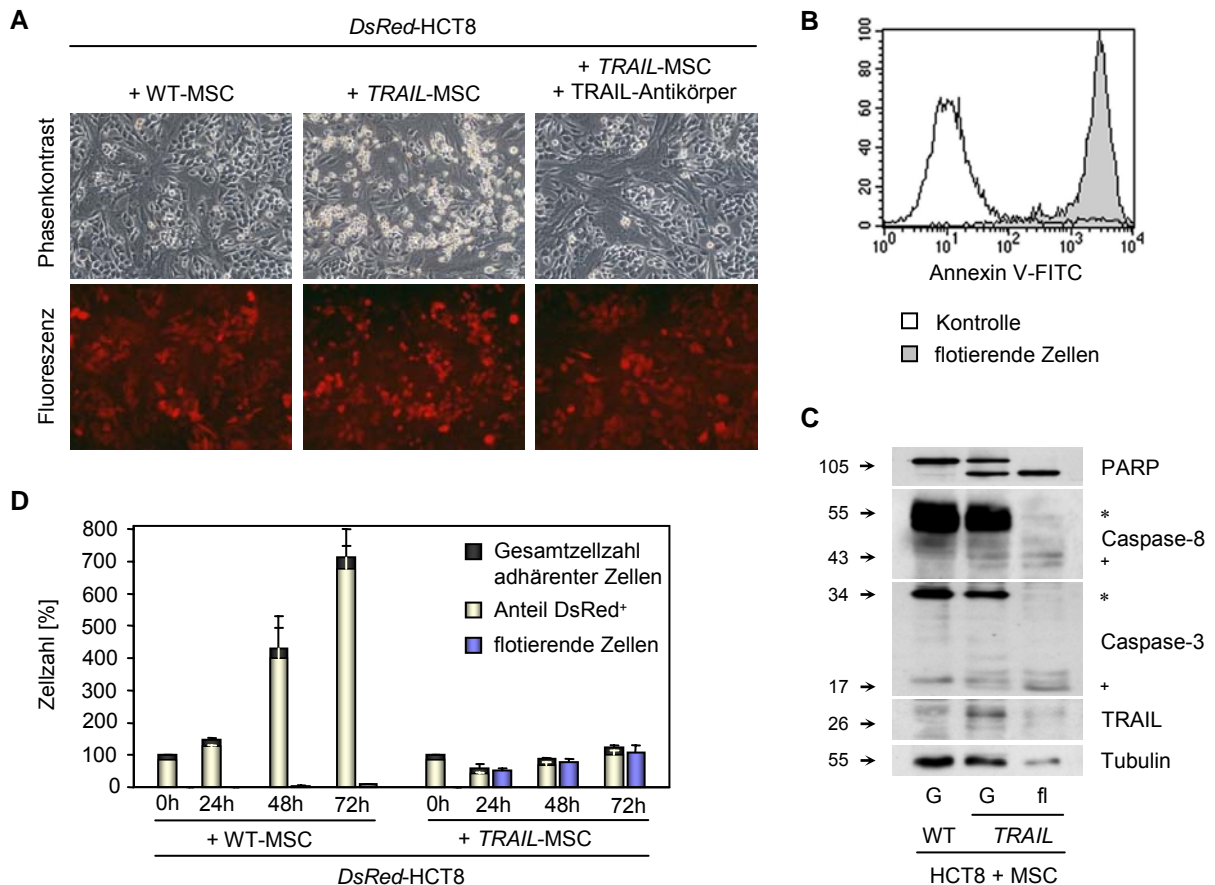


Abb. 4-26: Effekt von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte *DsRed*-HCT8-Zellen. **(A)** Phasenkontrast- und entsprechende Fluoreszenz-aufnahmen nach 24 h; Vergrößerung 100-fach. **(B)** Färbung der flotierenden Zellen aus *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HCT8-Kokultur mit Annexin V-FITC; als Kontrolle dienten separat kultivierte Annexin V-FITC-gefärbte *DsRed*-HCT8-Zellen. Kombinierte Fluoreszenzhistogramme. **(C)** Western Blot-Analyse; Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. G - Gesamtlysat; fl - flotierende Zellen; [*] - Procaspase; [+] - gesplante Fragmente. **(D)** Zellzahlen nach 24 h, 48 h und 72 h; der Anteil *DsRed*⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl adhärennter Zellen ist als helle Säule dargestellt. MW + Stabw (n = 2).

Diese Ergebnisse belegen, dass *TRAIL*-MSC sowohl in s*TRAIL*-sensitiven CRC-Zelllinien als auch in den s*TRAIL*-resistenten CRC-Zelllinien HCT8 und SW480 Apoptose induzierten. Am Beispiel der s*TRAIL*-resistenten Zelllinie HCT8 wurde gezeigt, dass *TRAIL*-MSC in der Kokultur über 72 h das Wachstum der CRC-Zellpopulation durch Induktion von Apoptose inhibierten. Demnach konnte in ausgewählten CRC-Zelllinien deren *TRAIL*-Resistenz durch *TRAIL*-MSC überwunden werden. Dagegen waren die Zelllinien HT29 und Colo320DM sowohl gegenüber s*TRAIL* als auch gegenüber *TRAIL*-MSC resistent. Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber *TRAIL* kann durch Zytostatika in subapoptotischen Konzentrationen durchbrochen werden (Marini *et al.* 2005). Exemplarisch sollte daher am Beispiel der Zelllinie

HT29 untersucht werden, ob diese durch Koinkubation mit Zytostatika für eine Apoptoseinduktion durch *TRAIL*-MSC sensitiviert werden kann.

4.5.5 Sensitivierung *TRAIL*-MSC-resistenter CRC-Zellen durch Oxaliplatin in subapoptotischer Dosierung

Die Untersuchungen zur Sensitivierung erforderten eine Inkubation von MSC/HT29-Kokulturen mit Zytostatika. Eine relative Resistenz von WT-MSC gegenüber ausgewählten Zytostatika wurde bereits gezeigt (siehe 4.1.3) und war insbesondere für Cisplatin charakterisiert. Nicht bekannt war hingegen, ob MSC eine relative Resistenz gegenüber Oxaliplatin besitzen, welches aufgrund seiner Relevanz bei der Behandlung des CRC verwendet werden sollte. Weiterhin war nicht bekannt, welche Reaktion eine Zytostatika-behandlung in *TRAIL*-MSC hervorrief.

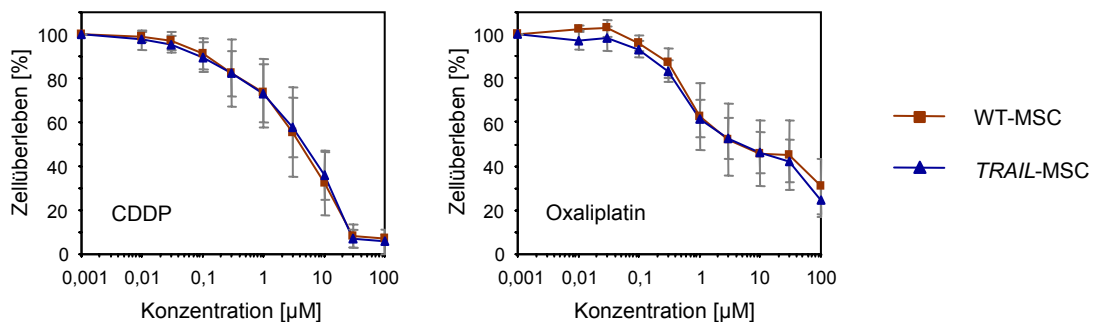


Abb. 4-27: Zytotoxizität von Cisplatin und Oxaliplatin in *TRAIL*-MSC und WT-MSC. Dargestellt sind die Ergebnisse der SRB-Assays für 24 h-Behandlungen mit Cisplatin (WT-MSC n = 3, *TRAIL*-MSC n = 6) und Oxaliplatin (WT-MSC n = 4, *TRAIL*-MSC n = 5). MW \pm Stabw.

TRAIL-MSC zeigten im Vergleich zu WT-MSC in den Zytotoxizitätsassays kein verändertes Ansprechen gegenüber Cisplatin sowie Oxaliplatin (Abb. 4-27) und waren somit unverändert resistent gegenüber Cisplatin. Für Oxaliplatin ergab sich für MSC eine IC₉₀ von > 100 µM (Abb. 4-27). Die IC₉₀ der CRC-Zelllinien HCT8 und HT29 betragen für Oxaliplatin 2 µM bzw. 28 µM (Tab. 8-3 im Anhang). Trotz der unterschiedlichen Behandlungsschemata - 24 h-Behandlung von MSC vs. 96 h-Behandlung der CRC-Zelllinien - kann eine relative Resistenz von MSC gegenüber Oxaliplatin postuliert werden. Aus diesen Erkenntnissen ableitend, wurde für die Untersuchungen zur Sensitivierung eine Konzentration von 3 µM Oxaliplatin gewählt, die sowohl für HT29-Zellen als auch für MSC eine subapoptotische Konzentration darstellte. Zusätzlich lag diese Konzentration unterhalb der mit Oxaliplatin klinisch erreichten Peak-Plasma-Spiegel (Levi *et al.* 2000).

In *TRAIL*-MSC/HT29-Kokulturen entstanden nach 24 h keine flotierenden Zellen (Abb. 4-28). Bei Zusatz von 3 µM Oxaliplatin wurden in *TRAIL*-MSC/HT29-Kokulturen nach 24 h

flotierende Zellen beobachtet. Wurde zusätzlich ein TRAIL-neutralisierender Antikörper zugesetzt, entstanden keine flotierenden Zellen (Abb. 4-28).

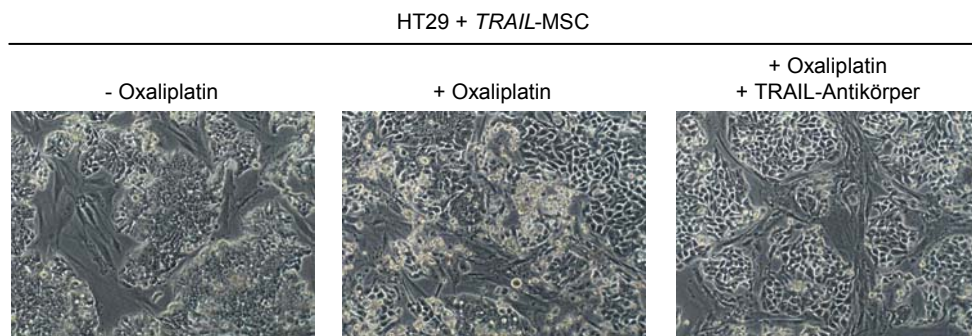


Abb. 4-28: Effekt von Oxaliplatin auf Kokulturen von *TRAIL*-MSC und HT29-Zellen. Kokulturen mit und ohne Zusatz von 3 μ M Oxaliplatin bzw. TRAIL-neutralisierendem Antikörper; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 unabhängigen Versuchen.

Die unter Oxaliplatin entstandenen flotierenden Zellen in *TRAIL*-MSC/HT29-Kokulturen zeigten eine Färbung mit Annexin V (Abb. 4-29A). In *TRAIL*-MSC/HT29-Kokulturen mit Oxaliplatin-Zusatz wurde mittels Western Blot-Analyse eine Spaltung von PARP sowie von Procaspase-8 und Procaspase-3 detektiert. Sowohl die Spaltung von PARP als auch die der Procaspasen war in den flotierenden Zellen besonders ausgeprägt (Abb. 4-29B). In WT-MSC/HT29-Kokulturen mit Oxaliplatin-Zusatz wurde keine Spaltung von PARP und der Procaspasen nachgewiesen (Abb. 4-29B), als Zeichen dafür, dass in Kokulturen mit WT-MSC und Oxaliplatin-Zusatz keine Apoptose induziert wurde.

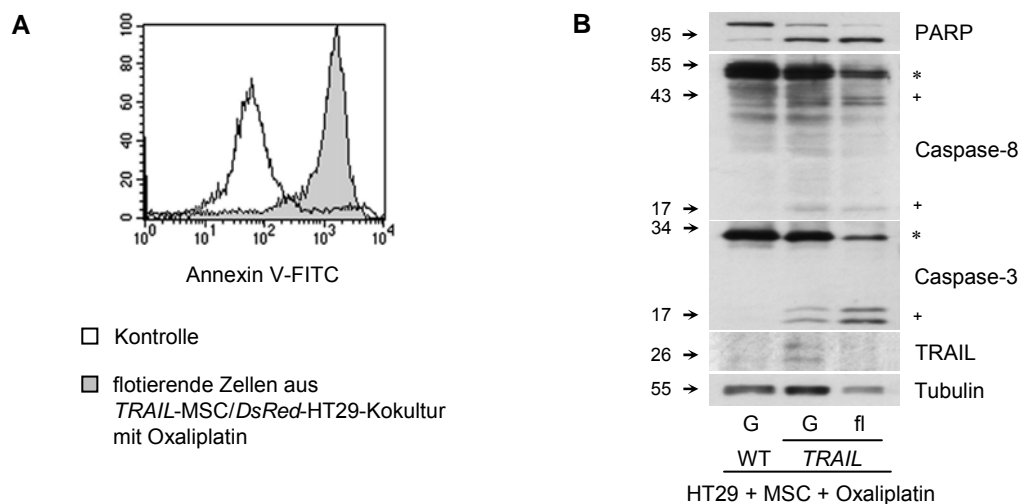


Abb. 4-29: Analyse von Apoptoseinduktion in Kokulturen von *TRAIL*-MSC und HT29-Zellen mit Oxaliplatinzusatz. (A) Färbung der flotierenden Zellen aus *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HT29-Kokultur nach 48 h mit Annexin V-FITC; als Kontrolle dienten separat kultivierte Annexin V-FITC-gefärbte *DsRed*-HT29-Zellen. Kombinierte Fluoreszenzhistogramme. (B) Western Blot-Analyse nach 24 h Kokultur; Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die jeweiligen Größenstandards in kDa. G - Gesamtlysate; fl - flotierende Zellen; [*] - Procaspase; [+] - gespaltene Fragmente. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 2 unabhängigen Versuchen.

TRAIL wurde nur in den Gesamtlysaten der *TRAIL*-MSC/HT29-Kokulturen detektiert, nicht jedoch in den flotierenden Zellen oder in WT-MSC/HT29-Kokulturen (Abb. 4-29B). Das war

ein Zeichen dafür, dass keine Apoptose in *TRAIL*-MSC induziert wurde, sowie dass in WT-MSC keine *TRAIL*-Expression durch kokultivierte CRC-Zellen oder Oxaliplatin induziert wurde. Es wurde somit der Nachweis erbracht, dass HT29-Zellen durch Oxaliplatin in subapoptotischer Konzentration für *TRAIL*-induzierte Apoptose durch *TRAIL*-MSC sensitiviert werden konnten.

Das Wachstumsverhalten von *DsRed*-HT29-Zellen in Kokultur mit *TRAIL*-MSC und WT-MSC jeweils mit bzw. ohne Zusatz von 3 μM Oxaliplatin wurde über 72 h analog den Analysen bei DLD1- und HCT8-Zellen (siehe 4.5.3 und 4.5.4) untersucht. Zuvor wurde nachgewiesen, dass HT29-Zellen kein CD105 exprimierten (Abb. 8-8 im Anhang). Ohne Zusatz von Oxaliplatin wurde in WT-MSC/*DsRed*-HT29-Kokulturen sowie in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HT29-Kokulturen über den gesamten Versuchszeitraum eine nahezu identische Zunahme der Gesamtzellzahl der adhärennten Zellen sowie des Anteils *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen beobachtet. Das war ein Anzeichen für die Proliferation der HT29-Zellen in den Kokulturen. Nach 72 h wurde in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HT29-Kokulturen ohne Zusatz von Oxaliplatin eine geringe Zunahme der flotierenden Zellen beobachtet (Abb. 4-30).

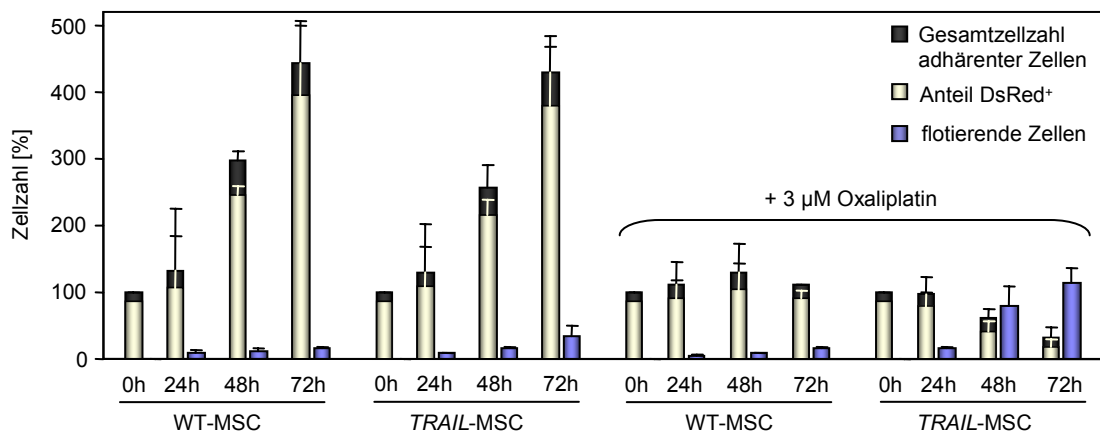


Abb. 4-30: Effekt von Oxaliplatin auf die Proliferation von *DsRed*-HT29-Zellen in Kokultur mit *TRAIL*-MSC und WT-MSC. Zellzahlen nach 24 h, 48 h und 72 h; der Anteil *DsRed*⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl adhärennter Zellen ist als helle Säule dargestellt. MW + Stabw (n = 2).

In WT-MSC/*DsRed*-HT29-Kokulturen nahm unter Zusatz von Oxaliplatin bis 48 h die Gesamtzellzahl der adhärennten Zellen bei gleich bleibendem Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ Zellen leicht zu, als Hinweis auf einen leichten Anstieg der HT29-Zellzahl. Nach 72 h wurde eine Reduktion der Zahl der adhärennten Zellen beobachtet, jedoch keine entsprechende Zunahme der flotierenden Zellen. In *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HT29-Kokulturen nahm unter Zusatz von Oxaliplatin ab 24 h im Verlauf des Versuches die Gesamtzellzahl der adhärennten Zellen sowie der Anteil *DsRed*⁺ CD105⁻ HT29-Zellen ab. Das ging mit einer deutlichen Zunahme der Anzahl der flotierenden Zellen ab 48 h einher (Abb. 4-30). Diese Ergebnisse zeigen, dass Oxaliplatin in subapoptotischer Konzentration in *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HT29-

Kokulturen keinen Proliferationsarrest induzierte, sondern eine effektive Reduktion der HT29-Zellpopulation durch Induktion von Apoptose bewirkte.

Es war somit gelungen, resistente HT29-Zellen durch Oxaliplatin in subapoptotischer Konzentration für eine Apoptoseinduktion durch *TRAIL*-MSC zu sensibilisieren. Im Folgenden sollte der Effekt von *TRAIL*-MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften *in vivo* untersucht werden.

4.5.6 Einfluss tumorintegrierter *TRAIL*-MSC auf das Tumorwachstum in subkutanen CRC-Mischxenograften

Die Untersuchung zur *In-vivo*-Funktionalität von *TRAIL*-MSC wurde anhand subkutaner Mischxenograften durchgeführt und erfolgte zunächst für die s*TRAIL*-sensitive Zelllinie DLD1. Es wurden Mischxenograften von *DsRed*-DLD1-Zellen und *TRAIL*-MSC bzw. *GFP*-MSC etabliert, wobei der Anteil MSC an der gesamt applizierten Zellzahl 20 % betrug. Die Tumorgroße wurde durch *In-vivo*-Imaging der *DsRed*-Fluoreszenzintensität bestimmt. Nach einer Reduktion der Tumorgroße aller Xenograften bis Tag 4, nahm das Wachstum der *GFP*-MSC/DLD1-Mischxenograften zu, während das Wachstum der *TRAIL*-MSC/DLD1-Mischxenograften reduziert war (Abb. 4-31A-C). Bei Versuchsende (Tag 16) war das Wachstum der Mischxenograften mit *TRAIL*-MSC signifikant inhibiert im Vergleich zu Mischxenograften mit *GFP*-MSC ($p = 0,006$).

Analog zu DLD1-Mischxenograften wurden als nächstes subkutane Mischxenograften der s*TRAIL*-resistenten *DsRed*-HCT8-Zellen mit 20 % *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC generiert. Ein *In-vivo*-Imaging der *DsRed*-Fluoreszenzintensität zur Bestimmung der Tumorgroße wurde zwar durchgeführt, konnte jedoch aufgrund der ineffizienten Markierung der HCT8-Zellen nur unzureichend ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte daher anhand der Gewichte der präparierten Mischxenograften nach Tötung der Tiere. *TRAIL*-MSC/HCT8-Mischxenograften hatten im Vergleich zu WT-MSC/HCT8-Mischxenograften ein signifikant niedrigeres Gewicht ($p = 0,014$, $n = 3$) (Abb. 4-31D). Demnach inhibierten tumorintegrierte *TRAIL*-MSC nicht nur das Tumorwachstum s*TRAIL*-sensitiver DLD1-Xenograften, sondern auch das Wachstum s*TRAIL*-resistenter HCT8-Xenograften.

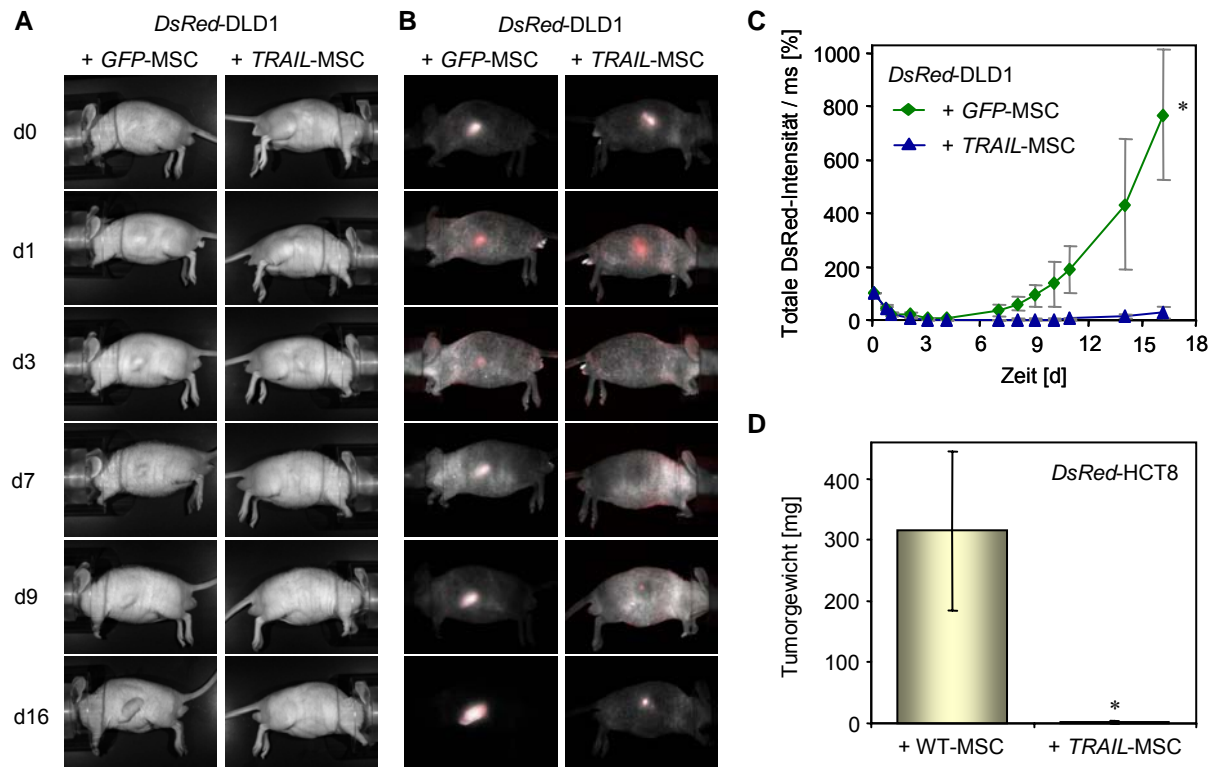


Abb. 4-31: Beeinflussung des Tumorwachstums durch tumorintegrierte *TRAIL*-MSC. **(A-C)** *In-vivo*-Imaging subkutaner *GFP*-MSC/*DsRed*-DLD1- bzw. *TRAIL*-MSC/*DsRed*-DLD1-Mischxenografte (Anteil tumorintegrierter MSC jeweils 20 %). **(A)** Graustufenaufnahmen einer Maus mit konstanter Belichtungszeit, repräsentative Auswahl an Zeitpunkten. **(B)** Entsprechende Fluoreszenzaufnahmen mit automatischer Belichtungszeit. **(C)** Quantifizierung der *DsRed*-Fluoreszenzintensitäten. MW \pm Stabw (n = 3). * *GFP*-MSC vs. *TRAIL*-MSC p = 0,006. **(D)** Tumorgewichte von WT-MSC/*DsRed*-HCT8- und *TRAIL*-MSC/*DsRed*-HCT8-Mischxenograften mit einem Anteil tumorintegrierter MSC von jeweils 20 % nach Versuchsende (Tag 25); MW \pm Stabw (n = 3); * p < 0,014 vs. WT-MSC.

Tumorgewebeproben von Mischxenograften mit *TRAIL*-MSC wurden anschließend mittels immunhistochemischer Färbung auf Anzeichen für eine Apoptoseinduktion untersucht. Hierfür fanden subkutane *TRAIL*-MSC/DLD1-Mischxenograften mit einem Anteil tumorintegrierter MSC von 3 % Anwendung, da von Mischxenograften mit 20 % *TRAIL*-MSC aufgrund des fehlenden Wachstums kein Material in ausreichender Menge für histologische Untersuchungen gewonnen werden konnte. Eine relevante Tumorgroße wurde nicht vor Tag 7 erreicht, so dass die Mischxenograften an Tag 9 präpariert wurden. Die immunhistochemische Färbung erbrachte den Nachweis für gespaltenes PARP innerhalb des Tumors an angrenzenden stromalen Septen (Abb. 4-32), was auf eine Induktion von Apoptose in DLD1-Zellen durch benachbarte *TRAIL*-MSC hindeutete.

Es wurde somit gezeigt, dass tumorintegrierte *TRAIL*-MSC das Tumorwachstum von CRC-Xenograften inhibierten und dabei Apoptose induzierten. Ausgehend von der zuvor beobachteten Integration systemisch applizierter MSC in Tumoren (Abb. 4-16), sollte der Effekt i. v. transplanteder *TRAIL*-MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften untersucht werden.

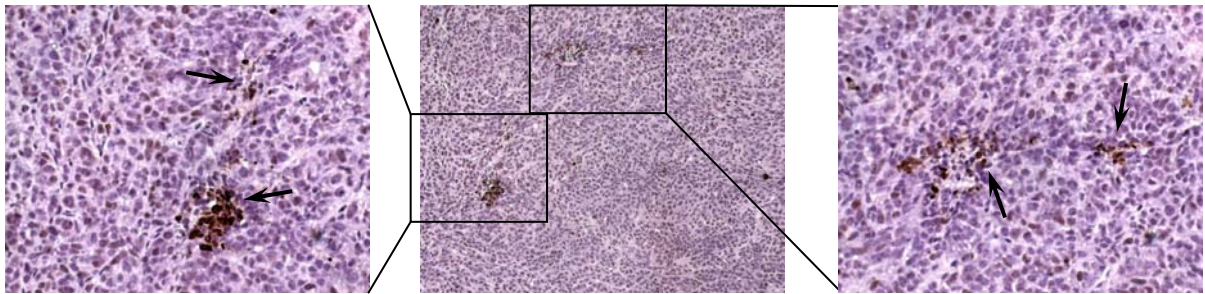


Abb. 4-32: Induktion von Apoptose in *TRAIL*-MSC/DLD1-Mischxenograften. Anteil tumorintegrierter MSC von 3 %; Immunhistochemische Färbung mit anti-PARP-1; die Pfeile in den vergrößerten Bildausschnitten markieren den Nachweis von gespaltenem PARP an stromalen Septen. Nachweis der Immunkomplexe mit DAB (braune Färbung); Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin; Vergrößerung 100-fach, Bildausschnitte 400-fach.

4.5.7 Effekt systemisch applizierter *TRAIL*-MSC auf das Wachstum subkutaner CRC-Xenograften

Dil-markierte *TRAIL*-MSC (Dil-*TRAIL*-MSC) wurden wiederholt i. v. in die Schwanzvene von Tieren mit subkutanen *GFP*-DLD1-Xenograften transplantiert. Als Negativkontrolle dienten Tiere ohne MSC-Transplantation. Aufgrund der beobachteten Förderung des Tumorwachstums durch tumorintegrierte MSC, konnte ein ähnlicher Effekt systemisch applizierter MSC nicht ausgeschlossen werden. Daher dienten Tiere mit wiederholter Transplantation Dil-markierter WT-MSC (Dil-WT-MSC) als Kontrolle. Die Tumorgößen wurden durch *In-vivo*-Imaging der *GFP*-Fluoreszenzintensität bestimmt. Sowohl die Xenografte ohne Transplantation von MSC als auch die Xenografte nach Transplantation von Dil-WT-MSC sowie Dil-*TRAIL*-MSC zeigten keine Unterschiede hinsichtlich des Tumorwachstums (Abb. 4-33). Weder systemisch applizierte WT-MSC noch *TRAIL*-MSC hatten in diesen Versuchen einen Einfluss auf das Tumorwachstum.

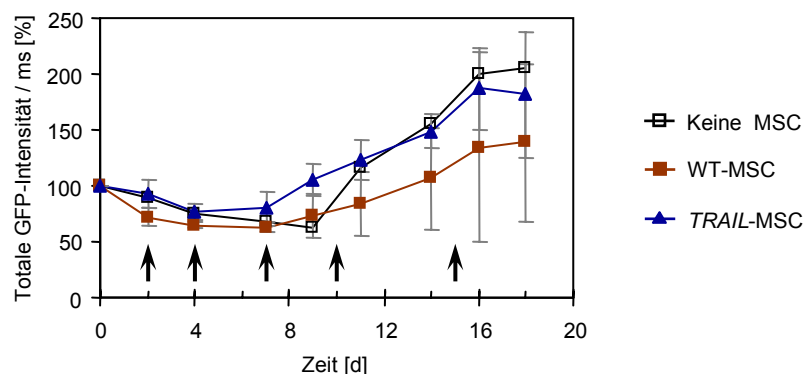


Abb. 4-33: Wachstum von subkutanen *GFP*-DLD1-Xenograften nach wiederholter systemischer Injektion von *TRAIL*-MSC. Die Xenograften wurden an Tag 0 generiert. Die Pfeile markieren jeweils eine i. v.-Applikation von MSC. *In-vivo*-Imaging und Quantifizierung der *GFP*-Fluoreszenzintensitäten; MW \pm Stabw (WT-MSC n = 3; *TRAIL*-MSC n = 3; Keine MSC n = 1).

Es gab keine Anzeichen einer Toxizität nach systemischer Transplantation von Dil-*TRAIL*-MSC. Insbesondere wurde keine Gewichtsveränderung der Tiere beobachtet und die Tiere zeigten keine Änderung ihres Sozialverhaltens. Die makroskopische Untersuchung der Organe nach Tötung der Tiere zeigte keine Anzeichen von viszeralen Tumoren als Zeichen einer möglichen malignen Transformation von *TRAIL*-MSC.

Im *Ex-vivo*-Imaging zeigten die präparierten Lungen der Tiere, denen Dil-WT-MSC bzw. Dil-*TRAIL*-MSC transplantiert worden waren, im Vergleich zu Lungen der Tiere ohne MSC-Transplantation ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abb. 4-34A). Das deutete auf eine Ansammlung der transplantierten Zellen im Lungengewebe hin. In den präparierten subkutanen Xenograften aller Tiere wurde im *Ex-vivo*-Imaging kein Dil-Fluoreszenzsignal detektiert.

Anschließend wurden Gefrierschnitte der Lungen und der subkutanen Xenografte angefertigt. Die Lungen der Tiere mit Dil-MSC-Transplantation wiesen großflächige rot fluoreszierende Areale auf, welche den bereits vermuteten pulmonalen Tropismus der transplantierten Dil-MSC bestätigten (Abb. 4-34B). In den zugehörigen subkutanen CRC-Xenograften dieser Tiere wurden wenige Dil-Fluoreszenzsignale detektiert (Abb. 4-34B). Damit wurden die bereits erhobenen Daten zur Tumorintegration systemisch transplanteder MSC in subkutane CRC-Xenografte (siehe 4.4.1) bestätigt. Die Auszählung der Zellkerne dieser Bildauschnitte ergab für MSC einen Anteil an den gesamten Zellen des Tumors von etwa 0,3 % bis 0,4 %, so dass die Integration in subkutane Xenografte durch eine geringe Effizienz gekennzeichnet war.

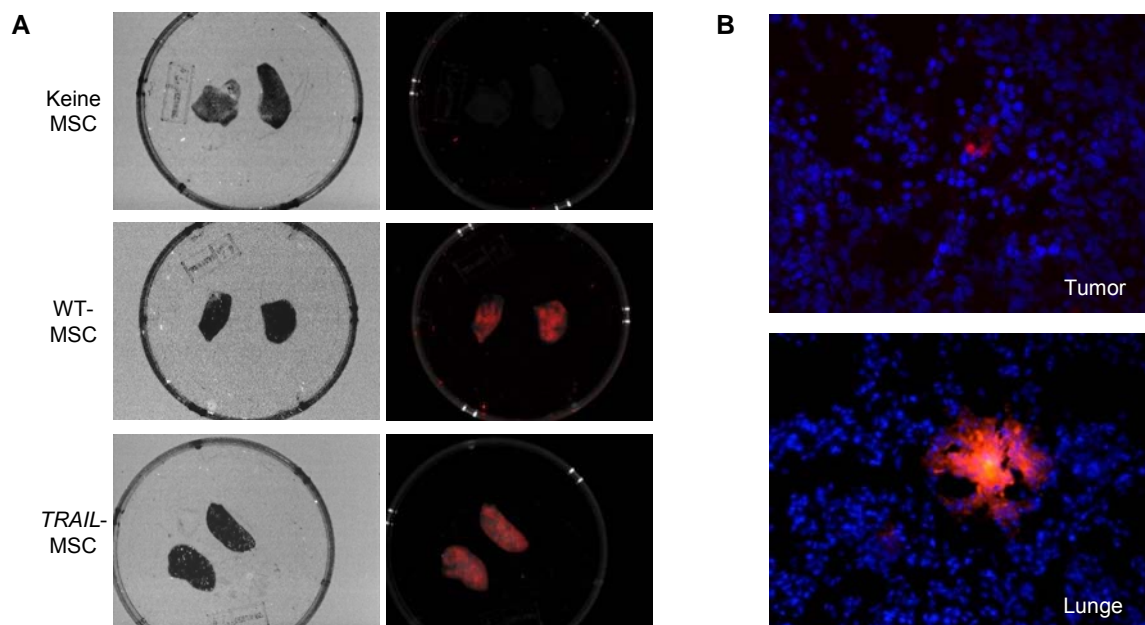


Abb. 4-34: Analyse der Tumorintegration rot fluoreszierender Dil-MSC nach wiederholter systemischer Injektion. (A) *Ex-vivo*-Imaging der entnommenen Lungen; links die Graustufenaufnahmen, rechts die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. (B) Gefrierschnitte der Lunge und des Tumors eines Tieres nach Injektion von Dil-*TRAIL*-MSC; Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau); Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400-fach.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die geringe Integration systemisch applizierter *TRAIL*-MSC in subkutane DLD1-Xenografte auf deren pulmonalen Tropismus zurückzuführen war. Weiterhin wurde angenommen, dass der fehlende Effekt systemisch applizierter *TRAIL*-MSC auf das Tumorwachstum durch deren geringe Tumorintegration erklärt werden kann. Es sollte daher evaluiert werden, welche Menge an tumorintegrierten *TRAIL*-MSC notwendig ist, um einen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum von CRC-Xenograften auszuüben.

4.5.8 Abhängigkeit der Wachstumsinhibierung vom Anteil tumorintegrierter *TRAIL*-MSC in subkutanen CRC-Mischxenograften

Die Untersuchungen erfolgten mittels Mischxenograften mit unterschiedlichen MSC-Anteilen. Hierfür wurden subkutane Mischxenografte von *DsRed*-DLD1-Zellen und *TRAIL*-MSC bzw. Kontroll-MSC (WT-MSC oder *GFP*-MSC) mit folgenden MSC-Anteilen generiert: 20 % MSC, 10 % MSC, 3 % MSC und 1 % MSC. Aufgrund der bereits beobachteten Wachstumsförderung durch WT-MSC dienten Xenografte ohne MSC als eigentliche Negativkontrolle. Die Tumorgrößen wurden durch *In-vivo*-Imaging der *DsRed*-Fluoreszenzintensität bestimmt. Zum Ende des Versuches (Tag 17) wurden deutlich differenzielle Tumorgrößen beobachtet. 20 % *TRAIL*-MSC inhibierten das Wachstum der DLD1-Mischxenografte im Vergleich zu 20 % Kontroll-MSC signifikant um das 25-fache ($p = 0,005$). Verglichen mit den Negativkontrollen war die Tumorgröße der *TRAIL*-MSC/DLD1-Mischxenografte mit 20 % MSC 10-fach reduziert. Ein Anteil von 10 % *TRAIL*-MSC im Tumor inhibierte das Tumorwachstum 3-fach verglichen mit 10 % Kontroll-MSC und 1,7-fach verglichen mit Negativkontrollen ohne MSC. 3 % *TRAIL*-MSC führten verglichen mit 3 % Kontroll-MSC zu einer 1,5-fachen Inhibierung des Tumorwachstums, während kein Unterschied hinsichtlich des Wachstums der *TRAIL*-MSC/DLD1-Mischxenografte mit 3 % MSC und Negativkontrollen beobachtet wurde. 1 % *TRAIL*-MSC übten sowohl im Vergleich zu 1 % Kontroll-MSC als auch im Vergleich zu Negativkontrollen keinen Effekt auf das Tumorwachstum der DLD1-Xenografte aus (Abb. 4-35).

Demzufolge war die Wachstumsinhibierung der DLD1-Xenografte durch tumorintegrierte *TRAIL*-MSC abhängig von deren Anteil am Tumor. Ein Anteil von 3 % tumorintegrierter *TRAIL*-MSC konnte lediglich den wachstumsfördernden Effekt von 3% Kontroll-MSC neutralisieren. Es waren mindestens 10 % tumorintegrierte *TRAIL*-MSC notwendig, um das Wachstum von DLD1-Xenograften im Vergleich zu Negativkontrollen ohne MSC zu inhibieren.

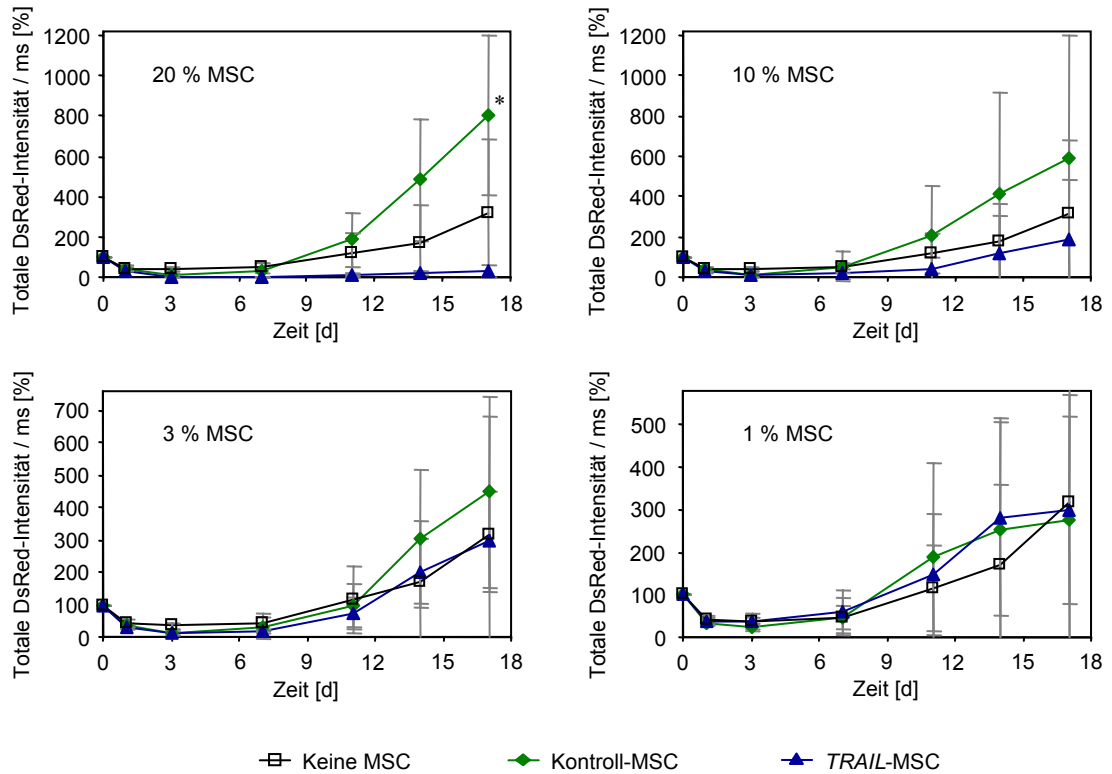


Abb. 4-35: Inhibierung des Wachstums von DLD1-Xenograften in Abhängigkeit von der Menge tumorintegrierter TRAIL-MSC. Subkutane Kontroll-MSC/*DsRed*-DLD1- und TRAIL-MSC/*DsRed*-DLD1-Mischxenograften mit unterschiedlichen MSC-Anteilen; als Kontrolle dienten subkutane *DsRed*-DLD1-Xenograften ohne MSC. *In-vivo*-Imaging und Quantifizierung der *DsRed*-Fluoreszenzintensitäten; MW \pm Stabw (20 % MSC n = 9; 10 % MSC n = 6; 3 % MSC n = 6; 1 % MSC n = 3; keine MSC n = 4). * TRAIL-MSC vs. Kontroll-MSC p = 0,005.

5 DISKUSSION

5.1 Charakteristika von MSC bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit widmete sich der Frage, ob MSC für potentielle klinische Anwendungen aus dem KM von Patienten nach vorangegangener Chemotherapie isoliert werden können.

Es wurden CFU-F sowohl aus dem KM von Spendern nach vorangegangener Chemotherapie als auch von Spendern ohne vorherige Medikation gewonnen. Die isolierten Zellen stellten mit einem Anteil von 0,001 % an den gesamten KM-MNZ eine sehr kleine Zellpopulation innerhalb des KM dar. Dies bestätigte die Beobachtungen anderer Autoren, die beschrieben, dass MSC einen Anteil von 0,001 - 0,01 % an den KM-MNZ ausmachten (Pittenger *et al.* 1999). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte geringere mittlere Anzahl der CFU-F pro 10^6 KM-MNZ nach vorangegangener Chemotherapie als auch die hohe Standardabweichung in beiden Spendergruppen deuteten darauf hin, dass ein Einfluss der spezifischen Medikation aber auch anderer Faktoren auf die Isolierbarkeit von CFU-F aus dem KM nicht ausgeschlossen werden kann. Beide Spendergruppen wiesen Unterschiede hinsichtlich klinischer Faktoren, z. B. Diagnose, Medikation oder Alter auf, die einen Einfluss auf die Isolierbarkeit von CFU-F ausüben können. Mögliche weitere Einflüsse auf die Anzahl der isolierten CFU-F haben z. B. die Technik der Aspiration oder die Zeit von der KM-Punktion bis zur Isolation der Zellen. Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Kultivierungsdauer der CFU-F bis zum Erreichen einer definierten Konfluenz innerhalb beider Spendergruppen deuteten auf interindividuelle Unterschiede in den initialen Wachstumskinetiken der Präparationen verschiedener Spender hin. Auch die Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, sind bislang nicht bekannt. Trotz dieser Unterschiede belegen die präsentierten Daten, dass CFU-F nach vorangegangener Chemotherapie isoliert werden können. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass aus dem KM von Empfängern eines allogenen KM-Transplantates auch nach Hoch-Dosis-Chemotherapie MSC isoliert werden konnten, die vom Empfänger stammten (Rieger *et al.* 2005; Simmons *et al.* 1987; Spyridonidis *et al.* 2005).

Die isolierten Zellen wurden auf die laut Konsensus (Dominici *et al.* 2006) für MSC definierenden Eigenschaften Proliferationskapazität, spezifisches Expressionsprofil von Oberflächenantigenen und mesodermales Differenzierungspotential untersucht. Dabei zeichneten sich keine Unterschiede zwischen MSC unbehandelter Spender und MSC nach Chemotherapie ab. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Arbeiten, die eine quantitative und qualitative Schädigung von KM-Stromazellen oder MSC nach HSC-Transplantation vermuten lassen (Banfi *et al.* 2001; Carlo-Stella *et al.* 1997; Devine *et al.* 2000; Domenech *et al.* 1998; Galotto *et al.* 1999). Hinsichtlich der Charakterisierung der

isolierten Zellen konzentrierten sich die meisten dieser Studien auf den Einfluss von MSC auf die Hämatopoese, während die vorliegende Arbeit sich auf die Eigenschaften von MSC *in vitro* bezieht. Einige Studien demonstrierten Veränderungen von MSC oder KM-Stromazellen durch maligne Infiltrationen des KM (Corre *et al.* 2007; Huss *et al.* 2002) oder durch verschiedene Erkrankungen (Murphy *et al.* 2002; Papadaki *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 1999). Weiterhin wurden in Studien Unterschiede zwischen MSC jüngerer und älterer Spender (Nishida *et al.* 1999) dargelegt. Diese Veränderungen äußerten sich hauptsächlich in einer verminderten Proliferationskapazität sowie in einer Reduktion der Differenzierungsaktivität, jedoch nicht in deren Verlust. Diese Studien zeigten, dass die Differenzierung in einzelne Richtungen weniger ausgeprägt war, als die Differenzierung in andere Richtungen oder in Kontrollzellen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede im Ausmaß der adipogenen oder osteogenen Differenzierung beobachtet. Diese äußerten sich einerseits in der Menge der Fetteinlagerungen und/oder der Kalziumhydroxylapatitablagerungen und andererseits in der Dauer bis zum Sichtbarwerden der morphologischen Differenzierungsanzeichen. Eine Quantifizierung der Differenzierung erfolgte in der hier vorgelegten Arbeit jedoch nicht. Diese Unterschiede in den Differenzierungsaktivitäten traten in beiden Spendergruppen auf und konnten nicht bestimmten Patientengruppen zugeordnet werden. Allerdings erlaubte die geringe Größe und die Inhomogenität der für diese Arbeit verwendeten Spendergruppen keine multivariate Analyse. Demnach kann weder ein Einfluss von Alter, Geschlecht oder Zeit seit letzter Chemotherapie, noch ein Einfluss anderer Erkrankungen oder Medikationen auf die Eigenschaften der isolierten MSC völlig ausgeschlossen werden. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die MSC-definierenden Charakteristika nicht betroffen sind. An dieser Stelle sollte in Betracht gezogen werden, dass diese definierenden Kriterien MSC möglicherweise nur unzureichend charakterisieren. Die Auswahl definierender Kriterien mit größerer Spezifität ist jedoch problematisch, da sich MSC in Abhängigkeit von ihrer Herkunft hinsichtlich spezifischer Charakteristika, z. B. der Expression von Oberflächenantigenen unterscheiden können (Battula *et al.* 2007).

Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigten Wachstumskinetiken wird deutlich, dass MSC ein begrenztes Proliferationspotential besitzen und nach 9 bis 11 Passagen einen Proliferationsarrest eingehen. Bestätigt wird dies durch Beobachtungen, dass MSC *in vitro* einer replikativen Seneszenz nach ca. 40 PD unterliegen (Wagner *et al.* 2008). MSC-Kulturen zeichnen sich durch eine Inhomogenität hinsichtlich Form und Größe der einzelnen Zellen innerhalb einer Kultur aus, für die in anderen Arbeiten unterschiedliche Proliferationsraten gezeigt wurden (Neuhuber *et al.* 2008). Gelegentlich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kulturen osteogen differenzierter Zellen auch Areale adipogen differenzierter Zellen beobachtet, was sich ebenfalls in der Expression von LPL nach osteogener Differenzierung widerspiegelte. Weiterhin wurde z. T. die Expression von

Osteocalcin in adipogen differenzierten Zellen nachgewiesen. Diese Beobachtungen ließen sich z. B. durch die Inhomogenität der MSC-Kulturen erklären.

Der für MSC angegebene spezifische Immunphänotyp enthält kein unikates Oberflächenantigen, vielmehr umfaßt er eine Kombination spezifischer positiver und negativer Marker. Es wurden in den letzten Jahren neue Oberflächenantigene identifiziert, die auf KM-MSC exprimiert werden, z. B. CD271 und MSCA-1 (Battula *et al.* 2007; Quirici *et al.* 2002), jedoch handelt es sich auch bei diesen nicht um unikate Marker.

In der vorliegenden Arbeit konnten MSC nach vorangegangener Chemotherapie unter Verwendung verschiedener Wachstumsmedien isoliert werden. Die resultierenden Zellen waren hinsichtlich der analysierten Eigenschaften identisch. Andere Arbeiten zeigten im Gegensatz dazu, dass die Zusammensetzung des Wachstumsmediums einen Einfluss auf spezifische Eigenschaften von MSC hat (Wagner *et al.* 2006). Diese Diskrepanz kann einerseits dadurch erklärt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit analysierten und laut Konsensus für MSC definierenden Charakteristika, keine spezifischen Eigenschaften darstellen. Andererseits kann die Ursache dieser Diskrepanz in der Verwendung FCS-haltiger Wachstumsmedien liegen. Da die Zusammensetzung von FCS hinsichtlich einzelner Wachstumsfaktoren und Proteine nicht definiert ist, resultiert der Zusatz von FCS *per se* in einer Variabilität der Kultivierungsbedingungen. Für spezifische Fragestellungen sollte daher auf FCS-freie, definierte Medien zurückgegriffen werden.

Die vorgelegten Daten zeigen, dass MSC von Spendern nach vorangegangener Chemotherapie in ausreichender Zahl isoliert werden können. Demnach stehen autologe MSC für potentielle klinische Anwendungen für die Behandlung von Malignomen zur Verfügung.

5.2 Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung

Die *In-vitro*-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass MSC, verglichen mit sensitiven TGCT-Zellen, resistent gegenüber Zytostatika verschiedener Wirkmechanismen sind. Cisplatin und Etoposid wurden exemplarisch als DNA-schädigende, Apoptose-induzierende Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen, Bildung von Platinaddukten (Fuentes *et al.* 2003) bzw. Inhibierung der Topoisomerase II (Kellner *et al.* 2002), gewählt. Vincristin wurde als Beispiel für ein Spindel-schädigendes Agens verwendet (Gidding *et al.* 1999). Die Resistenz von MSC zeigte sich vor allem bei höheren, in sensitiven Zellen Apoptose induzierenden Konzentrationen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Studie, welche eine *In-vitro*-Resistenz von MSC für verschiedene Zytostatika zeigte (Li *et al.* 2004). Die IC beider Arbeiten lassen sich aufgrund der verwendeten verschiedenen Methoden nicht direkt vergleichen. Für Vincristin zeigten beide Studien, dass eine Dosiserhöhung ab 0,01 µM in keinen weiteren zytotoxischen Effekten resultiert. Diese

Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung kann eine Grundlage für deren lebenslange Persistenz im Organismus sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MSC nach wiederholter Behandlung mit Cisplatin oder Etoposid in klinisch relevanten Konzentrationen die MSC-definierenden Eigenschaften beibehielten. Die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Resistenz von MSC erfolgten hauptsächlich für Cisplatin, da diese Substanz eine Relevanz für klinische Anwendungen besitzt und über einen klar definierten Wirkmechanismus verfügt.

Eine Grundlage der Resistenz vieler Tumorzelllinien gegenüber Cisplatin ist die reduzierte intrazelluläre Akkumulation der Substanz (Siddik 2003). Die Analyse des zellulären Platingehaltes ergab nach Behandlung von MSC und sensitiven TGCT-Zellen mit Cisplatin in äquimolaren Konzentrationen eine nahezu identische Platinakkumulation in MSC und TGCT-Zellen. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass die Resistenz von MSC gegenüber Cisplatin nicht durch eine verminderte intrazelluläre Akkumulation der Substanz begründet ist. Trotz des vergleichbaren zellulären Platingehaltes kann nicht unmittelbar auf ein gleiches Ausmaß an DNA-Platinierung geschlossen werden, da mittels AAS nicht zwischen der Platinierung von DNA, RNA und Proteinen oder auch ungebundenem Platin in der Zelle unterschieden werden kann. Jedoch kann bei einer intrazellulären Akkumulation von Platin von einer genotoxischen Schädigung dieser Zelle ausgegangen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MSC verglichen mit sensitiven TGCT-Zellen trotz Hinweisen auf eine vergleichbare genotoxische Schädigung eine erhöhte apoptotische Schwelle für Cisplatin besitzen. Die Cisplatin-induzierte Apoptose war in MSC durch eine fehlende Aktivität der Caspase-9 trotz Spaltung der Procaspase-9 gekennzeichnet. Die Vermutung, dass diese fehlende Aktivität zur Resistenz von MSC beiträgt, wird durch eine andere Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe gestützt, die zeigt, dass eine fehlende Aktivierung der Caspase-9 wesentlich zur Cisplatin-Resistenz einiger TGCT-Zellen beiträgt (Mueller, T *et al.* 2003). In MSC könnte die fehlende Caspase-9-Aktivität auf eine Suppression durch spezifische Inhibitoren (Shiozaki *et al.* 2003) zurückzuführen sein. Ein anderer Grund könnte in einer Sequestrierung der Caspase-9 liegen (Kottke *et al.* 2002). Dadurch wäre die Aktivität der Caspase-9 mittels Caspaseassay unter Umständen nicht nachweisbar, wenn mittels Triton-Lyse bestimmte Zellkompartimente nicht zugänglich wären. Durch diese Mechanismen könnte eine Apoptoseinduktion via Caspase-9 nicht oder nur eingeschränkt stattfinden.

Mechanismen einer Detoxifikation von Cisplatin in MSC wurden nicht analysiert, da die weiteren in der vorliegenden Arbeit erhobenen Resultate hinsichtlich der Zellzyklusregulation auf eine Reparatur der durch Cisplatin herbeigeführten genotoxischen Schädigung hindeuteten.

5.3 Zellzyklusregulation von MSC als möglicher Resistenzmechanismus

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass die durch Zytostatika in subapoptotischen Konzentrationen induzierte genotoxische Schädigung in MSC in einer vermehrten Expression von p53 resultierte. Diese subapoptotische Schädigung erfolgte durch Behandlung mit Zytostatika in den IC90 der sensitiven TGCT-Zellen. Die ebenfalls beobachtete Induktion von p21 als *Downstream*-Signal von p53 deutete auf die Funktionalität des in MSC exprimierten p53 hin. p53 wird nach induzierter genotoxischer Schädigung eine Schlüsselposition in den Signalwegen von Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest zuteil (Lundberg *et al.* 1999). Durch die p53-gesteuerte Signaltransduktion können sowohl Apoptose z. B. durch Aktivierung proapoptotischer und Inhibierung antiapoptotischer Gene als auch ein Zellzyklusarrest, z. B. durch Induktion von p21 sowie inhibierte Expression von Cyclin B und Cdk1 induziert werden (Yu, J *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit war die gesteigerte p53- und p21-Expression nach subapoptotischer Schädigung durch Cisplatin bzw. Etoposid mit einem Zellzyklusarrest assoziiert, wobei für beide Zytostatika ein differentieller Arrest beobachtet wurde.

Die Inkubation von MSC mit Vincristin in subapoptotischer Konzentration führte ebenfalls zu einer gesteigerten Expression von p53. Es wurde hierbei jedoch weder die Induktion von p21 noch die eines Zellzyklusarrestes beobachtet. Bekannt ist, dass die Behandlung mit Vincristin zur Beeinträchtigung der Mikrotubuli, insbesondere der mitotischen Spindel führt und somit in der Arretierung proliferierender Zellen in der Metaphase der Mitose resultiert (Gidding *et al.* 1999). Demzufolge müsste die Zellzyklusanalyse eine Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nach Behandlung von MSC mit Vincristin keine Veränderung der Verteilung innerhalb der Zellzyklusphasen beobachtet. In Kulturen von MSC befinden sich nur ca. 20 % der Zellen in der G2/M-Phase. Somit stellen nur ein Fünftel der Zellen ein direktes Ziel für eine Vincristin-bedingte Schädigung dar. Die verwendete Konzentration von 1 nM resultierte im SRB-Assay bei MSC nur in einer Wachstumsinhibierung von 30 - 40 % gegenüber den Kontrollen. Im Gegensatz zu den Zellzyklusanalysen erfolgte beim SRB-Assay die Analyse erst 3 Tage nach Behandlungsende. Darin kann eine Erklärung für diese beobachtete Diskrepanz - Inhibierung im SRB-Assay und kein Arrest in der Zellzyklusanalyse - liegen. Eine Inhibierung des Wachstums der behandelten Zellen kann durch eine uneingeschränkte Proliferation der unbehandelten Kontrolle im SRB-Assay stärker zur Geltung kommen als bei einer kürzeren Nachbeobachtung. Diese Inhibierung kann unter Umständen in der Zellzyklusanalyse unmittelbar nach Behandlungsende nicht detektierbar sein. Da eine weitere Erhöhung der Vincristin-Konzentration in der Apoptoseinduktion ohne Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung resultierte, erfolgten keine weiteren Analysen nach Behandlung mit Vincristin. Als mögliche weiterführende Schritte zur Untersuchung der

Resistenzmechanismen in MSC gegenüber Vincristin wären eine längere Expositionszeit oder eine längere Nachbeobachtung der behandelten Zellen zu nennen. Da eine Resistenz gegenüber *Vinca*-Alkaloiden durch ABC-Transporterproteine vermittelt werden kann (Gidding *et al.* 1999), sollte deren Expression in MSC analysiert werden, um die Mechanismen der Resistenz gegenüber Vincristin näher zu beleuchten.

Für die weiteren Analysen der Zellzyklusregulation wurde für die Cisplatin-Behandlung eine Konzentration von 2 μM verwendet, die wie die $\text{IC}_{90\text{TGCT}}$ im Bereich der klinisch erreichten Plasmaspiegel lag (Hanada *et al.* 2001; Nagai *et al.* 1998). Für die Etoposid-Behandlung wurde eine Konzentration von 0,75 μM verwendet, die über der $\text{IC}_{90\text{TGCT}}$ aber im Bereich der klinisch erreichten Plasmaspiegel lag (Braybrooke *et al.* 2003).

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der beobachtete Zellzyklusarrest in MSC nach subapoptotischer Schädigung temporär war. Die Rekonstitution der Proliferation in MSC war gekennzeichnet durch eine ursprünglichen Verteilung der Zellzyklusphasen. Die Bestimmung des Zeitpunktes der Rekonstitution erfolgte anhand Morphologie und Konfluenz der Zellen und unterlag somit durch den Begutachtenden beeinflussbaren Kriterien. MSC zeigten nach Rekonstitution der Proliferation nach Zellzyklusarrest unveränderte die MSC-definierenden Charakteristika. Das ließ die Vermutung zu, dass die Fähigkeit von MSC zur Arretierung der Zellzyklusprogression als Reaktion auf genotoxische Schädigung einerseits zum Erhalt des MSC-Charakters und andererseits zur Resistenz und lebenslangen Persistenz von MSC im Organismus beiträgt.

Der Schädigungs-assoziierte Zellzyklusarrest in MSC ging mit der verringerten Expression von Cyclin B und Cdk1 einher, welche p53-gesteuert ist. Es wird somit postuliert, dass es sich um einen p53-induzierten Zellzyklusarrest handelte. Die erhobenen Daten lassen die Vermutung zu, dass die durch Cisplatin induzierte genotoxische Schädigung von MSC einen Zellzyklusarrest am G2/M- sowie am G1/S- Kontrollpunkt zur Folge hatte, da der Anteil an Zellen in der G0/1-Phase trotz intermittierender S-Phasen-Akkumulation nahezu konstant blieb. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass p53 an der Arretierung der Zellzyklusprogression am G1/S- sowie am G2/M-Kontrollpunkt beteiligt ist. Es ist bekannt, dass der Schädigungs-assoziierte Zellzyklusarrest am G1/S-Kontrollpunkt p53-abhängig ist. Der Arrest am G2/M-Kontrollpunkt hingegen kann sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von p53 induziert werden. p53 hat jedoch eine wesentliche Beteiligung an der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrestes (Bunz *et al.* 1998).

Die hier präsentierten Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass in MSC der p53-abhängigen G1/S-Kontrollpunkt aktiv ist. Undifferenzierte Embryonale Karzinomzellen und murine Embryonale Stammzellen besitzen hingegen keinen G1/S-Kontrollpunkt. Aus diesem Grund können sie trotz Aktivierung von p53 keinen Zellzyklusarrest induzieren und sind sensitiv gegenüber genotoxischer Schädigung (Aladjem *et al.* 1998). Somit könnte der

Resistenzgrad von Stammzellen gegenüber genotoxischer Schädigung mit der Dauer ihrer Persistenz sowie ihrer Relevanz für die Genomintegrität des gesamten Organismus assoziiert sein. Die Funktion adulter Stammzellen im Organismus bliebe aufgrund der Resistenz dieser Zellen erhalten, während pluripotente Stammzellen, die Keimzellen entwickeln können, eine hohe Sensitivität gegenüber genotoxischer Schädigung zeigen.

5.4 Förderung des Tumorwachstums durch tumorintegrierte MSC

Die von anderen Autoren beschriebene Einwanderung von MSC in Tumoren konnte am Beispiel von subkutanen DLD1-Xenograften bestätigt werden. Die Nähe der tumorintegrierten MSC zu stromalen Elementen innerhalb der Xenografte legt eine Beteiligung von MSC am Tumorstroma nahe. Das Tumorstroma ist wesentlich an Prozessen wie Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt. Im Mischxenograft-Modell wurde in der vorliegenden Arbeit eine wachstumsfördernde Wirkung von MSC auf DLD1-Xenografte beobachtet, die abhängig vom Anteil der tumorintegrierten MSC war. Da nur diese eine Zelllinie verwendet wurde, ist nicht gesichert, ob es sich hierbei um ein repräsentatives Ergebnis oder um eine Zelllinien-spezifische Beobachtung handelt. Es wurden jedoch bereits ähnliche Beobachtungen in verschiedenen Tumormodellen beschrieben (Djouad *et al.* 2006; Karnoub *et al.* 2007; Ramasamy *et al.* 2007; Yu, JM *et al.* 2008). Auch spezifisch für das CRC wurde eine Wachstumsförderung durch MSC gezeigt (Zhu *et al.* 2006).

Wesentlich scheint hierbei die Beobachtung einer Differenzierung von MSC in Zellen mit Eigenschaften von CAF (Jeon *et al.* 2008; Mishra *et al.* 2008). Es ist bekannt, dass Tumorstroma zu einem wesentlichen Anteil aus CAF, vom Tumor aktivierten Fibroblasten, besteht. Verglichen mit Fibroblasten aus nicht-neoplastischen Geweben fördern CAF das Wachstum von Tumoren (Olumi *et al.* 1999; Orimo *et al.* 2005). CAF zeichnen sich vor allem durch einen myofibroblastären Phänotyp sowie die Expression des Chemokins SDF-1 aus, welches für die Interaktion von Tumorzellen und stromalen Fibroblasten von Bedeutung ist (Orimo *et al.* 2005). Von welchem Zelltyp CAF abstammen ist unbekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass sie dem KM entstammen können (Direkze *et al.* 2004).

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass MSC zu den Vorläuferzellen von CAF gehören, an der Ausbildung eines Tumor-Mikromilieus beteiligt sein könnten und einen Proliferations-fördernden Effekt auf Tumorzellen ausüben könnten. Diese Vermutung wird z. B. durch die Beobachtung eines veränderten Genexpressionsprofils von MSC von Patienten mit Multiplem Myelom im Vergleich zu MSC gesunder Spender gestützt. Ein Teil dieser differentiell exprimierten Gene scheint dabei in Zusammenhang mit der Ausbildung eines Tumor-Mikromilieus zu stehen (Corre *et al.* 2007). Denkbar wären auch eine Förderung des Tumorwachstums durch eine MSC-vermittelte Reduktion der Apoptose in

Tumorzellen (Yu, JM *et al.* 2008) oder eine Beteiligung tumorintegrierter MSC an der Tumorangiogenese, da für MSC eine endotheliale Differenzierung (Oswald *et al.* 2004) sowie eine Anregung der Endothelien-Sprossung (Beckermann *et al.* 2008) gezeigt wurde.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass MSC die Lymphozyteninfiltration in Mischxenograften verringerten und so ein zeitigeres Anwachsen der Xenografte ermöglichten. Allerdings wurden in jener Arbeit Tumorzellen und MSC im Verhältnis 1:1 gemischt (Djouad *et al.* 2006). Dieser hohe Anteil an MSC ist nur unter der Annahme des Modells einer prämetastatischen Nische (Psaila *et al.* 2009) physiologisch. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die wachstumsfördernde Wirkung mit der Menge an tumorintegrierten MSC korreliert. Dies könnte mit der These der Verringerung der Lymphozyteninfiltration in Einklang stehen. Aufgrund der ambivalenten Datenlage hinsichtlich des Effektes tumorintegrierter MSC auf das Tumorwachstum im Tiermodell, ist für deren therapeutische Anwendung ein genaueres Verständnis der involvierten Mechanismen notwendig.

Im hier verwendeten Tumormodell war ein MSC-Anteil am Tumor von mehr als 3 % notwendig, um einen relevanten wachstumsfördernden Effekt auszuüben. Dieser Anteil MSC am Tumor könnte physiologisch auch unter Annahme des Modells der sekundären Einwanderung erreicht werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung der Einwanderung von dem KM entstammenden Stromazellen zu einem Anteil von 10 % in das Tumorstroma humaner CRC-Xenografte gestützt. Da das Tumorstroma in jener Studie etwa 17 % des Tumors ausmachte, ergab sich für KM-Stromazellen ein Anteil von 1,7 % am Gesamttumor (Sangai *et al.* 2005).

Die Tumorintegration systemisch applizierter MSC scheint abhängig vom verwendeten Modell zu sein. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Tumorintegration im subkutanen Modell war durch eine geringe Effizienz gekennzeichnet. Diese war vermutlich auf den pulmonalen Tropismus der transplantierten Zellen zurückzuführen. Unterstützt wird dies durch Arbeiten, die einen pulmonalen Tropismus für systemisch applizierte humane MSC beschrieben (Barbash *et al.* 2003; Bentzon *et al.* 2005; Hakkarainen *et al.* 2007; Kidd *et al.* 2009). Dieser Tropismus systemisch transplantierte MSC scheint mechanisch über die Größe von MSC oder durch Zell-Zell-Interaktion aufgrund ihrer Fähigkeit zur Adhäsion vermittelt zu sein. Humane MSC in Suspension sind ca. 2- bis 3-mal größer als Granulozyten (Koc *et al.* 2000) und könnten aufgrund ihrer Größe in den Kapillaren der Lunge embolisieren (Lee *et al.* 2009). Dafür spricht z. B., dass durch Applikation eines Vasodilatators vor Transplantation der pulmonale Tropismus von MSC reduziert wurde (Gao *et al.* 2001). Aufgrund ihrer Adhärenz könnten MSC auch spezifisch an Fibronectin-reiche endotheliale Bereiche *in vivo* adhären. Erste weiterführende Versuche in unserer Arbeitsgruppe bezüglich dieser Problematik ergaben, dass mittels transgenem Fluoreszenzprotein

markierte MSC einen geringeren pulmonalen Tropismus zeigten als mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff Dil markierte MSC. Ein Grund hierfür könnte in der Einlagerung des Farbstoffes in die Zellmembran liegen, wodurch die Adhäsionsfähigkeit der Zellen modifiziert sein könnte.

5.5 MSC als Vehikel einer Tumorthherapie

Für die vorliegende Arbeit wurde TRAIL als Faktor mit Anti-Tumor-Aktivität zur transgenen Expression in MSC gewählt. TRAIL verspricht aufgrund der selektiven Toxizität für viele maligne Zellen eine geringe systemische Toxizität. Im gewählten Tumormodel wurde eine differentielle Sensitivität gegenüber TRAIL in einem Panel von 9 CRC-Zelllinien beobachtet. MSC waren resistent gegenüber TRAIL, in Übereinstimmung mit der Resistenz nicht-maligner Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose. Speziell für MSC wurde dies durch eine aktuell publizierte Studie bestätigt (Szegezdi *et al.* 2008). Die gewählte Konzentration von 100 ng/ml entsprach nur etwa 0,1 - 1 % der Konzentration, welche in klinischen Studien mit rekombinantem TRAIL (Ling *et al.* 2006) erreicht wurde. Sie war jedoch vergleichbar mit den Konzentrationen, welche in anderen *In-vitro*-Studien verwendet wurden (Ashkenazi *et al.* 1999; Galligan *et al.* 2005). In jenen Arbeiten wurde darüberhinaus gezeigt, dass eine weitere Erhöhung der Konzentration in keinem veränderten Ansprechen der Zellen *in vitro* resultierte. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass das Ansprechen auf eine Behandlung mit 100 ng/ml sTRAIL für 24 h den Status der TRAIL-Sensitivität *in vitro* im gewählten Tumormodell repräsentierte.

Lentivirale Transduktionssysteme zeichnen sich durch hohe Transduktionseffizienz, insbesondere durch Integration in das Genom von Zielzellen unabhängig von deren Proliferation und stabile Transgenexpression aus (Zhang *et al.* 2002). Das hier verwendete lentivirale System basiert auf dem Transfervektor pFUGW mit selbst-inaktivierender 3'-LTR und einem Verpackungssystem der 3. Generation (Lois *et al.* 2002). Obwohl die hier vorliegende Arbeit den Nachweis der Funktionalität des Systems - TRAIL als Anti-Tumorgen, das CRC als Tumormodell und MSC als therapeutisches Vehikel - erbringen soll und nicht direkt auf eine klinische Anwendung abzielt, wurde ein virales System gewählt, welches aus klinischer Sicht einen Großteil der Sicherheitsanforderungen an lentivirale Vektoren erfüllte (Neschadim *et al.* 2007). Aktuell wurde eine neue Generation von Lentiviren für therapeutische Anwendungen zur Erhöhung deren Sicherheit entwickelt (Neschadim *et al.* 2007). Diese viralen Vektoren enthalten neben dem therapeutischen Transgen einen molekularen „safety switch“. Dazu gehören die Einführung eines Suizidgens, z. B. der humanen Thymidylat-Monophosphat-Kinase, welche die Aktivierung des Prodrugs Zidovudin in die zytotoxische Form katalysiert (Sato *et al.* 2007) sowie die transgene Expression spezifischer Zelloberflächenantigene, die eine Eliminierung der Zellen mittels eines

Antikörpern erlauben (Ramsubir *et al.* 2007). Mit diesen Methoden kann im Falle einer malignen Transformation der transduzierten Zellen deren selektive Eliminierung gewährleistet werden. Das Risiko einer Insertionsmutagenese wird dadurch jedoch nicht verringert. In Hinblick auf eine klinische Anwendung transgener MSC sollten Alternativen erwogen werden, die dieses Risiko nahezu ausschließen.

Als alternative Methoden der Generierung transgener MSC sind z. B. die Transduktion mittels adenoviraler Vektoren sowie die Verwendung von Nanopartikeln zu nennen. Adenovirale Vektoren erlauben eine effiziente Transduktion unabhängig von der Teilung der Zielzellen und integrieren nicht in das Zielzellgenom, wodurch kein Risiko einer Insertionsmutagenese besteht (Lundstrom 2003; Schaffer *et al.* 2008). Ein Verlust der Wirkung der transplantierten transgenen MSC aufgrund der transienten Transgenexpression könnte durch wiederholte Transplantation ausgeglichen werden. Eine vielversprechende Entwicklung aus dem Bereich der Nanotechnologie stellen Nanopartikel - artifizielle Viren - dar (Mastrobattista *et al.* 2006). Artifizielle Viren sind synthetische Gentransferpartikel, die im Aufbau viralen Vektoren ähneln (Lim *et al.* 2008) und eine Effizienz und Zielzellspezifität, kombiniert mit biologischer Sicherheit versprechen. Sie besitzen ein geringes immunogenes Risiko und integrieren nicht in das Zielzellgenom (Mastrobattista *et al.* 2006). Die Transfektion bakterieller Plasmide stellt auf der Grundlage der eigenen Vorarbeiten, sowie der Daten anderer Arbeitsgruppen (Haleem-Smith *et al.* 2005) speziell für MSC derzeit aufgrund der geringen Transfektionseffizienz keine Alternative dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MSC nach lentiviraler Transduktion TRAIL stabil unter Beibehalt der MSC-definierenden Eigenschaften, ohne Apoptoseinduktion und ohne Anzeichen einer malignen Transformation exprimierten. Die beobachtete reduzierte TRAIL-Expression in MSC später Passagen schien nicht funktionell relevant zu sein, da die funktionellen Analysen, *In-vitro*-Kokulturen sowie *In-vivo*-Versuche, fast ausschließlich mit TRAIL-MSC später Passagen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Kokulturen legten nahe, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt von CRC-Zellen und TRAIL-MSC für eine Apoptoseinduktion notwendig war. Für einen therapeutischen Einsatz von TRAIL-MSC wäre somit deren Proliferation notwendig, um nach Apoptoseinduktion in den benachbarten Tumorzellen mit den übrigen Tumorzellen in Kontakt zu bleiben. Dass die Proliferation von MSC nach Tumorintegration möglich ist, wurde bereits in anderen Studien bestätigt (Hung *et al.* 2005). Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden Studien speziell zu TRAIL-transgenen MSC veröffentlicht, die deren Potential zur Behandlung von Malignomen darstellen (Kim *et al.* 2008; Loebinger *et al.* 2009; Mohr *et al.* 2008; Yang, B *et al.* 2009). Das Interesse anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich MSC als therapeutische Vehikel und TRAIL als Transgen unterstreicht somit die Relevanz der hier vorgelegten Ergebnisse. Im Unterschied zu den anderen Arbeiten, die vorliegende Dissertation eingeschlossen, in

denen es sich um transmembranäres TRAIL handelte, wurden in einer Arbeit adenoviral transgene MSC generiert, welche trimeres TRAIL sezernierten (Kim *et al.* 2008). Diese sezernierte Form könnte im therapeutischen Einsatz einen größeren Wirkungsradius erzielen, da in diesem Modell der Zell-Zell-Kontakt von MSC und Tumorzellen für eine Apoptoseinduktion nicht essentiell ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *TRAIL*-MSC in ausgewählten TRAIL-resistenten CRC-Zelllinien Apoptose induzierten. Die TRAIL-Resistenz dieser Zelllinien wurde durch Arbeiten anderer Autoren bestätigt (Tillman *et al.* 2003; Yoshida *et al.* 2008). Gründe für eine Apoptoseinduktion in TRAIL-resistenten Zellen durch *TRAIL*-MSC könnten z. B. in der Bildung oligomerer Formen des transgenen TRAIL liegen. So ist z. B. bekannt, dass einige Zellen resistent gegenüber trimere TRAIL, jedoch sensitiv gegenüber höherwertigen oligomerer Formen von TRAIL sind (LeBlanc *et al.* 2003). An dieser Stelle wäre es interessant zu untersuchen, ob die von MSC sezernierte Form von TRAIL (Kim *et al.* 2008) zur Induktion von Apoptose in diesen TRAIL-resistenten CRC-Zelllinien führt.

In Kokulturen mit HCT8-Zellen wurde durch *TRAIL*-MSC verglichen mit WT-MSC eine Reduktion der CRC-Population erreicht, jedoch keine Reduktion der initial eingesetzten CRC-Zellzahl. Nach anfänglicher Reduktion wurde ein geringer Anstieg der CRC-Zellzahl beobachtet. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der beobachteten Überwindung der TRAIL-Resistenz in HCT8-Zellen durch *TRAIL*-MSC. Der für eine Apoptoseinduktion durch *TRAIL*-MSC erforderliche Zell-Zell-Kontakt kam nur am Rand einer CRC-Kolonie zustande. Dadurch wurden die CRC-Zellen innerhalb der Kolonien nicht an der Proliferation gehindert. Vermutlich aufgrund der Proliferationsrate der HCT8-Zellen innerhalb dieser Kolonien zeigte sich in der Gesamtpopulation ein leichter Anstieg des CRC-Anteils, da für HCT8-Zellen verglichen mit DLD1-Zellen im gleichen Zeitraum eine höhere Proliferationsrate beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die sowohl TRAIL-resistente als auch *TRAIL*-MSC-resistente Zelllinie HT29 durch Inkubation mit Oxaliplatin in subapoptotischer Konzentration für durch *TRAIL*-MSC induzierte Apoptose sensitiviert. Die dabei beobachtete fehlende Proliferation ohne adäquate Entstehung flotierender Zellen in Kokulturen mit WT-MSC unter Zusatz von Oxaliplatin deutet auf einen Oxaliplatin-induzierten Zellzyklusarrest hin (Volland *et al.* 2006). Die gewählte Konzentration von 3 μM lag unter dem mit Oxaliplatin erreichten Peak-Plasmaspiegel von 6 μM (Levi *et al.* 2000) und kann daher als repräsentativ für eine niedrigdosierte Chemotherapie angesehen werden.

MSC mit transgener Expression von Faktoren mit Anti-Tumor-Aktivität besitzen das Potential, einen starken inhibitorischen Effekt auf Tumoren im Tiermodell auszuüben. Ein solcher Effekt wurde sowohl nach i. v. Transplantation transgener MSC in orthotopen (Studený *et al.* 2002; 2004) und subkutanen Modellen (Kucerova *et al.* 2007) als auch in

Mischxenograften (Studený *et al.* 2002) und nach intratumoraler Injektion (Kim *et al.* 2008; Mohr *et al.* 2008) beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden Mischxenografte für erste Untersuchungen der *In-vivo*-Aktivität transgener MSC verwendet. Mischxenografte können einfach generiert und gut beobachtet werden, ein Nachteil stellt jedoch die artifizielle Lokalisation dar. Intratumorale Injektionen wurden nicht in Betracht gezogen, da die Injektion eine mechanische Beschädigung darstellt, durch die das Ergebnis nicht-reproduzierbar beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Studie wurde eine Inhibierung des Tumorwachstums von Mischxenograften der TRAIL-sensitiven Zelllinie DLD1 sowie der TRAIL-resistenten HCT8 durch *TRAIL*-MSC beobachtet. Somit wurde die *in vitro* beobachtete Überwindung der TRAIL-Resistenz von HCT8-Zellen durch *TRAIL*-MSC *in vivo* bestätigt. Die Wachstumsinhibierung war vom Anteil der tumorintegrierten *TRAIL*-MSC abhängig. Der Nachweis von Apoptose innerhalb etablierter Xenografte legte nahe, dass Apoptoseinduktion eine Rolle bei der Wachstumsinhibierung spielte. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Beobachtungen einer Inhibierung des Tumorwachstums durch tumorintegrierte *TRAIL*-transgene MSC im Modell subkutaner Mischxenografte (Loebinger *et al.* 2009).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete fehlende Effekt systemischer applizierter *TRAIL*-MSC auf das Tumorwachstum war vermutlich auf deren geringe Tumorintegration zurückzuführen. Der Anteil tumorintegrierter MSC nach systemischer Applikation betrug weniger als 0,5 %. Das entsprach weniger als einem Sechstel des in Mischxenograften für eine Inhibierung des Tumorwachstums nötigen Anteils an tumorintegrierten *TRAIL*-MSC. Subkutane Xenografte sind möglicherweise ein ungünstiges Modell für die Untersuchung der Einwanderung systemisch applizierter MSC. Im Gegensatz dazu stehen jedoch Beobachtungen anderer Autoren, die eine Tumorintegration (Karnoub *et al.* 2007; Khakoo *et al.* 2006; Kucerova *et al.* 2007) sowie eine Proliferation (Hung *et al.* 2005) systemisch applizierter MSC in subkutanen Tumoren gezeigt haben.

Wie bereits in Abschnitt 5.4 diskutiert, war die geringe Tumorintegration vermutlich auf den pulmonalen Tropismus der systemisch applizierten MSC zurückzuführen. In vielen Studien, in denen ein Anti-Tumor-Effekt transgener MSC nach systemischer Applikation beschrieben wurde, wurden pulmonale Tumormodelle verwendet (Kanehira *et al.* 2007; Loebinger *et al.* 2009; Stoff-Khalili *et al.* 2007; Studený *et al.* 2004). Der beobachtete pulmonale Tropismus der applizierten MSC könnte den verstärkten Anti-Tumor-Effekt in pulmonalen Tumormodellen im Vergleich zu subkutanen Tumormodellen erklären. Trotz pulmonalem Tropismus zeigen systemisch applizierte MSC eine funktionelle Integration in pulmonale Xenografte, d. h. die Migration aus dem Lungenparenchym in Tumoren (Studený *et al.* 2002). Fraglich ist jedoch, ob diese Integration ohne pulmonalen Tropismus der *i. v.* applizierten Zellen mit einer solchen Effizienz erfolgen würde.

Trotz des pulmonalen Tropsimus i. v. applizierter *TRAIL*-MSC zeigten die Tiere keine Anzeichen einer Toxizität der transplantierten Zellen. Somit scheinen im Versuchstier keine Nebenwirkungen aufzutreten. Da es sich jedoch um immundefiziente Tiere handelte, ist eine Aussage bezüglich potentieller Nebenwirkungen im Menschen nur eingeschränkt möglich. Möglicherweise ist die bei Mäusen beobachtete pulmonale Ansammlung von systemisch applizierten MSC im Menschen nicht relevant, was auch die beobachteten klinischen Effekte bei Patienten nach systemischer Transplantation nativer MSC (Christopeit *et al.* 2008; Horwitz *et al.* 2002; Koc *et al.* 2002; Lazarus *et al.* 2005; Le Blanc *et al.* 2008) vermuten lassen.

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Anwendbarkeit *TRAIL*-transgener MSC muß zunächst die Einwanderung der transplantierten Zellen in Tumoren verbessert werden. Mögliche Ansätze bestehen in der Modulation der Migrationskapazität von MSC. Durch Veränderung der Oberflächenantigenexpression von MSC ist es bereits gelungen deren Einwanderung in Knochen zu erhöhen (Sackstein *et al.* 2008). Eine andere Möglichkeit stellt die Vorbehandlung der Zellen *in vitro* dar; eine vermehrte Migration wurde nach Vorbehandlung von MSC mit $\text{TNF}\alpha$ beobachtet (Ponte *et al.* 2007). Einen weiteren Ansatz stellt die Modulation der Zytokin-Expression des Tumors dar. Bestrahlung oder Chemotherapie in niedrigen Dosen führen zu einer Schädigung des Tumors, die in einer Ausschüttung von Chemokinen resultiert, ähnlich der einer Entzündung, und zur Rekrutierung diverser Zellen führt. Speziell für MSC wurde deren verstärkte Integration in Tumoren nach Bestrahlung der Tumoren belegt (Klopp *et al.* 2007).

Sollte trotz Optimierungsversuchen die Einwanderung systemisch applizierter MSC in subkutane Xenografte unzureichend sein, sollte auf orthotope oder intraperitoneale Tumormodelle zurückgegriffen werden. Insbesondere deren Dokumentation stellt sich jedoch schwieriger dar, als die subkutaner Modelle. Pulmonale Tumormodelle sollten, wie bereits diskutiert, kritisch betrachtet werden.

Es wurde somit bestätigt, dass es möglich ist, transgene MSC als Therapievehikel in Kombination mit *TRAIL* als Faktor mit Anti-Tumor-Aktivität zur Behandlung des CRC zu verwenden. Weiterhin wurde bestätigt, dass die Tumorintegration systemisch transplantierte MSC zu den kritischen Faktoren gehört und ausgehend von den generierten Daten momentan den limitierenden Faktor dieser Form der Therapie darstellt. Aus diesem Grund ist die Wirksamkeit dieser Tumortherapie vorerst kritisch zu betrachten.

6 AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss von Erkrankungen und Medikationen auf die Isolierbarkeit von CFU-F aus dem KM evaluiert. Ein Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass anhand der erhobenen Daten keine Multivarianzanalyse möglich war. Während der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe ca. 400 MSC-Präparationen durchgeführt. Eine Analyse deren Spenderdaten könnte Aufschluss über Einflüsse diverser Faktoren auf die Isolierbarkeit von CFU-F geben.

Die erhobenen Daten lassen den Erhalt der definierenden Charakteristika von MSC nach genotoxischer Schädigung durch Induktion eines z. T. p53-abhängigen Zellzyklusarrestes vermuten. Eine Manipulation der Zellzyklusregulation zur Inhibierung dieses Arrestes könnte Aufschluss über Mechanismen des Erhaltes des MSC-Charakters geben und könnte durch Repression von p53 oder CKI oder durch Überexpression von Cdk erfolgen. Weitere Einblicke in die Zellzyklusregulation von MSC versprechen ein weiteres Verständnis der Biologie und der Resistenz von Stammzellen und bieten einen Ansatz zur *Ex-vivo*-Mobilisierung von MSC aus dem Organsimus

Um die klinische Anwendung von *TRAIL*-MSC weiter zu evaluieren, müssen u. a. folgende Aspekte optimiert bzw. untersucht werden: das Risiko der Insertionsmutagenese durch Integration viraler Sequenzen in das Genom der Vehikelzellen, die Tumorintegration der systemisch transplantierten MSC sowie die Existenz *TRAIL*-MSC-resistenter Tumorzellen. Trotz des nur geringen Risikos einer Insertionsmutagenese durch lentivirale Vektoren, sollten für eine klinische Anwendung alternative Methoden der genetischen Modifikation erwogen werden. Alternativ sollten die adenovirale Transduktion von MSC und perspektivisch insbesondere die genetische Modifikation mittels artifizieller Viren etabliert werden. Aussagen über den Effekt systemisch transplantierte *TRAIL*-MSC auf das Tumorwachstum konnten anhand der generierten Daten aufgrund der unzureichenden Integration in subkutane Tumoren nur begrenzt getroffen werden. Eine effizientere Integration könnte durch die *In-vitro*-Vorbehandlung von MSC oder die Vorbehandlung der Tumoren, z. B. mittels niedrigdosierter Chemotherapie erreicht werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass geeignetere Tumormodelle, z. B. orthotope Xenografte für Untersuchungen zur Tumorintegration systemisch applizierter MSC etabliert werden müssen. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde *in vitro* eine Sensitivierung *TRAIL*-MSC-resistenter CRC-Zellen durch subapoptische Konzentrationen Oxaliplatin für *TRAIL*-induzierte Apoptose durch *TRAIL*-MSC gezeigt. Wesentlich erscheint die Etablierung eines solchen Modells *in vivo*, welches eine Kombinationstherapie von *TRAIL*-MSC-Transplantation und paralleler Chemotherapie simuliert.

7 ZUSAMMENFASSUNG

MSC von Spendern nach vorangegangener Chemotherapie waren zu Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation wenig charakterisiert. Die verfügbaren Daten deuteten auf eine Resistenz von MSC gegenüber Schädigungen im Organismus hin, die beteiligten Mechanismen waren jedoch unbekannt. Die Fähigkeit von MSC in maligne Tumoren zu integrieren eröffnete die Möglichkeit einer Tumortherapie durch tumorintegrierende MSC mit transgener Expression antineoplastischer Faktoren. Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand zunächst die Isolierung und Charakterisierung von MSC aus dem Knochenmark bei Patienten nach vorangegangener Chemotherapie. Die postulierte Resistenz von MSC gegenüber Zytostatika *in vitro* sollte charakterisiert und mögliche Resistenzmechanismen identifiziert werden. Weiterhin sollte der Nachweis einer Integration systemisch applizierter MSC in humane CRC-Xenografte erfolgen. Einen fünften Schwerpunkt stellte die Untersuchung des Potentials transgener MSC als mögliche Vehikel einer Tumortherapie am Beispiel des proapoptotischen Faktors TRAIL und des CRC dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MSC aus dem Knochenmark von Patienten nach vorangegangener Chemotherapie isoliert werden konnten. Diese Zellen zeigten die MSC-definierenden Charakteristika und unterschieden sich in diesen nicht von MSC gesunder Spender. Somit stehen autologe MSC für potentielle klinische Anwendungen in Chemotherapie-behandelten Patienten zur Verfügung.

MSC zeigten eine Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung durch Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen. Anhand eines *In-vitro*-Modells der genotoxischen Schädigung wurde belegt, dass MSC die definierenden Eigenschaften nach Schädigung durch Cisplatin und Etoposid beibehielten. MSC zeigten im Vergleich zu sensitiven Tumorzellen trotz ähnlicher Platinakkumulation eine erhöhte apoptotische Schwelle für Cisplatin-induzierte Apoptose, die durch eine fehlende Caspase-9-Aktivität gekennzeichnet war.

Subapoptotische Konzentrationen der Zytostatika Cisplatin und Etoposid induzierten in MSC einen p53-assoziierten temporären Zellzyklusarrest. MSC behielten nach diesem temporären Zellzyklusarrest ihre definierenden Charakteristika bei. Der Schädigungs-assoziierte Zellzyklusarrest war durch eine gesteigerte Expression von p21 sowie eine reduzierte Expression von Cyclin B und Cdk1 gekennzeichnet. Somit steht die Zytostatika-Resistenz von MSC mit der Induktion eines temporären Zellzyklusarrestes in Zusammenhang, der vermutlich zum Erhalt ihrer definierenden Charakteristika beiträgt.

MSC wanderten nach systemischer Transplantation in präformierte subkutane CRC-Xenografte ein und waren somit für die Verwendung als therapeutische Vehikel einer Tumortherapie geeignet. Es zeigte sich jedoch, dass native tumorintegrierte MSC das Tumorwachstum in Abhängigkeit ihres Anteils am Tumor unterstützten.

In einem Panel von 9 CRC-Zelllinien wurde eine differentielle Sensitivität für TRAIL gezeigt, während MSC resistent gegenüber TRAIL waren. TRAIL war somit ein geeigneter proapoptotischer Faktor für die transgene Expression in MSC. *TRAIL*-MSC wurden mit Hilfe eines lentiviralen Konstruktes der 3. Generation unter Beibehalt der MSC-definierenden Charakteristika generiert. Sie zeichneten sich durch eine stabile Expression von transmembranärem TRAIL ohne maligne Transformation aus. *TRAIL*-MSC induzierten sowohl in TRAIL-sensitiven als auch in ausgewählten TRAIL-resistenten CRC-Zellen bei direktem Zell-Zell-Kontakt Apoptose. Die *TRAIL*-MSC-resistente Zelllinie HT29 konnte durch Koinkubation mit subapoptotischer Konzentration Oxaliplatin für TRAIL-induzierte Apoptose durch *TRAIL*-MSC sensitiviert werden. Im Mischxenograftmodell wurde durch *TRAIL*-MSC eine Wachstumsinhibierung TRAIL-sensitiver CRC-Xenografte in Abhängigkeit des Anteils tumorintegrierter *TRAIL*-MSC sowie eine Wachstuminhibierung TRAIL-resistenter CRC-Xenografte beobachtet. Der fehlende Effekt systemisch applizierter *TRAIL*-MSC auf das Wachstum subkutaner CRC-Xenografte war vermutlich auf deren geringe Tumorintegration zurückzuführen. Diese geringe Integration schien mit einem pulmonalen Tropismus der applizierten *TRAIL*-MSC in Zusammenhang zu stehen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmalig die systematische Untersuchung der Isolierbarkeit und Charakterisierung von MSC bei Patienten nach Chemotherapie sowie die Kombination von MSC als Therapievehikel und lentiviral transduziertem TRAIL als Anti-Tumor-Gen als Behandlungsoption für das CRC im Rahmen einer MSC-basierenden Tumorthherapie publiziert.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdallah BM and Kassem M (2009). "The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives." *J Cell Physiol* 218(1): 9-12.
- Aboudy KS, Najbauer J and Danks MK (2008). "Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy." *Gene Ther* 15(10): 739-752.
- Adams JM (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." *Genes Dev* 17(20): 2481-2495.
- Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R and Wahl GM (1998). "ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage." *Curr Biol* 8(3): 145-155.
- Almasan A and Ashkenazi A (2003). "Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4): 337-348.
- Anderson DJ, Gage FH and Weissman IL (2001). "Can stem cells cross lineage boundaries?" *Nat Med* 7(4): 393-395.
- Andrews PW, Bronson DL, Benham F, Strickland S and Knowles BB (1980). "A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma." *Int J Cancer* 26(3): 269-280.
- Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O and Bonetti B (2008). "Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev* 17(5): 909-916.
- Ashkenazi A and Dixit VM (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-1308.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z and Schwall RH (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *J Clin Invest* 104(2): 155-162.
- Ashkenazi A and Herbst RS (2008). "To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists." *J Clin Invest* 118(6): 1979-1990.
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE and Christ B (2007). "Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers." *Gut* 56(3): 405-415.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (Hrsg). (2002). "Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium from Methods from Current Protocols in Molecular Biology." Wiley & Sons, New York.
- Avital I, Moreira AL, Klimstra DS, Leversha M, Papadopoulos EB, Brennan M and Downey RJ (2007). "Donor-derived human bone marrow cells contribute to solid organ cancers developing after bone marrow transplantation." *Stem Cells* 25(11): 2903-2909.
- Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F and Fibbe WE (2007). "Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation." *Blood* 110(7): 2764-2767.
- Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R and Quarto R (2000). "Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy." *Exp Hematol* 28(6): 707-715.
- Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R and Quarto R (2001). "Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment." *Leuk Lymphoma* 42(5): 863-870.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA and Leor J (2003). "Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution." *Circulation* 108(7): 863-868.

- Barry FP and Murphy JM (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." *Int J Biochem Cell Biol* 36(4): 568-584.
- Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T and Bühring HJ (2007). "Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation." *Differentiation* 75(4): 279-291.
- Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GT, Church HJ, Wraith JE, Carr TF and Fairbairn LJ (2002). "Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I." *Blood* 99(5): 1857-1859.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ and Bellantuono I (2004). "Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion." *Stem Cells* 22(5): 675-682.
- Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Buchler MW, Friess H, Buchler P and Herr I (2008). "VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma." *Br J Cancer* 99(4): 622-631.
- Bentzon JF, Stenderup K, Hansen FD, Schroder HD, Abdallah BM, Jensen TG and Kassem M (2005). "Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene." *Biochem Biophys Res Commun* 330(3): 633-640.
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O and Locatelli F (2007). "Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms." *Cancer Res* 67(19): 9142-9149.
- Bouralexis S, Findlay DM and Evdokiou A (2005). "Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL." *Apoptosis* 10(1): 35-51.
- Boyum A (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77-89.
- Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braybrooke JP, Levitt NC, Joel S, Davis T, Madhusudan S, Turley H, Wilner S, Harris AL and Talbot DC (2003). "Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase IIalpha expression." *Clin Cancer Res* 9(13): 4682-4688.
- Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE and Fleischmann BK (2007). "Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts." *Blood* 110(4): 1362-1369.
- Brenner S and Malech HL (2003). "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy." *Biochim Biophys Acta* 1640(1): 1-24.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW and Vogelstein B (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." *Science* 282(5393): 1497-1501.
- Burden DA and Osheroff N (1998). "Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme." *Biochim Biophys Acta* 1400(1-3): 139-154.
- Caplan AI (1991). "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* 9(5): 641-650.
- Carlo-Stella C, Tabilio A, Regazzi E, Garau D, La Tagliata R, Trasarti S, Andrizzi C, Vignetti M and Meloni G (1997). "Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors." *Bone Marrow Transplant* 20(6): 465-471.
- Carlson BM (1999). "Human Embryology and Developmental Biology." Elsevier Ltd., Oxford.

- Casper J, Schmoll HJ, Schnaidt U and Fonatsch C (1987). "Cell lines of human germinal cancer." *Int J Androl* 10(1): 105-113.
- Caysa H, Maeder K, Metz H, Mueller LP, Luetzkendorf J, Schmoll HJ and Mueller T "Monitoring of xenograft tumour growth and response to chemotherapy by non-invasive in vivo fluorescence imaging." *Manuscript in preparation*.
- Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM and Rameshwar P (2006). "Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma." *Blood* 107(12): 4817-4824.
- Chau I and Cunningham D (2009). "Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how?" *Br J Cancer* 100(11): 1704-1719.
- Chen C and Okayama H (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* 7(8): 2745-2752.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Christopeit M, Schendel M, Foll J, Muller LP, Keysser G and Behre G (2008). "Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L." *Leukemia* 22(5): 1062-1064.
- Clements JE and Zink MC (1996). "Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections." *Clin Microbiol Rev* 9(1): 100-117.
- Cockrell AS and Kafri T (2007). "Gene delivery by lentivirus vectors." *Mol Biotechnol* 36(3): 184-204.
- Cogle CR, Theise ND, Fu D, Ucar D, Lee S, Guthrie SM, Lonergan J, Rybka W, Krause DS and Scott EW (2007). "Bone marrow contributes to epithelial cancers in mice and humans as developmental mimicry." *Stem Cells* 25(8): 1881-1887.
- Colburn NH, Bruegge WF, Bates JR, Gray RH, Rossen JD, Kelsey WH and Shimada T (1978). "Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells." *Cancer Res* 38(3): 624-634.
- Conget PA and Minguell JJ (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." *J Cell Physiol* 181(1): 67-73.
- Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, Danho C, Laharrague P, Klein B, Reme T and Bourin P (2007). "Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma." *Leukemia* 21(5): 1079-1088.
- Corsten MF and Shah K (2008). "Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare." *Lancet Oncol* 9(4): 376-384.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhning HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J and Peault B (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." *Cell Stem Cell* 3(3): 301-313.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P and Traganos F (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 13(8): 795-808.
- De Palma M, Montini E, Santoni de Sio FR, Benedicenti F, Gentile A, Medico E and Naldini L (2005). "Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells." *Blood* 105(6): 2307-2315.
- Degterev A, Boyce M and Yuan J (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* 22(53): 8543-8567.
- Devine SM and Hoffman R (2000). "Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation." *Curr Opin Hematol* 7(6): 358-363.

- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulosom R, Oukrif D, Alison MR and Wright NA (2004). "Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts." *Cancer Res* 64(23): 8492-8495.
- Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C and Noel D (2006). "Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells." *Transplantation* 82(8): 1060-1066.
- Domenech J, Roingeard F, Herault O, Truglio D, Desbois I, Colombat P and Binet C (1998). "Changes in the functional capacity of marrow stromal cells after autologous bone marrow transplantation." *Leuk Lymphoma* 29(5-6): 533-546.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 315-317.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH and Calos MP (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol Cell Biol* 7(1): 379-387.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D and Naldini L (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol* 72(11): 8463-8471.
- Dvorak HF (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." *N Engl J Med* 315(26): 1650-1659.
- Elmore S (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA and Middleton J (2007). "Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking." *Br J Haematol* 137(6): 491-502.
- Freedman VH and Shin SI (1974). "Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium." *Cell* 3(4): 355-359.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." *Cell Tissue Kinet* 3(4): 393-403.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Exp Hematol* 4(5): 267-274.
- Froelich-Ammon SJ and Osheroff N (1995). "Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism." *J Biol Chem* 270(37): 21429-21432.
- Fuertes MA, Alonso C and Perez JM (2003). "Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance." *Chem Rev* 103(3): 645-662.
- Galligan L, Longley DB, McEwan M, Wilson TR, McLaughlin K and Johnston PG (2005). "Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP." *Mol Cancer Ther* 4(12): 2026-2036.
- Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R and Quarto R (1999). "Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients." *Exp Hematol* 27(9): 1460-1466.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M and Caplan AI (2001). "The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion." *Cells Tissues Organs* 169(1): 12-20.
- Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA and de Graaf SS (1999). "Vincristine revisited." *Crit Rev Oncol Hematol* 29(3): 267-287.
- Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H and Fisk NM (2007). "Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC." *Stem Cells* 25(3): 646-654.
- Hakkarainen T, Sarkioja M, Lehenkari P, Miettinen S, Ylikomi T, Suuronen R, Desmond RA, Kanerva A and Hemminki A (2007). "Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors." *Hum Gene Ther* 18(7): 627-641.

- Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ and Tuan RS (2005). "Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro." *Mol Biotechnol* 30(1): 9-20.
- Hamada H, Kobune M, Nakamura K, Kawano Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Matsunaga T and Niitsu Y (2005). "Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy." *Cancer Sci* 96(3): 149-156.
- Hanada K, Nishijima K, Ogata H, Atagi S and Kawahara M (2001). "Population pharmacokinetic analysis of cisplatin and its metabolites in cancer patients: possible misinterpretation of covariates for pharmacokinetic parameters calculated from the concentrations of unchanged cisplatin, ultrafiltered platinum and total platinum." *Jpn J Clin Oncol* 31(5): 179-184.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE and Brenner MK (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nat Med* 5(3): 309-313.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L and Hofmann T (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8932-8937.
- Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH, Wei HJ and Gelovani JG (2005). "Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging." *Clin Cancer Res* 11(21): 7749-7756.
- Huss R and Moosmann S (2002). "The co-expression of CD117 (c-kit) and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases." *Br J Haematol* 118(1): 305-312.
- Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS and Kim JH (2008). "Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells." *Stem Cells* 26(3): 789-797.
- Johnson DG and Walker CL (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295-312.
- Jordan MA and Wilson L (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* 4(4): 253-265.
- Kanehira M, Xin H, Hoshino K, Maemondo M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Matsumoto K, Nakamura T, Nukiwa T and Saijo Y (2007). "Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Cancer Gene Ther* 14(11): 894-903.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R and Weinberg RA (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature* 449(7162): 557-563.
- Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F and Rudolph P (2002). "Culprit and victim -- DNA topoisomerase II." *Lancet Oncol* 3(4): 235-243.
- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Eishal MF, Rovira, II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M and Finkel T (2006). "Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma." *J Exp Med* 203(5): 1235-1247.
- Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B and Marini FC (2008). "The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe." *Cytotherapy* 10(7): 657-667.
- Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M and Marini FC (2009). "Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging." *Stem Cells* 27(10): 2614-2623.
- Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Oh JH, Jeong M, Oh W, Park SH, Sung YC and Jeun SS (2008). "Gene Therapy Using TRAIL-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells against Intracranial Glioma." *Cancer Res* 68(23): 9614-9623.
- Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward WA, Munshi A, Meyn RE, Cox JD, Andreeff M and Marini FC (2007). "Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment." *Cancer Res* 67(24): 11687-11695.

- Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA and Krivit W (1999). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases." *Exp Hematol* 27(11): 1675-1681.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI and Lazarus HM (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* 18(2): 307-316.
- Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM and Krivit W (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." *Bone Marrow Transplant* 30(4): 215-222.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT and Pereboeva L (2006). "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses." *Mol Cancer Ther* 5(3): 755-766.
- Kottke TJ, Blajeski AL, Meng XW, Svingen PA, Ruchaud S, Mesner PW, Jr., Boerner SA, Samejima K, Henriquez NV, Chilcote TJ, Lord J, Salmon M, Earnshaw WC and Kaufmann SH (2002). "Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells." *J Biol Chem* 277(1): 804-815.
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S and Altaner C (2007). "Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy." *Cancer Res* 67(13): 6304-6313.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR, Jr., Moseley AB and Bacigalupo A (2005). "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients." *Biol Blood Marrow Transplant* 11(5): 389-398.
- Lazennec G and Jorgensen C (2008). "Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit?" *Stem Cells* 26(6): 1387-1394.
- Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lonnie H, Nava S and Ringden O (2007). "Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells." *Leukemia* 21(8): 1733-1738.
- Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W and Ringden O (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." *Lancet* 371(9624): 1579-1586.
- LeBlanc HN and Ashkenazi A (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell Death Differ* 10(1): 66-75.
- Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J and Prockop DJ (2009). "The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice." *Blood* 113(4): 816-826.
- Levi F, Metzger G, Massari C and Milano G (2000). "Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects." *Clin Pharmacokinet* 38(1): 1-21.
- Lewis PF and Emerman M (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." *J Virol* 68(1): 510-516.
- Li J, Law HK, Lau YL and Chan GC (2004). "Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents." *Br J Haematol* 127(3): 326-334.
- Liebermann DA, Hoffman B and Vesely D (2007). "p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines." *Cell Cycle* 6(2): 166-170.
- Lim YB, Lee E, Yoon YR, Lee MS and Lee M (2008). "Filamentous artificial virus from a self-assembled discrete nanoribbon." *Angew Chem Int Ed Engl* 47(24): 4525-4528.

- Ling J, Herbst RS, Mendelson DS, Eckhardt SG, O'Dwyer P, Ebbinghaus S, Osborne R, Cheu M, Lieberman G and Lum BL (2006). "Apo2L/TRAIL pharmacokinetics in a phase 1a trial in advanced cancer and lymphoma." *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 24(18 Suppl): 3047.
- Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D and Janes SM (2009). "Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer." *Cancer Res* 69(10): 4134-4142.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ and Baltimore D (2002). "Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors." *Science* 295(5556): 868-872.
- Lundberg AS and Weinberg RA (1999). "Control of the cell cycle and apoptosis." *Eur J Cancer* 35(14): 1886-1894.
- Lundstrom K (2003). "Latest development in viral vectors for gene therapy." *Trends Biotechnol* 21(3): 117-122.
- Mariani SM and Krammer PH (1998). "Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage." *Eur J Immunol* 28(3): 973-982.
- Marini P, Schmid A, Jendrossek V, Faltin H, Daniel PT, Budach W and Belka C (2005). "Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis." *BMC Cancer* 5: 5.
- Mastrobattista E, van der Aa MA, Hennink WE and Crommelin DJ (2006). "Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery." *Nat Rev Drug Discov* 5(2): 115-121.
- Minguell JJ, Erices A and Conget P (2001). "Mesenchymal stem cells." *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6): 507-520.
- Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW and Banerjee D (2008). "Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells." *Cancer Res* 68(11): 4331-4339.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO and Reiser J (1998). "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." *J Virol* 72(11): 8873-8883.
- Mohr A, Lyons M, Deedigan L, Harte T, Shaw G, Howard L, Barry F, O'Brien T and Zwacka R (2008). "Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model." *J Cell Mol Med* 12(6B): 2628-2643.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H and Schmol HJ (2006). "Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction." *Stem Cells* 24(12): 2753-2765.
- Mueller T, Voigt W, Simon H, Fruehauf A, Bulankin A, Grothey A and Schmol HJ (2003). "Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer." *Cancer Res* 63(2): 513-521.
- Mueller T (2005). "Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors." Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A and Barry F (2002). "Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 46(3): 704-713.
- Nagai N, Ogata H, Wada Y, Tsujino D, Someya K, Ohno T, Masuhara K, Tanaka Y, Takahashi H, Nagai H, Kato K, Koshiba Y, Igarashi T, Yokoyama A, Kinameri K, Kato T and Kurita Y (1998). "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisplatin in patients with cancer: analysis with the NONMEM program." *J Clin Pharmacol* 38(11): 1025-1034.
- Neschadim A, McCart JA, Keating A and Medin JA (2007). "A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* 13(12): 1407-1416.
- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A and Fischer I (2008). "Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics." *Exp Hematol* 36(9): 1176-1185.

- NIH (2001). "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions." National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. June 2001. <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>
- Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, Yu Z, Li B, Xu C, Li Y, Wang J, Hu J, Lou X and Chen H (2008). "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study." *Leukemia* 22(3): 593-599.
- Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T and Takahashi HE (1999). "Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation." *J Bone Miner Metab* 17(3): 171-177.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD and Cunha GR (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res* 59(19): 5002-5011.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL and Weinberg RA (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121(3): 335-348.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M and Werner C (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." *Stem Cells* 22(3): 377-384.
- Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C, Koutala H, Marsh JC, Boumpas DT and Eliopoulos GD (2002). "Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect." *Blood* 99(5): 1610-1619.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O and Prockop DJ (1995). "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 4857-4861.
- Pessino A and Sobrero A (2006). "Optimal treatment of metastatic colorectal cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* 6(5): 801-812.
- Phinney DG and Prockop DJ (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." *Stem Cells* 25(11): 2896-2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.
- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, Charbord P and Domenech J (2007). "The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities." *Stem Cells* 25(7): 1737-1745.
- Psaila B and Lyden D (2009). "The metastatic niche: adapting the foreign soil." *Nat Rev Cancer* 9(4): 285-293.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E and Marcacci M (2001). "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." *N Engl J Med* 344(5): 385-386.
- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C and Deliliers GL (2002). "Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies." *Exp Hematol* 30(7): 783-791.
- Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D and Dazzi F (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth." *Leukemia* 21(2): 304-310.
- Ramsubir S, Yoshimitsu M and Medin JA (2007). "Anti-CD25 targeted killing of bicistronically transduced cells: a novel safety mechanism against retroviral genotoxicity." *Mol Ther* 15(6): 1174-1181.
- Rasmusson I (2006). "Immune modulation by mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res* 312(12): 2169-2179.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH and Verfaillie CM (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." *J Clin Invest* 109(3): 337-346.
- Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, Reufi B, Blau WI, Thiel E and Knauf WU (2005). "Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation." *Exp Hematol* 33(5): 605-611.

- RKI (2008). "Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends." 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008.
- Rochefort GY, Vaudin P, Bonnet N, Pages JC, Domenech J, Charbord P and Eder V (2005). "Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies?" *Respir Res* 6: 125.
- Rodriguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM and Seitz G (1999). "Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics." *J Cell Biochem* 75(3): 414-423.
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R and Schichor C (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." *Cancer Res* 69(13): 5331-5339.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC and Bernad A (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." *Cancer Res* 65(8): 3035-3039.
- Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP and Wohlgenuth R (2008). "Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone." *Nat Med* 14(2): 181-187.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (Hrsg). (1989). "Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sangai T, Ishii G, Kodama K, Miyamoto S, Aoyagi Y, Ito T, Magae J, Sasaki H, Nagashima T, Miyazaki M and Ochiai A (2005). "Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma." *Int J Cancer* 115(6): 885-892.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D and Shimizu H (2008). "Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type." *J Immunol* 180(4): 2581-2587.
- Sato T, Neschadim A, Konrad M, Fowler DH, Lavie A and Medin JA (2007). "Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy." *Mol Ther* 15(5): 962-970.
- Schafer KA (1998). "The cell cycle: a review." *Vet Pathol* 35(6): 461-478.
- Schaffer DV, Koerber JT and Lim KI (2008). "Molecular engineering of viral gene delivery vehicles." *Annu Rev Biomed Eng* 10: 169-194.
- Schmoll HJ, Hoeffken K and Possinger K (Hrsg). (1999). "Kompendium Internistische Onkologie." Springer Verl., Berlin Heidelberg.
- Shin SI, Freedman VH, Risser R and Pollack R (1975). "Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(11): 4435-4439.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R and Shi Y (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Mol Cell* 11(2): 519-527.
- Siddik ZH (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene* 22(47): 7265-7279.
- Simmons PJ, Przepiorka D, Thomas ED and Torok-Storb B (1987). "Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation." *Nature* 328(6129): 429-432.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-1112.

- Soussi T (2007). "Handbook of p53 mutation in cell lines." Version 1.0 07/2007. <http://p53.free.fr/Database/Cancer_cell_lines/HB_cell_lines.html>
- Spyridonidis A, Kuttler T, Wasch R, Samek E, Waterhouse M, Behringer D, Bertz H and Finke J (2005). "Reduced intensity conditioning compared to standard conditioning preserves the in vitro growth capacity of bone marrow stroma, which remains of host origin." *Stem Cells Dev* 14(2): 213-222.
- Srinivasakumar N (2001). "HIV-1 vector systems." *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6): 51-81.
- Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N and Galipeau J (2006). "Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell." *Blood* 107(6): 2570-2577.
- Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM, Banerjee NS, Moon AS, Hess A, Rocconi RP, Numnum TM, Everts M, Chow LT, Douglas JT, Siegal GP, Zhu ZB, Bender HG, Dall P, Stoff A, Pereboeva L and Curiel DT (2007). "Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma." *Breast Cancer Res Treat* 105(2): 157-167.
- Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ and Andreeff M (2002). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors." *Cancer Res* 62(13): 3603-3608.
- Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE and Andreeff M (2004). "Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." *J Natl Cancer Inst* 96(21): 1593-1603.
- Szegezdi E, O'Reilly A, Davy Y, Vawda R, Taylor DL, Murphy M, Samali A and Mehmet H (2008). "Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis." *J Cell Mol Med* [Epub ahead of print].
- Thomas CE, Ehrhardt A and Kay MA (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." *Nat Rev Genet* 4(5): 346-358.
- Tillman DM, Izeradjene K, Szucs KS, Douglas L and Houghton JA (2003). "Rottlerin sensitizes colon carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis via uncoupling of the mitochondria independent of protein kinase C." *Cancer Res* 63(16): 5118-5125.
- Valtieri M and Sorrentino A (2008). "The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis." *J Cell Physiol* 217(2): 296-300.
- van Geelen CM, de Vries EG, Le TK, van Weeghel RP and de Jong S (2003). "Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines." *Br J Cancer* 89(2): 363-373.
- van Maanen JM, Retel J, de Vries J and Pinedo HM (1988). "Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review." *J Natl Cancer Inst* 80(19): 1526-1533.
- Vermeulen K, Berneman ZN and Van Bockstaele DR (2003a). "Cell cycle and apoptosis." *Cell Prolif* 36(3): 165-175.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR and Berneman ZN (2003b). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* 36(3): 131-149.
- Voland C, Bord A, Peleraux A, Penarier G, Carriere D, Galiegue S, Cvitkovic E, Jbilo O and Casellas P (2006). "Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells." *Mol Cancer Ther* 5(9): 2149-2157.
- Wagner W, Feldmann RE, Jr., Seckinger A, Maurer MH, Wein F, Blake J, Krause U, Kalenka A, Burgers HF, Saffrich R, Wuchter P, Kuschinsky W and Ho AD (2006). "The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes." *Exp Hematol* 34(4): 536-548.
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V and Ho AD (2008). "Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process." *PLoS One* 3(5): e2213.
- Wakitani S, Saito T and Caplan AI (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." *Muscle Nerve* 18(12): 1417-1426.

- Wang S and El-Deiry WS (2003a). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." *Oncogene* 22(53): 8628-8633.
- Wang S and El-Deiry WS (2003b). "Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15095-15100.
- Wolpin BM and Mayer RJ (2008). "Systemic treatment of colorectal cancer." *Gastroenterology* 134(5): 1296-1310.
- Yang B, Wu X, Mao Y, Bao W, Gao L, Zhou P, Xie R, Zhou L and Zhu J (2009). "Dual-targeted antitumor effects against brainstem glioma by intravenous delivery of tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing, ligand-engineered human mesenchymal stem cells." *Neurosurgery* 65(3): 610-624; discussion 624.
- Yang M, Li L, Jiang P, Moossa AR, Penman S and Hoffman RM (2003). "Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14259-14262.
- Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Taniguchi H, Yano K, Wakada M and Sakai T (2008). "Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* 375(1): 129-133.
- Yu J and Zhang L (2005). "The transcriptional targets of p53 in apoptosis control." *Biochem Biophys Res Commun* 331(3): 851-858.
- Yu JM, Jun ES, Bae YC and Jung JS (2008). "Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo." *Stem Cells Dev* 17(3): 463-473.
- Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P and Reiser J (2002). "Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells." *Mol Ther* 5(5 Pt 1): 555-565.
- Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C and Chen Y (2006). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." *Exp Mol Pathol* 80(3): 267-274.

9 ANHANG

Tabellen

Tab. 8-1: Charakteristika der Spender ohne vorangegangene Chemotherapie (n = 16)

#	m/w	Alter	Maligne Erkrankung (Grund für Punktion)	Chemo- therapie	Maligne KM- Infiltration ^a	CFU-F pro 10 ⁶ KM-MNZ
48	m	70	k (Monoklonale Gammopathie)	k	k	9
56	w	31	k (ITP in Schwangerschaft)	k	k	27
57	w	59	k (Anämie, Eisenmangel)	k	k	8
61	w	33	k (Anämie, Eisenmangel)	k	k	48
68	m	62	k (allogener Spender)	k	k	10
82	m	74	k (Monoklonale Gammopathie)	k	k	5
88	w	38	k (Polyklonale Gammopathie nach Infektion)	k	k	6
104	w	65	k (allogener Spender)	k	k	4
40	m	19	Sarkom	k	k	14
46	m	37	Hodgkin-Lymphom	k	k	5
64	m	63	Adenokarzinom	k	k	25
69	w	58	NHL	k	k	5
72	m	24	NHL	k	k	5
75	m	65	NHL	k	k	4
77	m	75	Adenokarzinom	k	k	22
95	m	25	Adenokarzinom	k	k	15
MW ± Stabw		49,9 ± 19,6				13,3 ± 12,0

- Laufende Nummer der Präparation nach Anonymisierung

^a Nach zytologischen und histologischen Kriterien bestimmt

Abkürzungen: ITP - Idiopathische thrombozytopenische Purpura, k - keine, m - männlich, NHL - Non-Hodgkin-Lymphom, w - weiblich

Tab. 8-2: Charakteristika der Spender mit vorangegangener Chemotherapie (n = 17)

#	m/w	Alter	Maligne Erkrankung	Chemotherapie		Maligne KM-Infiltration ^b	CFU-F pro 10 ⁶ KM-MNZ
				Behandlung	t _{CTx} ^a		
42	m	29	ALL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Teniposid, Methotrexat, Asparaginase, Mercaptopurin, Doxorubicin, Thioguanin), TBI, allogene PBSCT	1,8	ALL	4
47	m	27	ALL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Teniposid, Methotrexat, Asparaginase, Mercaptopurin, Doxorubicin, Thioguanin)	11,8	ALL	17
50	m	46	SCLC	S-CTx (Carboplatin, Etoposid)	0,8	k	14
52	m	44	Haarzell-Leukämie	S-CTx (Cladribin)	0,9	Haarzell-Leukämie	0
54	w	64	MM	HD-CTx (Idarubicin, Ifosfamid, Etoposid, Epirubicin, Melphalan)	7,9	Myelom	15
55	m	61	MM	S-CTx (Idarubicin, Melphalan)	13	Myelom	1
58	m	23	NHL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Etoposid, Doxorubicin, Methotrexat, Ifosfamid, Teniposid)	1	k	8
62	w	64	CML	S-CTx (Hydroxyurea, Idarubicin)	4	CML	7
63	m	23	ALL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Mercaptopurin, Methotrexat, Asparaginase, Doxorubicin, Teniposid, Thioguanin)	13	ALL	12
65	m	38	NHL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Etoposid, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Carmustin, Melphalan)	29	NHL	2
67	w	47	NHL	HD-CTx (Vincristin, Etoposid, Cytarabin, Carmustin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Melphalan), TBI	3,6	NHL	7
76	m	65	ALL	S-CTx (Vincristin, Cytarabin, Methotrexat, Asparaginase, Doxorubicin, Teniposid)	0,7	ALL	3
78	m	72	NHL	S-CTx (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin)	1,1	NHL	16

Tab. 8-2 (Fortsetzung)

#	m/w	Alter	Maligne Erkrankung	Chemotherapie		Maligne KM-Infiltration ^b	CFU-F pro 10 ⁶ KM-MNZ
				Behandlung	t _{CTx} ^a		
86	m	38	NHL	S-CTx (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin,)	12,5	k	2
87	m	65	MM	HD-CTx (Ifosfamid, Etoposid, Epirubicin, Idarubicin, Melphalan)	1	Myelom	1
90	m	18	AML	S-CTx (Idarubicin, Cytarabin)	0,4	AML	4
92	m	32	NHL	S-CTx (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin,)	0,4	NHL	6
MW ± Stabw		44,5 ± 17,8		6,1 ± 7,7		7,0 ± 5,7	

- Laufende Nummer der Präparation nach Anonymisierung

^a Zeit seit letzter Chemotherapie in Monaten

^b Nach zytologischen und histologischen Kriterien bestimmt

Abkürzungen: ALL - akute lymphatische Leukämie, AML - akute myeloische Leukämie, CML - chronische myeloische Leukämie, HD-CTx - Hochdosis-Chemotherapie mit autologer peripherer Blutstammzelltransplantation, k - keine, m - männlich, MM - multiples Myelom, NHL - Non-Hodgkin-Lymphom, PBSCT - periphere Blutstammzelltransplantation, SCLC - kleinzelliges Bronchialkarzinom, S-CTx - Standard-Chemotherapie mit mindestens einer Applikation der entsprechenden Medikamente, t_{CTx} - Zeit seit letzter Chemotherapie, TBI - Ganzkörperbestrahlung, w - weiblich

Tab. 8-3: CRC-Zelllinien, IC90 für 96 h-Behandlung mit Oxaliplatin; TRAIL-Status gemäß Abschnitt 4.5.1; p53-Status aus (Soussi 2007)

Zelllinie	IC90 (Oxaliplatin)	TRAIL-Status	p53-Status
Colo205	2 µM	sensitiv	mutiert (umstritten)
Colo320DM	15 µM	resistent	mutiert
DLD1	37 µM	sensitiv	mutiert
HCT8	2 µM	resistent	WT
HCT15	10 µM	sensitiv	mutiert (umstritten)
HCT116	1 µM	sensitiv	WT
HT29	28 µM	resistent	mutiert
SW48	1 µM	sensitiv	mutiert
SW480	30 µM	resistent	mutiert

Abbildungen

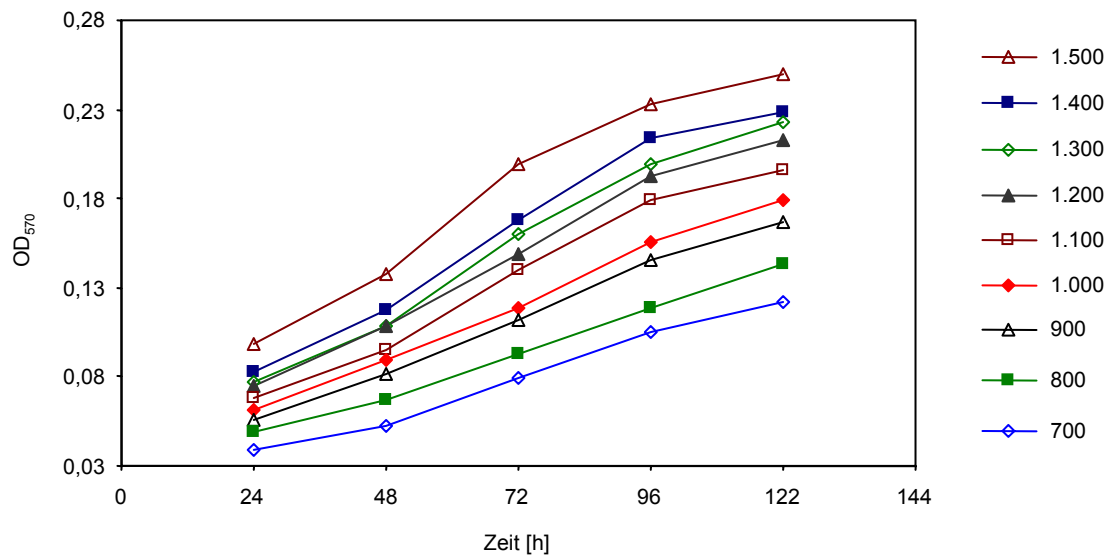


Abb. 8-1: Wachstumskinetik von MSC für den SRB-Assay. Die einzelnen Kurven repräsentieren das Wachstum von MSC über die gesamte Versuchsdauer für die jeweils eingesetzte Zellzahl pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte; MW (n = 4).

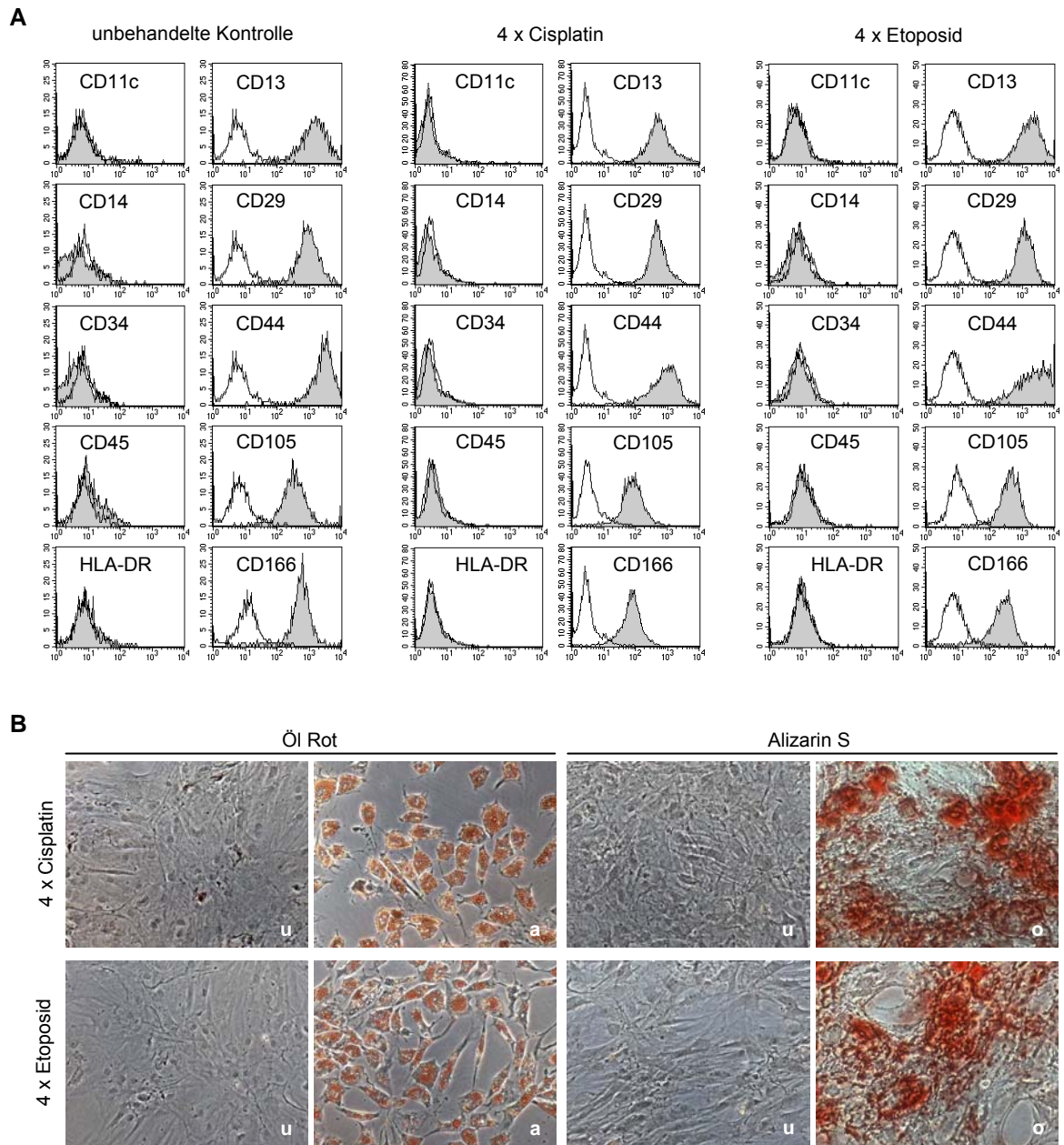


Abb. 8-2: Charakterisierung von MSC nach genotoxischer Behandlung (4 x Cisplatin und 4 x Etoposid) *in vitro*. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse von MSC-UKM einer Präparation vor (unbehandelte Kontrolle) und nach Behandlung; dargestellt sind die kombinierten Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und spezifischem FITC- oder PE-konjugiertem Antikörper (grau). **(B)** Differenzierungsinduktion; MSC-UKM wurden 72 h nach Ende des Behandlungszyklus mit Wachstumsmedium (u), adipogenem (a) und osteogenem (o) Differenzierungsmedium kultiviert und anschließend mit Öl Rot bzw. Alizarin S gefärbt. Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 4 unabhängigen Versuchen.

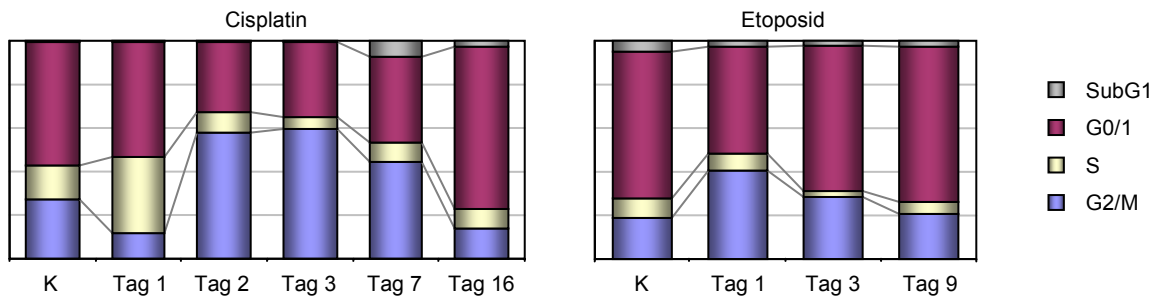


Abb. 8-3: Zellzyklusverteilung in MSC nach genotoxischer Schädigung durch 24 h-Behandlung mit 2 μM Cisplatin bzw. 0,75 μM Etoposid. Der Behandlungsstart wurde als Tag 0 festgelegt. Verteilung der Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen bezogen auf 100 %. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 2 unabhängigen Versuchen. K - unbehandelte Kontrolle.

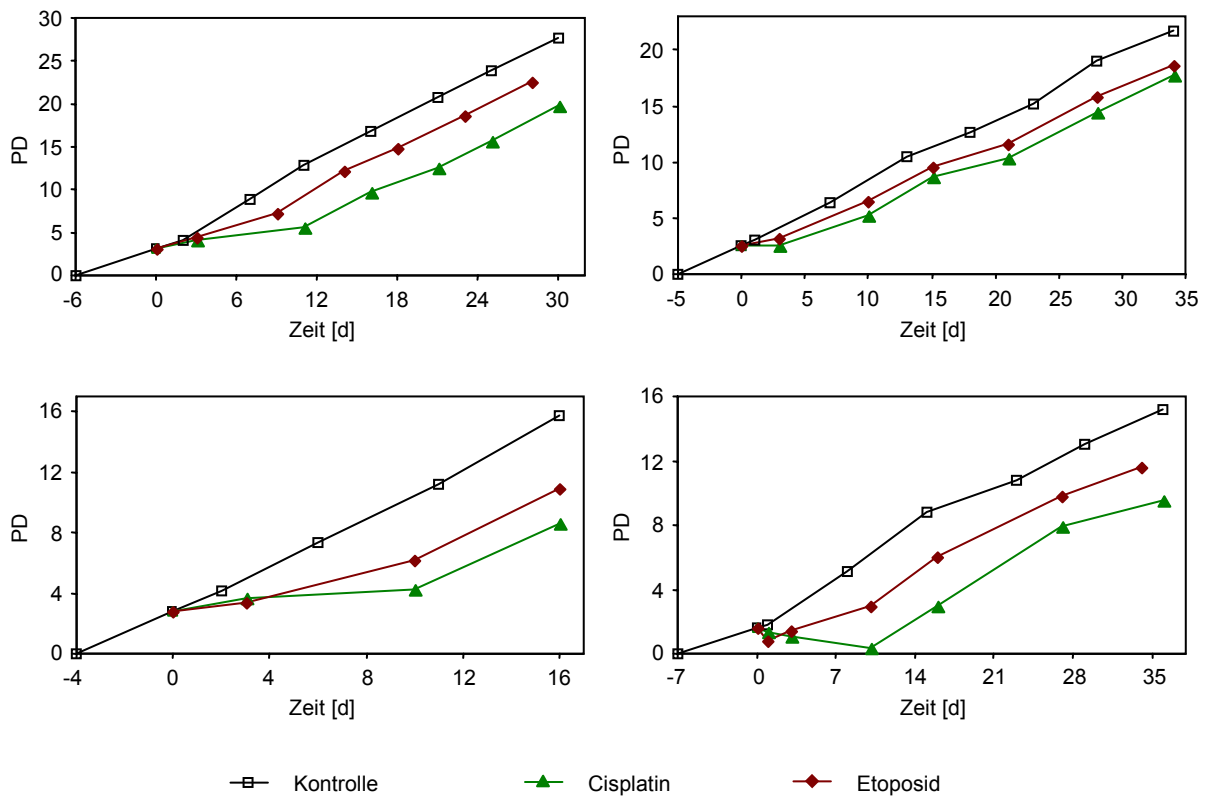


Abb. 8-4: Proliferation von MSC verschiedener Präparationen nach Zellzyklusarrest durch genotoxische Schädigung. Wachstumskinetiken; Start der jeweiligen Behandlung zum Zeitpunkt Tag 0.

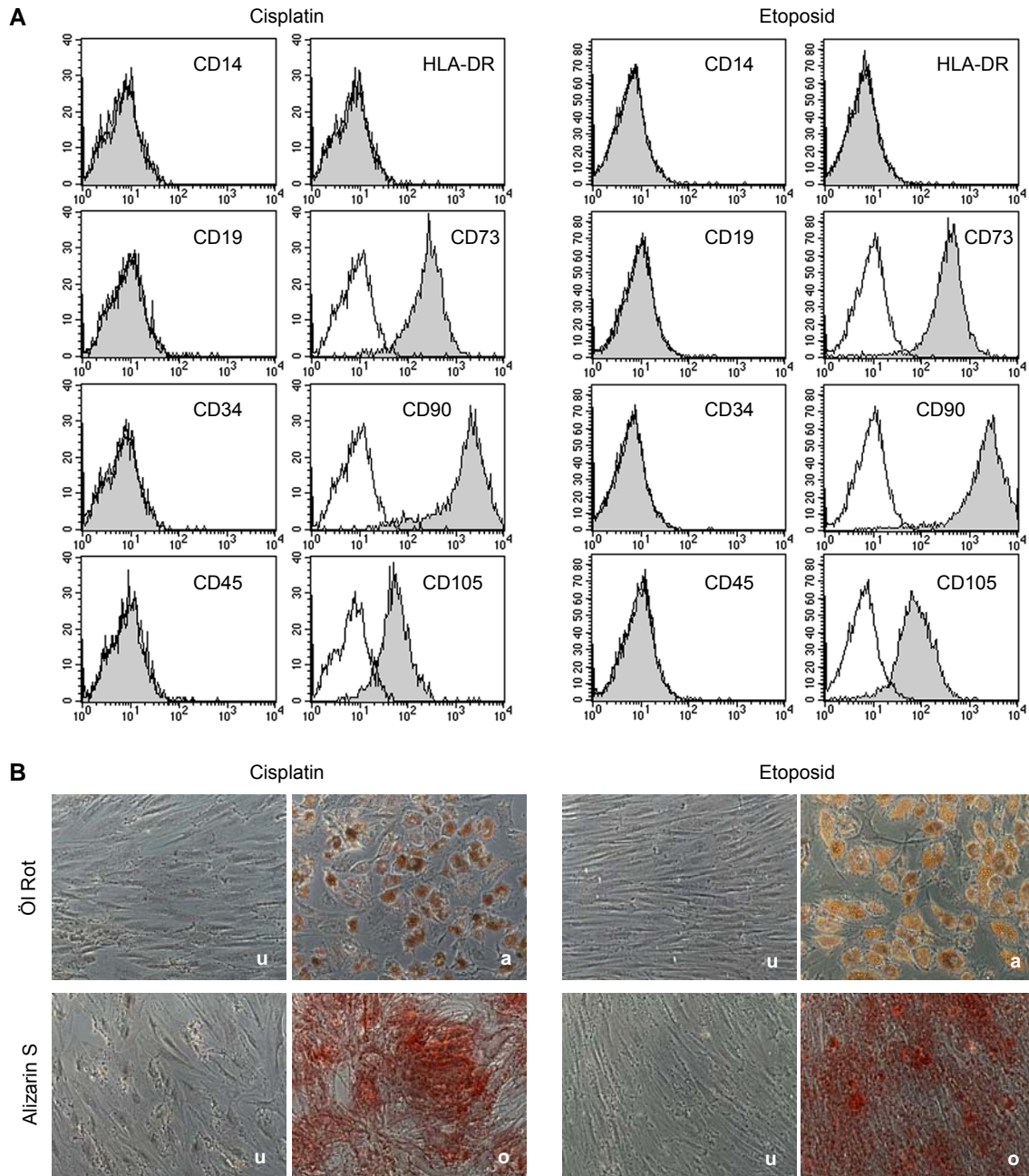


Abb. 8-5: MSC-definierende Eigenschaften nach Rekonstitution der Proliferation nach Zellzyklusarrest durch Behandlung mit Cisplatin bzw. Etoposid in subapoptischen Konzentrationen. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse nach d(R); kombinierte Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und spezifischem FITC- oder PE- konjugiertem Antikörper (grau). **(B)** Differenzierungsinduktion nach d(R); die Zellen wurden in Wachstumsmedium (u), adipogenem (a) und osteogenem (o) Differenzierungsmedium kultiviert und anschließend mit Öl Rot bzw. Alizarin S gefärbt. Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

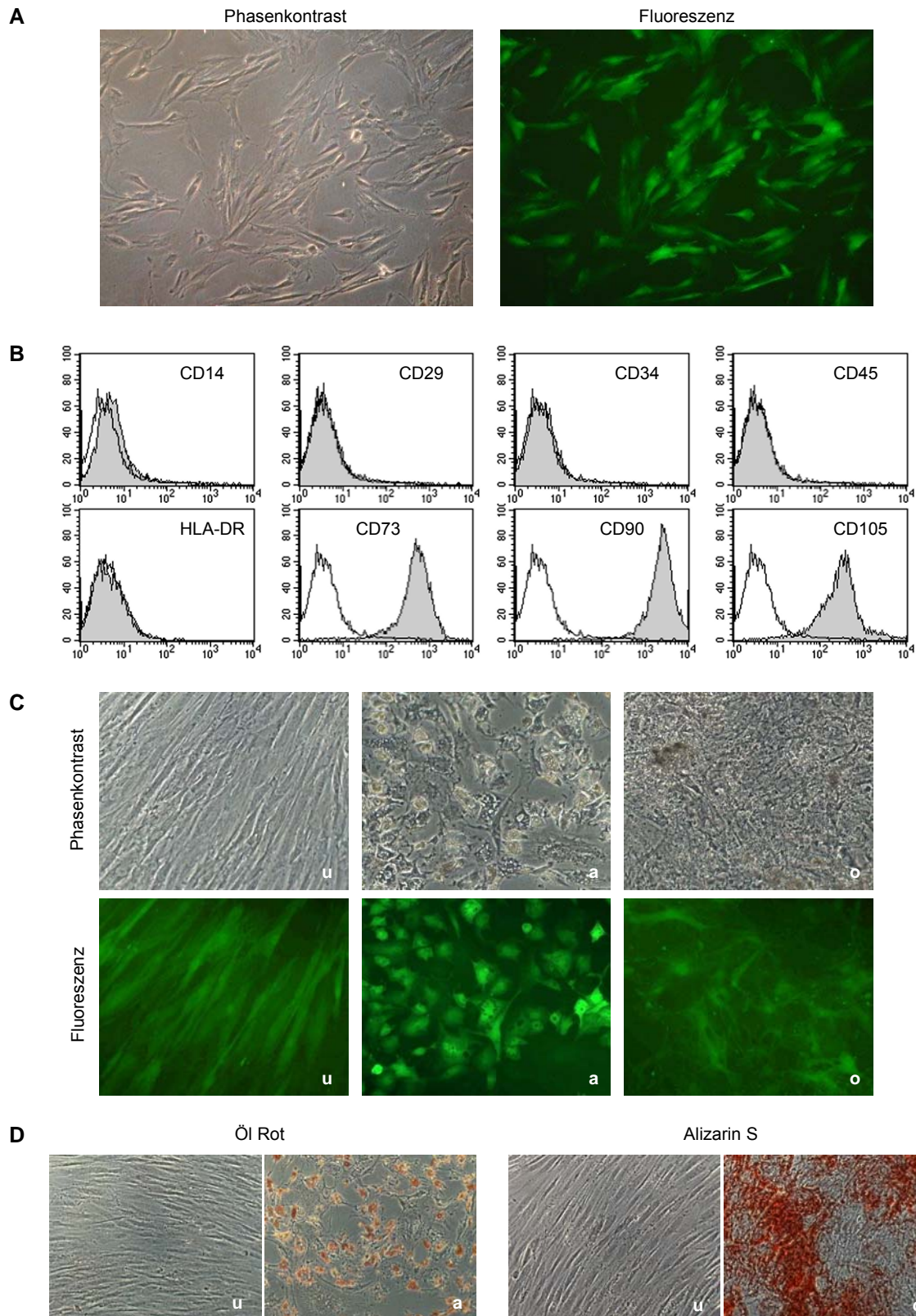


Abb. 8-6: Charakteristika lentiviraler *GFP*-MSC. **(A)** MSC der 2. Passage 48 h nach Transduktion; Phasenkontrast und entsprechende Fluoreszenzaufnahme, Vergrößerung 100-fach. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse von *GFP*-MSC; kombinierte Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und spezifischem PE- oder PerCP-konjugiertem Antikörper (grau). **(C und D)** Differenzierungsinduktion; *GFP*-MSC der 7. Passage wurden in Wachstumsmedium (u), adipogenem (a) und osteogenem (o) Differenzierungsmedium kultiviert. **(C)** Phasenkontrast und entsprechende Fluoreszenzaufnahme der nativen Zellen; Vergrößerung 100-fach. **(D)** Färbung mit Öl Rot bzw. Alizarin S; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

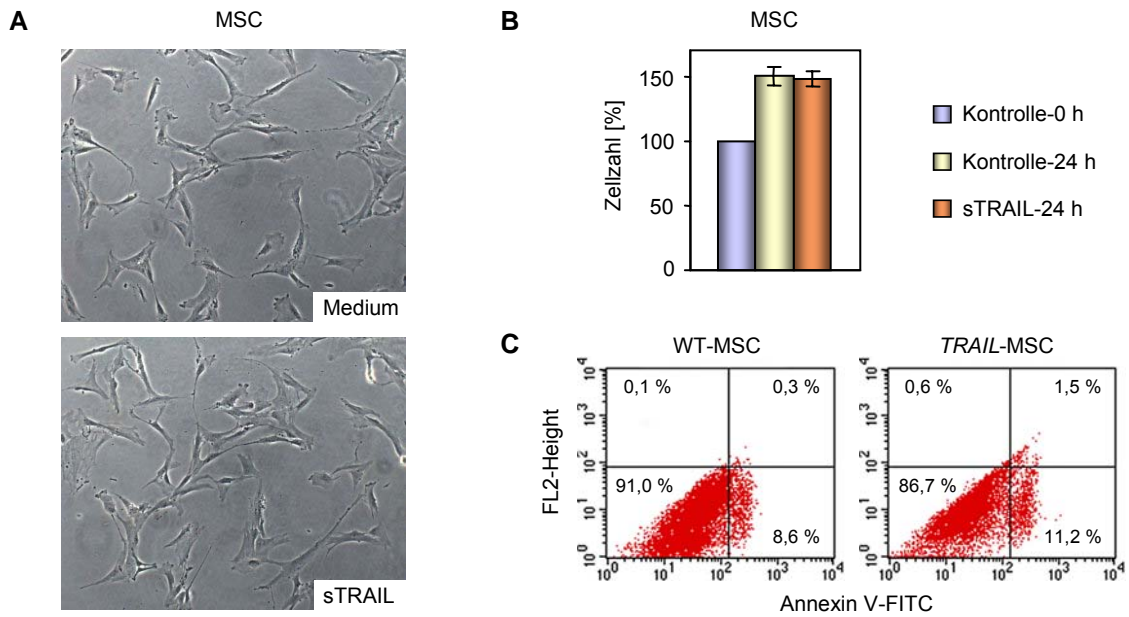


Abb. 8-7: Resistenz von MSC gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. **(A)** MSC in Wachstumsmedium und mit Zusatz von 100 ng/ml sTRAIL für 24 h; Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach. **(B)** Die Zellzahlen von MSC nach 24 h-Behandlung mit 100 ng/ml sTRAIL (sTRAIL-24 h) sowie der unbehandelte Kontrolle (Kontrolle-24 h) wurden in Bezug auf die Zellzahl zu Beginn der Behandlung (Kontrolle-0 h) dargestellt. MW \pm Stabw von 4 unabhängigen Versuchen. **(C)** Färbung von WT-MSC und TRAIL-MSC (Passage 9) mit Annexin V-FITC. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 unabhängigen Versuchen.

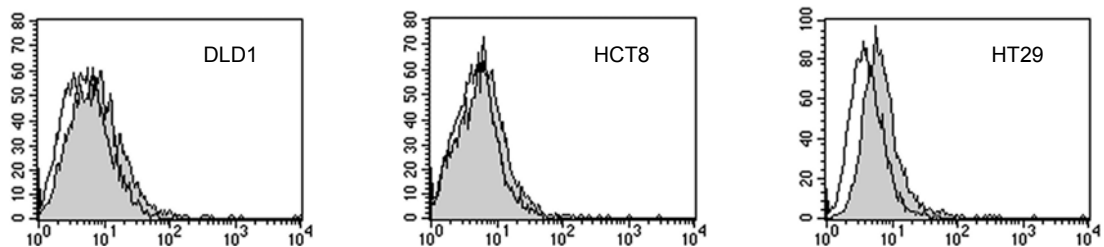


Abb. 8-8: Expression von CD105 der verwendeten CRC-Zelllinien. Durchflusszytometrische Analyse; kombinierte Fluoreszenzhistogramme von Isotypkontrolle (weiß) und FITC-konjugiertem anti-CD105 (grau).

ERKLÄRUNG

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2002 bis 2009 im Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in Publikationen eingegangen oder wurden zur Publikation eingereicht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet sowie verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ich versichere, dass ich mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Jana Lützkendorf

Halle (Saale), den 29.12.2009

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas sowie für seine stetige Unterstützung. Bei Herrn Prof. Dr. Gerald Moritz, Institut für Biologie, Bereich Zoologie/Entwicklungsbiologie möchte ich mich für seine Bereitschaft der Übernahme der Betreuung dieser Dissertation am Institut für Biologie bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Herrn Dr. Lutz P. Müller für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die hilfreiche Unterstützung in wissenschaftlichen Belangen, seine stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Weiterhin danke ich ihm für die vielen hilfreichen Ratschläge und Kritiken sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. Thomas Müller danke ich für die vielen Anregungen und Diskussionen sowie die Durchführung der Tierversuche. Katrin Nerger danke ich für ihre unverzichtbare Unterstützung sowohl bei der Durchführung vieler Experimente als auch bei der Organisation des Laboralltags. Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, dass er mir das lentivirale System zur Verfügung gestellt hat. Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder danke ich für die Bereitstellung der Technik des *In-vivo*-Imaging. Henrike Caysa danke ich für die Durchführung des *In-vivo*-Imaging. Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PD Dr. Paschke für die Analysen des zellulären Platingehaltes, den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Holzhausen für die Herstellung der Paraffinpräparate, den ärztlichen Mitarbeitern der KIM IV für die Bereitstellung der Knochenmarkpunktate und nicht zuletzt den Spendern, die ihr Knochenmark zu Verfügung gestellt haben.

Allen Mitarbeitern des Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabors danke ich ganz herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und insbesondere dafür, dass sich die Arbeit dort nicht immer wie Arbeit angefühlt hat.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich all die Jahre in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt haben. Und nicht zuletzt danke ich Jürgen für seine moralische Unterstützung und das Verständnis, dass er für meine Arbeit aufbrachte.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Jana Lützkendorf
Anschrift	06198 Beesenstedt, Eislebener Strasse 35
Geburtsdatum	14. Juni 1977
Geburtsort	Merseburg
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985	Johannes-R.-Becher Oberschule, Halle
1986 - 1988	G. E. Lessing Oberschule, Halle
1989 - 1990	Schule bei der Botschaft der DDR in der UdSSR, Moskau
1991	G. E. Lessing Oberschule, Halle
1992 - 1996	Gymnasium im Bildungszentrum, Halle
06/1996	Abitur

Studium

1996 - 2001	Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02 - 11/2001	Diplomarbeit am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema „Etablierung von Verfahren zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen“
11/2001	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biochemikerin durch Urkunde und Zeugnis der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Beruf und Weiterbildung

- 01 - 03/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft, Hämatologisch/Onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 03/2002 Promotionsarbeit im Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema „Mesenchymale Stammzellen bei Patienten mit malignen Erkrankungen - Untersuchung ihrer Eigenschaften und ihres Potentials als Vehikel einer Tumortherapie“
- 03/2002 – 02/2004 Jubiläumstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt
- 03/2004 – 12/2006 Förderung im Rahmen des ESF-Projektes "Nachakademische Qualifizierung auf dem Schwerpunkt Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg", BioService Halle GmbH; tätig im Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 01/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Hämatologisch/Onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Sonstiges

- 04/2003 Erwerb Sachkundenachweis „Tierschutz/Versuchstierkunde für tierexperimentell tätige Mitarbeiter“

PUBLIKATIONSLISTE**Artikel**

Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Caysa H, Nerger K and Schmoll HJ (2009). "Growth-inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence." *J Cell Mol Med* [Epub ahead of print].

Mueller T, Luetzkendorf J, Nerger K, Schmoll HJ and Mueller LP (2009). "Analysis of OCT4 expression in an extended panel of human tumor cell lines from multiple entities and in human mesenchymal stem cells." *Cell Mol Life Sci* 66(3): 495-503.

Dittmer A, Hohlfeld K, Lützkendorf J, Müller LP and Dittmer J (2009). "Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10." *Cell Mol Life Sci* 66(18): 3053-3065.

Stock P, Staeger MS, Müller LP, Sgodda M, Völker A, Volkmer I, Lützkendorf J and Christ B (2008). "Hepatocytes derived from adult stem cells." *Transplant Proc* 40(2): 620-623.

Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tislijar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE and Christ B (2007). "Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers." *Gut* 56(3): 405-415.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H and Schmoll HJ (2006). "Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction." *Stem Cells* 24(12): 2753-2765.

Mueller T, Mueller LP, Luetzkendorf J, Voigt W, Simon H and Schmoll HJ (2006). "Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance." *Tumor Biol* 27(2): 71-83.

Tagungsbeiträge

Luetzkendorf J, Mueller T, Caysa H, Nerger K, Schmoll H-J and Mueller LP (2009). "TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells can overcome resistance to soluble TRAIL in colorectal carcinoma cells." DGHO Jahrestagung 2009, Heidelberg/Mannheim; Onkologie 32 (Suppl. 4): V288.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Nerger K and Schmoll H-J (2009). "Promises and obstacles for the therapeutic use of lentiviral TRAIL-transgenic human multipotent stroma cells in colorectal carcinoma." DGHO Jahrestagung 2009, Heidelberg/Mannheim; Onkologie 32 (Suppl. 4): V46.

Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Reichelt K and Schmoll H-J (2008). "Lentiviral expression of TRAIL in human mesenchymal stem cells (MSC) induces apoptosis in interacting colon carcinoma cells." AACR Annual Meeting 2008, San Diego; AACR Meeting Abstracts: #4608.

Stock P, Staeger MS, Müller LP, Volkmer I, Lützkendorf J and Christ B (2008). "Analysis of gene expression patterns of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells." Experimental Biology 2008, San Diego; FASEB J. 22: 465.6.

Stock P, Staeger MS, Müller LP, Volkmer I, Lützkendorf J and Christ B (2008). "Analyse des Genexpressionsprofiles in aus humanen mesenchymalen Stammzellen differenzierten hepatozytären Zellen." GASL Jahrestagung 2008, Frankfurt a. M.; Z Gastroenterol 01: P3.15.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H and Schmoll HJ (2003). "Isolation of mesenchymal stem cells from adult human bone marrow affected by disease or chemotherapy." DGHO Jahrestagung 2003, Basel; Onkologie 26 (Suppl. 5): P743.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Reichelt K, Simon H and Schmoll HJ (2003). "Mesenchymal stem cells can be isolated from human bone marrow affected by disease or chemotherapy." ESEM 2003, Halle (Saale); #106.

Mueller T, Mueller LP, Simon H, Luetzkendorf J, Voigt W and Schmoll HJ (2003). "Loss of expression of the embryonal transcription factor Oct-4 is associated with impairment of caspase-9 activation and cisplatin resistance in testicular germ cell cancer." DGHO Jahrestagung 2003, Basel; Onkologie 26 (Suppl. 5): P964.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Schmidt M, Simon H, Grothey A, Werdan K and Schmoll H-J (2002). "Mesenchymal stem cells in the adult human bone marrow express genes similar to embryonic stem cells." AACR Annual Meeting 2002, San Francisco; AACR Meeting Abstracts: #1050.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Simon H, Grothey A and Schmoll H-J (2002). "Gene expression in undifferentiated mesenchymal stem cells from adult human bone marrow supports multipotential differentiation capacity." 2nd International Conference on High Dose Chemotherapy 2002, Banff; Biol Blood Marrow Transplant 8(6): 345.

Patente

Lützkendorf J, Müller LP, Müller T. „TNF-related apoptosis-inducing (TRAIL) stabil transgen exprimierende mesenchymale Stammzellen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung.“ DE102006020444, Anmeldetag 03.05.2006, Offenlegungstag 03.01.2008.

Lützkendorf J, Müller LP, Müller T. „TNF-related apoptosis-inducing (TRAIL) stabil transgen exprimierende mesenchymale Stammzellen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung.“ DE102006020307, Anmeldetag 03.05.2006.