

Aus dem Department für Innere Medizin
Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
(Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Charakteristika multipotenter Stromazellen
und deren Relevanz für die Biologie und Behandlung
maligner Erkrankungen**

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. habil.

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Lutz Peter Müller
geboren am 04.10.1970 in Bleicherode

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Einsele
Prof. Dr. med. A. D. Ho
Prof. Dr. med. D. Vordermark

Datum der Verteidigung: 17.01.2012

Referat und bibliographische Beschreibung

HINTERGRUND UND HYPOTHESEN: Multipotente Stromazellen (MSC) lassen sich aus Geweben des adulten humanen Organismus, z. B. dem Knochenmark isolieren, zeigen Charakteristika multipotenter Stammzellen, verfügen über ein immunmodulatorisches Potential und scheinen in humane maligne Tumoren zu integrieren. Hieraus leiten sich folgende Hypothesen ab:

- MSC verfügen über eine Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung, die ihnen eine lebenslange funktionelle Persistenz im adulten Organismus erlaubt.
- MSC könnten analog zu pluripotenten Zellen als Ursprung maligner Tumoren fungieren.
- Aufgrund ihrer Tumorintegration können MSC das Wachstum maligner Tumoren beeinflussen, aber auch als Vehikel für eine tumorgerichtete Therapie dienen.

ZIELSTELLUNG: Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Ergebnisse der mehrheitlich publizierten Arbeiten des Autors zur Biologie und therapeutischen Nutzung von MSC unter diesen Fragestellungen darzustellen und im Kontext des Standes der Forschung zu diskutieren.

ERGEBNISSE UND WERTUNG: Von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung ließen sich MSC isolieren, die sich in ihren Charakteristika von MSC gesunder Spender nicht unterschieden. MSC zeigten eine Resistenz gegenüber Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen. Die Resistenz gegenüber Cisplatin war durch eine erhöhte apoptotische Schwelle und fehlende Zunahme der Caspase-9-Aktivität gekennzeichnet. Eine subapoptotische Schädigung resultierte in MSC in einem temporären Zellzyklusarrest unter Erhalt ihrer Charakteristika.

In MSC fand sich eine epigenetisch regulierte Expression von für die Stammzellbiologie relevanten Genen, jedoch keine funktionelle Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors OCT4. Im Sinne einer Plastizität konnten MSC zu Zellen mit funktionell hepatozytärem Phänotyp differenzieren. Es wurden keinerlei Zeichen einer malignen Transformation von MSC *in vitro* und *in vivo* beobachtet.

MSC zeigten eine Integration in Xenografte kolorektaler Karzinome (CRC) und förderten spezifisch deren Wachstum. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass MSC insbesondere die Ausbildung des Tumorstroma von CRC fördern.

Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass MSC als gegenüber Schädigung resistente Zellpopulation lebenslang im Organismus unter Erhalt ihrer Funktionalität ohne relevantes Risiko der malignen Transformation, aber mit der Fähigkeit zur Integration in maligne Tumoren und zur Förderung deren Wachstums persistieren.

Ausgehend von einer differentiellen Sensitivität für löslichen TNF-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL) wurden TRAIL-sensitive und TRAIL-resistente CRC-Zelllinien unterschieden. Mithilfe lentiviraler Transduktion konnten MSC mit ektopter Expression von membranständigem TRAIL generiert werden. Bei direktem Zell-Zell-Kontakt inhibierten TRAIL-MSC *in vitro* und im Mischxenograftmodell das Wachstum sowohl von TRAIL-sensitiven als auch von TRAIL-resistenten CRC-Zellen durch Induktion von Apoptose. Erstmals wurden TRAIL-MSC-resistente CRC-Zellen beschrieben. Diese konnten *in vitro* durch 5-FU in subapoptotischer Dosis für TRAIL-MSC sensitiviert werden. Dagegen schienen TRAIL-MSC *in vivo* das Wachstum TRAIL-MSC-resistenter CRC-Zellen zu fördern. Systemisch applizierte TRAIL-MSC zeigten aufgrund eines pulmonalen Tropismus keinen Einfluss auf das Wachstum subkutaner CRC-Xenografte.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass TRAIL-MSC das Wachstum von CRC inhibieren können, dass aber ihre potentielle klinische Wirksamkeit durch die Existenz TRAIL-MSC-resistenter Zellen und durch einen pulmonalen Tropismus eingeschränkt wird.

SCHLUSSFOLGERUNG: Insgesamt belegt die Arbeit, dass MSC sowohl als Zielstruktur als auch als Therapievehikel bei malignen Erkrankungen relevant sind. Derartige klinische Ansätze erfordern jedoch eine detaillierte Kenntnis der tumorpropagierenden Charakteristika von MSC und der molekularen Interaktion von MSC und Tumorzellen.

Müller, Lutz P.: Charakteristika multipotenter Stromazellen und deren Relevanz für die Biologie und Behandlung maligner Erkrankungen. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 121 Seiten, 2011.

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	6
1	Einleitung	8
1.1	Charakteristika multipotenter Stromazellen	8
1.1.1	Existenz multipotenter Stromazellen, deren Isolation und Kultivierung <i>in vitro</i>	8
1.1.2	Stammzellcharakteristika von MSC und deren Analyse	9
1.1.3	Vorkommen und Funktion von MSC im humanen Organismus	11
1.1.4	Regeneratives und immunmodulatorisches Potential von MSC	11
1.2	Bedeutung von MSC für das Wachstum maligner Tumoren	12
1.2.1	Tumorintegration von MSC und deren Nachweis	12
1.2.2	Einfluss des Tumorstroma auf das Wachstum von Tumoren	13
1.2.3	MSC als Ursprung maligner Tumoren	14
1.3	Zelluläre Reaktion auf genotoxische Schädigung	14
1.3.1	DNA-Schädigung und deren Reparatur	14
1.3.2	Zellzyklusregulation und ihre Analyse	15
1.3.3	Mechanismen der Apoptose und ihre Analyse	16
1.3.4	Mechanismen der Persistenz adulter Stammzellen im humanen Organismus	18
1.4	Ansätze zur Therapie maligner Tumoren mittels genetisch modifizierter Zellen	19
1.4.1	Genetische Modifikation von Zellen	19
1.4.2	Modelle zur präklinischen Evaluation einer zellbasierten Tumorthherapie	20
1.4.3	Kolorektales Karzinom - eine für die MSC-basierte Tumorthherapie geeignete Entität	21
1.4.4	<i>TRAIL</i> als therapeutisches Gen für eine zellbasierte Tumorthherapie	22
1.4.5	Genetisch modifizierte MSC für die Therapie maligner Tumoren	22
2.	Zielstellung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Allgemeine Methodik	25
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	25
3.1.2	Verwendete Zellen und deren Kultivierung	25

3.1.3	Proteinisolierung und Western Blot	25
3.1.4	RT-PCR	26
3.1.5	Durchflusszytometrie	26
3.1.6	Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels Sulforhodamin-B-Assay	26
3.1.7	Immunzytochemie, Immunhistochemie und histologische Analyse	27
3.1.8	Versuche im Nacktmausmodell und Nicht-invasives <i>in vivo</i> Multispektral-Fluoreszenz-Imaging	28
3.1.9	Lentivirale Transduktion von MSC und Tumorzellen	29
3.1.10	Statistische Analyse	30
3.2	Analysen zur Präsenz und Charakteristika von MSC	30
3.2.1	Isolierung und Kultivierung von MSC	30
3.2.2	Erstellen einer Wachstumskinetik	31
3.2.3	Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen	31
3.2.4	Analyse der OCT4 Expression	31
3.2.5	Analysen zur epigenetischen Regulation	31
3.2.6	Induktion einer osteogenen und adipogenen Differenzierung und deren Nachweis	31
3.2.7	Induktion einer chondrogenen Differenzierung und deren Nachweis	32
3.2.8	Induktion einer hepatogenen Differenzierung und deren Nachweis	33
3.2.9	Gemischte MSC-Leukozyten Kultur	33
3.2.10	Analyse der malignen Transformation von MSC <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	34
3.3	Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und von Resistenzmechanismen in MSC	35
3.3.1	Zytotoxizitätsuntersuchungen in MSC mittels Sulforhodamin-B-Assay	35
3.3.2	<i>In-vitro</i> -Modell der Resistenz von MSC	35
3.3.3	Analyse und Quantifizierung der Schädigung und Apoptoseinduktion	35
3.3.4	Bestimmung der Caspase-Aktivität	36
3.3.5	Untersuchung der Zellzyklusregulation	36
3.4	Analyse des Einflusses tumorintegrierter MSC auf das Wachstum maligner Tumoren	37
3.4.1	Integration von MSC in subkutane CRC-Xenografte	37
3.4.2	Einfluss von MSC auf das Wachstum subkutaner CRC-Mischxenografte	37
3.4.3	Untersuchung der Interaktion von MSC und CRC <i>in vitro</i>	38
3.4.4	Interaktionen von MSC und Mammakarzinomzellen	38
3.5	Untersuchungen zur Nutzung von MSC für die Tumorthherapie	39
3.5.1	Zytotoxizitätsanalyse für sTRAIL in MSC und CRC-Zellen	39
3.5.2	Expression von DR in CRC-Zellen	39

3.5.3	Generierung lentiviral <i>TRAIL</i> -transduzierter MSC	39
3.5.4	Analyse der <i>TRAIL</i> -Expression in <i>TRAIL</i> -MSC	40
3.5.5	Ausschluss der malignen Transformation von <i>TRAIL</i> -MSC	40
3.5.6	Analyse des Einflusses von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Wachstum von CRC-Zellen <i>in vitro</i>	40
3.5.7	Analyse des Einflusses von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Wachstum von CRC-Zellen <i>in vivo</i>	41
3.5.8	Pulmonaler Tropismus von MSC	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Präsenz und wesentliche Charakteristika von MSC bei Patienten nach Chemotherapie	43
4.1.1	Präsenz von CFU-F	43
4.1.2	Phänotyp, mesodermales Differenzierungspotential und Wachstumsverhalten	43
4.1.3	Immunogenität und immunsuppressives Potential	46
4.2	Sensitivität gegenüber Zytostatika und Identifikation von Resistenzmechanismen in MSC	47
4.2.1	Relative Resistenz gegenüber Zytostatika	47
4.2.2	Cisplatin-induzierte Apoptose und deren Regulation	49
4.2.3	Zellzyklusverhalten und -regulation nach genotoxischer Schädigung	52
4.3	Charakteristika von MSC mit Relevanz für deren potentielle maligne Transformation	56
4.3.1	Expression des Pluripotenz-spezifischen Transkriptionsfaktors OCT4	56
4.3.2	Epigenetische Regulation und Expression von Genen mit Relevanz für die Stammzellbiologie	57
4.3.3	Plastizität am Beispiel der hepatogenen Differenzierung	58
4.3.4	Maligne Transformation	60
4.4	Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Wachstum maligner Tumoren	61
4.4.1	Integration in CRC-Xenografte	61
4.4.2	Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Wachstum von CRC	61
4.4.3	Einfluss von MSC auf die Biologie von Tumorzellen in anderen Modellen	64
4.5	Nutzung tumorintegrierender MSC mit lentiviraler <i>TRAIL</i> -Expression für die Therapie von CRC	66
4.5.1	Wachstumsinhibition von CRC-Zellen durch <i>TRAIL</i>	66
4.5.2	Generierung und Charakterisierung <i>TRAIL</i> -transduzierter MSC	68
4.5.3	Einfluss von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Wachstum <i>TRAIL</i> -sensitiver CRC-Zellen	69

4.5.4	Einfluss von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Wachstum <i>TRAIL</i> -resistenter CRC-Zellen	71
4.5.5	Sensitivierung von <i>TRAIL</i> -MSC-resistenten CRC-Zellen	73
4.5.6	Effekt von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Xenograftwachstum <i>TRAIL</i> -MSC-sensitiver CRC	74
4.5.7	Effekt von <i>TRAIL</i> -MSC auf das Xenograftwachstum <i>TRAIL</i> -MSC-resistenter CRC	75
4.5.8	Effekt systemisch applizierter <i>TRAIL</i> -MSC auf das CRC-Xenograftwachstum	76
5	Diskussion	79
5.1	Wesentliche Ergebnisse der Arbeit	79
5.2	MSC als Ursprung maligner Tumoren	80
5.2.1	Die bisherigen Erkenntnisse schließen die maligne Transformation von MSC nicht aus	80
5.2.2	Eine Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung und die Fähigkeit zum Zellzyklusarrest schützen MSC vor maligner Transformation	81
5.2.3	Ein geringes Potential zur malignen Transformation von MSC korreliert mit deren gegenüber ESC limitierten Stammzellpotential	83
5.3	Einfluss von MSC auf das Wachstum maligner Tumoren	84
5.3.1	MSC integrieren im humanen Organismus vermutlich in maligne Tumoren	85
5.3.2	Eine Interaktion von MSC und Tumorzellen könnte sich in verschiedenen Phasen des Tumorwachstums differentiell vollziehen	86
5.3.3	MSC können das Tumorwachstum durch unterschiedliche Mechanismen beeinflussen	88
5.4	Potential von <i>TRAIL</i> -MSC für die Therapie maligner Tumoren	90
5.4.1	<i>TRAIL</i> ist ein therapeutisches Gen mit Anti-Tumoraktivität im CRC-Modell	90
5.4.2	Die lentivirale Transduktion ist für die Generierung von MSC mit Anti-Tumoraktivität geeignet	91
5.4.3	<i>TRAIL</i> -MSC inhibieren das Wachstum von CRC und überwinden teilweise die <i>TRAIL</i> -Resistenz von CRC-Zellen	92
5.4.4	Die Effektivität von <i>TRAIL</i> -MSC wird durch eine Resistenz ausgewählter CRC-Zellen gegenüber <i>TRAIL</i> -MSC eingeschränkt	94
5.4.5	Ein pulmonaler Tropismus systemisch applizierter MSC kann die Anti-Tumoraktivität von <i>TRAIL</i> -MSC reduzieren	95
6	Zusammenfassung und Ausblick	97

7	Literaturverzeichnis	100
8	Anlage	111
8.1	Originalarbeiten des Autors zum Inhalt der Arbeit	111
8.2	Thesen	112
8.3	Lebenslauf	115
8.4	Selbstständigkeitserklärung	118
	Danksagung	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben den Abkürzungen der SI-Einheiten wurden im Text die nachfolgend aufgeführten Abkürzungen verwendet. Spezifische, nur in den Abbildungen verwendete Abkürzungen sind in den jeweils zugehörigen Legenden erklärt.

5-FU	5-Fluorouracil
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bid	Bcl-2 interacting domain
Bp	Basenpaare (Base pairs)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten (Carcinoma-Associated Fibroblasts)
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of Differentiation)
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin dependent kinase)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CFU-F	Kolonie-bildende Einheit fibroblastärer Zellen (Colony Forming Unit-Fibroblast)
CK	Cytokeratin
CRC	Kolorektales Karzinom (Colorectal Carcinoma)
CYP3A4	Cytochrom P450 Subtyp 3A4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DcR	Decoy Receptors
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanineperchlorat
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DR	Death Receptors
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ESC	Embryonale Stammzelle (Embryonic Stem Cell)
FGF4	Fibroblast Growth Factor 4
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
FKS	Fetales Kälberserum
FoxD3	Forkhead box D3
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
heMSC	hepatogen differenzierte MSC
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (Human Leukocyte Antigen)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (Hematopoietic Stem Cell)
IC	inhibitorische Konzentration (Inhibitory Concentration)
IL	Interleukin
IL-2R γ	Interleukin-2 Rezeptor γ
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
LTR	Long Terminal Repeat
MNZ	Mononukleäre Zellen

MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
MSC	Multipotente Stromazelle (Multipotent Stromal Cell) oder Mesenchymale Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell)
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NOD/SCID-Maus	Mausmodell mit Immun- und Stoffwechseldefekt aufgrund SCID- (Severe Combined Immunodeficiency) und NOD-Mutation (Non-Obese Diabetic)
NOG-Maus	auf der NOD/SCID-Maus basierendes Mausmodell mit zusätzlicher Mutation im IL-2Rγ (NOD/SCID/IL-2Rγ ^{null})
OD	Optische Dichte
p	p-Wert des statistischen Vergleiches
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PBMC	Leukozyten des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCK1	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PD	Populationsverdopplung (Population Doubling)
PDT	Populationsverdopplungszeit (Population Doubling Time)
PI	Propidium Jodid
PHA	Phytohämagglutinin
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
s. c.	subkutan
SD	einfache Standardabweichung (Standard Deviation)
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
siRNA	small interference RNA
SRB	Sulforhodamin-B
sTRAIL	lösliches TRAIL (soluble TRAIL)
TGCT	Testikulärer Keimzelltumor (Testicular Germ Cell Tumor)
TGF-β3	Transforming Growth Factor-β3
TNF	Tumornekrosefaktor (Tumor Necrosis Factor)
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
<i>TRAIL</i> -MSC	MSC mit lentiviraler Expression von <i>TRAIL</i>
UKH	Universitätsklinikum Halle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis

1 EINLEITUNG

1.1 CHARAKTERISTIKA MULTIPOTENTER STROMAZELLEN

1.1.1 Existenz multipotenter Stromazellen, deren Isolation und Kultivierung *in vitro*

Die initiale Beschreibung von Stromazellen mit dem Potential zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen geht auf die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Friedenstein zurück. Hier wurde demonstriert, dass nach ektopter Transplantation von Zellen des murinen Knochenmark im Empfängergewebe Knochen- und Fettgewebe mit Spendergenotyp entstehen (Friedenstein, 1968; Friedenstein, 1966). *In vitro* zeigten diese Zellen eine Plastikadhärenz und bei Kultivierung in niedriger Dichte ein kolonieförmiges Wachstum als Colony-Forming Units fibroblast (CFU-F; Abbildung 1-1) fibroblastenähnlicher Zellen (Friedenstein, 1970). Auch *in vitro* konnte für CFU-F-Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene mesodermale Zelltypen demonstriert werden, und diese Zellen wurden daher als mesenchymale Stammzellen (MSC) bezeichnet (Caplan, 1991).

Im Weiteren konnten MSC auch aus humanem Knochenmark isoliert werden. Dabei findet sich eine Frequenz von MSC, die deutlich unter 1 % aller kernhaltigen Zellen liegt (Pittenger, 1999). Die Gewinnung von MSC gelingt neben dem Knochenmark auch aus anderen Geweben, z. B. aus Fettgewebe (Zuk, 2001); im murinen Modell konnten MSC postnatal aus nahezu allen Organen isoliert werden (da Silva Meirelles, 2006).

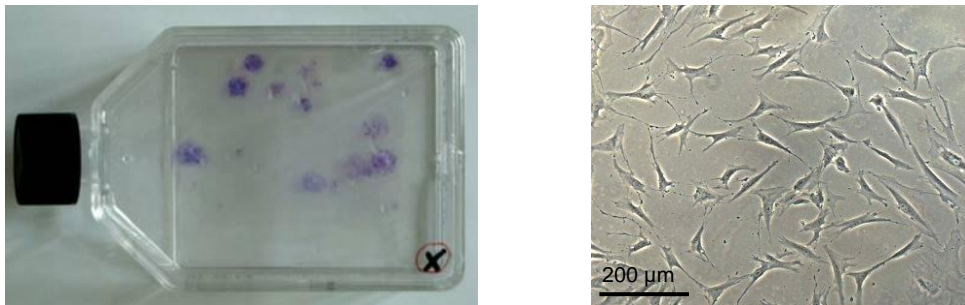


Abbildung 1-1: CFU-F-Zellen stellen im Knochenmark eine seltene Zellpopulation dar. Dargestellt ist links ein Zellkulturgefäß in dem initial 10×10^6 kernhaltige Zellen des Knochenmark kultiviert wurden. Nach 12 Tagen fanden sich 14, mit Giemsa gefärbte CFU-F. Die Zellen dieser Kolonien zeigen eine fibroblasten-ähnliche Morphologie, wie im Bild rechts dargestellt.

Die initiale genutzte, und auch heute noch allgemein verbreitete Methode zur Isolation von MSC beruht auf der Dichtegradientenzentrifugation (Boyum, 1968) der aus den jeweiligen Geweben gewonnenen Zellsuspension. Die damit separierten mononukleären Zellen (MNZ) werden in Plastikkulturgefäßen kultiviert, der die nicht-adhären Zellen enthaltende Überstand nach 12 - 24 h verworfen und die adhären Zellen weiter kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz passagiert.

MSC zeigen einen charakteristischen Phänotyp mit Expression von CD13, CD73, CD90, CD105, CD166 und fehlender Expression hämatopoetischer Marker wie z. B. CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR, Glycophorin-A (Krampera, 2006b). Allerdings konnte bislang kein unikater Marker für MSC identifiziert werden (Bianco, 2008). Aus diesem Oberflächenphänotyp mit fehlender Expression von HLA-Klasse II Merkmalen und kostimulatorischen Proteinen leitet sich eine niedrige Immunogenität von MSC ab (Nauta, 2007).

MSC zeigen *in vitro* ein kontinuierliches Wachstum über ca. 40 - 50 Populationsverdopplungen und unterliegen anschließend einer replikativen Seneszenz. Entscheidend für die Proliferation der Zellen *in vitro* sind die Kultivierungsbedingungen inklusive der Zusammensetzung des Expansionsmediums. Bei andauernder Kultivierung bei hoher Konfluenz unterliegen die Zellen einer spontanen Differenzierung mit Verlust ihres Proliferationspotentials (Colter, 2000). Die Expansion von MSC *in vitro* verlangt die Präsenz von Wachstumsfaktoren und erfolgt daher unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS), welches hinsichtlich der optimalen Wachstumsförderung getestet werden muss (Kuznetsov, 2000), oder aber ohne Zusatz tierischer Proteine unter Zugabe von humanem Plättchenlysat (Muller, 2006).

1.1.2 Stammzellcharakteristika von MSC und deren Analyse

Ausgehend von der Erstbeschreibung war bekannt, dass MSC zur multipotenten Differenzierung in der Lage sind, d. h. dass bei klonaler Kultivierung aus einer Zelle Tochterzellen hervorgehen, die unter den jeweiligen Bedingungen in verschiedene Phänotypen differenzieren können (Pittenger, 1999). Mit diesen Charakteristika - der Fähigkeit zur selbsterneuernden Proliferation und der Multipotenz - besitzen MSC die definierenden Eigenschaften von Stammzellen und reihen sich damit in die Gruppe adulter Stammzellen ein (Abbildung 1-2).

Um eine Vergleichbarkeit der Arbeiten mit MSC zu gewährleisten, wurden in einem Konsensus definierende Charakteristika von MSC (Tabelle 1-1) benannt (Dominici, 2006). Der Nachweis der Differenzierung stützt sich dabei auf die Analyse der Expression spezifischer Gene des osteogenen (z. B. Osteopontin, alkalische Phosphatase), adipogenen (PPAR- γ , Lipoproteinlipase) und chondrogenen (z. B. Kollagen II, Kollagen IX) Phänotyps. Gleichwertig ist der zytochemische Nachweis der osteogenen (Alizarin S- oder von Kossa-Färbung), adipogenen (Öl-Rot-Färbung) und chondrogenen (Alzian-Blau) Differenzierung.

In vielen bisher veröffentlichten Arbeiten wurde der Nachweis der multipotenten Differenzierung nicht in klonalen Populationen erbracht - d. h. eine Kontamination mit bereits in ihrer Differenzierung determinierten Vorläuferzellen kann nicht ausgeschlossen werden. Gleichfalls fehlt in der Mehrzahl der Arbeiten der Nachweis der *In-vivo*-Funktionalität der vollzogenen Differenzierung. Daher wird in einem weiteren Konsensus definiert, dass bei Fehlen dieser

Nachweise der Terminus „mesenchymale Stammzelle“ durch den Begriff „multipotente Stromazelle“ unter Beibehaltung des Akronyms ersetzt werden sollte (Horwitz, 2005).

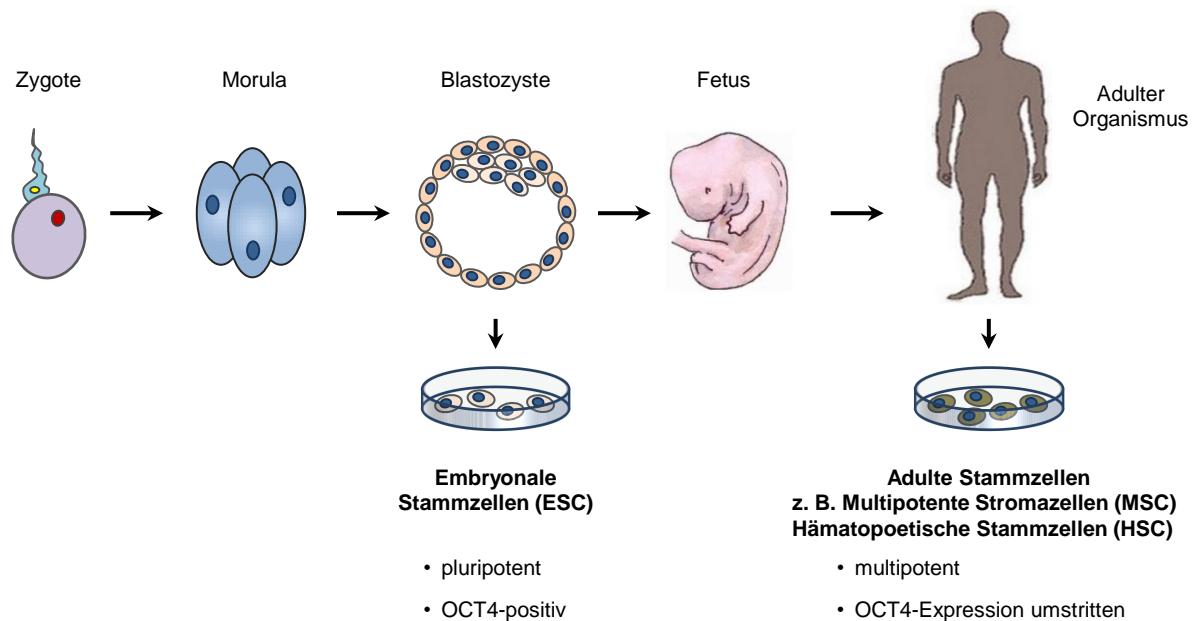


Abbildung 1-2: In der humanen Ontogenese lassen sich zu verschiedenen Zeitpunkten Stammzellen mit unterschiedlichen Charakteristika, insbesondere unterschiedlichem Differenzierungspotential, isolieren. Abbildung modifiziert nach (Mueller, 2005).

Von zahlreichen Autoren wurde berichtet, dass MSC oder deren Subpopulationen pluripotent sind, d. h. dass sie analog zu embryonalen Stammzellen (ESC) Tochterzellen hervorbringen, die in alle embryonalen Gewebe des humanen Organismus differenzieren können (Jiang, 2002). Bis heute konnten diese Ergebnisse nicht schlüssig bestätigt werden (Bianco, 2008), jedoch scheinen MSC die als Plastizität bezeichnete Fähigkeit zur nicht-mesodermalen Differenzierung zu besitzen (Prockop, 2009).

In diesem Zusammenhang wurde von einer Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors OCT4 in adulten Stammzellen und MSC-ähnlichen Zellen berichtet (Tai, 2005; Zangrossi, 2007). Die OCT4 cDNA wird von einem 5 Exons enthaltenden Gen kodiert; durch alternatives splicing werden zwei Isoformen generiert: OCT4A und OCT4B. Beide enthalten die DNA-bindende und C-terminale Transaktivierungsdomäne, doch nur das 45kDa Protein OCT4A enthält eine, die nukleäre Lokalisation vermittelnde N-terminale Domäne. Nur OCT4A ist damit im Kern präsent und als Transkriptionsfaktor funktionell aktiv; die biologische Funktion von OCT4B ist weitgehend unklar (Atlasi, 2008; de Jong, 2006; Lee, 2006). Die Aktivität von OCT4A ist essentiell für den Erhalt des undifferenzierten Zustandes pluripotenter Stammzellen (Niwa, 2000) und seine Relevanz für die Pluripotenz wird durch seine Rolle bei der Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen belegt (Hanna, 2010).

Kultivierung <i>in vitro</i>	Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen	
Phänotyp	positiv (> 95% aller Zellen positiv für das jeweilige Antigen) CD105 CD73 CD90	negativ (< 2% aller Zellen positiv für das jeweilige Antigen) CD45 CD34 CD14 oder CD11 CD79a oder CD19 HLA-DR
<i>In-vitro</i>-Differenzierung	osteogen, adipogen, chondrogen	

Tabelle 1-1: Konsensuskriterien für die Charakterisierung von MSC (Dominici, 2006).

1.1.3 Vorkommen und Funktion von MSC im humanen Organismus

Die Identifikation von MSC *in vivo* ist aufgrund des Fehlens eines unikaten Markers methodisch schwierig. Anhand aktueller Arbeiten liegen jedoch zahlreiche Hinweise dafür vor, dass MSC im adulten Organismus in enger Assoziation zu Gefäßen existieren (Crisan, 2008). Diese Existenz als Perizyt ist vereinbar mit der vielfach belegten Beteiligung von MSC an der Ausbildung einer Nische für hämatopoetische Stammzellen (HSC) im Knochenmark [Übersicht in (Nombela-Arrieta, 2011)]. Die Isolation von MSC aus anderen Geweben lässt jedoch darauf schließen, dass MSC im humanen Organismus weitere Funktionen, so z. B. im Rahmen der Geweberegeneration oder Immunregulation erfüllen [Übersicht in (Bianco, 2008)].

Diese postulierten Funktionen verlangen eine lebenslange Persistenz von MSC unter Erhalt ihres Stammzellcharakters und damit eine Resistenz gegenüber der physiologischen genotoxischen Schädigung im Laufe der Alterung des humanen Organismus. Bei HSC, als der am besten charakterisierten Population adulter Stammzellen, sind die Mechanismen des Erhalts des Stammzellcharakters im Laufe der Alterung gut untersucht. HSC existieren im Organismus als ruhende oder langsam proliferierende Zellpopulation und sind damit wenig vulnerabel für genotoxische Schädigung [Übersichten in (Bryder, 2006; Sharpless, 2007)]. Für MSC dagegen existierten zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten nur wenige Berichte zum Einfluss von Alterung und genotoxischer Schädigung (Stolzing, 2008). Insbesondere war unklar, ob von Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung isolierte MSC sich in ihren Eigenschaften von MSC gesunder Spender unterscheiden.

1.1.4 Regeneratives und immunmodulatorisches Potential von MSC

In Hinblick auf eine therapeutische Anwendung besitzen MSC gegenüber ESC Vorteile. Ihre Gewinnung ist nicht mit ethischen Bedenken behaftet und - je nach Therapieziel - auch bei dem zu behandelnden Patienten, d. h. in einem autologen Konzept möglich. Im Tiermodell wurden MSC in vielfältigen Modellen zur Organ- und Gewebegeneration eingesetzt (Mosna, 2010). Beim Menschen erfolgte die Transplantation von MSC u. a. zur Verbesserung der

hämatopoetischen Regeneration nach Transplantation von HSC (Koc, 2000), zur Reparatur von Gendefekten (Horwitz, 2002) und bei zahlreichen anderen Indikationen [Übersicht in (Giordano, 2007)]. Dabei wurden klinisch relevante Erfolge gesehen, allerdings konnte sich bisher bei keiner Indikation die Transplantation von MSC als Standard etablieren. Neueste Arbeiten lassen vermuten, dass der therapeutische Effekt transplanteder MSC weniger auf der Integration und Differenzierung in Zellen des verletzten Gewebes beruht, sondern auf die Sekretion von Zytokinen zurückzuführen ist [Übersicht in (Prockop, 2009)].

Diese Beobachtung korreliert mit dem vielfach demonstrierten immunmodulatorischen Potential von MSC. MSC sind u. a. in der Lage, die Mitogen-stimulierte Proliferation von Lymphozyten, die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und die Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten zu inhibieren sowie die Aktivität regulatorischer T-Lymphozyten zu modulieren [Übersicht in (Griffin, 2010)]. Diese Aktivität vermitteln MSC offenbar u. a. durch die Freisetzung von Prostaglandin E2 und IL-6. Trotz ihres niedrigen immunogenen Potentials können MSC unter spezifischen Bedingungen eine Immunantwort generieren [Übersicht in (Nauta, 2007)].

Diese beobachteten immunsuppressiven Eigenschaften waren Anlass, das therapeutische Potential von MSC bei Erkrankungen des Immunsystems zu untersuchen. Klinisch relevante Erfolge wurden bei der Transplantation von HLA-inkompatiblen MSC bei Patienten mit Graft-versus-host disease (GvHD) nach allogener Blutstammzelltransplantation gesehen (Le Blanc, 2008). Weiterhin existieren Fallberichte über die Transplantation von MSC bei Patienten mit Systemischer Sklerodermie (Christopeit, 2008) und systemischem Lupus erythematoses (Liang, 2010). Bei keiner der bislang berichteten Anwendungen von MSC beim Menschen wurden relevante Toxizitäten beobachtet (Prockop, 2010).

1.2 BEDEUTUNG VON MSC FÜR DAS WACHSTUM MALIGNER TUMOREN

1.2.1 Tumorintegration von MSC und deren Nachweis

Seit langem ist bekannt, dass nicht-maligne Zellen in das Gewebe maligner Tumoren integrieren und dort an der Ausbildung des Tumorstroma beteiligt sind (Yang, 2003). Ein Teil dieser Zellen scheint dem Knochenmark zu entstammen (Direkze, 2004). Im Tierversuch wurde beobachtet, dass auch MSC nach systemischer Applikation in etablierte Xenografte integrieren (Studený, 2002). Die Integration von MSC im Tiermodell wurde mittlerweile für zahlreiche Tumorentitäten und in verschiedenen Modellen bestätigt [Übersicht in (Klopp, 2011)].

Bislang liegen nur indirekte Hinweise für eine derartige Tumorintegration von MSC im humanen Organismus vor [Übersicht in (McAllister, 2010)]. So wurden in, nach allogener Knochenmarktransplantation erstdiagnostizierten, soliden Tumoren des Empfängers CD45-

negative, d. h. nicht-hämatopoetische Zellen des Spenders nachgewiesen (Avital, 2007; Cogle, 2007). In diesen Arbeiten konnte eine Abstammung dieser Zellen von HSC oder MSC nicht klar nachgewiesen werden; es leitet sich jedoch die Vermutung ab, dass MSC des Spenders in die entstehenden Tumoren integrierten. Die MSC könnten - insbesondere bei Transplantation von Knochenmark - direkt im Transplantat enthalten gewesen sein oder aber sich aus im Transplantat enthaltenen hämatopoetischen Zellen abgeleitet haben. Dies steht in Übereinstimmung mit der These eines gemeinsamen Progenitors von HSC und MSC (Ogawa, 2006).

1.2.2 Einfluss des Tumorstroma auf das Wachstum von Tumoren

Der mögliche Beitrag von MSC zum Tumorstroma ist relevant, denn das Tumorstroma ist für das Wachstum und die Metastasierung maligner Tumoren - und damit auch als potentiell Therapieziel - bedeutsam [Übersicht in (McAllister, 2010)].

Ein Bestandteil des Tumorstroma sind Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAF). Diese lassen sich regelhaft im Stroma solider Tumoren nachweisen und zeichnen sich u. a. durch die Expression von α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) und Stromal cell-Derived Factor 1 (SDF-1) aus. CAF scheinen für die Funktion des Stroma maligner Tumoren essentiell (Orimo, 2007).

Neben CAFs setzt sich das Tumorstroma aus weiteren nicht-malignen Zellen - Makrophagen, Lymphozyten - und einer extrazellulären Matrix - bestehend u. a. aus Fibronectin, Laminin und Heparansulfat - zusammen (Mueller, 2004). Eine wesentliche Funktion des Tumorstroma ist die Bereitstellung einer vaskulären Versorgung des Tumors (Kerbel, 2008). Gleichzeitig ist das Tumorstroma auch eine Zielstruktur der Anti-Tumor-Immunantwort [Übersicht in (Blankenstein, 2005)].

Bei zahlreichen soliden Tumoren lässt sich eine Zone des invasiven Wachstums im Grenzbereich zwischen Tumorgewebe und umliegendem gesundem Gewebe erkennen. Hier vollzieht sich die, für das invasive Wachstum von Tumorzellen essentielle Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT), die zur Generierung invasiv wachsender, zur Metastasierung fähiger Tumorzellen führt. Für die EMT ist die Aktivierung spezifischer intrazellulärer Signalwege wesentlich, und das Tumorstroma scheint an deren Regulation beteiligt zu sein (Brabletz, 2005). Der Vollzug der EMT und des invasiven Wachstums erfordert eine stetige Umstrukturierung der Architektur des Tumors. Hierfür sind u. a. Matrix-Metalloproteinasen verantwortlich, die sowohl von Tumorzellen als auch von Zellen des Tumorstroma sezerniert werden (Polyak, 2009).

1.2.3 MSC als Ursprung maligner Tumoren

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass sich zahlreiche Malignome aus transformierten unreifen Progenitorzellen oder Stammzellen ableiten [Übersicht in (Rosen, 2009)]. Diese These ist nahe liegend, verfügen doch Stamm- und Progenitorzellen über die Fähigkeit zur Proliferation und müssen diese nicht, wie im Falle ausdifferenzierter Zellen erst durch Mutationen erwerben.

Entsprechend wurde auch für MSC postuliert, dass sie eine niedrige Schwelle für die maligne Transformation besitzen. Berichte über die Entstehung eines Sarkoms mit Spendergenotyp nach allogener Knochenmarktransplantation (Berger, 2008) unterstützten diese Annahme. Im Verlauf der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen wurden von zwei Arbeitsgruppen Berichte vorgelegt, die eine maligne Transformation von MSC nach prolongierter *In-vitro*-Kultivierung demonstrierten (Rosland, 2009; Rubio, 2005). Die Beobachtung, dass MSC mit stabiler ektopter Expression humaner Telomerase nach prolongierter Kultivierung maligne transformieren, ließ auf mögliche Pathomechanismen schließen (Serakinci, 2004). Dem standen andere Arbeiten gegenüber, in denen keine maligne Transformation von MSC nachgewiesen werden konnte (Bernardo, 2007).

Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit war damit unklar, wie hoch die Suszeptibilität von MSC für eine maligne Transformation ist. Insbesondere war nicht bekannt, über welche Mechanismen MSC verfügen, um als Perizyt im adulten Organismus in Gegenwart permanenter Schädigungen lebenslang zu persistieren ohne ihren Stammzellcharakter zu verlieren und ohne einem erhöhten Risiko für eine maligne Transformation zu unterliegen. Anhand zahlreicher Untersuchungen im Modell der HSC [Übersicht in (Rossi, 2008)] bestand die Vermutung, dass auch in MSC die spezifische Regulation von Apoptose und Zellzyklus eine funktionelle Persistenz im adulten Organismus erlaubt.

1.3 ZELLULÄRE REAKTION AUF GENOTOXISCHE SCHÄDIGUNG

1.3.1 DNA-Schädigung und deren Reparatur

Im humanen Organismus sind Zellen permanent genotoxischer Schädigung ausgesetzt und die Zahl von DNA-Läsionen in einer Zelle pro Tag wird auf 10^5 geschätzt (Lindahl, 1993). Die intrazelluläre Detektion von DNA-Schäden wird durch verschiedene Proteine realisiert - z. B. die Kinasen Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related oder Ataxia-Telangiectasia Mutated. Die anschließenden zellulären Mechanismen der DNA-Reparatur umfassen u. a. Mismatch Repair, Nucleotide Excision Repair, homologe Rekombination und Base Excision Repair. Die Aktivierung dieser Reparaturmechanismen führt in Abhängigkeit des Ausmaßes der

Schädigung und des Zelltyps zur Aktivierung von p53 und nachfolgender Induktion eines Zellzyklusarrestes oder Vollzug der Apoptose (Blanpain, 2011).

1.3.2 Zellzyklusregulation und ihre Analyse

Ein Mechanismus zur Prävention der malignen Transformation proliferierender Zellen ist die Existenz von Restriktionspunkten im Zellzyklus. Erst bei Vorliegen der entsprechenden Wachstumssignale - z. B. Zytokine - und bei fehlender Expression oder bei Inaktivität anti-proliferativer Signale - z. B. p53 und p21 - kann die Zelle aus der in ihrer Länge variablen G₁-Phase in die Phase der DNA-Replikation, die S-Phase eintreten. Nach deren Durchlaufen tritt die Zelle in die G₂-Phase ein, sofern die intrinsischen Kontrollmechanismen eine fehlerfreie DNA-Synthese signalisieren. In der in ihrer Dauer fixierten und kurzen G₂-Phase erfolgt die Assemblierung des Mitoseapparates und nachfolgend die Mitose (Abbildung 1-3). Das Durchlaufen der Restriktionspunkte wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) kontrolliert, deren Aktivierung durch Phosphorylierung und die Assoziation mit Cyclinen vermittelt wird [Übersichten in (Satyanarayana, 2009; Vermeulen, 2003b)].

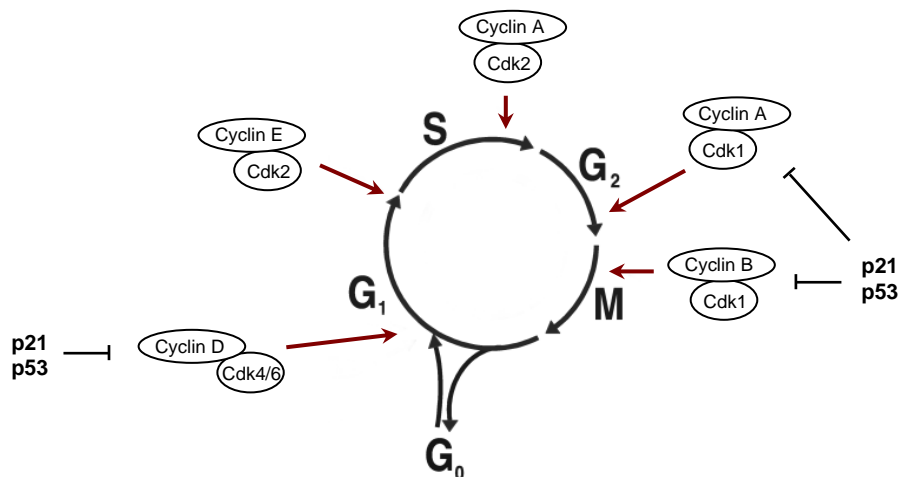


Abbildung 1-3: Der Zellzyklus proliferierender eukaryonter Zellen ist durch Restriktionspunkte gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (Vermeulen, 2003b).

An jedem der Restriktionspunkte kann bei inkomplett oder fehlerhaft vorliegenden Signalen ein Arrest des Zellzyklus oder aber der Eintritt in die Apoptose vermittelt werden. Bei vorliegender Schädigung erfolgt die Aktivierung von p53, welches eine Arretierung induzieren kann. Der Arrest erlaubt den Ablauf intrazellulärer Reparaturmechanismen, z. B. durch Reparatur von DNA-Schäden oder aber durch Elimination von Sauerstoffradikalen. Sofern weitere proapoptotische Signale aktiviert werden, erfolgt statt einer Aufrechterhaltung der Arretierung die Realisierung der Apoptose [Übersicht in (Vermeulen, 2003a)].

Darüber hinaus kann die Zelle in einen anhaltenden Arrest - die G₀-Phase - übertreten. Dabei erfolgt eine langfristige Unterdrückung der DNA-Replikation. Resultat ist eine ruhende Zelle mit

Erhalt ihres vollen - durch Genom und epigenetische Prägung bestimmten - Potentials. Bei entsprechenden extrinsischen Signalen kann dieser Zustand der „Quieszenz“ verlassen werden und die Zelle wieder in den Zellzyklus eintreten [Übersicht in (d'Adda di Fagagna, 2008)].

Bei *In-vitro*-Kultivierung befinden sich proliferierende Zellen in der G1- oder G0-, S- und G2/M-Phase, wobei der Anteil von Zellen in den jeweiligen Phasen sich nach der Dauer der Phasen und dem Vorliegen der Signale zum Passieren der Restriktionspunkte richtet. Die Analyse des Zellzyklus stützt sich auf die Bestimmung des Anteils von Zellen in den verschiedenen Phasen. Dies erfolgt nach Anfärbung der nukleären DNA mittels Durchflusszytometrie. Dabei lassen sich Zellen in der G1- oder G0-Phase mit einfachem DNA-Gehalt ($2n$) von Zellen in der S-Phase mit vermehrtem, aber noch nicht vollständig verdoppeltem DNA-Gehalt ($> 2n$ aber $< 4n$) und Zellen in der G2/M-Phase mit vollständig verdoppeltem DNA-Gehalt ($4n$) unterscheiden. Findet sich nach Änderung extrinsischer oder intrinsischer Bedingungen eine Veränderung des Anteils der Zellen, ist dies ein Hinweis auf einen vollzogenen Zellzyklusarrest. Die Differenzierung ruhender Zellen in der G0-Phase ist mit alleiniger DNA-Färbung nicht möglich, sondern erfordert zusätzliche Färbungen, z. B. die Bestimmung des RNA-Gehaltes mittels Pylonin.

1.3.3 Mechanismen der Apoptose und ihre Analyse

Der Mechanismus des programmierten Zelltodes kann in Zellen des humanen Organismus durch intrinsische oder extrinsische Signale induziert werden. Der intrinsische Signalweg wird bei Schädigung aktiviert, so z. B. bei Präsenz von Sauerstoffradikalen durch Schädigung der Mitochondrienmembran oder durch DNA-Schädigung, z. B. durch Platinaddukte. Dabei wird p53 exprimiert und in weiteren Schritten Procaspase-9 (46 kDa) in ihre Fragmente (37 kDa, 35 kDa und 12 kDa) gespalten.

Der extrinsische Signalweg wird durch Zytokine z. B. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) initiiert und führt zur Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Im Fall von TRAIL erfolgt die Bindung des homodimerisierten löslichen Liganden TRAIL an die transmembranären Death Receptors (DR) DR4 und DR5, über deren intrazelluläre Domänen die DISC-Bildung induziert wird. Darüber hinaus existieren die Decoy Receptors (DcR) DcR2 und DcR3 als inaktive Rezeptoren, die keine aktive intrazelluläre Domäne besitzen und damit auch trotz Bindung von TRAIL keine DISC-Bildung induzieren können. Via DISC erfolgt die Spaltung von Procaspase-8 (55kDa) in deren Fragmente (43 kDa, 41 kDa, und 11 kDa).

Beide Signalwege münden in eine gemeinsame Signaltransduktion (Abbildung 1-4). Durch aktive Caspase-8 oder Caspase-9 erfolgt die Spaltung von Procaspase-3 (32 kDa) in die aktiven Fragmente (17 kDa und 12 kDa). Durch diese Effektorcaspase werden Proteine, die für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen essentiell sind inaktiviert; so wird z. B. Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase (PARP, 116 kDa) in dessen inaktive Form (85 kDa) gespalten. Es erfolgt

dann die typische Fragmentierung der DNA in ca. 200 kB große Fragmente und die aktive Abtrennung membranumschlossener Zytoplasmafragmente. Dabei geht die Asymmetrie der Zellmembran verloren und mittels Annexin V detektierbare Phosphatidylserin-Domänen werden auf der Zelloberfläche zunächst unter Erhalt der Integrität der Zellmembran präsentiert. Letztlich kommt es zur Auflösung der Zellstruktur [Übersicht in (Fulda, 2006)].

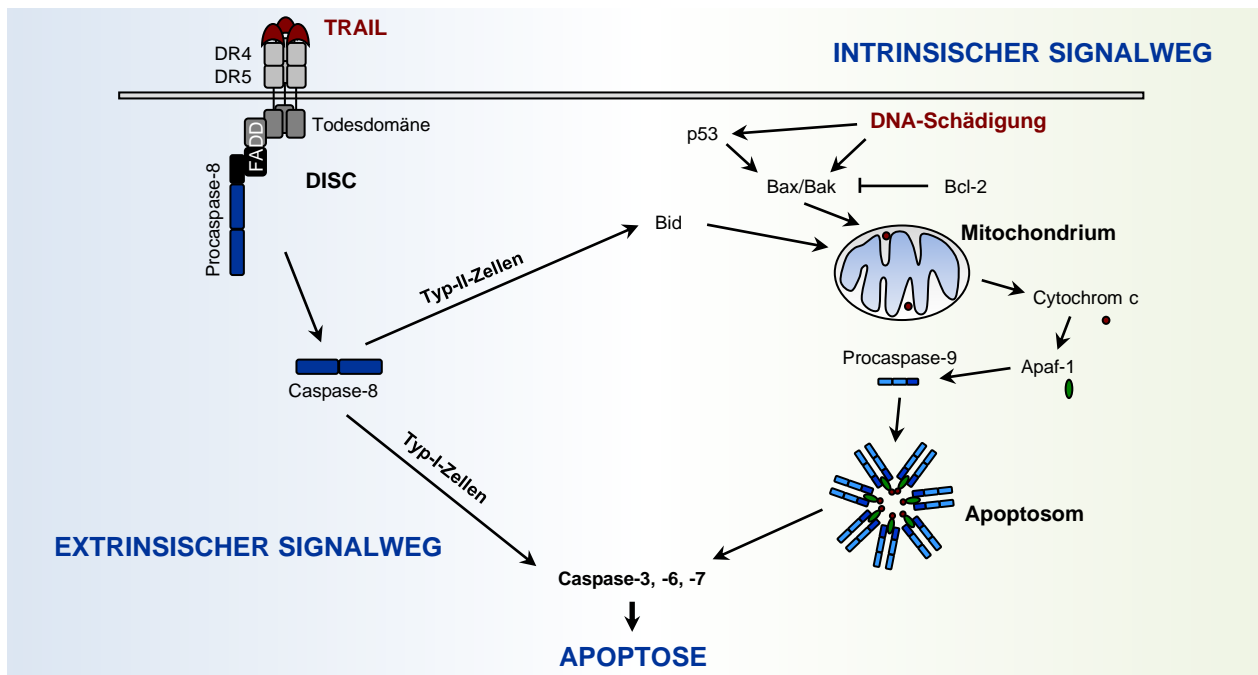


Abbildung 1-4: Die Induktion von Apoptose in humanen Zellen kann prinzipiell durch zwei, miteinander komplex verknüpfte Signalwege erfolgen. Schematisch dargestellt ist der extrinsische Signalweg am Beispiel von TRAIL und der intrinsische Signalweg am Beispiel der DNA-Schädigung durch DNA-Addukte. Abbildung modifiziert nach (Fulda, 2006). Apaf-1 - Apoptotic protease activating factor 1; Bak - Bcl-2 homologous antagonist killer, Bax - Bcl-2 associated x-protein; Bid - Bcl-2 interacting domain; FADD - Fas-Associated protein with Death Domain, übrige Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Zwischen intrinsischem und extrinsischem Signalweg sowie innerhalb der beiden Signalwege existieren mehrere Mechanismen um das proapoptotische Signal zu amplifizieren (Abbildung 1-4). Durch die Aktivierung des DISC und nachfolgend des proapoptotischen Proteins Bid kann in Typ-II Zellen Caspase-9 aktiviert werden. Caspase-3 kann Procaspase-9 spalten und damit das proapoptotische Signal verstärken. Dem stehen Proteine mit antiapoptotischer Wirkung gegenüber. So wird z. B. die Aktivierung von Caspase-8 u. a. durch FLIP inhibiert, und XIAP inhibiert die Aktivierung von Caspase-9 [Übersicht in (Fulda, 2006)].

Die Induktion der Expression von p53 durch verschiedene Schädigungsmechanismen hat daher eine ambivalente Wirkung. Zunächst wird ein Zellzyklusarrest induziert, der eine intrazelluläre Reparatur erlaubt. Akkumulieren jedoch die proapoptotischen Signale oder fehlen die antiapoptotischen Signale, erfolgt bei vorliegender Expression von p53 die Apoptose [Übersicht in (Haupt, 2003)].

Die Induktion von Apoptose kann durch verschiedene Methoden detektiert werden. Mittels Western Blot kann der Nachweis der Proteinspaltung erfolgen; mittels Trypan-Blau-Färbung können sich nicht anfärbende, apoptotische Zellen mit erhaltener Membranintegrität von angefärbten, nekrotischen Zellen mit destruiertes Membran unterschieden werden. Eine funktionelle Analyse der Proteinaktivierung kann durch kolorimetrische Substratspaltungsassays erfolgen. Eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen innerhalb einer Zellpopulation kann durch durchflusszytometrische Bestimmung der Annexin V-positiven Zellen sowie nach DNA-Färbung über die Bestimmung des Anteils der Zellen mit destruiertes DNA ($< 2n$, SubG1-Anteil) vorgenommen werden.

1.3.4 Mechanismen der Persistenz adulter Stammzellen im humanen Organismus

Die kontinuierliche Regeneration der Gewebe des humanen Organismus mit hohem Zellumsatz verlangt die lebenslange Persistenz adulter Stammzellen oder Progenitorzellen. Eines der best untersuchtesten Beispiele sind HSC. Die klinische Routine der Blutstammzelltransplantation mit dem kompletten Ersatz der Empfängerhämatoopoese beweist die Existenz von HSC im humanen adulten Organismus [Übersicht in (Jenq, 2010)]. Die Erfahrungen mit dieser Therapieform und die vielfältigen Untersuchungen von HSC deuten darauf hin, dass HSC über eine hohe genomische Stabilität verfügen (Bryder, 2006). Hierdurch kann eine Akkumulation der lebenslang physiologisch erworbenen genotoxischen Schäden vermieden werden.

Postulierte Mechanismen der Persistenz adulter Stammzellen beinhalten die Annahme einer ruhenden, in Quieszenz befindlichen Stammzellpopulation. Nur jeweils eine Fraktion dieser Zellen durchläuft den Zellzyklus, um sich schnell teilende Tochterzellen, sogenannte „transit amplifying progenitor cells“ zu generieren, die teilweise bereits für eine spätere Differenzierung determiniert sind. Neueste Daten geben Anlass zu der Hypothese, dass Populationen adulter Stammzellen je nach extrinsischen Faktoren ihr Zellzyklusverhalten zwischen Proliferation und Quieszenz wechseln [Übersicht in (Barker, 2010)]. Eine derartige Flexibilität der Proliferationsregulation verlangt eine balancierte Exposition mit den jeweiligen extrinsischen Signalen, um ein Aufbrauchen der gesamten Stammzellpopulation zu vermeiden. Dies wird durch die postulierte Stammzellnische vermittelt - eine Umgebung mit einer stringent regulierten Homöostase, die eine differenzierte Signaltransduktion zur Regulation des Proliferationsverhaltens von Stammzellen gewährleistet (Morrison, 2008).

Neben der Fähigkeit zur Quieszenz verfügen adulte humane Stammzellen über weitere Mechanismen, die eine Resistenz gegenüber genotoxischen Schäden vermitteln, so z. B. die Reparatur von DNA-Schäden (Kenyon, 2007) oder die Entfernung toxischer Substanzen aus dem Zytoplasma durch Membranpumpen (Huls, 2009).

Die Erkenntnisse zum Zeitpunkt des Beginns der hier präsentierten Arbeiten ließen darauf schließen, dass MSC im humanen Organismus auch im hohen Alter (Nishida, 1999) und nach

Chemotherapie (Dickhut, 2005; Rieger, 2005) präsent sind. Unklar war jedoch, ob sich diese Zellen gegenüber MSC gesunder Spender unterscheiden und welche Mechanismen der Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung diese Persistenz von MSC im humanen Organismus ermöglichen.

1.4 ANSÄTZE ZUR THERAPIE MALIGNER TUMOREN MITTELS GENETISCH MODIFIZIERTER ZELLEN

1.4.1 Genetische Modifikation von Zellen

Für den Transfer von Genen in eine eukaryontische Zelle stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Durchdringung der Zellmembran mittels Chemikalien - Kalzium-Phosphat, Dextran oder Liposomen - oder mittels Elektroporation erlaubt die Transfektion der als Plasmid vorliegenden DNA. Demgegenüber erfolgt eine Transduktion durch aktive Infektion mit manipulierten Viren, die das zu transferierende Gen als Teil des Virusgenoms tragen. Für den viralen Gentransfer sind auf Adenoviren oder Retroviren basierte Systeme etabliert. Der Transfer mittels DNA-Plasmiden oder adenoviralen Systemen führt nur zufällig und daher sehr selten - z. B. im Rahmen der homologen Rekombination - zu einer Integration des transferierten Gens in das Genom der Zielzelle und resultiert damit zumeist nur in einer transienten ektopen Genexpression. Die Generierung stabil transfizierter Zellen erfordert dann eine anschließende klonale Selektion mittels Marker- oder Resistenzgenen und ist daher für eine klinische Anwendung wenig geeignet. Der Vorteil der Transfektion und der adenoviralen Transduktion besteht vor allem in ihrer einfachen Handhabung und der geringen Chance von Störungen des Genoms durch den Einbau des transferierten Gens. Nachteilig ist die abnehmende Effizienz der Expression durch Degradation der Plasmid-DNA oder durch Abnahme des Anteils transfizierter Zellen bei Proliferation der Zellen. Zusätzlich problematisch ist bei den auf chemischer oder physikalischer Membranperforation beruhenden Methoden das umgekehrt proportionale Verhältnis von Toxizität und Transfektionseffizienz.

Im Gegensatz hierzu erfolgt bei retroviralen Systemen regelhaft der Einbau in das Genom proliferierender Zellen; bei lentiviralen Systemen auch in das Genom ruhender Zellen. Es resultiert eine stabile Expression des transferierten Gens auch in proliferierenden Zellen. Problematisch ist bei diesen Methoden, dass infolge der genomischen Integration des transferierten Gens eine Aktivierung von Onkogenen erfolgen kann und eine Replikation der Viren in den Wirtszellen ausgeschlossen werden muss. Daher sind diese Systeme aufwändig und methodisch komplex [Übersicht in (Kay, 2001)].

Am vielversprechendsten für eine klinische Anwendung erscheinen derzeit auf HIV-1 beruhende Konstrukte. Bei diesen lentiviralen Systemen der 3. Generation liegen das zu transferierende Gen, die Gene der Hüllproteine und die für die Virussynthese relevanten Verpackungsgene auf insgesamt 4 Plasmiden - Expressionsplasmid, zwei Verpackungsplasmide und Hüllproteinplasmid - getrennt vor. Das zu transferierende Gen wird mittels Standardmethoden der Klonierung in die multi-cloning site hinter einem für die geplante Anwendung ausgewählten Promotor insertiert und von einer deletierten 3'-LTR flankiert. Alle Plasmide werden mittels Transfektion in leicht zu transfizierende Zellen transient transferiert. In diesen Verpackungszellen erfolgen dann die Synthese der Viruspartikel und deren Sekretion. Nach Gewinnung des Überstandes kann z. B. durch Ultrazentrifugation die Konzentration der Viruspartikel erhöht werden. Anschließend kann durch Transduktion einer Kontrollzellpopulation mit diesem aufkonzentrierten Überstand in verschiedenen Verdünnungsstufen und Messung der Zielgenexpression die Konzentration der Viruspartikel im gewonnenen Überstand – der Virustiter – abgeschätzt werden. Durch Inkubation mit dem auf einen Titer adjustierten Überstand erfolgt dann die Transduktion der Zielzellen. Infolge der Separierung der Hüllproteine von den Genen der Polymerase werden in den Verpackungszellen Partikel generiert, die nicht das komplette Virusgenom enthalten. Zusätzlich vermittelt die deletierte 3'-LTR eine Selbstinaktivierung durch Inaktivierung der 5'-LTR nach reverser Transkription [Übersicht in (Trono, 2000)]. Die Infektösität der Viruspartikel kann je nach designierter Zielzelle durch Pseudotypisierung, d. h. den Ersatz der parentalen HIV-1-Hüllproteine mit artfremden viralen Hüllproteinen, erhöht werden (Kay, 2001).

1.4.2 Modelle zur präklinischen Evaluation einer zellbasierten Tumorthherapie

Das Wachstum eines Tumors und dessen Behandlung lässt sich im Tiermodell nur eingeschränkt simulieren. Voraussetzung für die Analyse humaner Zellen im Tiermodell ist die Verwendung immunsupprimierter Tiere. Die am besten charakterisierten und hinsichtlich ihrer Verwendung einfachsten Methoden existieren hierfür im Mausmodell.

Die athymische Nacktmaus (nu/nu) zeichnet sich aufgrund eines genetischen Defektes neben einer fehlenden Behaarung insbesondere durch eine fehlende T-Zell-Immunität aus. Die NOD/SCID-Maus zeigt eine defekte B- und T-Zell-Immunität. Die erst vor kurzem entwickelte NOD/SCID/IL-2Ry^{null}(NOG)-Maus wurde durch Kreuzung der NOD/SCID-Maus mit einer für IL-2Ry defekten Maus entwickelt und besitzt weder B- und T-Zell-Immunität noch eine aktive NK-Zellpopulation (Ito, 2002). Gegenüber Nacktmäusen ist die Haltung und Untersuchung von NOD/SCID- und NOG-Mäusen aufgrund deren höheren Infektanfälligkeit aufwändiger. Da zahlreiche Tumorzelllinien im Nacktmausmodell trotz dessen residualer Immunität ein reproduzierbares Wachstum zeigen, stellt die athymische Nacktmaus ein akzeptiertes Modell für die Untersuchung des Tumorwachstums *in vivo* dar.

Die Transplantation der Tumorzellen kann durch Injektion - mit in dieser Reihenfolge zunehmender methodischer Schwierigkeit - subkutan, systemisch intravenös oder aber orthotop, d. h. an der für die jeweilige Entität typischen Lokalisation erfolgen. Neben der unterschiedlichen Applikation bedingen diese Modelle auch, dass sich das Tumorwachstum nur eingeschränkt beobachten lässt. Hier ist insbesondere das subkutane Modell vorteilhaft, da es bei Verwendung markierter Tumorzellen die beste Möglichkeit des *In-vivo*-Imaging bietet. Dies erlaubt die Beobachtung eines Tieres und damit desselben Tumors über mehrere Tage mit höherer Genauigkeit als eine metrische Messung. Als Marker kommen dabei ektoexprimierte fluoreszierende oder aber eine Lumineszenz katalysierende Proteine in Frage. Gegenüber der Lumineszenz ist die Fluoreszenz-basierte Messung einfacher und robuster, aber durch das im lebenden Tier immanente Hintergrundsignal weniger sensitiv (Luker, 2008; Stell, 2007).

1.4.3 Kolorektales Karzinom - eine für die MSC-basierte Tumorthherapie geeignete Entität

Das Kolorektale Karzinom (CRC) besitzt bei geschlechterübergreifender Analyse in Deutschland und anderen westlichen Ländern eine der höchsten Inzidenz der Malignomkrankungen und stellt eine der häufigsten Malignom-assoziierten Todesursachen dar (Cunningham, 2010). Die hohe Sterblichkeit resultiert aus der Tatsache, dass bei einer Vielzahl von Patienten bereits bei Diagnose oder im Verlauf ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt. Der Standard der aktuellen Therapie fortgeschrittener Stadien besteht in der Applikation von Zytostatika wie z. B. 5-Fluorouracil (5-FU) oder seiner oralen Prodrugs (Schmoll, 2010), der Gabe von Oxaliplatin oder Irinotecan (Haller, 2011) sowie von Anti-EGF-Rezeptor- oder Anti-VEGF-Antikörpern wie Cetuximab oder Bevacizumab (Van Cutsem, 2010). Mit der Einführung dieser, teilweise erst seit wenigen Jahren zur Verfügung stehenden Substanzen konnte eine Verlängerung des Überlebens von Patienten mit metastasiertem CRC erzielt werden. Aufgrund der Biologie des Tumors entwickeln sich jedoch im Verlauf der Behandlung Resistenzen, die eine Heilung oder ein langfristiges Überleben verhindern. Es besteht daher weiterhin das Ziel, neue Therapieansätze zu identifizieren, die ein langfristiges Überleben sichern [Übersicht in (Cunningham, 2010)].

Die Pathophysiologie des CRC ist ein Paradigma für eine mehrstufige, durch die Akkumulation von Mutationen bei genomischer Instabilität induzierte Onkogenese. Es entwickelt sich ein inhomogener Tumor, der sich aus Tumorzellen mit unterschiedlich aggressivem Wachstum, Stromazellen, Immunzellen und Endothelien zusammensetzt [Übersicht in (Markowitz, 2009)]. Die Interaktion des Stroma mit dem umliegenden gesunden Gewebe und den Tumorzellen ist dabei essentiell für das invasive Wachstum des CRC (Brabletz, 2005).

Der Erwerb einer Resistenz scheint auch beim CRC durch das Neuauftreten von Mutationen zu erfolgen. Eine für CRC-Zellen typische Mutation betrifft *TP53* und resultiert in einer Expression von funktionell nicht aktivem p53. Allerdings ist ein normaler p53-Status nicht für jede Substanz prädikativ für eine Sensitivität und vice versa. Es ist ferner davon auszugehen, dass in einem Tumor Zellen mit unterschiedlichem Resistenzstatus präsent sind und sich auch das Resistenzverhalten von Primärtumor und Metastase unterscheidet (Walther, 2009).

1.4.4 TRAIL als therapeutisches Gen für eine zellbasierte Tumorthherapie

Ein für eine zellbasierte Tumorthherapie geeignetes Gen sollte eine selektive Aktivität für Tumorzellen aufweisen und in den Zielzellen keine toxischen Effekte haben. Für TRAIL ist bekannt, dass es eine proapoptotische Wirkung relativ selektiv auf Tumorzellen ausübt. Hierfür scheint sowohl eine erhöhte Expression von DR4 und DR5 als auch eine höhere Sensitivität der intrazellulären, TRAIL-assoziierten Signaltransduktion in malignen Zellen gegenüber gesunden Zellen verantwortlich zu sein (Ashkenazi, 2002). Aufgrund dieser Selektivität erfolgt bereits die klinische Testung von TRAIL bzw. TRAIL-Agonisten bei verschiedenen Tumorentitäten (Ashkenazi, 2008). Physiologisch ist TRAIL im humanen Organismus als transmembranär exprimiertes Protein oder aber als lösliches Protein präsent [Übersicht in (Gonzalvez, 2010)]. Welchen Effekt die ektope Expression von *TRAIL* in MSC auf diese hat, war bei Beginn der hier präsentierten Arbeiten nicht bekannt.

Ausgewählte Zelllinien verschiedener Tumorentitäten, darunter auch CRC-Zelllinien, weisen *in vitro* und *in vivo* eine inhärente Resistenz gegenüber löslichem TRAIL (sTRAIL) auf (Zhang, 2010). Eine Überwindung der Resistenz für sTRAIL gelingt teilweise durch die parallele Applikation von Zytostatika in subapoptotischer Dosierung (Wang, 2008). Inwiefern die Resistenz gegenüber sTRAIL durch transmembranär exprimiertes TRAIL überwindbar ist, war zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit unbekannt.

1.4.5 Genetisch modifizierte MSC für die Therapie maligner Tumoren

Zum Zeitpunkt des Beginns der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen lagen nur wenige Untersuchungen zum Einsatz genetisch modifizierter MSC für die Tumorthherapie vor. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Marini et al. zum Effekt von MSC mit ektope Expression von Interferon- γ in verschiedenen Tumormodellen (Nakamizo, 2005; Studeny, 2002; Studeny, 2004) ließen vermuten, dass genetisch modifizierte MSC für einen therapeutischen Einsatz geeignet sind. Speziell in einem CRC-Xenograftmodell war gezeigt worden, dass tumorintegrierte MSC mit retroviraler Expression von Cytosin-Deaminase bei Exposition mit 5-Fluorocytosin eine Inhibition des Tumorwachstums vermitteln können (Kucerova, 2007).

Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgten die in der vorgelegten Arbeit dargestellten Untersuchungen. Zahlreiche Arbeiten seit 2006 belegen das Interesse an einem therapeutischen Einsatz genetisch modifizierter MSC; zeigen aber auch, dass weiterführende Untersuchungen zur Einschätzung der klinischen Realisierbarkeit und Effektivität notwendig sind [Übersichten in (Ciavarella, 2011; Dwyer, 2010)].

2. ZIELSTELLUNG

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Projekte verfolgten folgende einzelne Zielstellungen:

- Analyse der Charakteristika von aus dem Knochenmark bei Patienten nach Chemotherapie-Behandlung gewonnenen MSC
- Untersuchung der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkmechanismen und Identifikation von Resistenzmechanismen für genotoxische Schädigung in MSC
- Untersuchung des Einflusses nativer MSC auf das Wachstum solider Tumoren
- präklinische Evaluation der Nutzung tumorintegrierender MSC mit lentiviraler *TRAIL*-Expression für die Therapie des CRC

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zum Großteil publizierten Ergebnisse dieser Projekte im Kontext des Standes der Forschung unter folgenden Fragestellungen zusammenzufassen und zu diskutieren:

- Wie groß ist das Potential von MSC zur malignen Transformation?
- Welchen Einfluss haben MSC auf das Wachstum maligner Tumoren?
- Welches Potential für eine zielgerichtete Tumorthherapie besitzen MSC?

3 MATERIAL UND METHODEN

Ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde bereits publiziert. Hinsichtlich der zugehörigen Methodik erfolgt hier nur die Darstellung des prinzipiellen Vorgehens; für eine Detailbeschreibung wird auf die entsprechenden Publikationen verwiesen. Für bisher unveröffentlichte Arbeiten erfolgt eine ausführlichere Darstellung.

3.1 ALLGEMEINE METHODIK

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Für alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen, einschließlich der bislang nicht veröffentlichten Arbeiten, wurden Verbrauchsmaterialien und Geräte so wie in den publizierten Arbeiten (Aurich, 2007; Dansranjavin, 2009; Dittmer, 2009; Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2011; Mueller, 2009) dargestellt, verwendet.

3.1.2 Verwendete Zellen und deren Kultivierung

Die Kultivierung und Passagierung von Tumorzellen erfolgte wie beschrieben (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2011; Mueller, 2009). Folgende CRC-Zelllinien wurden verwendet: Colo205, Colo320DM, DLD1, HCT8, HCT15, HT29, SW48, SW480, HCT116. Weiterhin wurden die aus testikulären Keimzelltumoren (TGCT) gewonnenen Zelllinien 2102EP (Andrews, 1980) und H12.1 (Casper, 1987), die Mammakarzinomzellen MCF-7 und MDA-MB-231, Fibroblasten des humanen Kolons (CCD-18), kutane humane Fibroblasten (Dammann, 2000) und die Ovarialkarzinom-Zelllinie HeLaS3 untersucht.

Die untersuchten MSC wurden im Rahmen des Projektes so wie dargestellt (Mueller, 2006) und unter 3.2.1 beschrieben, isoliert. Für die Arbeiten im Rahmen des Kooperationsprojektes zur epigenetischen Analyse (s. 3.2.5) wurden kommerziell erworbene MSC untersucht (Dansranjavin, 2009).

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter Standardbedingungen bei 95 % Luftfeuchte, 37°C und 5 % CO₂.

3.1.3 Proteinisolierung und Western Blot

Diese Arbeiten erfolgten gemäß Standardmethoden und wie für die einzelnen Untersuchungen dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006). Je nach Untersuchungsziel wurden von behandelten oder unbehandelten Proben die adhärenenten oder flotierenden Zellen gewonnen, in Lyse-Puffer lysiert, homogenisiert, die DNA mechanisch geschert und durch Zentrifugation der

proteinreiche Überstand gewonnen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels kolorimetrischer Messung und Adjustierung der Konzentrationen in den Proben erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine mittels Semi-Dry Blot-Kammer auf Nitrocellulose-Membranen transferiert, mittels Ponceau S die gleichmäßige Beladung geprüft und die Membranen nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit den angegebenen primären Antikörper inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und die Visualisierung der Immunkomplexe durch Chemilumineszenz mittels eines kommerziellen Kits.

3.1.4 RT-PCR

Die Analysen erfolgten wie dargestellt (Aurich, 2007; Dansranjavin, 2009; Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2009). Die Gesamt-RNA wurde mittels Trizol-Methode oder mittels kommerziell erhältlicher Kits isoliert, teilweise einer DNase-Behandlung unterzogen und anschließend mittels kommerzieller Kits transkribiert und amplifiziert. Als Negativkontrolle dienen für die reverse Transkription Proben ohne Zugabe von RT, für die Amplifikation Proben ohne Zugabe von cDNA. Die Analyse erfolgte im Agarosegel.

3.1.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte wie dargestellt (Mueller, 2006; Mueller, 2011). Die Zellen wurden in Suspension überführt und anschließend mit den entsprechenden FITC-, PE- oder PerCP-konjugierten primären Antikörpern oder entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert und analysiert. Im Einzelfall kamen unkonjugierte primäre Antikörper zur Anwendung, gefolgt von der Inkubation mit einem FITC- oder PE-konjugierten sekundären Antikörper. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer mit entsprechender Software. Die spezifischen Geräteeinstellungen wurden jeweils mit den Isotypkontrollen vorgenommen und im Verlauf der jeweiligen Messung nicht verändert.

3.1.6 Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels Sulforhodamin-B-Assay

Die Zytotoxizität von Substanzen wurde mittels Sulforhodamin-B (SRB)-Assay, so wie jeweils dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2011), getestet. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, der durch Messung der vorhandenen Proteinmenge und Vergleich mit unbehandelten Kontrollen Rückschlüsse über die in der jeweiligen behandelten Probe vorhandene Zellmenge erlaubt. Der Test beruht auf der stabilen Bindung des Farbstoffes SRB an zelluläres Protein, dem nachfolgenden Auswaschen ungebundenen Farbstoffes im sauren Milieu sowie der anschließenden Solubilisierung des Farbstoffes im basischen Milieu. Die Menge des gelösten Farbstoffes wird photometrisch erfasst und korreliert linear mit der Zellzahl. Voraussetzung zum Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ist das

uneingeschränkte Wachstum der Zellen in den verwendeten 96-Loch-Mikrotiterplatten über die gesamte Versuchsdauer. Hier wurden die für die TGCT-Zelllinien bekannten Zellzahlen zugrunde gelegt (Mueller, 2003) oder für CRC-Zelllinien und MSC die optimalen Zellzahlen ermittelt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2011).

Das Setzen der Zellen in eine 96-Loch-Kulturplatte erfolgte an Tag 1, der Beginn der Behandlung mit den angegebenen Zytostatika oder sTRAIL in den angegebenen Konzentrationen erfolgte nach 24 h an Tag 2. Im Falle der Zytostatika wurde pro Platte eine Zelllinie gesetzt und pro Konzentrationsstufe eine Spalte (8 Löcher) behandelt. Im Falle von sTRAIL wurden 3 Platten mit den verschiedenen Zelllinien angesetzt, wobei pro Zelllinie eine Spalte (8 Löcher) angesetzt wurden. Am Ende der Behandlung erfolgten die Fixierung der Zellen, Waschschritte und die SRB-Färbung. Anschließend wurde die OD bei 570 nm bestimmt. Aus den OD-Werten der 8 Proben einer Konzentrationsstufe oder einer Zelllinie wurde der Mittelwert berechnet und in Relation zum als 100 % gesetzten OD-Mittelwert der jeweiligen unbehandelten Kontrolle ausgewertet. Nach semilogarithmischer Auftragung wurde die Konzentration, bei der eine Inhibition des Zellwachstums von 90 % (inhibitorische Konzentration, IC90) bzw. 50 % (IC50) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erfolgte, im Diagramm abgelesen.

3.1.7 Immunzytochemie, Immunhistochemie und histologische Analyse

Diese Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011). Für die immunzytochemische Analyse wurden die Zellen auf Objektträgern oder in Plastik-Kulturgefäßen kultiviert und mittels Formalin oder Methanol/Aceton fixiert. Bei Formalin-Fixierung und angestrebter Detektion intrazellulärer Antigene erfolgte eine Permeabilisierung. Für die Untersuchung von Gewebepreparaten erfolgte bei Paraffinschnitten zunächst die Deparaffinisierung, Rehydrierung und Blockierung unspezifischer Bindung mittels BSA.

Die Proben wurden anschließend mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Als Isotypkontrolle wurde eine separate Probe mit dem jeweiligen unspezifischen Kontroll-Isotyp inkubiert. Anschließend wurde mit dem jeweiligen FITC-, Peroxidase- oder Biotin-markierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte je nach sekundärem Antikörper mittels Chemilumineszenz-Kits (Peroxidase-Markierung), Streptavidin-FITC (Biotin-Markierung) oder direkt fluoreszenzmikroskopisch (FITC-Markierung). Im Falle von Gewebeproben folgten die Färbung mit Hämatoxylin, die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte. Im Falle von Gefrierschnitten wurde eine Kernfärbung mit DAPI vorgenommen und die Schnitte mit Fluoreszenzeindeckmedium sowie Deckgläschen abgedeckt. Im Falle der ausschließlichen morphologischen Beurteilung erfolgte die Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin. Die Auswertung erfolgte am Licht- oder Fluoreszenzmikroskop.

3.1.8 Versuche im Nacktmausmodell und Nicht-invasives *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging

Für die Arbeiten *in vivo* wurden wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011; Mueller, 2009) 6 - 8 Wochen alte athymische Nacktmäuse (nu/nu) verwendet. Sämtliche Versuche erfolgten gemäß den institutionellen Bestimmungen; für alle durchgeführten Tierversuche lag eine entsprechende Genehmigung vor.

Subkutane Xenografte wurden durch s. c. Injektion von 3×10^6 oder 5×10^6 CRC-Zellen in die Flanke des Tiers generiert. Bei einigen Versuchen wurden beide Flanken verwendet, d. h. zwei Xenografte pro Tier generiert. Bei einigen Versuchen wurden Mischxenografte durch Injektion einer Suspension von 3×10^6 CRC-Zellen gemischt mit $7,5 \times 10^5$, $3,33 \times 10^5$, $9,3 \times 10^4$ oder $3,03 \times 10^4$ MSC - entsprechend einem MSC-Anteil an der injizierten Gesamtzellpopulation von 20 %, 10 %, 3 % bzw. 1 % - generiert.

Die systemische Gabe von Zellen erfolgte durch Injektion in die Schwanzvene. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet und die Tumoren reseziert und teilweise gewogen bzw. der Situs eröffnet und relevante Organe reseziert. Die Einbettung der Tumoren und Organe in Paraffin erfolgte nach Formalin-Fixierung; bei einem Teil der Versuche erfolgte die Herstellung von Gefrierschnitten. Die Paraffin-Einbettung sowie die Anfertigung von Schnitten erfolgte teilweise durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holzhausen (Institut für Pathologie, MLU).

Bei einem Teil der Versuche wurden CRC-Zellen mit lentiviraler Expression von Fluoreszenzproteinen verwendet. Das Wachstum der entstehenden Xenografte wurde dann durch Nicht-invasives *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz-Imaging (*In-vivo*-Imaging) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mäder (Institut für Pharmazie, MLU) wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011) bestimmt. Es wurden Multispektralaufnahmen mit einem *In-vivo*-Fluoreszenz-Imaging-System unter Verwendung unterschiedlicher Filtersätze erstellt. Die Aufnahmen erfolgten im Bereich von 500 - 800 nm in 10-nm-Schritten mit automatischer Belichtungszeit. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mittels kommerzieller Software mit Erstellung von Referenzspektren unter Berücksichtigung von Hintergrund und Autofluoreszenz des Tieres. Für die Quantifizierung wurde die totale Signalintensität innerhalb einer manuell im zugehörigen Graustufen-Bild über dem Tumor platzierten Region bestimmt und für die jeweilige Belichtungszeit korrigiert. Alle im Verlauf eines Versuches gemessenen korrigierten Signale wurden auf das unmittelbar nach dem Setzen des jeweiligen Xenografts bestimmte, als 100 % gesetzte Signal normiert. Die Korrelation von totaler Signalintensität und Tumorgroße wurde zuvor anhand subkutaner Tumormodelle demonstriert (Luetzkendorf, 2010).

3.1.9 Lentivirale Transduktion von MSC und Tumorzellen

Die Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010), basierend auf grundlegenden Methoden der Klonierung. Als lentivirales Transduktionssystem wurde ein Vektor mit selbst-inaktivierender 3'-LTR und einem Verpackungssystem der 3. Generation, bestehend aus dem, die *GFP*-cDNA enthaltenden Expressionsplasmid pFUGW (Lois, 2002), den Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE und pRSV-Rev (Dull, 1998) sowie dem Hüllproteinplasmid pVSVG (Lois, 2002), verwendet (dankenswerterweise überlassen von Prof. Dr. T. Braun, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim). Weiterhin kamen kommerziell erhältliche Plasmide, u. a. ein *DsRed*-enthaltendes Plasmid (pDsRed2-N1) zum Einsatz.

Die cDNA des rot fluoreszierenden Proteins DsRed wurde aus dem Plasmid pDsRed2-N1 mittels PCR unter Verwendung von Schnittstellen-generierenden Primern gewonnen. Anschließend erfolgte die gerichtete Ligation in das lentivirale Expressionsplasmid pFUGW aus dem zuvor die *GFP*-cDNA herausgeschnitten wurde. Die korrekte Sequenz des damit generierten *DsRed*-kodierenden Expressionsplasmides pFUDW wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Strangabbruchverfahren mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden durch Mitarbeiter des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung, MLU.

Lentivirale Partikel wurden anschließend durch transiente Transfektion der Verpackungszelllinie HEK 293T mit dem beschriebenen Vier-Plasmid-Expressionssystem hergestellt. Der virale Partikel enthaltende Überstand wurde 48 h nach Transfektion gewonnen, durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und kryokonserviert. Die anschließende Titerbestimmung für FUGW und FUDW erfolgte mittels Inkubation der HEK 293T-Zellen mit seriell verdünnter Virusstammlösung unter Zusatz von Polybrene. Die GFP- bzw. DsRed-Expression wurde dann mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und der Titer der Virusstammlösung anhand der Zahl GFP- bzw. DsRed-positiver Zellen berechnet.

Die Transduktion von MSC und CRC erfolgte bei subkonfluenter Zelldichte in Wachstumsmedium unter Zusatz von Polybrene mit einem Titer von etwa 5×10^5 lentiviralen Partikeln/ml. Durch Transduktion mit FUGW wurden *GFP*-MSC bzw. *GFP*-CRC-Zellen generiert; durch Transduktion mit FUDW wurden *DsRed*-CRC-Zellen gewonnen.

Die Expression von GFP oder Ds-Red wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie überprüft. Im Falle der CRC-Zelllinien erfolgte eine Klonierung der Zellen mittels limitierter Verdünnung zur Generierung von Populationen mit hoher Expression des transferierten Gens.

3.1.10 Statistische Analyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mittelwerte und die zugehörige einfache Standardabweichung (SD) mittels kommerzieller Software (SPSS 16.0; SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet und verglichen. Ausgehend von einem Levene-Test auf Varianzgleichheit kamen ein t-Test oder ein modifizierter t-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet.

3.2 ANALYSEN ZUR PRÄSENZ UND CHARAKTERISTIKA VON MSC

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von MSC

Die Gewinnung humaner MSC aus Knochenmarkaspiraten freiwilliger Spender erfolgte wie dargestellt (Mueller, 2006). Bei vorliegendem schriftlichem Einverständnis wurde eine Aspiration aus diagnostischen Gründen - bei Patienten zur Beurteilung von Erkrankung und bei gesunden Spendern zum Ausschluss einer Erkrankung in Vorbereitung einer allogenen Stammzellspende - durchgeführt. Für die Gewinnung und Untersuchung der Aspirate und isolierten MSC lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der MLU vor.

Mittels Dichtegradientenzentrifugation des Aspirates wurden die mononukleären Zellen (MNZ) gewonnen und in Plastikgefäßen für die Adhärenzselektion kultiviert. Die nicht-adhärenen Zellen wurden nach 24 h durch den Wechsel des Mediums entfernt. Die Kultivierung der adhärenen CFU-F-Zellen erfolgte unter regelmäßigem Medienwechsel bis zum Erreichen einer Konfluenz von 50 %. Anschließend wurden die adhärenen Zellen passagiert und kryokonserviert oder für nachfolgende Experimente mit einer Dichte von 200 Zellen/cm² ausplattiert.

Im Verlauf der hier dargestellten Untersuchungen wurde das für die Kultivierung von MSC verwendete Medium mehrfach optimiert. Letztlich kamen zwei Medien in ihrer jeweils beschriebenen Zusammensetzung zum Einsatz (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006). Beide basierten auf DMEM 1 g/l Glukose, dem Zusatz von hinsichtlich der wachstumsfördernden Wirkung getesteten FKS-Chargen in einem Anteil von 10% oder 15% sowie dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin. Die mit beiden Wachstumsmedien isolierten und expandierten MSC unterschieden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften nicht, so dass aus Gründen der einfacheren Handhabung für den Großteil der Arbeiten das in seiner Zusammensetzung einfachere Medium (Luetzkendorf, 2010) verwendet wurde. Aus gleichem Grund wird in der nachfolgenden Darstellung auf eine Unterscheidung zwischen beiden Medien verzichtet.

Für die Bestimmung der Zahl an CFU-F vor erster Passage erfolgte wie beschrieben deren makroskopische und mikroskopische Zählung sowie in einem Teil der Untersuchungen die Anfärbung mit Giemsa (Mueller, 2006).

3.2.2 Erstellen einer Wachstumskinetik

Das Proliferationsverhalten von MSC wurde wie beschrieben durch Wachstumskinetiken analysiert (Mueller, 2006). Die Zellen wurden mit einer definierten Dichte von 200 Zellen/cm² gesetzt und bei einer Konfluenz von 50 % passagiert. Die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) sowie die Populationsverdopplungszeit (PDT) wurden für jede Passage nach etablierten Formeln (Baxter, 2004) berechnet.

3.2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen

Die durchflusszytometrische Analyse des Zelloberflächenphänotyps von MSC erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006) und unter 3.1.5 beschrieben. Für die Analyse von CD105 kam ein unkonjugierter primärer Antikörper zur Anwendung, gefolgt von der Inkubation mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper.

3.2.4 Analyse der OCT4 Expression

Die Analysen zur Expression von OCT4 in MSC erfolgten wie dargestellt (Mueller, 2009). Für die Western Blot-Analyse und Immunzytochemie wurden verschiedene kommerziell erworbene, polyklonale oder monoklonale primäre Antikörper (polyklonal: goat N-19, monoklonal: mouse C-10) eingesetzt.

Für die RT-PCR-Analyse wurden folgende Primerpaare (Annealing-Temperatur jeweils 62°C) verwendet: β -Aktin (378 bp), OCT4-I (Exon 1 bis 3; 247 bp), OCT4-II (Exon 3 bis 5; 218 bp), OCT4-full length (gesamte OCT4-cDNA; 1133 bp).

3.2.5 Analysen zur epigenetischen Regulation

Diese Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der AG Prof. Dr. R. Dammann (Institut für Humangenetik, MLU; *aktuelle Adresse*: Institut für Genetik, Justus-Liebig Universität Gießen) wie dargestellt (Dansranjavin, 2009) unter Nutzung kommerziell erworbener MSC. Es erfolgte die Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregionen ausgewählter Gene mittels Bisulfit-Assay und nested PCR (COBRA-Assay) in undifferenzierten MSC, in osteogen und adipogen differenzierten MSC sowie in humanen Fibroblasten.

3.2.6 Induktion einer osteogenen und adipogenen Differenzierung und deren Nachweis

Die Induktion einer osteogenen und adipogenen Differenzierung und deren Nachweis erfolgte wie dargestellt (Mueller, 2006). Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Für die Analyse klonaler Zellpopulationen wurden Einzelzellkulturen durch limitierte Verdünnung in 96-Loch-Platten generiert, hinsichtlich ihrer Abstammung aus singulären Zellen

mikroskopisch beurteilt und ausgewählt sowie nachfolgend expandiert. Anschließend wurden die Kulturen mit osteogenem bzw. adipogenem Differenzierungsmedium über einen Zeitraum von 10 bis 14 Tagen inkubiert. Die Differenzierungsmedien basierten dabei auf DMEM mit Zusatz von 10 % FKS und Dexamethason. Bei adipogenem Differenzierungsmedium wurden zusätzlich Insulin, Indomethazin, 3-Isobutyl-1-methylxanthin und Rosiglitazon zugegeben; bei osteogenem Differenzierungsmedium wurden Ascorbinsäure-2-phosphat und Glycerol-3-phosphat zugesetzt. Parallel wurden Kontrollzellen in Wachstumsmedium inkubiert.

Bei sichtbaren morphologischen Zeichen der Differenzierung - Kalziumablagerungen bzw. Fetteinlagerungen - erfolgte die Analyse der differenzierten Zellen und der Kontrollen mittels zytochemischer Färbung sowie mittels RT-PCR wie dargestellt (Mueller, 2006). Der Nachweis von Kalziumhydroxylapatit-Ablagerungen bei osteogener Differenzierung erfolgte mittels Alizarin S, die Färbung von Fettvakuolen bei adipogener Differenzierung mittels Öl Rot. Für den Differenzierungsnachweis mittels RT-PCR wurde die Gesamt-RNA isoliert, einer DNase Behandlung unterzogen und nach optischer Bestimmung der Konzentration in der RT-PCR wie beschrieben (s. 3.1.4) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte über 35 Zyklen; die Primersequenzen mit den entsprechenden Annealingtemperaturen wurden wie dargestellt verwendet (Mueller, 2006).

3.2.7 Induktion einer chondrogenen Differenzierung und deren Nachweis

Die Arbeiten zur chondrogenen Differenzierung wurden bislang nicht veröffentlicht. Hierfür wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ MSC durch Zentrifugation (150 g, 10 min) pelletiert und bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte mit Mediumwechsel alle 2 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Dieses setzte sich wie folgt zusammen: DMEM (high-Glucose, PAA, Pasching, Österreich), 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 nM Dexamethason, 10 ng/ml TGFβ₃, 0,5 mg/ml BSA, 10 µg/ml Insulin, 5,5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Selen, 4,7 µg/ml Linolsäure (alle Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland). Nach 21 Tagen wurde die gesamte DNA mittels peqGOLD Total RNA Kit (Pepqlab, Erlangen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen und wie dargestellt einer DNase-Behandlung (Mueller, 2006) unterzogen. Anschließend erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (GeneAmp RNA PCR Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß den Angaben des Herstellers die RT-PCR wie dargestellt (Mueller, 2006) mit einer Amplifikation über 35 Zyklen. Dabei kamen neben den beschriebenen β-Aktin-Primern (Mueller, 2006) u. a. folgende Primerpaare mit ihren entsprechenden Annealing-Temperaturen zum Einsatz: Kollagen IX (5'-GTGTTGCTGGTAAAAGGGT / 5'-GGGATCCCCTGGTCCTAAT; 159 bp, 55°C), SOX9 (5'-GCTCAGCAAGACGCTGGGCA / CCGGAGGAGGAGTGTGGCGA; 249 bp, 66°C). Als Positivkontrolle diente aus humanem, hyalinen Knorpel isolierte RNA (überlassen von Dr. I. Schön, Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohren-Erkrankungen, MLU).

3.2.8 Induktion einer hepatogenen Differenzierung und deren Nachweis

In einem Kooperationsprojekt mit der AG von Prof. Dr. B. Christ (Universitätsklinik für Innere Medizin I, MLU) erfolgte die Analyse der hepatogenen Differenzierung von MSC. Die Induktion der Differenzierung und deren Nachweis erfolgte wie dargestellt (Aurich, 2007). Nach einer Behandlung mit 5-Azacytidin über 24 h wurden die konfluenten Zellen mit einem auf DMEM-basierenden, hepatogenen Differenzierungsmedium unter Zusatz von FKS, EGF und hepatocyte growth factor bis zu 21 Tage inkubiert. Die Analyse der Differenzierung dieser hepatogen differenzierten MSC (heMSC) erfolgte mittels RT-PCR, Western Blot und Immunzytochemie wie dargestellt (Aurich, 2007). Für den Nachweis der Funktionalität der Differenzierung *in vitro* wurden Glykogen-Ablagerungen in fixierten heMSC mittels PAS-Färbung nachgewiesen sowie die Harnstoff-Konzentration im Medium von heMSC mittels kolorimetrischer Diacetylmonoxim-Methode bestimmt. Der Nachweis einer Hepatozyten-spezifischen Genaktivierung erfolgte mittels transienter Transfektion von MSC und heMSC mit einem Reporter-Konstrukt von Red Fluorescent Protein (RFP) unter der Kontrolle des humanen Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1 (PCK1)-Promotors (Aurich, 2007). Primäre humane Hepatozyten dienten jeweils als Kontrollen.

Der Nachweis der Funktionalität der Differenzierung *in vivo* erfolgte in Pfp/Rag2-Mäusen, die sich durch eine Immunsuppression mit dysfunktionalen NK-Zellen und fehlender Ausreifung von T- und B-Lymphozyten auszeichnen. Vor Transplantation wurde den Tieren Propranolol für 48 h verfüttert, um das Wachstumspotential endogener Hepatozyten zu supprimieren. Anschließend wurde eine partielle Hepatektomie zur Generierung eines Verletzungsmodells durchgeführt. Zeitgleich wurden über 14 Tage *in vitro* vordifferenzierte heMSC via intrasplenische Injektion transplantiert. Nach 7 oder 12 Wochen wurden die Tiere getötet und das eingebettete Lebergewebe immunhistochemisch analysiert. Hierfür wurden serielle Paraffinschnitte nach Peroxidase-Inaktivierung mit den angegebenen primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Färbung humanen Albumins mittels kommerziell erhältlicher Kits.

Zum Ausschluss einer Zellfusion erfolgte nach Deparaffinierung und Vorbehandlung die parallele Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für humane Alu-Sequenzen und murine Satelliten-DNA mittels Fluorescein- bzw. Digoxigenin-markierten Sonden. Nach Denaturierung, Waschen und Blockierung wurde die humane Probe mittels biotinyliertem Anti-Fluorescein Antikörper und Streptavidin-Färbung visualisiert, während die Maus-spezifische Probe mittels Cy3-konjugiertem sekundären Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert wurde. Eine Färbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI.

3.2.9 Gemischte MSC-Leukozyten Kultur

Die Analysen mittels MSC-Lymphozyten-Kultur wurden bislang nicht veröffentlicht. Es wurden 8×10^3 MSC von Spendern mit vorliegendem Ergebnis einer HLA-Testung in 100 μ l pro Loch

einer 96-Loch-Mikrotiterplatte plattiert. Nach 24 h erfolgte bei einem Teil der Proben die Behandlung mit 25 µg/ml Mitomycin C (Sigma-Aldrich) für 1 h. Anschließend wurden humane Leukozyten mit 8×10^4 Zellen pro Loch zugegeben - entweder in noch unbesetzte Löcher oder in Löcher, in denen bereits Mitomycin-C-behandelte oder unbehandelte MSC plattiert waren. Zusätzlich erfolgte in den entsprechenden Ansätzen die Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA) in der Endkonzentration von 2,5 µg/ml (Sigma-Aldrich). Jeder Ansatz wurde im Triplikat ausgeführt und hatte ein Endvolumen von 150 µl.

Die Gewinnung der zu den verwendeten MSC HLA-inkompatiblen humanen Leukozyten erfolgte zuvor durch Dichtegradientenzentrifugation aus bei der Gewinnung von Vollblutkonserven verbliebenen Buffy-Coat-Schichten (Einrichtung für Transfusionsmedizin, UKH). Die entsprechende Einwilligung der Spender lag im Rahmen eines seitens der Ethikkommission genehmigten Projektes vor. In Abhängigkeit der Präparationsqualität erfolgte die Lyse der Erythrozyten.

Die Dauer der Kokultivierung betrug insgesamt 4 Tage. Anschließend wurde die zelluläre Proliferation anhand der BrdU-Inkorporation mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierfür erfolgte die Inkubation mit BrdU über 8 h, die anschließende Zugabe von Peroxidase-markiertem Anti-BrdU-Antikörper und der Zusatz der Farblösung. Die Bestimmung des BrdU-Einbaus erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 450 nm (Mikrotiterplatten-Reader „Spectra-Rainbow“, Tecan, Männedorf, Schweiz). Als Kontrollen fungierten Löcher ohne Zellen (Leerwert) bzw. Löcher mit Zellen aber ohne erfolgte BrdU-Zugabe (Hintergrund). Die Auswertung erfolgte, sofern Leerwert und Hintergrund eine Absorption von 0,1 nicht überschritten. Aus den Messwerten der Absorption der jeweils 3 gleichbehandelten Proben wurden die Mittelwerte berechnet und mit dem Mittelwert des Leerwertes korrigiert. Teilweise erfolgte die Auswertung in Bezug auf die Positivkontrolle – mit PHA stimulierte Leukozyten - zur Bestimmung des relativen mitogenen Potentials bzw. der relativen immunsuppressiven Kapazität von MSC.

3.2.10 Analyse der malignen Transformation von MSC *in vitro* und *in vivo*

Der Ausschluss der malignen Transformation von MSC erfolgte mittels Wachstumskinetik, Soft-Agar-Analyse und im Nacktmausmodell. Die Wachstumskinetik und der Soft-Agar-Assay erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006) bzw. unter 3.2.2 beschrieben.

Mittels Soft-Agar-Assay wurde das Kontakt-unabhängige Wachstum von MSC als eine wesentliche Eigenschaft maligner Zellen untersucht. Die CRC-Zelllinie DLD1 diente als Positivkontrolle. Es erfolgte die Zugabe von in Medium-Agar-Lösung suspendierten MSC bzw. DLD1 Zellen als Top-Agar in mit Basis-Agar beschichtete Kulturgefäße und die anschließende Kultivierung dieser Kulturen über mindestens 8 Tage. Die Beurteilung des Koloniewachstums

erfolgte mikroskopisch; für die abschließende Auswertung erfolgte die Färbung mit 0,005 %-igem Kristallviolett.

Für die Analyse der malignen Transformation *in vivo* erfolgte die Transplantation von $0,5 \times 10^6$ MSC s. c. in die Flanke bzw. i. v. in die Schwanzvenen von drei Nacktmäusen. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere und die makroskopische Beurteilung der eröffneten Bauchhöhle hinsichtlich eines Tumorwachstums.

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR SENSITIVITÄT GEGENÜBER CHEMOTHERAPEUTIKA UND VON RESISTENZMECHANISMEN IN MSC

3.3.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen in MSC mittels Sulforhodamin-B-Assay

Die Untersuchungen wurden wie dargestellt (Mueller, 2006) und unter 3.1.6 beschrieben, durchgeführt. Das Setzen der Zellen in eine 96-Loch-Kulturplatte erfolgte an Tag 1, dabei wurden pro Platte MSC einer Präparation bzw. eine Zelllinie gesetzt. Der Beginn der Behandlung mit Cisplatin, Etoposid und Vincristin in den angegebenen Konzentrationen erfolgte nach 24 h an Tag 2, wobei pro Konzentrationsstufe eine Spalte (8 Löcher) behandelt wurde. Nach weiteren 24 h oder 96 h wurde das Zytostatikum-enthaltende Medium entfernt und die Zellen im Falle der 24 h-Behandlung in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium weitere 72 h kultiviert. An Tag 5, d. h. 120 h nach initialem Setzen der Zellen, erfolgte die SRB-Färbung und Analyse mit Bestimmung der IC₅₀ und IC₉₀.

3.3.2 *In-vitro*-Modell der Resistenz von MSC

Für dieses Modell wurden MSC gesunder Spender wie dargestellt (Mueller, 2006) für 2 h mit Cisplatin bzw. Etoposid behandelt, anschließend gespült und weitere 22 h in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium kultiviert. Diese Behandlung wurde insgesamt 4-mal durchgeführt. Alle weiteren Analysen erfolgten 72 h nach Ende der letzten Behandlung. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Aliquot der gleichen MSC-Präparation.

3.3.3 Analyse und Quantifizierung der Schädigung und Apoptoseinduktion

Zunächst wurde wie dargestellt (Mueller, 2006) der intrazelluläre Platingehalt nach Cisplatin-Exposition analysiert. Hierfür wurden MSC und TGCT-Zellen mit gleichen Konzentrationen Cisplatin behandelt. Nach Zentrifugation und Vorbehandlung erfolgte dann die Analyse mittels Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie durch die Mitarbeiter der AG PD Dr. Paschke (Abteilung Medizinisch-Pharmazeutische Chemie, Biozentrum, MLU).

Der Nachweis der Apoptose erfolgte mittels Trypan-Blau-Ausschluss-Test, durchflusszytometrischer Analyse für Annexin V und mittels Western Blot. Für die Trypan-Blau-Färbung wurden wie dargestellt (Mueller, 2006) MSC und TGCT-Zellen mit Cisplatin oder Etoposid in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Entstehende flotierende Zellen wurden am Ende der Behandlung gewonnen, nach Waschschriffen in Trypan-Blau-Färbelösung resuspendiert und lichtmikroskopisch hinsichtlich des Farbstoffausschlusses beurteilt.

Die Analyse der apoptosetypischen Präsenz von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche mittels Annexin V wurde wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006) durchgeführt. Nach Behandlung von MSC mit Cisplatin oder Etoposid wurden von den behandelten Zellen sowie von den jeweiligen Kontrollen die adhärenfen Zellen gewonnen. Diese wurden mittels eines kommerziellen Kits mit FITC-markiertem Annexin V gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch wie unter 3.1.5 beschrieben analysiert.

Der Apoptosenachweis mittels Western Blot-Analyse erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006) und unter 3.1.3 beschrieben. Dabei wurden nach Behandlung von MSC oder TGCT-Zellen mit Cisplatin oder Etoposid sowohl die adhärenfen als auch die flotierenden Zellen getrennt gewonnen. Nach Gewinnung der Proteinlysate, SDS-PAGE und Membran-Transfer erfolgte die Antikörper-Inkubation und Visualisierung der Immunkomplexe mittels Chemilumineszenz.

3.3.4 Bestimmung der Caspase-Aktivität

Die relative Caspaseaktivität wurde wie dargestellt (Mueller, 2006; Mueller, 2003) in einem kolorimetrischen Substratspaltungsassay bestimmt. Es erfolgte die Behandlung von MSC und TGCT-Zellen mit Cisplatin für 24 h in der jeweils Apoptose-induzierenden Konzentration, d. h. der IC₉₀ (3 µM für TGCT-Zellen, 20 µM für MSC). Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die flotierenden Zellen verworfen, die adhärenfen Zellen lysiert und nach kolorimetrischer Bestimmung der Proteinkonzentration eine definierte Menge des Extraktes für die Substratreaktion eingesetzt. In der Reaktion wurden folgende Substrate verwendet: Ac-VDVAD-pNA (Caspase-2), Ac-DEVD-pNA (Caspase-3), Ac-IETD-pNA (Caspase-8) und Ac-LEHD-pNA (Caspase-9). Nach Inkubation wurde die OD bei 405 nm gemessen und die relativen Caspaseaktivitäten der behandelten Probe gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet.

3.3.5 Untersuchung der Zellzyklusregulation

Die Untersuchungen zur Zellzyklusregulation wurden bislang noch nicht veröffentlicht. MSC wurden für 24 h mit 2 µM, 3 µM bzw. 20 µM Cisplatin, 0,4 µM, 0,75 µM bzw. 80 µM Etoposid oder 0,001 µM bzw. 3 µM Vincristin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der Behandlung wurden die flotierenden Zellen verworfen, die adhärenfen Zellen gewaschen

und wie nachfolgend beschrieben analysiert, oder aber es erfolgte die weitere Kultivierung in Zytostatika-freiem Wachstumsmedium mit einer Analyse zu einem späteren Zeitpunkt.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA) abgelöst und mit PBS (PAA) gespült. Anschließend erfolgte die Färbung der zellulären DNA mit Propidium-Jodid (PI) mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (BD CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit; BD Biosciences, San Jose, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden anschließend am Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) mit entsprechender Software (CellQuest, BD Biosciences) analysiert.

Für Western Blot-Analysen Zellzyklus-relevanter Proteine wurden die Zellen wie beschrieben behandelt, zu den genannten Zeitpunkten mit Trypsin-EDTA abgelöst und lysiert. Anschließend erfolgte die Probenaufbereitung, SDS-PAGE, Membran-Transfer, die Antikörper-Inkubation und Visualisierung wie dargestellt (Mueller, 2006) und unter 3.1.3 beschrieben.

3.4 ANALYSE DES EINFLUSSES TUMORINTEGRIERTER MSC AUF DAS WACHSTUM MALIGNER TUMOREN

3.4.1 Integration von MSC in subkutane CRC-Xenografte

Die Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010) im Nacktmausmodell. Adhärenente MSC wurden mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff Dil unmittelbar vor Verwendung der Zellen gefärbt. Anschließend wurden bei Tieren mit zuvor generierten subkutanen CRC-Xenograften $2,5 \times 10^5$ Dil-MSK im Abstand von jeweils 2 Tagen insgesamt 5-mal systemisch, wie unter 3.1.8 beschrieben, injiziert. Als Kontrolle dienten Tiere ohne i. v. Injektion von MSC. Am Versuchsende wurden die Tumoren in Gefrierschnitttechnik präpariert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

3.4.2 Einfluss von MSC auf das Wachstum subkutaner CRC-Mischxenografte

Die Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010). Es wurden subkutane Mischxenografte von 3×10^6 *DsRed*-CRC-Zellen gemischt mit $7,5 \times 10^5$ nativen MSC - entsprechend einem MSC-Anteil von 20 % an der injizierten Gesamtzellpopulation - generiert. Als Kontrollen dienten reine *DsRed*-CRC-Xenografte in der kontralateralen Flanke des gleichen Tieres. Die *DsRed*-Fluoreszenzintensität wurde als Korrelat für die Tumorgröße mittels *In-vivo*-Imaging, wie unter 3.1.8 beschrieben, quantifiziert. Zusätzlich erfolgte die Quantifizierung der Tumorgröße wie dargestellt (Mueller, 2011) anhand des Graustufenbildes durch Vermessen der orthogonalen Durchmesser und Volumenberechnung mittels Ellipsenformel. Am Versuchsende wurden die exzidierten Tumoren gewogen.

3.4.3 Untersuchung der Interaktion von MSC und CRC *in vitro*

Die Untersuchungen zur Interaktion von MSC und CRC *in vitro* wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Für die Kokultur unter 2D-Bedingungen wurden MSC und *DsRed*-DLD1- oder *DsRed*-HCT8-Zellen im Verhältnis von 1 : 4 gemischt und plattiert. Nach 3 Tagen wurde die absolute Zellzahl durch Zellzählung sowie der Anteil der *DsRed*-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Untersuchungen zur Ausbildung von Sphäroiden der CRC-Zelllinien DLD1 und HCT8 erfolgte durch Kultivierung der Zellen unter 3D-Bedingungen auf 1 % Agarose wie dargestellt unter Verwendung des Kultivierungsmediums der CRC-Zellen (Dittmer, 2009). Gemäß der Ergebnisse von Vorversuchen wurden hierfür 3×10^3 Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte plattiert, um durch diese kleine Fläche die Ausbildung eines einzelnen Sphäroides zu begünstigen. Für die Untersuchung des Einflusses von MSC auf die Sphäroidbildung wurden MSC in einem Anteil von 20 % an der Gesamtzellzahl den CRC-Zellen zugesetzt. Der Einfluss spezifischer Extrazellulärmatrix auf die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen wurde untersucht, indem die CRC-Zellen in Kultivierungsmedium mit Zusatz von 1,67 % Matrigel (BD Bioscience) plattiert wurden. Nach 2 Tagen wurde die Sphäroidbildung mikroskopisch beurteilt.

3.4.4 Interaktionen von MSC und Mammakarzinomzellen

Diese Arbeiten erfolgten in einem Kooperationsprojekt mit der AG Prof. Dr. J. Dittmer (Universitätsklinik für Gynäkologie, MLU) so wie dargestellt (Dittmer, 2009). Zur Anwendung kamen die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 and MCF-7. Die Generierung von Sphäroiden erfolgte in 3D-Kulturen wie dargestellt (Dittmer, 2008) durch Kultivierung der Zellen auf 2 % Agarose. Bei einigen Kulturen erfolgte die Zugabe des ADAM10-Inhibitors GI254023X. Nach vollzogener Sphäroidbildung erfolgte der Zusatz von *GFP*-MSC und die mikroskopische Dokumentation. Die Generierung von *GFP*-MSC erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010) und unter 3.1.9 beschrieben.

Für knock-down Experimente erfolgte die Transfektion von MCF-7 Zellen mit ADAM10- oder ADAM15-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA mit den beschriebenen Sequenzen (Dittmer, 2009). Die Western Blot-Analyse erfolgte in Abweichung zu der unter 3.1.3 beschriebenen Methode nach spezifischer Lyse und fraktionierter Zentrifugation zur Gewinnung von Zellmembranproteinen wie dargestellt (Dittmer, 2009). Für die immunzytochemische Untersuchung wurden die Sphäroide in Paraffin eingebettet und anschließend, wie unter 3.1.7 beschrieben, analysiert.

Für den Migrationsassay mittels Boyden-Kammer wurde im unteren Kompartiment zellfreies, MSC-konditioniertes Medium sowie im oberen Kompartiment Mammakarzinomzellen eingebracht und beide Kammern durch einen Filter mit 8- μ m Porengröße getrennt. Nach 24 h

Kokultur erfolgte die Fixierung der Zellen und die mikroskopische Beurteilung der Migration der Mammakarzinomzellen.

Für den Wundheilungs-Assay wurde mechanisch eine Lücke in den Monolayer von Mammakarzinomzellen bzw. von kokultivierten MSC und Mammakarzinomzellen eingebracht und der Verschluss dieser Lücke innerhalb von 2 Tagen mikroskopisch beurteilt.

3.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR NUTZUNG VON MSC FÜR DIE TUMORTHERAPIE

3.5.1 Zytotoxizitätsanalyse für sTRAIL in MSC und CRC-Zellen

Diese Untersuchung erfolgte wie dargestellt (Mueller, 2011) mittels SRB-Assay. Es wurden 3 96-Loch Platten mit den verschiedenen Zelllinien angesetzt, wobei pro Zelllinie eine Spalte (8 Löcher) plattiert wurden. Die erste Platte wurde nach 24 h fixiert (Kontrolle 0 h), die zweite Platte über weitere 24 h mit Wachstumsmedium ohne sTRAIL (Kontrolle 24 h) behandelt und die dritte Platte mit 100 ng/ml sTRAIL (sTRAIL 24 h) inkubiert. Alle Platten wurden zum gleichen Zeitpunkt der SRB-Färbung unterzogen und ausgewertet. Die OD-Mittelwerte der 8 Proben jeder Zelllinie für jede Bedingung wurden ermittelt und in Relation zum Mittelwert der jeweiligen Kontrolle-0 h gesetzt.

3.5.2 Expression von DR in CRC-Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse der Expression von TRAIL-Rezeptoren in CRC-Zelllinien erfolgte wie dargestellt (Mueller, 2011) und unter 3.1.5 beschrieben.

3.5.3 Generierung lentiviral *TRAIL*-transduzierter MSC

Die Generierung von *TRAIL*-MSC erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010). *TRAIL*-cDNA wurde unter Verwendung von aus Jurkat-Zellen gewonnener RNA mittels RT-PCR generiert, kloniert und nach Restriktion sowie jeweiliger Klenow-Extension in das lentivirale Expressionsplasmid pFUGW ligiert, aus dem zuvor die *GFP*-cDNA herausgeschnitten wurde. Es erfolgte die Sequenzierung des generierten FUTW-Plasmides zur Kontrolle der Insertionsrichtung und zum Ausschluss von Mutationen wie unter 3.1.9 beschrieben.

Die Gewinnung infektiöser lentiviraler Partikel erfolgte wie unter 3.1.9 beschrieben. Für FUTW wurde keine Titerbestimmung durchgeführt. Stattdessen erfolgte die Transduktion mit FUTW mit dem Titer einer parallel präparierten FUGW-Stammlösung unter der Annahme, dass beide Virusstammlösungen einen ähnlichen Titer aufwiesen.

Als Kontrollen dienten in den jeweiligen Versuchen native MSC (WT-*MSC*) oder aber mit Kontrollvektor *GFP*-transduzierte MSC (*GFP-*MSC**).

3.5.4 Analyse der TRAIL-Expression in *TRAIL*-MSC

Der Nachweis der Expression von TRAIL erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010) mittels Immunzytochemie und Western Blot. Die Immunzytochemie wurde wie unter 3.1.7 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, mit 2 % Formalin fixiert und anschließend mit Triton X-100 permeabilisiert oder in Methanol / Aceton ohne zusätzliche Permeabilisierung fixiert. Es folgte die Inkubation mit verschiedenen primären Antikörpern und anschließend mit Fluoreszenz-markiertem sekundärem Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, die Objektträger in Fluoreszenzeindeckmedium abgedeckt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für die photographische Dokumentation wurde für WT-MSC und *TRAIL*-MSC jeweils die gleiche Belichtungszeit gewählt. Die Western Blot-Analyse von *TRAIL*-MSC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion erfolgte wie unter 3.1.3 beschrieben.

3.5.5 Ausschluss der malignen Transformation von *TRAIL*-MSC

Die Untersuchungen erfolgten mittels Soft-Agar-Assay wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010) und unter 3.2.10 beschrieben. Als Positivkontrolle dienen DLD1-Zellen; für jeden Ansatz erfolgten die Untersuchungen im Triplikat. Zum Zeitpunkt eines bei der Positivkontrolle makroskopisch sichtbaren Koloniewachstums erfolgten die Färbung mit Kristallviolett und die Fotodokumentation.

3.5.6 Analyse des Einflusses von *TRAIL*-MSC auf das Wachstum von CRC-Zellen *in vitro*

Die Analyse der Kokultur von *TRAIL*-MSC und *DsRed*-CRC-Zellen erfolgte wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011). Eine Mischsuspension von *TRAIL*-MSC und *DsRed*-CRC-Zellen im Verhältnis von 1 : 5 bzw. 1 : 6 wurde ausplattiert, als Kontrollen dienten Kokulturen von WT-MSC und *DsRed*-CRC-Zellen in gleichen Verhältnissen. Bei einigen Kokulturen wurde ein TRAIL-neutralisierender Antikörper zugesetzt. Für die Untersuchung des Effektes einer parallelen subapoptotischen Schädigung wurde Kokulturen von *TRAIL*-MSC oder WT-MSC mit *DsRed*-HT29-Zellen Oxaliplatin oder 5-FU über die gesamte Dauer der Kokultur in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Für die Analyse der Proliferation von *DsRed*-CRC-Zellen in Kokultur mit *TRAIL*-MSC wurden Kinetiken erstellt. Hierfür wurden *TRAIL*-MSC und *DsRed*-CRC-Zellen in je 3 identischen Ansätzen kokultiviert. Als Kontrollen dienten Kokulturen von WT-MSC und *DsRed*-CRC-Zellen. Nach 24 h wurden die flotierenden Zellen der Kokulturen gewonnen und gezählt. Die adhärennten Zellen je eines Ansatzes der Kokultur WT-MSC / *DsRed*-CRC-Zellen und der Kokultur *TRAIL*-MSC / *DsRed*-CRC-Zellen wurden gewonnen und gezählt. Die verbliebenen zwei Ansätze wurden weiter kultiviert und in gleicher Weise 48 h bzw. 72 h nach Beginn der

Kokultur verarbeitet. Die ermittelten Zellzahlen wurden in Relation zur initial gesetzten Zellzahl dargestellt. Die Suspension der adhärenen Zellen wurde mit anti-CD105-FITC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie wie unter 3.1.5 beschrieben hinsichtlich der Expression von DsRed und CD105 analysiert. Als Kontrolle für die Färbung mit anti-CD105-FITC dienten separat kultivierte MSC.

Um einen proapoptotischen Effekt von *TRAIL*-MSC auf kokultivierte CRC-Zellen zu untersuchen, erfolgte nach 24 h Kokultur die Gewinnung von Proteinlysaten der Gesamtkokultur von *TRAIL*-MSC / *DsRed*-CRC-Zellen bzw. WT-MSC / *DsRed*-CRC-Zellen sowie der flotierenden Zellen von separaten Kokulturen von *TRAIL*-MSC / *DsRed*-CRC-Zellen. Für die Gewinnung der Gesamtkokultur wurden flotierende und adhärenente Zellen gewonnen und vereinigt. Wie unter 3.1.3 beschrieben, erfolgte dann mittels Western Blot die Analyse von Apoptosemarkern.

Zusätzlich wurden die gewonnenen flotierenden Zellen der Kokulturen hinsichtlich der Färbung mit Annexin V analysiert. Hierfür erfolgte die Färbung mittels eines kommerziell erworbenen Kits mit Annexin V-FITC und die durchflusszytometrische Analyse wie unter 3.3.3 und unter 3.1.5 beschrieben. Als Kontrolle dienten separat kultivierte *DsRed*-CRC-Zellen.

3.5.7 Analyse des Einflusses von *TRAIL*-MSC auf das Wachstum von CRC-Zellen *in vivo*

Die Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011) im subkutanen CRC-Xenograftmodell in der Nacktmaus mit Applikation von MSC als Mischxenograft oder nachträglicher systemischer Injektion von MSC.

Für Analysen im Mischxenograft wurden 3×10^6 *DsRed*-CRC-Zellen mit einem Anteil von 20 %, 10 %, 3 % oder 1 % *TRAIL*-MSC gemischt und an Tag 0 s. c. in die Flanke einer Nacktmaus injiziert. Als Kontrollen dienten Mischxenografte mit dem jeweils gleichen Anteil WT-MSC bzw. nicht-gemischte Xenografte der entsprechenden Zelllinie in der kontralateralen Flanke des gleichen Tieres. In einigen Versuchen erfolgte die i. p. Applikation von 5-FU an den Tagen 0 bis 4 bzw. an den Tagen 7 bis 9 und 14 bis 16 nach Generierung des Xenograftes. Die DsRed-Fluoreszenzintensität wurde als Korrelat für die Tumorgroße mittels *In-vivo*-Imaging, wie unter 3.1.8 beschrieben, quantifiziert. Bei Versuchsende wurden die Tumoren exzidiert, gewogen und teilweise histologisch, wie unter 3.1.7 beschrieben, untersucht.

Für die Analyse der Effektivität systemisch transplantierte *TRAIL*-MSC wurden subkutane GFP-DLD1-Xenografte generiert. Nach 2, 4, 7, 10 und 15 Tagen erfolgte die i. v. Injektion von jeweils $2,25 \times 10^5$ - wie unter 3.4.1 beschrieben mit Dil gefärbten - *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC. Als Negativkontrollen dienten xenografttragende Tiere mit i. v. Applikation von PBS. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde als Korrelat für die Tumorgroße wie unter 3.1.8 beschrieben mittels

In-vivo-Imaging quantifiziert. Nach Tötung der Tiere bei Versuchsende wurden die Lungen und Tumoren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 20 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

3.5.8 Pulmonaler Tropismus von MSC

Die Arbeiten erfolgten wie dargestellt (Luetzkendorf, 2010) im Nacktmausmodell. Adhärenente *TRAIL*-MSC wurden, wie unter 3.4.1 beschrieben, mit Dil unmittelbar vor Verwendung der Zellen gefärbt und anschließend bei Tieren mit präformierten subkutanen Xenograften i. v., wie unter 3.1.8 beschrieben, mit einer Menge von 5×10^5 Dil-MSC an Tag 2, 4, 9 und 11 injiziert. Als Kontrolle dienten Tiere ohne i. v. Injektion von MSC. An Tag 14 wurden die Tiere getötet, die Lungen und Tumoren präpariert und mittels Fluoreszenzimaging analysiert sowie anschließend in Gefrierschnitttechnik präpariert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

4 ERGEBNISSE

4.1 PRÄSENZ UND WESENTLICHE CHARAKTERISTIKA VON MSC BEI PATIENTEN NACH CHEMOTHERAPIE

4.1.1 Präsenz von CFU-F

Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Fragestellung, inwiefern sich aus dem Knochenmark von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung MSC isolieren lassen. Ein Maß für die Präsenz von MSC in einer gewonnenen Zellsuspension ist das Wachstum plastikadhärenter CFU-F.

In den kultivierten MNZ aller Spender mit chemotherapeutischer Vorbehandlung ($n = 17$) mit Ausnahme eines Patienten und in den kultivierten MNZ aller nicht-vorbehandelten, gesunden Spender ($n = 16$) war das Wachstum von CFU-F 3 bis 7 Tage nach Kultivierungsbeginn zu beobachten. Die Zeitdauer bis zur Konfluenz der CFU-F unterschied sich zwischen Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung ($12,0 \pm 2,3$ Tage) und gesunden Spendern ($11,3 \pm 2,2$ Tage) nicht ($p = 0,4$). Hinsichtlich der Zahl von CFU-F pro 10^6 MNZ war zwischen Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung ($7,0 \pm 5,7$) und gesunden Spendern ($13,3 \pm 12,0$) ein, allerdings nicht signifikanter ($p = 0,073$) Unterschied zu beobachten (Mueller, 2006).

Die Subgruppenanalysen für die Zahl CFU-F / 10^6 MNZ bei Spendern unterschiedlichen Geschlechts und Alters war aufgrund der geringen Gruppengröße von eingeschränkter Aussagekraft. In den Gruppen der Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung und der gesunden Spender fanden sich jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede sowohl zwischen männlichen und weiblichen Spendern, als auch zwischen Spendern jünger und älter als 40 Jahre. Ebenfalls fanden sich in der Gruppe der Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung keine Unterschiede zwischen Spendern mit Erhalt der letzten Chemotherapie vor weniger und vor mehr als 3 Monaten (Mueller, 2006).

Diese Daten belegten, dass sich auch nach Chemotherapie CFU-F aus dem Knochenmark isolieren lassen. Daraus leitete sich die Vermutung ab, dass es sich bei diesen isolierten Zellen um MSC handelt, und dass diese MSC sich in ihren Charakteristika nicht von MSC gesunder, unbehandelter Spender unterscheiden.

4.1.2 Phänotyp, mesodermales Differenzierungspotential und Wachstumsverhalten

Um diese Annahme zu belegen, sollte im nächsten Schritt der MSC-Charakter der isolierten CFU-F-Zellen nachgewiesen werden. Gemäß Konsensus sind neben dem Wachstum als CFU-F, der Phänotyp und das multipotente Differenzierungspotential für MSC charakteristisch.

Die durchflusszytometrische Analyse demonstrierte für die von Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung gewonnenen CFU-F-Zellen einen für MSC typischen Phänotyp CD14⁻, CD34⁻, HLA-DR⁻, CD11c⁻, CD45⁻, Glycophorin-A⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD166⁺ (Mueller, 2006). Diese Arbeiten waren noch vor Veröffentlichung der Konsensuskriterien (Dominici, 2006) erfolgt. In späteren Arbeiten erfolgte die Analyse in Anlehnung an diese Kriterien und belegten für die CFU-F-Zellen sowohl von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung als auch von gesunden Spendern einen identischen Phänotyp CD14⁻, CD19⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ (Abbildung 4-1 A). Es waren für alle diese Marker keine Unterschiede zwischen CFU-F-Zellen von Spendern unterschiedlichen Geschlechts, Alters oder mit unterschiedlicher Dauer seit Chemotherapie-Vorbehandlung zu beobachten (Mueller, 2006).

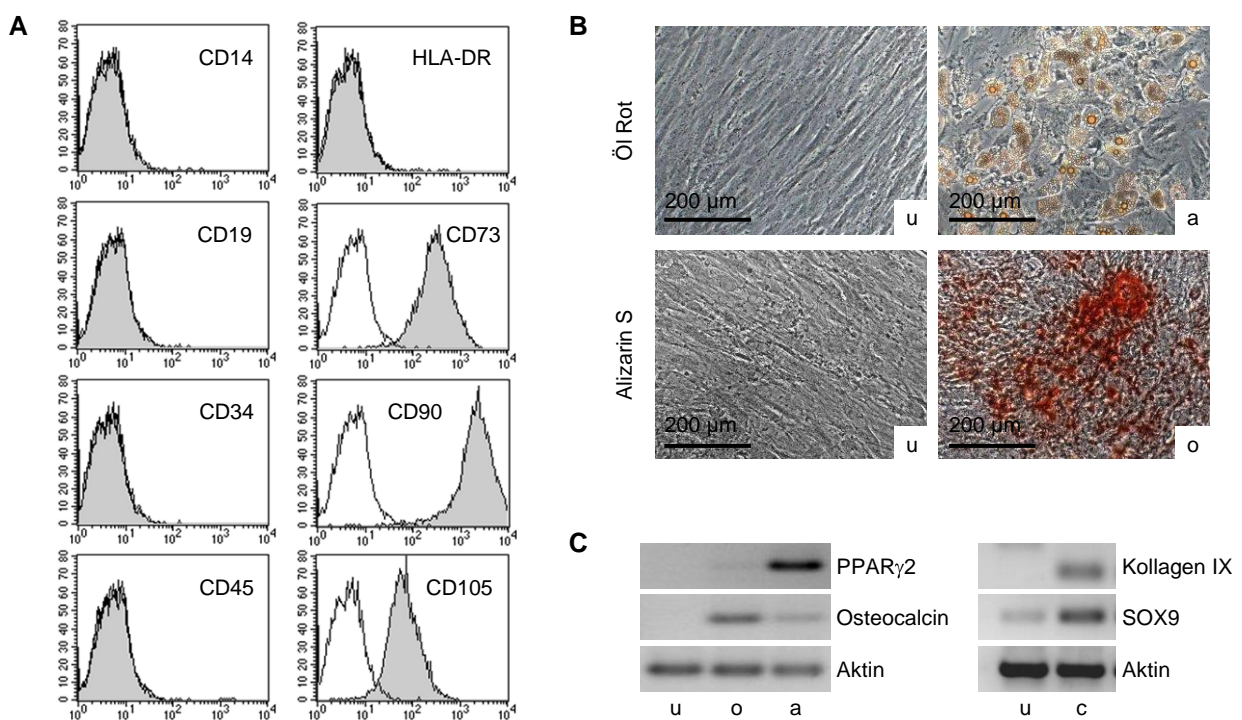


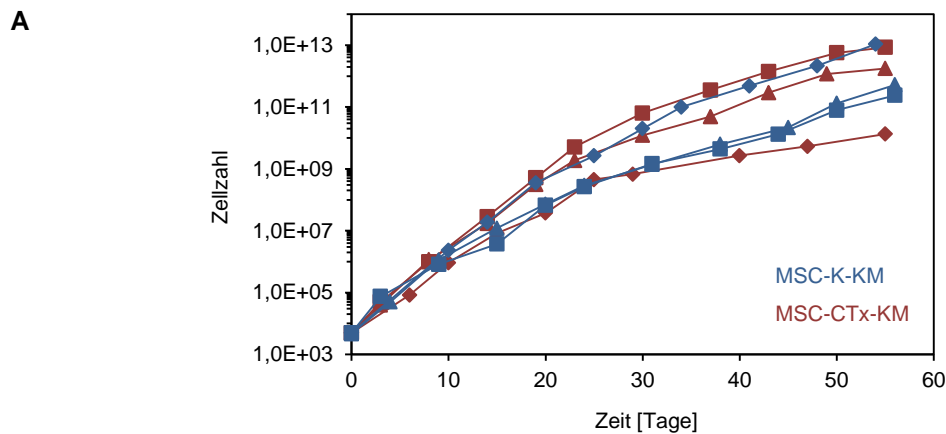
Abbildung 4-1: Die von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung isolierten CFU-F-Zellen erfüllen die Konsensuskriterien für MSC. Dargestellt sind beispielhaft ausgewählte Analysen, wobei für die unter A und B dargestellten Daten CFU-F-Zellen der gleichen Präparation eines Patienten verwendet wurden. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** Durchflusszytometrie für ausgewählte Oberflächenproteine, grau - spezifischer Antikörper, weiß - Isotypkontrolle; **B)** Zytochemische Färbung von CFU-F-Zellen nach adipogener (a) und osteogener (o) Differenzierungsinduktion sowie von jeweils undifferenzierten (u) CFU-F-Zellen als Kontrollen; **C)** RT-PCR-Analyse relevanter Gene nach adipogener (a), osteogener (o) und chondrogener (c) Differenzierungsinduktion von CFU-F-Zellen, undifferenzierte (u) CFU-F-Zellen des jeweiligen Patienten als Kontrolle, Aktin als Kontrolle der PCR

Für die Analyse des Differenzierungspotentials wurden isolierte CFU-F-Zellen von allen Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung und von allen nicht-vorbehandelten Spender als nicht klonale Zellpopulationen mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium *in vitro* inkubiert. Bei allen Ansätzen waren die typischen morphologischen Veränderungen der adipogenen Differenzierung – mit Öl-Rot anfärbbare intrazelluläre Fetttropfen - bzw. osteogenen Differenzierung – mit Alizarin S anfärbbare extrazelluläre Kalziumhydroxylapatitablagerungen -

zu beobachten (Abbildung 4-1 B). Die Analyse mittels RT-PCR demonstrierte die Expression der für die jeweilige Differenzierung typischen Gene (Abbildung 4-1 C). Gleiche Ergebnisse wurden bei Analyse klonaler Zellpopulationen bei zufällig ausgewählten Spendern beider Gruppen beobachtet (Mueller, 2006).

Nach Veröffentlichung der Konsensuskriterien erfolgte zusätzlich die Analyse der chondrogenen Differenzierungskapazität. Auch hier fand sich bei Inkubation der von Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung gewonnenen CFU-F-Zellen eine Expression von für die chondrogene Differenzierung typischen Genen (Abbildung 4-1 C).

Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei den aus dem Knochenmark von Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung isolierten CFU-F-Zellen um MSC handelt. Gleichzeitig lassen diese Daten darauf schließen, dass sich MSC von Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung nicht gegenüber MSC von nicht-vorbehandelten Spendern unterscheiden.



B

MSC	PD			PDT [Tage]		
	MSC-CTx-KM	MSC-K-KM		MSC-CTx-KM	MSC-K-KM	
Passage 2	3,5 (± 0,5)	5,4 (± 3,0)	p = 0,38	1,1 (± 0,3)	1,0 (± 0,2)	p = 0,67
Passage 5	15,2 (± 2,0)	15,6 (± 3,0)	p = 0,85	1,3 (± 0,2)	1,4 (± 0,1)	p = 0,47
Passage 10	26,4 (± 4,5)	26,6 (± 3,9)	p = 0,97	2,0 (± 0,5)	2,0 (± 0,2)	p = 0,89

Abbildung 4-2: Von Patienten nach Chemotherapie-Vorbehandlung isolierte MSC (MSC-CTx-KM) zeigen *in vitro* ein gegenüber von gesunden Spendern isolierten MSC (MSC-K-KM) gleiches Wachstumsverhalten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** Expansion der MSC jeweils drei ausgewählter Spender; **B)** berechnete und statistisch verglichene PD und PDT, jeweils MW (± SD) von 3 Spendern

Um diese Annahme weiter zu überprüfen, wurden die Wachstumskinetiken der MSC von gesunden Spendern und von Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung verglichen. Diese Analysen belegten ein ähnliches Proliferationspotential für MSC beider Gruppen (Abbildung 4-2 A). Es fanden sich von Passage 2 bis Passage 10 keine Unterschiede hinsichtlich PD und PDT (Abbildung 4-2 B). Für MSC beider Gruppen war im Verlauf der Kultivierung eine Abnahme

des Proliferationspotentials zu verzeichnen. Bei allen Spendern beider Gruppen war eine Expansion um den Faktor 50 – 100 x 10⁶ zu erzielen. Damit belegen die Daten, dass bei Patienten mit Chemotherapie-Vorbehandlung aus einem Knochenmarkaspirat von 10 - 40 ml *in vitro* die Gewinnung von über 200 x 10⁶ MSC möglich ist.

Diese Daten zeigen, dass sich nach Chemotherapie MSC aus dem Knochenmark von Patienten isolieren lassen, die sich in ihren definierenden Charakteristika nicht gegenüber MSC gesunder Spender unterscheiden. Eine weitere, für therapeutische Anwendungen relevante Eigenschaft von MSC ist deren immunmodulatorisches Potential. Für eine vollständige Charakterisierung der für die vorliegende Arbeit verwendeten, von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung isolierten MSC sollte daher mittels einer exemplarischen Methode *in vitro* sowohl die Immunogenität als auch das immunsuppressive Potential untersucht werden.

4.1.3 Immunogenität und immunsuppressives Potential

Für diese Untersuchungen wurde eine *In-vitro*-Mischkultur gewählt und damit untersucht, inwiefern die isolierten MSC 1.) die Proliferation humaner Leukozyten stimulieren und 2.) die Proliferation Mitogen-aktivierter Leukozyten inhibieren.

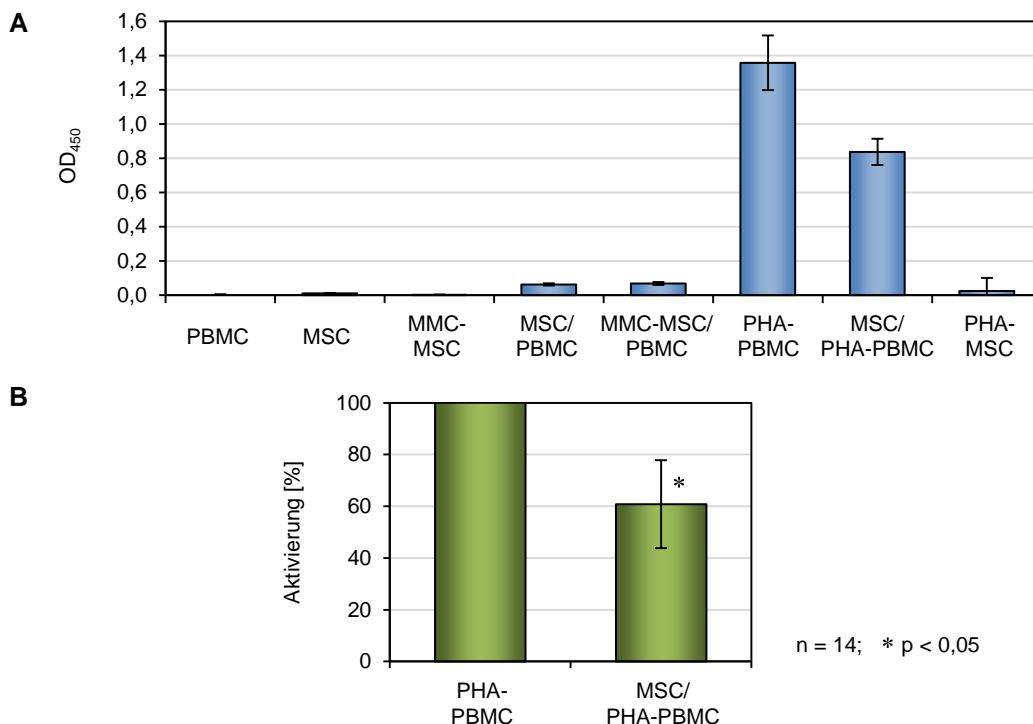


Abbildung 4-3: Direkter Kontakt mit MSC resultiert nicht in einer Proliferation HLA-inkompatibler Leukozyten sondern in einer Suppression deren Mitogen-induzierter Proliferation. Native MSC (MSC) bzw. Mitomycin-C-vorbehandelte MSC (MMC-MSC) wurden mit HLA-inkompatiblen Leukozyten des peripheren Blutes (PBMC) bzw. mit PHA-stimulierten PBMC (PHA-PBMC) kokultiviert und die Proliferation wurde mittels BrDU-Inkorporation bestimmt. Die jeweiligen nicht-gemischten Kulturen und PHA-stimulierte MSC (PHA-MSC) dienten als Kontrollen. **A)** repräsentatives Beispiel eines Kokulturansatzes, OD₄₅₀ als absolutes Maß der BrDU-Inkorporation; **B)** zusammenfassende Auswertung der PHA-stimulierten Proliferation von PBMC bei Präsenz von MSC im normierten Vergleich zur Inkubation von PHA-PBMC ohne MSC

Weder native noch Mitomycin-C behandelte MSC stimulierten die Proliferation HLA-inkompatibler Leukozyten nicht-verwandter Spender (Abbildung 4-3 A). Native MSC waren in der Lage, die Proliferation von PHA-stimulierten Leukozyten signifikant um durchschnittlich 40% ($p < 0,05$) zu inhibieren (Abbildung 4-3 B).

Damit konnten die geringe Immunogenität und das von anderen Autoren nachgewiesene immunsuppressive Potential für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, aus Knochenmark nach Chemotherapie gewonnenen MSC bestätigt werden. Der Nachweis dieser Fähigkeit komplettierte nicht nur die Charakterisierung der isolierten MSC, sondern war für die Interpretation der nachfolgend durchgeführten Untersuchungen zur Unterstützung des Tumorwachstums durch MSC relevant.

Die Daten des Abschnittes 4.1 belegen, dass sich MSC aus dem Knochenmark von Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung isolieren lassen. Diese MSC unterscheiden sich in ihren Charakteristika nicht von MSC gesunder Spender. Dies ließ darauf schließen, dass MSC über eine intrinsische Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung verfügen. Dieser Hypothese widmen sich die im folgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen.

4.2 SENSITIVITÄT GEGENÜBER ZYTOSTATIKA UND IDENTIFIKATION VON RESISTENZMECHANISMEN IN MSC

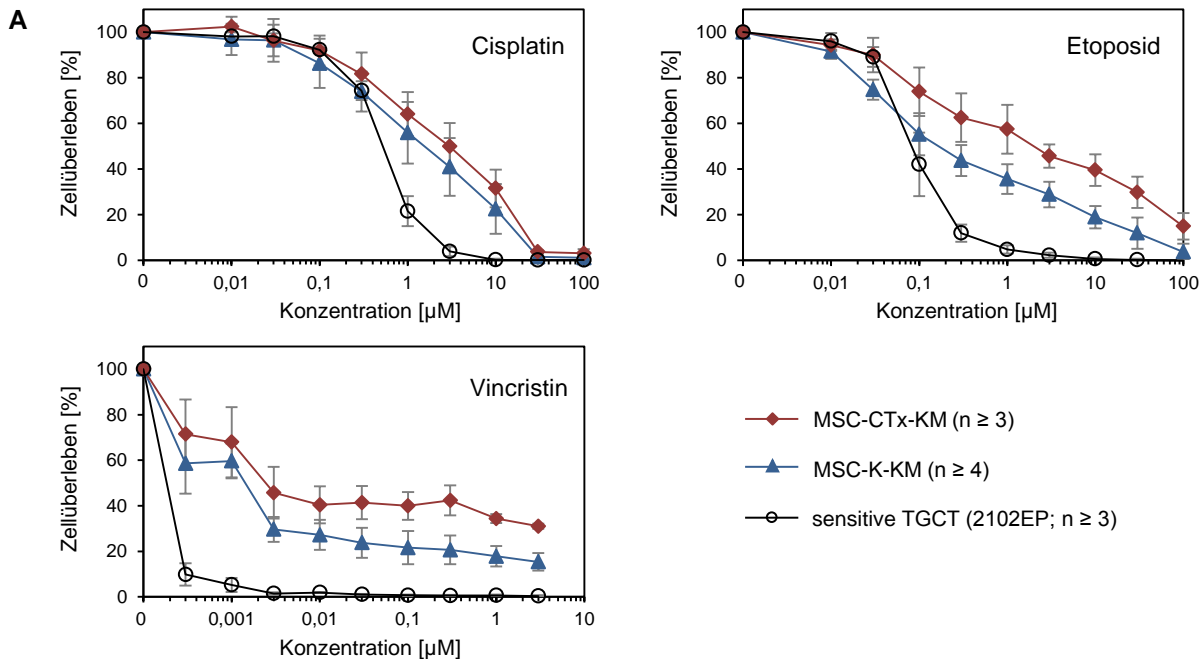
4.2.1 Relative Resistenz gegenüber Zytostatika

Der erbrachte Nachweis der Isolierbarkeit von MSC aus dem Knochenmark von Patienten nach chemotherapeutischer Behandlung ließ vermuten, dass MSC über eine inhärente Resistenz gegenüber Zytostatika verfügen. Um diese Hypothese zu testen, wurde zunächst die Sensitivität von MSC für Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkmechanismen - Cisplatin, Etoposid und Vincristin - *in vitro* analysiert. Als Vergleich dienten TGCT-Zelllinien für die eine Sensitivität gegenüber den verwendeten Zytostatika aus Vorarbeiten der AG des Autors bekannt war (Mueller, 2003).

Im SRB-Assay zeigten sowohl MSC von Patienten nach Chemotherapie-Vorbehandlung als auch MSC gesunder Spender eine relative Resistenz (Abbildung 4-4 A). Gegenüber den TGCT-Zelllinien 2102EP (Abbildung 4-4 B) und H12.1 resultierte dies in für MSC signifikant erhöhten IC90-Werten (Mueller, 2006).

Nachfolgend wurde untersucht, inwiefern MSC nach einer Exposition mit Zytostatika ihre Charakteristika beibehalten. Hierzu wurden MSC von Spendern ohne chemotherapeutische Vorbehandlung mit den Zytostatika Cisplatin oder Etoposid in einer klinisch relevanten Dosierung und Expositionszeit (jeweils 3 μM für 2 h alle 24h, insgesamt 4-mal) behandelt. Nach

einer Phase verlangsamten Wachstums von 7 Tagen nach Behandlung mit Etoposid und 14 Tagen nach Behandlung mit Cisplatin zeigten die behandelten Zellen ein erneutes Wachstum mit ähnlichen Populationsverdopplungen wie unbehandelte Zellen (Abbildung 4-5 A).



B

		MSC-CTx-KM n ≥ 3	MSC-K-KM n ≥ 4	TGCT (2102EP) n ≥ 3
IC50	Cisplatin	2,9 (± 1,4) [†]	2,0 (± 2,0)	0,5 (± 0,07)
	Etoposid	1,3 (± 1,3) ^{‡ †}	0,2 (± 0,1)	0,09 (± 0,03)
	Vincristin	0,002 (± 0,0004)	0,001 (± 0,0005)	< 0,0001
IC90	Cisplatin	22,3 (± 2,1) [†]	17,4 (± 4,9) [†]	2,0 (± 0,5)
	Etoposid	96,7 (± 5,8) ^{‡ †}	41,3 (± 32,9) [†]	0,4 (± 0,2)
	Vincristin	> 3 [†]	> 3 [†]	0,0005 (± 0,0002)

MW (± SD); [†] p < 0,05 vs. TGCT; [‡] p < 0,05 vs. MSC-K-KM

Abbildung 4-4: MSC zeigen *in vitro* eine relative Resistenz gegenüber Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen. Es wurden MSC sowohl von Patienten nach Chemotherapie-Vorbehandlung (MSC-CTx-KM) als auch von gesunden Spendern (MSC-K-KM) sowie Zellen der TGCT-Zelllinie 2102EP 24 h mit den angegebenen Zytostatika in den aufgeführten Konzentrationen behandelt und mittels SRB-Assay untersucht. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** SRB-Analyse; **B)** Übersicht und statistischer Vergleich der IC50 und IC90 Werte

Die durchflusszytometrische Analyse (Abbildung 4-5 B) demonstrierte in behandelten Zellen einen gegenüber unbehandelten Zellen identischen Phänotyp (CD14⁻, CD34⁻, HLA-DR⁻, CD11c⁻, CD45⁻, Glycophorin-A⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD166⁺). Nach Inkubation mit den entsprechenden Differenzierungsmedien zeigten behandelte Zellen analog zu unbehandelten Zellen die typischen, mittels zytochemischer Färbung nachweisbaren, morphologischen Zeichen der osteogenen oder adipogenen Differenzierung (Mueller, 2006).

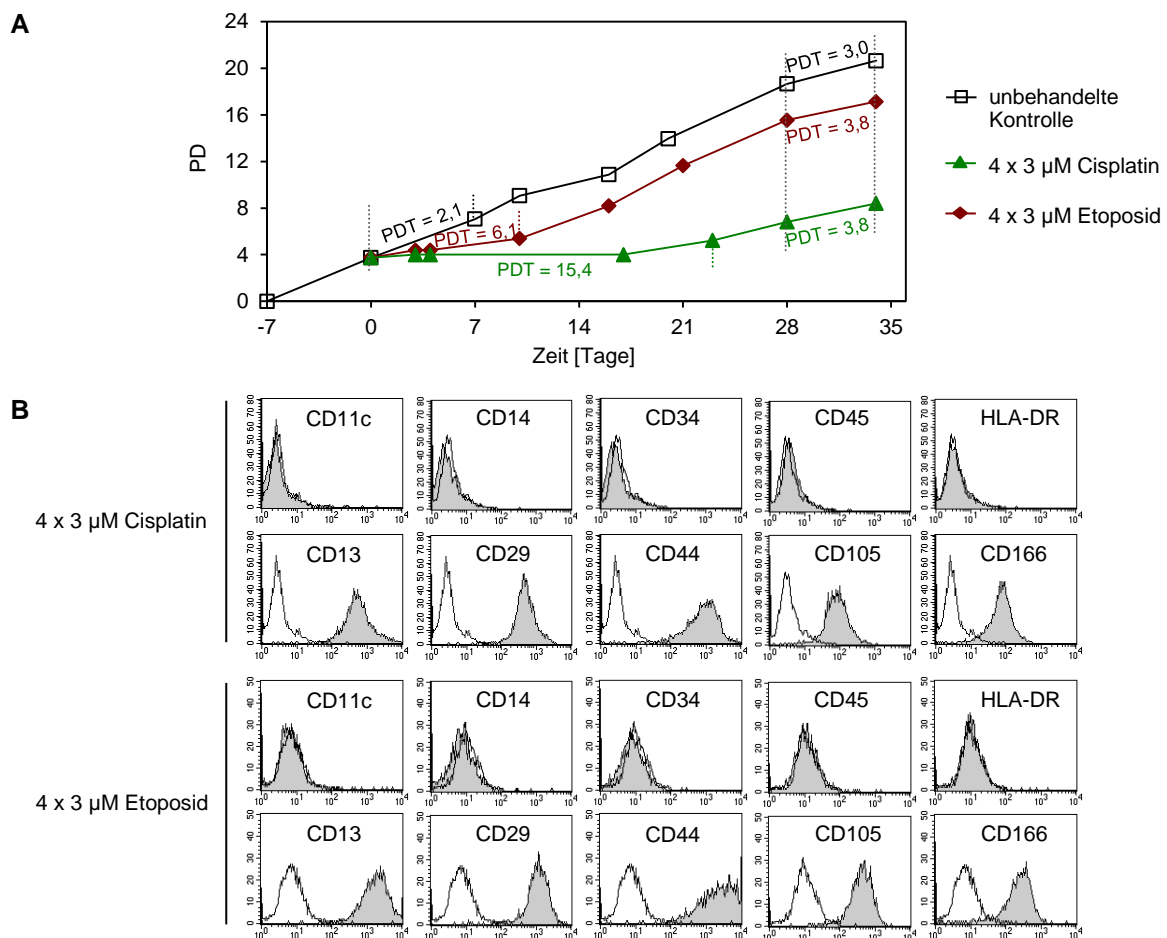


Abbildung 4-5: MSC behalten nach Schädigung in klinisch relevanter Dosierung *in vitro* ihre definierenden Charakteristika bei. MSC wurden im *In-vitro*-Modell der Resistenz an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit den angegebenen Konzentrationen Cisplatin oder Etoposid für je 2 h behandelt und anschließend weiter kultiviert; abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A**) Wachstumskinetik behandelter Zellen im Vergleich zur Kontrolle; Angabe der PDT für den jeweiligen Zeitraum; **B**) durchflusszytometrische Analyse der behandelten Zellen 72 h nach Ende der Behandlung

Diese Daten ließen vermuten, dass MSC eine Resistenz gegenüber genotoxischen Schäden aufweisen, die insbesondere durch eine erhöhte Schwelle gegenüber Apoptose-induzierenden Dosen der Schädigung gekennzeichnet ist.

4.2.2 Cisplatin-induzierte Apoptose und deren Regulation

Um die Hypothese einer erhöhten apoptotischen Schwelle für genotoxische Schädigung in MSC detaillierter zu untersuchen, wurde die Apoptoseinduktion in MSC nach Behandlung mit Cisplatin untersucht. Der in der Zytotoxizitätsanalyse ermittelte IC90-Wert entspricht bei vielen Zytostatika einer Apoptose-induzierenden Konzentration. Für die Analyse der Apoptoseinduktion erfolgte daher die Behandlung mit der IC90-Dosis sowohl von sensitiven TGCT-Zelllinien (IC90_{TGCT}, 3 µM) als auch von MSC (IC90_{MSC}, 20 µM).

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass die Behandlung sensitiver TGCT-Zellen mit deren IC90-Dosis in einer Spaltung von PARP, Caspase-3 und -9 resultierte. Dagegen war in MSC bei der Behandlung mit der IC90_{TGCT} keines dieser typischen Apoptosemerkmale zu detektieren. Erst eine Behandlung mit der IC90_{MSC} von 20 µM resultierte in MSC in einer Spaltung dieser Proteine (Abbildung 4-6 A). Entsprechend dem Charakter der Apoptose waren diese Veränderungen insbesondere in flotierenden Zellen ausgeprägt.

Für den bestätigenden Nachweis der Induktion von Apoptose in MSC bei IC90_{MSC}-Behandlung erfolgte die durchflusszytometrische Analyse für die Bindung von Annexin V-FITC. Hier zeigte sich gegenüber unbehandelten Zellen eine deutliche Zunahme der Zahl von apoptotischen, nicht-nekrotischen (Annexin V-positiv, PI-negativ) Zellen (Abbildung 4-6 B). Dagegen blieb der Anteil von sekundär nekrotischen (Annexin V-positiv und PI-positiv) sowie primär nekrotischen (Annexin V-negativ, PI-positiv) Zellen in behandelten und unbehandelten Proben gleich (Mueller, 2006).

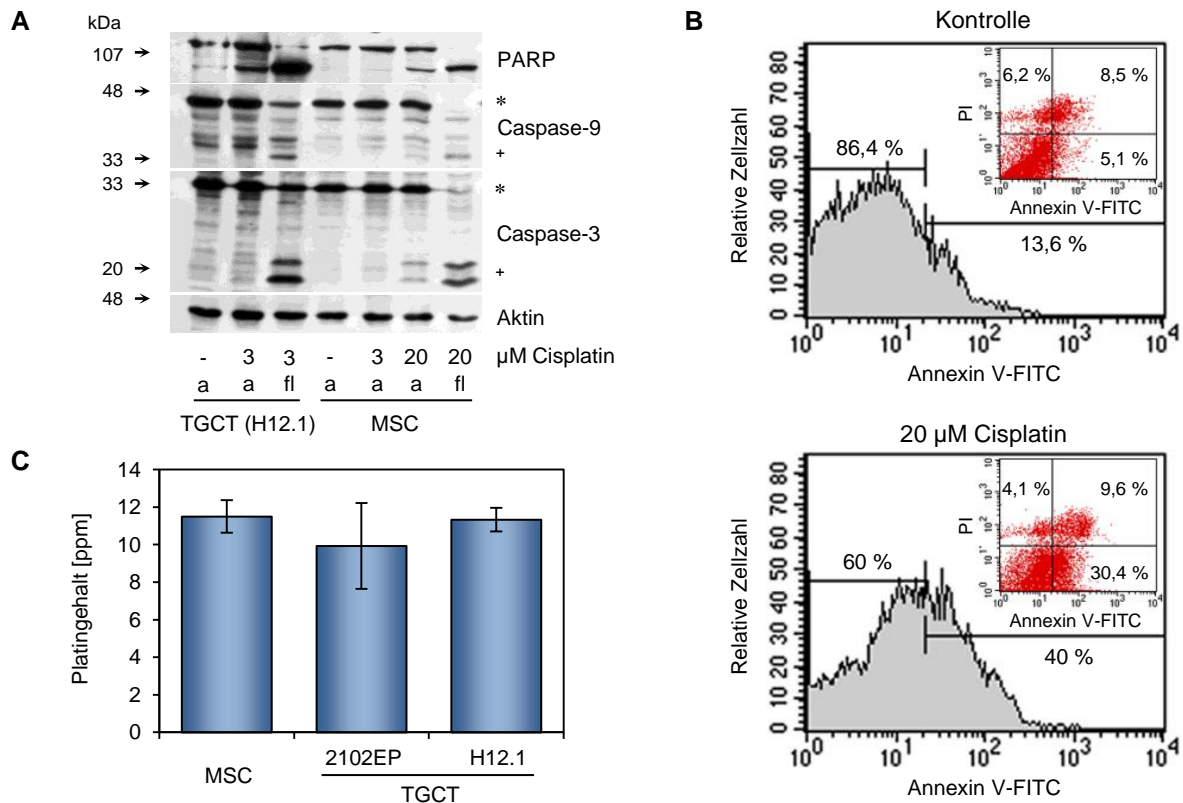


Abbildung 4-6: MSC besitzen gegenüber sensitiven Zellen bei gleicher intrazellulärer Schädigung eine erhöhte Apoptoseschwelle für Cisplatin. MSC und TGCT-Zellen wurden 24 h mit Cisplatin in den angegebenen Konzentrationen behandelt und nachfolgend analysiert; abgebildet sind die Mittelwerte bzw. ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A**) Western Blot für adhären (a) und flotierende (fl) Zellen, * - Signal der jeweiligen Procaspase, + - Signal der aktiven Caspase-Fragmente; **B**) Durchflusszytometrie nach Annexin V-FITC-Färbung für unbehandelte und behandelte MSC; dot blot der Analyse als Insert; **C**) Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie des zellulären Platingehalts nach Behandlung der angegebenen Zelllinien mit 3 µM Cisplatin

Diese Daten belegen, dass für die Induktion von Apoptose in MSC gegenüber sensitiven TGCT-Zelllinien eine ca. 6-fach höhere Cisplatin-Dosis notwendig ist. Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte apoptotische Schwelle besteht in einer in MSC gegenüber TGCT-Zellen reduzierten intrazellulären Cisplatin-Akkumulation, z. B. in Folge aktiver Exkretion durch Membranpumpen.

Um diese Annahme zu testen, wurde mittels Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie die zelluläre Platin-Akkumulation nach Cisplatin-Behandlung mit der $IC_{90_{TGCT}}$ untersucht. Dabei fand sich ein identischer Platingehalt in behandelten TGCT-Zellen und behandelten MSC (Abbildung 4-6 C). Diese Daten ließen darauf schließen, dass $3 \mu M$ Cisplatin in sensitiven TGCT-Zellen und in MSC das gleiche Ausmaß an intrazellulärer Schädigung verursachen (Mueller, 2006). Aus diesen Daten ist zu schlussfolgern, dass die erhöhte Apoptoseschwelle in MSC durch einen gegenüber sensitiven Zellen veränderten Mechanismus der Apoptoseinduktion vermittelt wird. Entscheidend für die Initiierung der Apoptose ist die Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen. Die Western Blot-Analyse ließ vermuten, dass in MSC bei Cisplatin-induzierter Apoptose eine proteolytische Spaltung von Caspase-9 und Caspase-3 erfolgt. Unklar war, ob diese auch mit einer enzymatischen Aktivität der jeweiligen Caspase einhergeht.

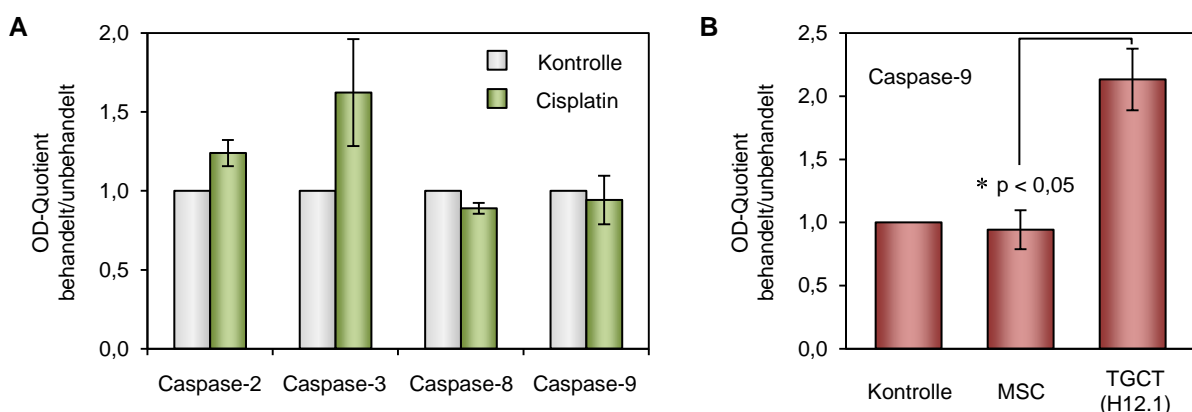


Abbildung 4-7: MSC zeigen gegenüber sensitiven TGCT-Zellen bei Cisplatin-induzierter Apoptose keine Zunahme der Caspase-9 Aktivität. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** Caspase-Assay in MSC nach 24 h-Behandlung mit $20 \mu M$ ($IC_{90_{MSC}}$) Cisplatin, unbehandelte MSC als Kontrolle; **B)** Caspase-Assay für Caspase-9 jeweils nach 24 h-Behandlung von MSC mit $20 \mu M$ Cisplatin ($IC_{90_{MSC}}$) bzw. von Zellen der TGCT-Zelllinie H12.1 mit $3 \mu M$ Cisplatin ($IC_{90_{TGCT}}$)

Es erfolgte daher mittels eines Substratassays die Analyse der Aktivität von Initiator- und Effektor-Caspasen in MSC nach Behandlung mit Cisplatin in Apoptose-induzierender $IC_{90_{MSC}}$ -Dosis ($20 \mu M$). Gegenüber unbehandelten Zellen fand sich für Caspase-2 und -3 eine Aktivierung bei Cisplatin-induzierter Apoptose in MSC. Dagegen war für die Initiator-Caspasen, Caspase-8 und -9 keine Aktivitätssteigerung zu beobachten (Abbildung 4-7 A). Die fehlende Spaltung von Caspase-8 als Enzym des intrinsischen Signalweges entsprach der

ausschließlichen Aktivierung des extrinsischen Signalweges durch Cisplatin. Dagegen war die fehlende Aktivität von Caspase-9 angesichts der beobachteten Spaltung des Proteins (Abbildung 4-6 A) nicht erklärbar. Im Vergleich hierzu wurde in sensitiven TGCT-Zellen nach Cisplatin-Behandlung in Apoptose-induzierender $IC_{90_{TGCT}}$ -Dosis (3 μ M) eine deutliche Zunahme der Aktivität von Caspase-9 beobachtet (Abbildung 4-7B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Resistenz von MSC für genotoxische Schädigung mit einer fehlenden Zunahme der Caspase-9-Aktivität bei Cisplatin-induzierter Apoptose einhergeht (Mueller, 2006). Da nicht alle genotoxischen Schäden zu einer durch Caspase-9 vermittelten Apoptose führen, sollten andere potentielle Mechanismen der Resistenz in MSC untersucht werden. Zu diesen Mechanismen zählt u. a. ein p53-vermittelter Zellzyklusarrest.

4.2.3 Zellzyklusverhalten und -regulation nach genotoxischer Schädigung

Hierfür wurden die Expression relevanter Proteine und das Zellzyklusverhalten in MSC nach Behandlung mit Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen - Cisplatin, Etoposid und Vincristin - untersucht.

Die Behandlung erfolgte jeweils sowohl mit der $IC_{90_{TGCT}}$ (Cisplatin: 3 μ M, Etoposid: 0,4 μ M, Vincristin: 0,001 μ M) als auch mit der $IC_{90_{MSC}}$ (Cisplatin: 20 μ M, Etoposid: 80 μ M) bzw. bei der Behandlung von MSC mit Vincristin in der höchsten für die Zytotoxizitätstestung eingesetzten Konzentration (3 μ M). Für Cisplatin war bereits demonstriert worden, dass die $IC_{90_{TGCT}}$ -Dosis in MSC keine Apoptose induziert (Abbildung 4-6). Die IC_{90} -Dosis der TGCT-Zellen für Etoposid und Vincristin resultierte in MSC in keiner Entstehung von flotierenden Zellen. Analog zu Cisplatin wurde daher davon ausgegangen, dass diese Behandlungen für MSC subapoptotische Schädigungen repräsentieren.

Für alle drei Substanzen fand sich in MSC bereits bei subapoptotischer Dosis eine deutliche Zunahme der p53-Expression (Abbildung 4-8 A). Für p21 fand sich ebenfalls eine Zunahme der Expression bei subapoptotischer Behandlung mit Cisplatin und Etoposid, während für die Behandlung mit Vincristin keine Änderung der p21-Expression zu beobachten war (Abbildung 4-8 A). Dies ließ darauf schließen, dass subapoptotische genotoxische Schädigungen durch Cisplatin und Etoposid in MSC zur Aktivierung einer p53-abhängigen Signaltransduktion führen. Für Vincristin als Mitoseinhibitor ließ sich dies angesichts der fehlenden Aktivierung von p21 nicht postulieren.

Ein wesentlicher Effekt der Aktivierung von p53 ist die Regulation des Zellzyklus. Ausgehend von den erhobenen Daten erfolgte daher die Zellzyklusanalyse für die Behandlung von MSC mit den drei Zytostatika. Bei Behandlung mit der $IC_{90_{MSC}}$ war bei allen drei Zytostatika eine Zunahme der SubG1-Fraktion zu beobachten (Abbildung 4-8 B). Damit wurde belegt, dass analog zu Cisplatin diese $IC_{90_{MSC}}$ für Etoposid und Vincristin eine Apoptose-induzierende Dosis repräsentieren.

Dagegen wurde bei Behandlung mit der jeweiligen $IC_{90_{TGCT}}$ ein differentielles Zellzyklusverhalten von MSC beobachtet. Für Vincristin fand sich keine Veränderung der Verteilung der Zellzyklusphasen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Übereinstimmend mit der fehlenden Zunahme der Expression von p21 (Abbildung 4-8 A) wies diese Beobachtung darauf hin, dass der Mitoseinhibitor Vincristin in MSC zu keiner veränderten Zellzyklusregulation führt. Die für MSC beobachtete relative Resistenz gegenüber Vincristin beruht daher wahrscheinlich auf Zellzyklus-unabhängigen Mechanismen.

Dagegen führte die Behandlung von MSC mit Cisplatin in der $IC_{90_{TGCT}}$ zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase (Abbildung 4-8 B) und die Behandlung mit Etoposid in der $IC_{90_{TGCT}}$ zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase (Abbildung 4-8 B).

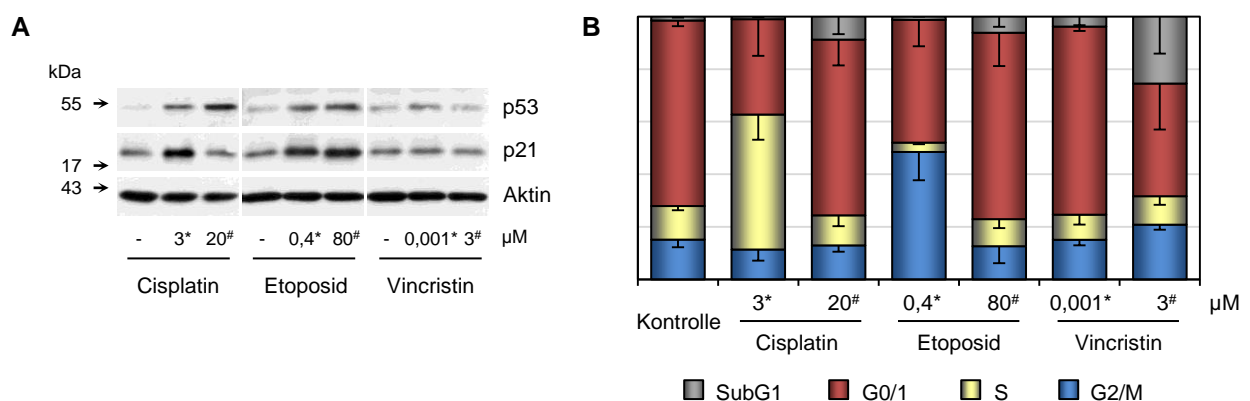


Abbildung 4-8: Eine subapoptotische Schädigung durch Cisplatin und Etoposid resultiert in MSC in einer erhöhten Expression von p53 und p21 sowie in einer Veränderung der Verteilung der Zellzyklusfraktionen. MSC wurden mit den angegebenen Zytostatika 24 h in subapoptotischer Dosis (*) und in apoptotischer Dosis (#) behandelt und unmittelbar anschließend analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte bzw. ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** Western Blot-Analyse für die angegebenen Proteine; **B)** Zellzyklusanalyse, unbehandelte Kontrolle als Vergleich

Diese Daten ließen auf einen durch subapoptotische Schädigung mit Cisplatin und Etoposid induzierten Zellzyklusarrest in MSC schließen. Nachfolgende Untersuchungen belegten, dass es sich dabei um einen temporären Arrest handelte, denn nach einem Zeitraum $d(R)$ war eine Rekonstitution der Proliferation mit erneutem Erreichen der Konfluenz und Notwendigkeit der Passagierung zu beobachten. Bei Behandlung mit Cisplatin betrug $d(R)$ 21 bis 28 Tage und bei Behandlung mit Etoposid 3 Tage. Daraufhin wurden die Versuche mit einer an die jeweilige Plasmakonzentration der beiden Medikamente angepassten Dosis – 2 μM Cisplatin bzw. 0,75 μM Etoposid - wiederholt. Dabei fanden sich für $d(R)$ Werte von jeweils 14 Tagen für beide Substanzen.

Anschließend sollte ermittelt werden, ob es sich um einen temporären Zellzyklusarrest handelt. Hierfür wurde analysiert, ob die Rekonstitution der Proliferation auch zu einer Rekonstitution der Verteilung der Zellzyklusfraktionen führte und inwiefern dieser Arrest in einer Veränderung der definierenden Charakteristika in MSC resultierte.

A

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

MW (± SD), n ≥ 4; * p < 0,05 vs. Kontrolle

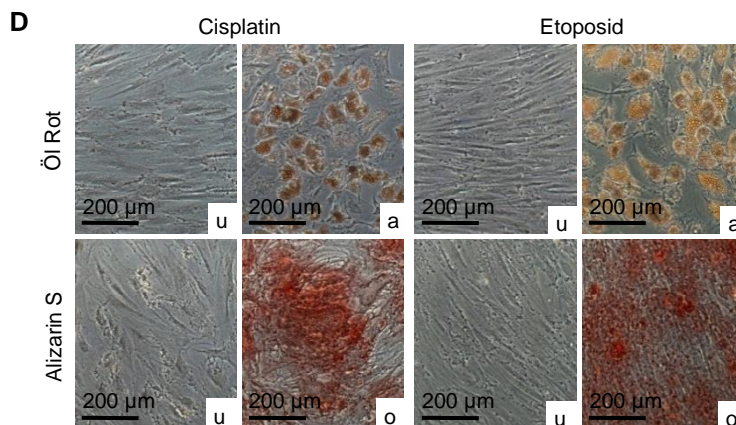
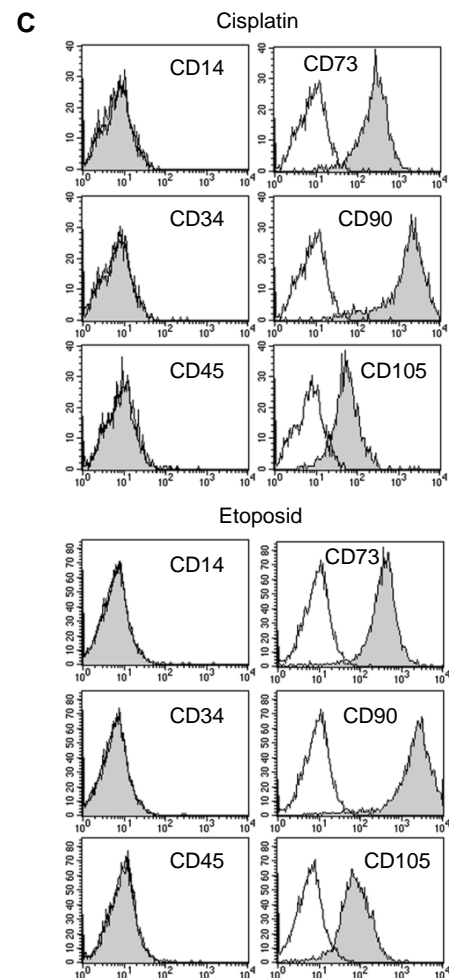
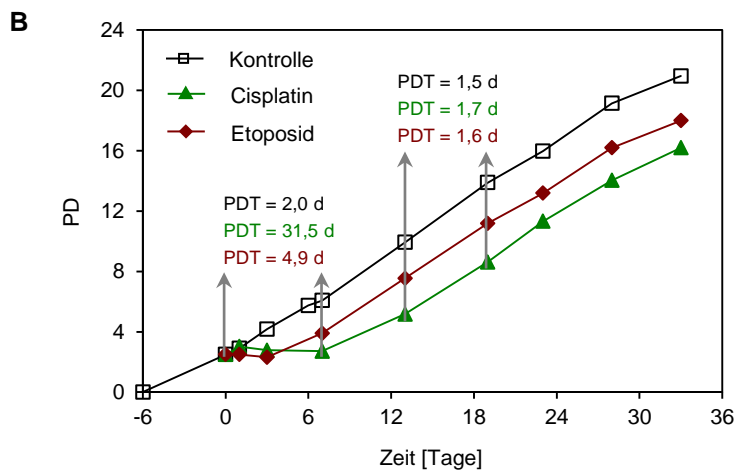


Abbildung 4-9: Die subapoptotische Schädigung von MSC mit Cisplatin und Etoposid resultiert in einem temporären Zellzyklusarrest unter Erhalt der MSC-definierenden Charakteristika. MSC wurden mit 2 µM Cisplatin oder 0,75 µM Etoposid über 24 h behandelt, weiter kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert; als Kontrollen dienten jeweils unbehandelte Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte bzw. ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2006). **A)** Mittelwerte und statistischer Vergleich der Zellzyklusanalyse sofort (Tag 1) und 48 h nach Behandlung (Tag 3) sowie zum Zeitpunkt d(R); **B)** Wachstumskinetik; **C)** Durchflusszytometrie zum Zeitpunkt d(R); **D)** zytochemische Färbung nach Differenzierungsinduktion ab d(R), u - undifferenziert, o - nach osteogener und a - nach adipogener Differenzierungsinduktion

Für Cisplatin fand sich unmittelbar bei Ende der Behandlung (Tag 1) eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase und 48 h nach Behandlungsende (Tag 3) eine Akkumulation von Zellen in

der G2/M-Phase. Für Etoposid wurde eine Akkumulation in der G2/M-Phase an Tag 1 beobachtet, die bereits an Tag 3 abnahm. Die Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase war gegenüber unbehandelten MSC dabei sowohl für Cisplatin ($p = 0,002$) als auch für Etoposid ($p < 0,002$) signifikant (Abbildung 4-9 A). Es fand sich eine vollständige Rekonstitution der Zellzyklusfraktionen gegenüber unbehandelten MSC zum Zeitpunkt d(R) von 15,7 Tagen bei Cisplatin und 13,3 Tagen bei Etoposid. Dies ließ darauf schließen, dass beide Substanzen in MSC einen temporären Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase induzieren.

Wie die in Abbildung 4-9 B dargestellte Wachstumskinetik belegt, fand sich bis Tag 7 nach Behandlungsende eine intermittierende Phase der reduzierten Proliferation mit einer PDT von 31,5 d für die Behandlung mit Cisplatin und 4,9 d für die Behandlung mit Etoposid gegenüber einer PDT von 2 d für unbehandelte MSC. Die Rekonstitution der Proliferation ging im Zeitraum Tag 13 bis 19 nach Behandlungsende mit einer nahezu vollständigen Normalisierung der PDT gegenüber den Kontrollen einher - 1,5 d für die Kontrollen, 1,7 d für Cisplatin-behandelte MSC und 1,6 d für Etoposid-behandelte MSC (Abbildung 4-9 B).

Die durchflusszytometrische Analyse von MSC zum Zeitpunkt d(R) nach Cisplatin- bzw. Etoposid-induziertem temporärem Zellzyklusarrest demonstrierte eine gegenüber den Kontrollen unveränderte Expression von Oberflächenantigenen (Abbildung 4-9 C).

Die Untersuchung des Differenzierungspotentials zum Zeitpunkt d(R) belegte eine unveränderte Fähigkeit der behandelten MSC zur adipogenen bzw. osteogenen Differenzierung mit der Ausprägung der entsprechenden morphologischen, die Differenzierung anzeigenden Veränderungen (Abbildung 4-9 D).

Somit wurde nachgewiesen, dass MSC nach subapoptotischer genotoxischer Schädigung durch Cisplatin und Etoposid einen temporären Zellzyklusarrest vollziehen können, bei dem die MSC-definierenden Charakteristika erhalten bleiben.

Diese Ergebnisse des Abschnittes 4.2 belegen, dass MSC eine Resistenz für genotoxische Schädigung aufweisen. Es ist nahe liegend zu vermuten, dass diese Resistenz zur lebenslangen Persistenz von MSC im humanen Organismus beiträgt. Von verschiedenen Autoren wird sowohl diese Persistenz als auch die für MSC postulierte Pluripotenz als Argument angeführt, dass MSC ein hohes Potential zur malignen Transformation zeigen. Diesen Aspekten der Biologie von MSC widmeten sich verschiedene Projekte der AG des Autors deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt dargestellt sind. Insbesondere mit Blick auf die angestrebte Untersuchung der Eignung genetisch modifizierter MSC für die Therapie maligner Tumoren wurde die maligne Transformation der verwendeten MSC unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Kulturbedingungen analysiert.

4.3 CHARAKTERISTIKA VON MSC MIT RELEVANZ FÜR DEREN POTENTIELLE MALIGNEN TRANSFORMATION

4.3.1 Expression des Pluripotenz-spezifischen Transkriptionsfaktors OCT4

Zum Zeitpunkt der hier dargestellten Arbeiten ließen Daten anderer Autoren vermuten, dass MSC über eine Pluripotenz verfügen, typische Transkriptionsfaktoren pluripotenter Zellen wie z. B. OCT4 exprimieren und diese Eigenschaften mit einem hohen Potential zur malignen Transformation in MSC einhergehen.

Zunächst wurde die Expression von OCT4 in MSC vergleichend zu den TGCT-Zelllinien H12.1 und 2102EP mit bekannter OCT4-Expression auf Ebene der Transkription und Translation untersucht. Für die RT-PCR-Analyse kamen 2 Primerpaare zur Anwendung. Das Primerpaar OCT4-I umfasste eine Sequenz von Exon 1 bis 3 und war damit für OCT4A, d. h. genuines OCT4 spezifisch. Die Sequenz des Primerpaars OCT4-II wurde aus Arbeiten übernommen, in denen eine OCT4-Expression in Tumorzellen gezeigt wurde (Monk, 2001), umfasste die Sequenz von Exon 3 bis 5 und amplifizierte damit cDNA sowohl von OCT4A als auch OCT4B. Das Primerpaar OCT4-fl umfasste die cDNA des gesamten OCT4-Gens. Für die nachfolgenden Analysen mittels Western Blot und Immunzytochemie kamen 2 verschiedene Antikörper (goat polyclonal N-19, mouse monoclonal C-10) zur Anwendung, die alle das N-terminale Ende des OCT4 Proteins binden und damit spezifisch OCT4A detektieren.

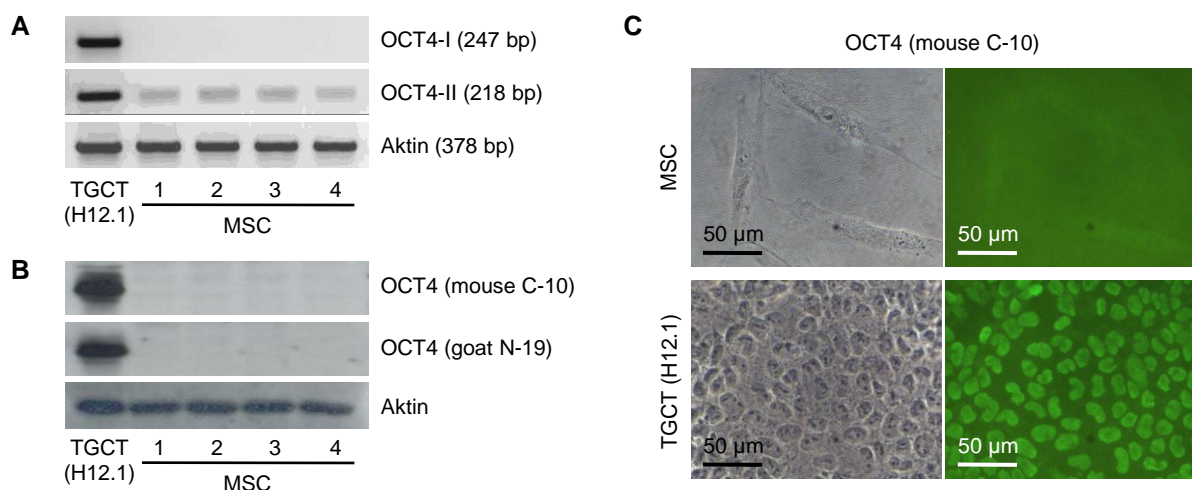


Abbildung 4-10: MSC exprimieren im Gegensatz zu pluripotenten Zellen kein funktionelles OCT4. Dargestellt sind die Analysen eines repräsentativen Beispiels von jeweils mindestens 3 Experimenten. Unter A und B wurden MSC verschiedener Spender parallel analysiert (MSC 1 - 4); die TGCT-Zelllinie H12.1 bzw. 2102EP diente jeweils als Kontrolle. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2009). **A)** RT-PCR für OCT4 mittels zwei Primerpaaren - OCT4-I und OCT4-II; **B)** Western Blot-Analyse mittels 2 verschiedener Antikörper; **C)** Immunzytochemie für OCT4 (Vergrößerung 400 x)

In der RT-PCR-Analyse fand sich bei Verwendung der Primerpaare OCT4-I (Abbildung 4-10 A) und OCT4-fl in MSC im Vergleich zu OCT4-positiven TGCT-Zellen kein Signal. Ebenfalls fand sich in MSC kein Anhalt für eine Expression des 45 kDa OCT4 Proteins im Western Blot bzw.

für eine intranukleäre Präsenz des OCT4-Proteins in der Immunzytochemie (Abbildung 4-10 B und 4-10 C). Die Signale des Primerpaares OCT4-II sind als Resultat der Expression von Isoformen - z. B. des für die Pluripotenz funktionell nicht relevanten OCT4B – oder als alternativen Splicevarianten zu werten (Mueller, 2009).

Die Analysen zeigen damit sowohl, dass MSC im Vergleich zu OCT4-positiven TGCT-Zellen kein OCT4 exprimieren, als auch, dass die Analyse der OCT4-Expression eine sorgfältige Auswahl der Methodik verlangt (Mueller, 2009). Neben der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren wurden MSC hinsichtlich der differenzierungsabhängigen epigenetischen Regulation bestimmter, für die Biologie pluripotenter Stammzellen relevanter Gene untersucht.

4.3.2 Epigenetische Regulation und Expression von Genen mit Relevanz für die Stammzellbiologie

In einem Kooperationsprojekt mit der AG Prof. Dr. R. Dammann (Universität Gießen) wurde die epigenetische Regulation bestimmter, für die Biologie von Stammzellen relevanter Gene in MSC untersucht. Dabei erfolgte die Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregion von brachyury, FGF4, FOXD3, LIN28 und NESTIN in nativen sowie in osteogen und adipogen differenzierten MSC. Humane Fibroblasten sowie die Zellen der humanen Tumorzelllinie HeLaS3 mit bekanntem Methylierungsstatus dienten als Kontrollen.

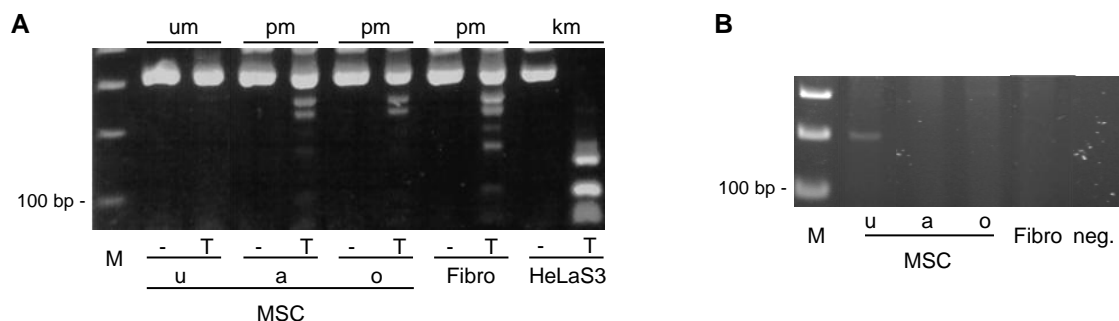


Abbildung 4-11: Gene mit funktioneller Bedeutung für die Stammzellbiologie wie z. B. brachyury unterliegen in undifferenzierten und differenzierten MSC einer differentiellen Methylierung, resultierend in einer differentiellen Expression. Analysiert wurden undifferenzierte (u), adipogen (a) und osteogen (o) differenzierte MSC; als Kontrollen dienten humane Fibroblasten (Fibro) und Tumorzellen (HeLaS3); abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Dansranjavin, 2009). **A)** Cobra Assay für die Methylierung des brachyury Promotors; um - unmethyliert, pm - partiell methyliert; km - komplett methyliert; **B)** RT-PCR für brachyury (201 bp); neg - Negativkontrolle, M - Molekulargewichtsmarker

Es fand sich ein differentielles Muster der Genexpression und des Methylierungsstatus des zugehörigen Promotors (Dansranjavin, 2009). Bemerkenswert war insbesondere die Korrelation von Expression und Promotormethylierung für brachyury. In undifferenzierten MSC wurde brachyury schwach exprimiert und der Promotor lag unmethyliert vor. Dagegen fand sich sowohl in Fibroblasten als auch in adipogen und osteogen differenzierten MSC keine Expression von brachyury, aber eine partielle Methylierung des Promotors (Abbildung 4-11).

Ebenfalls fanden sich in undifferenzierten MSC für FGF4, FOXD3, LIN28 and NESTIN unmethylierte Promotorregionen (Dansranjavin, 2009).

Diese Daten belegen, dass in MSC analog zu anderen Stammzelltypen Gene mit funktioneller Relevanz für die Stammzellbiologie einer differenzierungsabhängigen epigenetischen Regulation unterliegen. Als Kriterium für eine Pluripotenz wurde nachfolgend die Plastizität von MSC am Beispiel einer hepatogenen Differenzierung untersucht.

4.3.3 Plastizität am Beispiel der hepatogenen Differenzierung

Die Untersuchungen zur hepatogenen Differenzierung von MSC erfolgten in einem Kooperationsprojekt mit der AG Prof. Dr. B. Christ (MLU).

Konfluente MSC wurden mit hepatogenem Differenzierungsmedium über mehr als 20 Tage kultiviert. Auf Ebene der Transkription war in den damit generierten heMSC eine Genexpression epithelialer Proteine wie Cytokeratin 18 (CK18) sowie hepatozytenspezifischer Proteine und Enzyme wie Alpha-Fetoprotein (AFP), Cytochrom P450 Subtyp 3A4 (CYP3A4) und PCK1 zu beobachten (Abbildung 4-12 A). Diese Ergebnisse wurden durch die Analysen der Proteinexpression bestätigt (Aurich, 2007). In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Differenzierung sowohl die Konfluenz der Zellen voraussetzte, als auch die Präsenz des hepatogenen Differenzierungsmediums erforderte (Aurich, 2007).

Für den Nachweis der Funktionalität dieser Differenzierung erfolgte die Analyse der Stoffwechselaktivität in heMSC *in vitro*. Gegenüber undifferenzierten Zellen zeigten heMSC eine deutliche Akkumulation von Glykogen in der PAS-Färbung (Abbildung 4-12 B). Ebenso fand sich im Überstand von heMSC eine gegenüber undifferenzierten MSC 10-fach erhöhte Harnstoff-Konzentration als Beleg für die Harnstoffsynthese. Als weiterer Nachweis diente die Analyse der Aktivierung des *PCK1* Gens. Hierfür wurden heMSC mit einem *RFP*-Reporter-Konstrukt unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors transfiziert. Trotz einer niedrigen Transfektionseffizienz fand sich in heMSC wie auch in den als Positivkontrolle dienenden primären Hepatozyten eine Expression von RFP in 10 % aller Zellen (Abbildung 4-12 C).

Für den *In-vivo*-Nachweis der funktionellen Relevanz der Differenzierung erfolgte die intrasplenische Transplantation von heMSC in immundefiziente, partiell hepatektomierte Pfp/Rag22/2 Mäuse. In diesem Verletzungsmodell erfolgte zusätzlich vor Transplantation von heMSC die Behandlung der Tiere mit Propranolol, um für die transplantierten heMSC einen Wachstumsvorteil gegenüber den Wirt-Hepatozyten zu generieren. Bei Tötung der Tiere 12 Wochen nach Transplantation waren humane Zellen mit einem human-spezifischen Anti-Albumin Antikörper insbesondere in periportalen Arealen detektierbar (Abbildung 4-12 D). In korrespondierenden seriellen Schnitten fand sich ebenfalls eine Anfärbung für PCK1 und Glykogenablagerungen (Aurich, 2007). In der FISH-Analyse fand sich keine Kolo-kalisation humaner Alu-Sequenzen und muriner Satelliten-DNA. Damit konnte eine Zellfusion als

dominierender Mechanismus für die Präsenz humaner Zellen mit hepatozytären Charakteristika in der Leber der transplantierten Tiere ausgeschlossen werden (Aurich, 2007).

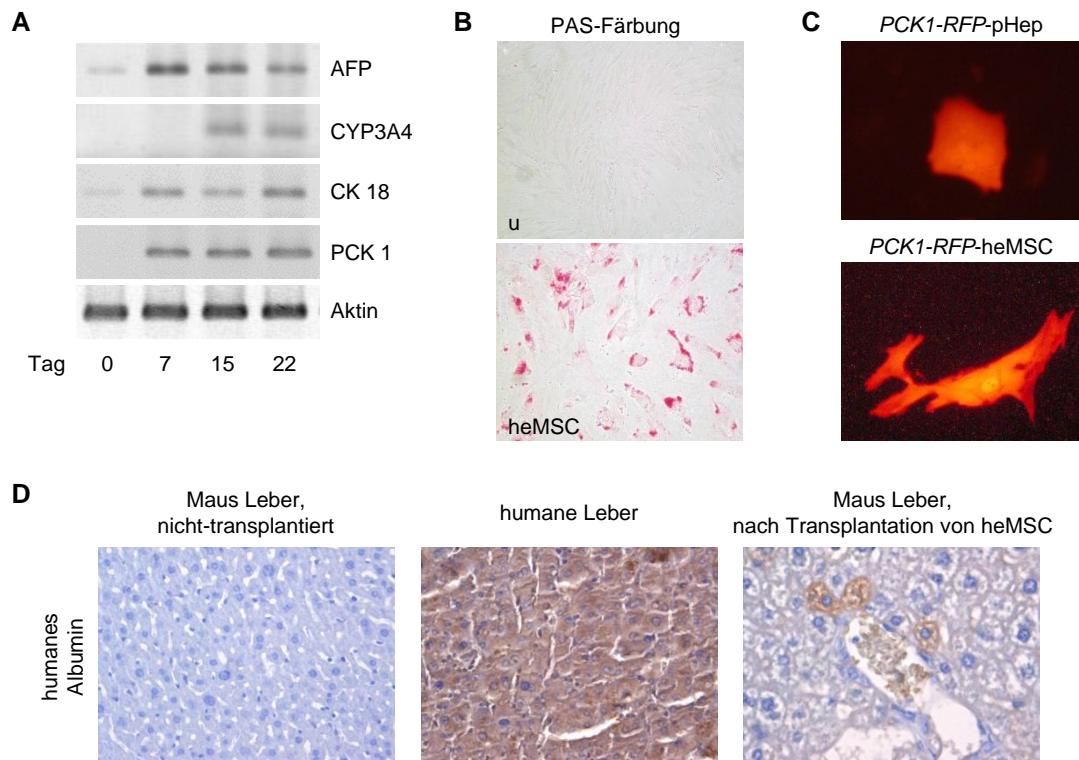


Abbildung 4-12: MSC besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen mit funktionell hepatozytärem Phänotyp und behalten diesen nach Transplantation *in vivo* bei. Analysiert wurde die funktionelle Genexpression bei heMSC *in vitro* sowie nach Transplantation im immunsupprimierten Mausmodell; abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Aurich, 2007). **A)** RT-PCR für hepatozytäre Gene vor (Tag 0) und im Verlauf der hepatogenen Differenzierung; **B)** Glykogenfärbung von heMSC *in vitro* im Vergleich zu undifferenzierten MSC (u) als Kontrolle; **C)** Fluoreszenzmikroskopie von heMSC nach Transfektion eines RFP-Reporter-Konstruktes unter Kontrolle des PCK1-Promotors (PCK1-RFP-heMSC); transfizierte primäre Hepatozyten (PCK1-RFP-pHep) als Kontrolle; **D)** Immunhistochemie für humanes Albumin nach intrasplenischer Injektion von heMSC in Pfp/Rag22/2 Mäuse; Färbung von Lebergewebe nicht-transplantierte Mäuse und von humanem Lebergewebe als Negativ- und Positivkontrolle

Aus den dargestellten Daten lässt sich ableiten, dass MSC zur funktionellen Differenzierung in nicht-mesodermale Zellen in der Lage sind und damit eine Plastizität besitzen. Die in MSC fehlende funktionelle Expression von OCT4 lässt aber darauf schließen, dass diese Plastizität im Gegensatz zu ESC nicht mit einer Pluripotenz einhergeht.

Daraus lässt sich jedoch nicht unmittelbar auf das Potential von MSC zur malignen Transformation schließen. Diese Fragestellung war jedoch für die nachfolgend geplanten Untersuchungen zur potentiellen therapeutischen Verwendung von MSC essentiell. Daher wurden die für die vorliegende Arbeit verwendeten, *in vitro* kultivierten MSC hinsichtlich Zeichen einer malignen Transformation untersucht.

4.3.4 Maligne Transformation

Für diese Analysen wurden sowohl WT-MSC als auch *GFP*-MSC unterschiedlicher Spender ($n = 10$) zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung (Passage 2 bis 6, 11 und 13) mittels Soft-Agar-Assay *in vitro* und im Nacktmausmodell *in vivo* hinsichtlich Zeichen einer malignen Transformation untersucht.

Im Soft-Agar-Assay fand sich im Vergleich zu den als Positivkontrollen dienenden DLD1-Zellen bei keiner der getesteten MSC-Präparationen ein kontakt-unabhängiges Wachstum (Abbildung 4-13 A). Ebenfalls fand sich nach s. c. (Abbildung 4-13 B) und nach i. v. Applikation von MSC im Nacktmausmodell bei einer Beobachtungszeit von bis zu 6 Monaten kein Tumorwachstum (Luetzkendorf, 2010). Diese Daten zeigen, dass die in der vorliegenden Arbeit gewählten Kulturbedingungen in keiner regelhaften malignen Transformation der verwendeten MSC resultieren.

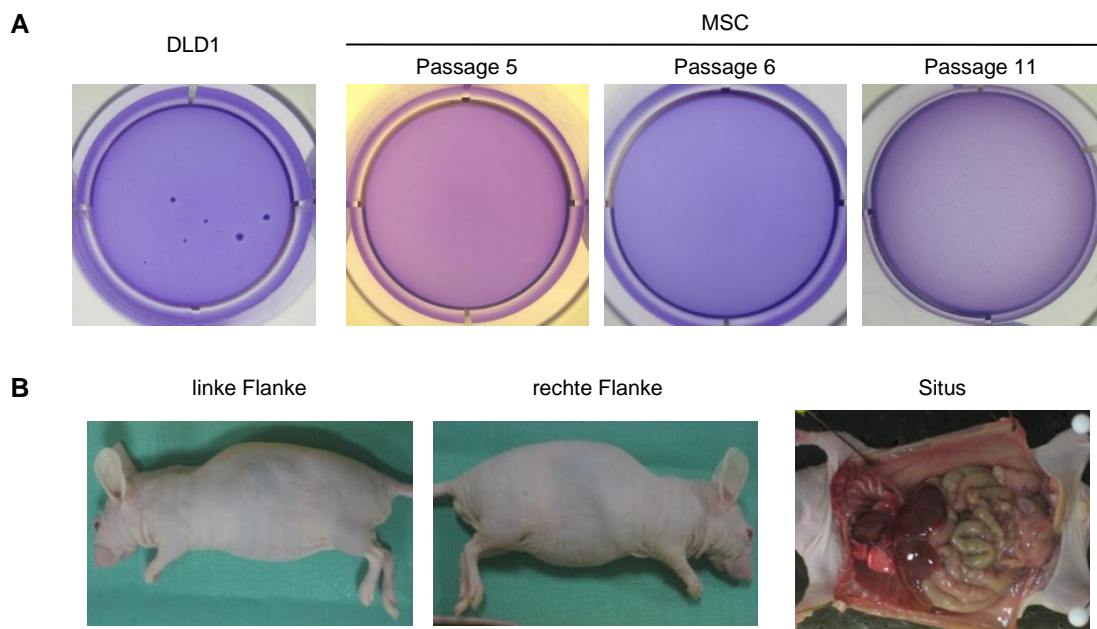


Abbildung 4-13: MSC zeigen keine Zeichen der malignen Transformation sowohl bei Kultivierung *in vitro* als auch bei nachfolgender Transplantation *in vivo*. MSC wurden über mehrere Passagen kultiviert und anschließend untersucht; abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. **A)** Soft-Agar-Assay mit MSC verschiedener Spender; CRC-Zelllinie DLD1 als Positivkontrolle; Fotodokumentation 1 x; **B)** Nacktmaus 34 Wochen nach s. c. Injektion von MSC eines Spenders in beide Flanken

Die im Abschnitt 4.3 dargestellten Untersuchungen unterstützten die Annahme, dass MSC Stammzellcharakter tragen und ein hohes regeneratives Potential besitzen. Allerdings zeigen MSC keine funktionelle Expression von OCT4 und weisen daher vermutlich im Gegensatz zu ESC keine Pluripotenz auf. Unter den hier vorgestellten Kultivierungsbedingungen vollziehen MSC keine regelhafte maligne Transformation.

Bedenken gegen eine therapeutische Anwendung von MSC betreffen neben der direkten malignen Transformation die für MSC im Tiermodell beobachtete Tumorintegration. Es wird

vermutet, dass tumorintegrierte MSC das Wachstum maligner Tumoren fördern können. Diese Fragestellung ist nicht nur für die potentielle therapeutische Anwendung von MSC, sondern auch für die Tumorbiologie relevant. Nachfolgend wurde daher der Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Wachstum maligner Tumoren vorrangig am Beispiel des CRC untersucht.

4.4 EINFLUSS TUMORINTEGRIERTER MSC AUF DAS WACHSTUM MALIGNER TUMOREN

4.4.1 Integration in CRC-Xenografte

Von zahlreichen Autoren wurde im Mausmodell eine Integration von MSC in humane Xenografte demonstriert. Für die im Folgenden dargestellten Arbeiten sowohl zum Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Tumorstadium als auch zur therapeutischen Nutzung genetisch manipulierter MSC sollte ein subkutanes CRC-Nacktmaus-Xenograftmodell zur Anwendung kommen. Daher wurde zunächst untersucht, inwiefern MSC in subkutane Xenografte ausgewählter humaner CRC-Zelllinien im Nacktmausmodell integrieren.

Hierfür wurden CRC-Xenografte subkutan in der Flanke von Nacktmäusen etabliert und bei sichtbarem Tumorstadium markierte MSC via Schwanzvene systemisch appliziert. Dabei zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse eine Integration von MSC in allerdings geringem Ausmaß (Abbildung 4-14).

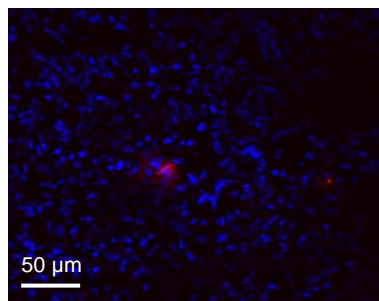


Abbildung 4-14: Nach systemischer Applikation integrieren MSC in subkutane CRC-Xenografte. MSC wurden mit Dil gefärbt und wiederholt i. v. bei subkutanen DLD1-Xenograft-tragenden Nacktmäusen injiziert. Gefrierschnittanalyse eines repräsentativen Versuches von mindestens 3 Experimenten, Gegenfärbung der Kerne mittels DAPI, composite overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen

Hiermit war der Nachweis der prinzipiellen Integration von MSC in CRC-Xenografte erbracht. Es bestand damit eine Basis für die nachfolgende Analyse des Einflusses nativer und genetisch modifizierter tumorintegrierter MSC auf das CRC-Xenograftwachstum.

4.4.2 Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Wachstum von CRC

Zunächst wurde der Einfluss von MSC auf das Wachstum von Xenograften der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 im Mischxenograftmodell analysiert. Dabei erfolgte die Applikation einer

Mischsuspension der jeweiligen *DsRed*-markierten CRC-Zellen und WT-MSC im Verhältnis von 4 : 1. Als Vergleich diente ein Mischxenograft der jeweiligen CRC-Zellen und humanen Fibroblasten der Kolonschleimhaut (CCD-18) und nicht-gemischte CRC-Xenografte. Die Analyse des Wachstums erfolgte mittels *In-vivo*-Imaging und nach Tötung der Tiere durch Wiegen der Tumoren.

Bei Präsenz von MSC wurde für beide Zelllinien eine Beschleunigung des Xenograftwachstums beobachtet. Dies resultierte am Versuchsende in einem teilweise signifikanten Wachstumsvorteil für MSC-enhaltene Xenografte sowohl hinsichtlich der Tumogröße als auch des Tumorgewichtes (Luetzkendorf, 2010). Der Vergleich mit Fibroblasten-enhaltenden Xenograften ließ vermuten, dass es sich um einen MSC-spezifischen Effekt handelte (Abbildung 4-15).

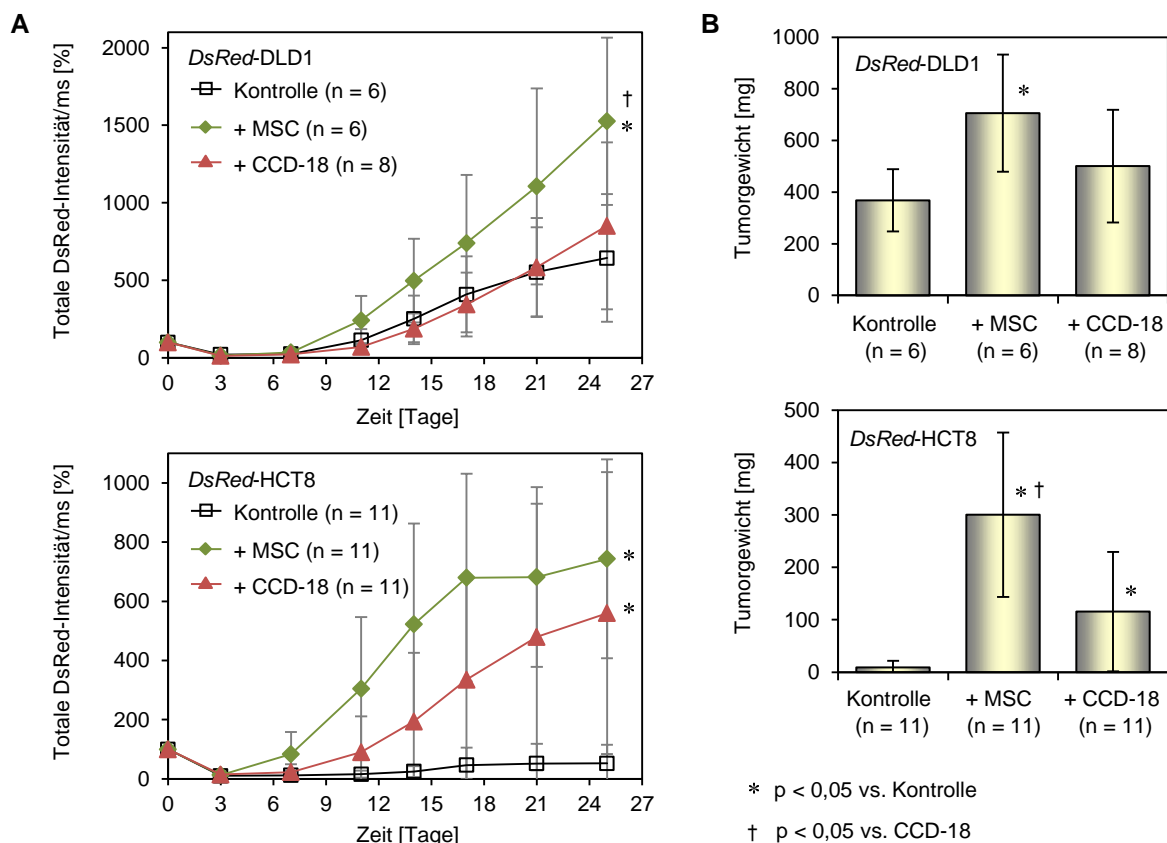


Abbildung 4-15: Tumorintegrierte MSC fördern spezifisch das Wachstum subkutaner Xenografte ausgewählter CRC-Zelllinien im Nacktmausmodell. WT-MSC wurden im Verhältnis von 1 : 4 mit *DsRed*-DLD1 bzw. *DsRed*-HCT8 als Mischsuspension s. c. injiziert. Als Kontrollen dienten Mischxenografte von *DsRed*-CRC-Zellen und Fibroblasten (CCD-18) bzw. nicht-gemischte Xenografte von *DsRed*-CRC-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010). **A)** *In-vivo*-Imaging des Xenograftwachstums anhand des *DsRed*-Signals; **B)** Tumorgewichte der an Tag 25 exzidierten Tumoren

Diese Daten belegen, dass MSC das Wachstum von Xenograften ausgewählter CRC-Zellen im Nacktmausmodell fördern. Als mögliche Mechanismen kamen u. a. eine Suppression der in Nacktmäusen residualen humoralen und NK-Zell-basierten Immunantwort, ein direkter

proliferationsfördernder Effekt auf die Tumorzellen oder aber eine Beschleunigung der Ausbildung des Tumorstroma durch MSC in Frage.

Für die Bestimmung der Rolle der Immunsuppression bei der Wachstumsförderung von CRC-Xenograften durch MSC erfolgen aktuell in der AG des Autors Untersuchungen im NOG-Mausmodell. In diesem Modell ist aufgrund der vollständigen Immundefizienz eine MSC-vermittelte Immunsuppression für das Wachstum von Xenograften irrelevant. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass auch im NOG-Mausmodell MSC das Wachstum von CRC-Xenograften spezifisch fördern (Daten nicht gezeigt). Damit scheint die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften nicht ausschließlich auf immunologischen Mechanismen zu beruhen.

Die Untersuchung einer direkten Proliferationsförderung durch MSC erfolgte in direkter 2D-Kokultur als auch im 3D-Sphäroidmodell unter Mischung von MSC und *DsRed*-CRC-Zellen. Als Kontrollen dienten Mischkulturen von *DsRed*-CRC-Zellen und Fibroblasten. Es wurden die Zellzahlen mittels Zählung und Durchflusszytometrie bzw. die Größen der Sphäroide verglichen. Dabei wurde kein MSC-spezifischer Effekt auf die Proliferation von CRC-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

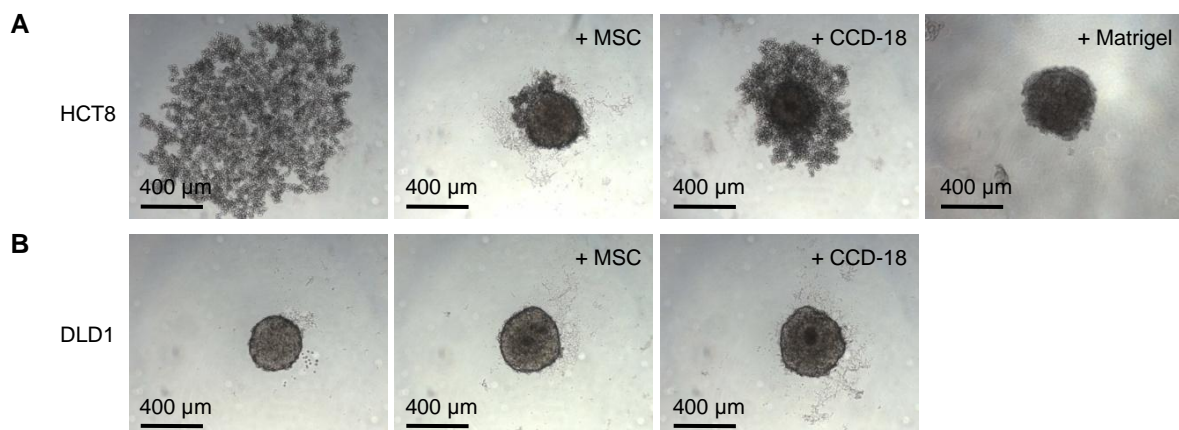


Abbildung 4-16: MSC fördern analog zu Matrigel *in vitro* die Ausbildung dreidimensionaler Sphäroide der CRC-Zelllinie HCT8. Die jeweiligen Zellen bzw. Mischsuspensionen wurden 48 h unter 3D-Bedingungen kultiviert und anschließend mikroskopisch analysiert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. **A)** Kultivierung von HCT8-Zellen allein (HCT8), gemischt im Verhältnis 4 : 1 mit MSC (+ MSC) bzw. Fibroblasten (+ CCD-18) oder gemischt mit 1,67 % Matrigel (+ Matrigel); **B)** Kultivierung von Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 allein (DLD1), gemischt im Verhältnis 4 : 1 mit MSC (+ MSC) oder Fibroblasten (+ CCD-18)

Der Einfluss von MSC auf die Tumorarchitektur als ein weiterer potentieller Mechanismus der MSC-vermittelten Wachstumsförderung wurde im 3D-Sphäroidmodell untersucht. Hierbei war für die Zelllinie HCT8 eine Förderung der Ausbildung von Sphäroiden durch MSC auffällig. Während sich bei Zugabe von MSC Sphäroide ausbildeten, formierten HCT8-Zellen sowohl allein als auch bei Zusatz von Fibroblasten unter 3D-Bedingungen lediglich locker strukturierte Aggregate (Abbildung 4-16 A). Weitere Analysen zeigten, dass verdünntes Matrigel den Effekt von MSC auf die Sphäroidbildung von HCT8-Zellen simulieren konnte (Abbildung 4-16 A). Dem

gegenüber waren DLD1-Zellen auch allein unter 3D-Bedingungen zur Sphäroidbildung in der Lage (Abbildung 4-16 B).

Diese Daten ließen vermuten, dass dem Einfluss von MSC auf das Wachstum von Xenograften der Zelllinien HCT8 und DLD1 differentielle Mechanismen zugrunde liegen. Für die Zelllinie HCT8 konnte angesichts dieser Daten postuliert werden, dass MSC einen Einfluss auf die Ausbildung der dreidimensionalen Tumorarchitektur z. B. durch Sekretion von in Matrigel ebenfalls enthaltenen Proteinen ausüben. Mögliche Erklärungsansätze für den beobachteten Einfluss tumorintegrierter MSC auf das Wachstum von CRC ergaben sich aus den Arbeiten in anderen Tumormodellen.

4.4.3 Einfluss von MSC auf die Biologie von Tumorzellen in anderen Modellen

In einem Kooperationsprojekt mit der AG von Prof. Dr. J. Dittmer (MLU) wurde der Einfluss von MSC auf die Sphäroidbildung von Mammakarzinomzellen untersucht. Für diese Arbeiten kamen die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zum Einsatz. Diese unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Sphäroiden unter 3D-Kulturbedingungen: während die epitheloide, E-cadherin exprimierende Zelllinie MCF-7 Sphäroide ausbildet, aggregieren Zellen der E-cadherin-defizienten MDA-MB-231 zu irregulären Strukturen. Dabei zeigen MCF-7 Sphäroide nach 7 - 10 Tagen ein zentrales Lumen (Dittmer, 2009).

Nach jeweiliger Zugabe von *GFP*-MSC zu den etablierten MCF-7-Sphäroiden und zu den MDA-MB-231-Aggregaten war nach einem Tag eine Anheftung und Invasion der MSC in die 3D-Strukturen zu beobachten. Die immunhistochemische Detektion mittels Anti-GFP- oder Anti-CD44-Antikörper belegte gegenüber den Negativkontrollen die Integration von MSC in die Sphäroide bzw. Aggregate (Dittmer, 2009).

Untersuchungen mittels Boyden-Kammer Technik belegten, dass sowohl MDA-MB-231-Zellen und MCF-7 Zellen als auch jeweils deren zellfreies, konditioniertes Medium die Migration von MSC um das 2,5- bis 5-fache steigerten (Dittmer, 2009).

Im Folgenden wurde der Einfluss von MSC auf die Struktur der MCF-7-Sphäroide und MDA-MB-231-Aggregate analysiert. Bei MCF-7-Sphäroiden war 5 Tage nach Zugabe von MSC eine Auflösung der 3D-Struktur zu beobachten (Abbildung 4-17 A). Dagegen fand sich bei MDA-MB-231-Aggregaten keine relevante Änderung der Morphologie nach Zugabe von MSC. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass MSC die Adhärenz der epitheloiden MCF-7 Zellen herabsetzen (Dittmer, 2009).

Dies bestätigte sich in Migrations-Assays, in denen bei Präsenz von MSC oder MSC-konditioniertem, zellfreiem Medium gegenüber den jeweiligen Kontrollen eine deutlich erhöhte Motilität der MCF-7-Zellen zu beobachten war. So fand sich für MCF-7-Zellen im Wundheilungs-Assay eine beschleunigte Schließung des Verletzungsareals (Abbildung 4-17 B). MDA-MB-231-

Zellen zeigten demgegenüber eine von der Präsenz von MSC unabhängige höhere Migrationsfähigkeit (Dittmer, 2009).

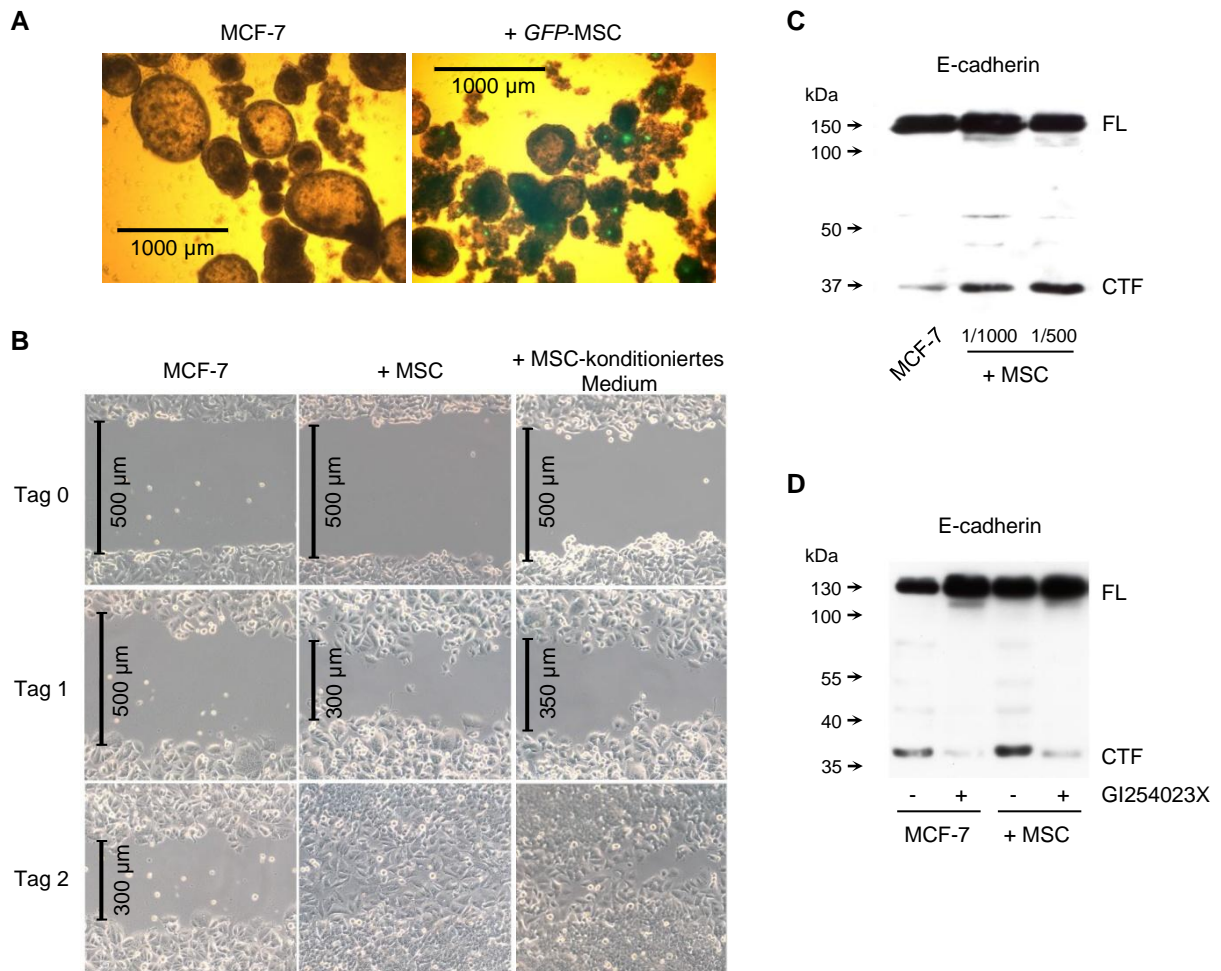


Abbildung 4-17: MSC führen bei MCF-7-Zellen zu einer veränderten Sphäroidarchitektur, erhöhen das Migrationspotential der Tumorzellen und induzieren in diesen die Spaltung von E-cadherin. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. In den Western Blot-Analysen wurde die Präsenz des Gesamtproteins (FL) und des C-terminalen Fragmentes (CTF) von E-cadherin bestimmt. Abbildung modifiziert aus (Dittmer, 2009). **A)** Mikroskopie von MCF-7-Sphäroiden 3 Tage nach Zugabe von GFP-MSC im Vergleich zu Kontrollsphäroiden; **B)** Wundheilungs-Assay bei MCF-7-Zellen allein (MCF-7), bei deren Kokultur mit MSC (+ MSC) und bei Kultivierung in zellfreiem, MSC-konditioniertem Medium; **C)** Western Blot für MCF-7-Sphäroide ohne Zusatz von MSC (MCF-7) oder in Gegenwart von MSC (+ MSC) in den angegebenen Verhältnissen (MSC/MCF-7) bzw. bei **D)** mit jeweiligem Zusatz des ADAM-10-Inhibitors GI254023X, Verhältnis MSC/MCF von 1/1000

Angesichts der bekannten differentiellen Expression des Adhäsion-vermittelnden E-cadherins in beiden Zelllinien wurde postuliert, dass die Präsenz von MSC in MCF-7-Zellen die Expression von E-cadherin herabsetzt. Die Analyse des 120 kD-großen Gesamtproteins und des 37 kD-großen C-terminalen Fragmentes ergab, dass die Präsenz von MSC zu einer Zunahme der Präsenz des C-terminalen Fragmentes führte, als Hinweis auf eine vermehrte Degradation von E-cadherin (Abbildung 4-17 C). Gleichzeitig fand sich bei Präsenz von MSC eine Zunahme von nukleärem E-cadherin in MCF-7-Sphäroiden (Dittmer, 2009).

Die Degradation von E-cadherin mit Entstehung des C-terminalen Fragmentes kann durch die Metalloproteinase ADAM10 vermittelt werden (Maretzky, 2005). Mittels Western Blot und RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass ADAM10 in MCF-7-Zellen exprimiert wird und für die Degradation von E-cadherin verantwortlich ist. Um die vermutete Beteiligung von ADAM10 am MSC-vermittelten Einfluss auf die MCF-7 Migration zu untersuchen, erfolgten Versuche mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X. Die Inhibition von ADAM10 resultierte sowohl in einer Abnahme des C-terminalen Fragmentes von E-cadherin trotz Gegenwart von MSC (Abbildung 4-17 D) als auch in einer völligen Aufhebung des MSC-vermittelten, promigratorischen Effektes von MSC auf MCF-7-Zellen (Dittmer, 2009).

Die Ergebnisse des Abschnittes 4.4 lassen darauf schließen, dass MSC einen generellen Einfluss auf die Aggregation und das Migrationsverhalten von Tumorzellen ausüben können. Dessen fördernder oder hemmender Effekt auf das Wachstum des Tumors scheint dabei abhängig von der Entität. Im Fall des CRC scheinen MSC das Tumorstadium zu fördern. Ausgehend von der Tumorintegration von MSC wurde untersucht, ob genetisch manipulierte MSC als Vehikel einer Therapie von CRC dienen können. Die Ergebnisse dieser präklinischen Untersuchungen sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.5 NUTZUNG TUMORINTEGRIERENDER MSC MIT LENTIVIRALER TRAIL-EXPRESSION FÜR DIE THERAPIE VON CRC

4.5.1 Wachstumsinhibition von CRC-Zellen durch TRAIL

Ausgehend von den erhobenen Daten und dem Stand der Forschung bestand die Hypothese, dass genetisch modifizierte MSC als Vehikel für eine Tumorthherapie nutzbar sind. Als potentiell therapeutisches Gen mit Anti-Tumoraktivität imponierte *TRAIL* aufgrund seiner proapoptischen Aktivität in Tumorzellen. Daher sollte zunächst die Anti-Tumoraktivität von *TRAIL* in einem CRC-Zelllinienmodell untersucht werden.

Hierfür erfolgte die Analyse des Einflusses von s*TRAIL* auf das Wachstum 9 verschiedener CRC-Zelllinien. Dabei wurde eine differentielle Sensitivität beobachtet; bei den Zelllinien Colo205, SW48, HCT116, HCT15 and DLD1 war eine deutliche Abnahme der Zellzahl nach s*TRAIL*-Behandlung zu beobachten (Abbildung 4-18 A), und diese Zelllinien wurden daher als *TRAIL*-sensitiv klassifiziert. Dagegen fand sich für die Zelllinien SW480, HCT8, HT29 and Colo320DM ein fortgesetztes Wachstum unter s*TRAIL*-Behandlung (Abbildung 4-18 A), und diese Zelllinien wurden daher als *TRAIL*-resistent klassifiziert. Diese Differenzierung bestätigte sich im SRB-Zytotoxizitätsassay (Abbildung 4-18 B). Hier fand sich für die IC₅₀-Konzentration zwischen der *TRAIL*-sensitiven Zelllinie DLD1 (45 ± 7 ng/ml) und den *TRAIL*-resistenten

Zelllinien HCT8 (687 ± 320 ng/ml) sowie HT29 (490 ± 215 ng/ml) jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,03$). Für MSC wurde eine vollständige Resistenz gegenüber sTRAIL beobachtet (Abbildung 4-18 B). Die Zytotoxizitätsanalyse zeigt damit zum einen, dass die gewählte Konzentration von 100 ng/ml eine geeignete Dosis darstellt, um zwischen TRAIL-sensitiven und -resistenten CRC-Zelllinien zu diskriminieren. Darüber hinaus demonstriert sie, dass MSC eine absolute Resistenz gegenüber sTRAIL besitzen und damit als Vehikel für eine ektope TRAIL-Expression geeignet sind (Mueller, 2011).

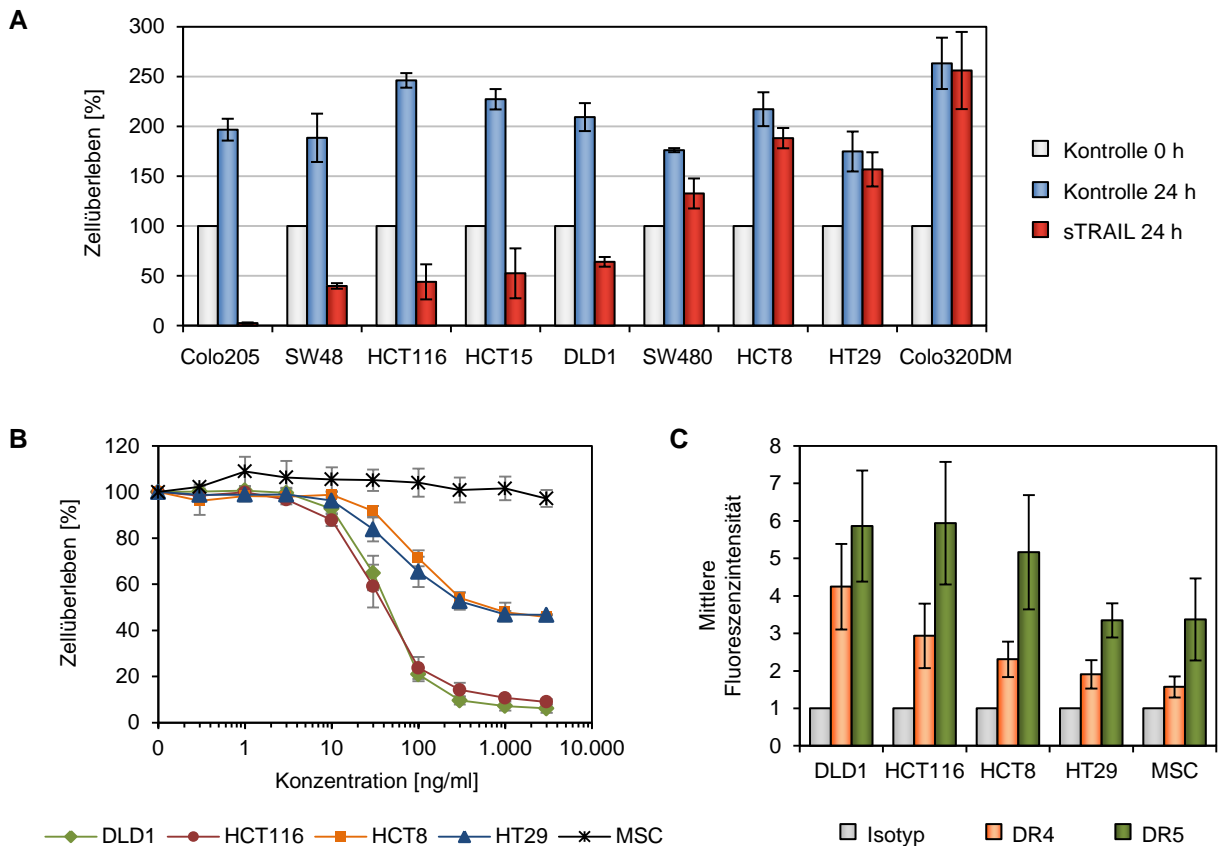


Abbildung 4-18: CRC-Zelllinien zeigen eine differentielle Sensitivität für sTRAIL ohne klare Assoziation zur Expression funktionell aktiver TRAIL-Rezeptoren. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2011). **A**) Wachstumskinetik verschiedener CRC-Zelllinien bei 24 h-Behandlung mit 100 ng/ml sTRAIL (sTRAIL 24 h) im Vergleich zur Ausgangszellzahl (Kontrolle 0 h) und zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle 24 h), Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten; **B**) SRB-Analyse für die 24 h-Behandlung mit sTRAIL für ausgewählte CRC-Zelllinien und MSC; **C**) Durchflusszytometrie für DR4 und DR5 bezogen auf den Isotyp in den ausgewählten CRC-Zelllinien und MSC, Mittelwerte aus 4 unabhängigen Analysen

Die proapoptische Signaltransduktion von TRAIL erfordert dessen Bindung an DR4 und DR5, während die Bindung an die inaktiven Rezeptoren DcR2 und DcR3 die Menge an aktivem TRAIL vermindert. Es wurde daher die Expression dieser Rezeptoren im untersuchten Panel von CRC-Zelllinien und in MSC analysiert, um eine differentielle Expression als mögliche Ursache der differentiellem TRAIL-Sensitivität zu identifizieren. Dabei ließ sich keine klare Assoziation zwischen der Expression von DR4 sowie DR5 und der TRAIL-Sensitivität

beobachten (Abbildung 4-18 C). Ebenfalls fand sich keine Assoziation der Expression der inaktiven Rezeptoren DcR2 sowie DcR3 mit der TRAIL-Sensitivität (Mueller, 2011).

Die Analyse belegt, dass TRAIL eine proapoptotische Aktivität in bestimmten CRC-Zellen besitzt, dass aber CRC-Zelllinien existieren, die eine, von der Expression von TRAIL-Rezeptoren unabhängige TRAIL-Resistenz aufweisen. Gleichzeitig lassen diese Daten vermuten, dass eine Expression von *TRAIL* ohne Induktion von Apoptose in MSC möglich ist. MSC mit ektopter *TRAIL*-Expression könnten daher als Vehikel für eine Tumorthherapie dienen.

4.5.2 Generierung und Charakterisierung *TRAIL*-transduzierter MSC

Zunächst wurden daher MSC mit lentiviraler Expression von TRAIL generiert. Hierzu wurde die gesamte *TRAIL*-cDNA in einen lentiviralen Expressionsvektor integriert (Abbildung 4-19 A). Damit konnte eine, über mehrere Passagen stabile Expression des 34 kDa großen TRAIL-Proteins in MSC erzielt werden (Abbildung 4-19 B). Die Immunzytochemie bestätigte, dass es sich dabei um membranständiges TRAIL handelt und 4 Passagen nach Transduktion eine Expression in 80 % der Zellen vorlag (Luetzkendorf, 2010).

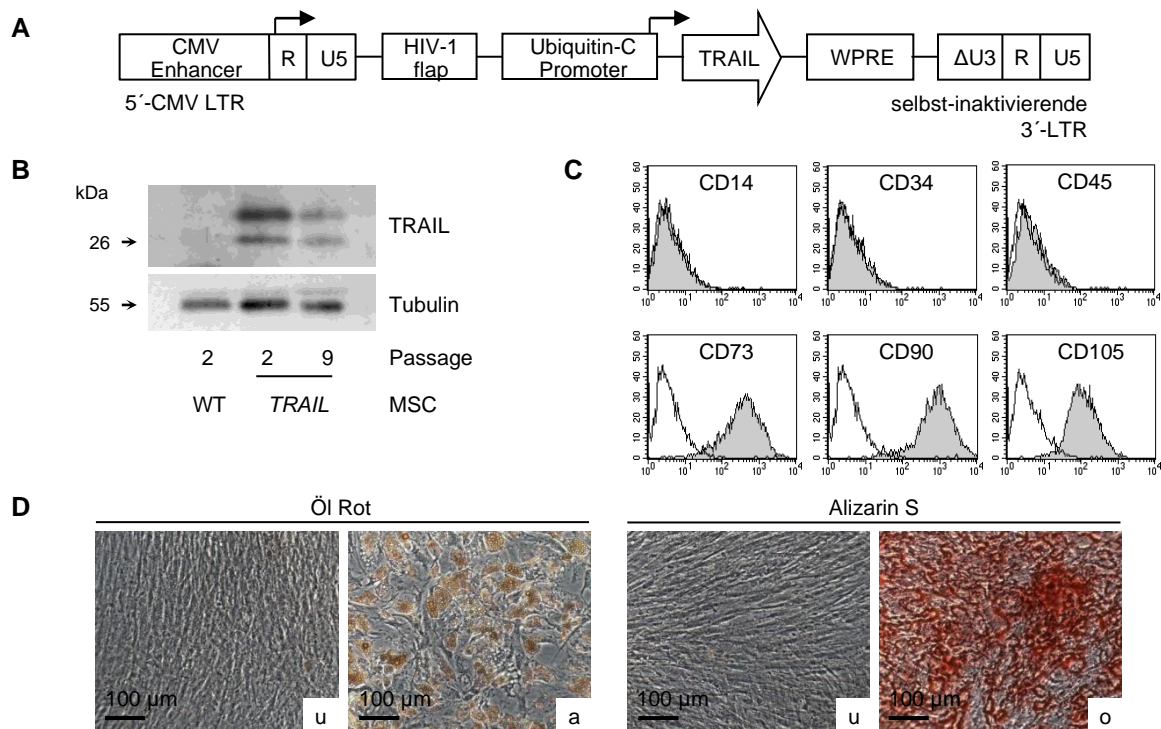


Abbildung 4-19: Nach Transduktion mit einem lentiviralen *TRAIL*-Konstrukt zeigen MSC eine stabile Expression von TRAIL ohne Verlust ihrer definierenden Charakteristika. Abgebildet ist unter B bis D jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010). **A)** verwendetes lentivirales *TRAIL*-Konstrukt; **B)** Western Blot für TRAIL in der Passage der Transduktion (Passage 2) und nach Kultivierung über ca. 6 Wochen (Passage 9); **C)** Durchflusszytometrie von *TRAIL*-MSC für ausgewählte, MSC-definierende Antigene; **D)** zytochemische Färbung von *TRAIL*-MSC nach osteogener (o) und adipogener (a) Differenzierung im Vergleich zu jeweils gefärbten undifferenzierten Zellen (u)

Anschließend wurde untersucht, inwiefern die ektope Expression von *TRAIL* die Charakteristika von MSC verändert. Die durchflusszytometrische Analyse von *TRAIL*-MSC ergab einen für MSC typischen, zu den nicht-transduzierten Kontrollen identischen Phänotyp mit CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺ und CD105⁺ (Abbildung 4-19 C) sowie CD11c⁻, CD13⁻, CD19⁻, CD29⁻, Glycophorin-A⁻, HLA-DR⁻, CD44⁺, CD166⁺ (Luetzkendorf, 2010). Unter Induktion einer adipogenen und osteogenen Differenzierung zeigten *TRAIL*-MSC die typischen, in der Zytochemie nachweisbaren morphologischen Zeichen der entsprechenden Differenzierung (Abbildung 4-19 D). Diese Daten belegen, dass die definierenden Charakteristika - die plastikadhärente Proliferation, der charakteristische Phänotyp und die multipotente Differenzierung - in *TRAIL*-MSC erhalten sind (Luetzkendorf, 2010).

Da eine lentivirale Transduktion von *TRAIL* in der aberranten Expression von Onkogenen resultieren kann, wurde als nächstes untersucht, inwiefern *TRAIL*-MSC Zeichen der malignen Transformation zeigen. Weder in der Wachstumskinetik und im Soft-Agar-Assay noch nach Injektion im Nacktmausmodell fand sich ein Hinweis für die maligne Transformation von *TRAIL*-MSC (Luetzkendorf, 2010). In Übereinstimmung mit der beobachteten absoluten Resistenz von MSC für sTRAIL fand sich kein Anhalt für eine Apoptoseinduktion in *TRAIL*-MSC durch lentiviral exprimiertes *TRAIL* (Luetzkendorf, 2010).

Diese Daten belegen, dass die ektope Expression von *TRAIL* mit dem gewählten lentiviralen Konstrukt die wesentlichen Charakteristika von MSC nicht verändert. Daraus leitet sich die Annahme ab, dass *TRAIL*-MSC geeignet sind, das Wachstum von CRC-Zellen im direkten Zell-Zell-Kontakt zu inhibieren. Ausgehend von den mit sTRAIL gewonnenen Daten sollte zunächst der Effekt von *TRAIL*-MSC auf TRAIL-sensitive DLD1 Zellen untersucht werden.

4.5.3 Einfluss von *TRAIL*-MSC auf das Wachstum TRAIL-sensitiver CRC-Zellen

Nach direkter Kokultur von *DsRed*-DLD1-Zellen mit *TRAIL*-MSC fanden sich flotierende, *DsRed*-positive Zellen (Abbildung 4-20 A). Bei paralleler Inkubation der Kokultur mit einem TRAIL-neutralisierenden Antikörper und bei Inkubation von *DsRed*-DLD1-Zellen mit zellfreiem Überstand von *TRAIL*-MSC war keine Entstehung flotierender Zellen zu beobachten. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass transmembranär in *TRAIL*-MSC exprimiertes TRAIL in DLD1-Zellen bei direktem Zell-Zell-Kontakt Apoptose induziert (Luetzkendorf, 2010).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine deutlich verstärkte Färbung für Annexin V-FITC in diesen flotierenden Zellen und belegte damit, dass *TRAIL*-MSC in den kokultivierten CRC-Zellen Apoptose induzieren (Luetzkendorf, 2010). Die Analyse der Proteinexpression bestätigte dies. In *TRAIL*-MSC enthaltenden Kokulturen fand sich gegenüber den Kontrollen sowohl eine Zunahme des 85 kD-Fragmentes von PARP als auch eine Spaltung von Caspase-8 und Caspase-3 (Abbildung 4-20 B). Am ausgeprägtesten waren diese Veränderungen in den

flotierenden Zellen. In diesen fand sich keine Expression von TRAIL als Hinweis, dass in *TRAIL*-MSC selbst keine Apoptoseinduktion erfolgte (Luetzkendorf, 2010).

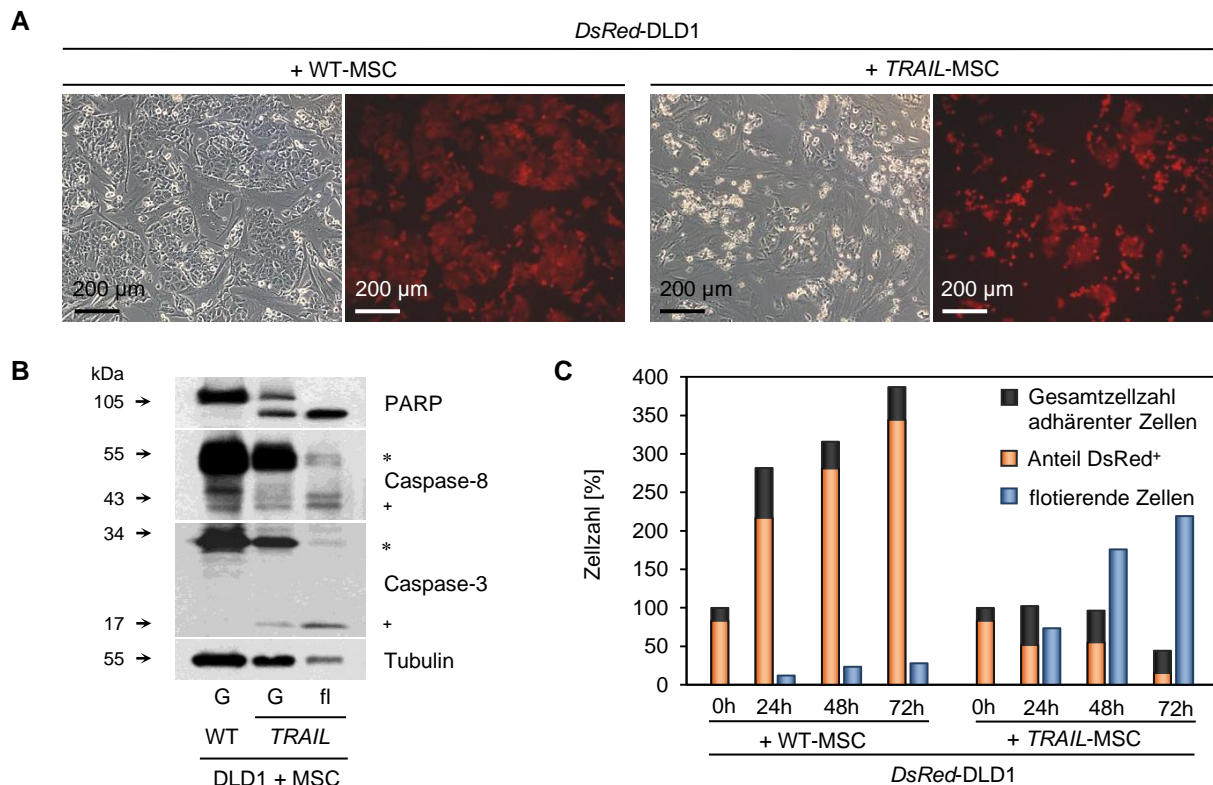


Abbildung 4-20: *TRAIL*-MSC induzieren in kokultivierten, *TRAIL*-sensitiven DLD1-Zellen Apoptose und inhibieren damit das Tumorzellwachstum. *DsRed*-DLD-1 Zellen wurden mit WT-MSC und *TRAIL*-MSC über 72 h kokultiviert und analysiert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010). **A**) Licht- und Fluoreszenzmikroskopie der Kokultur; **B**) Western Blot des Lysates der gesamten Kultur (G) oder der flotierenden Zellen (fl), * - Signal der jeweiligen Procaspase, + - Signal der aktiven Caspase-Fragmente; **C**) Wachstumskinetik mit Zählung adhärenter und flotierender Zellen sowie durchflusszytometrischer Bestimmung des Anteils *DsRed*-positiver Zellen

Nachfolgend wurde durch Zellzählung und durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils von *DsRed*-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation der Effekt der durch *TRAIL*-MSC induzierten Apoptose auf das Wachstum kokultivierter DLD1-Zellen bestimmt. Dabei fand sich nicht nur gegenüber den Kontroll-Kokulturen mit WT-MSC sondern auch gegenüber der initialen Zellzahl eine Reduktion der Zahl von *DsRed*-DLD1-Zellen nach 72 h Kokultur mit *TRAIL*-MSC (Abbildung 4-20 C). Die zusätzliche durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD105 belegte, dass weder Zellfusion noch Endozytose von *DsRed* durch MSC die Ergebnisse der Zellzählung beeinflussten (Luetzkendorf, 2010).

Diese Daten waren der Nachweis, dass die lentivirale Transduktion von *TRAIL* in MSC in einer Expression von funktionell aktivem TRAIL resultiert, und dass *TRAIL*-MSC in direktem Zell-Zell-Kontakt das Wachstum *TRAIL*-sensitiver CRC-Zellen durch Apoptoseinduktion inhibieren. Ableitend aus dem Resistenzverhalten von CRC-Zellen gegenüber sTRAIL bestand die

Vermutung, dass TRAIL-resistente CRC-Zellen auch eine Resistenz gegenüber *TRAIL*-MSC aufweisen.

4.5.4 Einfluss von *TRAIL*-MSC auf das Wachstum TRAIL-resistenter CRC-Zellen

Für die Untersuchung dieser Annahme erfolgte zunächst die Western Blot-Analyse der Kokultur von *TRAIL*-MSC mit den 9 verschiedenen CRC-Zelllinien. Dabei fand sich ein schwaches Signal des PARP-Fragmentes (85 kDa) in WT-MSC-enthaltenden Kokulturen. Dies wurde als Ausdruck einer schwachen, permanenten Apoptoseinduktion bei *In-vitro*-Kultur gewertet. Im Vergleich zur Kokultur mit WT-MSC fand sich bei Gegenwart von *TRAIL*-MSC eine Zunahme des PARP-Fragmentes unter Abnahme des 116 kDa Signals für das intakte Protein als Zeichen der Apoptoseinduktion nicht nur in den Linien mit bekannter TRAIL-Sensitivität (Colo205, SW48, HCT116, HCT15, DLD1) sondern auch in den zwei TRAIL-resistenten Zelllinien HCT8 und SW480 (Abbildung 4-21 A). Diese Zelllinien waren somit *TRAIL*-MSC-sensitiv. Dagegen fand sich für die Zelllinien HT29 und Colo320DM keine Zunahme der PARP-Spaltung bei Kokultur mit *TRAIL*-MSC (Abbildung 4-21 A). Diese beiden Zelllinien wurden daher als *TRAIL*-MSC-resistent klassifiziert (Mueller, 2011).

Die detaillierte Analyse für die Zelllinie HCT8 belegte, dass *TRAIL*-MSC in kokultivierten HCT8-Zellen Apoptose durch Aktivierung des extrinsischen Signalweges via Caspase-8 induzierten (Abbildung 4-21 B). Auffällig war, dass in der Fraktion flotierender Zellen dieser Kokultur ein schwaches Signal für TRAIL detektierbar war (Luetzkendorf, 2010). Dies wurde als Hinweis für einen Adhärenzverlust von *TRAIL*-MSC im Sinne eines Bystander-Effektes der Apoptoseinduktion gewertet. Aus dieser Beobachtung leitete sich die Vermutung ab, dass *TRAIL*-MSC auch das Wachstum der TRAIL-resistenten Zelllinie HCT8 durch Induktion von Apoptose inhibieren können (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011).

Diese Annahme wurde durch die Wachstumskinetik bestätigt. Bei Kokultur mit *TRAIL*-MSC wurde eine effektive Reduktion des Wachstums von *DsRed*-HCT8-Zellen und eine Entstehung flotierender Zellen beobachtet (Abbildung 4-21 C). Bei diesen flotierenden Zellen handelte es sich um apoptotische *DsRed*-HCT8-Zellen, denn diese waren positiv für DsRed und zeigten eine Färbung mit Annexin V-FITC. Wie für DLD1-Zellen bereits beobachtet, war die Apoptoseinduktion in HCT8-Zellen an den Zell-Zell-Kontakt mit *TRAIL*-MSC gebunden. Die Entstehung apoptotischer Zellen wurde durch die parallele Inkubation mit einem TRAIL-neutralisierenden Antikörper inhibiert und es fanden sich keine apoptotischen Zellen bei Inkubation mit zellfreiem *TRAIL*-MSC-konditioniertem Medium (Luetzkendorf, 2010).

Angesichts der Resistenz von HCT8-Zellen gegenüber sTRAIL bestand die Vermutung, dass die Sensitivität von HCT8-Zellen gegenüber *TRAIL*-MSC auf eine, von der TRAIL-Expression unabhängige, Sensitivierung durch zusätzliche, von MSC vermittelte Signale zurückzuführen war. Zur Untersuchung dieser These wurden Kokulturen von HCT8-Zellen und WT-MSC mit

sTRAIL behandelt. Dabei fand sich im Vergleich zur unbehandelten Kokultur und im Gegensatz zur Kokultur von HCT8-Zellen und *TRAIL*-MSC keine Reduktion des Wachstums von HCT8-Zellen (Abbildung 4-21 D). Native MSC waren demzufolge nicht in der Lage, *TRAIL*-resistente HCT8-Zellen für sTRAIL zu sensitivieren und die Apoptoseinduktion durch *TRAIL*-MSC in HCT8-Zellen war an die Expression von *TRAIL* in den interagierenden MSC gebunden (Mueller, 2011).

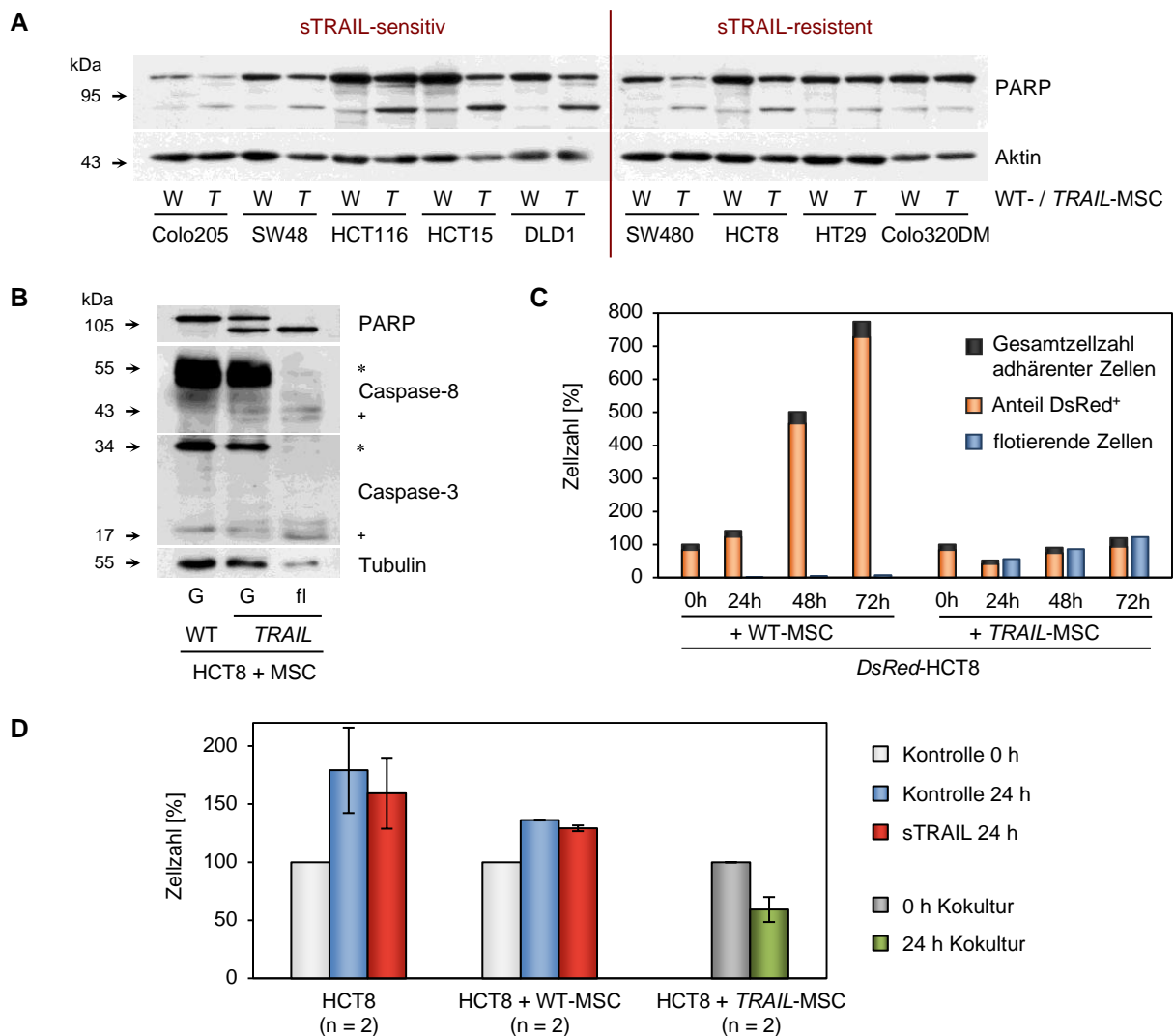


Abbildung 4-21: *TRAIL*-MSC inhibieren das Wachstum der *TRAIL*-resistenten CRC-Zelllinie HCT8 *in vitro* durch *TRAIL*-induzierte Apoptose. *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC wurden mit *DsRed*-HCT8-Zellen kokultiviert und wie angegeben analysiert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 2 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011). **A**) Western Blot, W – WT-MSC, T – *TRAIL*-MSC; **B**) Western Blot des Lysates der gesamten Kultur (G) oder der flotierenden Zellen (fl), * - Signal der jeweiligen Procaspase, + - Signal der aktiven Caspase-Fragmente; **C**) Wachstumskinetik mit Zählung adhärenter und flotierender Zellen sowie durchflusszytometrischer Bestimmung des Anteils *DsRed*-positiver Zellen; **D**) Wachstumskinetik von *DsRed*-HCT8-Zellen in alleiniger Kultur oder in Kokultur mit WT-MSC bei 24 h-Behandlung mit sTRAIL (sTRAIL 24 h), normierter Vergleich zur Ausgangszellzahl (Kontrolle 0 h) und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle 24 h), im weiteren Vergleich unbehandelte Kokultur von *DsRed*-HCT8 mit *TRAIL*-MSC

Aus diesen Daten war zu schlussfolgern, dass *TRAIL*-MSC in ausgewählten CRC-Zelllinien die *TRAIL*-Resistenz durch lentivirale Expression von membranständigem *TRAIL* überwinden

können. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass *TRAIL*-MSC-resistente CRC-Zelllinien, wie z. B. die Zelllinie HT29 existieren. Für *TRAIL*-resistente Tumorzellen war bekannt, dass eine zusätzliche subapoptotische Schädigung z. B. durch Chemotherapeutika eine Sensitivierung für *TRAIL*-induzierte Apoptose vermitteln kann. Es sollte daher untersucht werden, ob eine derartige Sensitivierung auch für eine *TRAIL*-MSC-induzierte Apoptose in *TRAIL*-MSC-resistenten CRC-Zellen möglich ist.

4.5.5 Sensitivierung von *TRAIL*-MSC-resistenten CRC-Zellen

Es wurde daher untersucht, inwiefern subapoptotische Dosen von 5-FU und Oxaliplatin HT29-Zellen für die *TRAIL*-MSC-vermittelte Apoptoseinduktion sensitivieren können. Die für beide Zytostatika gewählte Konzentrationen von 3 μ M lag jeweils deutlich unter der IC90-Konzentration der jeweiligen Zellen sowohl für 5-FU (MSC: 765 \pm 150 μ M, HT29: 65 \pm 18 μ M) als auch für Oxaliplatin (MSC: 94.5 \pm 10.2 μ M; HT29: 15.3 \pm 4.6 μ M) (Mueller, 2011).

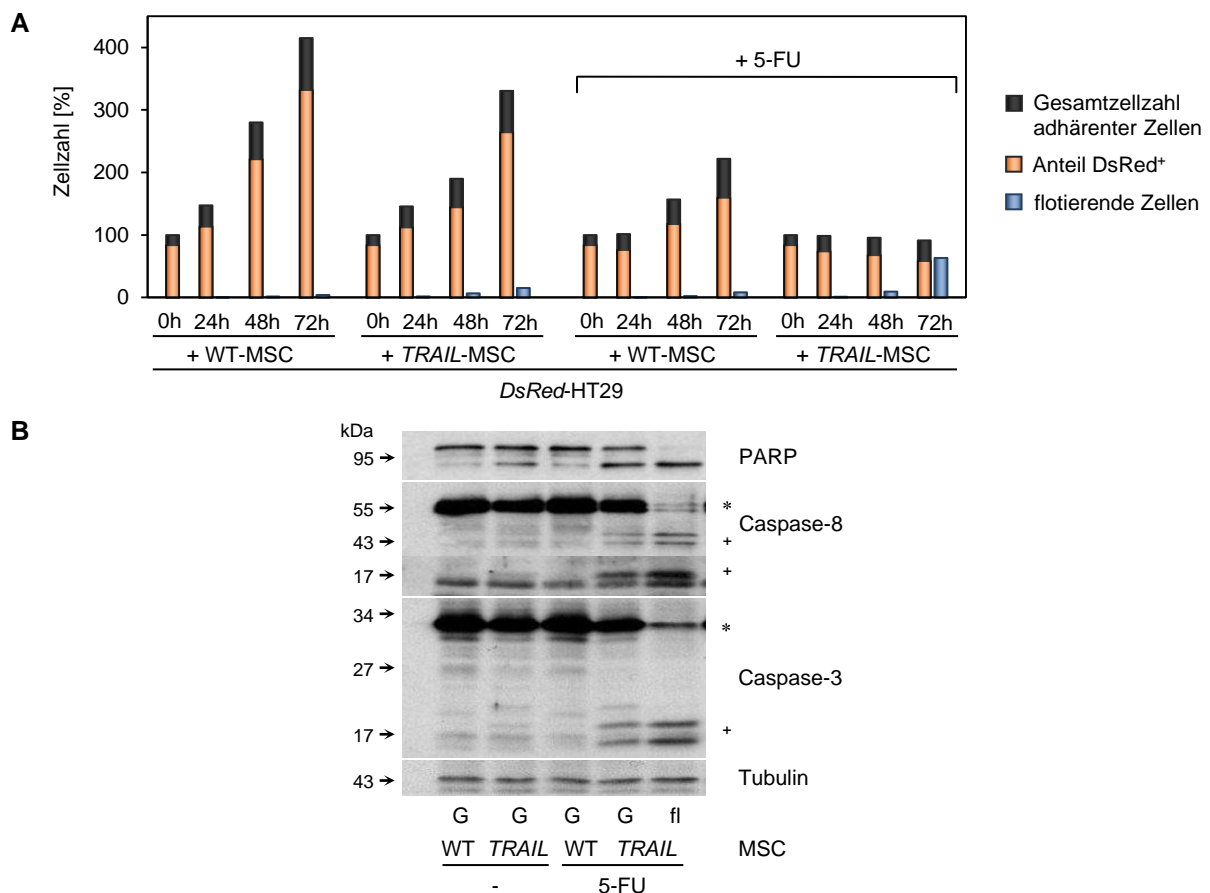


Abbildung 4-22: Die parallele Exposition mit 5-FU in subapoptotischer Dosis und mit *TRAIL*-MSC induziert Apoptose in *TRAIL*-MSC-resistenten HT29-Zellen und inhibiert deren Wachstum. *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC wurden mit *DsRed*-HT29-Zellen kokultiviert, parallel mit 3 μ M 5-FU behandelt und analysiert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2011). **A)** Wachstumskinetik mit Zählung adhärenter und flotierender Zellen sowie durchflusszytometrischer Bestimmung des Anteils DsRed-positiver Zellen; **B)** Western Blot des Lysates der gesamten Kultur (G) und der flotierenden Zellen (fl), * - Signal der jeweiligen Procaspase, + - Signal der aktiven Caspase-Fragmente

Die Wachstumskinetiken belegten, dass die Behandlung der Kokultur von *DsRed*-HT29-Zellen und *TRAIL*-MSC mit 5-FU (Abbildung 4-22 A) oder Oxaliplatin (Daten nicht gezeigt) in einer Entstehung von flotierenden Zellen mit Reduktion des Tumorzellwachstums resultierte. Dagegen fand sich für die 5-FU- (Abbildung 4-22 A) oder Oxaliplatin-behandelte (Daten nicht gezeigt) Kokultur mit WT-MSC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lediglich ein verzögertes Wachstum ohne Entstehung flotierender Zellen.

Dies ließ darauf schließen, dass die parallele Schädigung durch 5-FU oder Oxaliplatin in einer Sensitivierung von HT29-Zellen für *TRAIL*-MSC-induzierte Apoptose resultiert. In Übereinstimmung hiermit fand sich ausschließlich in der 5-FU-behandelten Kokultur von *DsRed*-HT29-Zellen mit *TRAIL*-MSC eine Aktivierung der relevanten proapoptotischen Signalwege (Abbildung 4-22 B) (Mueller, 2011).

Diese Daten belegen, dass *TRAIL*-MSC in der Lage sind, das Wachstum sowohl von *TRAIL*-sensitiven als auch von ausgewählten *TRAIL*-resistenten CRC-Zelllinien *in vitro* zu inhibieren. Darüber hinaus führt eine parallele subapoptotische Schädigung in *TRAIL*-MSC-resistenten CRC-Zellen zu deren Sensitivierung für *TRAIL*-MSC. Dies war die Basis für die Hypothese, dass *TRAIL*-MSC das Wachstum humaner CRC *in vivo* inhibieren können. Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern *TRAIL*-MSC im Modell des subkutanen Mischxenograftes das Wachstum von *TRAIL*-MSC-sensitiven CRC-Zellen inhibieren.

4.5.6 Effekt von *TRAIL*-MSC auf das Xenograftwachstum *TRAIL*-MSC-sensitiver CRC

Für diese Untersuchungen wurden die *TRAIL*-sensitive CRC-Zelllinie DLD1 und die *TRAIL*-resistente CRC-Zelllinie HCT8 verwendet, die beide zuvor als *TRAIL*-MSC-sensitiv (s. 4.4.3 und 4.4.4) charakterisiert wurden. *DsRed*-DLD1- oder *DsRed*-HCT8-Zellen wurden als Mischsuspension mit einem Anteil von 20 % *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC oder als nicht-gemischte Zellsuspension s. c. injiziert. Das Tumorstadium wurde mittels *In-vivo*-Imaging, Messung mit Schublehre und Wägung des Tumors nach Exzision im Vergleich zu Kontrollxenograften bestimmt.

Bei Präsenz von *TRAIL*-MSC fand sich eine, z. T. signifikante Inhibition des mittels *In-vivo*-Imaging bestimmten Wachstums sowohl von DLD1-Xenograften als auch von HCT8-Xenograften jeweils im Vergleich zu nicht-gemischten Xenograften (Luetzkendorf, 2010) und WT-MSC-enthaltenden Xenograften (Abbildung 4-23 A). Dies resultierte bei Versuchsende in einem signifikant reduziertem Tumorgewicht von *TRAIL*-MSC-enthaltenden Xenograften im Vergleich zu WT-MSC-Mischxenograften (Abbildung 4-23 B) und im Vergleich zu nicht-gemischten Xenograften (Luetzkendorf, 2010).

Anschließend sollte mittels Immunhistochemie der Nachweis erbracht werden, dass auch *in vivo* die Induktion von Apoptose an der Inhibition des Tumorstadiums beteiligt ist. Da bei einem Anteil von 20 % *TRAIL*-MSC kein für eine histologische Untersuchung ausreichendes

Xenograftwachstum zu beobachten war (Luetzkendorf, 2010), wurde ein Anteil von 3 % *TRAIL*-MSC verwendet. Nach Erreichen einer relevanten Tumorgroße fand sich fragmentiertes PARP in der Nähe von Stromaelementen (Abbildung 4-23 C) als Hinweis für die *TRAIL*-MSC-vermittelte Induktion von Apoptose (Luetzkendorf, 2010).

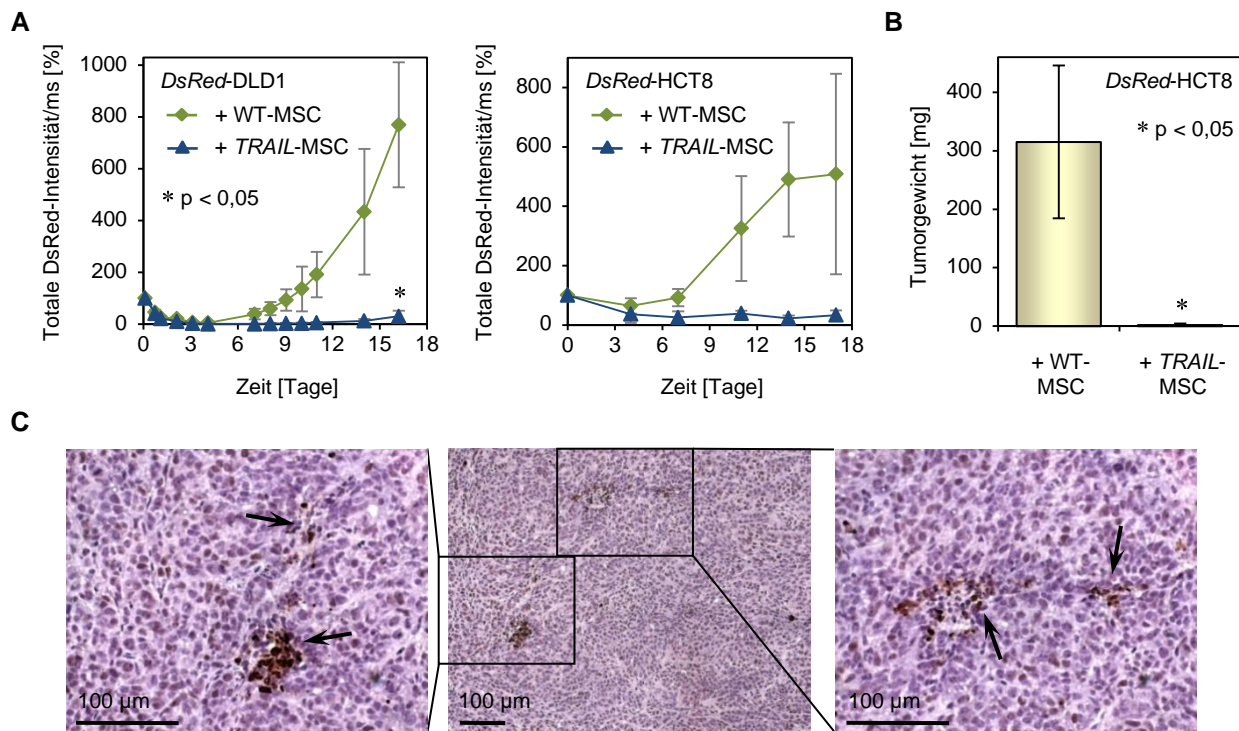


Abbildung 4-23: Tumorintegrierte *TRAIL*-MSC inhibieren das Wachstum *TRAIL*-sensitiver und ausgewählter *TRAIL*-resistenter CRC-Zellen im subkutanen Mischxenograftmodell und induzieren Apoptose in benachbarten CRC-Zellen *in vivo*. *DsRed*-DLD1- bzw. *DsRed*-HCT8-Zellen wurden im Verhältnis von 4 : 1 (A und B) bzw. 32,3 : 1 (C) mit *TRAIL*-MSC gemischt und s. c. injiziert. Mischxenografte mit WT-MSC dienen als Kontrolle. Abgebildet sind die Mittelwerte bzw. ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011). **A**) Ergebnisse des *In-vivo*-Imaging der Mischxenografte der jeweiligen Zelllinien; **B**) statistischer Vergleich der Gewichte der an Tag 25 exzidierten Mischxenografte; **C**) Immunhistochemie für PARP in Schnitten eines an Tag 9 exzidierten subkutanen DLD1 / *TRAIL*-MSC-Mischxenograftes

Aus diesen Daten war zu schließen, dass MSC nach lentiviraler Transduktion *TRAIL* auch *in vivo* in funktionell aktiver Form exprimieren, und dass *TRAIL*-MSC das Wachstum von *TRAIL*-MSC-sensitiven CRC-Zellen *in vivo* inhibieren. Nachdem die *In-vitro*-Analysen gezeigt hatten, dass *TRAIL*-MSC-resistente HT29-Zellen für eine *TRAIL*-MSC-vermittelte Apoptose durch parallele subapoptotische genotoxische Schädigung sensitiviert werden können, sollte untersucht werden, inwiefern dies *in vivo* reproduzierbar ist.

4.5.7 Effekt von *TRAIL*-MSC auf das Xenograftwachstum *TRAIL*-MSC-resistenter CRC

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde Nacktmäusen mit etabliertem subkutanem *TRAIL*-MSC / *DsRed*-HT29-Mischxenograft 5-FU systemisch in klinisch relevanter Dosis mehrfach appliziert.

Es fand sich ein durch 5-FU verzögertes Wachstum von nicht-gemischten HT29-Xenograften gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 4-24). Diese Beobachtung bestätigte, dass die verwendete 5-FU-Dosis eine Wachstums-retardierende Dosis darstellte. Entgegen der Annahme fand sich jedoch keine Inhibition des Wachstums durch Behandlung mit 5-FU bei *TRAIL*-MSC-enthaltenden Mischxenograften. Vielmehr zeigten die Daten, dass die Präsenz von *TRAIL*-MSC die durch 5-FU vermittelte Wachstumsverzögerung kompensiert. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob 5-FU zu frühen (Tag 0 bis 4; Abbildung 4-24) oder späteren (Tag 7 bis 9 und 14 bis 16, Daten nicht gezeigt) Zeitpunkten nach Generierung des Xenograftes appliziert wurde (Mueller, 2011).

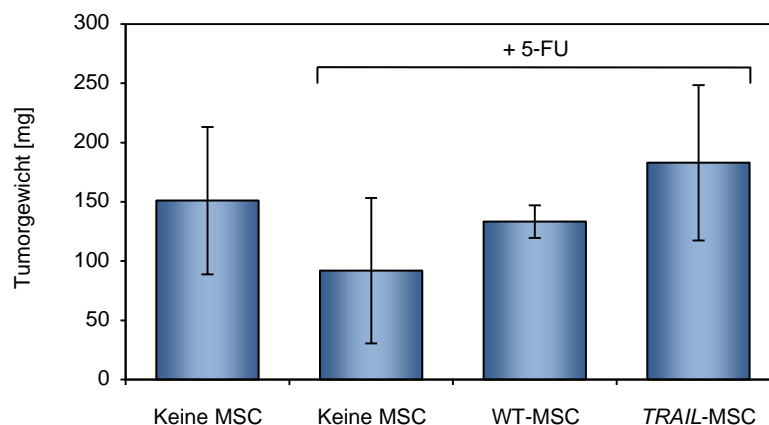


Abbildung 4-24: Die Kombination tumorintegrierter *TRAIL*-MSC und niedrig dosierter, systemischer 5-FU-Behandlung führt zu keiner Inhibition des Xenograftwachstums *TRAIL*-MSC-resistenter HT29-Zellen. Es wurden subkutane *DsRed*-HT29 / *TRAIL*-MSC-Mischxenografte (*TRAIL*-MSC) an Tag 0 generiert. An Tag 0 bis 4 wurde täglich 5-FU mit einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht des Tieres i. p. appliziert. Als Kontrollen dienten nicht-gemischte *DsRed*-HT29-Xenografte (keine MSC) bzw. *DsRed*-HT29 / WT-MSC-Mischxenografte (WT-MSC) von mit 5-FU behandelten Tieren sowie nicht-gemischte HT29-Xenografte von mit 0,9 % NaCl i. p. behandelten Tieren. Abgebildet sind die Mittelwerte der Tumorgewichte an Tag 25 von mindestens 3 Tumoren pro Bedingung. Abbildung modifiziert aus (Mueller, 2011).

Diese Daten zeigen, dass die *in vitro* beobachtete Sensitivierung von HT29-Zellen für die proapoptische Wirkung von *TRAIL*-MSC *in vivo* nicht reproduzierbar ist. Die Identifizierung möglicher Ursachen dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist Gegenstand aktueller Untersuchungen der AG des Autors.

Ausgehend von der beobachteten Integration von MSC in CRC-Xenograften (s. 4.3.1) und den Ergebnissen der Untersuchungen im Mischxenograftmodell (s. 4.4.6) sollte abschließend untersucht werden, ob *TRAIL*-MSC auch nach systemischer Applikation eine Inhibition des Wachstums subkutaner Xenograften *TRAIL*-MSC-sensitiver CRC-Zellen vermitteln.

4.5.8 Effekt systemisch applizierter *TRAIL*-MSC auf das CRC-Xenograftwachstum

Hierfür wurden *TRAIL*- bzw. WT-MSC systemisch bei Nacktmäusen mit etablierten *GFP*-DLD1-Xenograften appliziert und das Tumorstadium mittels *In-vivo*-Imaging analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne MSC-Injektion fand sich nach Applikation von WT-MSC und von *TRAIL*-

MSC ein unverändertes Tumorwachstum (Abbildung 4-25 A). Nach Applikation von WT- oder *TRAIL*-MSC waren sowohl im lebenden Tier als auch nach Tötung des Tieres keine Zeichen einer Toxizität zu beobachten (Luetzkendorf, 2010).

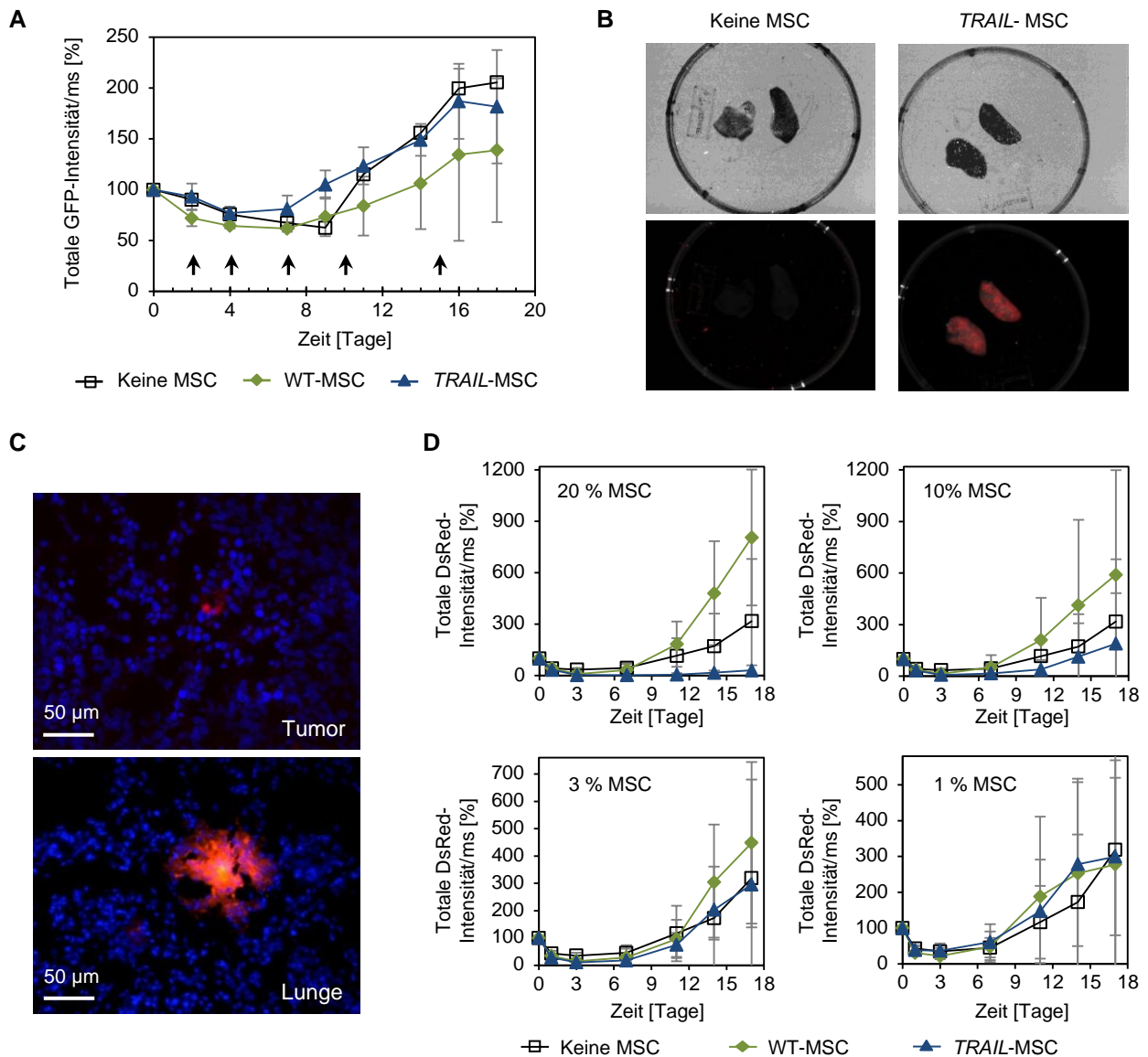


Abbildung 4-25: Der fehlende Effekt systemisch applizierter *TRAIL*-MSC auf das Wachstum subkutaner Xenograften *TRAIL*-sensitiver DLD1-Zellen ist auf die geringe Anreicherung der Zellen im Tumorgewebe infolge eines pulmonalen Tropismus zurückzuführen. Abgebildet sind die Mittelwerte bzw. ein repräsentatives Beispiel von jeweils mindestens 3 Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Luetzkendorf, 2010). **A**) *In-vivo*-Imaging des Wachstums von *GFP*-DLD1-Xenograften bei wiederholter (Pfeile) i. v. Applikation von *TRAIL*-MSC oder WT-MSC, *GFP*-DLD1-Xenograften in Tieren ohne MSC-Applikation als Kontrolle; **B**) Fluoreszenz-Imaging der gesamten Lungen nach i. v. Applikation von Dil-markierten MSC, Lungen von Tieren ohne MSC-Applikation als Kontrolle; **C**) Fluoreszenz-Mikroskopie von Lungen- und Xenograftgewebe nach i. v. Applikation von Dil-markierten MSC; **D**) *In-vivo*-Imaging des Wachstums von *DsRed*-DLD1-Mischxenograften mit einem Anteil von 20 %, 10 %, 3 % oder 1 % *TRAIL*-MSC bzw. WT-MSC, nicht-gemischte *DsRed*-DLD1-Xenograften als Kontrolle

Als Ursache dieses fehlenden Effektes wurde eine unzureichende Integration von *TRAIL*-MSC im Tumorgewebe vermutet. Nach systemischer Applikation Dil-markierter *TRAIL*- bzw. WT-MSC bei Nacktmäusen mit etablierten subkutanen DLD1-Xenograften fand sich in der *Ex-vivo*-

Fluoreszenz-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie der exzidierten Organe und Tumoren eine deutliche Anreicherung Dil-positiver Zellen im Lungengewebe gegenüber einem geringen Anteil von nur ca. 0,1 % Dil-positiven Zellen in den Xenograften (Abbildung 4-25 B und C).

Diese Beobachtung warf die Frage auf, wie hoch der Anteil von *TRAIL*-MSC im Tumorgewebe sein muss, um einen wachstumsinhibierenden Effekt ausüben zu können. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Wachstum subkutaner *DsRed*-DLD1 / *TRAIL*-MSC-Mischxenografte mit unterschiedlichen Anteilen von *TRAIL*-MSC mittels *In-vivo*-Imaging analysiert. Im Vergleich zu nicht-gemischten *DsRed*-DLD1-Xenograften fand sich bei einem Anteil von 20 % ($p = 0,21$) und 10 % ($p = 0,6$) *TRAIL*-MSC eine Reduktion des Tumorwachstums, die aufgrund der hohen Varianz der Werte keine statistische Signifikanz erreichte. Dagegen waren bei einem Anteil von 1 % und 3 % *TRAIL*-MSC keine Abnahme des Tumorwachstums zu beobachten (Abbildung 4-25 D).

Der Vergleich des Wachstums von *DsRed*-DLD1 / WT-MSC-Mischxenograften mit nicht-gemischten DLD1-Xenograften demonstrierte erneut die fördernde Wirkung von MSC auf das Wachstum von DLD1-Tumoren (Abbildung 4-25 D).

Diese Daten belegen einerseits, dass MSC nach i. v. Applikation einem pulmonalen Tropismus unterliegen. Andererseits zeigen sie, dass *TRAIL*-MSC im Tumorgewebe eine substantielle Anreicherung erfahren müssen, um eine effektive Inhibition des Tumorwachstums zu induzieren.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Abschnittes 4.5, dass lentiviral *TRAIL*-transduzierte MSC durch Apoptoseinduktion bei direktem Zell-Zell-Kontakt das Wachstum sowohl von *TRAIL*-sensitiven als auch von ausgewählten *TRAIL*-resistenten CRC-Zellen inhibieren können. Die Daten demonstrieren jedoch auch, dass die Effektivität dieser Wachstumsinhibition *in vivo* durch eine Resistenz ausgewählter CRC-Zellen gegenüber *TRAIL*-MSC und durch einen pulmonalen Tropismus von *TRAIL*-MSC vermindert wird.

5 DISKUSSION

5.1 WESENTLICHE ERGEBNISSE DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit präsentiert zum Großteil veröffentlichte Daten zu verschiedenen Aspekten der Biologie und potentiellen therapeutischen Nutzung von MSC.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass MSC sich aus dem Knochenmark von Patienten mit malignen Erkrankungen nach Chemotherapie isolieren lassen und sich in ihren charakterisierenden Eigenschaften inklusive ihres immunmodulatorischen Potentials nicht von MSC gesunder Spender unterscheiden (Mueller, 2006).

Ausgehend hiervon konnte gezeigt werden, dass MSC eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkmechanismen aufweisen. Als Mechanismen der Resistenz von MSC gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wurde erstmals eine erhöhte apoptotische Schwelle mit reduzierter Caspase-9 Aktivierung (Mueller, 2006) sowie ein bei subapoptotischer Schädigung induzierter, temporärer Zellzyklusarrest identifiziert (unveröffentlichte Daten). Es konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Resistenz von MSC mit dem Erhalt ihres Stammzellcharakters nach Schädigung einhergeht (Mueller, 2006).

Es wurde demonstriert, dass MSC *in vitro* nicht regelhaft einer malignen Transformation unterliegen. Bezugnehmend auf die als Ursache eines malignen Transformationspotentials von MSC postulierten Analogien von MSC und ESC konnte nachgewiesen werden, dass MSC ein für den Stammzellcharakter typisches Methylierungsmuster aufweisen (Dansranjavin, 2009) und zur Differenzierung in Zelltypen nicht-mesodermaler Herkunft im Sinne einer Plastizität in der Lage sind (Aurich, 2007). Jedoch wurde gezeigt, dass sich MSC in ihrer Genexpression deutlich von pluripotenten Zellen unterscheiden (Mueller, 2009).

Angesichts der Präsenz von MSC bei an Malignomen erkrankten Patienten und der von anderen Autoren berichteten Integration von MSC in maligne Tumoren wurde postuliert, dass MSC im humanen Organismus in Tumoren und deren Metastasen integrieren und deren malignes Wachstum beeinflussen. Dabei konnte gezeigt werden, dass MSC das Wachstum von CRC fördern (Luetzkendorf, 2010). Als möglicher Mechanismus wurde ein Einfluss von MSC auf die Ausbildung der dreidimensionalen Tumorstruktur sowohl im CRC-Modell (unveröffentlichte Daten) als auch in anderen Modellen (Dittmer, 2009) ermittelt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen - der Möglichkeit zur Gewinnung autologer MSC bei Patienten mit malignen Erkrankungen, der Resistenz von MSC gegenüber Schädigung und der Integration von MSC in maligne Tumoren - wurde das Potential von MSC untersucht, nach genetischer Modifikation als Vehikel einer Tumorthherapie zu dienen. Es konnte gezeigt werden, dass lentiviral *TRAIL*-exprimierende MSC das Wachstum ausgewählter CRC-Zelllinien *in vitro*

und *in vivo* inhibieren (Luetzkendorf, 2010). Es wurde erstmals demonstriert, dass *TRAIL*-MSC auch das Wachstum ausgewählter *TRAIL*-resistenter CRC-Zelllinien unabhängig von der Expression von *TRAIL*-Rezeptoren inhibieren (Mueller, 2011). Allerdings zeigen die Daten auch, dass die Wirksamkeit von *TRAIL*-MSC durch die Existenz von *TRAIL*-MSC-resistenten CRC-Zellen und durch einen pulmonalen Tropismus systemisch applizierter *TRAIL*-MSC eingeschränkt wird.

Wie in den betreffenden Publikationen dargestellt und diskutiert, hat ein Teil dieser Ergebnisse Relevanz sowohl für das allgemeine Verständnis der Biologie von MSC als auch für die Einschätzung des therapeutischen Potentials von MSC im Bereich der regenerativen Medizin. Für die kritische Beurteilung dieser Aspekte muss hier auf die betreffenden Publikationen verwiesen werden.

Ziel der nachfolgenden Diskussion ist es, die dargestellten Erkenntnisse in den Kontext des aktuellen Wissensstandes einzuordnen und dabei insbesondere die Relevanz der Charakteristika von MSC für ihre putative Rolle bei der Entstehung und beim Wachstum maligner Tumoren sowie für ihr Potential zur Therapie maligner Tumoren zu werten.

5.2 MSC ALS URSPRUNG MALIGNER TUMOREN

Schlüssig belegt ist die Entstehung maligner Erkrankungen aus Zellen mit Stammzellcharakter bislang nur für wenige Entitäten, so z. B. Keimzelltumoren (Sell, 2006) und Leukämien (Dick, 2008). Aufgrund ihres Stammzellcharakters wird aber auch für MSC vermutet, dass sie gegenüber differenzierten Zellen bevorzugt einer malignen Transformation unterliegen.

5.2.1 Die bisherigen Erkenntnisse schließen die maligne Transformation von MSC nicht aus

In mehreren Arbeiten wurde eine maligne Transformation nativer MSC nach prolongierter *In-vitro*-Kultivierung postuliert (Rosland, 2009; Rubio, 2005). Nachträgliche Arbeiten belegen jedoch, dass diesen Beobachtungen eine Kontamination mit Tumorzellen, die zeitgleich in den jeweiligen Laboren verwendet wurden, zugrunde lag (Garcia, 2010; Torsvik, 2010).

Daneben existieren weitere Arbeiten, die eine maligne Transformation von MSC beschreiben oder vermuten lassen. So wurde die Präsenz maligne transformierter Zellen unklarer Herkunft in der MSC-Kultur eines Spenders beschrieben (Wang, 2005) und nach allogener Knochenmarktransplantation die Entstehung von aus Donorzellen abstammenden Sarkomen demonstriert (Berger, 2008). Ob sich die jeweiligen Zellen aber aus MSC ableiten, bleibt unklar. Im murinen Modell wurde gezeigt, dass MSC mit *APC*-Mutation Desmoide ausbilden (Wu, 2010), Sarkome sich aus nativen MSC ableiten lassen (Mohseny, 2009) und dass für

Helicobacter-assoziierte Magenkarzinome eine Entstehung aus MSC wahrscheinlich ist (Houghton, 2004). Für humane MSC konnte dies bislang jeweils nicht nachgewiesen werden. Humane MSC mit ektopter Telomerase-Expression zeigen einen typischen malignen Phänotyp (Serakinci, 2004) und juvenile humane MSC mit ektopter Expression des *EWS-FLI-1* Fusionsgens bilden typische Charakteristika von Ewing-Sarkomen aus (Riggi, 2010). Da es sich hierbei um genetisch modifizierte Zellen handelt, erlauben diese Daten die Schlussfolgerung, dass MSC einen malignen Phänotyp ausprägen, wenn sie Onkogene exprimieren. Ob aber Onkogene in MSC des humanen Organismus unter physiologischen Bedingungen aktiviert werden, ist fraglich.

Dem stehen Berichte gegenüber, wonach humane MSC auch nach prolongierter *In-vitro*-Kultivierung keine Zeichen der malignen Transformation zeigen (Bernardo, 2007; Meza-Zepeda, 2008) und sich in anderen Modellen eine Abstammung von Malignomen aus Zellen des Knochenmark nicht reproduzieren lässt (Ando, 2009). Bei Kultivierung von MSC unter GMP-Bedingungen wurde zwar die Entstehung einer Aneuploidie, jedoch keine maligne Transformation beobachtet (Tarte, 2010).

Aufgrund der Widersprüchlichkeit dieser Beobachtungen bleibt das Potential einer malignen Transformation von MSC ungeklärt und kann nicht definitiv ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen jedoch aus Sicht des Autors die Annahme, dass die maligne Transformation von MSC im humanen Organismus keinen regelhaften Prozess darstellt.

5.2.2 Eine Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung und die Fähigkeit zum Zellzyklusarrest schützen MSC vor maligner Transformation

Angeführte Argumente für das Potential von MSC zur malignen Transformation sind deren lebenslange Persistenz im humanen Organismus mit dem damit verbundenen erhöhten Risiko genetischer Aberrationen sowie die für MSC postulierte Analogie zu inhärent tumorigenen ESC mit Expression typischer embryonaler Gene und der Fähigkeit zur Pluripotenz. Die vorliegende Arbeit liefert zu diesen Fragestellungen relevante Ergebnisse.

Die vom Autor nachgewiesene Präsenz von MSC im Knochenmark von Spendern höheren Alters und von Patienten nach vorangegangener Chemotherapie (Mueller, 2006) wird bestätigt durch andere Arbeiten, die zeigen, dass sich MSC unabhängig vom Alter (Lund, 2010) und von vorangegangener Chemotherapie (Li, 2004) isolieren lassen. Die von anderen Autoren beschriebene Veränderung der Charakteristika von MSC bei Patienten nach vorangegangener Chemotherapie (Cao, 2008; Prata Kde, 2010) oder mit malignen Erkrankungen (Todoerti, 2010) widersprechen diesen Beobachtungen nicht. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden

Unterschiede in der CFU-F-Frequenz bei Patienten nach vorangegangener Chemotherapie und bei gesunden Spendern beobachtet, die aber keine statistische Signifikanz erreichten. Die Konsensusvorgaben beschreiben ausgewählte, zum Teil nicht quantifizierbare Kriterien für die Charakterisierung von MSC (Dominici, 2006). Es ist aus Sicht des Autors davon auszugehen, dass sowohl erfolgte Chemotherapie und Alter des Spenders als auch andere Faktoren Einfluss auf MSC nehmen. Die resultierenden Veränderungen werden jedoch mit den Konsensuskriterien aufgrund der limitierten Sensitivität der gemäß Konsensus verwendeten Methodik sowie aufgrund der geringen Größe und fehlenden Homogenität der untersuchten Spendergruppen nicht erfasst.

Aus Sicht des Autors ist aber gesichert, dass Zellen mit den definierten Charakteristika von MSC sowohl im fortgeschrittenen Alter als auch nach erfolgter Chemotherapie im Knochenmark präsent sind und sich hinsichtlich ihrer grundlegenden Eigenschaften nicht von MSC junger und gesunder Spender unterscheiden. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation vom Empfänger abstammende MSC isoliert werden konnten (Koc, 1999). Hieraus leitet sich die Vermutung ab, dass MSC über eine Resistenz gegenüber genotoxischen Schädigungen verfügen, die zugleich das Risiko einer malignen Transformation von MSC beeinflusst.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten eine solche Resistenz für ausgewählte Zytostatika belegen. Mit der für Cisplatin demonstrierten erhöhten Apoptoseschwelle und fehlenden Caspase-9-Aktivierung sowie dem Schädigung-vermitteltem Zellzyklusarrest konnten erstmals Resistenzmechanismen in MSC beschrieben werden. Andere Autoren konnten nachweisen, dass in MSC Nucleotide Excision Repair als ein Mechanismus der DNA-Reparatur aktiv ist (Alves, 2010). Diese Mechanismen sind potentiell relevant für die Resistenz gegenüber physiologischer DNA-Schädigung und könnten damit zu dem beobachteten niedrigen Risiko einer malignen Transformation von MSC beitragen.

Unterstützt wird die Annahme eines geringen Potentials zur malignen Transformation von MSC durch Erkenntnisse zur Biologie von MSC im humanen Organismus. Das *In-vivo*-Korrelat von MSC im humanen Organismus ist bislang umstritten (Bianco, 2008), jedoch scheinen MSC als Perizyten im Organismus zu existieren (Crisan, 2008). Das in den Untersuchungen der hier vorgelegten Arbeit beobachtete Zellzyklusverhalten – insbesondere die Fähigkeit zum temporären Zellzyklusarrest unter Erhalt der funktionellen und phänotypischen Charakteristika - unterstützt die Annahme, dass MSC als langsam proliferierende oder ruhende, perivaskulär lokalisierte Zellen im humanen Organismus existieren könnten (Slack, 2008). Damit ergeben sich Analogien zur wesentlich besser untersuchten Biologie von HSC. Für diese ist eine Existenz als ruhende oder langsam proliferierende Zellpopulation im humanen Organismus

gesichert (Orford, 2008). Eine derartige Quieszenz reduziert einerseits das Risiko der malignen Transformation und sichert andererseits den Erhalt des regenerativen Potentials adulter Stammzellen (Rossi, 2008).

5.2.3 Ein geringes Potential zur malignen Transformation von MSC korreliert mit deren gegenüber ESC limitierten Stammzellpotential

Damit scheinen MSC über Eigenschaften zu verfügen, die ihnen im Gegensatz zu ESC eine lebenslange Persistenz im adulten Organismus ohne gesteigertes Risiko der malignen Transformation erlauben. Unter anderem unterscheidet MSC und ESC die in der vorliegenden Arbeit für MSC demonstrierte Fähigkeit zum temporären Zellzyklusarrest. ESC sind gegenüber DNA-Schädigung sehr sensitiv, nicht zum Zellzyklusarrest in der Lage, sondern vollziehen bei Schädigung Apoptose (Aladjem, 1998). Obwohl ESC zur p53-unabhängigen DNA-Reparatur fähig sind (Prost, 1998), scheint in ESC eine partielle Inaktivität von p53-abhängigen Signalwegen vorzuliegen (Burdon, 2002). Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen die Inaktivität von p53 verlangt (Utikal, 2009). Damit erfordern sowohl maligne Transformation als auch Pluripotenz eine Inaktivität von p53. Diese Analogie läßt auf ähnliche molekulare Mechanismen bei beiden Prozessen schließen (Tapia, 2010).

Die hier vorgelegten Daten lassen vermuten, dass dagegen in MSC sowohl die Apoptoseinduktion als auch die Induktion eines Zellzyklusarrestes p53-abhängig erfolgt. Die Untersuchung des molekularen Zusammenhanges zwischen p53-Expression und Zellzyklusarrest in MSC ist Gegenstand aktueller Projekte der AG des Autors, aber die Funktionalität dieses Zusammenhanges in MSC ist wahrscheinlich.

Die differentielle Antwort auf genotoxische Schädigung in MSC und ESC entspricht deren differentiellen Funktionen in der Ontogenese. ESC stehen am Beginn der embryonalen Entwicklung, während adulte Stammzellen den Erhalt von Geweben des adulten Organismus gewährleisten. Diesen Funktionen entspricht die hohe Proliferationsrate und Sensitivität gegenüber DNA-Schäden von ESC im Gegensatz zur Quieszenz und Resistenz adulter Stammzellen.

ESC sind tumorigen und die Fähigkeit zur Ausbildung von Teratomen *in vivo* ist ein definierendes Charakteristikum von ESC (Knoepfler, 2009). Dieses Potential beruht allerdings nicht primär auf einer malignen Transformation, sondern ist Ausdruck der Pluripotenz (Smith, 2001). Hieraus leitete sich die Hypothese ab, dass MSC aufgrund putativ ähnlicher Stammzellcharakteristika wie ESC *in vivo* Tumoren ausbilden. Die in der vorgelegten Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen jedoch die Annahme, dass sich MSC und ESC in ihrer Genexpression und damit auch in ihrem Potential zur Ausbildung von Tumoren unterscheiden.

Die hier präsentierten Daten belegen, dass der embryonale, für die Pluripotenz essentielle Transkriptionsfaktor OCT4 in MSC nicht funktionell exprimiert wird (Mueller, 2009). Dies steht im Widerspruch zu der in anderen Arbeiten berichteten Expression von OCT4 in MSC (Tai, 2005; Zangrossi, 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Autoren lassen jedoch vermuten, dass der in anderen Arbeiten berichtete Nachweis von OCT4 in MSC nicht die Expression von funktionell aktivem OCT4A widerspiegelt, sondern auf die Verwendung ungeeigneter Antikörper oder Primer zurückzuführen ist, die in der Detektion unspezifischer Epitope bzw. Pseudogene oder Isoformen resultiert (Liedtke, 2007).

Die Schlussfolgerung, dass sich MSC in ihrer Genexpression von pluripotenten Zellen unterscheiden, wird durch die Ergebnisse zur Untersuchungen der epigenetischen Genregulation in MSC bestätigt (Dansranjavin, 2009). Zwischen MSC und pluripotenten TGCT-Zellen wurden deutliche Unterschiede im Methylierungsgrad und der Expression ausgewählter, die Biologie von Stammzellen bestimmender Gene beobachtet.

Die hier demonstrierte hepatogene Differenzierung von MSC (Aurich, 2007; Stock, 2008) belegt, dass MSC über die Fähigkeit zur Plastizität verfügen. Entgegen ursprünglicher Annahmen (Jiang, 2002) sind MSC jedoch vermutlich nicht pluripotent (Bianco, 2008).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sich die vermuteten Analogien der Genexpression und des Stammzellcharakters von MSC und ESC nicht bestätigen lassen und daher auch nicht als Argument für ein hohes Potential zur malignen Transformation von MSC dienen können.

In Übereinstimmung hiermit wurde in der hier präsentierten Arbeit auch nach prolongierter Kultivierung und nach Transplantation kein Hinweis für eine maligne Transformation sowohl nativer MSC als auch lentiviral transduzierter MSC beobachtet (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2006; Mueller, 2011). Dies steht im Einklang mit dem aktuellen Konsensus, dass MSC über ein geringes Potential zur malignen Transformation verfügen (Prockop, 2010).

Dies schließt nicht aus, dass MSC unter spezifischen Bedingungen und in seltenen Fällen eine maligne Transformation unterlaufen können. Am wahrscheinlichsten scheint dabei, dass eine Transformation von MSC in der Entstehung von mesodermalen Tumoren, z. B. Sarkomen resultiert (Mohseny, 2011). Aus Sicht des Autors besteht jedoch derzeit kein Hinweis darauf, dass die maligne Transformation von MSC einen regelhaften Prozess darstellt.

5.3 EINFLUSS VON MSC AUF DAS WACHSTUM MALIGNER TUMOREN

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Untersuchungen zahlreicher anderer Autoren lassen darauf schließen, dass MSC mit Tumorzellen interagieren können und damit das Wachstum maligner Tumoren beeinflussen.

5.3.1 MSC integrieren im humanen Organismus vermutlich in maligne Tumoren

Eine solche Interaktion von MSC und Tumorzellen scheint sowohl durch Integration von MSC in maligne Tumoren als auch durch Sekretion von Zytokinen durch nicht-tumorintegrierte MSC möglich. Eine Tumorintegration von MSC wiederum ist denkbar, indem im Gewebe ortsständige MSC in das dort entstehende Tumorgewebe integriert werden oder aber indem migrierende MSC aktiv in existierende Tumoren einwandern [Übersicht in (Klopp, 2011)]. Ob und welcher der skizzierten Mechanismen im humanen Organismus eine Rolle spielt, ist nicht zuletzt aufgrund des fehlenden unikaten Markers zur *In-vivo*-Detektion von MSC unklar. Dies ist für die Interpretation der bislang vorliegenden Daten entscheidend, denn insbesondere die in verschiedenen Arbeiten verwendeten *In-vivo*-Modelle simulieren jeweils nur eine Auswahl dieser Mechanismen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit liefern Argumente für verschiedene dieser Aspekte und deren Auswirkung auf die Tumorbilogie.

Modelle, in denen eine aktive Integration systemisch applizierter MSC in präformierte Xenografte erfolgt, setzen voraus, dass MSC im humanen Organismus in das periphere Blut mobilisieren und eine Integration in existierende Tumoren vollziehen können. Bislang ist allerdings umstritten, ob MSC im humanen Organismus aus anderen Geweben in die Zirkulation mobilisieren können und inwiefern die Charakteristika dieser zirkulierenden CFU-F-Zellen dann noch denen gewebeständiger MSC entsprechen [Übersicht in (He, 2007)]. Für die aktive Integration von MSC in existierende Tumoren spricht jedoch, dass in humanen malignen Tumoren ein Anteil dem Knochenmark-entstammender, myofibroblastärer Zellen von bis ca. 5 % demonstriert werden konnte (Cogle, 2007). Auch in humanen CRC konnte eine Präsenz solcher Zellen nachgewiesen werden (Worthley, 2009). Untersuchungen im Tiermodell bestätigen dies: bis zu 25 % der CAF in malignen Tumoren stammten von Zellen des Knochenmark ab (Direkze, 2004). Unterstützt wird die Annahme einer aktiven Integration von MSC in maligne Tumoren durch die Beobachtung, dass MSC aktiv in verletzte Gewebe einwandern können (Phinney, 2007). Dies wiederum unterstützt die These einer Analogie von Tumor- und Wundgewebe (Dvorak, 1986).

Im Tiermodell wurde eine Integration systemisch applizierter MSC in präformierte humane Xenografte für verschiedene Tumorentitäten [Übersicht in (Kidd, 2008)] und u. a. auch im subkutanen CRC-Xenograftmodell nachgewiesen (Kucerova, 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies; es wurde im Mausmodell eine Integration systemisch applizierter MSC in subkutane humane Xenografte beobachtet. Allerdings fand sich in diesem Modell nur eine, vermutlich auf einen pulmonalen Tropismus zurückzuführende, geringe Effizienz der Tumorintegration systemisch applizierter MSC (Luetzkendorf, 2010).

Ein derartiger pulmonaler Tropismus systemisch injizierter MSC ist seit langem bekannt (Barbash, 2003). Neuere Arbeiten belegen, dass in bestimmten Modellen bereits wenige Minuten nach i. v. Applikation 95 % aller applizierten MSC in der Lunge als Emboli vorliegen (Lee, 2009). Bislang existieren keine Erkenntnisse, inwiefern ein solcher pulmonaler Tropismus von systemisch zirkulierenden MSC auch im humanen Organismus auftritt. Jedoch zwingt diese Erkenntnis aus Sicht des Autors zur differenzierten Interpretation des vielfach berichteten Einflusses systemisch applizierter MSC auf das Wachstum pulmonaler Xenografte. Angesichts einer pulmonalen Embolisation ist davon auszugehen, dass eine Akkumulation systemisch applizierter MSC in pulmonalen Xenograften erleichtert ist. Der in derartigen Modellen (Studený, 2002) beobachtete Effekt tumorintegrierter MSC auf das Tumorwachstum beruht damit möglicherweise auf einem gegenüber der physiologischen Situation wesentlich höheren Anteil tumorintegrierter MSC.

Diese Überlegung führt zurück zu der Feststellung, dass die physiologische Situation, d. h. der Anteil tumorintegrierter MSC in humanen Tumoren, nicht bekannt ist. Die hier präsentierten Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen im Mischxenograftmodell, in denen ein Anteil der MSC von 20 % an der Gesamtzellpopulation gewählt wurde (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011). Dies liegt in der Größenordnung des von anderen Autoren beobachteten Anteils von dem Knochenmark-entstammender, myofibroblastärer Zellen in humanen Tumoren (Cogle, 2007).

Unklar ist aber ebenso, ob eine permanente Präsenz von MSC im Tumorgewebe physiologisch relevant ist. In vorläufigen Untersuchungen im Mischxenograftmodell konnte die AG des Autors zeigen, dass tumorintegrierte MSC wenige Tage nach Generierung des Xenograftes in diesem nicht mehr nachweisbar sind. Möglicherweise ist der Einfluss von MSC auf die Tumorbiologie auf einen bestimmten Zeitraum des Tumorwachstums begrenzt.

5.3.2 Eine Interaktion von MSC und Tumorzellen könnte sich in verschiedenen Phasen des Tumorwachstums differentiell vollziehen

Ein wesentlicher Zeitraum für das maligne Wachstum von Tumoren ist die Phase der metastatischen Absiedlung maligner Tumorzellen. Im Verlauf dieses Prozesses spielt die Interaktion mit gewebeständigen Zellen eine entscheidende Rolle. Postuliert wurde hierbei, dass VEGF-Rezeptor-positive Zellen des Knochenmark bereits vor Absiedlung der Tumorzellen am Ort des späteren metastatischen Wachstums präsent sind und eine für die Ausbildung einer Metastase essentielle, sogenannte prämetastatische Nische bilden [Übersicht in (Kaplan, 2006)]. Hierbei handelt es sich vermutlich um hämatopoetische Zellen (Kaplan, 2005). In Arbeiten im *Caenorhabditis*-Modell wurde das Modell einer latenten Nische formuliert, bei der ortsständige Zellen ektopen Zellen als Nische-bereitende Zellen dienen können (McGovern,

2009). Das in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und in zahlreichen Arbeiten anderer Autoren genutzte Modell des Mischxenograftes simuliert letztlich eine derartige Nischenfunktion. MSC treten in diesen Modellen in Kontakt mit vollständig maligne transformierten, sich „metastatisch“ absiedelnden Tumorzellen. Sofern die postulierte perivaskuläre ubiquitäre Präsenz von MSC zutrifft (Bianco, 2008), wäre eine solche Nischenfunktion in vielen Geweben und Organen möglich. Die Beteiligung von MSC an einer prämetastatischen Nische ist mit einem MSC-Anteil an der Tumorzellgesamtpopulation von 20 % - so wie für die hier präsentierten Versuche gewählt (Luetzkendorf, 2010) – oder auch von bis zu 60 % - wie in anderen Arbeiten verwendet (Karnoub, 2007) – vereinbar.

Gegenüber dieser postulierten Rolle von MSC bei der Metastasierung von Tumorzellen ist auch eine Beteiligung von MSC an der malignen Transformation von Zellen möglich. So wurde für MSC mit ektopter Expression von p53 gezeigt, dass sie in einem Modell des spontanen Tumorstwachstums die Entstehung maligner Tumoren durch die Aktivierung von latent maligne transformierten Zellen fördern (Houghton, 2010). Für gewebeständige Fibroblasten wurde gezeigt, dass sie in Abhängigkeit der Expression von PTEN die maligne Transformation von Brustepithelien inhibieren (Trimboli, 2009).

Ausgehend von der Beobachtung, dass systemisch applizierte MSC auch ohne Anreicherung im Zielgewebe dessen Struktur und Biologie verändern können (Lee, 2009), ist weiterhin denkbar, dass eine Tumorintegration nicht zwingend erforderlich ist, um einen Einfluss von MSC auf das Tumorstwachstum zu realisieren. Insbesondere der von MSC ausgeübte, in der vorliegenden Arbeit bestätigte immunmodulatorische Effekt erfordert keine unmittelbare Präsenz von MSC im Tumorgewebe.

Ein Argument für die putative Tumorintegration von MSC ist jedoch deren Fähigkeit zur Differenzierung in CAF [Übersicht in (Mishra, 2009)]. Im Tiermodell wurde demonstriert, dass CAF sich direkt von MSC ableiten können (Quante, 2011). *In vitro* zeigen MSC nach Inkubation mit zellfreiem, Tumorzell-konditioniertem Medium eine Differenzierung zu Zellen mit CAF-Charakteristika mit Expression von α -SMA und SDF-1 (Mishra, 2008). Eine ähnliche Differenzierung war nach Behandlung von MSC mit Lysophosphatidyl-Säure zu beobachten (Jeon, 2008).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Einfluss von MSC auf das Tumorstwachstum *in vivo* an die Differenzierung zu CAF gebunden ist. Damit ergibt sich aber auch die Frage, inwiefern die in zahlreichen Arbeiten – einschließlich der hier vorliegenden - unter Verwendung von nativen statt CAF-differenzierten MSC erhobenen Daten relevant sind. Aktuell erfolgen in der AG des Autors Arbeiten mit zu CAF differenzierten MSC, um die Relevanz des für native MSC beobachteten Einflusses auf das Tumorstwachstum zu bestimmen.

5.3.3 MSC können das Tumorwachstum durch unterschiedliche Mechanismen beeinflussen

Hinsichtlich dieses Einflusses von MSC auf das Wachstum maligner Tumoren und die ihm zugrundeliegenden Mechanismen liegen widersprüchliche Daten vor [Übersicht in (Klopp, 2011)]. In zahlreichen Modellen wurde für tumorintegrierte MSC eine Förderung des Tumorwachstums demonstriert (Karnoub, 2007; Quante, 2011). Auch für CRC wurde im Tiermodell eine Förderung des Wachstums und der Metastasierung durch tumorintegrierte MSC beobachtet (Shinagawa, 2010). Dies wird durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, vermutlich vom immunsuppressiven Potential der MSC unabhängige Förderung des Wachstums von CRC durch tumorintegrierte MSC unterstützt (Luetzendorf, 2010).

Dem stehen Arbeiten gegenüber, bei denen im Tiermodell eine Suppression des Tumorwachstums bei Leberzellkarzinomen (Qiao, 2008) und Kaposi-Sarkomen (Khakoo, 2006) durch tumorintegrierte MSC beobachtet wurde. Auch für CRC-Zellen der Ratte wurde in einem *In-vivo*-Modell eine inhibierende Wirkung von MSC-ähnlichen Zellen auf das Tumorzellwachstum beschrieben (Ohlsson, 2003).

Diese differentiellen Ergebnisse wurden in unterschiedlichen Entitäten unter Verwendung unterschiedlicher Modelle gewonnen. Ihre Interpretation führt damit zurück zu der beschriebenen methodischen Unsicherheit: Solange unklar bleibt, ob, wann, in welchem Ausmaß und Differenzierungszustand MSC in maligne Tumoren integrieren, ist die Wahl der Modelle schwierig zu rechtfertigen.

Die postulierten Mechanismen des Einflusses von MSC auf das Tumorwachstum umfassen u. a. die Modulation der Anti-Tumorimmunantwort, die Förderung des Aufbaus einer dreidimensionalen Tumorstruktur inklusive der Förderung der Tumorneoangiogenese sowie die Vermittlung einer Therapieresistenz. Zu all diesen Aspekten liefern die dargestellten Untersuchungen des Autors relevante Ergebnisse.

Für MSC ist ein immunmodulierendes Potential belegt (Uccelli, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, durch MSC vermittelte Suppression der Mitogen-induzierten Proliferation von Leukozyten bestätigt dies exemplarisch. MSC inhibieren insbesondere die Aktivierung von T-Lymphozyten (Krampera, 2003), aber modulieren auch die Aktivierung von dendritischen Zellen (Nauta, 2006), B-Lymphozyten (Corcione, 2006) und NK-Zellen (Krampera, 2006a). Ausgehend hiervon wurde gezeigt, dass MSC das Wachstum allogener Xenograften in immunkompetenten Mäusen ermöglichen (Djouad, 2003).

Die Analyse des Einflusses von MSC auf das Wachstum von Xenograften muss daher einen potentiell modulierenden Einfluss von MSC auf die Immuntoleranz gegenüber den transplantierten humanen Tumorzellen berücksichtigen. Aufgrund der Wirkung von MSC auf B-

Lymphozyten und NK-Zellen kann sowohl im Modell der athymischen Nacktmaus mit einer residualen humoralen Immunantwort als auch im NOD/SCID-Modell mit einer residualen NK-Zell-Aktivität ein immunmodulatorischer Einfluss von MSC auf das Wachstum xenogener Tumorzellen nicht ausgeschlossen werden. Die beobachtete Aktivität systemisch transplantierte MSC bei Patienten mit GvHD (Le Blanc, 2008) oder mit Autoimmunerkrankungen (Christopeit, 2008; Liang, 2010) sind ein Hinweis dafür, dass MSC ein immunsuppressives Potential im humanen Organismus ausüben können. Inwiefern dieses für die physiologische Situation eines Wachstums autologer Tumorzellen relevant ist, lässt sich nur schwer abschätzen (Klopp, 2011).

In vorläufigen, in der vorliegenden Arbeit noch nicht dargestellten Untersuchungen konnte die AG des Autors allerdings zeigen, dass MSC das Wachstum von Xenograften der CRC-Zelllinie HCT8 im Modell der komplett immunsupprimierten NOG-Maus fördern. Aufgrund der fehlenden residuellen Immunität ist eine MSC-vermittelte Immunsuppression in diesem Modell irrelevant. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die im Nacktmausmodell beobachtete Förderung des CRC-Wachstums durch MSC allein auf einer MSC-vermittelten Immunsuppression beruht.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte von MSC auf die Sphäroidbildung von CRC- und Mammakarzinomzellen sowie die nachgewiesene Wachstumsförderung von CRC-Xenograften durch tumorintegrierte MSC weisen darauf hin, dass tumorintegrierte MSC die Ausbildung der dreidimensionalen Tumorarchitektur beeinflussen können. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass MSC die Gewebeintegration von Mammakarzinomzellen fördern (Corcoran, 2008). Welche molekularen Prozesse hieran beteiligt sind, ist unklar; die vom Autor erhobenen Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Interaktion von Metalloproteinasen und extrazellulärer Matrix eine Rolle spielen. Untersuchungen anderer Autoren lassen auf eine Beteiligung von Wachstumsfaktoren wie growth arrest-specific 6 (Shiozawa, 2010) oder LIM-Kinasen (Scott, 2010) schließen.

Diese Interaktionen scheinen nicht primär eine Förderung der Proliferation der Tumorzellen zu vermitteln. Vielmehr wurde für einige dieser Mechanismen, so z. B. für durch Osteoblasten sezerniertes growth arrest-specific 6 eine Wachstumshemmung in ossär metastasierten Prostatakarzinomzellen nachgewiesen (Shiozawa, 2010). Stromazellen des Knochenmark sind in der Lage, durch gap-junction vermittelten Transfer von miRNA einen Zellzyklusarrest in Mammakarzinomzellen zu induzieren (Lim, 2011). Hierdurch könnte der Vollzug einer für die Metastasierung wesentlichen Mesenchymal-Epithelialen Transition und EMT erleichtert werden [Übersicht in (Polyak, 2009)]. Eine Beteiligung von CAF an der EMT wurde in anderen Modellen demonstriert (Giannoni, 2010). Explizit wurde für MSC gezeigt, dass sie die Metastasierung von Tumorzellen fördern (Karnoub, 2007). Anhand aktueller Erkenntnisse zum Einfluss der EMT auf

die Generierung von Tumorstammzellen (Singh, 2010) lässt sich weiterhin postulieren, dass tumorintegrierte MSC auch an der Tumorstammzellnische beteiligt sind.

Andererseits ist denkbar, dass die Induktion einer Quieszenz in Tumorzellen durch Stromazellen, wie z. B. tumorintegrierte MSC, eine Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika vermittelt. Für einen derartigen Effekt wurden in verschiedenen Modellen Hinweise beobachtet (Kurtova, 2009; Muerkoeser, 2004).

Ungeachtet der dargestellten methodischen Unsicherheiten belegt der aktuelle Stand der Forschung einschließlich der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten, dass lokal vorhandene MSC das Wachstum maligner Tumoren unter bestimmten Bedingungen unterstützen können. Der zugrundeliegende Mechanismus - Förderung der Ausbildung des Tumorstroma, Suppression der Immunantwort oder aber andere Interaktionen - bleibt spekulativ. Wie aktuelle Arbeiten beweisen (Santos, 2009), lassen sich jedoch bereits mit dem aktuellen Kenntnisstand Ansätze für eine auf das Tumorstroma zielende Therapie ableiten.

5.4 POTENTIAL VON *TRAIL*-MSC FÜR DIE THERAPIE MALIGNER TUMOREN

Mit der - wenn auch im humanen Organismus noch nicht definitiv nachgewiesenen - Fähigkeit von MSC zur Integration in maligne Tumoren verbindet sich die Hoffnung, dass genetisch modifizierte MSC als Instrument einer Tumorthherapie nutzbar sind (Ciavarella, 2011). Für die klinische Realisierung sind aus Sicht des Autors u. a. folgende Punkte essentiell: 1.) Auswahl eines Gens mit spezifischer Anti-Tumoraktivität, 2.) Auswahl der Methode der genetischen Modifikation sowie 3.) Erzielen einer effizienten Tumorintegration der genetisch modifizierten MSC. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse liefern zu diesen Punkten weiterführende Erkenntnisse.

5.4.1 *TRAIL* ist ein therapeutisches Gen mit Anti-Tumoraktivität im CRC-Modell

Zahlreiche Genprodukte versprechen bei ektopter Expression in tumorintegrierenden Zellen eine Anti-Tumoraktivität. Es liegen zahlreiche Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Gene vor [Übersicht in (Ciavarella, 2011)]. Hierzu gehören Zytokine wie Interferone und Interleukine, die eine direkte Zytotoxizität und eine Anti-Tumorimmunantwort vermitteln (Ren, 2008; Studeny, 2002; Yuan, 2006) ebenso wie Enzyme, wie z. B. Cytosin-Deaminase, die eine Aktivierung therapeutisch wirksamer Substanzen katalysieren (Kucerova, 2007; Zischek, 2009). Aus Sicht des Autors weisen diese Genprodukte klinisch relevante Nachteile auf. Die Sekretion von Zytokinen kann durch eine, über das Tumorgewebe hinausgehende, komplexe Interaktion auch in einem breiten Spektrum von Nebenwirkungen resultieren. Die ektopte Expression von

Zytostatika-aktivierenden Enzymen in tumorintegrierenden Zellen garantiert eine relative Tumorzell-Spezifität der Wirkung, führt aber letztlich nicht zu einer Erweiterung des Spektrums an therapeutischen Ansätzen.

Optimal erscheint ein Gen dessen Expression: 1.) MSC nicht schädigt oder deren tumorintegrierenden Eigenschaften verändert, 2.) eine proliferationshemmende Wirkung in benachbarten Tumorzellen ausübt ohne nicht-maligne Zellen zu schädigen und 3.) in ihrer Wirkung nicht durch eine inhärente Resistenz von Tumorzellen abgeschwächt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten deuten darauf hin, dass *TRAIL* solch ein Gen darstellen könnte. Die Expression von *TRAIL* führte in MSC weder zur Induktion von Apoptose noch wurden die definierenden Eigenschaften von MSC verändert (Luetzkendorf, 2010). Arbeiten anderer Autoren bestätigen die Beobachtung, dass die Expression von *TRAIL* in MSC ohne Veränderung der Charakteristika von MSC möglich ist (Grisendi, 2010; Loebinger, 2009). Es ist seit langem bekannt, dass *TRAIL* selektiv Apoptose in Tumorzellen induziert, dass jedoch bei zahlreichen Entitäten Resistenzen gegenüber s*TRAIL* bestehen (Walczak, 1999). Für das CRC war z. B. eine *TRAIL*-Resistenz für die Zelllinien HCT8 und HT29 bekannt (Lacour, 2001; Tillman, 2003). Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Beobachtung in einem erweiterten Panel von CRC-Zelllinien (Mueller, 2011). Sie widersprechen aber auch einer, von anderen Autoren (Drosopoulos, 2005) postulierten, stringenten Korrelation zwischen *TRAIL*-Sensitivität und Expression von *TRAIL*-Rezeptoren. Dies ist bezüglich einer klinischen Applikation sowohl von s*TRAIL* bzw. *TRAIL*-Agonisten als auch von *TRAIL*-MSC relevant. Die immunhistochemische Analyse der DR-Expression im Tumorgewebe ist vermutlich nicht geeignet, um den zu erwartenden Erfolg *TRAIL*-basierter Therapien abzuschätzen.

5.4.2 Die lentivirale Transduktion ist für die Generierung von MSC mit Anti-Tumoraktivität geeignet

Für die spätere klinische Anwendung ist neben der Auswahl des therapeutischen Gens die verwendete Methode des Gentransfers entscheidend. Ein nicht-viraler Gentransfer resultiert in MSC in einer nur geringen Transfektionseffizienz (Haleem-Smith, 2005). Erfolg versprechender ist die virale Transduktion entweder mit adenoviralen oder retroviralen Systemen. Gegenüber adenoviralen Systemen besteht der Vorteil retroviraler Konstrukte darin, dass eine Genomintegration des transferierten Gens erfolgt und damit MSC mit über lange Zeit stabiler ektopter Genexpression generiert werden (Thomas, 2003). Dies würde die einmalige Produktion genetisch modifizierter MSC für mehrere Anwendungen erlauben. Zugleich stellt dies sicher, dass die Effektivität genetisch modifizierter MSC durch eine nach dem Gentransfer erfolgende Proliferation der Zellen nicht abnimmt.

Angesichts der vergleichsweise niedrigen Proliferationsrate von MSC *in vitro* sind unter den retroviralen Systemen insbesondere lentivirale Konstrukte interessant, da diese eine Transduktion mit Genomintegration unabhängig von der Proliferationsrate der Zielzellen erlauben (Lewis, 1994). Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten, mit dem Glykoprotein des Vesicular stomatitis Virus pseudotypisierten lentiviralen System wurde eine effiziente und über mehrere Passagen persistierende Genexpression erzielt. Als mögliche Ursachen der beobachteten Abnahme der Expression kommen ein Verdünnungseffekt durch die Abnahme des Anteils von Zellen mit nicht-genomintegriertem Zielgen, ein epigenetisches „Silencing“ sowie eine Disintegration des transferierten Gens aus dem Genom in Frage. Denkbar ist aber auch ein Proliferationsnachteil von Zellen mit ektopter Genexpression (Cockrell, 2007).

In der Genomintegration liegt aber offensichtlich auch der Nachteil retroviraler Systeme, denn abhängig von der Lokalisation kann durch Insertionsmutagenese eine Onkogenaktivierung erfolgen (Matrai, 2010). Für die vorliegende Arbeit wurde bereits in Hinblick auf eine klinische Anwendung ein selbst-inaktivierendes lentivirales Konstrukt mit einem Verpackungssystem der 3. Generation verwendet (Lois, 2002). Dabei ist das Risiko der Replikation des Virusgenoms sowohl durch die Separation von Verpackungsproteinen als auch durch die Verwendung einer deletierten 3'-LTR minimiert. Das Risiko der Insertionsmutagenese besteht aber weiterhin (Matrai, 2010). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch für *TRAIL*-MSC kein Anhalt für eine maligne Transformation beobachtet (Luetzkendorf, 2010).

Ein Ansatz, das Risiko der malignen Transformation genetisch modifizierter Zellen zu vermeiden, besteht u. a. in der Verwendung lentiviraler Konstrukte die neben dem therapeutischen Gen ein Suizidgen - wie z. B. die Thymidylat-Monophosphat-Kinase – enthalten. Dies erlaubt die selektive Eliminierung der genetisch veränderten Zellen (Sato, 2007). Eine weitere Alternative besteht in der Verwendung von Transposons (VandenDriessche, 2009).

5.4.3 *TRAIL*-MSC inhibieren das Wachstum von CRC und überwinden teilweise die *TRAIL*-Resistenz von CRC-Zellen

Die hier präsentierten Daten belegen, dass MSC mit transmembranärer Expression von *TRAIL* in benachbarten CRC-Zellen Apoptose induzieren und damit das Wachstum der Tumorzellpopulation effektiv inhibieren. Gleiche Effekte wurden für *TRAIL*-exprimierende neuronale Stammzellen oder *TRAIL*-MSC in anderen Entitäten beobachtet (Ehtesham, 2002; Loebinger, 2009).

Erstmals wurde vom Autor berichtet, dass *TRAIL*-MSC die *TRAIL*-Resistenz von CRC-Zellen überwinden können (Mueller, 2011). Die erhobenen Daten zeigen, dass die Überwindung der *TRAIL*-Resistenz nicht auf sensitivierende, durch native MSC vermittelte Signale

zurückzuführen ist. Wahrscheinlich scheint vielmehr, dass die im Vergleich zu sTRAIL verlängerte und vermutlich in höherer Konzentration erfolgende TRAIL-Exposition durch *TRAIL*-MSC für die Überwindung der TRAIL-Resistenz verantwortlich ist.

Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass ausgewählte CRC-Zellen eine Resistenz gegenüber *TRAIL*-MSC aufweisen (Mueller, 2011). Diese Resistenz war nicht stringent mit einer reduzierten Expression von DR4 und DR5 assoziiert. Für die Einschätzung des therapeutischen Potentials von TRAIL - als lösliches Protein oder als ekto exprimiertes Gen - bleibt die Identifizierung molekularer Marker, die mit einer Sensitivität oder Resistenz assoziiert sind, ein wesentliches Ziel.

Die Resistenz der Zelllinie HT29 gegenüber *TRAIL*-MSC ließ sich *in vitro* durch Exposition mit Zytostatika in subapoptotischer Dosis überwinden. Es ist bekannt, dass sowohl klassische Zytostatika (Lacour, 2001) als auch zielgerichtete Substanzen, wie z. B. Proteasom-Inhibitoren (Grisendi, 2010) TRAIL-resistente CRC-Zellen für TRAIL sensitivieren. Unter anderem wurde für die CRC-Zelllinie HT29 eine Sensitivierung durch Oxaliplatin gezeigt (Toscano, 2008). Der Umstand, dass diese Sensitivierung auch für *TRAIL*-MSC gelingt, deutet darauf hin, dass MSC-exprimiertes TRAIL und lösliches TRAIL über den gleichen, durch zusätzliche Schädigung verstärkten, Signalweg Apoptose induzieren. Der wahrscheinliche Mechanismus der Sensitivierung besteht in einer, durch die parallel applizierte Substanz vermittelten, mitochondrialen Schädigung (Tillman, 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Hemmung des Wachstums von Mischxenograften (Luetzkendorf, 2010; Mueller, 2011) beweist die funktionelle Aktivität von *TRAIL*-MSC *in vivo*. Von der Arbeitsgruppe des Autors wurden erstmals Analysen durchgeführt, um den für eine Wachstumsinhibition minimal notwendigen intratumoralen Anteil von *TRAIL*-MSC zu bestimmen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Anteil von *TRAIL*-MSC an der Gesamtumorzellmasse mindestens 10 % betragen muss, um das Tumorstadium TRAIL-sensitiver Zellen zu inhibieren. Das für diese Analysen gewählte Mischxenograftmodell erfasst das Anwachsen und frühe Wachstum des Tumors - also eine Phase, in der die Tumorzellen für eine Apoptoseinduktion aufgrund fehlender Vaskularisierung des Tumors vermutlich zusätzlich vulnerabel sind. Es ist daher davon auszugehen, dass im Fall der nachträglichen Integration in bereits existierende Tumoren, d. h. in der klinisch relevanten Situation, der für eine Wachstumsinhibition notwendige Anteil von *TRAIL*-MSC nicht niedriger liegen wird.

Von anderen Autoren wurden Zellen mit ektopter Expression eines infolge N-terminaler Mutation sezernierten TRAIL-Proteins generiert (Shah, 2004). Die in der hier vorliegenden Arbeit präsentierten Daten lassen vermuten, dass *TRAIL*-MSC gegenüber sTRAIL eine prolongierte

und effektivere Exposition der Tumorzellen mit funktionell aktivem TRAIL ermöglichen. Um diese These zu bestätigen, wäre es aufschlussreich, im Vergleich zu den hier verwendeten *TRAIL*-MSC, MSC mit ektopter Expression von sezerniertem TRAIL hinsichtlich ihres Effektes auf TRAIL-resistente CRC-Zellen zu untersuchen.

5.4.4 Die Effektivität von *TRAIL*-MSC wird durch eine Resistenz ausgewählter CRC-Zellen gegenüber *TRAIL*-MSC eingeschränkt

In der vorliegenden Arbeit ließ sich die *in vitro* beobachtete Sensitivierung von *TRAIL*-MSC-resistenten CRC-Zellen durch 5-FU nicht *in vivo* reproduzieren. Im Gegenteil, die Präsenz von *TRAIL*-MSC förderte das Xenograftwachstum *TRAIL*-MSC-resistenter HT29-Zellen (Mueller, 2011). Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar.

Wie in der vorliegenden Arbeit für die Zelllinien DLD1 und HCT8 gezeigt, können tumorintegrierte native MSC das CRC-Xenograftwachstum fördern (Luetzkendorf, 2010). Die hier präsentierten Daten (s. 4.3.2) lassen vermuten, dass dieser Wachstumsförderung nicht eine Förderung der Tumorzellproliferation, sondern eine Förderung der Ausbildung des Tumorstroma zu Grunde liegt. Möglich scheint daher, dass auch *TRAIL*-MSC einen solchen wachstumsfördernden Effekt ausüben, der jedoch bei den *TRAIL*-MSC-sensitiven Zelllinien DLD1 und HCT8 durch die parallele, *TRAIL*-MSC-vermittelte Apoptose nicht wirksam wird. Bei *TRAIL*-MSC-resistenten HT29-Zellen dagegen könnte dieser wachstumsfördernde Effekt gegenüber der sekundären Sensitivierung durch 5-FU in den Vordergrund treten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch durch andere Autoren eine Wachstumsförderung durch TRAIL bei TRAIL-resistenten Zellen *in vivo* berichtet wurde (Malhi, 2006). Dieser Effekt ist sowohl mit einer erhöhten Metastasierungstendenz (Trauzold, 2006) als auch mit einer verstärkten Tumorzellproliferation (Ehrhardt, 2003) verbunden. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint in einer TRAIL-vermittelten Aktivierung antiapoptotischer Proteine via NFκB zu bestehen. So wurde berichtet, dass TRAIL in TRAIL-resistenten HT29-Zellen via IGF-binding protein 3 NFκB aktiviert (Williams, 2007). Ebenfalls für HT29-Zellen wurde beschrieben, dass aufgrund eines Defektes der proapoptotischen Signaltransduktion via TRAIL-Rezeptor und einer Überexpression von cFLIP in diesen Zellen die Proliferation durch TRAIL induziert werden kann (Baader, 2005).

Diese Mechanismen liefern Ansätze, um die für HT29-Zellen beobachtete Diskrepanz zwischen dem *in vitro* und dem *in vivo* beobachteten Effekt einer parallelen Exposition mit *TRAIL*-MSC und 5-FU zu erklären. TRAIL könnte in TRAIL-resistenten Zellen sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Signale aktivieren. Der Nettoeffekt sollte dann von der Konzentration und Dauer der TRAIL-Exposition und der vorbestehenden Caspase-Aktivität abhängig sein. Es ist davon auszugehen, dass diese Faktoren im Modell der 2D-Kokultur *in vitro* gegenüber dem

Xenograft differentiell ausgeprägt sind. Insbesondere der Einfluss des Tumorstroma im Xenograftmodell könnte durch eine Aktivierung von NFκB zu einer Suppression der TRAIL-induzierten Apoptose führen.

Ausgehend von der in anderen Modellen beobachteten Variabilität der zellulären Reaktion auf TRAIL (Spencer, 2009) ist aber auch eine Selektion von HT29-Zellen mit erhöhter TRAIL-Resistenz im Rahmen des Tumorwachstums *in vivo* denkbar. Letztlich bleibt die *in vitro* und *in vivo* differentielle Reaktion von HT29-Zellen auf die Behandlung mit TRAIL-MSD und 5-FU ungeklärt und ist gegenwärtig Gegenstand weiterer Untersuchungen der AG des Autors.

5.4.5 Ein pulmonaler Tropismus systemisch applizierter MSD kann die Anti-Tumoraktivität von TRAIL-MSD reduzieren

Essentiell für die potentielle klinische Anwendung ist die Effektivität der Tumorintegration systemisch transplantiertes MSD. Die vom Autor im subkutanen CRC-Xenograftmodell erhobenen Daten lassen vermuten, dass mindestens ein Anteil von 10 % tumorintegrierter TRAIL-MSD für eine effektive Inhibition TRAIL-sensitiver Tumoren notwendig ist (Luetzkendorf, 2010). Auf die Limitationen dieser Schlussfolgerungen aufgrund des verwendeten subkutanen Modells wurde bereits verwiesen.

Wesentlich für die klinische Anwendung ist die Beobachtung, dass die Tumorintegration von MSD nach systemischer Transplantation durch einen pulmonalen Tropismus eingeschränkt wird (Luetzkendorf, 2010). Ein derartiger Tropismus wurde von mehreren Autoren im Tiermodell berichtet (Barbash, 2003; Gao, 2001). Aktuelle Daten lassen vermuten, dass dieses Phänomen die potentiellen therapeutischen Ansätze zur Nutzung von MSD zur Immunmodulation nicht einschränkt (Lee, 2009). Für eine lokale Tumortherapie mittels genetisch modifizierter MSD würde dieser pulmonale Tropismus allerdings ein wesentliches Hindernis darstellen. Wie bereits diskutiert, wird durch diese Daten auch die Relevanz der berichteten hohen Effizienz der Tumorintegration von MSD in pulmonalen Xenograftmodellen (Studený, 2002) in Frage gestellt. Die Ursachen dieses pulmonalen Tropismus sind unklar; mögliche Erklärungen liegen in der Zellgröße von MSD, die zu einer rein mechanischen Embolisation führen könnte. Denkbar ist auch ein durch Adhärenzfaktoren vermittelter selektiver Tropismus.

Offensichtlich entspricht sowohl das in der vorliegenden Arbeit verwendete subkutane Modell im Speziellen als auch das Mausmodell im Allgemeinen nur eingeschränkt der Situation im humanen Organismus. Es bleibt unklar, ob transplantiertes MSD auch im humanen Organismus einem pulmonalen Tropismus unterliegen. Weitere Arbeiten deuten an, dass sich eine Anreicherung von MSD in der Lunge ggf. durch methodische Optimierung vermeiden lässt. So konnte z. B. nach Vorbehandlung der Tiere mit Nitraten eine pulmonale Embolisation von MSD reduziert

werden (Gao, 2001). Ebenso wurde durch die Bestrahlung von Xenograften die Tumorintegration systemisch applizierter MSC verbessert (Klopp, 2007). Dies deutet darauf hin, dass durch Vorbehandlung des Tumors eine Chemotaxis für MSC ausgelöst werden kann. Eine weitere Option zur Überwindung des pulmonalen Tropismus von MSC besteht in der Applikation von MSC im afferenten Gefäßsystem - d. h. unter Umgehung des pulmonalen Kreislaufs (Nakamizo, 2005).

Aus all diesen Überlegungen leitet sich aus Sicht des Autors ab, dass 1.) MSC als Vehikel einer Tumorthherapie dienen können, 2.) TRAIL ein therapeutisches Gen mit Anti-Tumoraktivität auch bei TRAIL-resistenten Tumoren darstellt, 3.) aber noch weitere präklinische Studien erforderlich sind, um die offensichtlichen Risiken dieses Therapieansatzes zu minimieren und dessen Erfolgsaussichten zu optimieren. Zu diesen Risiken zählt weniger die maligne Transformation der genetisch manipulierten MSC, als vielmehr die Förderung des Tumorwachstums durch tumorintegrierte MSC.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen lieferten neue Ergebnisse zur Biologie von MSC, zu deren Relevanz für das Wachstum maligner Erkrankungen und zur potentiellen Nutzung genetisch modifizierter MSC für eine Therapie maligner Tumoren. Hierauf gründen sich aktuelle Projekte in der AG des Autors.

Es wurde gezeigt, dass sich aus dem Knochenmark von Patienten nach chemotherapeutischer Vorbehandlung MSC isolieren lassen, die sich hinsichtlich der für MSC definierenden Charakteristika nicht von MSC gesunder Spender unterscheiden. Neben der Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung scheinen diese Zellen auch über ein immunmodulatorisches Potential zu verfügen. Es fand sich kein Anhalt für ein hohes Potential von MSC zur malignen Transformation.

Aufbauend hierauf wurden unter Mitarbeit des Autors Protokolle zur GMP-gerechten Herstellung von MSC erarbeitet und die entsprechende Herstellungsgenehmigung am UKH etabliert. Derzeit werden in Kooperationsprojekten durch den Autor Studienprotokolle für die klinische Anwendung von MSC u. a. bei Patienten mit schweren immunologischen Erkrankungen vorbereitet.

Ausgehend vom Nachweis der Präsenz von MSC im Knochenmark nach chemotherapeutischer Behandlung konnte für MSC eine inhärente Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung nachgewiesen werden. Diese beruht u. a. auf einer erhöhten apoptotischen Schwelle sowie der Fähigkeit zum Zellzyklusarrest und erlaubt den Erhalt des Stammzellcharakters trotz genotoxischer Schädigung.

Damit scheint diese Resistenz zur lebenslangen Persistenz von MSC im humanen adulten Organismus als eine langsam proliferierende Zellpopulation mit niedrigem Transformationsrisiko beizutragen. In der AG des Autors werden derzeit Reaktionsmuster von MSC auf physiologisch relevante Schädigungen wie z. B. Hypoxie untersucht. Die Ergebnisse liefern aber auch Ansätze, um die Möglichkeiten einer endogenen Aktivierung von MSC zu therapeutischen Zwecken zu untersuchen.

Es wurde gezeigt, dass sich MSC in ihrer Genexpression und epigenetischen Genregulation von pluripotenten Zellen unterscheiden, dass aber MSC in Zellen mit funktionell hepatozytärem Phänotyp und somit in nicht-mesodermale Zelltypen differenzieren können. Dies lässt darauf schließen, dass MSC gegenüber pluripotenten Zellen eine differentielle molekulare Regulation von Differenzierung und Proliferation aufweisen.

Mit der Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen steht seit kurzem ein Modell zur Verfügung, um die Relevanz der epigenetischen Regulation und von einzelnen Transkriptionsfaktoren gezielt zu untersuchen. Die Beobachtungen des Autors unterstützten die Annahme, dass MSC über ein großes Potential zur therapeutischen Gewebe- und Organregeneration verfügen. Durch Kooperationspartner des Autors werden diese Ansätze weiterverfolgt und sollen in Protokollen zur klinischen Anwendung von hepatozytär differenzierten MSC einfließen.

Es konnte gezeigt werden, dass tumorintegrierte MSC spezifisch das Wachstum von CRC-Xenograften, vermutlich durch Propagation der Ausbildung der Tumorarchitektur fördern. Ausgehend von der wahrscheinlichen Integration von MSC in maligne Tumoren im humanen Organismus können diese Beobachtungen sowohl zum besseren Verständnis der Tumorbiologie als auch zur Identifikation neuer Zielstrukturen einer Tumorthherapie beitragen. Wesentlich ist, den Zeitpunkt der Integration von MSC in das Tumorgewebe und deren molekulare Interaktion mit Tumorzellen zu bestimmen. Hierzu erfolgen derzeit Untersuchungen in der AG des Autors.

MSC mit lentiviraler *TRAIL*-Expression induzierten bei direktem Zell-Zell-Kontakt Apoptose sowohl in *TRAIL*-sensitiven als auch in ausgewählten *TRAIL*-resistenten CRC-Zellen und inhibierten deren Wachstum *in vitro* und *in vivo*. Damit konnte nachgewiesen werden, dass *TRAIL*-MSC in ausgewählten CRC-Zelllinien eine Resistenz für *TRAIL* überwinden können. Systemisch applizierte *TRAIL*-MSC zeigten aufgrund eines pulmonalen Tropismus keinen Einfluss auf das Wachstum von CRC-Xenograften. Aus den Ergebnissen leitet sich ab, dass *TRAIL*-MSC für eine therapeutische Anwendung bei CRC prinzipiell geeignet sein könnten, die Realisierung dieses Ansatzes jedoch weitere präklinische Untersuchungen verlangt. Insbesondere ist eine Steigerung der Tumorintegration von *TRAIL*-MSC für eine klinische Effektivität entscheidend. Ansätze bestehen in der Vorbehandlung von Tumoren oder einer gezielten zusätzlichen Manipulation der *TRAIL*-MSC. Angesichts der Kosten zelltherapeutischer Ansätze bietet die Untersuchung von *TRAIL*-MSC aber auch die Aussicht, Erkenntnisse zur Generierung und therapeutischen Nutzung von zell-unabhängigen, *TRAIL*-tragenden Vehikeln zu gewinnen.

Mit den vorgestellten Arbeiten wurden erstmals *TRAIL*-MSC-resistente CRC-Zellen identifiziert. Diese konnten *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* durch subapoptotische genotoxische Schädigung für *TRAIL*-MSC sensitiviert werden.

Diese Ergebnisse tragen zur Kenntnis der Biologie der *TRAIL*-induzierten Apoptose in Tumorzellen bei. Für den klinischen Einsatz von *TRAIL*, seinen Agonisten oder *TRAIL*-MSC

sollte die Identifikation von Markern der TRAIL-Sensitivität ein Ziel weiterer Untersuchungen sein. Unabhängig hiervon verspricht die Kombination von TRAIL-basierten Verfahren mit TRAIL-sensitivierenden Substanzen eine klinische Wirksamkeit.

Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass MSC lebenslang im Organismus unter Erhalt ihrer Funktionalität ohne maligne Transformation aber mit der Fähigkeit zur Integration in maligne Tumoren und zur Förderung deren Wachstums persistieren. Es lässt sich weiter ableiten, dass MSC mit lentiviraler *TRAIL*-Expression das Wachstum von CRC inhibieren können, dass aber für eine klinische Anwendung von *TRAIL*-MSC weitere präklinische Arbeiten zur Optimierung der Tumorintegration und Überwindung von Resistenzen notwendig sind.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R, Wahl GM. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* 8, 145-55 (1998).
- Alves H, Munoz-Najar U, De Wit J, Renard AJ, Hoeijmakers JH, Sedivy JM, Van Blitterswijk C, De Boer J. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *J Cell Mol Med* 14, 2729-38 (2010).
- Ando S, Abe R, Sasaki M, Murata J, Inokuma D, Shimizu H. Bone marrow-derived cells are not the origin of the cancer stem cells in ultraviolet-induced skin cancer. *Am J Pathol* 174, 595-601 (2009).
- Andrews PW, Bronson DL, Benham F, Strickland S, Knowles BB. A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *Int J Cancer* 26, 269-80 (1980).
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-30 (2002).
- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-Based Targeting of Apoptosis in Cancer: The Potential of Recombinant Human Apoptosis Ligand 2/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26, 3621-30 (2008).
- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 26, 3068-74 (2008).
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tislijar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56, 405-415 (2007).
- Avital I, Moreira AL, Klimstra DS, Leversha M, Papadopoulos EB, Brennan M, Downey RJ. Donor-derived human bone marrow cells contribute to solid organ cancers developing after bone marrow transplantation. *Stem Cells* 25, 2903-9 (2007).
- Baader E, Toloczko A, Fuchs U, Schmid I, Beltinger C, Ehrhardt H, Debatin KM, Jeremias I. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects. *Cancer Res* 65, 7888-95 (2005).
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108, 863-8 (2003).
- Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell* 7, 656-70 (2010).
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22, 675-82 (2004).
- Berger M, Muraro M, Fagioli F, Ferrari S. Osteosarcoma derived from donor stem cells carrying the Norrie's disease gene. *N Engl J Med* 359, 2502-4 (2008).
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. 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, 9142-9 (2007).
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313-9 (2008).
- Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr Opin Immunol* 17, 180-6 (2005).
- Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E. DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 16-29 (2011).

- Boyum A. 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 (1968).
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179, 56-65 (2005).
- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169, 338-46 (2006).
- Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12, 432-8 (2002).
- Cao J, Tan MH, Yang P, Li WL, Xia J, Du H, Tang WB, Wang H, Chen XW, Xiao HQ. Effects of adjuvant chemotherapy on bone marrow mesenchymal stem cells of colorectal cancer patients. *Cancer Lett* 263, 197-203 (2008).
- Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-50 (1991).
- Casper J, Schmoll HJ, Schnaidt U, Fonatsch C. Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl* 10, 105-13 (1987).
- Christopeit M, Schendel M, Foll J, Muller LP, Keysser G, Behre G. 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, 1062-4 (2008).
- Ciavarella S, Dominici M, Dammacco F, Silvestris F. Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy. *Stem Cells Dev* 20, 1-10 (2011).
- Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36, 184-204 (2007).
- Cogle CR, Theise ND, Fu D, Ucar D, Lee S, Guthrie SM, Lonergan J, Rybka W, Krause DS, Scott EW. Bone marrow contributes to epithelial cancers in mice and humans as developmental mimicry. *Stem Cells* 25, 1881-7 (2007).
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-8 (2000).
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-72 (2006).
- Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H, Bryan M, Taborga M, Srinivas V, Packman K, Patel PS, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS ONE* 3, e2563 (2008).
- 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, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-13 (2008).
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet* 375, 1030-47 (2010).
- d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8, 512-22 (2008).
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-13 (2006).
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 25, 315-9 (2000).
- Dansranjavin T, Krehl S, Mueller T, Mueller LP, Schmoll HJ, Dammann RH. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. *Cell Cycle* 8, 916-24 (2009).
- de Jong J, Looijenga LH. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog* 12, 171-203 (2006).
- Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-807 (2008).

- Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, Brendel C. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84, 722-7 (2005).
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 64, 8492-5 (2004).
- Dittmer A, Schunke D, Dittmer J. PTHrP promotes homotypic aggregation of breast cancer cells in three-dimensional cultures. *Cancer Lett* 260, 56-61 (2008).
- Dittmer A, Hohlfeld K, Lützkendorf J, Müller LP, Dittmer J. Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 66, 3053-65 (2009).
- Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-44 (2003).
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-7 (2006).
- Drosopoulos KG, Roberts ML, Cermak L, Sasazuki T, Shirasawa S, Andera L, Pintzas A. Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 22856-67 (2005).
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-71 (1998).
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650-9 (1986).
- Dwyer RM, Khan S, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther* 1, 25 (2010).
- Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22, 3842-52 (2003).
- Ehteshami M, Kabos P, Gutierrez MA, Chung NH, Griffith TS, Black KL, Yu JS. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 62, 7170-4 (2002).
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-90 (1966).
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-47 (1968).
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403 (1970).
- Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-811 (2006).
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169, 12-20 (2001).
- Garcia S, Bernad A, Martin MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la Fuente R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316, 1648-50 (2010).
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 70, 6945-56 (2010).
- Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 211, 27-35 (2007).

- Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29, 4752-65 (2010).
- Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 21, 1641-55 (2010).
- Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, De Santis G, Spano C, Tagliazzucchi M, Barti-Juhasz H, Scarabelli L, Bambi F, Frassoldati A, Rossi G, Casali C, Morandi U, Horwitz EM, Paolucci P, Conte P, Dominici M. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 70, 3718-29 (2010).
- Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ, Tuan RS. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol* 30, 9-20 (2005).
- Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil and Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *J Clin Oncol* 29, 1465-71 (2011).
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508-25 (2010).
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116, 4077-85 (2003).
- He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 25, 69-77 (2007).
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. 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, 8932-7 (2002).
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-5 (2005).
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306, 1568-71 (2004).
- Houghton J, Li H, Fan X, Liu Y, Liu JH, Rao VP, Poutahidis T, Taylor CL, Jackson EA, Hewes C, Lyle S, Cerny A, Bowen G, Cerny J, Moore N, Kurt-Jones EA, Erdman SE. Mutations in bone marrow-derived stromal stem cells unmask latent malignancy. *Stem Cells Dev* 19, 1153-66 (2010).
- Huls M, Russel FG, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 3-9 (2009).
- Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175-82 (2002).
- Jenq RR, van den Brink MR. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 213-21 (2010).
- Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 26, 789-97 (2008).
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9. (2002).
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggiero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820-7 (2005).

- Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 66, 11089-93 (2006).
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-63 (2007).
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7, 33-40 (2001).
- Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res* 35, 7557-65 (2007).
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358, 2039-49 (2008).
- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203, 1235-47 (2006).
- Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* 10, 657-67 (2008).
- Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward WA, Munshi A, Meyn RE, Cox JD, Andreeff M, Marini FC. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 67, 11687-95 (2007).
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29, 11-9 (2011).
- Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 27, 1050-6 (2009).
- Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W. 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, 1675-81 (1999).
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. 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, 307-16 (2000).
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101, 3722-9. (2003).
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 386-98 (2006a).
- Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 6, 435-41 (2006b).
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 67, 6304-13 (2007).
- Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, Sivina M, Wierda WG, Estrov Z, Keating MJ, Shehata M, Jager U, Gandhi V, Kay NE, Plunkett W, Burger JA. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 114, 4441-50 (2009).
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 70, 1780-7 (2000).

- Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* 61, 1645-51 (2001).
- Le Blanc K, Frassoni 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, Ringden O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-86 (2008).
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281, 33554-65 (2006).
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5, 54-63 (2009).
- Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 510-6 (1994).
- Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol* 127, 326-34 (2004).
- Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkeson GS, Sun L. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 69, 1423-9 (2010).
- Liedtke S, Enczmann J, Waclawczyk S, Wernet P, Kogler G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 364-6 (2007).
- Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Taborga M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P. Gap Junction-Mediated Import of MicroRNA from Bone Marrow Stromal Cells Can Elicit Cell Cycle Quiescence in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 71, 1550-60 (2011).
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-15 (1993).
- Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer. *Cancer Res* 69, 4134-42 (2009).
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-72 (2002).
- Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Caysa H, Nerger K, Schmoll HJ. Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *J Cell Mol Med* 14, 2292-304 (2010).
- Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med* 49, 1-4 (2008).
- Lund TC, Kobs A, Blazar BR, Tolar J. Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions. *Cytotherapy* 12, 971-81 (2010).
- Malhi H, Gores GJ. TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? *Oncogene* 25, 7333-5 (2006).
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9182-7 (2005).
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361, 2449-60 (2009).
- Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 18, 477-90 (2010).
- McAllister SS, Weinberg RA. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol* 28, 4022-8 (2010).
- McGovern M, Voutev R, Maciejowski J, Corsi AK, Hubbard EJ. A "latent niche" mechanism for tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11617-22 (2009).

- Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl JA, Micci F, Myklebost O, Collas P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *J Cell Mol Med* 12, 553-63 (2008).
- Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68, 4331-9 (2008).
- Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 69, 1255-8 (2009).
- Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, van Pel M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol* 219, 294-305 (2009).
- Mohseny AB, Hogendoorn PC. Mesenchymal Tumors: When Stem Cells Go Mad. *Stem Cells* Jan 7. [Epub ahead of print], Accession number 21218449 (2011).
- Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 20, 8085-91 (2001).
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611 (2008).
- Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 19, 1449-70 (2010).
- Mueller LP. in: Kompendium Internistische Onkologie. eds. Schmoll, HJ, Höffken, K, Possinger, K (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York), 2333-60 (2005).
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 24, 2753-65 (2006).
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Widder M, Nerger K, Caysa H, Mueller T. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSC) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 18, 229-239 (2011).
- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839-49 (2004).
- Mueller T, Voigt W, Simon H, Fruehauf A, Bulankin A, Grothey A, Schmoll HJ. Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63, 513-21 (2003).
- Mueller T, Luetzkendorf J, Nerger K, Schmoll HJ, Mueller LP. 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, 495-503 (2009).
- Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64, 1331-7 (2004).
- Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8, 437-44 (2006).
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65, 3307-18 (2005).
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177, 2080-7 (2006).
- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-506 (2007).
- Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 17, 171-7 (1999).

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6 (2000).
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 126-31 (2011).
- Ogawa M, LaRue AC, Drake CJ. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood* 108, 2893-6 (2006).
- Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 75, 248-55 (2003).
- Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 9, 115-28 (2008).
- Orimo A, Weinberg RA. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther* 6, 618-9 (2007).
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-902 (2007).
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7 (1999).
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-73 (2009).
- Prata Kde L, Orellana MD, De Santis GC, Kashima S, Fontes AM, Carrara Rde C, Palma PV, Neder L, Covas DT. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. *Exp Hematol* 38, 292-300 e4 (2010).
- Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17, 939-46 (2009).
- Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, Simmons PJ, Sensebe L, Keating A. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 12, 576-8 (2010).
- Prost S, Bellamy CO, Clarke AR, Wyllie AH, Harrison DJ. p53-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett* 425, 499-504 (1998).
- Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 18, 500-7 (2008).
- Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19, 257-72 (2011).
- Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* 26, 2332-8 (2008).
- Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, Reufi B, Blau WI, Thiel E, Knauf WU. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 33, 605-11 (2005).
- Riggi N, Suva ML, De Vito C, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Cironi L, Janiszewska M, Petricevic T, Suva D, Tercier S, Joseph JM, Guillou L, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* 24, 916-32 (2010).
- Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670-3 (2009).
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69, 5331-9 (2009).

- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stem cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132, 681-96 (2008).
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65, 3035-9 (2005).
- Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Pure E. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest* 119, 3613-25 (2009).
- Sato T, Neschadim A, Konrad M, Fowler DH, Lavie A, Medin JA. Engineered human tmprk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. *Mol Ther* 15, 962-70 (2007).
- Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28, 2925-39 (2009).
- Schmoll HJ. S-1 for advanced colorectal cancer: do we need another oral fluorouracil prodrug? *Lancet Oncol* 11, 808-9 (2010).
- Scott RW, Hooper S, Crighton D, Li A, Konig I, Munro J, Trivier E, Wickman G, Morin P, Croft DR, Dawson J, Machesky L, Anderson KI, Sahai EA, Olson MF. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J Cell Biol* 191, 169-85 (2010).
- Sell S. Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol* 27, 59-70 (2006).
- Serakinci N, Guldborg P, Burns JS, Abdallah B, Schrodder H, Jensen T, Kassem M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23, 5095-8 (2004).
- Shah K, Tung CH, Yang K, Weissleder R, Breakefield XO. Inducible release of TRAIL fusion proteins from a proapoptotic form for tumor therapy. *Cancer Res* 64, 3236-42 (2004).
- Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-13 (2007).
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127, 2323-33 (2010).
- Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y, Wang J, Zalucha S, Loberg RD, Pienta KJ, Taichman RS. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia* 12, 116-27 (2010).
- Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741-51 (2010).
- Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 322, 1498-501 (2008).
- Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-62 (2001).
- Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428-32 (2009).
- Stell A, Belcredito S, Ramachandran B, Biserni A, Rando G, Ciana P, Maggi A. Multimodality imaging: novel pharmacological applications of reporter systems. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51, 127-38 (2007).
- Stock P, Staege MS, Müller LP, Sgodda M, Völker A, Volkmer I, Lützkendorf J, Christ B. Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant Proc* 40, 620-3 (2008).
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129, 163-73 (2008).
- Studeniy M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62, 3603-8. (2002).
- Studeniy M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96, 1593-603 (2004).
- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26, 495-502 (2005).

- Tapia N, Scholer HR. p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *J Exp Med* 207, 2045-8 (2010).
- Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Spingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebe L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549-53 (2010).
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-58 (2003).
- Tillman DM, Izeradjene K, Szucs KS, Douglas L, Houghton JA. 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, 5118-25 (2003).
- Todoerti K, Lisignoli G, Storti P, Agnelli L, Novara F, Manferdini C, Codeluppi K, Colla S, Crugnola M, Abeltino M, Bolzoni M, Sgobba V, Facchini A, Lambertenghi-Deliliers G, Zuffardi O, Rizzoli V, Neri A, Giuliani N. Distinct transcriptional profiles characterize bone microenvironment mesenchymal cells rather than osteoblasts in relationship with multiple myeloma bone disease. *Exp Hematol* 38, 141-53 (2010).
- Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, Lonning PE, Primon M, Sobala E, Tonn JC, Goldbrunner R, Schichor C, Mysliwicz J, Lah TT, Motaln H, Knappskog S, Bjerkvig R. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res* 70, 6393-6 (2010).
- Toscano F, Fajoui ZE, Gay F, Lalaoui N, Parmentier B, Chayvialle JA, Scoazec JY, Micheau O, Abello J, Saurin JC. P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells. *Oncogene* 27, 4161-71 (2008).
- Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Roder C, Kalthoff H, Wajant H. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25, 7434-9 (2006).
- Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, Thompson JC, Caserta E, Wang H, Chong JL, Naidu S, Wei G, Sharma SM, Stephens JA, Fernandez SA, Gurcan MN, Weinstein MB, Barsky SH, Yee L, Rosol TJ, Stromberg PC, Robinson ML, Pepin F, Hallett M, Park M, Ostrowski MC, Leone G. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 461, 1084-91 (2009).
- Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 7, 20-3 (2000).
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-36 (2008).
- Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145-8 (2009).
- Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v93-7 (2010).
- VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvak Z, Chuah MK. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood* 114, 1461-8 (2009).
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 36, 165-75 (2003a).
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-49 (2003b).
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-63 (1999).
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 489-99 (2009).

- Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 27, 6207-15 (2008).
- Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7, 509-19 (2005).
- Williams AC, Smartt H, AM HZ, Macfarlane M, Paraskeva C, Collard TJ. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 14, 137-45 (2007).
- Worthley DL, Ruzskiewicz A, Davies R, Moore S, Nivison-Smith I, Bik To L, Browett P, Western R, Durrant S, So J, Young GP, Mullighan CG, Bardy PG, Michael MZ. Human Gastrointestinal Neoplasia-Associated Myofibroblasts Can Develop from Bone Marrow-Derived Cells Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Stem Cells* 27, 1463-1468 (2009).
- Wu C, Nik-Amini S, Nadesan P, Stanford WL, Alman BA. Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 70, 7690-8 (2010).
- Yang M, Li L, Jiang P, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14259-62 (2003).
- Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS. Interleukin-23-expressing bone marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res* 66, 2630-8 (2006).
- Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebull P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 25, 1675-80 (2007).
- Zhang L, Ren X, Alt E, Bai X, Huang S, Xu Z, Lynch PM, Moyer MP, Wen XF, Wu X. Chemoprevention of colorectal cancer by targeting APC-deficient cells for apoptosis. *Nature* 464, 1058-61 (2010).
- Zischek C, Niess H, Ischenko I, Conrad C, Huss R, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns C. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 250, 747-53 (2009).
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-28 (2001).

8 ANLAGE

8.1 ORIGINALARBEITEN DES AUTORS ZUM INHALT DER ARBEIT

Mueller LP*, Luetzkendorf J*, Widder M, Nerger K, Caysa H, Mueller T. *TRAIL*-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (*TRAIL*-MSC) overcome TRAIL-resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 18, 229-39 (2011). (* contributed equally)

Luetzkendorf J*, **Mueller LP***, Mueller T*, Caysa H, Nerger K, Schmoll HJ. Growth-inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *J Cell Mol Med* 14, 2292-304 (2010). (* contributed equally)

Mueller T, **Mueller LP**, Holzhausen HJ, Witthuhn R, Albers P, Schmoll HJ. Histological evidence for the existence of germ cell tumor cells showing embryonal morphology but lacking OCT4 expression and cisplatin sensitivity. *Histochem Cell Biol* 134, 197-204 (2010).

Mueller T, Luetzkendorf J, Nerger K, Schmoll HJ, **Mueller LP**. 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, 495-503 (2009).

Dittmer A, Hohlfeld K, Luetzkendorf J, **Mueller LP**, Dittmer J. Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 66, 3053-65 (2009).

Dansranjavin T, Krehl S, Mueller T, **Mueller LP**, Schmoll HJ, Dammann RH. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. *Cell Cycle* 15, 916-24 (2009).

Stock P, Staeger MS, **Müller LP**, Sgodda M, Völker A, Volkmer I, Lützkendorf J, Christ B. Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplantation Proceedings* 40, 620-3 (2008).

Aurich I* **Mueller LP***, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger M, Schormann W, Walldorf J, Hengstler J, Fleig WE, Christ B. Functional integration of human mesenchymal stem cell-derived hepatocytes into mouse livers. *Gut* 56, 405-15 (2007). (* contributed equally)

Mueller LP, Luetzkendorf, J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy - evidence of resistance to apoptosis-induction. *Stem Cells* 24, 2753-65 (2006).

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

8.2 THESEN

1. MSC scheinen in zahlreichen Geweben des humanen Organismus als perivaskuläre Zellen zu existieren und lassen sich u. a. aus adultem, humanem Knochenmark isolieren. Es bestand daher die Annahme, dass MSC über Mechanismen der Resistenz gegenüber genotoxischer Schädigung verfügen, die ihnen eine lebenslange funktionelle Persistenz im adulten Organismus erlauben.
2. MSC zeigen Charakteristika multipotenter Stammzellen, verfügen über ein immunmodulatorisches Potential und scheinen in humane maligne Tumoren zu integrieren. Hierauf gründet sich die Vermutung, dass MSC ähnlich wie pluripotente Stammzellen als Ursprungszelle maligner Tumoren fungieren oder das Wachstum maligner Tumoren beeinflussen. Gleichzeitig leitet sich hieraus ab, dass MSC als Vehikel für eine tumorspezifische Therapie dienen könnten.
3. Von Patienten mit chemotherapeutischer Vorbehandlung ließen sich MSC isolieren, die sich hinsichtlich der für MSC definierenden Charakteristika, einschließlich eines immunmodulatorischen Potentials, nicht von MSC gesunder Spender unterschieden. Dies unterstützte die Annahme einer inhärenten Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung.
4. MSC zeigten *in vitro* im Vergleich zu sensitiven TGCT-Zellen eine relative Resistenz gegenüber Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen und behielten nach Schädigung in klinisch relevanter Dosierung ihre definierenden Charakteristika bei. Die postulierte Resistenz von MSC gegenüber genotoxischer Schädigung konnte hiermit bewiesen werden.
5. Gegenüber sensitiven Zellen zeigten MSC für Schädigung mit Cisplatin eine erhöhte apoptotische Schwelle, die durch eine fehlende Zunahme der Caspase-9-Aktivität bei Cisplatin-induzierter Apoptose gekennzeichnet war. Damit konnte ein spezifischer Resistenzmechanismus in MSC identifiziert werden, der potentiell zur lebenslangen Persistenz von MSC im humanen adulten Organismus beiträgt.
6. Die subapoptotische Schädigung durch Cisplatin und Etoposid resultierte in MSC in einem p53-assoziierten temporären Zellzyklusarrest unter Erhalt der MSC-definierenden Charakteristika. Dies unterstützt die Annahme, dass eine spezifische Zellzyklusregulation die Existenz von MSC als langsam proliferierende Zellpopulation mit niedrigem Transformationsrisiko im humanen, adulten Organismus erlaubt.

7. MSC zeigten eine für Stammzellen typische, epigenetisch regulierte Genexpression und eine Plastizität des Differenzierungspotentials. Jedoch fand sich in MSC keine funktionelle Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors OCT4 sowie kein Anhalt für eine maligne Transformation. Dies widerspricht der Annahme, dass MSC aufgrund einer Pluripotenz für eine maligne Transformation prädestiniert sind.
8. Es konnte eine Integration von MSC in subkutane CRC-Xenografte nach systemischer Applikation demonstriert werden. Tumorintegrierte MSC förderten spezifisch das Wachstum subkutaner CRC-Xenografte. Die *In-vitro*-Untersuchungen unterstützten dabei die Annahme, dass MSC insbesondere die Ausbildung des Tumorstroma von CRC fördern.
9. Für CRC-Zelllinien wurde *in vitro* eine differentielle Sensitivität für sTRAIL ohne Assoziation zur Expression von TRAIL-Rezeptoren beobachtet. Nach Transduktion mit einem lentiviralen *TRAIL*-Konstrukt zeigten MSC eine stabile Expression von membranständigem TRAIL ohne Verlust ihrer definierenden Charakteristika. Daraus läßt sich ableiten, dass MSC mit *TRAIL*-Expression geeignet sein könnten, das Wachstum von CRC zu inhibieren.
10. Bei direktem Zell-Zell-Kontakt inhibierten *TRAIL*-MSC *in vitro* und im Mischxenograftmodell das Wachstum sowohl von TRAIL-sensitiven als auch von TRAIL-resistenten CRC-Zellen durch eine, auf die Expression von TRAIL zurückzuführende Apoptoseinduktion. Damit konnte nachgewiesen werden, dass *TRAIL*-MSC in ausgewählten CRC-Zelllinien eine Resistenz für TRAIL überwinden können.
11. Das Wachstum *TRAIL*-MSC-resistenter CRC-Zellen konnte *in vitro* durch *TRAIL*-MSC kombiniert mit 5-FU in subapoptotischer Dosis inhibiert werden. Dagegen schienen *TRAIL*-MSC im Mischxenograftmodell das Wachstum *TRAIL*-MSC-resistenter CRC-Zellen zu fördern. Dies belegt, dass die Fähigkeit zur Förderung des Tumorwachstums bei der therapeutischen Anwendung genetisch modifizierter MSC berücksichtigt werden muss.
12. Entgegen den Beobachtungen im Mischxenograftmodell zeigten systemisch applizierte *TRAIL*-MSC aufgrund eines pulmonalen Tropismus mit resultierendem geringem Ausmaß der Tumorintegration keinen Einfluss auf das Wachstum subkutaner CRC-Xenografte. Für die klinische Anwendung von MSC mit Anti-Tumoraktivität ist deren effiziente Tumorintegration wesentlich.

13. Die erhobenen Ergebnisse lassen vermuten, dass MSC lebenslang im Organismus unter Erhalt ihrer Funktionalität ohne relevantes Risiko der malignen Transformation, aber mit der Fähigkeit zur Integration in maligne Tumoren und zur Förderung deren Wachstums persistieren.

14. Aus den Daten läßt sich ableiten, dass lentiviral *TRAIL*-exprimierende MSC das Wachstum von CRC inhibieren können. Für eine klinische Anwendung von *TRAIL*-MSC sind aber weitere präklinische Arbeiten zur Optimierung der Tumorintegration und Überwindung von Resistenzen notwendig.

8.3 LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name Dr. med. Lutz Peter Müller
Anschrift 06114 Halle, Rathenauplatz 5
Anschrift dienstlich Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
Onkologie / Hämatologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06120 Halle, Ernst-Grube-Str. 40
Telefon: +49 – 345 – 557 7250; Fax: +49 – 345 – 557 7242
e-mail: lutz.mueller@uk-halle.de

Geburtsdatum 04.10.1970
Geburtsort Bleicherode
Familienstand ledig, 1 Kind
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

09/1977 - 08/1987 Polytechnische Oberschule, Halle
09/1987 - 08/1989 Erweiterte Oberschule, Abitur, Halle

Wehr- und Zivildienst

11/1989 - 01/1990 Wehrdienst
06/1990 - 06/1991 Zivildienst

Studium

09/1991 – 11/1998 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/1994 Laborpraktikum, Dept. of Haematology, University of Wales, College of Medicine, Großbritannien
11/1996 - 09/1997 Studien- und Forschungsaufenthalt, Molecular Genetics Program / Section on Infectious Diseases, Dept. of Medicine, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA
10/1997 – 09/1998 Praktisches Jahr in den Fächern Anästhesiologie (Halle), Chirurgie (Lachen, Schweiz), Innere Medizin (Halle)
11/1998 3. Staatsexamen

Beruf und Weiterbildung

- 01/1999 – 07/1999 Research Fellow, Section on Infectious Diseases, Dept. of Medicine, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA
- 09/1999 - 02/2001 Arzt im Praktikum, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; klinische Tätigkeit vorrangig im Bereich der ambulanten Versorgung von Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen
- 03/2001 – 04/2005 Assistenzarzt, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; klinische Tätigkeit im Bereich der stationären und ambulanten Versorgung von Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen
- 07/2001 – 06/2004 Projektleiter der Juniorgruppe „Funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung humaner adulter mesenchymaler Stammzellen und deren kardiomyogene Differenzierung“, Wilhelm-Roux-Programm, MLU, Halle (NBL-3 Förderung durch BMBF und Land Sachsen-Anhalt; FKZ 1/09; 3/15; 6/08)
- Juni 2003 Erwerb des Sachkundenachweis “Tierschutz / Versuchstierkunde für tierexperimentell tätige Mitarbeiter”, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 05/2005 – 01/2010 Assistenzarzt, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; klinische Tätigkeit vorrangig im Bereich der stationären und ambulanten Versorgung von Patienten mit autologer oder allogener Stammzelltransplantation
- Seit 2005 regelmäßige Teilnahme an Fortbildungen zu GMP
- Seit 2007 Projektverantwortlicher der Nachwuchsgruppe „Proliferation und Differenzierung von Tumorstammzellen und adulten Stammzellen – Konzepte zur Biologie und Therapie maligner Tumoren“ (Förderung durch das Land Sachsen-Anhalt; FKZ: 3646A/0907)
- 05/2008 Teilnahme an der DFG-Nachwuchsakademie Klinische Studien, Bad Nauheim
- Seit 07/2008 Stellvertretender Vorsitzender des wissenschaftlichen Beirates des Zentrums für Zell- und Gentherapie am Universitätsklinikum Halle
- 07/2008 Erwerb des Zertifikates der Deutschen Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM) "Sonographie-Kurs - Abdomen, Retroperitoneum, Thorax und Schilddrüse"
- 09/2008 Erwerb der Facharztbezeichnung „Innere Medizin“

02/2009 Teilnahme an der Fortbildung „Prüfarzt“, Koordinierungszentrum Klinische Studien Halle

seit 02/2010 Oberarzt, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Leitung Station I12 (allogene Stammzelltransplantation); klinische Tätigkeit vorrangig im Bereich der stationären und ambulanten Versorgung von Patienten mit autologer oder allogener Stammzelltransplantation

04/2010 Erwerb der Facharztbezeichnung „Innere Medizin und Hämatologie und Onkologie“

seit 08/2010 Leitung der Ambulanz Stammzelltransplantation, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Promotion

05.12.2000 Promotion, Thema: „Typisierung der HLA-DPB1-Allele und HLA-Assoziation der Chronisch Lymphatischen Leukämie“, Note: Magna cum Laude, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Betreuung durch Prof. Dr. J. Langner

Mitgliedschaften

Seit 2008 Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin

Seit 2009 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

Seit 2009 Deutsche Gesellschaft für Gentherapie

Sonstiges

08 - 09/1993 Stipendiat des DAAD, Sprachkurs, Language Centre University of Bristol, Großbritannien

12/1993 First Certificate in English, University of Cambridge

10/1994 - 12/1998 Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung

10/1995 Test of English as a Foreign Language (TOEFL)

8.4 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich noch keinen früheren Habilitationsversuch unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität durch meine Person ein Habilitationsverfahren anhängig ist.

Weiterhin erkläre ich hiermit, dass ich die Habilitationsschrift selbstständig verfasst habe und nur die in der Arbeit gekennzeichneten Arbeitsmittel und Quellen verwendet habe.

Halle, den 07.05.2011

Dr. Lutz P. Müller

DANKSAGUNG

Ich danke all jenen, deren Arbeit und Rat, Zuspruch und Kritik zum Gelingen dieser Arbeit und der in ihr dargestellten Untersuchungen beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Hans-Joachim Schmoll, Direktor der Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für dessen Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Die Initiierung der Arbeiten zur Untersuchung von MSC geht in wesentlichem Maß auf sein Engagement zurück. Ohne seine stete, unterstützende und inhaltlich anregende Anteilnahme hätten die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Projekte nicht entwickelt werden können.

Ich danke der Arbeitsgruppe im Forschungslabor der Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, insbesondere Dr. Jana Lützkendorf, Dr. Thomas Müller, Katrin Nerger, Miriam Widder, Franziska Reipsch und Henrike Caysa. Ihre praktische Arbeit und wissenschaftliche Diskussion liegt den dargestellten Ergebnissen in großem Maße zugrunde. Ohne ihr eigenständiges Arbeiten wären einige der Projekte in den schwierigen Phasen der vergangenen Jahre nicht fortführbar gewesen. Weiterhin danke ich allen in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Kooperationspartnern für ihre kollegiale Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern des Labors von Prof. Charles „Cash“ McCall und insbesondere dabei Barbara Yoza, PhD und Jonathan Wells, BS, Wake Forest University, Winston-Salem, USA danke ich für die Inspiration zum wissenschaftlichen Arbeiten und die Demonstration, dass ein solches in einer inhaltlich kompetitiven, aber menschlich respektvollen Atmosphäre eine wirkliche Erfüllung ist.

Meinen Eltern danke ich nicht nur für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten in „klammen“ Zeiten, sondern insbesondere für die vorgelebten Prinzipien von Zielstrebigkeit und Verlässlichkeit, ohne die mein Arbeiten nicht erfolgreich gewesen wäre.

Susann, Henni, Max und Frieder danke ich für ihre unbedingte Unterstützung und Bereitschaft zum Verzicht auf gemeinsame Zeit. Ich hoffe, dass wir hiervon in Zukunft mehr haben werden.