

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Treede  
Leiter Forschung: Prof. Dr. rer. nat. A. Simm

**Beeinflussung der Migration hämatopoetischer Stammzellen  
durch Zellen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Alexander Koch  
geboren am 25.10.1984 in Halle (Saale)

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. rer. medic. habil. B. Bartling  
Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Bornhäuser (Dresden)  
2. apl. Prof. PD Dr. rer. nat. J. Dittmer  
3. PD Dr. rer. nat. rer. medic. habil. B. Bartling

26.01.2017

15.12.2017

## Referat und bibliografische Daten

Zelluläre Komponenten des Tumorstromas haben beispielweise durch Förderung der Tumervaskularisierung einen entscheidenden Anteil an der Progression von soliden Tumorentitäten, so auch dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Obwohl auch hämatopoetische Stammzellen (HSCs) als zelluläre Bestandteile des Tumorstromas gelten, die zur Tumorprogression beitragen, ist es jedoch unklar, ob diese direkt durch die Tumorzellen und/oder andere Komponenten des Tumorstromas angelockt werden.

Daher sollte in dieser Arbeit der zellmigratorische Einfluss von Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (H358, H322) sowie primären Lungenfibroblasten (WI-38), ein weiterer essentieller Bestandteil des Tumorstromas, auf HSCs mit den Oberflächenantigenen CD34 und/oder CD133 untersucht werden.

Kokultur-Migrations-Assays mittels *Transwell*-Einsätzen mit einer Porengröße von 3 und 8  $\mu\text{m}$  zeigten, dass CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs, nicht aber CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>-HSCs oder CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs, sowohl von den Lungenkarzinomzelllinien als auch von den Lungenfibroblasten zur Migration angeregt werden.

Als potentielle Mediatoren der Migrationssteigerung der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs durch die untersuchten Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten wurden Faktoren des IGF-Systems identifiziert. So zeigten *Transwell*-Migrations-Assays mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$ , dass vor allem die IGFBPs (*insulin-like growth factor binding proteins*) -2 und -4 die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs steigern.

Zusammenfassend hat diese Arbeit nachgewiesen, dass CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen als Subtyp der hämatopoetischen Stammzellen durch die chemotaktische Wirkung der IGFBP-2 und -4, welche sowohl von den Lungenkarzinomzellen (H358, H322) als auch der Lungenfibroblasten sezerniert werden, in den soliden Tumor gelangen und somit zur Tumorprogression beitragen können.

Koch, Alexander: Beeinflussung der Migration hämatopoetischer Stammzellen durch Zelllinien des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1.) Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.) Zellmigration .....	1
1.2.) IGF-System .....	3
1.2.1.) IGF-I und IGF-II .....	3
1.2.2.) IGF-IR und IGF-IIR .....	4
1.2.3.) IGF-Bindungsprotein-Superfamilie.....	5
1.2.4.) IGF und Tumor.....	6
1.3.) Hämatopoetische Stammzellen und endotheliale Progenitorzellen .....	7
1.4.) Lungenkarzinom.....	9
1.4.1.) Tumorprogress solider Tumore .....	10
1.5.) Zielstellung .....	11
<b>2.) Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1.) Materialien.....	12
2.1.1.) Chemikalien .....	12
2.1.2.) Verbrauchsmaterialien .....	13
2.1.3.) Geräte.....	13
2.1.4.) Auswertungssoftware.....	15
2.2.) Methoden.....	15
2.2.1.) Zellkultivierung .....	15
2.2.2.) Stammzellisolierung, -kultivierung und -sortierung .....	16
2.2.3.) Durchflusszytometrie.....	18
2.2.4.) Indirekte Kokultur.....	18
2.2.5.) <i>Transwell-Assay</i> .....	19
2.2.6.) RNA-Isolation .....	21
2.2.7.) Agarose-Gelelektrophorese .....	23
2.2.8.) RNA-Expressionsanalyse.....	24

<b>3.) Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1.) Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.....	27
3.2.) Einfluss von Lungenzellen auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen .....	29
3.3.) Analyse potentiell migrationsfördernder Faktoren .....	32
3.4.) Einfluss löslicher Komponenten des IGF-Systems auf die Migration der CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup> -Stammzellen.....	36
<b>4.) Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>5.) Literaturverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
<b>Publikation.....</b>	<b>56</b>
<b>6.) Thesen.....</b>	<b>57</b>
<b>Erklärungen .....</b>	<b>VII</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>IX</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>X</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Übersicht über das IGF-System.....	2
<b>Abbildung 2</b> Schematische Darstellung des IGF-IR (A) und des IGF-IIR (B).....	4
<b>Abbildung 3</b> Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. ....	8
<b>Abbildung 4</b> Auftrennung des <i>Buffy Coat</i> -Blutes. ....	16
<b>Abbildung 5</b> Versuchsanordnung des <i>Transwell</i> -Assays.....	20
<b>Abbildung 6</b> RNA-Isolierung mit Trizol <sup>®</sup> -Reagenz. ....	22
<b>Abbildung 7</b> Anzahl und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.....	28
<b>Abbildung 8</b> Anzahl migrierter Stammzellen in <i>Transwell</i> -Assays mit 8- bzw. 3- $\mu$ m-Poren. ....	31
<b>Abbildung 9</b> Expression der IGF-Rezeptoren (IGF-IR und IGF-IIR) in hämatopoetischen Stammzellen.....	33
<b>Abbildung 10</b> Expression der IGF-Bindungsproteine in den Lungenzellen.....	35
<b>Abbildung 11</b> Migrationsveränderung von CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup> & CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> -Stammzellen durch ausgewählte lösliche Faktoren des IGF-Systems im <i>Transwell</i> -Assay. ....	38
<b>Abbildung 12</b> Schematisches Modell der Tumervaskularisierung (modifiziert nach Richardson <i>et al.</i> , 2011). ....	41

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Bindungsaffinitäten für IGF-I und IGF-II an den beiden IGF-Rezeptoren. ....	5
<b>Tabelle 2</b> RGD-Sequenz in der C-terminalen Domäne von IGFBP-1 und -2. ....	6
<b>Tabelle 3</b> Verteilung histologischer Subtypen des Lungenkarzinoms. ....	9
<b>Tabelle 4</b> Rekombinante humane (rh) Faktoren des IGF-Systems für <i>Transwell</i> -Assays. ....	21
<b>Tabelle 5</b> Humane Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
<b>Tabelle 6</b> Basale Migration hämatopoetischer Stammzellen im <i>Transwell</i> -Assay. ....	29
<b>Tabelle 7</b> mRNA-Expression des IGF-Systems in humanen Lungenzellen. ....	34
<b>Tabelle 8</b> Expression von IGF-I in hämatopoetischen Stammzellen.....	36
<b>Tabelle 9</b> Schematische Zusammenfassung des Einflusses von Lungenkarzinomzellen und -fibroblasten auf die Migration von HSCs. ....	40
<b>Tabelle 10</b> mRNA-Expression von Komponenten des IGF-Systems in WI-38, H358 und H322. ....	43
<b>Tabelle 11</b> IGFBP-vermittelte Migration hämatopoetischer Stammzellen in Abhängigkeit von der Konzentration. ....	44

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ALS	<i>acid-labile subunit</i> (säurelabile Untereinheit)
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BM-MSC	<i>bone marrow derived-mesenchymal stem cell</i> (aus dem Knochenmark stammende Stammzelle)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Endothelzelle
ED <sub>50</sub>	Effektive Dosis 50
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(C)EPC	<i>(circulating) endothelial progenitor cell</i> ([zirkulierende] endotheliale Progenitorzelle)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> (fokale Adhäsionskinase)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt-3L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
GH	<i>growth hormone</i> (Wachstumshormon)
GRB2	<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure

HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> (hämatopoetische Stammzelle)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> (insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF-IR/IGF-IIR	IGF-I-/ IGF-II-Rezeptor
IGFBP(s)	IGF-Bindungsprotein(e)
IGFBP-rP	IGFBP- <i>related protein</i> (IGFBP-verwandtes Protein)
IL-6	Interleukin-6
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IR	Insulinrezeptor
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
$K_D$	Dissoziationskonstante
KDR	<i>kinase insert domain-containing receptor</i>
konj.	konjugiert
M6P/M6PR	Mannose-6-Phosphat/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (mitogenaktivierte Proteinkinase)
MEK	<i>mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> (Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom)
PAC	<i>proangiogenic cell</i> (pronagiogene Zelle)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLA <sub>2</sub> , PLC	Phospholipase A <sub>2</sub> , Phospholipase C
PTH	Parathormon
R	Rezeptor

rac	Mitglied der Rho GTPase-Familie
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin (Arg), Glycin (Gly) und Asparaginsäure (Asp)
rh	<i>recombinant human</i>
RNA (mRNA, rRNA, sRNA)	Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA, ribosomal RNA, soluble RNA,</i> )
RT	Reverse Transkription
SCF	<i>stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> (Kleinzelliges Lungenkarzinom)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
Shc	= Name eines Adapterproteins
SOS	<i>son of sevenless</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i> (Tumor-assoziierte Makrophagen)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TPO	Thrombopoetin
TSH	Thyreidea stimulierendes Hormon
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
Vol.	Volumeneinheiten
WI	<i>Wistar Institute</i>
WF	Wachstumsfaktor(en)



# 1.) Einleitung

## 1.1.) Zellmigration

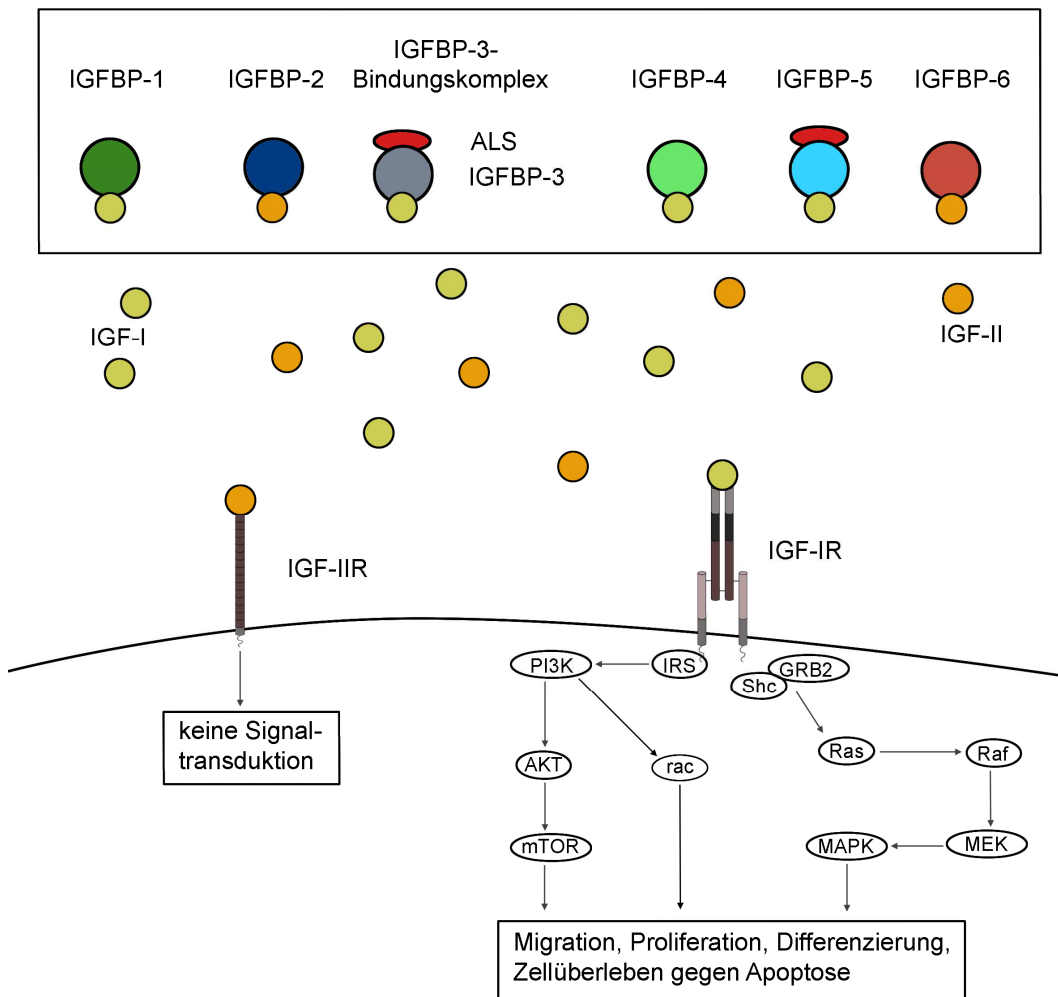
Die Zellmigration ist ein essentieller Bestandteil für die Lebensfähigkeit von Organismen. Bei Verletzungen und Entzündungsreaktionen gelangen beispielsweise Zellen des Immunsystems durch Migration an den Zielort. Auch neoplastische Zellen können sich aus ihrem Primärtumor lösen und in andere Organe migrieren, um Tumormetastasen zu bilden.

Der Begriff „Zellmigration“ umfasst sowohl die gerichtete (Chemotaxis) als auch die ungerichtete (Chemokinese) Bewegung von Zellen, welche zur Migration befähigt sind. Bei der Chemotaxis sezernieren Zellen unter anderem lösliche Faktoren, welche eine migrationsinduzierende Wirkung auf ihre Zielzellen besitzen und dadurch eine Chemotaxis auslösen (zur Übersicht Petrie *et al.*, 2009). Als Voraussetzung für diese Chemotaxis müssen die migrationsbefähigten Zielzellen in der Lage sein, diese löslichen Faktoren zu binden und zu erkennen. Im Gegensatz zu den Prokaryoten sind Eukaryoten nicht nur dazu befähigt, an ihrer Zelloberfläche lösliche Faktoren zu erkennen, sondern auch Konzentrationsunterschiede wahrzunehmen (Parent *et al.*, 1998; Weiner, 2002). Dies geschieht meist über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Je nach Faktor und Zellart werden unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert, welche wiederum das Signal über Signalkaskaden weiterleiten (Devreotes *et al.*, 2015).

Die zelluläre Signalweitergabe für chemotaktische Signale ist beispielsweise in neutrophilen Granulozyten gut untersucht. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Phosphoinositol-3-Kinase- (PI3K-) Signalkaskade bei der Weiterleitung chemotaktischer Signale eine bedeutende Rolle spielt (Servant *et al.*, 2000; Horwitz *et al.*, 2003). Die Signalweitergabe über diese PI3K-Signalkaskaden bewirkt eine Polarisierung der zur Migration befähigten Zielzelle und löst über das Aktin- bzw. Aktin-Myosin-Zytoskelett eine gerichtete Migration aus (Weiner, 2002; Devreotes *et al.*, 2015). Handelt es sich bei den löslichen Faktoren um „Lockstoffe“ (*attractant*), so liegt eine positive Chemotaxis vor und die Zielzellen migrieren gegen den Konzentrationsgradienten der Lockstoffe auf die sezernierenden Zellen zu. Eine negative Chemotaxis wird durch „abweisende Faktoren“ (*repellent*) ausgelöst und ist von den sezernierenden Zellen weg gerichtet.

Zu den migrationsinduzierenden Faktoren gehört beispielsweise der Wachstumsfaktor IGF-I (*insulin-like growth factor-I*), welcher unter anderem die Migration von Myoblasten (Lafreniere *et al.*, 2004), Neuroblasten (Hurtado-Chong *et al.*, 2009) und

BM-MSCs (*bone marrow derived-mesenchymal stem cells*; Ponte *et al.*, 2007) stimuliert. Weiterhin besitzt das IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*) -3 einen migrationsfördernden Einfluss auf HSCs (*hematopoietic stem cells*; Chang *et al.*, 2007). Diese Nachweise legen den Verdacht nahe, dass die Faktoren des IGF-Systems für die Zellmigration entscheidend sein könnten.



**Abbildung 1** Übersicht über das IGF-System.

(modifiziert nach Pollak *et al.*, 2004 und Foulstone *et al.*, 2005)

IGF-I und IGF-II binden mit unterschiedlicher Affinität an die jeweiligen IGF-Rezeptoren sowie an die IGFBPs, welche unter anderem eine regulierende Funktion ausüben. Am IGF-IR können Signalkaskaden zum Beispiel die PI3K- (Phosphoinositol-3-Kinase) oder MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) Signalkaskaden auslösen.

Weitere Abkürzungen: Akt = Proteinkinase B; mTOR = *mammalian target of rapamycin*; Shc = Adapterprotein; GRB2 = *growth-factor-receptor-bound protein 2*); Ras/Raf = kleine G-Proteine; MEK = *mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase*; ALS = *acid labile subunit*.

## 1.2.) IGF-System

Das IGF-System, welches auch "IGF-Achse" genannt wird, ist ein sehr komplexes zelluläres System. Es umfasst drei Liganden (Insulin, IGF-I und IGF-II), drei Rezeptoren (Insulinrezeptor [IR], IGF-I-Rezeptor [IGF-IR] und IGF-II-Rezeptor [IGF-IIR]) sowie sechs IGF-Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) (Abb. 1) mit ihren IGFBP-*related proteins*. Das IGF-System kontrolliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Dazu zählen neben der Migration das Wachstum, die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von Zellen bzw. Schutz vor Apoptose (zur Übersicht Denley *et al.*, 2005; King und Wong, 2012). IGF-II gilt als "pränataler Wachstumsfaktor", da die Konzentration nach der Geburt rapide absinkt. IGF-I hingegen gilt als "postnataler Wachstumsfaktor", da seine Konzentration erhöht bleibt und während der Pubertät einen Anstieg verzeichnet (zur Übersicht Yu *et al.*, 1999; Bach, 2015). Erhöhte IGF-I-Serumwerte korrelieren jedoch auch mit einem erhöhten Risiko für einige Tumorarten. So wurden beispielsweise erhöhte Serumwerte bei Patienten mit Karzinomen der Prostata (Roddam *et al.*, 2008), der Lunge (Wang *et al.*, 2013) und der prämenopausalen Mamma (Allen *et al.*, 2005) gemessen.

### 1.2.1.) IGF-I und IGF-II

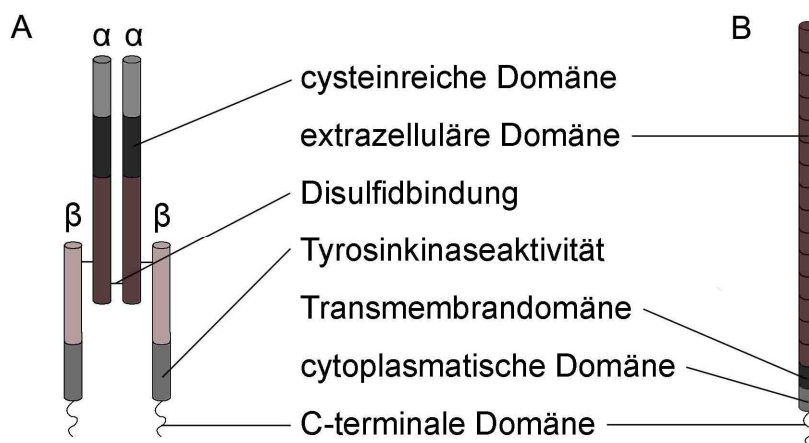
Die IGFs (Abb. 1) verdanken ihren Namen der strukturellen Ähnlichkeit zu Proinsulin (Blundell *et al.*, 1983). Es handelt sich bei den IGFs um Polypeptide mit einer Größe von 70 (IGF-I) beziehungsweise 67 Aminosäuren (IGF-II). IGF-I wird vorwiegend in der Leber, jedoch auch in vielen anderen Geweben produziert (Yakar *et al.*, 1999). Das Wachstumshormon GH (*growth hormon*) ist der Hauptregulator für die hepatische IGF-I-Biosynthese. Die extrahepatische Regulation erfolgt durch das GH sowie durch weitere Mediatoren, die sich je nach Organ unterscheiden (zur Übersicht Le Roith, 2003). IGF-II wird ebenfalls hepatisch und extrahepatisch gebildet. Im Gegensatz zu IGF-I wird die hepatische Produktion jedoch kaum durch das GH reguliert (zur Übersicht Pollak *et al.*, 2004). Sowohl die hepatische als auch die extrahepatische Produktion sind für den menschlichen Organismus unverzichtbar. Beispielsweise sind nach Yakar *et al.*, 1999,2002 sowohl die hepatische als auch die extrahepatische Produktion für die Knochendichte entscheidend.

Neben der Produktionsregulation der IGFs durch das GH, stellen die IGFBPs einen weiteren Regulationsmechanismus für den IGF dar. Sie können die Verfügbarkeit der IGFs verändern, indem sie diese binden oder aus ihrem Bindungskomplex entlassen. Dies gelingt über Proteasen, welche die Affinität der IGFBPs für die IGFs heruntersetzen. Dadurch wird auch die Halbwertszeit der IGFs

moduliert; sie stehen vermehrt für andere Bindungen zur Verfügung und können so über größere Distanzen im Körper transportiert werden (Brahmkhatri *et al.*, 2015).

### 1.2.2.) IGF-IR und IGF-IIR

Der IGF-I-Rezeptor (Abb. 1 & 2) ähnelt dem Insulinrezeptor in seiner Struktur (Garret *et al.*, 1998). Beide gehören zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der IGF-IR besteht aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten (Abb. 2). Die beiden  $\beta$ -Ketten bilden die Verankerung des IGF-IR in der Zellmembran. Am intrazellulären Ende der  $\beta$ -Ketten befinden sich je ein Abschnitt mit einer Tyrosinkinaseaktivität sowie eine C-terminale Domäne. Sowohl die Verbindung der  $\alpha$ -Ketten untereinander als auch die Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bestehen aus einer Disulfidbindung (Abb. 2). An den cysteinreichen Domänen kann unter anderem mit den IGFs eine Bindung eingegangen werden (Schumacher *et al.*, 1991; Favelyukis *et al.*, 2001;). Sowohl IGF-I als auch IGF-II können an den IGF-IR binden (Tab. 1) und eine Vielzahl an Reaktionen, wie beispielsweise Zellmigration, -proliferation, -differenzierung und/oder Apoptoseschutz auslösen.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des IGF-IR (A) und des IGF-IIR (B).

(modifiziert nach Adams *et al.*, 2000 [IGF-IR] und Szebenyi und Rotwein, 1994 [IGF-IIR])

Der IGF-IIR wird auch als Mannose-6-phosphat-Rezeptor (M6PR) bezeichnet (Abb. 1 und 2). Er besteht aus einer großen extrazellulären Domäne (15 Sequenzabschnitte), einer einzelnen Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Szebenyi und Rotwein, 1994; Abb. 2). Während der IGF-IIR den IGF-II mit hoher Affinität bindet, wird IGF-I deutlich schlechter gebunden (Tab. 1). Die Funktion des IGF-IIR wird stark diskutiert. Seine Aufgabe scheint vorwiegend darin zu bestehen, IGF-II ohne Signaltransduktion zu binden. Dadurch wird eine kompetitive Bindung von IGF-II an Rezeptoren mit Signalweiterleitung verhindert (zur Übersicht Körner *et al.*,

1995; Bach *et al.*, 2013). Der IGF-IIR scheint aber auch einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des IGF-IR zu haben (Tian *et al.*, 2016).

**Tabelle 1** Bindungsaffinitäten für IGF-I und IGF-II an den beiden IGF-Rezeptoren.

	IGF-I ( $K_D$ in nM)	IGF-II ( $K_D$ in nM)	Referenz
IGF-IR	0,1 - 1,5	3,0	Steele-Perkins <i>et al.</i> , 1988 Schumacher <i>et al.</i> , 1991
IGF-IIR	$0,4 \times 10^3$	0,2	Tong <i>et al.</i> , 1988

$K_D$  = Dissoziationskonstante

### 1.2.3.) IGF-Bindungsprotein-Superfamilie

Die IGFBPs sind bereits sehr früh in der Entwicklung der Wirbeltiere entstanden und haben ihre Struktur bis in die heutige Zeit kaum verändert (Upton *et al.*, 1993). Bisher sind sechs Bindungsproteine (-1 bis -6) bekannt, welche durch zehn IGFBP-rPs (*IGFBP-related proteins*) ergänzt werden. Während die sechs IGFBPs die IGFs mit hoher Affinität binden können, binden die IGFBP-rPs die IGFs mit niedrigerer Affinität (zur Übersicht Brahmkhatri *et al.*, 2015). Die Aufgaben der IGFBPs können sowohl abhängig als auch unabhängig von IGF stattfinden. Zu den wichtigsten IGF-abhängigen Aufgaben der IGFBPs zählt die Bindung der zirkulierenden IGFs. Mehr als 75 % dieser zirkulierenden IGFs sind durch die IGFBPs gebunden, um vor dem Abbau durch Proteasen geschützt zu sein. Dies wird hauptsächlich über einen Bindungskomplex erreicht, der aus dem IGFBP-3, dem IGF und einer ALS (*acid-labile subunit*) besteht (zur Übersicht Baxter, 1988; Baxter und Martin, 1989; Brahmkhatri *et al.*, 2015). Das IGFBP-5 ist ebenfalls in der Lage diese Bindungskomplexe zu bilden (Twigg und Baxter, 1998). Allerdings stellt das IGFBP-3 die höchste Serumkonzentration aller IGFBPs (Tab. 4), während die Konzentration des IGFBP-5 lediglich 10 % der Konzentration des IGFBP-3 beträgt (Firth und Baxter, 2002). Daher spielt das IGFBP-5 für die Bildung dieser Bindungskomplexe vermutlich eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz zu den systemischen Aufgaben besitzen die IGFBPs in den Geweben auch lokale Aufgaben, die sich auf die Regulierung der IGF-Wirksamkeit beschränken. Dies kann über die Bindung bzw. die Freigabe der IGFs sowohl eine Verstärkung als auch eine Verringerung der Wirkung bedeuten.

Die IGFBPs übernehmen in den Organen auch eine Vielzahl IGF-unabhängiger Aufgaben. Darunter zählt zum Beispiel die über das IGFBP-1 und die RGD- (Arg-Gly-Asp)-Sequenz vermittelte Steigerung der Zellmotilität und Zelladhäsion (Jones *et al.*,

1993). Die RGD-Sequenz ist eine Subdomäne der C-terminalen Domäne der IGFBPs und befindet sich sowohl auf dem IGFBP-1 (Jones *et al.*, 1993) als auch auf dem IGFBP-2 (Kuang *et al.*, 2006; Tab. 2). Die RGD-Sequenz des IGFBP-1 kann an das Oberflächenmolekül  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Fibronectinrezeptor) binden. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die wiederum diese Zelle zur Migration anregt. Auch IGFBP-2 kann über die RGD-Sequenz IGF-unabhängig die Proliferation inhibieren und die Migration fördern (Schütt *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). Für die IGFBP-3 bis -6 konnten in den letzten Jahren ebenfalls IGF-unabhängige Effekte nachgewiesen werden (Wright *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007; Massoner *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

**Tabelle 2** RGD-Sequenz in der C-terminalen Domäne von IGFBP-1 und -2.

IGFBP-1	<sup>178</sup> LPNCN KNGFYHSRQCETSMTGEA GLCWCVYPWNGKRIPGSPEIR <b>GD</b> PNC <sup>226</sup>
IGFBP-2	<sup>222</sup> IPNCD KHGLYNLKQCKMSLNGQR GECWCVNPNTGKLIQGAPTIR <b>GD</b> PEC <sup>270</sup>

aus Firth und Baxter, 2002.

#### 1.2.4.) IGF und Tumor

Faktoren des IGF-Systems (Abb. 1) sind bei Patienten mit vorhandenem Tumorleiden oft verändert, so auch im Serum von Lungenkarzinompatienten (Shersher *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Dies deutet auf eine wichtige Rolle des IGF-Systems bei der Entstehung und/oder Entwicklung von Tumoren hin. Obwohl sich die Serumwerte von Faktoren des IGF-Systems nicht als Tumormarker selbst eignen (Matuschek *et al.*, 2011) ist die Einflussnahme des IGF-Systems auf die Entstehung und/oder den Progress hinweisend beschrieben. So konnte in zahlreichen Studien ein direkter oder indirekter Zusammenhang zwischen Faktoren des IGF-Systems und dem Überleben oder dem Auftreten von Tumorerkrankungen nachgewiesen werden, so zum Beispiel beim Kolorektalen Karzinom (Pankaj *et al.* 2015), Prostatakarzinom (Correa *et al.*, 2015), Lungenkarzinom (Wang *et al.*, 2013) sowie weiteren Tumorentitäten. Für die Tumorentwicklung ebenfalls von großer Bedeutung ist die Fähigkeit des Primärtumors zur Metastasenbildung. Diese Metastasenbildung wiederum wird durch migrationsfördernde Mechanismen ermöglicht.

Komponenten des IGF-Systems tragen zur Migration von Zellen bei. Dies trifft auch auf Tumorzellen zu. So fördert beispielsweise IGF-I die Migration von Lungenkarzinom- (Zelllinie A549; Kim *et al.*, 2012) sowie Mammakarzinomzellen (Hollier *et al.*,

2008). Am Beispiel der Mammakarzinomzellen wurde zudem konkret die Achse über den IGF-I/IGFBP/Vitronectin-Komplex beschrieben (Hollier *et al.*, 2008). Auch das IGFBP-2 kann mit einer gesteigerten Zellmigration einhergehen, wie es am Beispiel von Zellen der akuten Leukämie gezeigt wurde (Chen *et al.*, 2013). Die IGF-I-vermittelte Zellmigration erfolgt über die PI3K-Signalkaskade, zu der auch Rac als Mitglied der Rho GTPase-Familie gehört. Rac beeinflusst wesentlich die Regulation des Zytoskeletts und somit auch die Migration von Zellen (Cancelas *et al.*, 2006).

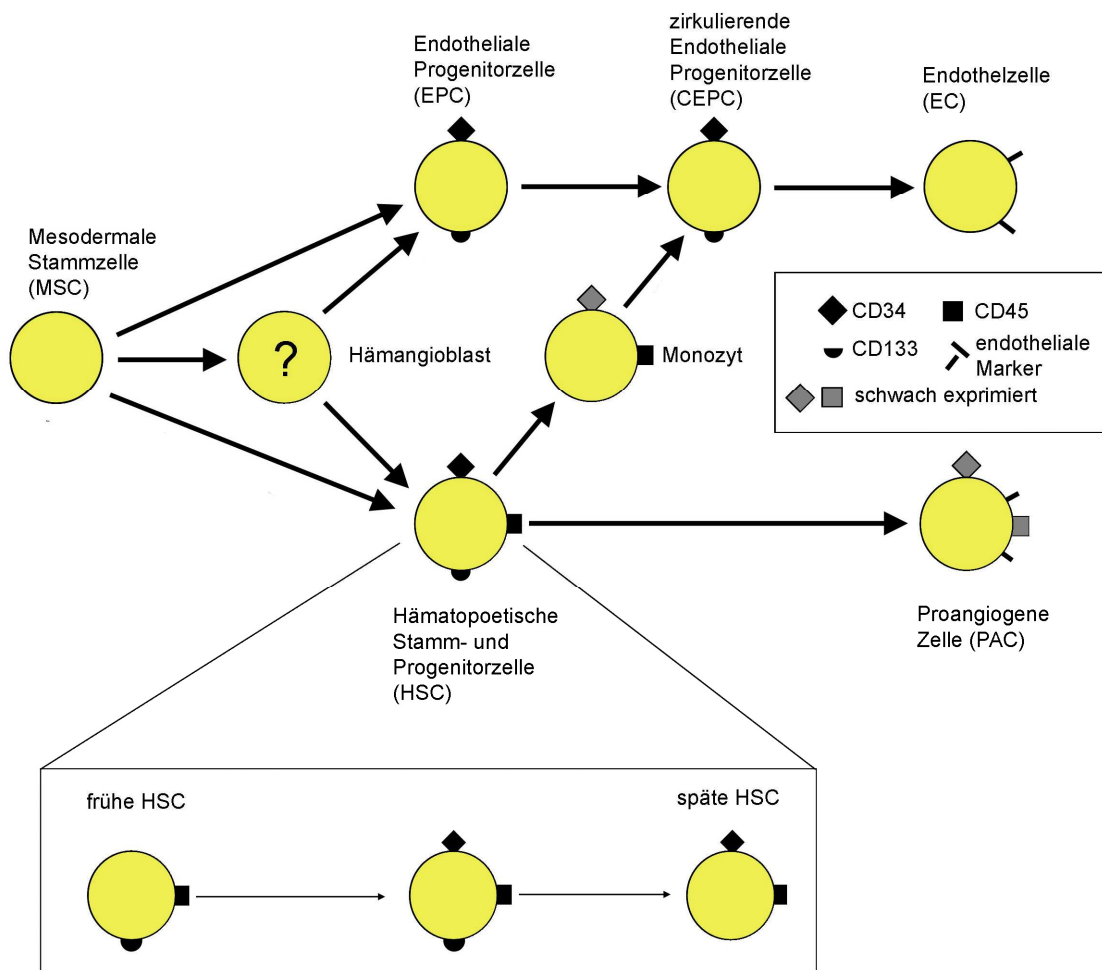
### **1.3.) Hämatopoetische Stammzellen und endotheliale Progenitorzellen**

In den letzten circa 20 Jahren wurden hämatopoetische Stamm- (HSC) und endothelialen Progenitorzellen (EPC), ausgelöst durch die Arbeit von Asahara *et al.*, 1997, intensiv untersucht. Asahara *et al.*, 1997 haben erstmals die Existenz von Progenitorzellen im Blut nachgewiesen, die mutmaßlich an der Gefäßneubildung beteiligt sind. Diese Zellen nannte man daher EPC (*endothelial progenitor cell*) genannt. Allerdings stellte sich heraus, dass diese so genannten EPCs eine Vielzahl an verschiedenen Zellen und Entwicklungsstufen umfassen. Eine genaue Definition dieser Zellen ist bis heute stark umstritten. Zudem werden die Begriffe EPC und HSC (*hematopoietic stem cell*) teilweise synonym verwendet. Trotz dieser fehlenden eindeutigen Begriffsdefinition gibt es zumindest eine Einteilung dieser Zellen anhand von definierten Oberflächenantigenen.

Die Oberflächenantigene CD34, CD133 sowie VEGFR-2 sind die am häufigsten eingesetzten Marker zur Isolation endothelialer Progenitorzellen. Da Estes *et al.*, 2010 jedoch CD45 auf den CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>-Zellen detektierten, handelt es sich bei diesen demnach um Zellen der hämatopoetischen Zelllinie und nicht um Zellen der endothelialen Zelllinie, welchen kein CD45 exprimieren sollten. Trotz dieser Erkenntnis ist eine Selektion CD45-positiver Zellen anhand der Oberflächenantigene CD34 und/oder CD133 nach aktuellem Stand ausreichend, um zumindest Zellen mit potenziell proangiogenen Eigenschaften aus dem peripheren Blut zu isolieren (Rose *et al.*, 2015) und für experimentelle Arbeiten zu kultivieren (Gammaitoni *et al.*, 2003, Navarrete Santos *et al.*, 2008). Ein vereinfachtes Modell wie man sich derzeit die Differenzierung der HSCs in Zellen mit proangiogenen Eigenschaften vorstellt, ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurden hämatopoetische Zellen (CD45<sup>+</sup>) anhand der Oberflächenantigene CD34 und CD133 isoliert und in drei Subpopulationen der HSC eingeteilt. Es handelt sich hierbei um die Stammzellpopulationen CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>. Handgretinger *et al.*, 2003 fanden heraus, dass CD133<sup>+</sup>-Stamm-zellen frühe Progenitorzellen darstellen. Hristov *et al.*, 2003 konnten

aufzeigen, dass CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen das Oberflächenantigen CD133 im Rahmen der Differenzierung verlieren und beginnen endotheliale Marker (z.B.: von-Willebrand-Faktor) zu exprimieren. Hieraus ergibt sich eine mögliche Differenzierung innerhalb der endothelialen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Abb. 3). Diese Theorie der Entwicklungsstadien anhand der Oberflächenantigene ist aber immer noch sehr vage und nicht hinreichend belegt, so dass es weiterhin Unklarheiten bezüglich der Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen gibt.



**Abbildung 3** Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen.

(modifiziert nach Urbich und Dimmeler, 2004 und Timmermans *et al.*, 2009)

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft entstehen aus der mesodermalen Stammzelle sowohl Zellen der endothelialen Linie (EPC, CEPC, EC) als auch Zellen der hämatopoetischen Linie (HSC, PAC). Die Existenz einer gemeinsamen Vorstufe, des Hämangioblasten, ist derzeit nicht gesichert und wird kontrovers diskutiert. Eine Unterscheidung zwischen endothelialer und hämatopoetischer Zelle anhand des Oberflächenmarkers CD45 wird derzeit ebenfalls kontrovers diskutiert.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stammzellpopulationen entsprechen dem Stadium der HSC und können mutmaßlich in frühe und späte HSC unterschieden werden.



#### 1.4.) Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom zählt zu den malignen Tumoren und ist der häufigste Tumor der Lunge. Bei den Männern stellt er deutschlandweit die häufigste und bei den Frauen deutschlandweit die dritthäufigste Krebstodesursache dar (Goeckenjan *et al.*, 2011). Der größte Risikofaktor für die Entstehung des Lungenkarzinoms ist der regelmäßige Zigarettenkonsum. Ihm werden 90 % aller Lungenkarzinome zugeschrieben. Zu den weiteren Risikofaktoren des Lungenkarzinoms zählen Karzinogene (z.B.: Asbest, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), Vorerkrankungen (z.B.: Kavernenkarzinom) und eine genetische Prädisposition. Die Prognose und die Art der Therapie sind von mehreren Faktoren abhängig. Zu diesen Faktoren zählt unter anderem die Einordnung des Lungenkarzinoms in verschiedene histologische Subtypen (Tab. 3).

**Tabelle 3** Verteilung histologischer Subtypen des Lungenkarzinoms.

histologischer Subtyp		Zelllinien (Bsp.)	Häufigkeit
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom	DMS79	15 - 20 %
NSCLC	Plattenepithelkarzinom	A549	30 - 40 %
	Adenokarzinom	H358	25 - 35 %
	Großzelliges Lungenkarzinom	H810	< 10 %
	Andere (z.B. squamös)	H520	

nach Hammerschmidt und Wirtz, 2009; SCLC = *small cell lung cancer*, NSCLC = *non small cell lung cancer*.

Hierbei stellt die histologische Einordnung des Lungenkarzinoms in SCLC (*small cell lung cancer*) bzw. NSCLC (*non-small cell lung cancer*) die wichtigste Einteilung dar. Ebenfalls für Prognose und Therapie relevant ist eine Einteilung des Lungenkarzinoms in verschiedene Stadien der Erkrankung, welche nach der TNM-Klassifikation erfolgt (Mirsadraee *et al.*, 2012).

Das Lungenkarzinom besitzt unter den Tumorerkrankungen eine vergleichend schlechte Prognose. Daher wird dieses intensiv erforscht und die Therapieoptionen stets optimiert. Zelllinien, die den jeweiligen histologischen Subtyp repräsentieren (Tab. 3), sind dabei integrativer Bestandteil der Forschung. Zudem sind weitere Bestandteile des soliden Tumors (Tumorstromas), zu denen Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten gehören, in den Mittelpunkt der Tumorforschung gerückt. So haben beispielsweise Bartling *et al.*, 2008 festgestellt, dass stromale Lungenfibroblasten die Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel hemmen. Da die Fibroblasten im Allgemeinen einen fördernden Einfluss auf die Entstehung und den Progress des Lungenkarzinoms zu besitzen scheinen (Krtolica *et al.*, 2001; Parrinello

*et al.*, 2005), wurden in der vorliegenden Arbeit neben den Lungenkarzinomzelllinien auch Fibroblasten der Lunge untersucht.

In den letzten Jahren sind in der Grundlagenforschung bedeutende Fortschritte bezüglich der Tumorresistenzen bzw. -rezidive nach Chemotherapie erzielt worden. Trotz Eradikation des Tumors zum Beispiel mittels Operation, Chemotherapie, und/oder Strahlentherapie und guten Ansprechens der Patienten auf diese Therapie treten immer wieder Rezidive oder Fernmetastasen auf. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür sind sogenannte Tumorstammzellen (*cancer stem cells*; zur Übersicht Ajani *et al.*, 2015), die ebenfalls Bestandteil des Tumorstromas sein können. Diese sind resistent gegenüber der herkömmlichen Therapie und ermöglichen so eine erneute Progression des Tumors. Tumorstammzellen wurden für verschieden Tumorentitäten nachgewiesen, so zum Beispiel für Karzinome der Leber (HCC, Ma *et al.* 2008), des Pankreas (Li *et al.*, 2007), des Kolorektums (Dalerba *et al.*, 2007) und der Lungen (Eramo *et al.*, 2008). Zum Nachweis der Tumorstammzellen konnten Oberflächenantigene bestimmt werden (zur Übersicht Ajani *et al.*, 2015). Eines der bedeutendsten Oberflächenantigene der Tumorstammzellen lautet CD133, das zugleich ein Oberflächenantigen der HSCs ist (Abb. 3).

#### **1.4.1.) Tumorprogress solider Tumore**

Die Gefäßneubildung ist ein entscheidender Faktor bei der Progression solider Tumore. Bisher ging man davon aus, dass postnatale Gefäßneubildungen immer mittels Angiogenese geschehen und sich somit aus bestehenden Gefäßen entwickeln. In den letzten Jahren verdichteten sich jedoch Hinweise, dass auch die bis dato nur während der embryonalen Neovaskularisierung bekannte Vaskulogenese, einen Anteil daran haben könnte (Janic und Arbab, 2010). Während dieser Vaskulogenese entstehen Gefäße im Rahmen einer *de novo*-Gefäßneubildung. Sowohl die Angiogenese als auch die Vaskulogenese würden demnach ebenfalls bei dem Lungenkarzinom eines adulten Patienten anzutreffen sein. Es wird angenommen, dass neben den reifen Endothelzellen und deren Progenitorzellen auch HSCs bzw. PACs im Tumorgewebe an der Gefäßbildung beteiligt sind (zur Übersicht Asahara *et al.*, 2011; Richardson und Yoder, 2011). So wiesen Hilbe *et al.*, 2004 eine erhöhte Anzahl an Progenitorzellen teilweise im Bereich entstehender Kapillargefäße im histologisch aufgearbeiteten Lungengewebe von NSCLC-Patienten nach und Dome *et al.*, 2006 zeigte eine erhöhte Konzentration zirkulierender Progenitorzellen im peripheren Blut von NSCLC-Patienten auf. Weiterhin konnten Sun *et al.*, 2012 die Beteiligung von Progenitorzellen an der Tumovaskulogenese von Hepatozellulären Karzinomen

nachweisen. In allen letztgenannten Arbeiten ist keine sichere Differenzierung zwischen endothelialen und hämatopoetischen Progenitorzellen erfolgt.

Man kann zudem davon ausgehen, dass Tumorzellen und/oder stromale Zellen des Tumors, wie beispielsweise Fibroblasten, durch Sekretion löslicher Faktoren angrenzende Zellen des Nichttumorgewebes modulieren und so die Tumorexpansion weiter fördern (zur Übersicht Bremnes *et al.*, 2011a, 2011b). Auch Tumorassoziierte Makrophagen (TAM; *tumor-associated macrophages*), welche teilweise einen hämatopoetischen Ursprung haben (Davies *et al.*, 2013), können einen Tumorprogress fördern. Während die so genannten "klassischen" M1 Makrophagen antitumoral wirken, bewirken hingegen die M2 Makrophagen einen Tumorprogress beispielsweise über die Steigerung der Angiogenese oder die Hemmung der Immunantwort (zur Übersicht Chanmee *et al.*, 2014).

### **1.5.) Zielstellung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Lungenkarzinomzellen sowie Lungenfibroblasten als essentielle Komponenten des Lungenkarzinoms auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen, die sich potentiell zu Endothelzellen weiterdifferenzieren können, aus dem Blut nachzuweisen. Im Falle eines fördernden Einflusses sollte die Bedeutung von löslichen Faktoren des IGF-Systems untersucht werden.

## 2.) Material und Methoden

### 2.1.) Materialien

#### 2.1.1.) Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
<i>Anchor</i> Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper FITC-konj. CD34-AK (hum.)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Antikörper CD133 <i>Micro Bead Kit</i> (hum.)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Antikörper PE-konj. CD133/2-AK (hum.) (293C3)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
BSA	Perbio Science GmbH, Bonn, Deutschland
BSA Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter Gene Ruler™ 50 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP Mix	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA-Na <sub>2</sub> (Titriplex)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (1µl/100ml)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	C.C.Pro GmbH, Oberlörda, Deutschland
Gentamicin (50 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycergel®-Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
IGF/IGFBP	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
IMDM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Orange G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Master-Mix	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Primer (IGF, IGFBP, 18S rRNA)	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>Random</i> Primer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
rh FLT-3 Ligand	CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
rh SCF	CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
rh TPO	CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Superscript</i> <sup>®</sup> II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trizol <sup>®</sup> Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (10 ×)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2.) Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einmal-Skalpell Cutfix Deutschland	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
FACS <i>Tubes</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Plastikware (Zellkulturschalen etc.)	TPP, Trasadingen, Schweiz
RNA-Isolations-Kit (RNeasy Micro Kit)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNA-Isolations-Kit (RNeasy Mini Kit)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Zellkultur-Einsätze ThinCert™ (Porengröße 0,4; 3 und 8 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhasuen Deutschland

### 2.1.3.) Geräte

Auflichtmikroskop Eclipse	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eismaschine AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Mikrowelle Micromat	AEG, Frankfurt am Main, Deutschland
Mini-Auto MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M Casy <sup>®</sup> -Zellzähler Modell TTC	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Chemielumineszenz- und Fluoreszenz- detektor LAS-3000	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Homogenisator Ultra-Turrax T8	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Kirsch, Offenburg, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet-Aid XP	Drummond, Broomall, PA, USA
Präzisionswaage TE 1502S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Spannungsquelle für Elektrophorese Powerpack 25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spektrophotometer Nanodrop <sup>®</sup> ND-1000	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zellsortierer FACSVantage SE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

#### 2.1.4.) Auswertungssoftware

Aida Image Analyzer Version 3.51	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
BD FACSDiva Version 5.0.3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Cell Quest Pro Version 4.0	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Image Reader LAS-3000 Version 1.1	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
MetaMorph Version 6.1r6	Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA
Microsoft Office Paket 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

#### 2.2.) Methoden

##### 2.2.1.) Zellkultivierung

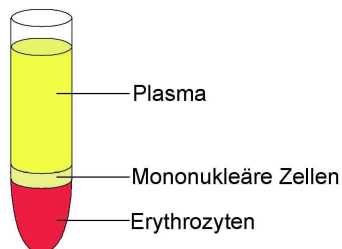
Es wurden die humanen Lungenkarzinomzelllinien *National Cancer Institute* (NCI)-H358 und NCI-H322 sowie die primären humanen Lungenfibroblasten *Wistar Institute* (WI)-38 (ATCC; Manassas, VA, USA) verwendet. Die Lungenkarzinomzelllinien leiten sich von einem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC; *non-small cell lung carcinoma*) ab und sind adhärente Zellen. Die WI-38-Fibroblasten stammen von einer fetalen Lunge. Alle Zelllinien wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Umgebung kultiviert und unter sterilen Bedingungen nach drei bis vier Tagen passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 × *phosphate-buffered saline* (PBS)-Lösung gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 × Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM/10 % FCS-Lösung beendet. Nach der Zellzählung im Casy<sup>®</sup>-Zellzähler wurden ca.  $1,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> (NCI-H358, NCI-H322) und  $7,5 \times 10^3$  WI-38-Zellen/cm<sup>2</sup> erneut in DMEM/10 % FCS ausgesetzt.

DMEM	DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 4 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat
1 × Trypsin-EDTA-Lösung	1 Vol. 10 × Trypsin-EDTA (5 g/l Trypsin, 2 g/l Na <sub>4</sub> -EDTA)

	9 Vol. 1 × PBS
1 × PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	(mit HCl auf pH 7,4 eingestellt)

### 2.2.2.) Stammzellisolierung, -kultivierung und -sortierung

Die humanen hämatopoetischen Stammzellen wurden aus dem *Buffy Coat*-Blut freiwilliger Spender isoliert. Die Isolierung und experimentelle Verwendung der hämatopoetischen Zellen wurde zuvor von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Für die Stammzellisolierung wurde das *Buffy Coat*-Blut zunächst mit *magnetic-activated cell sorting* (MACS)-Puffer verdünnt, anschließend vorsichtig auf eine Ficoll-Lösung (Dichte = 1,077 g/ml) im Zentrifugenröhrchen geschichtet und zentrifugiert (35 min bei 400 g ohne Bremse). Im Ergebnis erhielt man durch den Aufbau eines Ficoll-Dichtegradienten eine Auftrennung des *Buffy Coat*-Blutes nach Zellbestandteilen (Abb. 4).



**Abbildung 4** Auftrennung des *Buffy Coat*-Blutes.

Nachdem das *Buffy Coat*-Blut auf eine Ficoll-Lösung geschichtet und zentrifugiert wurde, entstand eine Auftrennung durch den Ficoll-Dichtegradienten. In der oberen Schicht befindet sich das Plasma, welches ebenso verworfen wird wie die Erythrozyten der unteren Schicht. In der mittleren Schicht befinden sich mononukleäre Zellen, zu denen auch die CD34-exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen gehören.

Die Zellbestandteile der mittleren Schicht, welche die mononukleären Zellen enthielt, wurden entnommen und anschließend in mehreren Schritten aufgereinigt. Dazu wurde die mittlere Schicht mit MACS-Puffer verdünnt und erneut zentrifugiert (10 min bei 400 g). Das erhaltene Zellpellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert und dann durch einen Zellfilter (30 µm Porengröße) pipettiert, um Zellaggregate zu entfernen. Die erhaltene Zellsuspension wurde erneut mit MACS-Puffer verdünnt,



zentrifugiert (5 min bei 320 g) und in einem Volumen von 300 µl in MACS-Puffer aufgenommen. Aus diesen aufgereinigten mononukleären Zellen wurden anschließend hämatopoetische Stammzellen, welche das Oberflächenantigen CD34 exprimierten, mittels MACS-Technik isoliert. Dazu wurden die Zellen in 300 µl MACS-Puffer zunächst mit 100 µl Fcγ-Block-Reagenz versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Danach wurden 100 µl der *Magnetbead*-konjugierten CD34-Antikörper zugegeben und im Dunkeln inkubiert (30 min bei 4 °C). Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 320 g) und anschließend in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Isolierung der CD34-exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen aus der Zellsuspension erfolgte durch das Mini-MACS-System nach Anleitung des Herstellers. Die isolierten CD34<sup>+</sup>-Stammzellen wurden in Zentrifugenröhrchen aufgefangen, zentrifugiert (5 min bei 320 g) und in 1 × PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM) unter Zusatz von Antibiotika (50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin), 10 % FCS und definierten Wachstumsfaktoren (WF; s.u.) aufgenommen und bei einer Zelldichte von 1 - 2 × 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf mehrere Vertiefungen einer 12er-Multizellkulturschale verteilt. Die Zellzählung erfolgte durch den Casy<sup>®</sup>-Zellzähler. Anschließend wurden die CD34<sup>+</sup>-Stammzellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Umgebung für sieben Tage kultiviert.

Nach der Kultivierung der CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen wurden diese vom Boden der 12er-Multizellkulturschale gelöst und abzentrifugiert (5 min bei 400 g). Das Zellpellet wurde in 1 × PBS gewaschen, wiederum zentrifugiert und in 50 µl 1 × PBS aufgenommen. Anschließend wurden die hämatopoetischen Stammzellen entsprechend ihrer Expression der Zelloberflächenantigene CD34 und/oder CD133 mittels der *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Technik sortiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 20 µl Fcγ-Block-Reagenz versetzt, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten CD34-Antikörpers und des Phycoerythrin (PE)-konjugierten CD133/2-Antikörpers hinzugefügt und im Dunkeln inkubiert (45 min bei 4 °C). Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 320 g) und anschließend in 3 ml 1 × PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden im FACS Vantage in drei Populationen (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>) sortiert (BD FACSDiva Software Version 5.0.3). Als negative Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Antikörpern markiert worden sind. Die drei Zellpopulationen wurden in IMDM aufgefangen, in 1 × PBS gewaschen, mit dem

den Casy<sup>®</sup>-Zellzähler gezählt und anschließend in DMEM für die weitere Verwendung aufgenommen.

MACS-Puffer	1 × PBS 2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 0,5 % <i>bovine serum albumine</i> (BSA)
IMDM	IMDM mit 4 mM L-Glutamin und 25 mM HEPES
WF	100 ng/ml rh <i>stem cell factor</i> (SCF) 100 ng/ml rh <i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i> (Flt-3L) 10 ng/ml rh Interleukin (IL)-6 10 ng/ml rh Thrombopoetin (TPO)

### 2.2.3.) Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient unter anderem der Messung bestimmter Antigene auf der Oberfläche von Zellen. Dazu werden die Zellen mit spezifischen Antikörpern versehen, welche nach Bindung an das für sie spezifische Antigen nach Anregung Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge aussenden. Dieses Fluoreszenzlicht wird durch Detektoren erfasst. Bei den Zellen dieser Arbeit handelte es sich um hämatopoetische Stammzellen, welche die Antigene CD34 und/oder CD133 exprimieren. Die jeweiligen Stammzellen wurden hierbei aus den 12er-Multizellkulturschalen gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min bei 400 g). Anschließend wurden die Zellen in 1 × PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min bei 400 g). Das erhaltene Zellpellet wurde in 25 µl 1 × PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µl Fcγ-Block-Reagenz versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Dann wurden jeweils 5 µl FITC-konjugierte CD34-Antikörper und PE-konjugierte CD133/2-Antikörper hinzugefügt und im Dunkeln inkubiert (15 min bei 4 °C). Nach der Inkubation wurden 300 µl 1 × PBS hinzugefügt und die Proben am FACSCalibur Durchflusszytometer vermessen.

### 2.2.4.) Indirekte Kokultur

Bei der indirekten Kokultur wurden die Oberflächenantigene (CD34 und CD133) der drei Populationen humaner hämatopoetischer Stammzellen (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>) nach 24-stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS überprüft, um zu erkennen inwiefern sich die Oberflächenantigenexpression im

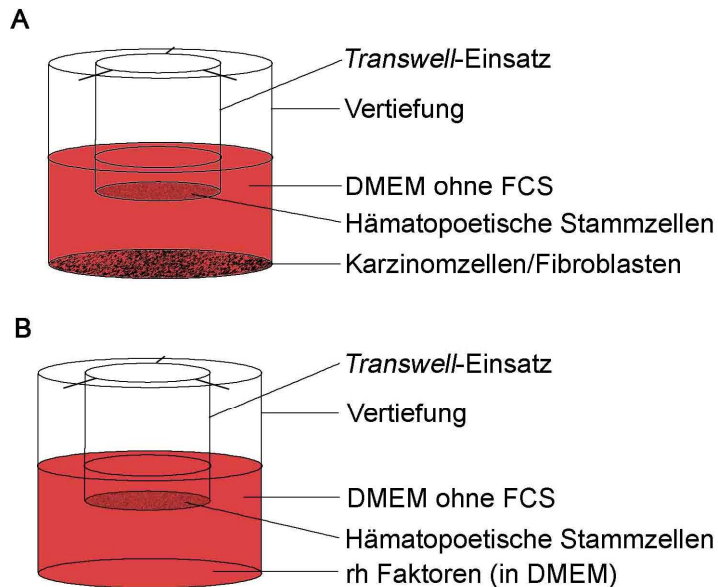
Verlauf der *Transwell-Assays* verändert. Dazu wurden je  $5 \times 10^4$  Lungenkarzinomzellen (H358 bzw. H322) oder  $4 \times 10^4$  Fibroblasten (WI-38) in *Transwell*-Einsätze (Porengröße  $0,4 \mu\text{m}$ ) vorgelegt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die *Transwell*-Einsätze in Vertiefungen einer 12er-Multizellkulturschale platziert, in denen sich jeweils  $1\,200 \text{ Zellen/cm}^2$   $\text{CD34}^+/\text{CD133}^-$  und  $\text{CD34}^-/\text{CD133}^+$  oder je  $800 \text{ Zellen/cm}^2$   $\text{CD34}^+/\text{CD133}^-$ -Stammzellen befanden. Durch die poröse Membran der *Transwell*-Einsätze war ein direkter Kontakt zwischen den Zellen ausgeschlossen, ein Austausch über das Medium jedoch weiterhin möglich. Nach 24-stündiger Kokultur wurden die hämatopoetischen Stammzellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenantigene untersucht (2.2.3.).

### **2.2.5.) *Transwell-Assay***

Die Migration der hämatopoetischen Stammzellen wurde mit Hilfe des sogenannten *Transwell-Assays* untersucht (Abb. 5). Bei diesen Assays wird erfasst, inwiefern bestimmte Zellpopulationen durch spezifische Einflussfaktoren in der Lage sind, durch die Poren einer Membran mit definierter Porengröße (hier  $3$  bzw.  $8 \mu\text{m}$ ) zu migrieren (nach Kränkel *et al.*, 2005). Die Wahl der Porengröße ist abhängig von der Größe der zu untersuchenden Zellen. Die migrierenden Zellen befinden sich in den *Transwell*-Einsätzen und die potentiell migrationsfördernden Faktoren in den Vertiefungen der 12er-Multizellkulturschale. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen gewählt (A: indirekte Kokultur und B: Einzelfaktoren; Abb. 5). Bei den Assays mit der indirekten Kokultur befinden sich Fibroblasten bzw. Lungenkarzinomzellen in den Vertiefungen der 12er-Multizellkulturschale, welche potenziell migrationsfördernde Faktoren freisetzen (Abb. 5A). Bei den Einzelfaktoren-Assays befinden sich in den Vertiefungen lediglich die rh Faktoren (Abb. 5B). Alle Zellen bzw. rh Faktoren befinden sich in DMEM ohne FCS. In dem in dieser Arbeit durchgeführten *Transwell-Assay* wurden die drei Populationen der hämatopoetischen Stammzellen auf ihre Migration hin untersucht. Es wurden  $1 \times 10^4$  Stammzellen je *Transwell*-Einsatz ausgesetzt.

Bei den Kokultur-Assays wurden die Lungenzellen (H358, H322 und WI-38) in den Vertiefungen in DMEM/10 % FCS mit einer Konzentration von  $3,6 \times 10^4 \text{ Zellen/cm}^2$  ausgesetzt (Abb. 5A). Da hierbei jeweils eine Lungenzellart verwendet wurde, handelte es sich um Mono-Kokulturen. Neben diesen wurden auch Bi-Kokulturen verwendet. Diese Bi-Kokulturen bestanden aus drei Teilen Lungenkarzinomzellen (H358 oder H322) und einem Teil Fibroblasten (WI-38). Dies geschah, da die Fibroblasten *in vivo* einen essentiellen Bestandteil des Lungengewebes darstellen. Nach Erreichen der Zellkonfluenz wurde das Medium durch  $1,5 \text{ ml}$  DMEM ohne FCS ersetzt. Anschließend

wurden die *Transwell*-Einsätze in den Vertiefungen der Multizellkulturschale platziert. In diese *Transwell*-Einsätze wurden jeweils  $1 \times 10^4$  hämatopoetische Stammzellen in DMEM ohne FCS überführt und auf 500  $\mu$ l aufgefüllt. In der Negativkontrolle wurden keine Lungenkarzinomzellen bzw. Fibroblasten kokultiviert.



**Abbildung 5** Versuchsanordnung des *Transwell*-Assays.

Versuchsanordnung **A** stellt die indirekte Kokultur dar. In dieser wurden Lungenkarzinomzellen (H358 bzw. H322) bzw. Fibroblasten (WI-38) subkonfluent in den Vertiefungen der 12er-Multizellkulturschale ausgesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden *Transwell*-Einsätze mit definierter Porengröße (3 bzw. 8  $\mu$ m) platziert und jeweils  $1 \times 10^4$  Stammzellen hinzugefügt. Nach 2 h (8  $\mu$ m) bzw. 24 h (3  $\mu$ m) wurden diejenigen Stammzellen fixiert und gezählt, die in die Membran der *Transwell*-Einsätze migriert sind (nach Kränkel *et al.*, 2005). In Versuchsanordnung **B** wurden die Karzinomzellen und Fibroblasten durch Einzelfaktoren ersetzt, welche in ihrer Konzentration humanen Serumwerten entsprechen (Tab. 4).

Die zweite Versuchsanordnung beinhaltete rh Faktoren des IGF-Systems (Abb. 5B). Sie wurden statt der Lungenzellen in den Vertiefungen entsprechend der Konzentration ausgesetzt, die den humanen Serumkonzentrationen *in vivo* entsprechen (Tab. 4). Da die rh Faktoren nach den Angaben der Herstellers in 0,1%iger BSA-Lösung aufgenommen und gelagert werden mussten, wurde den Kontrollen die gleiche BSA-Konzentration zugesetzt.

**Tabelle 4** Rekombinante humane (rh) Faktoren des IGF-Systems für *Transwell*-Assays.

rh Faktoren	Konzentration (ng/ml)	Referenzen
IGF-I	100, 250, 500	Yu <i>et al.</i> , 1999, Krsek <i>et al.</i> , 2002
IGFBP-2	100, 500, 900	Yu <i>et al.</i> , 1999, Krsek <i>et al.</i> , 2002
IGFBP-3	2000, 3000	Yu <i>et al.</i> , 1999, Krsek <i>et al.</i> , 2002
IGFBP-4	250, 500, 750	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
IGFBP-6	100, 250, 500	Yu <i>et al.</i> , 1999, Krsek <i>et al.</i> , 2002

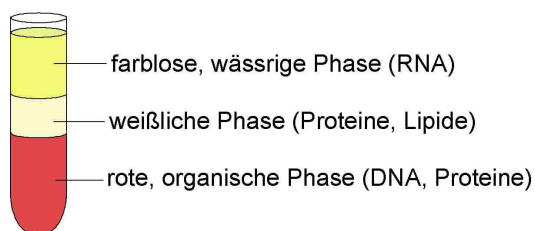
Nach Beendigung des *Transwell*-Assays wurden diejenigen Zellen fixiert und ausgezählt, welche aktiv in die Poren der Membran gewandert waren, da die Zellstrukturveränderung, welche zum aktiven Passieren der Poren erforderlich ist, zu diesem Zeitpunkt bereits geschehen war. Versuchsanordnungen ergaben eine Zeitdauer von zwei Stunden bei den *Transwell*-Assays mit einer Membranporengröße von 8 µm und 24 Stunden bei einer Membranporengröße von 3 µm. Zum Fixieren der Stammzellen wurden die Einsätze zunächst zweimal in 1 × PBS gewaschen. Danach wurden sie für ca. 5 min in Methanol fixiert und anschließend wieder zweimal in 1 × PBS gewaschen. Nun konnten die Zellen gefärbt werden. Dazu wurden die *Transwell*-Einsätze in einer 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (1 µg/ml in 1 × PBS) für 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend wieder zweimal in 1 × PBS gewaschen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert die Zellkerne aufgrund seiner Färbung der genomischen DNA. Nach der Färbung wurden die Poren-Membranen der Einsätze mit einem Einmal-Skalpell entnommen und mittels Glycergel<sup>®</sup>-*Mounting Medium* auf einem Objektträger eingebettet. Die Zellzahl wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M; Anregung/Emission 365/465 nm) durch Auszählung der fluoreszierenden Zellkerne ermittelt. Die Anzahl der Zellen, die durch die Membran hindurch migriert sind, wurde mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur kontrolliert (siehe 2.2.3.).

#### **2.2.6.) RNA-Isolation**

Die Gesamt-RNA wurden aus den untersuchten Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten mit Trizol<sup>®</sup>-Reagenz isoliert. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml Trizol<sup>®</sup>-Reagenz im Homogenisator Ultra-Turrax T8 aufgeschlossen und anschließend mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach dem Durchmischen wurde die Suspension für 3 min bei Raumtemperatur bis zur Phasentrennung inkubiert und dann zentrifugiert (15 min bei 12 000 g). Es entstand eine Auftrennung in drei Phasen (Abb. 6). Die RNA befand

sich in der oberen, wässrigen Phase und musste ausgefällt werden. Diese obere Phase wurde dafür abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol gemischt, 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min bei 12 000 g). Danach wurde das RNA-haltige Pellet gewaschen. Dazu wurde es in 1 ml 75 %igen Ethanol resuspendiert und zentrifugiert (5 min bei 7 500 g). Nach Entfernung des Ethanols wurde das Pellet in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA mittels RNeasy Mini-Kit. Die RNA-Probe wurde zunächst mit 350 µl RLT-Puffer versetzt, gemischt und dann mit 250 µl Ethanol (96 %) versehen. Diese Probenlösung wurde auf eine RNeasy-Mini-Säule gegeben, welche in ein 2 ml-Zentrifugenröhrchen platziert wurde, und danach zentrifugiert (15 s bei 8 000 g). Die RNA befand sich nun auf der Säule, während alle Zentrifugate verworfen wurden. Zum Waschen der Probe wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und dann zentrifugiert (15 s bei 8 000 g). Dieser Schritt wurde mit einer 2-minütigen Zentrifugation wiederholt. Nachfolgend wurde die RNA von der Säule eluiert. Hierzu wurde die Säule in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen platziert, 40 µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Säule pipettiert und anschließend zentrifugiert (1 min bei 8 000 g). Die RNA befand sich nun in dem DEPC-behandeltem Wasser.



**Abbildung 6** RNA-Isolierung mit Trizol<sup>®</sup>-Reagenz.

Mit der gerade beschriebenen Prozedur wurde ebenfalls die RNA der Kontrollen isoliert. Es handelte sich dabei um einen Mix aus jeweils 16 Proben, die sowohl aus physiologischem als auch aus neoplastischem Tumorgewebe entnommen wurden (Bartling *et al.*, 2005). Die RNA-Isolation aus den hämatopoetischen Stammzellen erfolgte nach einwöchiger Kultivierung der hämatopoetischen Stammzellen und anschließender Sortierung in die beiden Populationen CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>. Die RNA wurde mit dem RNeasy Micro Kit nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Zunächst wurden beide Stammzellpopulationen abzentrifugiert (5 min bei 300 g). Das Zellpellet wurde in 75 µl RLT-Puffer (10 µl β-Mercaptoethanol je 1 ml RLT-Puffer hinzugefügt) lysiert und anschließend für 30 s mit dem Ultra-Turrax gemischt. Dann wurden 75 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt. Jetzt wurde die Probe auf eine RNeasy MinElute-Säule überführt, welche in ein 2 ml-Zentrifugenröhrchen

platziert wurde, und zentrifugiert (15 s bei 8 000 g). Im nächsten Schritt wurden 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy MinElute-Säule gegeben und erneut zentrifugiert (15 s bei 8 000 g). Anschließend wurden 80 µl DNase I-Lösung (70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I) auf die Säule pipettiert und die Säule für 15 min bei 25 °C im Thermomixer 5436 inkubiert. Danach wurden wiederum 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy MinElute-Säule gegeben und erneut zentrifugiert (15 s bei 8 000 g). Zum Waschen der Probe wurden 500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy-Säule pipettiert, zentrifugiert (15 s bei 8 000 g) und der Vorgang mit 500 µl 80 %igem Ethanol und 2-minütiger Zentrifugation (8 000 g) wiederholt. Anschließend wurde die RNA von der RNeasy Midi-Säule heruntergelöst. Dazu wurden die RNeasy MinElute-Säule in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen platziert, 14 µl DEPC-behandeltes Wasser hinzugefügt und zentrifugiert (1 min bei 8 000 g). Die RNA befand sich nun in dem DEPC-behandelten Wasser. Die Konzentration der RNA wurde im Spektrophotometer vermessen (NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer; Absorption 260 nm). Anschließend wurde die RNA-Konzentration aller Proben auf 30 ng/µl eingestellt. Die Integrität der RNA wurde in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.7.).

### **2.2.7.) Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu RNA-/DNA-Stränge ihrer Größe nach aufzutrennen. Dies gelingt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an ein Gel aus Agarose. Die in den Taschen des Gels befindlichen negativ geladenen RNA-/DNA-Stränge wandern dadurch zur Anode. Kleinere Fragmente wandern hierbei schneller als größere. Mithilfe einer RNA-/DNA-Leiter (RNA-/DNA-Fragmente definierter Größe) wird die Größe der Proben ermittelt.

Zur Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst das Gel hergestellt. Dazu wurden 1 g Agarose durch die Präzisionswaage TE 1502S abgewogen und in 100 ml 1 × TAE-Puffer überführt. Diese 1%ige Agaroselösung wurde in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Agarose komplett aufgelöst war. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60 °C wurden 1 µl Ethidiumbromid je 100 ml Lösung hinzugefügt und gut durchmischt. Jetzt wurde die Agaroselösung in die mit Kämmen vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurden die Kämmen entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub gelegt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt bis das Gel vollständig bedeckt war. Die Proben wurden mit je 4 × Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben in die durch die Kämmen entstandenen Zwischenräume (Taschen) überführt. Durch das Anlegen von 100 V für 10 min an die Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub wurde eine Ladung aufgebaut und die Proben wanderten durch das Gel. Ethidiumbromid verändert durch

die Anlagerung an die Basen der RNA/DNA sein Anregungsspektrum und erhöht dadurch die Fluoreszenz. Diese wurde durch den Chemieluminiszenz- und Fluoreszenzdetektor LAS-3000 abgelichtet. Die erfassten unterschiedlich starken Signalstärken wurden durch die Software Aida Image Analyzer Version 3.51 quantifiziert.

1 × TAE-Puffer	1 Vol. 50 × TAE-Puffer (242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8,0) ad 1 l aqua bidest) 49 Vol. aqua bidest
4 × Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, Spatelspitze Orange G

### 2.2.8.) RNA-Expressionsanalyse

Für die RNA-Expressionsanalyse wurde die Gesamt-RNA zunächst in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription (RT)). Hierzu wurden folgende Ansätze pipettiert (25 µl-Gesamtansatz):

Ansatz 1 (20 µl):	10 µl RNA (= 300 ng) 4 µl 5 × Reaktions-Puffer 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) 1 µl <i>Random</i> Primer (50 ng/µl) 1 µl <i>Anchor</i> Primer (250 ng/µl) 3 µl DEPC-behandeltes Wasser
Ansatz 2 (5 µl):	1 µl 5 × Reaktions -Puffer 0,3 µl <i>Superscript</i> <sup>®</sup> II Reverse Transkriptase 0,3 µl RNase Inhibitor 3,4 µl DEPC-behandeltes Wasser



Die Reverse Transkription wurde im TRIO-Thermoblock nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Protokoll (Temp., Zeit):
- 1.) Denaturierung von Ansatz 1 (5 min bei 70 °C)
  - 2.) Zugabe von Ansatz 2 (bei 10°C)
  - 3.) cDNA-Synthese (50 min bei 42 °C)
  - 4.) Inaktivierung der Reversen Transkription (10 min bei 70 °C)

Mit Erhalt der cDNA konnte die PCR durchgeführt werden. Hierfür wurde folgender Ansatz pipettiert (25 µl-Gesamtansatz):

- Ansatz:
- 3 µl cDNA
  - 12,5 µl 2 × PCR-Master-Mix (dNTPs, *Taq* DNA Polymerase, Reaktionspuffer)
  - 1 µl *sense*-Primer
  - 1 µl *antisense*-Primer
  - 7,5 µl DEPC-behandeltes Wasser

Die PCR-Amplifikation wurde im TRIO-Thermoblock nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Protokoll (Temp., Zeit):
- 1.) Denaturierung (2 min bei 95 °C)
  - 2.) Denaturierung (20 s bei 95 °C)
  - 3.) Primeranlagerung (20 s bei x °C; siehe Tab. 5)
  - 4.) DNA-Strangsynthese (30 s bei 72 °C)  
x-maliges Wiederholen der Schritte 2 - 4 (siehe Tab. 5)
  - 5.) End-Strangsynthese (5 min bei 72 °C)

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.7.)

**Tabelle 5** Humane Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR).

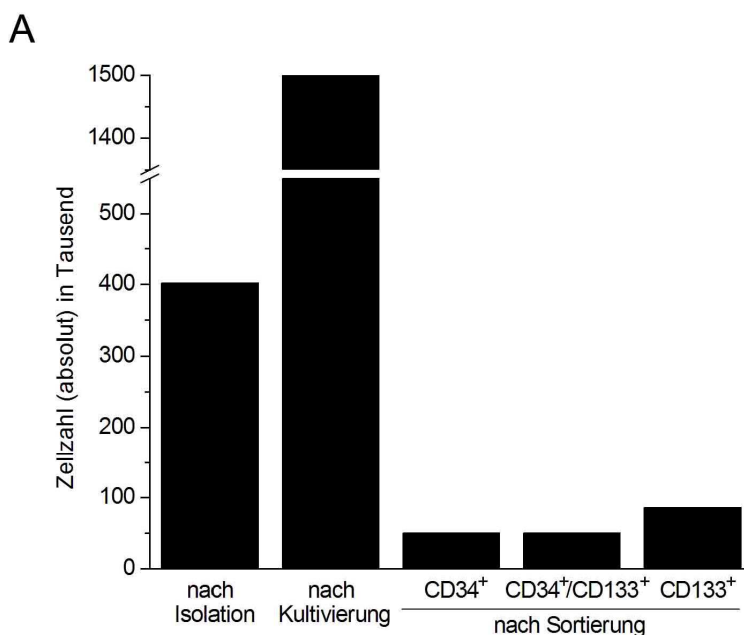
Name	Genbank-Nr.	5`-3` Sequenz		Hybridisierungstemp. (°C)	PCR-Fragment (bp)
		Sense-Strang	Antisense-Strang		
IGF-I	M29644	CAG CAG TCT	TCC TGC ACT	58	429
		TCC AAC CCA	CCC TCT ACT		
		AT	TG		
IGF-II*	NM000612	CGG CTT CTA	TTG GAA GAA	55	202
		CTT CAG CAG	CTT GCC CAC		
IGFBP-1*	NM000596	GAA AGC CCA	CCT CTT CCC	58	351
		GAG AGC ACG	ATT CCA AGG		
		GAG ATA	GTA GAC		
IGFBP-2*	NM000597	CAC GTG GAC	GTA GAA GAG	58	447
		AGC ACC ATG	ATG ACA CTC		
		AAC ATG	GGG GTC		
IGFBP-3*	M31159	TCC AGG AAA	CTT GCT CTG	58	475
		TGC TAG TGA	CAT GCT GTA		
		GTC GGA G	GCA GTG C		
IGFBP-4*	NM001552	AGC ACT TCG	CTC ACT CTC	58	357
		CCA AAA TTC	GAA AGC TGT		
		GAG	CAG		
IGFBP-5*	NM000599	TCT CTG CAC	CAA CGT TGC	55	282
		CTG AGA TGA	TGC TGT CGA		
		GAC	AGG		
IGFBP-6*	NM002178	GTG TCC AAG	CCT CTA TCC	55	279
		ACA CTG AGA	CCC AGC TTT		
		TGG	AGC		
IGF-IR	NM000875	CAC GAG GCT	AGG CAT ACA	50	501
		GAG AAG CT	GCA CTC CA		
IGF-IIR*	NM000876	GAG TGG CTG	GGA GTC AGA	55	379
		ATG GAA GAG	TGT GTA AGA		
		AT	GG		
18S rRNA	M10098	GTT GGT GGA	AGG GCA	60	345
		GCG ATT TGT	GGG ACT TAA		
		CTG G	TCA ACG C		

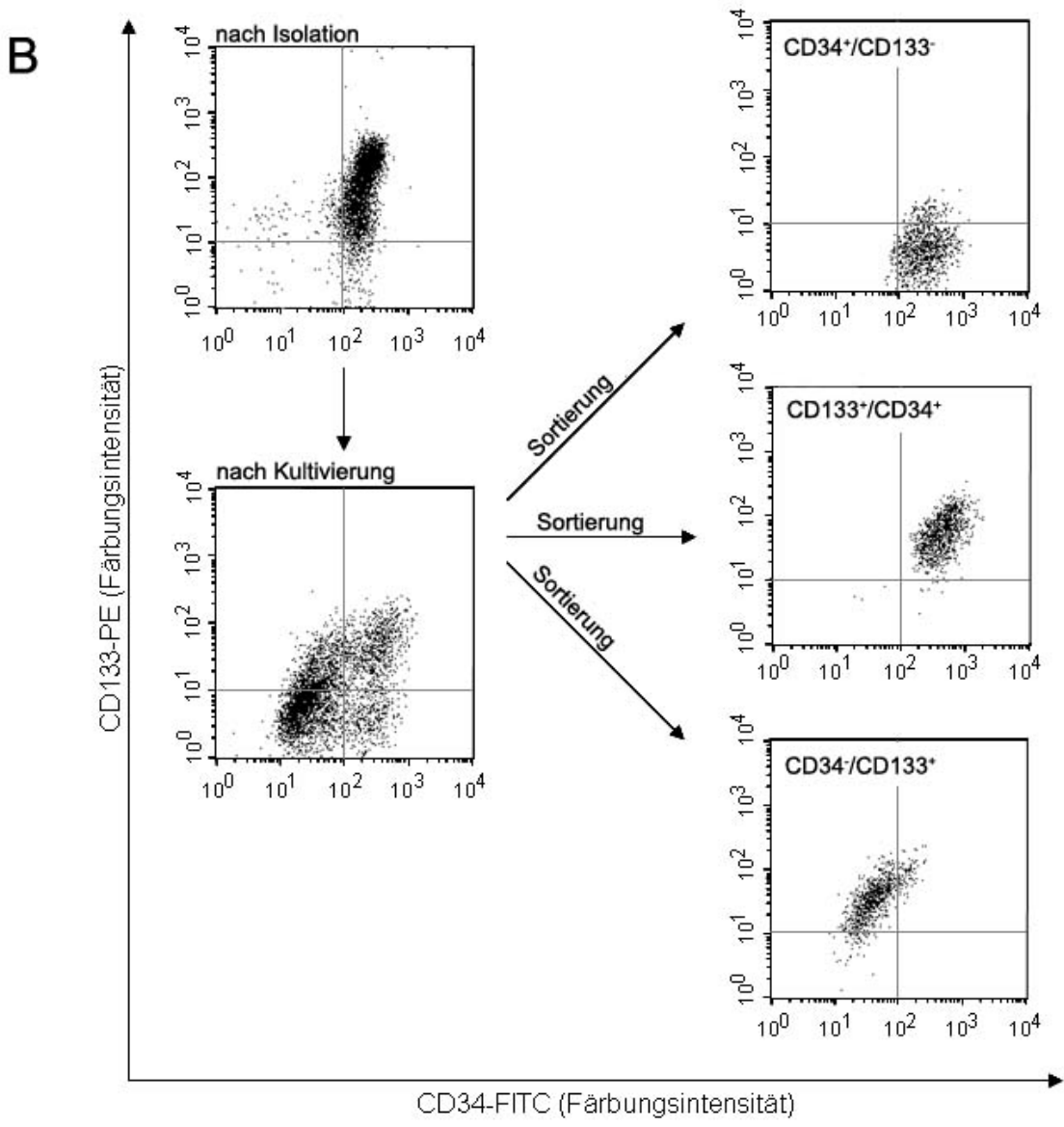
\*Mita *et al.*, 2000; AGCT = Basensequenz (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin)

### 3.) Ergebnisse

#### 3.1.) Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Es wurden durchschnittlich  $4 \times 10^5$  humane hämatopoetische Stammzellen, welche CD34 als Oberflächenantigen exprimieren, aus 100 ml *Buffy Coat*-Blut durch die MACS-Technik isoliert (Abb. 7A). Eine weitere Analyse dieser isolierten Stammzellen mittels Durchflusszytometrie ergab, dass diese CD34<sup>+</sup>-Zellen auch das Oberflächenantigen CD133 exprimieren (Abb. 7B links oben). Nach siebentägiger Kultivierung dieser CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen wurden durchschnittlich  $1,5 \times 10^6$  Zellen gezählt (Abb. 7A). Die anschließende Durchflusszytometrie wies die Entstehung von Stammzellen mit folgendem Oberflächenantigenmuster auf: CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>, welche per FACS-Technik sortiert wurden. Nach der Sortierung lagen durchschnittlich jeweils  $5,0 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>- und CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen sowie  $8,5 \times 10^4$  CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen vor (Abb. 7A). Im Gegensatz zur siebentägigen Kultivierung wurde nach 12-tägiger Kultivierung der CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen weder das CD34- noch das CD133-Antigen als Oberflächenantigene der hämatopoetischen Stammzellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine siebentägige Kultivierung CD34<sup>+</sup> und/oder CD133<sup>+</sup>-Stammzellen gewählt.





**Abbildung 7** Anzahl und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.

Exemplarische Darstellung hämatopoetischer Stammzellen nach Isolation, Kultivierung und Sortierung im Balkendiagramm (A) und Streudiagramm (B).

Für die nachfolgenden Studien zum Einfluss von Lungenzellen des Lungenkarzinoms auf die Migration der hämatopoetischen Stammzellen war es zunächst nötig, die Stammzellen auf die stabile Expression der Oberflächenantigene CD34 und CD133 in Gegenwart von Lungenkarzinomzellen (H358, H322) und Fibroblasten zu untersuchen. Die Überprüfung erfolgte durch indirekte Kokultur mittels *Transwell*-Einsätzen im FCS-freien Medium (siehe 2.2.4.). Vor und nach der 24-stündigen Kokultivierung wurden die Stammzellen im Durchflusszytometer untersucht. Es zeigte sich, dass die Antigene CD34 und/oder CD133 aller drei Stammzellpopulationen (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>) nach der 24-stündigen Kokultur noch vorhanden waren (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.) Einfluss von Lungenzellen auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen

Ziel dieser Arbeit war es, einen potentiellen Einfluss von Lungenzellen aus dem Gewebe eines Lungenkarzinoms auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen nachzuweisen. Als Lungenzellen wurden die Lungenkarzinomzelllinien H358 und H322 verwendet. Da Fibroblasten einen essentiellen Bestandteil des Lungenstromas darstellen, wurden diese Lungenzellen ebenfalls untersucht. Die Fibroblasten (WI-38) wurden sowohl in Mono-Kokultur als auch in Bi-Kokultur mit den Lungenkarzinomzellen verwendet (siehe 2.2.5.). Ein möglicher Mechanismus für den Einfluss der Lungenzellen auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen könnte das Freisetzen spezifischer löslicher Faktoren durch die Lungenzellen sein, welche anschließend über Signal-Rezeptor-Kaskaden eine erhöhte aktive Migration der Stammzellen induzieren. Daher wurde als Untersuchungsmethode der *Transwell-Assay* gewählt, weil über die poröse Membran der *Transwell*-Einsätze ein Kontakt zwischen Lungen- und Stammzellen lediglich mittels löslicher Faktoren erfolgen kann (Abb. 5A.). Die *Transwell-Assays* wurden mit porösen Membranen zweier unterschiedlicher Porengrößen durchgeführt. *Transwell-Assays* mit 8- $\mu$ m-Poren waren dabei weniger selektiv als jene mit 3  $\mu$ m Porengröße, weil die hämatopoetischen Stammzellen einen höheren Energieaufwand betreiben müssen, um ihre Zellstruktur so zu verändern, dass sie aktiv die engeren 3- $\mu$ m-Poren passieren können. Die *Transwell*-Einsätze mit 8- $\mu$ m-Poren wurden zur Vorauswahl genutzt. Weiterführende Untersuchungen in Assays mit 3- $\mu$ m-Poren dienten der Verifizierung der Ergebnisse aus den Assays mit 8- $\mu$ m-Poren.

**Tabelle 6** Basale Migration hämatopoetischer Stammzellen im *Transwell-Assay*.

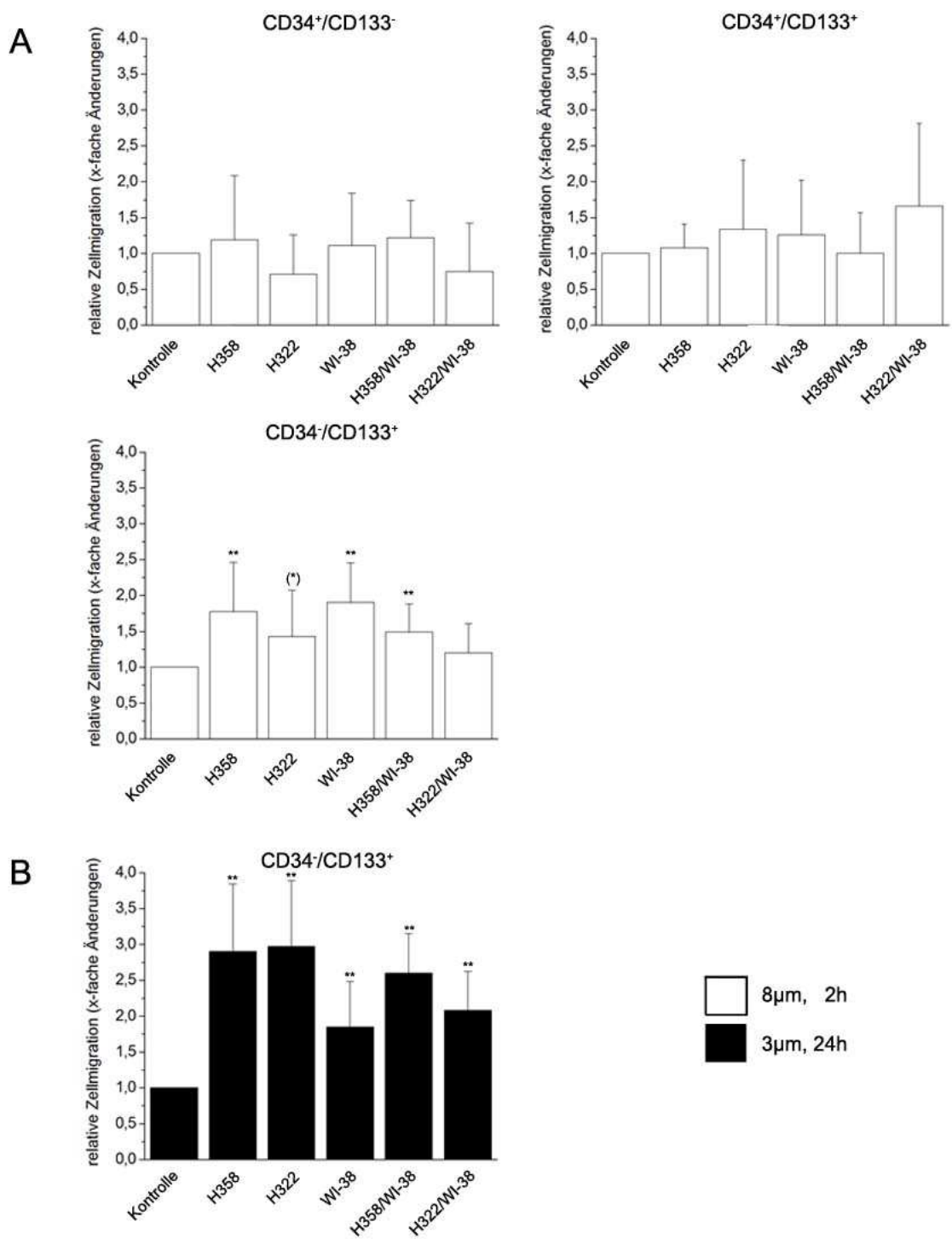
	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup>	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>
Basale Migration (% aller Zellen)*			
in 8 $\mu$ m-Poren	4,51 $\pm$ 1,07	5,22 $\pm$ 2,71	4,99 $\pm$ 0,47
in 3 $\mu$ m-Poren	nicht bestimmt	2,70 $\pm$ 0,46	2,77 $\pm$ 0,73

\*Mittelwerte  $\pm$  SD von n  $\geq$  5 Versuchen.

Zunächst wurden Versuche ohne Kokultur durchgeführt. Es war nötig, die Zeit des *Transwell-Assays* möglichst kurz zu halten, weil eine längere Versuchsdauer neben der Migration der Stammzellen zusätzlich noch eine Beeinflussung durch die Stammzellproliferation zur Folge haben würde. Daher wurde die Zeit untersucht, welche die Stammzellen benötigen, um in die Poren der Membran, jedoch nicht durch sie hindurch, zu migrieren (nach Kränkel *et al.*, 2005). Es hat sich gezeigt, dass für die *Transwell-Assays* mit 8- $\mu$ m-Poren eine Migrationszeit von 2 h und für die *Transwell-*

Assays mit 3- $\mu$ m-Poren eine Migrationszeit von 24 h geeignet war. Versuche ohne Lungenzellen ergaben eine vergleichbare basale Migration zwischen den drei Stammzellpopulationen sowohl in den *Transwell*-Assays mit 8  $\mu$ m als auch in denen mit 3  $\mu$ m (Tab. 6).

Nun wurden *Transwell*-Assays mit Kokultur in 8- $\mu$ m-Poren durchgeführt. Die Lungenzellen hatten bei diesen Assays sowohl in Mono- als auch in Bi-Kokultur keinen Einfluss auf die Migration von CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>- oder CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen (Abb. 8A, oben). Im Gegensatz dazu erreichten die Lungenkarzinomzellen H358 und die Fibroblasten WI-38 sowohl in Mono-Kokultur als auch in Bi-Kokultur eine Steigerung der Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen (Abb. 8A, unten links). Die Lungenkarzinomzellen H322 hatten sowohl in Mono- als auch in Bi-Kokultur mit den Fibroblasten einen geringen Effekt auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellpopulation beziehungsweise zeigten lediglich eine Tendenz zur Förderung der Migration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen (Abb. 8A, unten links). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden anschließend mit den CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen 3- $\mu$ m-Poren-*Transwell*-Assays durchgeführt, um die Ergebnisse der 8- $\mu$ m-Poren-*Transwell*-Assays in einem selektiveren Assay überprüfen zu können. Bei diesen Assays mit 3- $\mu$ m-Poren konnte in Gegenwart aller untersuchten Lungenzellen (H358, H322 und WI-38) sowohl in Mono- als auch in Bi-Kokultur eine Migrationssteigerung der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen gezeigt werden (Abb. 8B). Zur weiteren Analyse welche löslichen, potentiell migrationsfördernden Faktoren diese Ergebnisse bewirken könnten, wurde nachfolgend der Einfluss des IGF-System auf die Migration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen untersucht.



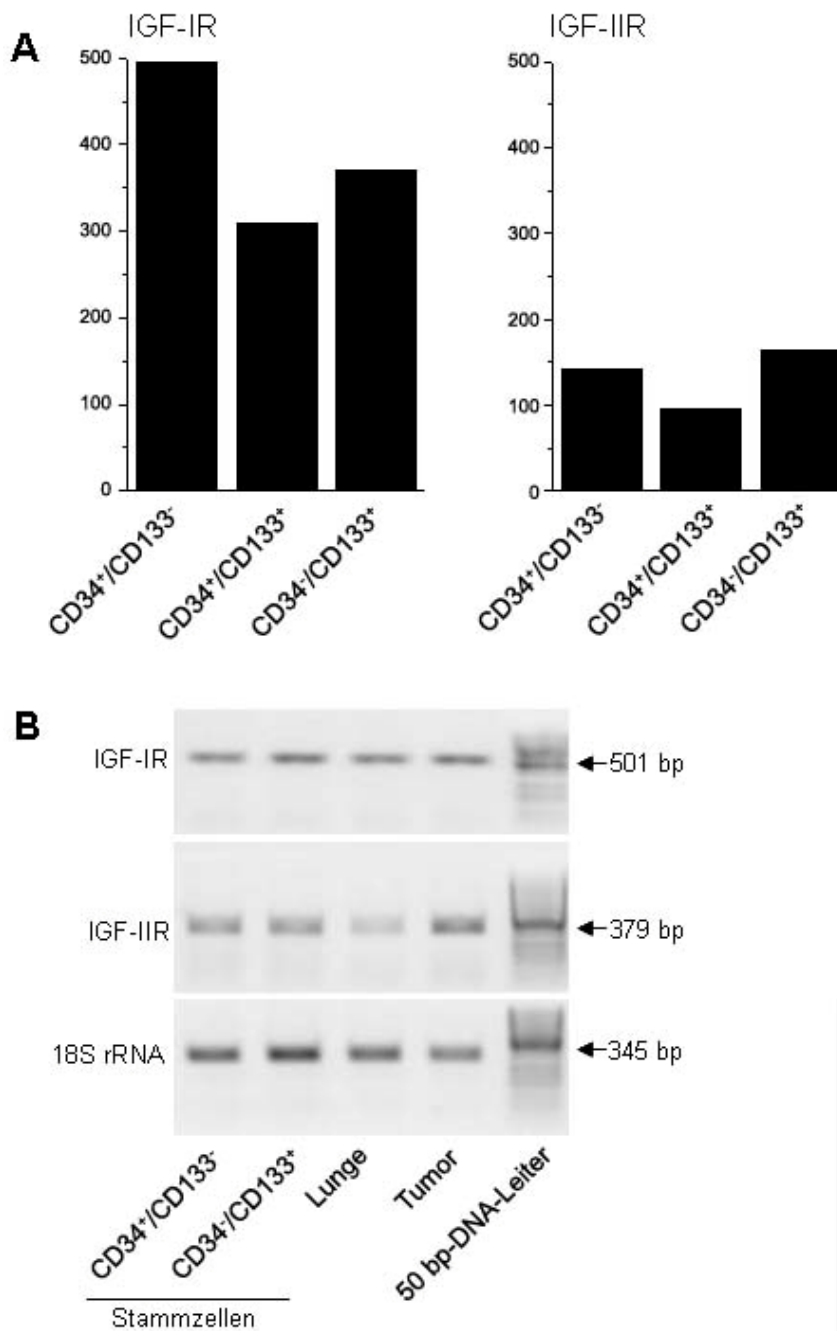
**Abbildung 8** Anzahl migrierter Stammzellen in *Transwell*-Assays mit 8- bzw. 3-µm-Poren.

Migrationsanalyse CD34<sup>-</sup> und/oder CD133<sup>+</sup>-exprimierender hämatopoetischer Stammzellen durch *Transwell*-Assays mit Kokultur (Lungenkarzinomzellen H358, H322 und/oder primäre Lungefibroblasten WI-38) in 8-µm-Poren nach 2 h (**A**) und in 3-µm-Poren nach 24 h Migration (**B**). Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ) mit (\*) $P \leq 0,1$ ; \* $P \leq 0,05$  und \*\* $P \leq 0,01$ .

### 3.3.) Analyse potentiell migrationsfördernder Faktoren

Die gesteigerte Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen in den *Transwell*-Assays unter Kokultur mit den Lungenzellen H358, H322 und WI-38 könnte durch die löslichen Faktoren des IGF-Systems verursacht werden. Nach dieser Hypothese sezernieren die Lungenkarzinomzellen und Lungenfibroblasten diese Faktoren und nehmen dadurch einen Einfluss auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Faktoren des IGF-Systems auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen untersucht. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die Rezeptoren des *insulin-like growth factor* (IGF-IR, IGF-IIR) auf den Stammzellpopulationen CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> exprimiert werden. Eine Analyse dieser drei Stammzellpopulationen wurde mittels Genchip (*Oligonucleotid Microarray*) durchgeführt. Diese Analyse erfolgte im Auftrag am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung in Halle (Dr. rer. nat. Vesselin Christov). In den erhaltenen Daten wurde gezeigt, dass der IGF-IR von allen drei Stammzellpopulationen exprimiert wird (Abb. 9A, links). Der IGF-IIR wird ebenfalls von den drei Stammzellpopulationen exprimiert, jedoch deutlich geringer als der IGF-IR (Abb. 9A, rechts). Dieses Ergebnis wurde mittels RT-PCR überprüft. Die RT-PCR wurde am Beispiel der beiden Stammzellpopulationen CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Mix aus RNA, welche aus jeweils 16 Proben sowohl physiologischem Lungen- („Lungenkontrolle“) als auch neoplastischem Tumorgewebe („Tumorkontrolle“) isoliert wurde (Bartling *et al.*, 2005). Das Ergebnis der RT-PCR zeigt, dass sowohl der IGF-IR als auch der IGF-IIR von den CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>- und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen gut exprimiert wird (Abb. 9B). Auch in den Kontrollen ist eine gute Expression erkennbar (Abb. 9B). Im Gegensatz zum IGF-IR ist die Expression des IGF-IIR in der Lungenkontrolle jedoch nur sehr gering, in der Tumorkontrolle dagegen relativ stark (Abb. 9B).





**Abbildung 9** Expression der IGF-Rezeptoren (IGF-IR und IGF-IIR) in hämatopoetischen Stammzellen.

Die Expression von Rezeptoren des *insulin-like growth factor* (IGF) durch die Stammzellpopulationen CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> wurde mittels Oligonucleotid Microarray (**A**, Mix aus n = 5 Proben) und RT-PCR (**B**) untersucht.

Anschließend wurde mittels RT-PCR die Expression der Liganden IGF-I und IGF-II sowie der IGF-Bindungsproteine (IGFBP) in den Lungenzellen (H358, H322, WI-38) untersucht. Sowohl IGF-I und IGF-II als auch das IGFBP-1 wurden von diesen Lungenzellen sehr gering exprimiert (Tab. 7). Während das IGFBP-3 gut von den

Fibroblasten (WI-38) exprimiert war, exprimierten die Lungenkarzinomzelllinien H358 und H322 das IGFBP-3 nur sehr gering (Tab. 7). Die IGFBP-2, -4, -5 und -6 hingegen wurden sowohl in den Lungenkarzinomzelllinien H358 und H322 als auch in den Fibroblasten gut exprimiert (Tab. 7, Abb. 10). Aufgrund der Expressionsdaten wurde das IGF-I sowie die IGFBP-2, -3, -4 und -6 ausgewählt, um die individuelle Bedeutung dieser löslichen Faktoren auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen.

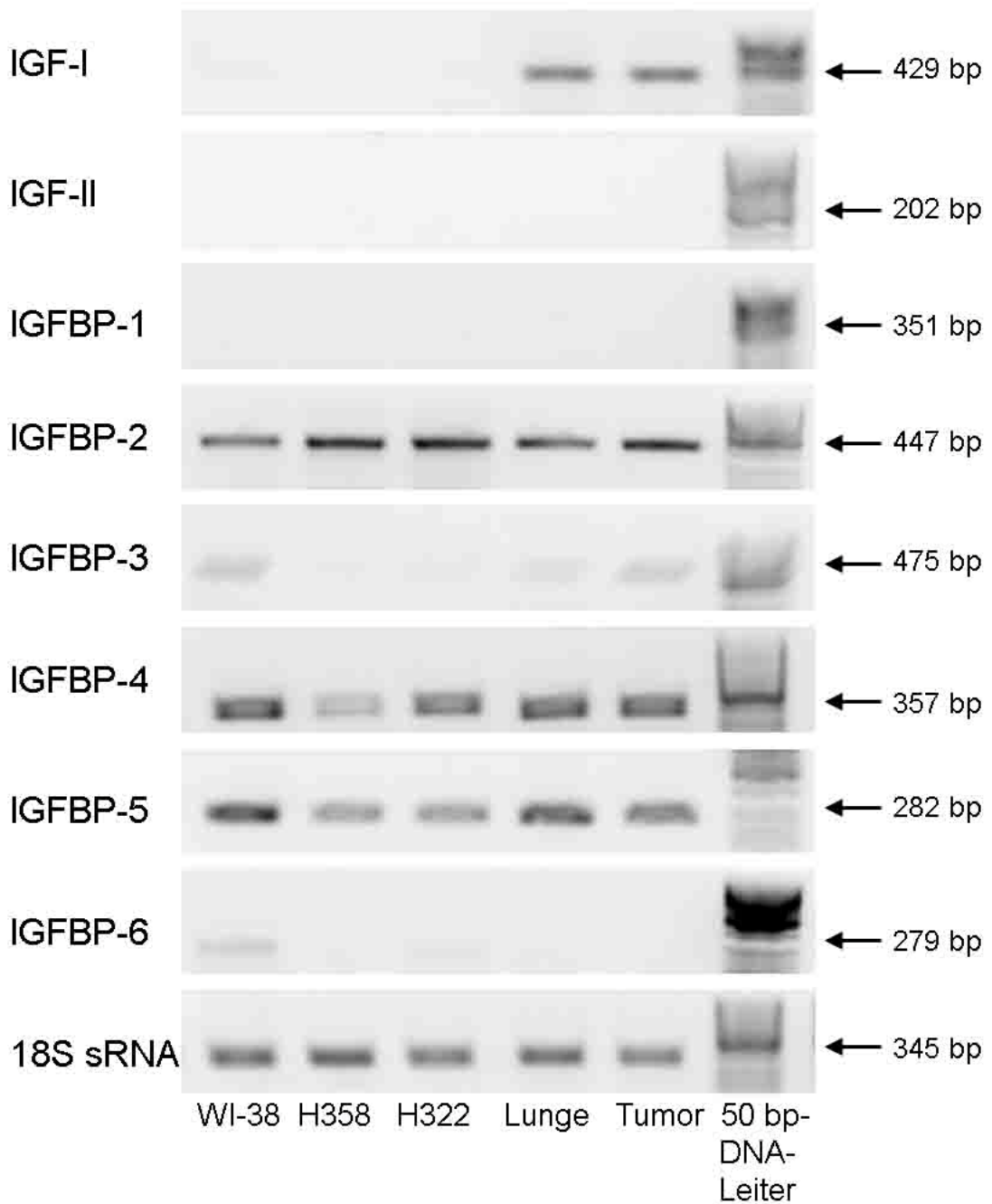
**Tabelle 7** mRNA-Expression des IGF-Systems in humanen Lungenzellen.

Name	Primäre	Lungenkarzinomzelllinien <sup>a</sup>		Lungengewebe <sup>b</sup>	
	Lungenfibroblasten <sup>a</sup>	H358	H322	Lunge	Tumor
	WI-38				
IGF-I	0,27 ± 0,14	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,05	1,90	2,37
IGF-II	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,05	0,17 ± 0,12	0,17	0,29
IGFBP-1	0,05 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,01	0,04
IGFBP-2	0,92 ± 0,41	1,43 ± 0,65	1,47 ± 0,66	1,02	2,09
IGFBP-3	1,07 ± 0,75	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,03	0,15	0,42
IGFBP-4	1,32 ± 1,14	0,36 ± 0,35	0,54 ± 0,49	1,25	1,50
IGFBP-5	1,29 ± 0,31	0,96 ± 0,34	0,85 ± 0,46	1,11	1,14
IGFBP-6	1,54 ± 0,71	0,28 ± 0,25	0,89 ± 0,88	0,22	0,22

mRNA-Gehalt analysiert durch RT-PCR und normalisiert per 18S rRNA.

<sup>a</sup>Mittelwerte ± SD von n = 3 Zellkultivierungen

<sup>b</sup>Mittelwerte aus einem Mix von n = 16 Proben



**Abbildung 10** Expression der IGF-Bindungsproteine in den Lungenzellen.

Die Expression von Faktoren des IGF-Systems durch die Lungenzellen H358, H322 und WI-38 wurde mittels RT-PCR überprüft. Als Kontrollen dienten humane Lungen- und Tumorgewebe (Mix aus n = 16 Proben).

### 3.4.) Einfluss löslicher Komponenten des IGF-Systems auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen

Die Bedeutung der löslichen Komponenten des IGF-Systems auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen wurde nun per *Transwell*-Assay (3- $\mu$ m-Poren) untersucht. In die *Transwell*-Einsätze wurden jeweils die ausgewählten rh Faktoren IGF-I, IGFBP-2, -3, -4 und -6 eingesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Faktoren richten sich nach den physiologischen Serumkonzentrationswerten im Menschen (siehe Tab. 4, Yu *et al.*, 1999, Krsek *et al.*, 2002, Yamaguchi *et al.*, 2006).

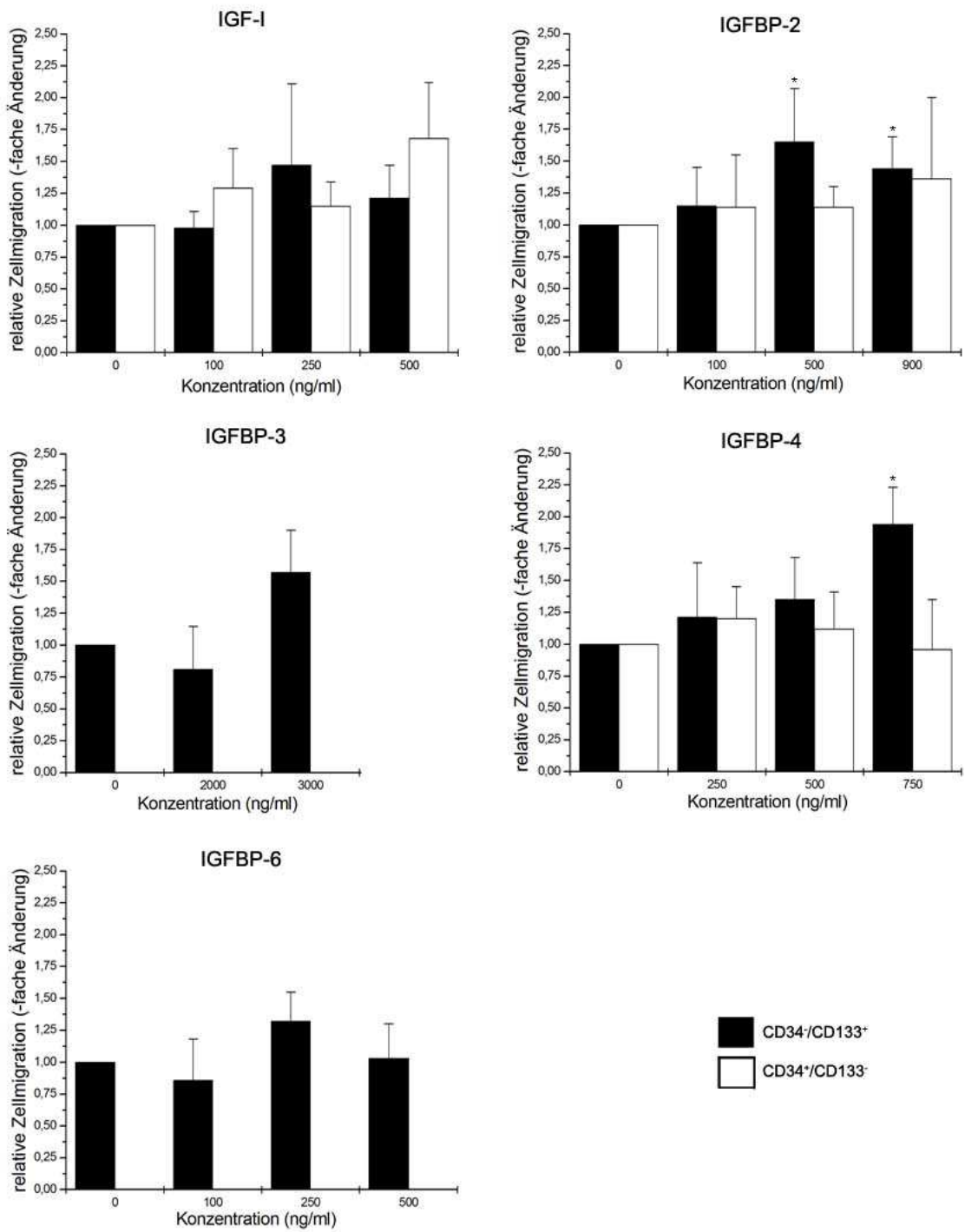
In den Untersuchungen zeigte sich, dass IGF-I keine veränderte Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen im Vergleich zu den Kontrollen bewirkt. Eine IGF-I-bedingte Migration CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen infolge zu hoher basaler Eigenproduktion des IGF-I kann nahezu ausgeschlossen werden, da IGF-I von den CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen nur sehr gering exprimiert wird (Tab. 8). Anschließend erfolgte die Analyse der Migration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen durch die ausgewählten IGFBPs. Die IGFBP-3 und -6 verursachten keine Veränderung der Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen (Abb. 11A). Im Gegensatz dazu führten die Faktoren IGFBP-2 und -4 zu einer Migrationssteigerung der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen, welche vor allem bei höheren Konzentrationen beobachtet werden konnte. Diese Migrationssteigerung erzielte IGFBP-2 bei 500 und 900 ng/ml; IGFBP-4 erreichte dies bei 750 ng/ml (Abb. 11A; 11B).

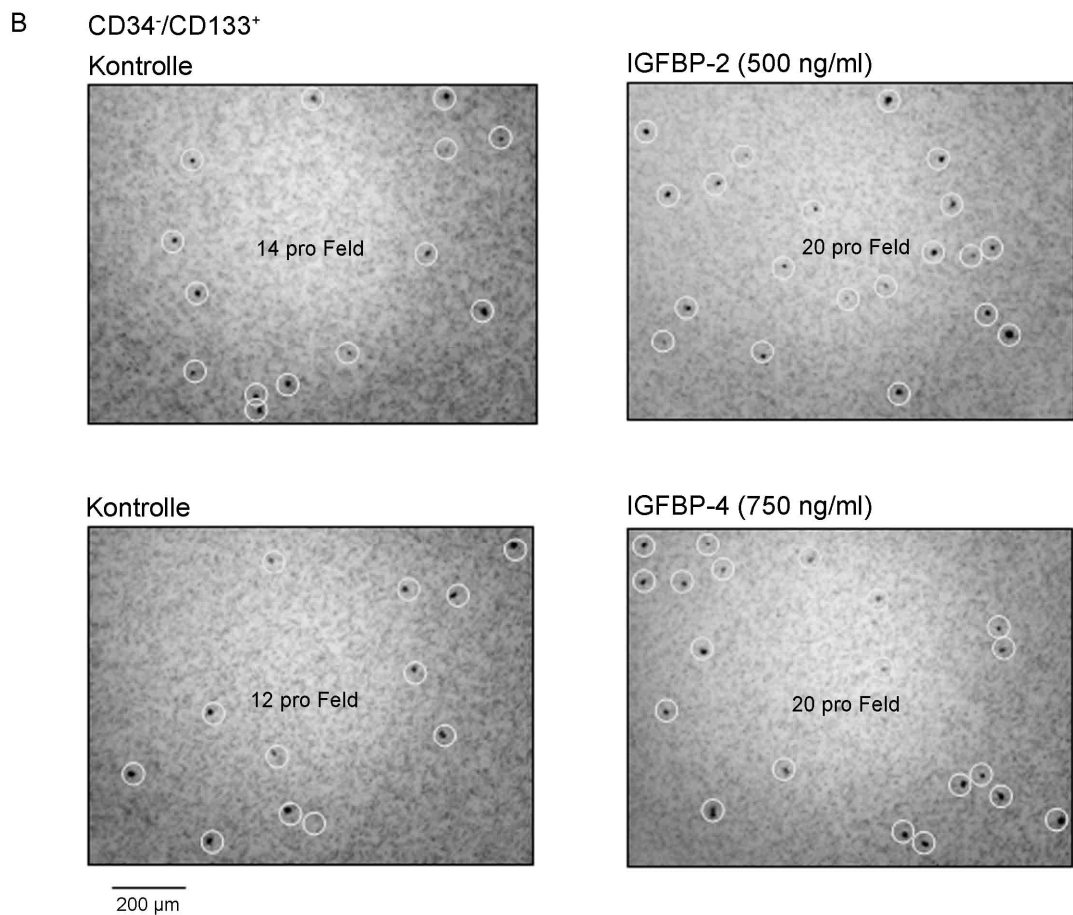
**Tabelle 8** Expression von IGF-I in hämatopoetischen Stammzellen.

	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup>	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>
IGF-I	39,5	10,3	65,0

Analyse mit Genchip (Oligonucleotid Microarray; Probenmix aus n = 5 Proben).

A





**Abbildung 11** Migrationsveränderung von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>- & CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> Stammzellen durch ausgewählte lösliche Faktoren des IGF-Systems im *Transwell*-Assay.

(A) Migrationsanalyse CD34<sup>-</sup> bzw. CD133<sup>-</sup> exprimierender hämatopoetischer Stammzellen durch *Transwell*-Assays durch ausgewählte lösliche Faktoren des IGF-Systems mittels *Transwell*-Assays (3-µm-Poren). Mittelwerte ± SD (n=3) mit \*P≤0,05. (B) repräsentative Darstellung der migrierenden CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> Stammzellen in einer Fluoreszenz-Mikroskopieaufnahme mittels DNA-spezifischer Zellkernanfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI.

## 4.) Diskussion

Die Tumervaskularisierung hat bei der Entstehung und dem Progress solider Tumoren, wie dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, eine entscheidende Bedeutung. Da hierbei eine Beteiligung von hämatopoetischen Stammzellen vermutet wird, welche CD133 und/oder CD34 exprimieren und sich potentiell zu Endothelzellen weiterentwickeln oder die Gefäßbildung indirekt stimulieren könnten, sollte die vorliegende Arbeit den Einfluss von Lungenkarzinomzellen sowie Lungenfibroblasten, als essentielle Komponenten des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, auf die Migration dieser Stammzellen untersuchen. In diesem Zusammenhang konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass sowohl humane Lungenkarzinomzellen als auch Lungenfibroblasten alleinig sowie zusammen bevorzugt die humanen hämatopoetischen Stammzellen vom Antigenmuster CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> aber nicht jene vom Antigenmuster CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> bzw. CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> zur Migration stimulieren. Detaillierte Studien zu löslichen Faktoren des IGF-Systems, welches an der Tumorentstehung und -progression beteiligt ist, haben anschließend gezeigt, dass insbesondere die IGF-Bindungsproteine-2 und -4 die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen fördern.

Zur Isolation von humanen Stammzellen mit potentiell proangiogenen Eigenschaften wurden mononukleäre Zellen aus *Buffy Coat*-Blut isoliert und nach Kultur mittels Durchflusszytometrie anhand der Oberflächenantigene CD34 und/oder CD133 in drei Zellpopulationen (CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>-</sup>; CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>; CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>) unterteilt. Diese Oberflächenantigene ermöglichten eine Zuordnung zu den hämatopoetischen bzw. endothelialen Stamm- und Progenitorzellen (HSCs bzw. EPCs). Spätere Differenzierungen sowohl der hämatopoetischen als auch der endothelialen Zellreihe dieser HSCs bzw. EPCs verlieren diese Oberflächenantigene zum Teil (Abb. 3). Die hier auf CD34- und CD133-charakterisierten Stammzellen wurden zusätzlich positiv auf das Oberflächenantigen CD45 getestet. Dies ermöglichte eine Zuordnung dieser Zellen in die hämatopoetische Zellreihe (Timmermans *et al.*, 2009) und ließ daher den Schluss zu, dass es sich bei den untersuchten Zellen um proangiogene HSCs handelte. Allerdings war eine exakte Zuordnung aufgrund einer fehlenden einheitlichen Nomenklatur und fehlender spezifischer Marker derzeit nicht eindeutig möglich (Timmermans *et al.*, 2009; Yoder *et al.*, 2012; Rose *et al.*, 2015).

Die migrationsfördernde Wirkung von Lungenkarzinomzellen auf die CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen konnte am Beispiel der beiden humanen Zelllinien H358 und H322, gezeigt werden. Am Beispiel der WI-38-Zellen konnte zudem ein migrationsfördernder Effekt von Fibroblasten, einer wichtigen Zellkomponente des

Tumorstromas, auf die CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen gezeigt werden. Dies wird indirekt durch die Studien von Silzle *et al.*, 2003 unterstützt, die einen migrationsfördernden Effekt tumorassoziierter Fibroblasten auf Monozyten im Tumorgewebe nachweisen konnten. Da jedoch der migrationsfördernde Effekt der untersuchten Lungenkarzinomzellen auf die CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs größer war als bei den Fibroblasten, deutet dies primär auf die migrationsfördernde Wirkung der Lungenkarzinomzellen selbst hin. Die Kombination von Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten erbrachte keinen synergistischen Effekt auf die Migrationsteigerung der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs. Dies deutet daraufhin, dass zur Potenzierung der promigratorischen Eigenschaften des Tumors keine relevanten Interaktionen zwischen Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten bestehen. Allerdings wurden in dieser Arbeit Fibroblasten aus physiologischem Lungengewebe verwendet. Tumorassozierte Fibroblasten hingegen könnten einen stärkeren promigratorischen Effekt bewirken. Der Unterschied zwischen physiologischen und tumorassozierten Fibroblasten wurde bereits beschrieben (Horie *et al.*, 2012; Chaudhri *et al.*, 2013).

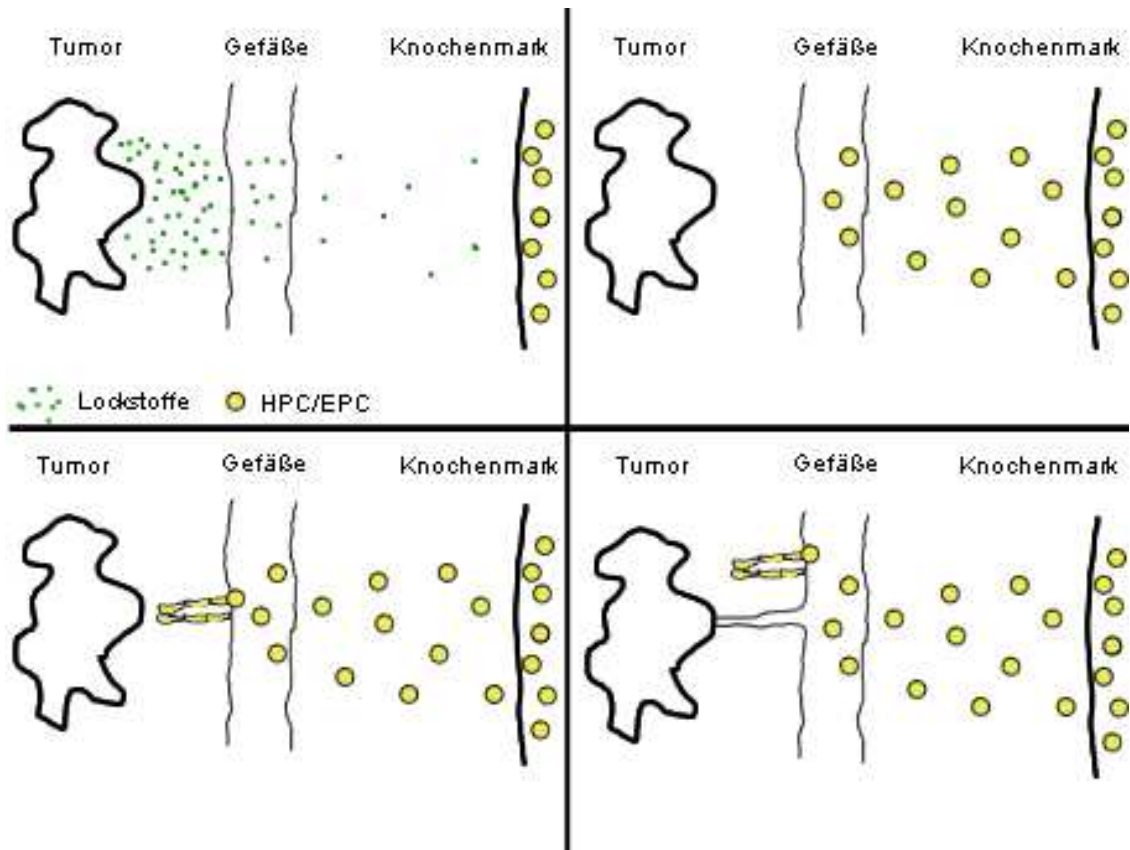
**Tabelle 9** Schematische Zusammenfassung des Einflusses von Lungenkarzinomzellen und -fibroblasten auf die Migration von HSCs.

	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup>	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>
H358	∅	∅	↑↑↑
H322	∅	∅	↑↑↑
WI-38	∅	∅	↑
H358/WI-38	∅	∅	↑↑
H322/WI-38	∅	∅	↑

∅=kein Effekt, ↑=positiver Effekt nach Stärke.

Eine Änderung des HSC-Zelltyps während der Kokultur konnte ausgeschlossen werden, da abschließende Analysen auf CD34 und CD133 die positive Expression von CD34 bzw. CD133 sicherstellten. Die Ergebnisse deuten zunächst darauf hin, dass *in situ* im Lungentumor detektierte CD133<sup>+</sup>-Stammzellen vermutlich primär im peripheren Blut vorhandene HSCs sind (Hilbe *et al.*, 2004; Dome *et al.*, 2006; Pircher *et al.*, 2008).





**Abbildung 12** Schematisches Modell der Tumorvaskularisierung (modifiziert nach Richardson *et al.*, 2011).

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden durch Lockstoffe zur Migration aus dem Knochenmark angeregt (oben) um eine Tumorvaskularisierung durch Gefäßneubildungen zu ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich ein in der Abbildung 12 sowie im Folgenden dargestellter schematischer Ablauf vermuten. Die im Lungengewebe befindlichen Lungenkarzinomzellen benötigen aufgrund des progredienten Wachstums und der gesteigerten Hypoxie eine bessere Anbindung an das Blutkreislaufsystem. Hierzu werden Lockstoffe (*attractant*) an das umliegende Gewebe abgegeben und dadurch hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zur Proliferation und Migration aus dem Knochenmark angeregt. Diese gelangen über das Blutkreislaufsystem entgegen dem Konzentrationsgefälle der Lockstoffe in die Nähe der sezernierenden Tumorzellen. Während der Migration oder nach dem Erreichen des Zielgebietes differenzieren die unreiferen proangiogenen hämatopoetischen Zellen in Monozyten, Endothelzellen oder andere proangiogene Zellen (PAC; siehe Abb. 3). Durch diese Differenzierung erklärt sich der Wechsel der Oberflächenantigene und der Funktionen dieser HSCs/HPCs (Hristov *et al.*, 2003). Mehrere Arbeitsgruppen geben Hinweise für diese Theorie. So konnten bereits durch Shigematsu *et al.*, 1999 ein Einfluss reifer Endothelzellen auf die Gefäßneubildung nachgewiesen werden. Hilbe *et al.*, 2004; Dome *et al.*, 2006 und

Pircher *et al.*, 2008 konnten zusätzlich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte Anzahl endothelialer Progenitorzellen in kapillarähnlichen Strukturen oder Gefäßwänden bestehender Kapillaren innerhalb des Tumorgewebes nachweisen. Die aus den EPC zu ECFC (*endothelial colony forming cell*) differenzierten Zellen tragen mutmaßlich ebenso zur Tumolvaskularisierung bei wie die aus den HSCs/HPCs differenzierten PACs (zur Übersicht Richardson *et al.*, 2011). Während PACs in das umliegende Gewebe migrieren und gefäßähnliche Strukturen bilden, kleiden ECFCs diese fragilen Gebilde aus, stabilisieren sie und stellen eine Verbindung zum bestehenden Blutkreislaufsystem her. Eine andere mögliche Erklärung stellt eine Infiltration der undifferenzierten HSCs in das Tumorgewebe dar, in welchem eine Metaplasie dieser Stammzelle in eine entartete Tumorzelle stattfindet. Auch eine Differenzierung der HSCs zu Monozyten, welche Bestandteil des Tumorstromas sind, ist möglich (siehe Abb. 3). Monozyten sind ebenfalls über die Modulation der Immunantwort (Ke *et al.* 2015) und/oder über eine gesteigerte Angiogenese (Dirkx *et al.*, 2006) am Tumorprogress des Lungenkarzinoms beteiligt.

Als Auslöser des migrationsfördernden Effektes von Lungentumorzellen auf HSCs kommen vor allem löslichen Faktoren in Frage, unter denen die des IGF-Systems vertieft untersucht wurden. So konnten Shigematsu *et al.*, 1999 nachweisen, dass IGF-I die Migration von reifen Endothelzellen stimuliert. Im Gegensatz dazu wurde anhand der hier gewonnenen Ergebnisse jedoch keine durch IGF-I induzierte erhöhte Migration CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen (Abb. 11A), obwohl der IGF-IR von den CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen gut exprimiert wird. Eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund zu hoher Migration infolge basaler Eigenproduktion von IGF-I durch die CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen selbst konnte ausgeschlossen werden, da IGF-I in diesen Stammzellen nur sehr gering exprimiert wird. (Abb. 9). Allerdings ist der migrationsfördernde Effekt in dieser Arbeit lediglich bei den CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen aufgetreten, welche nach derzeitiger Kenntnis einer früheren Entwicklungsstufe der HSCs entsprechen. Spätere Entwicklungsstufen der HSCs (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>) zeigten in dieser Arbeit keine erhöhte Migrationsbereitschaft. Die von Shigematsu *et al.*, 1999 untersuchten reifen Endothelzellen, welche eine Differenzierungsstufe der HSCs darstellen, waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Weiterhin sah man in der RT-PCR, dass IGF-I in der Tumorkontrolle eine starke Expression aufzeigte, in den Lungenkarzinomzelllinien H358, H322 und den Fibroblasten (WI-38) jedoch nur schwach exprimiert wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der individuellen Expression der Lungenzellen einzelner Proben im Vergleich mit den Kontrollen gefunden werden, da diese Kontrollen ein größeres Kollektiv erfassen. Die Daten lassen aber auch den Schluss zu, dass IGF-I nicht direkt

an der Migrationssteigerung der HSCs beteiligt ist und/oder, dass andere Zellen aus dem Gewebe des Lungenkarzinoms, als die hier verwendeten Lungenkarzinomzellen (H358, H322) und primären Lungenfibroblasten (WI-38), als Ursprung für die IGF-I-Expression in Frage kommen.

**Tabelle 10** mRNA-Expression von Komponenten des IGF-Systems in WI-38, H358 und H322.

	WI-38	H358	H322
IGF-I	(+)	-	-
IGF-II	-	-	(+)
IGFBP-1	-	-	-
IGFBP-2	++	++	++
IGFBP-3	++	-	+
IGFBP-4	++	+	+
IGFBP-5	++	++	++
IGFBP-6	++	(+)	++

– = unterhalb des Messbereiches, (+) = gering, + = normal, ++ = hoch

Einige IGFBPs hingegen werden gut von den untersuchten Lungenkarzinomzellen auf mRNA-Ebene exprimiert (Tab. 9), und daher wurden diese eingehender in *Transwell-Assays* (3- $\mu$ m-Poren) untersucht. Bei dem nachgewiesenen Einfluss von IGFBP-2 und -4 auf die Migration CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSCs, nicht jedoch auf CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>-HSCs (Abb. 11A; Tab. 11), handelt es sich vermutlich um einen IGF-I-unabhängigen Effekt, da IGF-I und IGF-II von den Lungenzellen und den CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-HSC nur sehr gering exprimiert werden. Allerdings wäre auch eine verminderte mRNA-Expression als negatives Feedback infolge einer hohen Proteinexpression denkbar. Eine IGF-I-unabhängige Stimulation der Zellmigration durch IGFBP-2 wurde für Tumorzellen bereits beschrieben (Schütt *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die IGFBP-2-bedingte Zellmigration durch die Bindung von IGFBP-2 an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin durch seine carboxy-terminale RGD-Sequenz (Gly-Arg-Asp) erfolgt (Schütt *et al.*, 2004). Der größte Effekt von IGFBP-2 auf die Migration wurde bei einer IGFBP-2-Konzentration von 500 ng/ml beobachtet, was physiologischen Serumwerten entspricht (Yu *et al.*, 1999; Krsek *et al.*, 2002). In dieser und anderen Arbeiten (Reeve *et al.*, 1992) konnte bereits eine gute Expression von IGFBP-2 in den Lungenkarzinomzelllinien und -geweben gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte nun erstmals die IGF-unabhängige stimulierende Wirkung von IGFBP-4 auf die

Zellmigration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen nachgewiesen werden (Abb. 11A; Tab. 11).

**Tabelle 11** IGFBP-vermittelte Migration hämatopoetischer Stammzellen in Abhängigkeit von der Konzentration.

K in ng/ ml	IGFBP-2		IGFBP-4		K in ng/ ml
	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>-</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>	
100	-	-	-	-	250
500	-	↑	-	-	500
900	-	↑	-	↑	750

K = Konzentration, - = keine Migrationssteigerung, ↑ = vorhandene Migrationssteigerung

Weiterhin wurde durch Fu *et al.*, 2007 eine von IGF unabhängige IGFBP-6-induzierte Zellmigration beschrieben. Obwohl die Lungenkarzinomzelllinien und primären Lungenfibroblasten IGFBP-6 gut exprimierten, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Einfluss von IGFBP-6 auf die Migration CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen beobachtet. Das IGFBP-3, welches die größte Serumkonzentration aller hier getesteten Peptide aufweist (Yu *et al.*, 1999, Yamaguchi *et al.*, 2006), hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen (Abb. 11A). In der Literatur wurde weiteren Faktoren des IGF-Systems eine Migrationssteigerung zugesprochen (zur Übersicht Forbes *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung über den fehlenden Nachweis in der hier vorliegenden Arbeit könnte in einem Mechanismus liegen, der hier nicht untersucht wurde. Stearns *et al.*, 2005 wiesen beispielsweise nach, dass IGF-I die VEGF-Synthese erhöht. VEGF wiederum ist ein bekannter Stimulator der Migration von EPC (Benezra *et al.*, 2001). Auch IGF-II kann eine Erhöhung der VEGF-Synthese bewirken (Hoeben *et al.*, 2004). Demnach könnte ein weiterer, wichtiger promigratorischer Effekt der IGFBPs über die Stimulation von VEGF oder anderen Mediatoren zu finden sein.

Diese Arbeit konnte einen Einblick in die Beeinflussung der Migrationssteigerung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen durch Lungenkarzinomzellen bieten und somit einen Beitrag zur Erforschung der Tumorprogression und/oder -entwicklung leisten. In dieser Arbeit wurde versucht, dem *in vivo*-Zustand näher zu kommen, indem primäre Lungenfibroblasten als essentielle Komponente des Lungenkarzinoms in Kokultur mit den Lungenkarzinomzellen untersucht wurden. Dennoch beschränkt sich die Aussagekraft dieser Arbeit primär auf zwei ausgewählte Zelllinien des Nicht-

kleinzelligen Lungenkarzinoms (H358, H322), während *in vivo* eine Vielzahl verschiedener Zelltypen einschließlich Tumorsubzellen im Lungenkarzinom vorliegen. Ein weiterer begrenzender Aspekt dieser Arbeit ist die Konzentration der untersuchten Faktoren des IGF-Systems. Diese entsprechen physiologischen Werten von gesunden Probanden. In den letzten Jahren konnten zwar auch Serumwerte in NSCLC-Patienten ermittelt werden (Lee *et al.*, 1999; Wakai *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Shersher *et al.*, 2011), allerdings gibt es immer noch kaum Aussagen über die genauen tumorlokalen Konzentrationen dieser potenziell migrationssteigernden Faktoren des IGF-Systems. Mit diesen Angaben wären Experimente möglich, die genauere Aussagen über das Verhalten der HSCs bei einem NSCLC-Patienten ermöglichen. Weiterhin konnte in den Experimenten lediglich bewiesen werden, dass die hier untersuchten Lungenkarzinomzelllinien die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen steigern. Eine Einschätzung über nachfolgende Zusammenhänge bezüglich Tumervaskularisierung bzw. des -progresses können nur vermutet werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit nachgewiesen, dass CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen als Subtyp der hämatopoetischen Stammzellen durch die chemotaktische Wirkung der IGFBP-2 und -4, welche sowohl von den Lungenkarzinomzellen (H358, H322) als auch der Lungenfibroblasten sezerniert werden, in den soliden Tumor gelangen und somit zur Tumorprogression beitragen können. Weitere Einzelheiten über die genauen Zusammenhänge müssen aber noch untersucht werden. Sollten sich jedoch diese Zusammenhänge bestätigen, dürfte das IGF/IGFBP-System ein potentiellies Angriffsziel für eine mögliche antitumorale Therapie sein (Mohanraj und Oh, 2011; Liu *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Heidegger *et al.*, 2015).

## 5.) Literaturverzeichnis

### Referenzen

Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW (2000) Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57(7):1050-1093.

Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB (2015) Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol* 42 Suppl 1:S3-S17.

Allen NE, Roddam AW, Allen DS, Fentiman IS, Dos Santos Silva I, Peto J, Holly JM, Key TJ (2005) A prospective study of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3 and breast cancer risk. *Br J Cancer* 92(7):1283-1287.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302):964-967.

Asahara T, Kawamoto A, Masuda H (2011) Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 29(11):1650-1655.

Bach LA, Fu P, Yang Z (2013) Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond)* 124(4):215-229.

Bach LA (2015) Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol* 54(1) R1-R13.

Bartling B, Rehbein G, Silber RE, Simm A (2006) Senescent fibroblasts induce moderate stress in lung epithelial cells in vitro. *Exp Gerontol* 41(5):532-539.

Bartling B, Hofmann HS, Silber RE, Simm A (2008) Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin. *Cancer Biol Ther* 7(8):1250-1261.

Baxter RC (1988) Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 67(2):265-272.

Baxter RC, Martin JL (1989) Structure of the M<sub>r</sub> 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):6898-6902.

Benezra R, Rafii S, Lyden D (2001) The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20(58):8334-8341.

Blundell TL, Bedarkar S, Humbel RE (1983) Tertiary structures, receptor binding, and antigenicity of insulinlike growth factors. *Fed Proc* 42(9):2592-2597.

Brahmkhatri VP, Prasanna C, Atreya HS (2015) Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *Biomed Res Int* 2015:538019.

Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT (2011a) The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6(4):824-833.

Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT (2011b) The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6(1):209-217.

Cancelas JA, Jansen M, Williams DA (2006) The role of chemokine activation of Rac GTPases in hematopoietic stem cell marrow homing, retention, and peripheral mobilization. *Exp Hematol* 34(8):976-985.

Chang KH, Chan-Ling T, McFarland EL, Afzal A, Pan H, Baxter LC, Shaw LC, Caballero S, Sengupta N, Li Calzi S, Sullivan SM, Grant MB (2007) IGF binding protein-3 regulates hematopoietic stem cell and endothelial precursor cell function during vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10595-10600.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N (2014) Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 6(3):1670-1690.

Chaudhri VK, Salzler GG, Dick SA, Buckman MS, Sordella R, Karoly ED, Mohny R, Stiles BM, Elemento O, Altorki NK, McGraw TE (2013) Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor. *Mol Cancer Res* 11(6):579-592.

Chen X, Zheng J, Zou Y, Song C, Hu X, Zhang CC (2013) IGF binding protein 2 is a cell-autonomous factor supporting survival and migration of acute leukemia cells. *J Hematol Oncol* 6(1):72.

Correa LL, Neto LV, Lima GA, Gabrich R, Miranda LC, Gadelha MR (2015) Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and prostate cancer: correlation with Gleason score. *Int Braz J Urol* 41(1):110-115.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):10158-10163.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14(10):986-995.

Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE (2005) Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5):421-439.

Devreotes P, Horwitz AR (2015) Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(8):a005959.

Dirkx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW (2006) Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80(6):1183-1196.

Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J (2006) Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66(14):7341-7347.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15(3):504-514.

Estes ML, Mund JA, Mead LE, Prater DN, Cai S, Wang H, Pollok KE, Murphy MP, An CS, Srour EF, Ingram DA Jr, Case J (2010) Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytometry A* 77(9):831-839.

Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT (2001) Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* 8(12):1058-1063.

Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6):824-854.

Forbes BE, McCarthy P, Norton RS (2012) Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:38.

Foulstone E, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, Church D, Hassan AB (2005) Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 205(2):145-153.

Fu P, Thompson JA, Bach LA (2007) Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6. *J Biol Chem* 282(31):22298-22306.

Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, Gunetti M, Kollet O, Cavalloni G, Falda M, Fagioli F, Lapidot T, Aglietta M, Piacibello W (2003) Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp Hematol* 31(3):261-270.

Garret TP, McKern NM, Lou M, Frenkel MJ, Bentley JD, Lovrecz GO, Elleman TC, Cosgrove LJ, Ward CW (1998) Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* 394(6691):395-399.



Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller J, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Stauder A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rübe C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H, German Respiratory Society, German Cancer Society (2011) Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: Interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie* 65(1):39-59.

Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106(49):809-818.

Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhning HJ, Niethammer D, Kuci S (2003) Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 996:141-151.

Heidegger I, Massoner P, Sampson N, Klocker H (2015) The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer. *Cancer Lett* 367(2):113-121.

Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM (2004) CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 57(9):965-969.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56(4):549-580.

Hollier BG, Krickler JA, Van Lonkhuyzen DR, Leavesley DI, Upton Z (2008) Substrate-bound insulin-like growth factor (IGF)-I-IGF binding protein-vitronectin-stimulated breast cell migration is enhanced by coactivation of the phosphatidylinositide 3-Kinase/AKT pathway by  $\alpha$ v-integrins and the IGF-I receptor. *Endocrinology* 149(3):1075-1090.

Horie M, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, Kohyama T, Nagase T (2012) Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochem Biophys Res Commun* 423(1):158-163.

Hristov M, Erl W, Weber PC (2003) Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7):1185-1189.

Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergano-Vera E, Bulfone A, de Pablo F, Vicario-Abejon C (2009) IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30(5):742-755.

Janic B, Arab AS (2010) The role and the therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. *ScientificWorldJournal* 10:1088-1099.

Jones JI, Gockerman A, Busby WH Jr, Wright G, Clemmons DR (1993) Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad U S A* 90(22):10553-10557.

Ke X, Wu M, Lou J, Zhang S, Huang P, Sun R, Huang L, Xie E, Wang F, Gu B (2015) Activation of Toll-like receptors signalling in non-small cell lung cancer cell line induced by tumor-associated macrophages. *Chin J Cancer Res* 27(2):181-189.

Kim EK, Yun SJ, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Woo DH, Lee HS, Ha HK, Bae SS (2012) Synergistic induction of cancer cell migration regulated by Gβγ and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Mol Med* 44(8):483-491.

King ER, Wong KK (2012) Insuline-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 7(1):14-30.

Körner C, Nürnberg B, Uhde M, Bräulke T (1995) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains. *J Biol Chem* 270(1):287-295.

Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R (2005) Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(4):698-703.

Krsek M, Prazny M, Marek J, Skrha J, Justova V, Lacinova Z (2002) The relationship between serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins and microvascular function in acromegalic patients. *Growth Horm IGF Res* 12(1):54-59.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad U S A* 98(21):12072-12077.

Kuang Z, Yao S, Keizer DW, Wang CC, Bach LA, Forbes BE, Wallace JC, Norton RS (2006) Structure, dynamics and heparin binding of the C-terminal domain of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2). *J Mol Biol* 364(4):690-704.

Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, El Fahime E (2004) Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation* 77(11):1741-1747.

Lee DY, Kim SJ, Lee YC (1999) Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J Korean Med Sci* 14(4):401-404.

Lee YC, Jogie-Brahim S, Lee DY, Han J, Harada A, Murphy LJ, Oh Y (2011) Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) blocks the effects of asthma by negatively regulating NF- $\kappa$ B signaling through IGFBP-3R-mediated activation of caspases. *J Biol Chem* 286(20):17898-17909.

LeRoith D (2003) The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res* 4(4):205-212.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67(3):1030-1037.

Liu CH, Bao HG, Ge YL, Wang SK, Shen Y, Xu L (2013) Celecoxib inhibits insulin-like growth factor 1 induced growth and invasion in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 5(6):1943-1947.

Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY (2008) CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27(12):1749-1758.

Massoner P, Colleselli D, Matscheski A, Pircher H, Geley S, Jansen Dürr P, Klocker H (2009) Novel mechanism of IGF-binding protein-3 action on prostate cancer cells: inhibition of proliferation, adhesion, and motility. *Endocr Relat Cancer* 16(3):795-808.

Matuschek C, Rudoy M, Peiper M, Gerber PA, Hoff NP, Buhren BA, Flehmig B, Budach W, Knoefel WT, Bojar H, Prisack HB, Steinbach G, Shukla V, Schwarz A, Kammers K, Erhardt A, Scherer A, Bölke E, Schauer M (2011) Do insulin-like growth factor associated proteins qualify as a tumor marker? Results of a prospective study in 163 cancer patients. *Eur J Med Res* 16(10):451-456.

Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E Jr. (2012) The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol* 4(4):128-134.

Mohanraj L, Oh Y (2011) Targeting IGF-I, IGFBPs and IGF-I receptor system in cancer: the current and future in breast cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(2):166-177.

Navarrete Santos A, Kahrstedt S, Nass N, Czeslick E, Scheubel RJ, Silber RE, Simm A (2008) Evidences for age-related modulation of human hematopoietic progenitor cell proliferation. *Exp Gerontol* 43(11):1033-1038.

Pankaj J, Kumari JR, Kim W, Lee SA (2015) Insulin-like growth factor-1, IGF-binding protein-3, c-peptide and colorectal cancer: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(9):3735-3740.

Parent CA, Blacklock BJ, Froehlich WM, Murphy DB, Devreotes PN (1998) G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95(1):81-91.

Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 118(Pt 3):485-496.

Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM (2009) Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):538-549.

Pircher A, Kähler CM, Skvortsov S, Dlaska M, Kawaguchi G, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe W (2008) Increased numbers of endothelial progenitor cells in peripheral blood and tumor specimens in non-small cell lung cancer: a methodological challenge and an ongoing debate on the clinical relevance. *Oncol Rep* 19(2):345-352.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4(7):505-518.

Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, Charbord P, Domenech J (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25(7):1737-1745.

Reeve JG, Brinkman A, Hughes S, Mitchell J, Schwander J, Bleehen NM (1992) Expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 84(8):628-634.

Richardson MR, Yoder MC (2011) Endothelial progenitor cells: quo vadis? *J Mol Cell Cardiol* 50(2):266-272.

Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ, Ferrucci L, Carter HB, Metter EJ, Chen C, Weiss NS, Fitzpatrick A, Hsing AW, Lacey JV Jr, Helzlsouer K, Rinaldi S, Riboli E, Kaaks R, Janssen JA, Wildhagen MF, Schröder FH, Platz EA, Pollak M, Giovannucci E, Schaefer C, Quesenberry CP Jr, Vogelmann JH, Severi G, English DR, Giles GG, Stattin P, Hallmans G, Johansson M, Chan JM, Gann P, Oliver SE, Holly JM, Donovan J, Meyer F, Bairati I, Galan P (2008) Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann Intern Med* 149(7):461-471.

Rose JA, Erzurum S, Asosingh K (2015) Biology and flow cytometry of proangiogenic hematopoietic progenitors cells. *Cytometry A* 87(1):5-19.

Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Brandenburg D, Ullrich A (1991) Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem* 266(29):19288-19295.

Schütt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW (2004) Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 32(3):859-868.

Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287(5455):1037-1040.

Shersher DD, Vercillo MS, Fhied C, Basu S, Rouhi O, Mahon B, Coon JS, Warren WH, Faber LP, Hong E, Benomi P, Liptay MJ, Borgia JA (2011) Biomarkers of the insulin-like growth factor pathway predict progression and outcome in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 92(5):1805-1811.

Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K (1999) IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J* 46:S59-S62.

Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA (2003) Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol* 33(5):1311-1320.

Singh B, Smith JA, Axelrod DM, Ameri P, Levitt H, Danoff A, Lesser M, de Angelis C, Illa-Bochaca I, Lubitz S, Huberman D, Darvishian F, Kleinberg DL (2014) Insulin-like growth factor-I inhibition with pasireotide decreases cell proliferation and increases apoptosis in pre-malignant lesions of the breast: a phase 1 proof of principle trial. *Breast Cancer Res* 16(6):463.

Stearns M, Tran J, Francis MK, Zhang H, Sell C (2005) Activated ras enhances insulin-like growth factor I induction of vascular endothelial growth factor in prostate epithelial cells. *Cancer Res* 65(6):2085-2088.

Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA (1988) Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263(23):11486-11492.

Szebenyi G, Rotwein P (1994) The mouse insulin-like growth factor II/cation independent mannose 6-phosphate (IGF-II/MPR) receptor gene: molecular cloning and genomic organization. *Genomics* 19(1):120-129.

Sun XT, Yuan XW, Zhu HT, Deng ZM, Yu DC, Zhou X, Ding YT (2012) Endothelial precursor cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 18(35):4925-4933.

Tian D, Mitchell I, Kreeger PK (2016) Quantitative analysis of insulin-like growth factor 2 receptor and insulin-like growth factor binding proteins to identify control mechanisms for insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylation. *BMC Syst Biol* 10:15.

Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J (2009) Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 13(1):87-102.

Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S (1988) The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 263(6):2585-2588.

Twigg SM, Baxter RC (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273(11):6074-6079.

Upton Z, Chan SJ, Steiner DF, Wallace JC, Ballard FJ (1993) Evolution of insulin-like growth factor binding proteins. *Growth Regul* 3(1):29-32.

Urbich C, Dimmeler S (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and the role in vascular biology. *Circ Res* 95(4):343-353.

Wakai K, Ito Y, Suzuki K, Tamakoshi A, Seki N, Ando M, Ozasa K, Watanabe Y, Kondo T, Nishino Y, Ohno Y, JACC Study Group (2002) Serum insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding protein-3, and risk of lung cancer death: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort (JACC) Study. *Jpn J Cancer Res* 93(12):1279-1286.

Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W (2006) An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP-2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 281(20):14085-14091.

Wang Z, Wang Z, Liang Z, Liu J, Shi W, Bai P, Lin X, Magaye R, Zhao J (2013) Expression and clinical significance of IGF-1, IGFBP-3, and IGFBP-7 in serum and lung cancer tissues from patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Targets Ther* 6:1437-1444.

Weiner OD (2002) Regulating of cell polarity during chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol* 14(2):196-202.

Wright RJ, Holly JM, Galea R, Brincat M, Mason HD (2002) Insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 67(3):776-781.

Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D (2002) Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 62(4):1030-1035.

Xu Q, Li S, Zhao Y, Maures TJ, Yin P, Duan C (2004) Evidence that IGF binding protein-5 functions as a ligand-independent transcriptional regulator in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 94(5):E46-E54.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7324-7329.

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D (2002) Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110(6):771-781.

Yamaguchi T, Kanatani M, Yamauchi M, Kaji H, Sugishita T, Baylink DJ, Mohan S, Chihara K, Sugimoto T (2006) Serum levels of insulin-like growth factor (IGF); IGF-binding proteins-3,-4,and -5; and their relationships to bone mineral density and the risk of vertebral fractures in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 78(1):18-24.

Yoder MC (2012) Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7):a006692.

Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A (1999) Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I, and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal* 13(4):166-172.

## Publikation

Bartling B, Koch A, Simm A, Scheubel R, Silber RE, Santos AN (2010) Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -4 enhance the migration of human CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells. *Int J Mol Med* 25(1):89-96.



## 6.) Thesen

- 1.) Lungenkarzinomzellen (H358, H322) besitzen einen migrationsfördernden Einfluss auf hämatopoetische Stammzellen vom Antigenmuster CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>, aber nicht CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> oder CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>.
- 2.) Lungenfibroblasten (WI-38) können ebenfalls die Migration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen fördern, haben aber keinen kumulativen Effekt auf die migrationsfördernde Eigenschaft der Lungenkarzinomzellen.
- 3.) Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten exprimieren unter den Komponenten des IGF-Systems vor allem IGFBP-2, -4, -5 und -6. IGFBP-3 wird lediglich von den Fibroblasten gut exprimiert. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren unter den Rezeptoren des IGF-Systems vor allem den IGF-IR.
- 4.) Die von den Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten exprimierten Faktoren IGFBP-2 und -4 bewirken eine Stimulation der Migration von CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen, die möglicherweise IGF-unabhängig ist.
- 5.) Obwohl Lungenkarzinomzellen und Fibroblasten unter den Komponenten des IGF-Systems besonders gut IGFBP-3 und -6 exprimieren, besitzen diese keinen Einfluss auf die Migration der CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Stammzellen.

## **Erklärungen**

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ich erkläre an Eides statt, dass die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Darlingerode, den 31.08.2016

Alexander Koch

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Koch  
Vorname: Alexander  
Adresse: Hinter den Gärten 17, 38871 Ilsenburg OT Darlingerode  
Geburtsdaten: 25.10.1984 in Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schullaufbahn:

1991-1995 Comenius Grundschule in Delitzsch  
1995-2004 Europa- und Landesgymnasium Latina AHF in Halle (Saale)  
2004 Abitur

## Studium:

2004 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation

## Promotion:

Seit 2007 Doktorand in der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Herzzentrum des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter  
der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Andreas Simm,  
Betreuung durch PD Dr. Babett Bartling

## Berufliche Tätigkeit:

Seit 01.04.2012 Assistenzarzt im Zentrum für Innere Medizin des  
Harzklinikums Dorothea Christiane Erxleben in Wernigerode

Darlingerode, den 31.08.2016

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Mitteldeutsches Herzzentrum des Universitätsklinikums Halle (Saale).

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die Bereitstellung des Themas. Des  
Weiteren danke ich sowohl dem ehemaligen Klinikumsdirektor Prof. Dr. R.-E. Silber als  
auch dem aktuellen Klinikumsdirektor Prof. Dr. H. Treede für die Möglichkeit der  
Bearbeitung dieses Themas.

Ein herzlicher Dank geht an Frau PD Dr. Babett Bartling unter deren stets kritischen,  
fundierten und auch fördernden und fordernden Anleitung und Betreuung ich das  
Thema bearbeiten durfte. Für die humorvolle Motivation, sowie Hilfe und Betreuung im  
Bereich der hämatopoetischen Stammzellen möchte ich mich auch sehr bei Herrn Dr.  
Alexander Navarrete Santos bedanken. Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitgliedern  
des Forschungslabors und dem Medizinischen Zentrum für Grundlagenforschung in  
Halle für Ihre Unterstützung.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine lieben Eltern ohne deren Hilfe ich mich  
nicht an diesem Punkt befinden würde. Außerdem danke ich sehr herzlich meinen  
Großeltern, Geschwistern und nicht zuletzt auch meiner Freundin Sabine, die mich  
stets motiviert, angetrieben und moralisch unterstützt haben.

## **Anhang**

Votum der Ethikkommission vom 02.12.2003



Martin-Luther-Universität Halle – Wittenberg, D-06097 Halle (Saale)

Herrn Dr. med. Robert Scheubel  
Universitätsklinik und Poliklinik  
für Herz- und Thoraxchirurgie  
der Medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Ernst-Grube-Straße 40

06097 Halle

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen

hm-fu

Datum

02.12.2003

Postanschrift:  
06097 Halle (Saale)

Hausanschrift:  
Magdeburger Straße 27  
06112 Halle (Saale)

Geschäftsstelle:  
Tel. (03 45) 5 57-44 76  
Fax (03 45) 5 57-44 77  
e-mail [ethik-kommission@medizin.uni-halle.de](mailto:ethik-kommission@medizin.uni-halle.de)  
Internet: [www.medizin.uni-halle.de/](http://www.medizin.uni-halle.de/)

Steuernummer: 111/144 02550  
(Finanzamt Halle-Nord)

### **Nutzung von Nabelschnüren zur Erforschung von altersbedingten Angiogenesemechanismen durch adulte Vorläuferzellen**

Sehr geehrter Herr Dr. Scheubel,

mit Schreiben vom 25.11.2003 haben Sie der Ethik-Kommission eine überarbeitete Patienteninformation zum o. g. Forschungsvorhaben vorgelegt. Damit sind die Auflagen unseres Votums vom 18.11.2003 erfüllt. Ich darf Ihnen bestätigen, dass die Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens hat.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Stefan Grond  
Vorsitzender der Ethik-Kommission