

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Einfluss des Proteasomeninhibitors Bortezomib auf die
in-vitro-Proliferation und Differenzierung CD133 positiver
Progenitorzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- **Aus der Sektion Medizin** -

vorgelegt von
Svea Maria Blöcker
aus Lübeck

Lübeck 2011

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Entzian

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.04.2012

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Grundlagen der Gefäßneubildung	4
1.1.1 Angiogenese.....	4
1.1.1.1 Tumorangiogenese.....	6
1.1.2 Vaskulogenese	8
1.2 Endotheliale Progenitorzellen.....	9
1.3 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen für die Tumorangiogenese.....	12
1.4 Bortezomib	13
1.5 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Reagenzien und Kits	18
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Zellkulturmedien	19
2.1.4 Enzyme, Wachstumsfaktoren und Farbstoffe	20
2.1.5 Labormaterialien.....	20
2.1.6 Antikörper	21
2.1.7 Geräte.....	22
2.1.8 Zytostatikum	23
2.1.8.1 Bortezomib (Velcade®).....	23
2.1.9 Zelllinien und biologische Materialien.....	24
2.1.9.1 Leukaphereseprodukte	24
2.1.9.2 HUVEC-Zelllinie.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Stammzellisolierung CD133 positiver Zellen aus humanen Leukaphereseprodukten.....	25
2.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus frischen Leukaphereseprodukten	25

2.2.1.2	Immunmagnetische Selektion von CD133 positiver Zellen aus mononukleären Zellen	25
2.2.2	Isolierung mononukleärer Zellen gesunder Spender aus dem peripheren Blut	27
2.2.3	Durchflusszytometrische Analyse isolierter CD133 positiver Stammzellen.....	28
2.2.3.1	Grundlagen FACS.....	28
2.2.3.2	Durchflusszytometrische Reinheitsmessung nach Isolation	29
2.2.3.3	Durchflusszytometrische Reinheitsmessung unter Expansionskultur.....	30
2.2.4	Expansionskultur CD133 positiver Zellen.....	30
2.2.5	BrdU-ELISA	31
2.2.5.1	Grundlagen	31
2.2.5.2	Etablierung an mononukleären Zellen gesunder Spender	32
2.2.5.3	Inkubation CD133 positiver Zellen mit Bortezomib.....	32
2.2.5.4	Inkubation CD133 positiver Zellen mit BrdU-Solution und ELISA-Messung.....	33
2.2.6	Annexin V-FITC Apoptose-Assay.....	34
2.2.6.1	Grundlagen	34
2.2.6.2	Durchführung	35
2.2.7	Differenzierung CD133 positiver Zellen in endotheliale Zellen unter Bortezomib-Inkubation.....	36
2.2.7.1	Differenzierungskultur unter Bortezomib-Inkubation und anschließende Kryokonservierung	36
2.2.7.2	Zytospins differenzierter CD133 positiver Zellen	37
2.2.8	Immunfluoreszenzanalyse der Endothelmarkerexpression differenzierter CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation	38
2.2.8.1	Prinzip.....	38
2.2.8.2	Durchführung	38

2.2.9	Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 positiver Zellen unter Bortezomib-Inkubation	40
2.2.9.1	Prinzip	40
2.2.9.2	Durchführung	40
2.2.10	HUVEC-Zellreihe	41
2.2.10.1	Zellkultur	41
2.2.10.2	Zytospins.....	41
2.2.10.3	Biometrie und Statistik	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle endothelialer Progenitorzellen.....	42
3.1.1	Reinheitsmessung nach Isolation.....	42
3.1.2	Reinheitsmessung unter Expansionskultur	43
3.2	BrdU-ELISA.....	44
3.2.1	Konzentrationsabhängige Proliferationsrate endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation	44
3.3	Annexin-Assay.....	46
3.3.1	Konzentrationsabhängige Zellüberlebensrate endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation	47
3.3.2	Konzentrationsabhängige Apoptoseraten CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation	49
3.3.2.1	Apoptoseraten nach 24h Bortezomib-Inkubation.....	49
3.3.2.2	Apoptoseraten nach 48h Bortezomib-Inkubation.....	50
3.3.2.3	Frühapoptose.....	52
3.3.2.4	Spätapoptose.....	53
3.4	Differenzierungsverhalten CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation.....	55
3.4.1	Immunfluoreszenzanalyse der Endothelmarkerexpression differenzierter CD133 aufgereinigter Zellen	55
3.4.2	Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen.....	57

4 Diskussion	61
4.1 Hintergrund.....	61
4.2 Phänotyp und Definition endothelialer Progenitor-zellen.....	62
4.3 Diskussion zum Proliferations- und Apoptoseverhalten endothelialer Progenitorzellen unter Borte-zomibeinfluss.....	65
4.4 Diskussion zum Differenzierungsverhalten endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Einfluss	68
4.5 Beitrag endothelialer Progenitorzellen zur Tumorangio-genese.....	69
4.6 Limitierung der <i>in vitro</i> Untersuchung.....	71
4.7 Ausblick	72
5 Zusammenfassung	74
Literaturverzeichnis	76
Abbildungsverzeichnis	88
Tabellenverzeichnis	90
Danksagung	91
Lebenslauf	92
Eidesstattliche Versicherung	94

Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Antikoagulant Citrate Dextrose Solution A
AML	Akute myelotische Leukämie
ANG-1	Angiopoietin 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
CFU	Colony forming unit
CSC	Cancer stemm cell
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
ECFC	Endothelial colony forming cell
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEA	European Medicines Agency
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FCR	Folin-Ciocalteu reagent
FDA	United States Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FLT-3	FMS-like Tyrosin Kinase 3

FKS	Fetales Kälberserum
FS	Forward light scatter
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
HABL	Hämangioblast
HGF	Hepatocyte growth factor
HSPC	Hämatopoetische Progenitorzelle
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IAP	Inhibitor of apoptosis
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modified Dulbeccos Medium
I κ B	Inhibitor of kappa B
KitL	Kit Ligand
LSGS	Low Serum Growth Supplement
MMP	Matrix-Metallo Proteinase
MNC	Mononuklear Cell
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PI	Propidiumiodid
SCGF- β	Stemm cell growth factor beta
SS	Sideward light scatter

TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R2/KDR	Vascular endothelial growth factor- Rezeptor 2
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Gefäßneubildung

Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen bildet die Grundvoraussetzung für das Überleben sowohl physiologischer als auch pathologischer Gewebe. Aufgrund der vergleichsweise geringen Gewebediffusionsstrecke für Sauerstoff von 100-200 μm , wird die Nährstoffversorgung der Zellen mittels Diffusion auf wenige Millimeter limitiert. Tumorgewebe sind als komplexe Gewebeverbände ebenso wie physiologische Gewebe auf die Ausbildung eines zugehörigen Gefäßsystems zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie zum Abtransport von Kataboliten angewiesen. Erst der funktionelle Anschluss an das Blutgefäßsystem ermöglicht durch ausreichende Blutversorgung ein ungehindertes lokales Tumorstadium sowie die weitere Tumorausbreitung durch Metastasierung. Die Notwendigkeit der Bildung tumoröser Gefäße besteht dabei in gleichem Maße für sowohl solide Tumore als auch maligne hämatologische Systemerkrankungen wie beispielsweise dem Multiplen Myelom. Bei der Gefäßneubildung unterscheidet man die Angiogenese von der Vaskulogenese. Beide Mechanismen spielen nach neuen Erkenntnissen sowohl im Rahmen physiologischer als auch pathologischer Prozesse eine entscheidende Rolle.

1.1.1 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man alle Prozesse der Gefäßneubildung auf der Basis eines bereits existenten Kapillarsystems. Nach früherem Verständnis wurde dabei der Begriff Angiogenese mit dem der Gefäßneubildung durch Aussprossung gleichgesetzt. Neuere Studien haben jedoch zeigen können, dass mindestens zwei Neubildungsmechanismen unterschieden werden können: die Gefäßbildung durch Aussprossung (sprouting angiogenesis) und die Gefäßbildung durch Intussuszeption (nonsprouting angiogenesis) (Tang und Conti 2004).

Gefäßbildung durch Aussprossung:

Die Kapillarbildung durch Aussprossung ist in der Forschung bereits seit ca. 150 Jahren bekannt und daher vergleichsweise gut verstanden. Sie spielt unter anderem in Prozessen der Wundheilung sowie im Rahmen der Tumorangiogenese eine bedeutende Rolle. Durch initialen Sauerstoffmangel im zu versorgenden Gewebegebiet, und die daraus resultierende Expression Angiogenese-stimulierender Faktoren, wird die Gefäßaussprossung eingeleitet. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem zellulären Wachstumsfaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) zu, der als wichtiger Überlebensfaktor für Endothelzellen gilt (Ferrara 1999). Als weitere proangiogenetische Faktoren sind unter anderem FGFa und FGFb (Fibroblast growth factors), TGFa und TGFβ (Transforming growth factors), HGF (Hepatocyte growth factor), TNFα (Tumor necrosis factor), Angiogenin und Interleukin-8 zu nennen (Karamysheva 2008). Durch Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren an Endothelzell-Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, kommt es zu einem proteolytischen Abbau der Basalmembran und der umgebenden extrazellulären Matrix. Es folgen eine gesteigerte Endothelzellbildung durch Aktivierung der Endothelzellproliferation und die anschließende Einwanderung der Zellen in Richtung des angiogenen Reizes in das umgebende Bindegewebe (Endothelzellmigration). Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression membranständiger Integrine und Glykoproteine, die als Mediatoren eine zentrale Rolle im Rahmen der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion einnehmen. Nach Ausbildung eines neuen Lumens durch benachbarte Zellen folgen der Aufbau einer Basalmembran und die Anordnung von Stütz- und glatten Muskelzellen um das neue Gefäß (Mazitschek et al. 2002).

Gefäßbildung durch Intussuszeption:

Die Gefäßbildung durch Intussuszeption basiert auf der Teilung eines bestehenden Gefäßes durch die Bildung sogenannter interkapillarer Stützpfiler (Risau, 1997). Burri et al. haben in ihrer Publikation im Jahre 2004 zeigen können, dass je nach Lokalisation der beteiligten Endothelzellen verschiedene Mechanismen zur Säulenbildung unterschieden werden können. Die Herstellung

eines direkten Zellkontakts gegenüberliegender bzw. benachbarter Endothelzellen und damit die Ausbildung einer endothelialen Kontaktbrücke spielt dabei in allen Prozessen eine Schlüsselrolle. Durch die anschließende Verstärkung der primären Kontaktzone mittels Infiltration von Fibroblasen und Perizyten kommt es durch Ausbildung eines bzw. im weiteren Verlauf mehrerer interkapillarer Stützpfiler zur Gefäßteilung und damit -neubildung. Je nach Art des Zellkontaktes sowie der Lokalisation, des Bildungszeitpunktes und der Entstehungsfrequenz benachbarter interkapillarer Säulen, kommt es zu unterschiedlichen Resultaten im Rahmen der Gefäßbildung. Als Beispiele können die Erweiterung des Kapillarbettes, die Bildung von Gefäßbäumen, die Ausbildung von Gefäßgabelungen und Änderungen des existenten Gefäßverlaufs genannt werden (Burri et al., 2004).

1.1.1.1 Tumorangiogenese

Tumorgewebe benötigt in gleichem Maße wie physiologisches Gewebe eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie einen effizienten Abtransport gewebeschädlicher Stoffwechselprodukte, um Überleben und Wachstum zu sichern (Papetti und Herman, 2002). Die Sicherstellung eines Zugangs zum Blutgefäßsystem des Wirtsorganismus und die gleichzeitige Ausbildung eines tumoreigenen Gefäßnetzes stellen somit limitierende Schritte des Tumorwachstums und der Tumorausbreitung dar (Bergers und Benjamin, 2003).

Der Prozess der Angiogenese wird durch eine Vielzahl von Aktivatoren und Inhibitoren reguliert und somit in einem empfindlichen Gleichgewicht gehalten. Als Angiogenese-Agonisten und somit Aktivatoren von Endothelzell-Proliferation sowie -Migration (siehe 1.1.1 Gefäßbildung durch Aussprossung) agieren vor allem Tyrosinrezeptor-Kinase-Liganden wie VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGFs (Fibroblast growth factors), PDGF (Platelet-derived growth factor) und EGF (Epidermal growth factor) (Bergers und Benjamin, 2003). Anti-angiogenetisch wirken in diesem Zusammenhang unter anderem Thrombospondin-1 (Bergers und Benjamin, 2003), Angiostatin (internes

Spaltprodukt von Plasminogen) (O'Reilly et al., 1994), Endostatin (Kollagen XVIII-Fragment) (O'Reilly et al., 1997), Antithrombin III, Interferon- β und Plättchenfaktor-4 (Carmeliet, 2000).

Die Verlagerung des angiogenetischen Gleichgewichts zu Gunsten proangiogenetischer Faktoren (Agonisten) durch einen Tumor, wird als „angiogenetic switch“ bezeichnet und ist ein typisches Kennzeichen der Tumorprogression (Abdollahi et al., 2007). Im avaskulären Tumorstadium besteht der Tumor zunächst aus einer Ansammlung weniger Tumorzellen, die in ihrer Gesamtheit primär als sogenannte „Schläferzelle“ (dormant) agieren. Mit zunehmender Tumorzellproliferation kommt es durch vermehrte Expression proangiogenetischer Faktoren wie VEGF durch den Tumor zum „angiogenetic switch“: Das Verschieben des Gleichgewichts zu Gunsten der Proangiogenese resultiert in einer gesteigerten Gefäßneubildung durch Aussprossung. Die zunehmende Vaskularisierung des Tumorgewebes stellt im weiteren Verlauf eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten aus nekrotischen Tumorgebieten sicher, wodurch ein weiteres Tumorwachstum ermöglicht wird.

Der Übergang vom avaskulären zum vaskulären Tumorstadium ist in Abbildung 1 dargestellt und erläutert. Dabei ist zu beachten, dass sich der „angiogenetic switch“ selbst als relativ unscheinbarer Schritt in der Tumorentwicklung vollzieht und zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression die Vaskularisierung des Tumorgewebes einleiten kann (Bergers und Benjamin 2003). Im Rahmen der Erforschung tumorangiogenetischer Mechanismen wird, neben der Tumorgefäßbildung durch klassische Angiogeneseprozesse, zunehmend auch der Beitrag vaskulogenetischer Prozesse im Sinne einer postnatalen Vaskulogenese sowie die Rolle endothelialer Progenitorzellen in diesem Zusammenhang diskutiert.

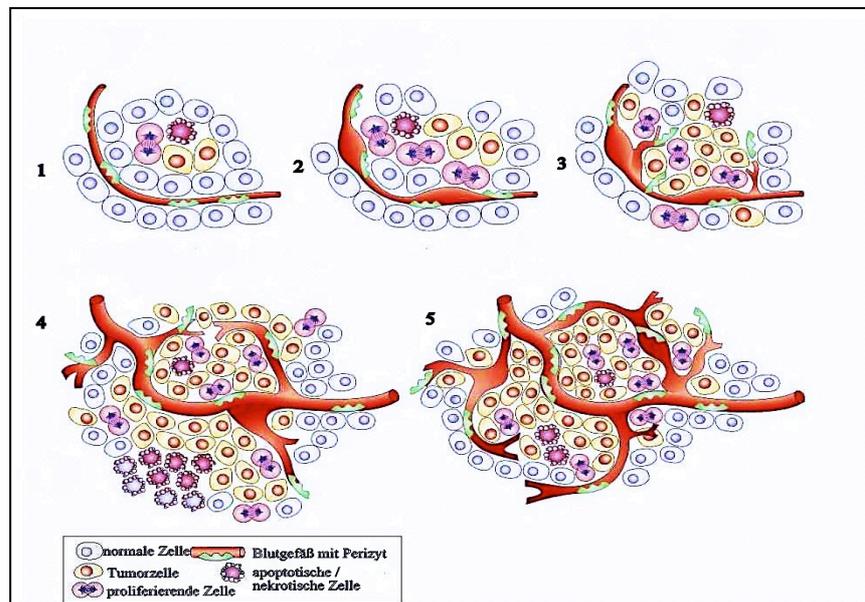


Abbildung 1: Tumorangiose und „angiogenetic switch“ (nach Bergers und Benjamin 2003)

Im avaskulären Tumorstadium (1) besteht der Tumor zunächst aus einer Ansammlung weniger Tumorzellen, die in ihrer Gesamtheit zunächst als „Schläferzelle“ bezeichnet werden. Durch zunehmende Tumorzellproliferation und die daraus resultierende Expressionszunahme pro-angiogenetischer Faktoren kommt es zum „angiogenetic switch“: Initial erfolgen eine perivaskuläre Zelllösung und Gefäßdilataion (2), gefolgt von einer beginnenden Gefäßneubildung durch Aussprossung (3), die bereits im Anfangsstadium eine Versorgung des wachsenden Tumors sicherstellt. Im weiteren Verlauf kommt es zur vollständigen Ausreifung der Endothelzellen samt Rekrutierung perivaskulärer Zellen zur Stabilisierung des wachsenden Gefäßnetzes (4) (Bergers und Benjamin 2003).

1.1.2 Vaskulogenese

Der Begriff Vaskulogenese steht für die de novo Entstehung von Gefäßen und wurde bis vor einigen Jahren ausschließlich im Zusammenhang mit der Gefäßbildung während der Embryonalentwicklung verwendet (Ergün et al., 2008). Die Ausbildung eines primitiven Gefäßsystems zur Organversorgung gilt dabei als eines der frühesten Ereignisse während der Embryogenese. Initial differenzieren mesodermale Zellen zu Hämangioblasten, die als Vorläuferzellen für sowohl endotheliale also auch hämatopoetische Zellen gelten. Durch weitere

Zelldifferenzierung entstehen Angioblasten, welche durch Zellaggregation sogenannte Blutinseln (Blood islands) bilden. Die anschließende Fusion mehrerer Blutinseln sowie die abschließende Zelldifferenzierung zu Endothelzellen resultieren in der Bildung eines primären Blutgefäßplexus (Karamysheva, 2008). Die Entdeckung sogenannter endothelialer Progenitorzellen durch Asahara et al. im Jahre 1997 und deren vermutete Rolle bei der Gefäßneubildung im adulten Organismus im Sinne einer postnatalen Vaskulogenese haben das traditionelle Bild der Vaskulogenese Ende der 90er Jahre revolutioniert. Seitdem konnte in zahlreichen Folgestudien die Existenz endothelialer Progenitorzellen belegt, sowie ihre Rolle im Rahmen physiologischer als auch pathologischer Prozesse der Gefäßneubildung durch Rekrutierung aus dem Knochenmark in das periphere Blutsystem beleuchtet werden.

1.2 Endotheliale Progenitorzellen

1997 beschrieben Asahara et al. erstmals die Isolation CD34 positiver Zellen aus dem peripheren Blut und deren Differenzierungsfähigkeit zu ausgereiften endothelialen Zellen unter bestimmten Kulturbedingungen (Asahara et al., 1997). Aufgrund ihres Differenzierungsverhaltens wurde diese Zellpopulation als endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) bezeichnet. Zahlreiche Folgestudien unterstützen die Hypothese der Existenz endothelialer Vorläuferzellen, ihre Bildung im Knochenmark, sowie ihre Rolle bei der Gefäßneubildung im adulten Organismus im Sinne einer postnatalen Vaskulogenese (Ria et al., 2008).

Da der Oberflächenmarker CD34 nicht exklusiv auf immaturren hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks exprimiert wird, sondern in geringerem Ausmaß auch auf der Oberfläche sich differenzierender Endothelvorläuferzellen nachgewiesen werden kann, wurde in späteren Studien der in der Stammzellhierarchie höher gestellte Oberflächenmarker CD133 für die Immunselektion endothelialer Progenitorzellen bevorzugt (Urbich und Dimmeler, 2004). Die Zellaufreinigung nach CD133 als Stammzellmarker zur Selektion

humaner endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut wird derzeit jedoch zunehmend kontrovers diskutiert. So hat CD133 seine Exklusivität als reiner Stammzellmarker endothelialer Progenitorzellen unter zahlreichen Forschungsgruppen verloren (Ribatti, 2007). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sowohl frühe endotheliale Progenitorzellen als auch Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellreihe (Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, HSPCs) die Oberflächenmarker CD133, CD34 und VEGF-R2 exprimieren, welche vor einigen Jahren noch als rein EPC-spezifisch aufgefasst wurden. Unterstützend zu diesen Daten konnten Loges et al. 2004 *in vitro* zeigen, dass sich endotheliale und hämatopoetische Progenitorzellen aus derselben Vorläuferzelle, dem Hämangioblast, entwickeln (Loges et al., 2004).

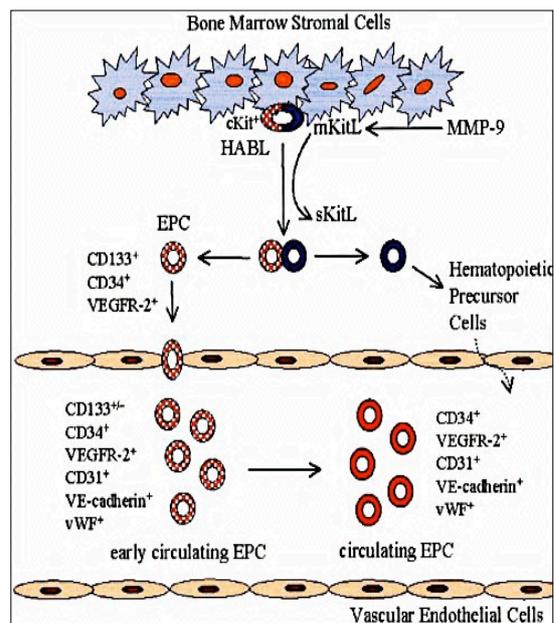


Abbildung 2: Mobilisation endothelialer Progenitorzellen (EPCs) aus dem Knochenmark

Initial kommt es durch die Matrix-Metallo-Proteinase-9 (MMP-9) zur Transformation von mKitL (membrane-bound Kit ligand) zu sKitL (soluble Kit ligand), woraufhin cKit-positive Stammzellen in die Gefäßzone des Knochenmarks wandern. Zu dieser Stammzellengruppe gehört der Hämangioblast (HABL), der als gemeinsamer Vorläufer endothelialer und hämatopoetischer Progenitorzellen (EPC/ HPC) agiert. (nach Hristov et al., 2003)

Die Mobilisation endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark wird von zahlreichen Faktoren im Rahmen komplexer Wechselwirkungen reguliert. Durch Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen wird über weitere Mediatoren das Einwandern von Stammzellen (Hämangioblasten) in die Gefäßzone des Knochenmarks bewirkt. Es folgen die Differenzierung in hämatopoetische sowie endotheliale Progenitorzellen und deren Mobilisierung in den peripheren Blutstrom. Dabei können sogenannte "frühe zirkulierende EPCs" phänotypisch teilweise durch die Expression des Oberflächenmarkers CD133 von sogenannten höher differenzierten "zirkulierenden EPCs" unterschieden werden (Abbildung 2).

Betrachtet man die Mehrzahl aktueller Studien, können endotheliale Progenitorzellen in mindestens zwei Phänotypen mit unterschiedlichem Proliferationsverhalten unterschieden werden:

1. frühe endotheliale Progenitorzellen (Expression der Oberflächenmarker CD34, CD133 und VEGF-R2/KDR) mit niedriger Proliferationskapazität
2. späte endotheliale Progenitorzellen (Verlust der Expression von CD133 und zunehmende Expression Endothelzell-spezifischer Oberflächenmarker wie vWF, VE-Cadherin/CD144 und eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) mit hoher Proliferationskapazität und der Fähigkeit zur eigenständigen Gefäßbildung sowie Integration in sich entwickelnde Gefäßnetze *in vitro* (Napoli et al., 2011).

Allgemein ist bei kritischer Betrachtung der derzeitigen Studienlage zu beachten, dass zahlreiche widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Phänotyps, des Ursprunges und der Eigenschaften endothelialer Progenitorzellen im Rahmen der Gefäßneubildung im adulten Organismus gefunden wurden. Die Heterogenität der Ergebnisse ist höchstwahrscheinlich auf den derzeit fehlenden Konsens bezüglich des Phänotyps endothelialer Progenitorzellen zurückzuführen: unterschiedliche Methoden der Zellselektion führen zu unterschiedlichen Basis-Zellpools der einzelnen Forschungsarbeiten und damit zu einer Verwirrung in der Ergebnislage. Als Selektions- und Analysemethoden sind derzeit hauptsächlich die Kultivierung

mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut auf Fibronectin-beschichteten Kulturplatten, die Nutzung monoklonaler Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse (FACS-Analyse) und die Verwendung sogenannter *in vitro* „colony forming cell assays“ (CFU (Colony forming unit)-Hill-Assay / ECFC (Endothelial colony forming cell)-Assay) zu nennen (Yoder und Ingram, 2009b).

1.3 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen für die Tumorangiogenese

Endotheliale Progenitorzellen sind Vorläuferzellen mit hohem Proliferationspotential, die bei Rekrutierung in Angiogenese-Gebiete die Eigenschaft zur Differenzierung in ausgereifte Endothelzellen besitzen. Ob, und wenn ja, in welchem Umfang endotheliale Progenitorzellen zur Tumorangiogenese beitragen, wird jedoch aufgrund variierender Studienergebnisse derzeit äußerst kontrovers diskutiert (Ahn und Brown, 2009). Lyden et al. konnten 2001 im Mausmodell zeigen, dass das Tumorgefäßsystem in Abhängigkeit von der Tumorart zu 50-100% aus Vorläuferzellen des Knochenmarks gebildet wird, und vermuteten eine zentrale Bedeutung endothelialer Progenitorzellen im Rahmen der Tumorangiogenese (Lyden et al., 2001). Zahlreiche Studien unterstützen diese Hypothese und konnten unter anderem zeigen, dass endotheliale Progenitorzellen Tumormetastasierung fördern (Gao et al., 2008), proangiogenetisch durch die Sekretion angiogener Zytokine wie beispielsweise VEGF wirken (Fürstenberger et al., 2006) und das Ansprechen von Tumoren auf Chemotherapeutika entscheidend beeinflussen (Shaked et al., 2008). Interessanter Weise konnten erhöhte Serumspiegel endothelialer Progenitorzellen im Blut von Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen festgestellt werden, was die Theorie einer Bedeutung endothelialer Progenitorzellen im Rahmen der Tumorangiogenese unterstützt. So konnten beispielsweise Mancuso et al. 2001 eine signifikante Erhöhung der Serumspiegel endothelialer Progenitorzellen im Blut an Brustkrebs sowie verschiedenen Lymphomarten erkrankter Patienten (unter anderem B-Zell-Lymphom, Mantelzell-Lymphom und Hodgkin-Lymphom) unter

Durchführung durchflusszytometrischer Analysen (FACS) nachweisen (Mancuso et al., 2001). Andere Forschergruppen stellten die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen im Rahmen tumorangiogenetischer Prozesse hingegen in Frage und konnten lediglich geringe bzw. nicht nachzuweisende Level an endothelialen Progenitorzellen in Tumorgefäßen bestimmen (Göthert et al., 2004; Purhonen et al., 2008).

Die derzeitige Diskrepanz bezüglich des Phänotyps endothelialer Progenitorzellen erschwert die Identifizierung dieser Zellen *in vivo* und im Besonderen in Tumorgeweben (Melero-Martin und Dudley, 2010) und stellt eine mögliche Erklärung für die breitgefächerte und zum Teil widersprüchliche Studienlage dar. Weiterhin setzen Unterschiede bezüglich der gewählten Nachweismethoden endothelialer Progenitorzellen, das Fehlen eines einheitlichen Untersuchungszeitpunkts sowie die Wahl unterschiedlicher Tumorentitäten die Studienvergleichbarkeit herab (Ahn und Brown, 2009). Die eindeutige Identifikation des Phänotyps endothelialer Progenitorzellen stellt damit aktuell eine der größten Herausforderungen auf dem Gebiet der Stammzellforschung dar (Pasquier und Dias, 2010). Erst sie wird eindeutig Klarheit schaffen können, ob, und in welchem Ausmaß, endotheliale Vorläuferzellen zur Tumorangiogenese beitragen.

1.4 Bortezomib

Der Proteasomeninhibitor Bortezomib (Abbildung 3) gehört zu der relativ jungen Medikamentengruppe der sogenannten „Targeted Drugs“, welche im Rahmen der Krebsforschung seit einigen Jahren eine vielversprechende Rolle einnehmen. „Targeted Drugs“ entfalten ihre Wirkung, im Gegensatz zu den traditionellen Tumormedikamenten, wie beispielsweise dem alkylierenden Zytostatikum Cyclophosphamid, über die Inhibition eines spezifischen Zielmoleküls. 1999 entdeckten bzw. entwickelten Adams et al. mehrere Dipeptidyl-Borsäure-Derivate, die den zellulären Proteasomstoffwechsel hochspezifisch hemmten (Adams et al., 1999). Dabei erwies sich Bortezomib (Abbildung 3) als potentestes Präparat im Hinblick auf Tumorzelltoxizität und Wachstumsinhibition und gab Anlass zu

weiterer präklinischer und klinischer Forschung. Seine Affinität für andere zelluläre Proteasen ist im Gegensatz zu früheren Proteasomeninhibitoren äußerst gering und erlaubt ein gezieltes Eingreifen in den Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg. (Teicher et al., 1999)

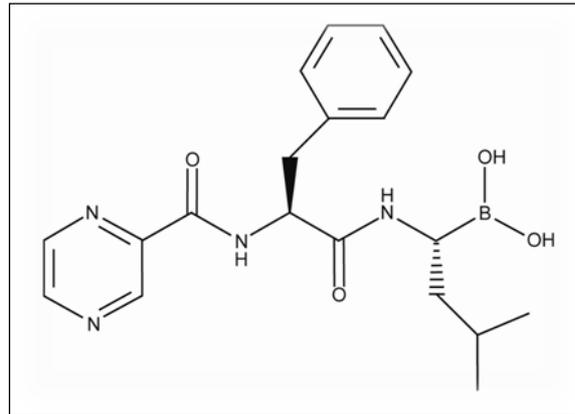


Abbildung 3: Strukturformel Bortezomib / PS-341 (Teicher et al., 1999)

Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg:

Der intrazelluläre Abbau von Proteinen wird ausschließlich auf molekularer Ebene reguliert, wobei dem Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg eine zentrale Bedeutung zukommt. Der gezielte Abbau regulativ wirksamer Proteine durch das 26S-Proteasom ist dabei unerlässlich für die Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse. In diesem Zusammenhang sind besonders die Aktivierung und Inhibierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. durch NF- κ B oder I κ B) sowie die Regulation von Zellzyklus (z.B. durch Cycline, p27) und Apoptose (z.B. durch den Tumorsuppressor p53) zu nennen (Nandi et al., 2006). Wird die Proteolyse beschädigter oder initial defekter Proteine gestört bzw. verhindert, führt deren intrazelluläre Anhäufung zum Untergang der Zelle, da sie – bildlich gesprochen – an ihren eigenen Abfallprodukten erstickt.

Der initiale Schritt für den Abbau eines Proteins über den Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg (siehe Abbildung 4) ist die Koppelung eines Ubiquitin-Moleküls an die ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenkette des Substratproteins. Ubiquitin ist ein

kleines Protein, bestehend aus 76 Aminosäuren, mit der Fähigkeit, multimere Ketten zu bilden. Durch Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe eines Ubiquitin-Moleküls und der ϵ -Aminogruppe eines weiteren Ubiquitins kommt es in weiteren Reaktionsschritten zur Bildung von Polyubiquitin Ketten (Nandi et al., 2006). Die Ubiquitinierung ist der wesentliche Selektionsschritt für den Proteinabbau und wird durch drei Hauptenzyme katalysiert: das Ubiquitin-aktivierende-Enzym, die Ubiquitin-Konjugase und die Ubiquitin-Ligase.

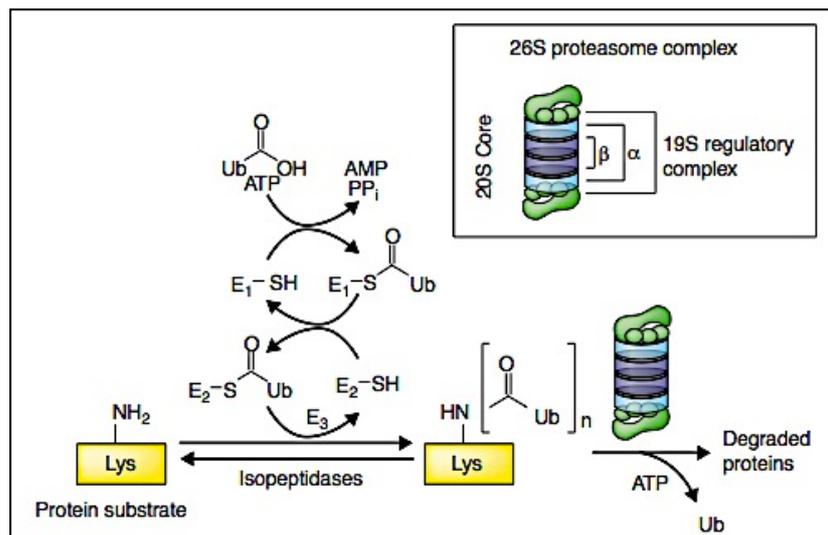


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweges

Dargestellt ist die enzymatische Markierung eines Proteins mittels Ubiquitin, die anschließende Koppelung an die 26S-Untereinheit des Proteasoms und folgende Denaturierung des Proteins durch das Proteasom. Bortezomib unterbindet Reaktionsschritt 2 und führt damit zu einer intrazellulären Anhäufung zelltoxischer Proteine und damit zum Zelltod. [Abb. übernommen aus (Adams, 2002b)].

Der zweite Schritt des Stoffwechselweges besteht in der Denaturierung und folgendem Abbau des Proteins durch das 26S-Proteasom. Das 26S-Proteasom besteht aus einem Multiprotein-Komplex und findet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus aller eukaryonten Zellen (Peters et al., 1994). Es besteht aus zwei funktionellen Komponenten: der 20S-Einheit, die als katalytischer Komplex fungiert, und der 19S-Untereinheit, der regulative Aufgaben zukommen (Mani und Gelmann, 2005). Die 19S-Untereinheit bindet initial rezeptorspezifisch an die Ubiquitinkette des markierten Proteins. Anschließend folgen die Abspaltung der

Ubiquitinkette und die teilweise Denaturierung des Proteins als Voraussetzung für den eigentlichen Abbau der „entfalteten“ Proteine durch die 20S-Einheit (Nandi et. al., 2006).

2003 wurde Bortezomib unter dem Handelsnamen Velcade® als erster Proteasomeninhibitor durch die FDA (United States Food and Drug Administration) in den USA (Paramore und Frantz, 2003) und seit 2004 auch in der EU von der EMEA (European Medicines Agency) für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen. Aufgrund der Ergebnisse einer internationalen multizentrischen Studie mit an Multiplem Myelom erkrankten Patienten, die keine Vorbehandlung durchlaufen haben, hat die EMEA die Zulassung 2008 dahingehend erweitert, dass Bortezomib in Kombination mit Melphalan und Prednison (VMP) zur Primärtherapie des Multiplen Myeloms eingesetzt werden darf. In dieser randomisierten Studie wurden die Patienten entweder mit Melphalan in Kombination mit Prednison oder zusätzlich zu dieser Kombination mit Bortezomib behandelt. Die Studie wurde aufgrund einer signifikanten Verbesserung zugunsten der Bortezomib-Therapie vorzeitig abgebrochen (FDA, 2010). Derzeit gilt diese Erweiterung jedoch lediglich für Patienten, die für eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation (aktueller Goldstandard) ungeeignet sind (EMEA, 2010).

1.5 Fragestellung

Wie unter 1.4. beschrieben, wird der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib derzeit erfolgreich als sogenannte „second-line“-Therapie für die Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom eingesetzt. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und zeigen neue Wege in der Behandlung von Patienten auf, die eine Hochdosis-Therapie aufgrund ihres Allgemeinzustandes nicht tolerieren können bzw. nicht auf das konventionelle Therapieschema ansprechen. Allgemein werden Bortezomib antiproliferative, proapoptotische sowie antiangiogene Eigenschaften zugeschrieben, die für die Therapie von malignen Erkrankungen genutzt werden können. Die Hemmung der Tumorangiogenese und damit der

Versorgung des Tumors mit lebenswichtigen Nährstoffen stellt dabei aktuell einen vielversprechenden Ansatz in zahlreichen Tumorthérapien dar. Zahlreiche Forschergruppen (Nolan et al., 2007; Dome et al., 2008; Du et al., 2008) messen in diesem Zusammenhang der Hemmung von Vorläuferzellen eine zentrale Bedeutung bei, wobei besonderes Interesse der Gruppe der endothelialen Progenitorzellen gilt.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen noch keine Forschungsergebnisse bezüglich der Wirkung Bortezomibs auf endotheliale Progenitorzellen vor. Die vorliegende Arbeit steht daher in der Absicht, diese Lücke zu füllen, um ein besseres Verständnis der antiangiogenetischen Wirkweise Bortezomibs im Rahmen der Therapie des Multiplen Myeloms zu schaffen. Zur Klärung der Wirkung des Proteasomen-Inhibitors auf endotheliale Progenitorzellen und damit ebenfalls zur Klärung einer möglichen Auswirkung auf die Tumorangio-genese im Allgemeinen, werden im Einzelnen die Wirkung Bortezomibs auf das Proliferations- Apoptose- und Differenzierungsverhalten endothelialer Progenitorzellen aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom untersucht. Die verfolgte Arbeitshypothese geht dabei der Frage nach, ob Bortezomib *in vitro* einen direkten antiangiogenetischen Einfluss auf endotheliale Vorläuferzellen hat und damit eine direkte Hemmung der Tumorangio-genese *in vivo* vermutet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Kits

Reagenz/Kit	Hersteller
<i>Magnetische Stammzellisolierung</i>	
MACS CD 133 MicroBead Kit enthält:	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ FcR-Blocking Reagent, human ▪ CD133 MicroBeads, human 	
<i>Proliferations-Assay</i>	
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) enthält:	Roche Applied Science (Mannheim)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ BrdU labeling reagent ▪ FixDenat ▪ Anti-BrdU-POD ▪ Antibody dilution solution ▪ Washing buffer ▪ Substrate solution 	
<i>Apoptose-Assay</i>	
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I enthält:	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Annexin V-FITC (100Tests) ▪ Propidiumjodid ▪ Annexin V Binding Buffer 	
<i>Sonstige Reagenzien</i>	
Fibronektin	Millipore GmbH (Schwalbach)

FKS (Fetales Kälberserum) Gold	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH (Pasching)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
VECTASHIELD Eindeckmedium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer /Lösung	Hersteller
PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer	Gibco / Invitrogen (Karlsruhe)
MACS (Blaupuffer für AutoMACS) enthält:	
▪ PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
▪ Humanes Serum Albumin (20%)	Biomol GmbH (Hamburg)
▪ ACD-A (Antikoagulant Citrate Dextrose Solution A)	Baxter Deutschland GmbH (München)

2.1.3 Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
IMDM (Iscoves Modified Dulbeccos Medium), L-Glutamin, 25nM Hepes	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
Medium 200	Gibco / Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4 Enzyme, Wachstumsfaktoren und Farbstoffe

Enzym	Hersteller
Trypsin/EDTA	Gibco / Invitrogen (Karlsruhe)
VersaLyse	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)

Wachstumsfaktor	Hersteller
FLT-3 (FMS-like Tyrosin Kinase 3)	PeptoTech GmbH (Hamburg)
Hydrokortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
SCGF- β (Stemm Cell Growth Factor Beta)	PeptoTech GmbH (Hamburg)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	PeptoTech GmbH (Hamburg)

Farbstoff	Hersteller
PI (Propidiumiodid)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol)	Invitrogen Molecular Probes, Inc. (Paisley, UK)

2.1.5 Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller
MACS-Säulen (LS Columns)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
Dispenserspritzen, Combitips Plus (0,5ml, 1ml, 5ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
FACS-Tubes (5ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Objektträger und Deckgläschen	Schütt (Göttingen), Menzel (Braunschweig)
Pasteurpipette Glas (145mm)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pre-Separation-Filter (30µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Shandon Cytoclips™ (Stainless Steel)	Thermo Elctron Corporation (Pittsburgh, USA)
Shandon Single Cytofunnels® (with white Filter Cards)	Thermo Electron Corporation (Pittsburgh, USA)
Shandon Single Cytoslides	Thermo Electron Corporation (Pittsburgh, USA)
Sterilpipetten (2 ml bis 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Zellkultur Microplatten (96 W)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkultur Multiwell Platten (24, 12, 6W)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen, Nunclon Surface	Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold)

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper	Farbstoff	Hersteller
CD144 / VE Cadherin) (Rabbit Anti-Human)	FITC	Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen)
Von Willebrand Factor (vWF) (Sheep Anti-Human)	FITC	The Binding Site Limited (Birmingham, UK)
VEGFR-2 / KDR (Mouse IgG Anti-Human)	unkonjugiert	Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen)

Sekundärer Antikörper	Farbstoff	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG	FITC	Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen)

2.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
<i>ELISA</i>	
Spektralphotometer	Dynex Technologies GmbH (Berlin)
Multipette	Eppendorf AG (Hamburg)
Photometer-Software Revelation [®]	Dynex Technologies GmbH (Berlin)
Zentrifuge, Sepatech Megafuge	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
<i>Durchflusszytometrie</i>	
FACS-Gerät, Cytomics FC500	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Vortex MS2 Minishaker	IKA GmbH & Co. KG (Staufen)
<i>Zellkultur</i>	
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Mikroskop Typ ID03	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht KG „Assistent“ (Sondenheim/ Rhön)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Sterilbank, Typ BSP 4A	Gelaire (Sydney, Australien)
Wasserbad, Typ 1003	GFL GmbH (Burgwedel)
<i>Immunzytologie</i>	

Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss AG (Göttingen)
Folienschweißgerät	Krupps GmbH (Offenbach am Main)
Fotokamera	MetaSystems GmbH (Altlussheim)
Fotosoftware CellCam	MetaSystems GmbH (Altlussheim)
Zytozentrifuge Cytospin [®] 2	Shandon (Pittsburgh, USA)

2.1.8 Zytostatikum

2.1.8.1 Bortezomib (Velcade[®])

Hersteller: Millennium Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, USA)

Summenformel: $C_{19}H_{25}BN_4O_2$

Bortezomib liegt für den stationären Verbrauch in Pulverform zur Herstellung einer Injektionslösung vor. Eine Durchstechflasche enthält dabei 3,5 mg Wirkstoff mit einem Molekulargewicht von 384.24. Residualbestände des stationären Gebrauchs, die sonst zur Entsorgung vorgesehen waren¹, wurden für die *in-vitro*-Versuche zu je 20 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Aliquotierung wurde zunächst mit Hilfe des Molekulargewichtes die Konzentration des Restbestandes errechnet und anschließend durch entsprechende Verdünnung eine Konzentration von 1 µM als Stocklösung hergestellt. Vor Behandlung der Zellen wurde das Medikament im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in Medium auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Bortezomib wurde in der vorliegenden Arbeit bezüglich seiner antiproliferativen, apoptotischen und differenzierungshemmenden Wirkung auf endotheliale Progenitorzellen untersucht.

¹ Diese ungewöhnliche Vorgehensweise musste aufgrund der immens hohen Kosten des Wirkstoffes gewählt werden und erfolgte mit Zustimmung der Abteilungsleitung.

2.1.9 Zelllinien und biologische Materialien

2.1.9.1 Leukaphereseprodukte

Die Leukapheresepreparate, aus denen die CD133 positiven Stammzellen als Ausgangsmaterial dieser Arbeit isoliert wurden, stammen von autologen Stammzellspendern. Alle Spender waren in die Einrichtung für Knochenmarkstransplantation der Universitätskliniken Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) eingebunden und gaben ihre Einwilligungserklärung für die Verwendung ihrer Zellen für wissenschaftliche Zwecke. Die Nummer des zugehörigen Ethikantrags mit dem Titel „Untersuchungen zum Einfluss auf die endothelialen Progenitorzellen im Blut von Tumorpatienten“ lautet 07/188 (Ethikvotum vom 23.5.2005). Die Proben wurden ausschließlich aus dem bei der Aufreinigung entstehenden Überstand im Schlauchsystem der Leukapheresesebeutel gewonnen, so dass den Patienten keine Zellen für die spätere Behandlung verloren gingen. Insgesamt wurde Apherese material von 14 Spendern für diese Arbeit verwendet.

2.1.9.2 HUVEC-Zelllinie

Die HUVEC-Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden von der Firma Cascade Biologics Incorporation, Portland USA bezogen und in Medium 200 plus LSGS (Low Serum Growth Supplement) kultiviert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine rein endotheliale Zelllinie, deren Zellen als phänotypisches Merkmal die Oberflächenantigene vWF (von Willebrand Faktor) und CD31/PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) tragen. Sie dienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Kontrollzellen für die immunzytologischen Färbungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Stammzellisolierung CD133 positiver Zellen aus humanen Leukaphereseprodukten

2.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus frischen Leukaphereseprodukten

Zur Isolation der im Leukaphereseprodukt enthaltenen mononukleären Zellen (MNC), wurden jeweils 2-4 ml Leukapheresat im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt und auf 20 ml Ficoll-Hypaque geschichtet. Die Zellen wurden in direktem Anschluss 20 Minuten bei 672 xg ohne Bremse zentrifugiert und über einen Dichtegradienten von der restlichen Probe getrennt. Die in der Grenzschicht zwischen wässriger Lösung und hochmolekularer Polysaccharidlösung befindlichen MNCs wurden vorsichtig in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 1x mit PBS im Verhältnis 1:2 für 10 Minuten bei 203 xg gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet für 10 Minuten in Erythrozytenlysepuffer inkubiert, um eine höhere Probenreinheit zu garantieren, 1 mal mit MACS-Puffer gewaschen und erneut in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die gewonnenen Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt und die resultierende Gesamtzellzahl berechnet ($MW \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times \text{ml Ausgangsvolumen}$). Anschließend erfolgte die Einstellung der Zellzahl mit MACS-Puffer zur immunmagnetischen Selektion der CD 133 positiven Zellen (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.2 Immunmagnetische Selektion von CD133 positiver Zellen aus mononukleären Zellen

Nach der Isolation der MNCs aus den Leukaphereseprodukten erfolgte die immunmagnetische Selektion der CD133 positiven Stammzellen (siehe 2.2.1.1). Das Prinzip dieser Methode besteht in der Koppelung monoklonaler Anti-CD133-Antikörper an paramagnetische Partikel. Dieser Komplex bindet unter Inkubation an zelluläre CD133-Rezeptoren und ermöglicht unter Verwendung einer

magnetischen Säule die Isolierung der antikörpertragenden Zielzellen aus einem Zellpool. Bei der vorliegenden Arbeit wurde das MACS- System der Firma Miltenyi Biotec verwendet (siehe Abbildung 5). Im ersten Schritt erfolgte die Bindung der Paramagnetpartikel-tragenden Antikörper an die im Vorfeld isolierten MNCs des mobilisierten peripheren Blutes. Hierzu wurde die Zellzahl auf 1×10^8 Zellen pro $300 \mu\text{l}$ MACS-Puffer eingestellt und mit $100 \mu\text{l}$ FCR-Blockierungsreagenz je 1×10^8 Zellen vermischt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{l}$ CD133-Microbeads je 1×10^8 Zellen. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 4°C inkubiert, wobei alle 10 Minuten eine vorsichtige Probendurchmischung erfolgte. Im nächsten Schritt wurden die Zellen über einen sogenannten MACS-Pre-Separationsfilter der Firma Miltenyi Biotec (Porengröße $30 \mu\text{m}$) gegeben und mit MACS-Puffer 10 Minuten bei $203 \times g$ gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer je 1×10^8 Zellen aufgenommen. Aus dieser Suspension erfolgte die Isolierung der für die Forschungsarbeit relevanten CD133⁺ Zellen unter Verwendung von LS-Columns der Firma Miltenyi Biotec. Die Zellen wurden dabei über zwei Säulen gegeben, um eine höhere Reinheit zu gewährleisten. Zu beachten ist, dass mit diesem Programm die größtmögliche Reinheit der isolierten Zellen erzielt werden kann, jedoch Zellen, die das Zielantigen nur schwach exprimieren, nicht ausreichend genug markiert werden, um immunmagnetisch vom Gesamtzellpool selektiert zu werden. Die Reinheit der isolierten Stammzellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 2.2.3).

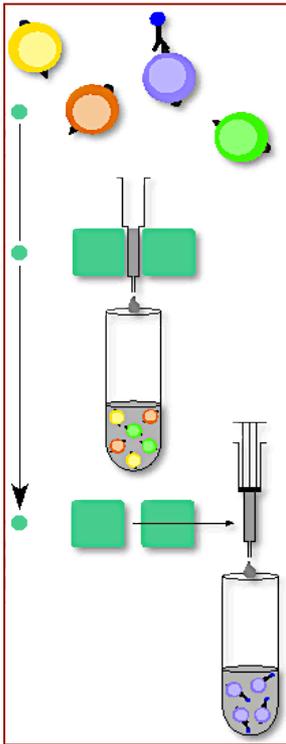


Abbildung 5: Prinzip der Immunmagnetischen Selektion CD133 positiver Zellen

Zur immunmagnetischen Aufreinigung CD133 positiver Zellen (lila) aus einem mononukleären Zellpool, wurde das MACS Separation System der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Zellen werden im ersten Schritt mit CD133 MicroBeads inkubiert (blau) und anschließend in MACS-Puffer über eine Separationssäule in einem magnetischen Feld gegeben (Magnet grün dargestellt). Die CD133 positiven Zellen verbleiben durch die vorherige magnetische Immunmarkierung in der Säule, die CD133 negative Zellfraktion befindet sich in der Negativfraktion. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD133 positiven Zellen unter Verwendung von MACS-Puffer mit Hilfe eines passenden Separationstempels als Positivfraktion aus der Säule gepresst. Der Separationstempel dient in diesem Zusammenhang zur Beschleunigung des Auswaschens der Zellfraktion durch den Puffer.

2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen gesunder Spender aus dem peripheren Blut

Zur Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte im ersten Schritt die Entnahme ca. 4 ml Blutes durch Punktion einer Cubitalvene eines gesunden Spenders. Im nächsten Schritt wurden je 2 ml Blut in 10 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen, für 10 Minuten inkubiert und anschließend in einem Waschschrift mit je 10 ml PBS bei 203 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in je 5 ml PBS aufgenommen, gepoolt und auf 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet. Das weitere Verfahren entspricht dem unter 2.2.1.1 beschriebenen. Anschließend wurden die isolierten mononukleären Zellen in einer Zytocentrifuge mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ 200 μ l PBS bei 71 xg für 10 Minuten auf Cytospins zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger 10 Minuten luftgetrocknet und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die mononukleären Zellen dienten im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten

Immunfluoreszenz-Färbungen als Negativkontrolle. Der Grund für die Wahl gesunder Spender bestand in der unkomplizierten Zugänglichkeit des Materials.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse isolierter CD133 positiver Stammzellen

2.2.3.1 Grundlagen FACS

Die durchflusszytometrische Messung fluoreszenzaktivierter Zellen (FACS-Analyse) ermöglicht die quantitative Bestimmung von sowohl zellspezifischen Oberflächenmolekülen als auch intrazellulären Proteinen. Grundlage des Verfahrens ist die Kopplung der zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern, die nach zellspezifischer Bindung durch einen Laser angeregt und anhand ihrer charakteristischen Emissionsspektren detektiert nach Größe, Granularität und Fluoreszenz differenziert werden können. Zur Analyse werden die markierten Zellen in Suspension gebracht und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet: Die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension wird durch Überdruck über einer Stahlkapillare in die Meßküvette gesogen. Durch die umgebende Mantelflüssigkeit wird der Zellenstrom dahingehend beschleunigt, dass es zu einer Auftrennung kleinerer Zellaggregate kommt. Die Zellen erreichen sequentiell, wie an einer Perlschnurkette aneinandergereiht, den Analysepunkt und werden einzeln mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Nach dem Prinzip der Fluoreszenz werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Abgabe von Photonen fallen die Elektronen auf ihr Ursprungsniveau zurück, wobei die freigesetzten Photonen ein farbstoffspezifisches Emissionsspektrum bilden. Die Verwendung von Farbstoffen mit ähnlichen Absorptionsspektren bei unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht daher eine Differenzierung verschiedener Signale und damit verschiedener Zellpopulationen.

Die Analyse umfasst Fluoreszenzintensität und Lichtstreuung, wobei das einfallende Licht in Vorwärtsrichtung (forward light scatter, FS) und im rechten Winkel zum einfallenden Licht (sideward light scatter, SS) gestreut wird. Für die Identifizierung der gesuchten Zellpopulation wird eine sogenannte Dot-Plot-Graphik mit den Parametern FS auf der Abszisse und SS auf der Ordinate generiert. Der FS-Wert dient dabei der Abschätzung der relativen Zell- bzw. Partikelgröße wobei der SS- Wert zur Abschätzung der Zellgranularität dient. Durch Setzen eines sogenannten Gates kann die Zellpopulation von Interesse selektiert werden, so dass für alle weiteren Analysen nur diese Ausgangspopulation berücksichtigt wird. Die anschließende Darstellung der fluoreszenzpositiven Zellen der ausgewählten Population erfolgt am übersichtlichsten im 4-Felder-Dot-Plot, da sich hier auf einen Blick der Anteil einfach- bzw. doppeltpositiver Zellen ablesen lässt. Parallel zur Zelldarstellung, mithilfe der Felder zugeordneten Farbpunkten im Dot-Plot, stellt der sogenannte Density-Plot die Dichte der Zellen am jeweiligen Punkt dar. Jeder Punkt entspricht bei beiden Darstellungsweisen einer Zelle.

2.2.3.2 Durchflusszytometrische Reinheitsmessung nach Isolation

In direktem Anschluss an die immunselektive Aufreinigung (2.2.1.2), wurden die CD133 positiven Zellen exemplarisch mittels FACS-Analyse auf ihre Reinheit überprüft. Als Negativkontrolle wurden jeweils PE- und PC7-konjugierte Isotypenkontrollen mitgeführt. Hierfür wurden pro Ansatz 1×10^5 Zellen in 100 μ l PBS aufgenommen und in entsprechend der verwendeten Antikörper beschriftete FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit der entsprechend vom Hersteller empfohlenen Antikörpermenge 30 Minuten dunkel bei 4°C inkubiert:

Tabelle 1: Antikörper zur Reinheitskontrolle CD133 positiver Zellen nach Isolation im FACS-Zytometer (je 1×10^5 Zellen in 100 μ l PBS)

	<i>Antikörper</i>	<i>Konjugation</i>	<i>AK-Konzentration</i>
<i>Ansatz 1</i>	CD133	PE	1:6
	CD34	PC7	1:6
<i>Ansatz 2</i>	IgG 2 β k-Kette (mouse)	PE	1:6
	IgG (mouse)	PC7	1:6
	IgG (mouse)	PC7	1:6

Im Anschluss wurden die Zellen 2mal mit je 1ml PBS bei 203 xg für je 5 Minuten gewaschen und für die Messung in je 270 μ l PBS plus 30 μ l Paraformaldehyd aufgenommen. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 10.000 Ergebnisse pro Messung erfasst.

2.2.3.3 Durchflusszytometrische Reinheitsmessung unter Expansionskultur

Unter Expansionskultur (siehe 2.2.4) wurden die CD133 positiven Stammzellen analog zu Punkt 2.2.1.3 exemplarisch an Tag 2, 5, 7, 14 und 21 auf ihre Reinheit mittels FACS-Analyse untersucht.

2.2.4 Expansionskultur CD133 positiver Zellen

Expansionsmedium:

100 ng/ml SCGF- β ; 50 ng/ml VEGF; 50 ng/ml FLT3L; 10% FKS; 10% Pferdeserum; 10^{-6} M Hydrokortison in IMDM mit L-Glutamin, 25 mM HEPES

Die Verwendung der Wachstumsfaktor-Kombination aus SCGF- β , VEGF und FLT3L erfolgt in Anlehnung an die Forschungsarbeiten von Gehling et al., Loges et al. und Butzal et al. (Gehling et al., 2000; Loges et al., 2004; und Butzal et al., 2004). Loges et al. konnten 2004 zeigen, dass endotheliale Progenitorzellen ihr Differenzierungspotential in sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Zellen

unter diesen Kulturbedingungen bis zu 28 Tage lang bewahren und zusätzlich eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (Loges et al., 2004). Zur Kultivierung der isolierten CD133⁺ Zellen wurden 96-, 24-, 12- und 6 Well-Platten bzw. 25 cm² Suspensionszellflaschen 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Fibronectin in einer Konzentration von 1 mg/ml beschichtet. Die frisch isolierten CD133⁺ Zellen wurden in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in das Expansionsmedium aufgenommen und in die beschichteten Vertiefungen der Zellkulturplatten ausgesät (96-Well: 5×10^5 Zellen, 24-Well: 3×10^6 Zellen). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage unter Verteilung der Zellen gewechselt, wobei die Zellen nach Ermittlung des Mittelwertes entsprechend ihrer aktuellen Zellzahl wie folgt geteilt wurden: 12-Well: 6×10^6 Zellen, 6-Well: $1,5 \times 10^7$ Zellen, 25cm² Suspensionszellflasche: (a) stehend: 1×10^7 Zellen (b) liegend: $3,5 \times 10^7$ Zellen. Die Gesamtexpansionsdauer betrug 21 Tage. Die Zellen wurden in direktem Anschluss für Versuche bezüglich ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens unter dem Einfluss des Proteasomeninhibitors Bortezomib, sowie zur Analyse der Bortezomib-induzierten Zellapoptoserate verwendet (siehe 2.2.5.3, 2.2.6.2, 2.2.7.1)

2.2.5 BrdU-ELISA

2.2.5.1 Grundlagen

Das Pyrimidin-Analogon BrdU (5-bromo-2'-desoxyuridin) wurde erstmals 1985 von Porstmann et al. als nicht-radioaktives Substrat eines Immunoessays zur Ermittlung der Proliferationsrate einer Zellpopulation beschrieben (Porstmann et al., 1985). Diese Methode wurde seitdem durch mehrere Arbeitsgruppen variiert und optimiert. Bei der vorliegenden Arbeit wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) der Firma Roche verwendet. Es handelt sich dabei um einen reinen in-vitro-ELISA, der infolge Herstellerangaben sowohl für adhärente Zellen als auch für Suspensionszellen geeignet ist. Das Prinzip des ELISAs beruht auf dem Einbau BrdUs anstelle von Thymin in die DNA proliferierender Zellen: An die integrierten BrdU-Moleküle binden nach einem Zell-Denaturierungsschritt anti-

BrdU-Peroxidasen im Verhältnis 1:1. An diese Immunkomplexe binden im Folgeschritt Tetramethylbenzidine (TMB) unter Ausbildung einer blauen Farbreaktion. Das Reaktionsprodukt wird anschließend über Messung der Extinktion durch ein Multiwell-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert und entspricht der Anzahl proliferierender Zellen in der untersuchten Mikrokultur. Aufgrund des schwer zugänglichen Zellmaterials wurde in der vorliegenden Arbeit keine Standardreihe etabliert. Als Standard wurden stattdessen jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt, zu denen die restlichen Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt wurden.

2.2.5.2 Etablierung an mononukleären Zellen gesunder Spender

Aufgrund der relativ geringen Zellmenge, die pro Patientenprobe zur Verfügung stand, wurde die optimale Durchführung des ELISAs im Vorfeld an mononukleären Zellen gesunder Spender etabliert. Das ursprüngliche Protokoll wurde dabei dahingehend verändert, dass alle Inkubationsschritte in Dunkelheit durchgeführt wurden. Der Wechsel flüssiger Reagenzien fand ausschließlich nach vorheriger Zentrifugation und anschließend vorsichtigem Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes unter Verwendung einer 200 µl-Pipette statt, um die Fehlerquote durch Zellverluste zu minimieren.

2.2.5.3 Inkubation CD133 positiver Zellen mit Bortezomib

An Tag 21 der Expansionskultur wurden die kultivierten CD 133 positiven Zellen auf Fibronectin-beschichtete 96-Well-Platten mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/190 µl pro Well ausgebracht. Anschließend wurde den Zellen 10 µl Bortezomib/Well in den Konzentrationen 2, 5, 25, 50, 75, 100 und 500 nM zugesetzt (je 5 Wells/Konzentration) und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ 24 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Eine unbehandelte Probe desselben Patienten sowie reines Expansionsmedium in ebenfalls 5 Duplikaten dienten dabei als Kontrolle. Es erfolgte pro Patient eine Inkubation über 24 und 48 Stunden.

2.2.5.4 Inkubation CD133 positiver Zellen mit BrdU-Solution und ELISA-Messung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer 200 µl Pipette/Well gut resuspendiert, um eine gleichmäßige Zellenverteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden 20 µl BrdU-Solution/Well zugegeben (Endkonzentration 10 µM BrdU/Well) und die Zellen erneut 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut resuspendiert und 10 Minuten bei 284 xg zentrifugiert. Anschließend wurden mit einer 200 µl Pipette vorsichtig 180 µl Medium/Well abgenommen und die Platte für 2 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank vollständig getrocknet. Nach diesem Arbeitsschritt konnte die Platte nach Herstellerangaben Vakuum-verschweißt und bei +4°C maximal eine Woche bis zur ELISA-Messung gelagert werden. Zur Weiterarbeit wurde den Zellen 200 µl FixDenat (siehe 2.2.1)/ Well zugesetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde erneut 10 Minuten bei 284 xg zentrifugiert und das FixDenat mit einer 200 µl Pipette vorsichtig abgenommen. Zur Beseitigung eventueller Flüssigkeitsrückstände wurde die Platte kurz im Dunkeln bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Zur Weiterarbeit wurde Anti-BrdU-Working-Solution (siehe 2.2.1) im Verhältnis 1:1000 mit BrdU-Dilution-Solution verdünnt, den Zellen in einer Menge von 100 µl/Well zugesetzt und 90 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 284 xg und das vorsichtige Abpipettieren des Flüssigkeitsüberstandes. Es folgten 3 Waschschriffe mit jeweils 300 µl Washing Solution (siehe 2.2.1)/Well, wobei vor dem Abnehmen der Flüssigkeit jeweils 10 Minuten bei 284 xg zentrifugiert wurde, um Zellverluste zu minimieren. Dann wurden 100 µl Substrat Solution (siehe 2.2.1)/Well zugesetzt, 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und in direktem Anschluss 25 µl H₂SO₄ (1M)/Well als Stop Solution zugesetzt. Die anschließende Messung der Extinktion wurde innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stop Solution mit einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt.

2.2.6 Annexin V-FITC Apoptose-Assay

2.2.6.1 Grundlagen

Unter Apoptose durchläuft jede Zelle charakteristische morphologische Veränderungen, wobei zwischen einer frühapoptotischen und einer spätapoptotischen Phase unterschieden wird. Die beginnende Veränderung der Zellmembran und damit verbundene Translokation des Membran-Phospholipid Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite, gehört zu den frühesten Prozessen der Apoptose und kann damit zur Identifizierung der Frühapoptose herangezogen werden. Späte Stadien der Apoptose kennzeichnen den vollständigen Verlust der Zellmembran-Integrität und die damit verbundene Durchlässigkeit für extrazelluläre Farbstoffe wie beispielsweise den Nukleinsäure-Interkalator Propidiumiodid (PI).

Das in diesem Assay verwendete Annexin-V-FITC ist ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Aus diesem Grund eignet es sich hervorragend für die Detektierung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche frühapoptotischer Zellen. Da Phosphatidylserin jedoch auch in spätapoptotischen Zellen gebunden werden kann, wird Propidiumiodid als weiterer Farbstoff verwendet. Propidiumiodid kann erst in Stadien der Spätapoptose oder Nekrose die Zellmembran penetrieren und somit die im Zellkern befindliche Nukleinsäure färben. Durch die kombinierte Anwendung beider Farbstoffe kann in diesem Assay durchflusszytometrisch zwischen vitalen Zellen (Annexin negativ/PI negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin positiv/PI negativ) und spätapoptotischen (Annexin positiv/PI positiv) unterschieden werden. Eine Unterscheidung zwischen spätapoptotischen, nekrotischen oder toten Zellen ist hierbei jedoch nicht möglich.

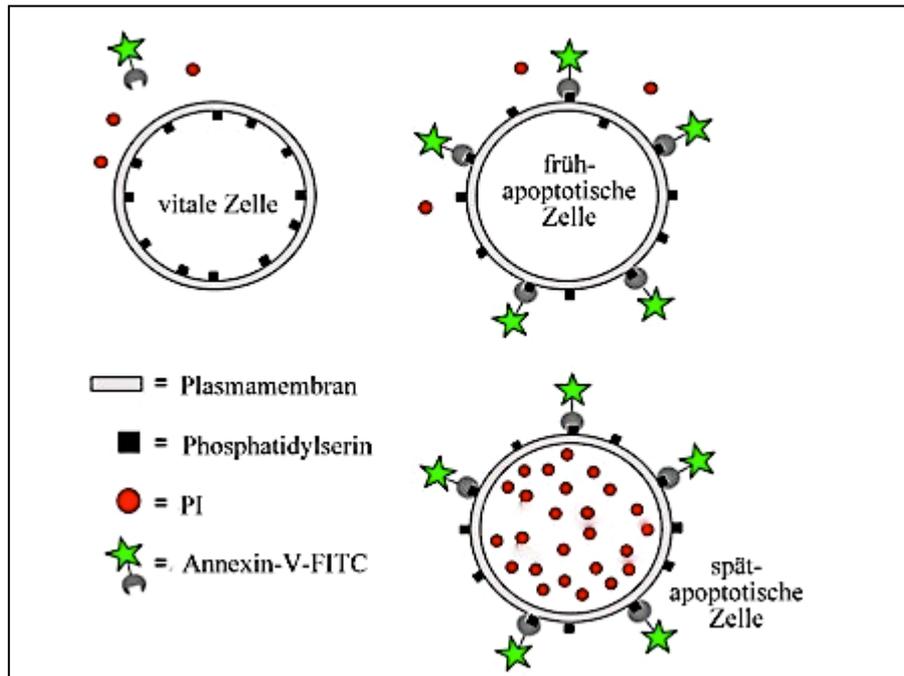


Abbildung 6: Prinzip des Annexin V-FITC Apoptose Assay

Gezeigt ist die Färbung der Zelle in Abhängigkeit von ihrem Vitalitätszustand. Bei der lebenden Zelle befindet sich das Phosphatidylserin auf der Plasmamembran-Innenseite ohne Kontakt zur Zellumgebung. Im Rahmen frühapoptotischer Zellveränderungen wird Phosphatidylserin auf die Membran-Außenseite transferiert und kann nun von Annexin V-FITC gebunden werden. Durch spätapoptotische Prozesse verliert die Zelle ihre Membranintegrität: als Folge kann Propidiumiodid (PI) die Zellmembran penetrieren und sich in der Zelle anreichern.

[modifiziert nach
http://www.lifesci.dundee.ac.uk/services/flow_cytometry/PDF/flow_cytometry_lecture.pdf.
 Stand 07.01.2011]

2.2.6.2 Durchführung

An Tag 21 der Expansionskultur wurden die Zellen analog zu Punkt 2.2.5.3 ausgebracht und inkubiert. Die Aussaat erfolgte in Duplikaten je Konzentration Bortezomib (unb., 5, 25, 50, 75 und 100 nM) zuzüglich 3 Kontroll-Wells mit unbehandelten Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gut resuspendiert, um eine gleichmäßige Zellverteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen in, den einzelnen Proben zugehörige und analog beschriftete, FACS-Röhrchen pipettiert und jedes Well mit 200 µl kaltem PBS gründlich nachgespült, um Fehler durch Zellverluste zu minimieren. Die Proben

wurden für 10 Minuten bei 203 xg zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand im Anschluss mit einer Glas-Pasteurpipette vorsichtig fast vollständig abgesaugt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 200 µl kaltem PBS und anschließender Zentrifugation. Nach vorsichtigem Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes wurden die Proben in je 100 µl Binding Buffer (siehe 2.2.1) aufgenommen und je Konzentration einem Duplikat 5 µl Annexin bzw. 5 µl PI zugesetzt. Den 3 unbehandelten Kontrollproben wurde 5 µl Annexin, 5 µl PI bzw. nichts zugesetzt. Die Proben wurden anschließend erneut gut resuspendiert, für 15 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und den Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit je 400 µl Binding Buffer zugesetzt. Die Proben wurden danach bei 4°C gelagert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb einer Stunde.

2.2.7 Differenzierung CD133 positiver Zellen in endotheliale Zellen unter Bortezomib-Inkubation

2.2.7.1 Differenzierungskultur unter Bortezomib-Inkubation und anschließende Kryokonservierung

Differenzierungsmedium:

50 ng/ml VEGF; 10% FKS; 10% Pferdeserum; 10^{-6} M Hydrokortison in IMDM mit L-Glutamin, 25 mM Hepes

Die Verwendung von VEGF als einzigem Wachstumsfaktor zur Induktion endothelialer Differenzierung erfolgt in Anlehnung an die bereits erwähnte Publikation von Butzal et al. (siehe 2.2.4; Butzal et al., 2004). Zur Induktion der endothelialen Differenzierung der CD133⁺ Zellen wurden diese nach 21 Tagen Expansionskultur in endotheliales Differenzierungsmedium aufgenommen und in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/190 µl pro Well in Duplikaten auf einer 96-Well-Platte ausgebracht. Anschließend wurde den Zellen einmalig 10 µl Bortezomib/Well in den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 und 500 nM zugesetzt. Eine unbehandelte Probe diente dabei als Kontrolle. Das Medium der

Differenzierungskultur wurde alle 3 Tage gewechselt, wobei 100 µl verbrauchtes Medium vorsichtig in 2 Arbeitsschritten mit einer Pipette abgenommen und durch 100 µl frisches Differenzierungsmedium ersetzt wurden. Die endotheliale Differenzierung der CD133⁺ Zellen unter Bortezomib-Einwirkung erfolgte über 14 Tage. An Tag 14 der Differenzierungskultur wurde der Zellüberstand je Well mit einer Pipette abgenommen, anschließend 50 µl eiskaltes Ethanol (100%) /Well zur Fixierung der Zellen zugesetzt und für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Das Ethanol wurde im Anschluss mit einer Pipette abgenommen und die präparierte 96-Well-Platte bis zur weiteren Analyse eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Zytospins differenzierter CD133 positiver Zellen

Zur späteren Zentrifugierung differenzierter CD133⁺Zellen auf Objektträger wurden die kultivierten CD133⁺ Zellen nach 21 Tagen Expansionskultur in endotheliales Differenzierungsmedium aufgenommen und in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/2ml pro Well auf einer 12-Well-Platte ausgebracht. Den Zellen wurde im Anschluss kein Bortezomib zugesetzt. An jedem dritten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das verbrauchte Differenzierungsmedium je Well vollständig aspiriert und für 10 Minuten bei 203 xg zentrifugiert wurde. Die adhärenen Zellen wurden sofort mit 1 ml frischem Medium versorgt und die Zellpellets nach Zentrifugation in je 1ml frisches Medium aufgenommen und dem Ausgangswell erneut zugeführt, um Zellverluste zu verhindern. An Tag 14 der Differenzierungskultur wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette abgesaugt und die adhärenen differenzierten Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA (0.025%/0.01%) infolge Herstellerangaben 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die in Suspension gebrachten Zellen 5 Minuten bei 203 xg bei RT zentrifugiert, in PBS aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Unter Verwendung einer Zytocentrifuge wurden die Differenzierungszellen im Anschluss mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/200 µl PBS für 10 Minuten bei 71 xg auf Zytospins zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger 10 Minuten luftgetrocknet und bis zur weiteren Analyse – in Alufolie eingewickelt – bei -20°C gelagert.

2.2.8 Immunfluoreszenzanalyse der Endothelmarkerexpression differenzierter CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation

2.2.8.1 Prinzip

Um die Oberflächenantigene der in der Differenzierungskultur morphologisch endothelial differenzierten Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen immunzytologisch gefärbt und fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Verwendet wurden die Endothelzell-Marker vWF (von-Willebrand-Faktor), VE-Cadherin/CD144 und VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)/KDR. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid). Als Positiv-Kontrolle wurden HUVEC-Zellen, als Negativ-Kontrolle MNCs gesunder Spender verwendet.

2.2.8.2 Durchführung

Zur Färbung wurden die auf Objektträger zentrifugierten Zellen 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend kurz in PBS getaucht. Zur Fixierung wurde mit Paraformaldehyd 15 Minuten bei 4°C überschichtet, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS. Anschließend wurde für 1 Sekunde mit 0,1% Triton überschichtet und erneut drei Mal in PBS getaucht. Danach wurden die Zellen mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern – wie folgt – dunkel in einer feuchten Kammer inkubiert:

Tabelle 2: Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten für die Immunfluoreszenzanalyse CD133 aufgereinigter Zellen nach Differenzierungskultur

<i>Primär- AK</i>	<i>Sekundär- AK</i>	<i>Konjugation</i>	<i>AK-Konzentration</i>	<i>Inkubationszeit</i>
vWF		FITC	1:50	1h
CD144		FITC	1:25	2h
KDR			1:50	1h
	Mouse-IgG	FITC	1:1000	1h

Für die KDR-Färbung wurden die Zellen nach Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Für die anderen Färbungen wurden die Zellen in direktem Anschluss an die Primärantikörper-Inkubation drei Mal lichtgeschützt für 5, 10 und 10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend lichtgeschützt luftgetrocknet. Zum Eindeckeln wurde der blaue Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1µg/ml) in Vectashield-Einbettungsmedium verwendet. Die Deckgläschen wurden mit farblosem Nagellack luftdicht versiegelt und bei 4°C lichtgeschützt bis zur weiteren Analyse gelagert. Die immunzytologische Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops mit 50W Quecksilber-Lampe. Die Zellen wurden in zwanzig- bzw. hundertfacher Vergrößerung fokussiert und mit einer Digitalkamera fotografisch dokumentiert. Die Färbungen wurden an insgesamt 4 Patienten durchgeführt, wobei jede Färbung pro Patient 3mal (vWF, CD144) bzw. 2mal (VEGF-R2) wiederholt wurde. Pro Färbung wurden mit der Digitalkamera 5 sogenannte Hot-Spots erfasst, anschließend die Gesamtzellzahl sowie der Anteil Antikörper-positiver Zellen jeweils von drei unabhängigen Untersuchern manuell ausgezählt und zur weiteren Auswertung die Mittelwerte gebildet.

2.2.9 Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 positiver Zellen unter Bortezomib-Inkubation

2.2.9.1 Prinzip

Um eine quantitative Auszählung der unter Bortezomib-Einfluss endothelial differenzierten Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop zu ermöglichen, erfolgte die Inkubation der Zellen mit Propidiumiodid (PI). PI färbt als Interkalator die DNA der Zellkerne, deren Zahl proportional zur Gesamtzellzahl ist. Seine optimale Anregung erfolgt durch grünes Licht, wobei sich die Zellkerne im Grünfilter des Fluoreszenz-Mikroskops durch das emittierte rote Licht rot darstellen.

2.2.9.2 Durchführung

Nach der unter Punkt 2.2.7.1 beschriebenen Präparation der Zellen wurden diese vorsichtig aufgetaut. Anschließend wurde jedem Well 50 µl PI (Konzentration 5µg/ml) zugesetzt und die 96-Well-Platte für 15 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. In direktem Anschluss an die PI-Färbung wurden die Proben unter Verwendung eines Fluoreszenz-Mikroskops (50W Quecksilber-Lampe) mit einem Grün-Filter in zwanzigfacher Vergrößerung dargestellt und fotodokumentiert. Pro Well wurden mit der Digitalkamera 2 bezüglich des Zellwachstums repräsentative Areale aufgenommen, so dass pro Konzentration 4 Bilder zur weiteren Auswertung vorlagen. Die Zellen wurden in einem Fotoprogramm mit Hilfe eines Gitterrasters ausgezählt, und je Konzentration wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.10 HUVEC-Zellreihe

2.2.10.1 Zellkultur

Kulturmedium:

Medium 200 mit LSGS; 20% FKS

Als Positivkontrolle für die Immunfluoreszenzanalyse der Endothelmarkerexpression CD133⁺ Zellen diente die HUVEC-Zellenreihe. Für die Zellkultur wurden die HUVEC-Zellen vorsichtig aufgetaut und in Medium 200 bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium versorgt und unter Verwendung von Trypsin/EDTA (Verdünnung 1:10) bei Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 gesplittet und weiterkultiviert.

2.2.10.2 Zytospins

Bei ausreichender Zellzahl wurden die kultivierten Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Zytozentrifuge analog zu Punkt 2.2.7.2 auf Objektträger zentrifugiert und gelagert.

2.2.10.3 Biometrie und Statistik

Die Analyse der Daten und die Generierung der statistischen Parameter (Mittelwert, Standardabweichung) erfolgte, ebenso wie die Erstellung der Graphiken, mit dem Computerprogramm Excel (Microsoft). Zu Signifikanzberechnungen der Versuchsergebnisse wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Es ist zu beachten, dass für Probenzahlen $n \leq 2$ keine Signifikanzberechnung vorgenommen wurde. P-Werte $< 0,05$ werden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle endothelialer Progenitorzellen

3.1.1 Reinheitsmessung nach Isolation

Die Reinheit CD133 positiver Zellen nach Isolation wurde direkt nach der Aufreinigung (d0) exemplarisch an fünf Patienten durchflusszytometrisch im FACS-Zytometer analysiert. Die Zellen wurden hierfür auf die Expression der Oberflächenantigene CD34 und CD133 untersucht. Die Darstellung der Messungen erfolgte jeweils in Form eines Dotplots (Darstellung im Vorwärts-Seitwärts-Gitter, Abbildung 8) sowie eines 4-Felder-Dotplots, die Zellen wurden zur Auswertung nach kleinen, nicht-granulären Zellen gated (Abbildung 9, siehe 2.2.3.1). Die mittlere Reinheit der CD34/CD133 doppelt-positiven Zellen betrug nach Isolation 98,6% (n=5, SD 1,08).

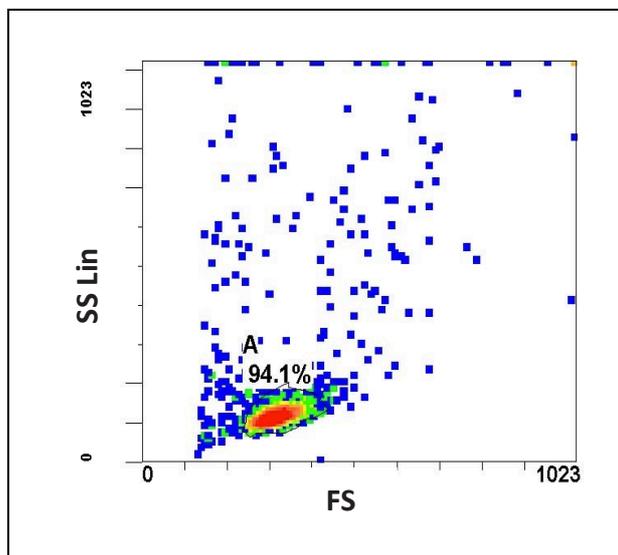


Abbildung 7: Darstellung der Reinheitsmessung CD133 positiver Zellen direkt nach der Aufreinigung (d0) in der FACS-Analyse in Form eines Dotplots

Die gemessenen Zellen sind nach SS (sideward light scatter, misst die Zellgranularität) und FS (forward light scatter, schätzt die relative Zell- bzw. Partikelgröße) abgebildet. Die Population von Interesse (kleine, nicht-granuläre Zellen) ist durch Setzen eines Gates von anderen korpuskulären Bestandteilen und Zelldebris abgegrenzt und beträgt 94.1% aller gemessenen Partikel. Die Darstellung erfolgt in einem sogenannten Density-Plot, d.h. die Farbgebung zeigt die Dichte der jeweiligen Zellen am jeweiligen Punkt an.

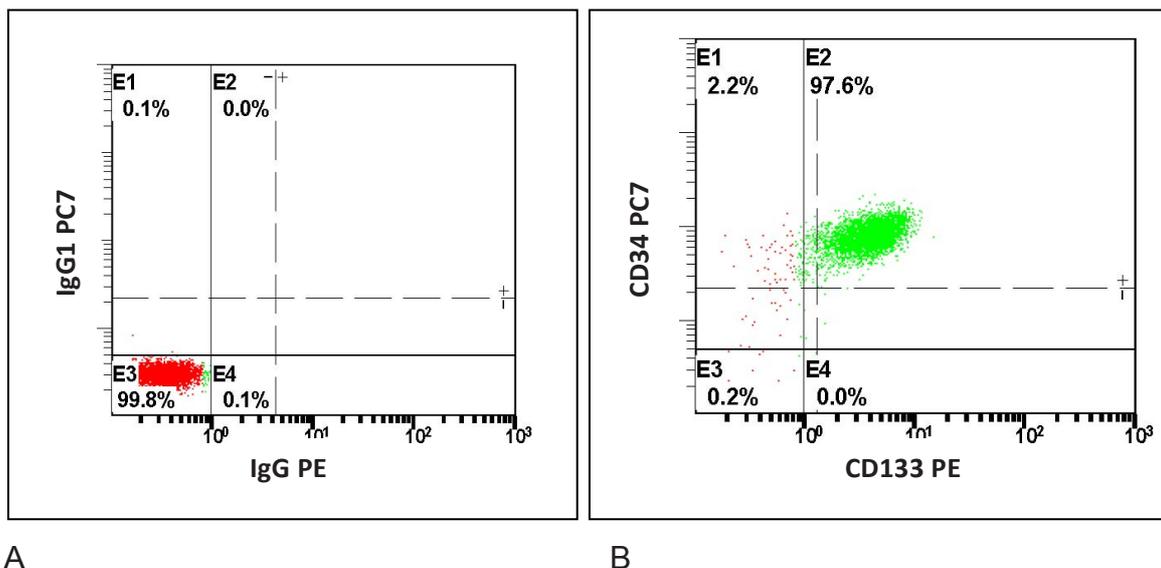


Abbildung 8: Darstellung der Reinheitsmessung CD133 positiver Zellen nach Isolation (d0) in der FACS-Analyse in Form eines 4Felder-Dotplots mit zugehöriger Isotypenkontrolle

In Diagramm B stellt die Abszisse logarithmisch die Fluoreszenz für den PE-markierten Antikörper CD133 dar, die Ordinate für den PC7-markierten Antikörper CD34. In Feld E2 kommt die Zielpopulation CD133/CD34 doppelpositiver Zellen zur Darstellung, sie beträgt 97.6%. In der Isotypenkontrolle (Diagramm A) werden 99.8% aller Zellen in Feld E3 dargestellt und zeigen somit keine Fluoreszenz. Die Isotypenkontrolle dient dabei zum Ausschluss unspezifischer Bindungen.

3.1.2 Reinheitsmessung unter Expansionskultur

Die Reinheit CD133 positiver Zellen wurde unter Expansionskultur exemplarisch analog zu Punkt 3.1.1 im FACS-Zytometer an einem Patienten untersucht. In Tabelle 3 ist der Verlauf des prozentualen Anteils positiver Zellen für die Stammzellmarker CD34 und CD133 dargestellt.

Tabelle 3: Verlauf der Oberflächenexprimierung der Stammzellmarker CD133 und CD34 direkt nach Isolation und während 21 tägiger Expansionskultur in Prozent

	<i>d0</i>	<i>d2</i>	<i>d5</i>	<i>d14</i>	<i>d21</i>
$CD133^+/CD34^+$	97.9	94.6	38.5	3.4	0.9
$CD133^+/CD34^-$	1.0	3.4	33.9	4.8	1.1
$CD133^-/CD34^+$	0.0	0.2	2.2	0.3	0.2
$CD133^-/CD34^-$	1.1	1.8	25.4	91.5	97.8

Abbildung 9 zeigt die Entwicklung der Zellexpression der Oberflächenmarker CD133 und CD34. Es kann gezeigt werden, dass die Mehrheit der kultivierten Zellen sowohl den Oberflächenmarker CD133 als auch CD34 nach 21 Tagen Expansionskultur fast vollständig verliert.

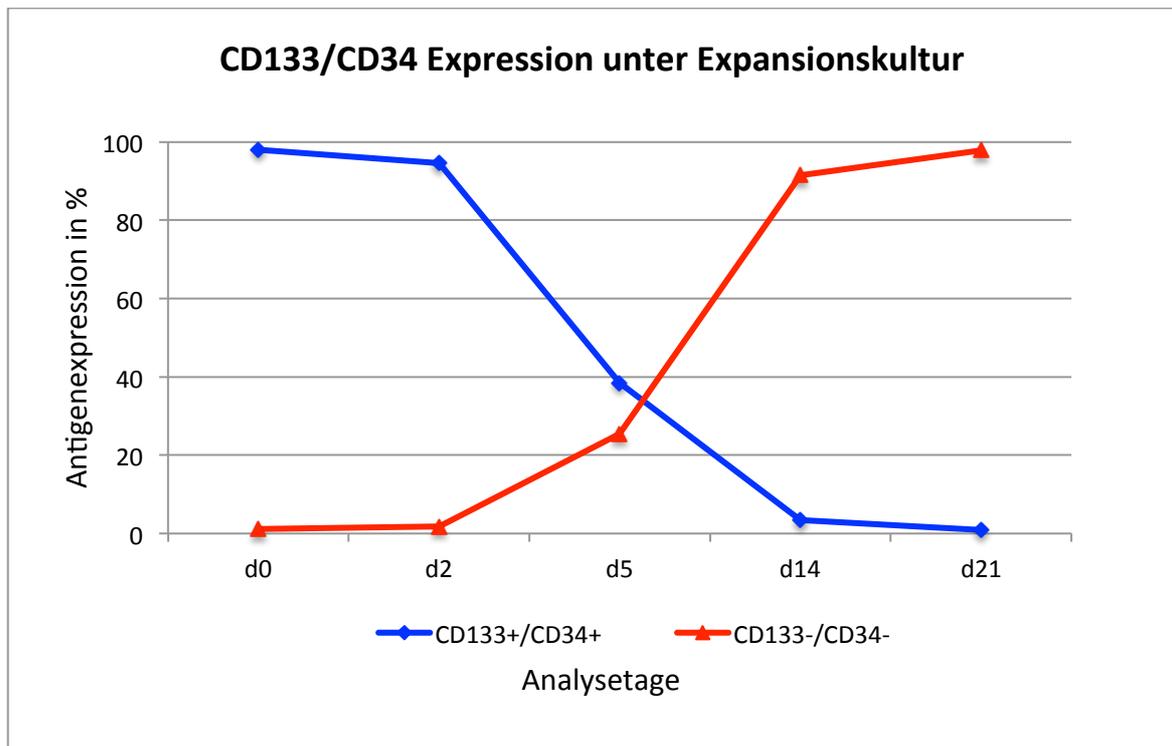


Abbildung 9: Expression der Oberflächenmarker CD133 und CD34 unter Expansionskultur

Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD133/CD34 doppelt positiver bzw. CD133/CD34 doppelt negativer Zellen über 21 Tage Expansionskultur. FACS-Analyse an den Tagen 0, 2, 5, 14 und 21.

3.2 BrdU-ELISA

3.2.1 Konzentrationsabhängige Proliferationsrate endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation

Um den Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib auf das Proliferationsverhalten CD133 aufgereinigter Zellen zu untersuchen, wurden diese nach Expansionskultur mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zytostatikums über 24 Stunden und 48 Stunden behandelt und anschließend mit Hilfe des BrdU-

ELISA (siehe 2.1.1) analysiert. Die niedrigste gewählte Behandlungskonzentration von 5 nM liegt tausendfach unterhalb der Plasmakonzentration, die nach intravenöser Gabe von $1,3 \text{ mg/m}^2$ Bortezomib, entsprechend der empfohlenen therapeutischen Dosierung zur Behandlung des Multiplen Myeloms, erreicht wird. Die höchste gewählte Behandlungskonzentration von 500 nM liegt zehnfach unterhalb der Plasmakonzentration, die nach intravenöser Gabe der empfohlenen therapeutischen Dosierung erreicht wird. Der größere der beiden im Rahmen dieser Arbeit gewählten Behandlungszeiträume (48 Stunden) liegt dabei unterhalb der Eliminations-Halbzeit von Bortezomib unter therapeutischen Bedingungen, welche durchschnittlich, je nach Plasmaverteilungsvolumen, zwischen minimal 76 und maximal 108 Stunden beträgt.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, nimmt die Zellproliferationsrate bei steigender Bortezomib-Konzentration für sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden zunehmend ab. Aufgrund des schwer zugänglichen Patientenmaterials und einer Anpassung des Konzentrationsspektrums während der Arbeit, variieren die Patientenzahlen in den einzelnen Konzentrationsgruppen ($n=8$ [5, 25,100] $n=6$ [50,75] $n=3$ [500]). Die Verdopplung der Behandlungsdauer von 24 Stunden auf 48 Stunden zeigt in diesem Zusammenhang bei niedrigen Bortezomib-Konzentrationen (5 nM bis 25 nM) keinen verstärkt hemmenden Effekt bezüglich des Proliferationsverhaltens der CD133 aufgereinigten Zellen. Die Verdopplung der Behandlungsdauer bei höheren Konzentrationen (75 nM bis 500 nM) zeigt hingegen einen deutlich sichtbaren Effekt bezüglich der Reduktion der Proliferationsrate. Die Abnahme der Zellproliferation bei Inkubationszeitverdopplung zeigt dabei nur für die Behandlung mit 100 nM eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$). Weiterhin konnte für alle Behandlungskonzentrationen ab 50 nM beider Inkubationszeiträume eine deutliche und statistisch signifikante Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden (**24h**: [50]: $p = 0,04$; [75]: $p = 0,04$; [100]: $p < 0,01$; **48h**: [50]: $p < 0,01$; [75]: $p < 0,01$; [100]: $p < 0,01$). Es ist zu beachten, dass eine Signifikanzberechnung für 500 nM aufgrund der geringen Probenzahl in dieser Konzentrationsgruppe ($n=2$) nicht vorgenommen wurde.

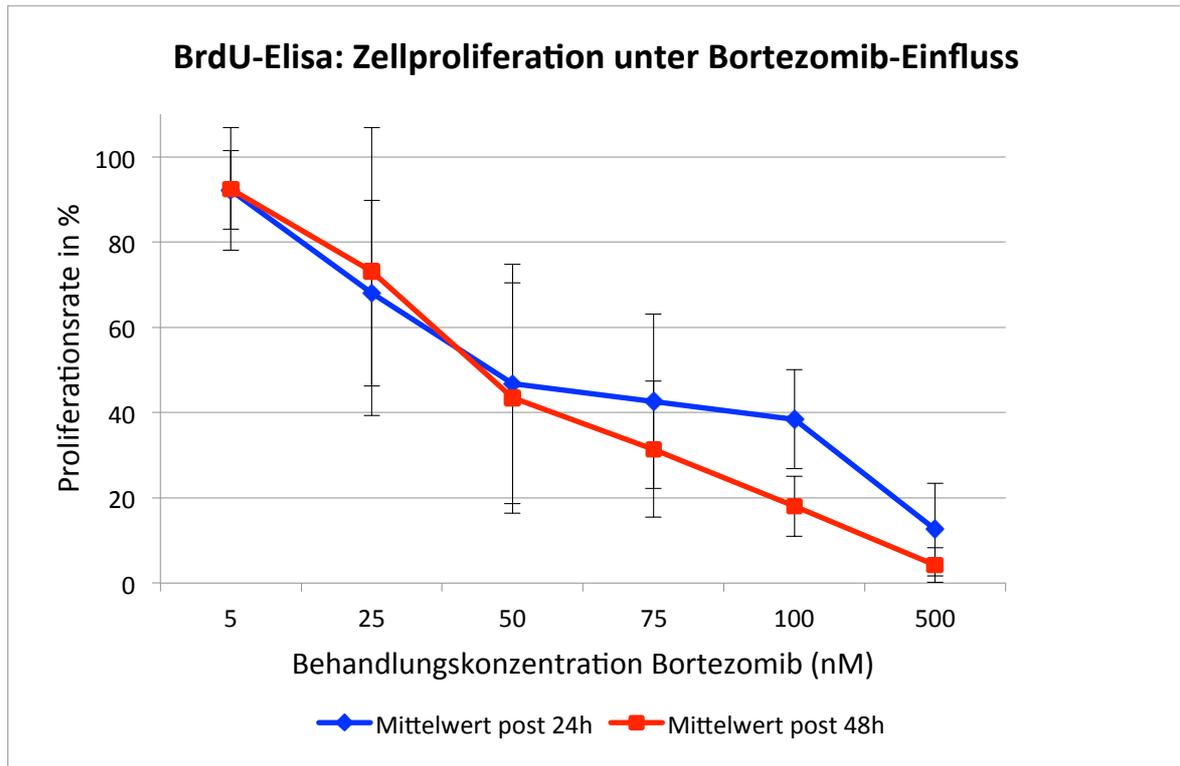


Abbildung 10: *In vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=8 [5,25,100] n=6 [50,75] n=2 [500]) sowie Standardabweichungen der konzentrationsabhängigen Zellproliferationsraten in %. Die Behandlungsdauer der Zellen mit Bortezomib betrug für alle Konzentrationen pro Patient 24 Stunden und 48 Stunden. Die Proliferationsrate wurde anschließend photometrisch mit Hilfe des BrdU-ELISA ermittelt. Zunehmende Bortezomib-Konzentrationen führen dabei zu einer verstärkten Abnahme der Proliferationsrate für beide untersuchten Behandlungszeiträume.

3.3 Annexin-Assay

Zur Untersuchung, ob Bortezomib in steigenden Konzentrationen einen proapoptischen Effekt auf CD133 aufgereinigte Zellen hat, wurden die Zellen nach Expansionskultur parallel zum BrdU-ELISA ebenfalls bezüglich ihres Apoptoseverhaltens nach 24 stündiger und 48 stündiger Bortezomib-Inkubation analysiert. Unter Verwendung des Annexin V-FITC Apoptose Assays (siehe 2.1.1) wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres frühapoptischen und spätapoptischen Verhaltens unter steigender Bortezomib-Konzentration untersucht. Die verwendeten Zytostatika-Konzentrationen sind dabei parallel zu denen des BrdU-ELISAs gewählt und im niedrigen Konzentrationsbereich um die

Konzentrationen 2 nM und 5 nM erweitert. Aufgrund des schwer zugänglichen Patientenmaterials und einer Anpassung des Konzentrationsspektrums während der Arbeit, variieren die Patientenzahlen den einzelnen Konzentrationsgruppen (n-Werte: siehe Abbildung 12 bis 16).

3.3.1 Konzentrationsabhängige Zellüberlebensrate endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation

Nach Expansionskultur wurden die aufgereinigten Zellen analog zu Punkt 3.2 mit unterschiedlichen Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden und 48 Stunden behandelt. Durch die anschließende Analyse der vitalen Zellen im Annexin-Apoptose-Assay können Rückschlüsse auf das Zellüberleben unter den jeweiligen Behandlungskonzentrationen geschlossen werden.

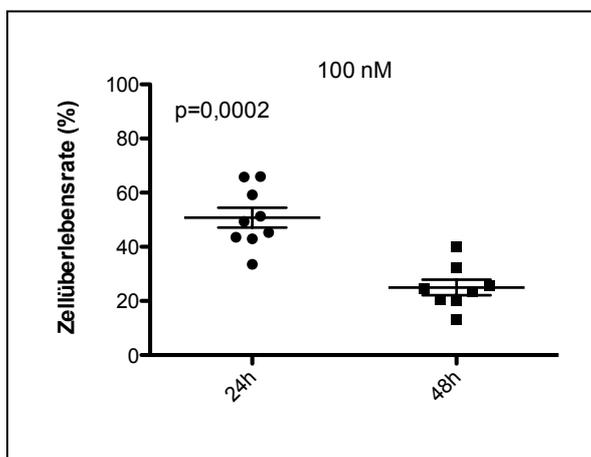


Abbildung 11: Scatter-Dot-Plot der Zellüberlebensrate CD133 aufgereinigter Zellen nach 24h bzw. 48h Bortezomib-Inkubation [100nM] in %. n=9 (24h) n=8 (48h)

Dargestellt ist die Patientenverteilung um den zugehörigen Median, wobei jeder Punkt einem Patienten zugeordnet werden kann. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test (siehe 2.2.11).

Wie in Abbildung 12 dargestellt, wird das Zellüberleben im Rahmen beider Inkubationszeiten erst ab einer Behandlungskonzentration von 25 nM beeinflusst. Insgesamt liegt die Zellüberlebensrate für alle Konzentrationen im Behandlungszeitraum von 24 Stunden über der von 48 Stunden. Bei Bortezomib-Inkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden sterben 50 Prozent der Zellen bei einer Konzentration von 100 nM. Im Gegensatz dazu sinkt die Zellüberlebensrate

bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden bereits bei einer Konzentration von 50 nM auf unter 50 Prozent (42,6 Prozent). Für die Verdopplung der Inkubationszeit von 24 Stunden auf 48 Stunden führt lediglich eine Zytostatika-Konzentration von 100 nM zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl ($p < 0,01$) (Abbildung 11), für alle niedrigeren Konzentration konnte keine signifikante Abnahme bei Verdopplung der Behandlungsdauer festgestellt werden. Grund hierfür können besonders für die Konzentrationen 50 nM und 75 nM die verhältnismäßig geringen Patientenzahlen und die daraus resultierenden relativ großen Standardabweichungen sein.

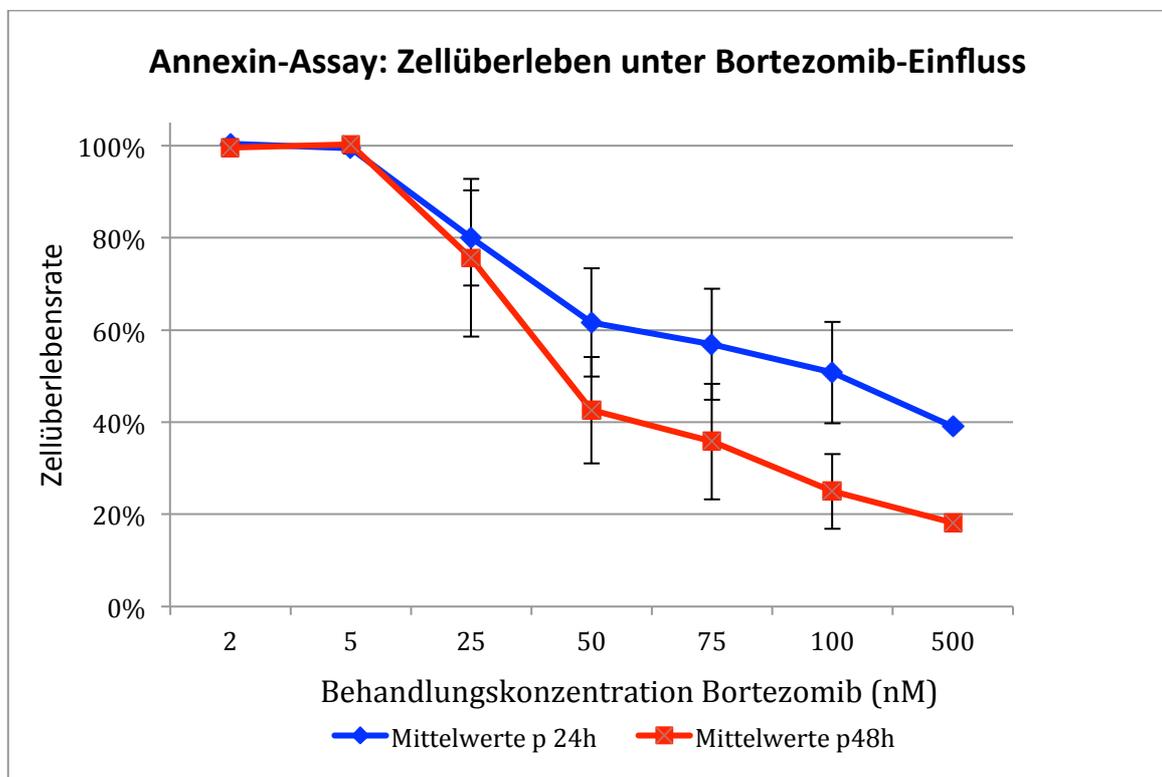


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse nach *in vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Mutliplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte (24h: n=2 [500] n=5 [50,75] n=6 [2] n=9 [100] n=11 [5,25] 48h: n=2 [500] n=4 [2] n=5 [50,75] n=8 [100] n=9 [5,25]) und Standardabweichungen des Zellüberlebens nach Zellinkubation mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden und 48 Stunden in %. Die Zellüberlebensrate wurde dabei durch Bestimmung der vitalen Zellen im Annexin-Apoptose-Assay (Annexin negativ + PI negativ) ermittelt. Zunehmende Bortezomib-Konzentrationen führen dabei in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer zu einer Abnahme des Zellüberlebens.

Weiterhin konnte ab einer Konzentration von 25 nM für alle Behandlungskonzentrationen beider Inkubationszeitpunkte eine signifikante Reduktion der Zellüberlebensrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden (**24h**: [25]: $p < 0,01$; [50]: $p < 0,01$; [75]: $p < 0,01$; [100]: $p < 0,01$; **48h**: [25]: $p < 0,01$; [50]: $p < 0,01$; [75]: $p < 0,01$; [100]: $p < 0,01$). Es ist zu beachten, dass eine Signifikanzberechnung für 500 nM aufgrund der geringen Probenzahl in dieser Konzentrationsgruppe ($n=2$) nicht vorgenommen wurde.

3.3.2 Konzentrationsabhängige Apoptoseraten CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation

3.3.2.1 Apoptoseraten nach 24h Bortezomib-Inkubation

In Abbildung 13 sind die Früh- und Spätapoptoseraten der untersuchten CD133 aufgereinigten Zellen für eine Inkubationszeit von 24 Stunden dargestellt. Allgemein kann festgestellt werden, dass sich für alle Konzentrationen mit Behandlungseffekt (ab 25 nM) nach beiden Inkubationsintervallen prozentual mehr Zellen in der Früh- als in der Spätapoptose befinden: es befinden sich also nach 24 Stunden bereits ab einer Bortezomib-Konzentration von 25 nM durchgehend mehr Zellen im Stadium der Frühapoptose als dem der Spätapoptose (25 nM: 4,2x mehr Zellen; 50 nM: 6,25x mehr Zellen; 75 nM: 7,14x mehr Zellen; 100 nM: 4,34x mehr Zellen; 500 nM: 7,14x mehr Zellen). Bezüglich der Früh- und Spätapoptoseraten der einzelnen Konzentrationen ist dabei für alle Konzentrationen ab einem Wert von 25 nM ein signifikanter Unterschied festzustellen ([25]: $p < 0,01$; [50]: $p < 0,01$; [75] $p < 0,01$; [100] $p < 0,01$). Es befinden sich somit für diese Konzentrationen signifikant mehr Zellen im Stadium der Frühapoptose als dem der Spätapoptose. Weiterhin kann gezeigt werden, dass die Erhöhung der Zytostatikakonzentration von 25 nM auf 500 nM zu einer knappen Vervierfachung der Frühapoptoserate ($\times 3,73$) führt, analog hierzu kommt es bei gleicher Konzentrationserhöhung lediglich zu einer Verdopplung der Spätapoptoserate ($\times 2,27$).

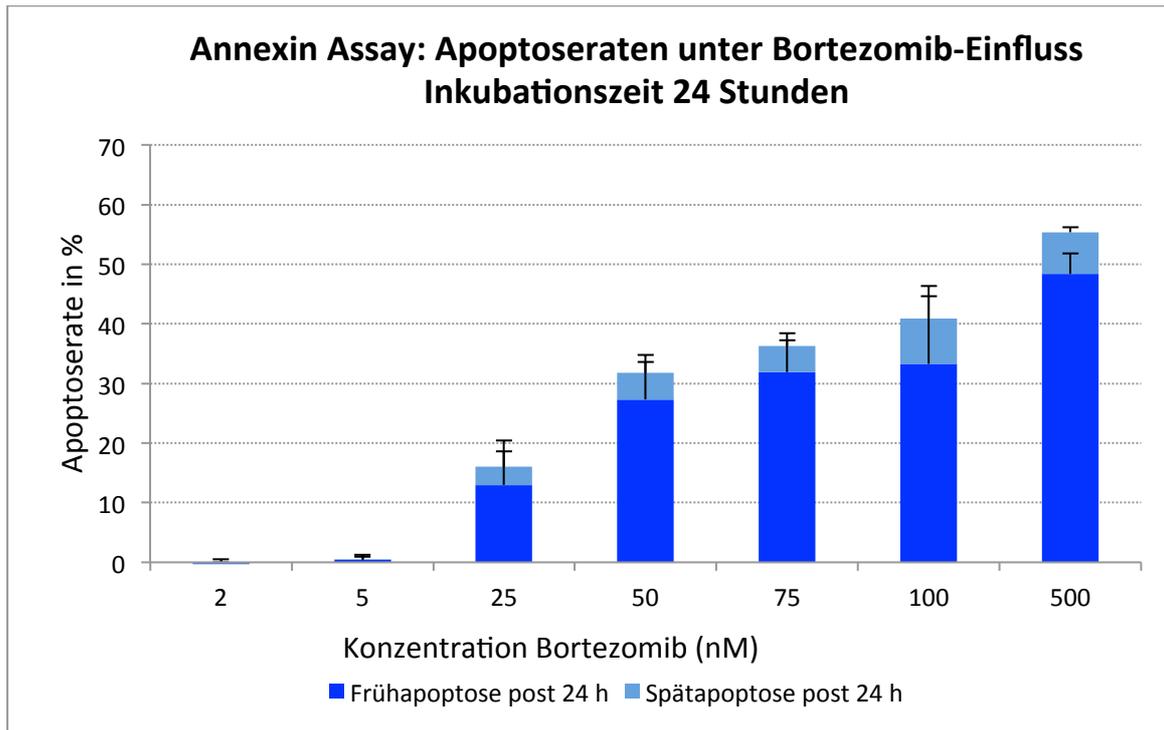


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse nach *in vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden

Dargestellt sind die Mittelwerte (*Frühapoptose*: n= 2 [500] n=5 [50,75] n=6 [2] n=9 [100] n=11 [5,25] *Spätapoptose*: n=2 [500] n=5 [2,50,75] n=8 [100] n=10 [5,25]) und Standardabweichungen der prozentualen Anteile frühapoptotischer und spätapoptotischer Zellen. Unter Behandlung mit Bortezomib für 24 Stunden zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der apoptotischen Zellen, wobei der Anteil frühapoptotischer Zellen größer ist als der Anteil spätapoptotischer Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte unter Verwendung des Annexin V-FITC Apoptose Assays.

3.3.2.2 Apoptoseraten nach 48h Bortezomib-Inkubation

In Abbildung 14 sind analog zu Punkt 3.2.2.1 und Abbildung 13 die Früh- und Spätapoptoseraten der Bortezomib-behandelten CD 133 aufgereinigten Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden dargestellt. Auch bei Verdopplung der Inkubationszeit von 24 auf 48 Stunden, kann ein Behandlungseffekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe für sowohl Früh- und Spätapoptose der Zellen erst ab einer Zytostatikakonzentration von 25 nM festgestellt werden. Vergleicht man die Früh- und Spätapoptoseraten für die steigende Konzentrationsreihe, befinden sich auch nach 48 Stunden Inkubation signifikant mehr Zellen in der

Früh- als in der Spätapoptose ([25]: $p < 0,01$; [50]: $p < 0,01$; [75]: $p < 0,01$; [100]: $p < 0,01$). Das Verhältnis der sich in Früh- bzw. Spätapoptose befindlichen Zellen ist dabei für 25 nM 1:0,27, 50 nM 1:0,11, 75 nM 1:0,09 und 100 nM 1:0,12. Für die Erhöhung der Behandlungskonzentration von 25 nM auf 500 nM kann insgesamt eine Vervierfachung der Zellen im Stadium der Frühapoptose (x4,17) sowie eine Verdreifachung der sich in Spätapoptose befindlichen Zellen (x3,33) festgestellt werden.

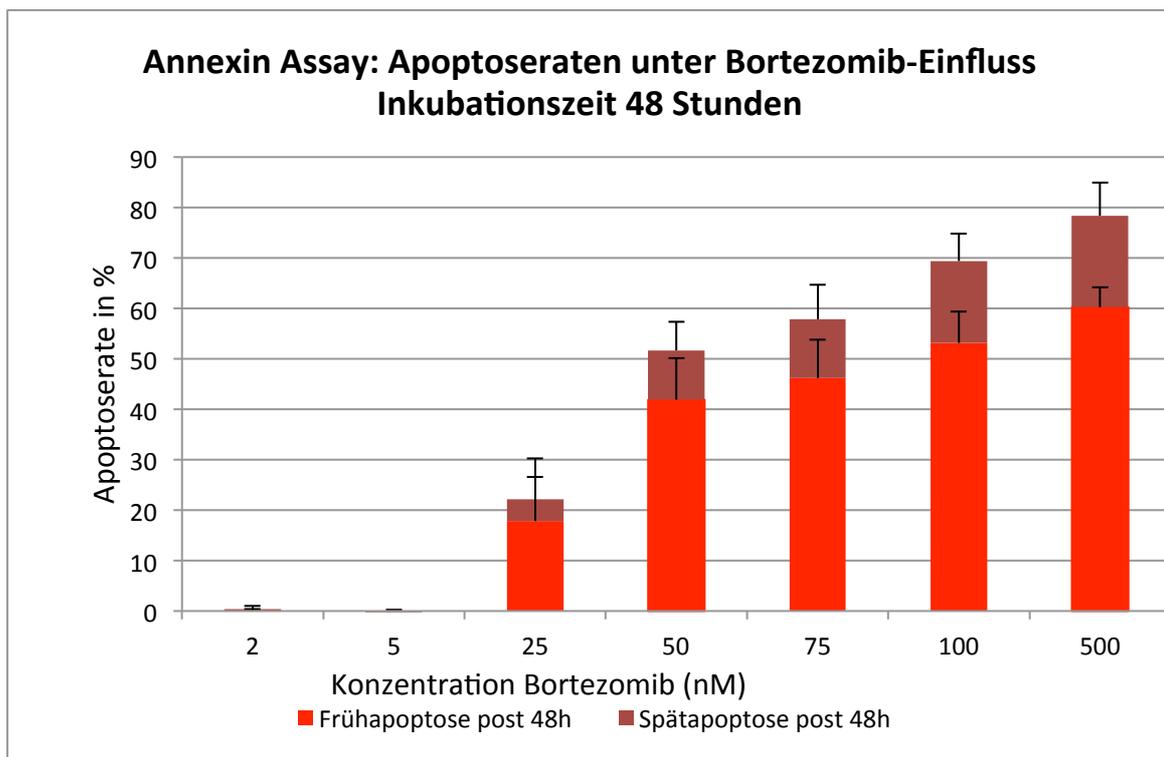


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse nach *in vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 48 Stunden.

Dargestellt sind die Mittelwerte (*Frühapoptose*: n=2 [500] n=4 [2] n=5 [50,75] n=8 [100] n=9 [5,25] *Spätapoptose*: n=2 [500] n=4 [2] n=5 [50,75] n=9 [100] n=10 [5,25]) und Standardabweichungen der prozentualen Anteile frühapoptotischer und spätapoptotischer Zellen. Unter Behandlung mit Bortezomib für 48 Stunden zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der apoptotischen Zellen, wobei der Anteil frühapoptotischer Zellen größer ist als der spätapoptotischer Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte unter Verwendung des Annexin V-FITC Apoptose Assays.

3.3.2.3 Frühapoptose

Abbildung 15 zeigt die Frühapoptoseraten CD133 aufgereinigter Zellen nach Bortezomib-Inkubation mit steigenden Behandlungskonzentrationen für einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden bzw. 48 Stunden. Allgemein zeigt sich ab einer Bortezomib-Konzentration von 25 nM eine Zunahme der Frühapoptoserate mit steigender Behandlungskonzentration. Die Inkubation mit 2 nM bzw. 5 nM zeigt dabei für beide Inkubationszeitpunkte keinen proapoptotischen Einfluss. Für die Verdopplung des Behandlungszeitraumes von 24 Stunden auf 48 Stunden kann ab 25 nM ein synergistischer Effekt bezüglich der Zellapoptoserate festgestellt werden, wobei sich die Zunahme der frühapoptotischen Zellen jedoch nur für die Konzentrationen 50 nM bis 100 nM als signifikant erweist ([50]: $p=0,03$; [75]: $0,02$; [100]: $p<0,01$). Vergleicht man die Zellapoptose der einzelnen Konzentrationen beider Inkubationszeiten mit einer unbehandelten Kontrollgruppe, zeigt sich eine signifikante Zunahme der Frühapoptoserate für alle Konzentrationen mit proapoptotischem Behandlungseffekt (**24h**: [25]: $0,01$ [50]: $p<0,01$; [75]: $p<0,01$; [100] $p<0,01$ / **48h**: [25]: $p<0,01$ [50]: $p<0,01$; [75]: $p<0,01$; [100] $p<0,01$)

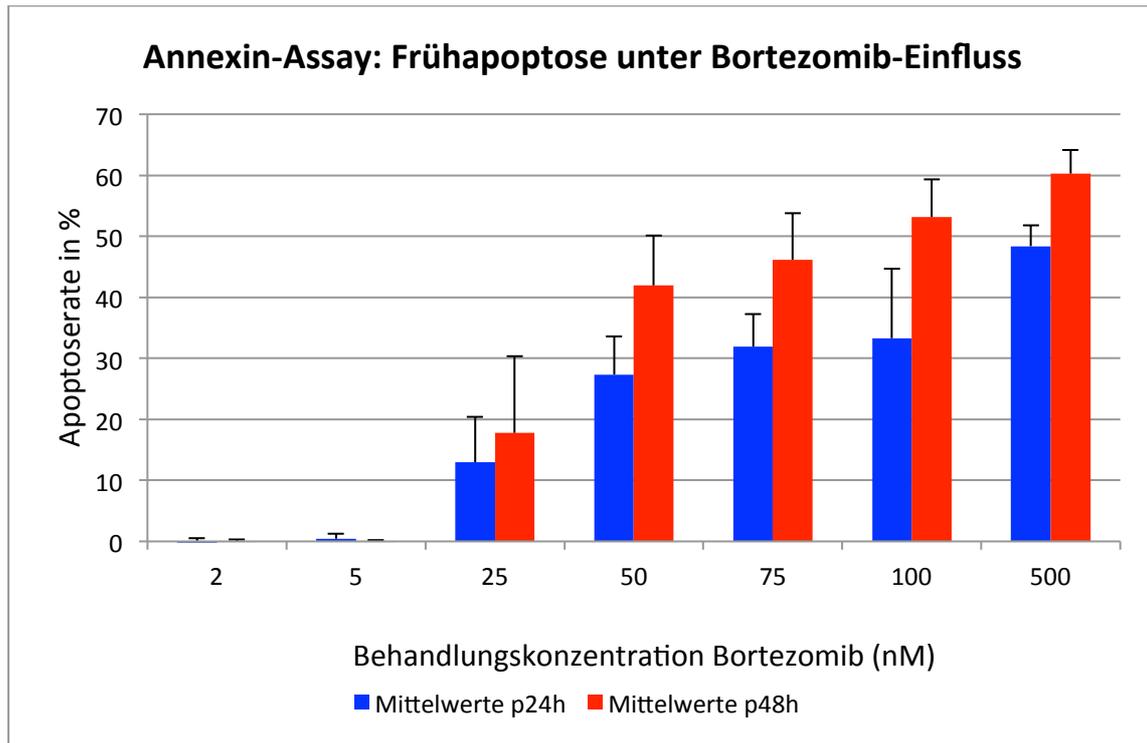


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse nach *in vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplen Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen. Darstellung der Frühapoptose.

Dargestellt sind die Mittelwerte (24h: n=2 [500] n=5 [50,75] n=6 [2] n=9 [100] n=11 [5,25] 48h: n=2 [500] n=4 [2] n=5 [50,75] n=8 [100] n=9 [5,25]) und Standardabweichungen der Frühapoptoseraten nach Zellinkubation mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden und 48 Stunden in %. Die Analyse erfolgte mittels Annexin V-FITC Apoptose Assay, wobei sich Zellen in Frühapoptose als Annexin positiv + PI negativ darstellen. Eine proapoptotische Wirkung kann für beide Behandlungszeiträume ab einer Konzentration von 25 nM nachgewiesen werden.

3.3.2.4 Spätapoptose

Abbildung 16 zeigt die Spätapoptoseraten CD133 aufgereinigter Zellen nach Bortezomib-Inkubation mit steigenden Behandlungskonzentrationen für einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden bzw. 48 Stunden. Hierbei kann analog zu Punkt 3.3.2.3 ein Behandlungseffekt erst ab einer Konzentration von 25 nM festgestellt werden. Insgesamt zeigt sich für die Zytostatikainkubation über 24 Stunden keine kontinuierliche Zunahme der Apoptoserate mit steigender Bortezomib-Konzentration, sondern es bilden sich zwei Wirkplateaus: Plateau 1 für die Konzentrationen 25 nM bis 75 nM mit einer durchschnittlichen

Spätapoptoserate von 4 Prozent und Plateau 2 für die Konzentrationen 100 nM und 500 nM mit einer durchschnittlichen Spätapoptoserate von 7,3 Prozent.

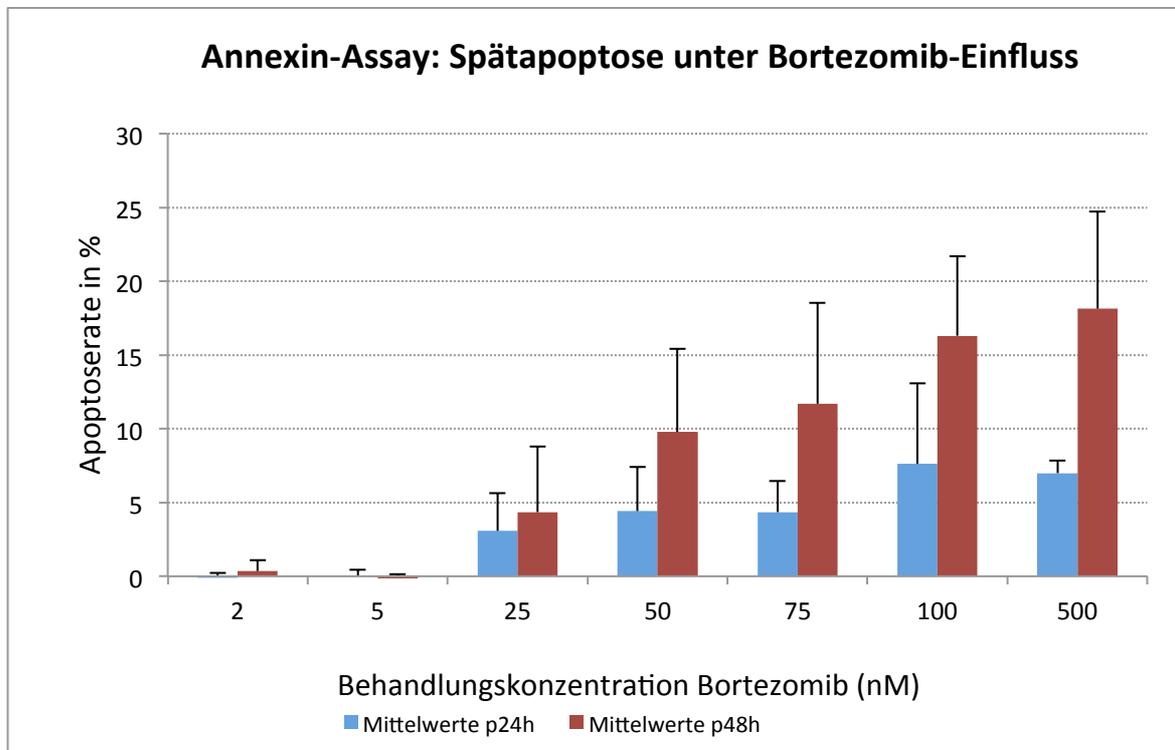


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse nach *in vitro* Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Mutliplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte (24h: n=2 [500] n=5 [2,50,75] n=8 [100] n=10 [5,25] 48h: n=2 [500] n=4 [2] n=6 [50,75] n=9 [100] n=10 [5,25]) und Standardabweichungen der Spätapoptoseraten nach Zellinkubation mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden und 48 Stunden in %. Die Analyse erfolgte mittels Annexin V-FITC Apoptose Assay, wobei sich Zellen in Spätapoptose als Annexin positiv + PI positiv darstellen. Ein proapoptotischer Effekt kann für beide Behandlungszeiträume ab einer Konzentration von 25 nM nachgewiesen werden, wobei die Spätapoptoserate nach 24h zwei Wirkplateaus zeigt und nach 48 Stunden mit steigender Zytostatikakonzentration kontinuierlich zunimmt.

Nach Inkubation über 48 Stunden zeigt sich hingegen, wie bereits bei Analyse der Frühapoptoseraten, eine kontinuierliche Zunahme der Apoptoserate mit steigender Behandlungskonzentration. Für die Verdopplung der Inkubationszeit von 24 Stunden auf 48 Stunden kann zwar bereits ab einer Konzentration mit 25 nM ein synergistischer Effekt gesehen werden, im Gegensatz zur Frühapoptose erweist sich jedoch nur die Behandlung mit 100 nM als statistisch signifikant. Bei Vergleich der Spätapoptoseraten der einzelnen Konzentrationen mit einer unbehandelten

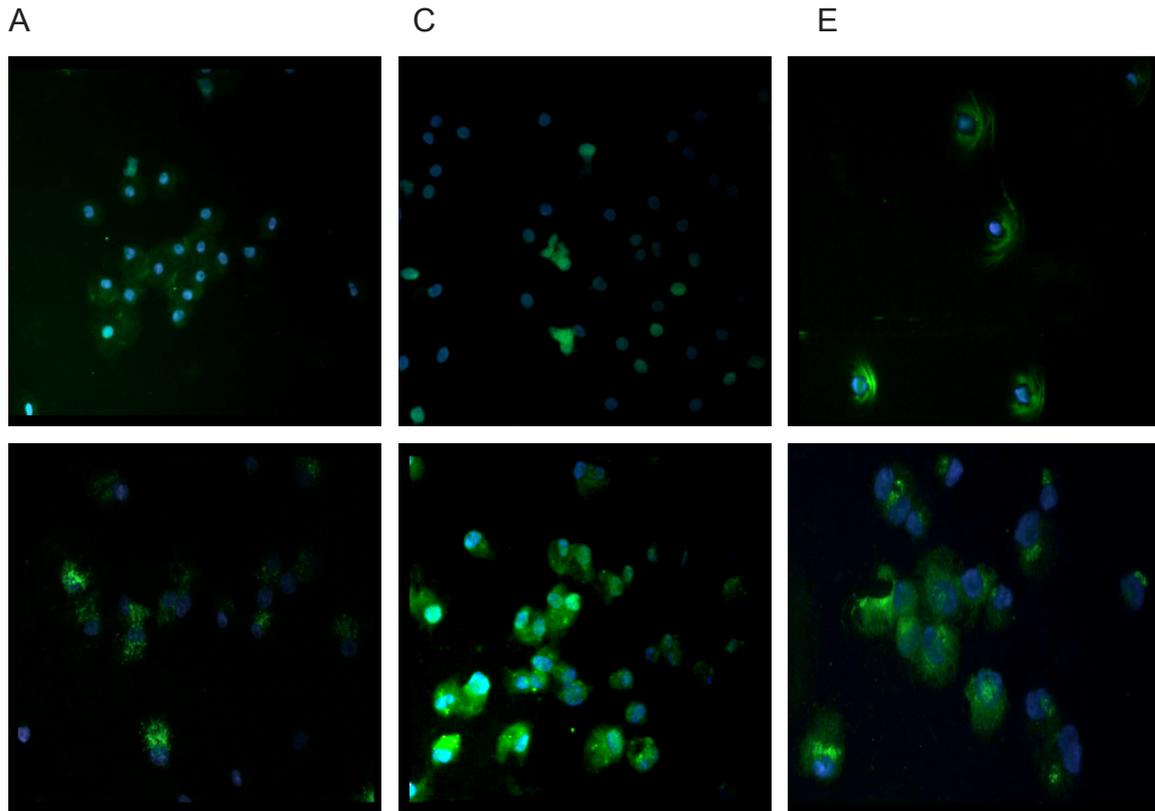
Kontrollgruppe zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme im Gegensatz zur Frühapoptose für beide Behandlungszeiträume erst ab einer Konzentration von 50 nM (**24h**: [50]: $p < 0,01$; [75]: $p < 0,01$; [100]: $p < 0,01$ / **48h**: [50]: 0,03; [75]: $p = 0,03$; [100]: $p < 0,01$).

3.4 Differenzierungsverhalten CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Inkubation

3.4.1 Immunfluoreszenzanalyse der Endothelmarkerexpression differenzierter CD133 aufgereinigter Zellen

Zur Analyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen nach Expansionskultur wurden die Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die endothelspezifischen Oberflächenantigene CD144, vWF und VEGF-Rezeptor-2 untersucht (siehe 2.2.7). Als Positivkontrolle wurden jeweils Endothelzellen der HUVEC-Zellreihe mitgeführt. In Abbildung 17 sind exemplarisch digitale Bildaufnahmen der einzelnen Immunfärbungen an Patientenzellen plus die zugehörigen Kontrollfärbungen an HUVEC-Zellen dargestellt (20fache Vergrößerung, siehe 2.2.8)

In Abbildung 18 ist der prozentuale Anteil Antigen-tragender differenzierter CD133 aufgereinigter Zellen im Vergleich zur HUVEC-Zellreihe für die gewählten Oberflächenmarker dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass alle drei endothelspezifischen Oberflächenmarker von den Differenzierungszellen exprimiert werden, der prozentuale Anteil positiver Zellen liegt dabei generell unter dem der Kontrollgruppe. Das Oberflächenantigen VEGF-R2 wird dabei sowohl von der Kontrollgruppe als auch den Differenzierungszellen am stärksten exprimiert, gefolgt von CD144 und vWF. Das Verhältnis der Antigenexpression von HUVEC-Zellen und Patientenzellen beträgt für vWF sowie VEGF-R2 1:0.7 und für CD144 1:0.69, d.h. die Endothelzellmarkerexpression der Differenzierungszellen liegt 30% bzw. 31% unterhalb der Expressionsrate der Kontrollzellen.



B

D

F

Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur *in vitro*, Aufnahmen in 20facher Vergrößerung

A: Patientenzellen: Färbung nach vWF
C: Patientenzellen: Färbung nach CD144
E: Patientenzellen: Färbung nach VEGF-R2

B: HUVECs: Färbung nach vWF
D: HUVECs: Färbung nach CD144
E: HUVECs: Färbung nach VEGF-R2

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzfärbungen CD133 aufgereinigter Zellen nach den endothelspezifischen Oberflächenmarkern vWF, CD144 und VEGF-R2. Als Kontrolle dienten für jede Färbung HUVEC-Zellen. Blau erscheinen die mit DAPI gegengefärbten Zellkerne, Antikörperpositive Zellen stellen sich zusätzlich grün dar (FITC).

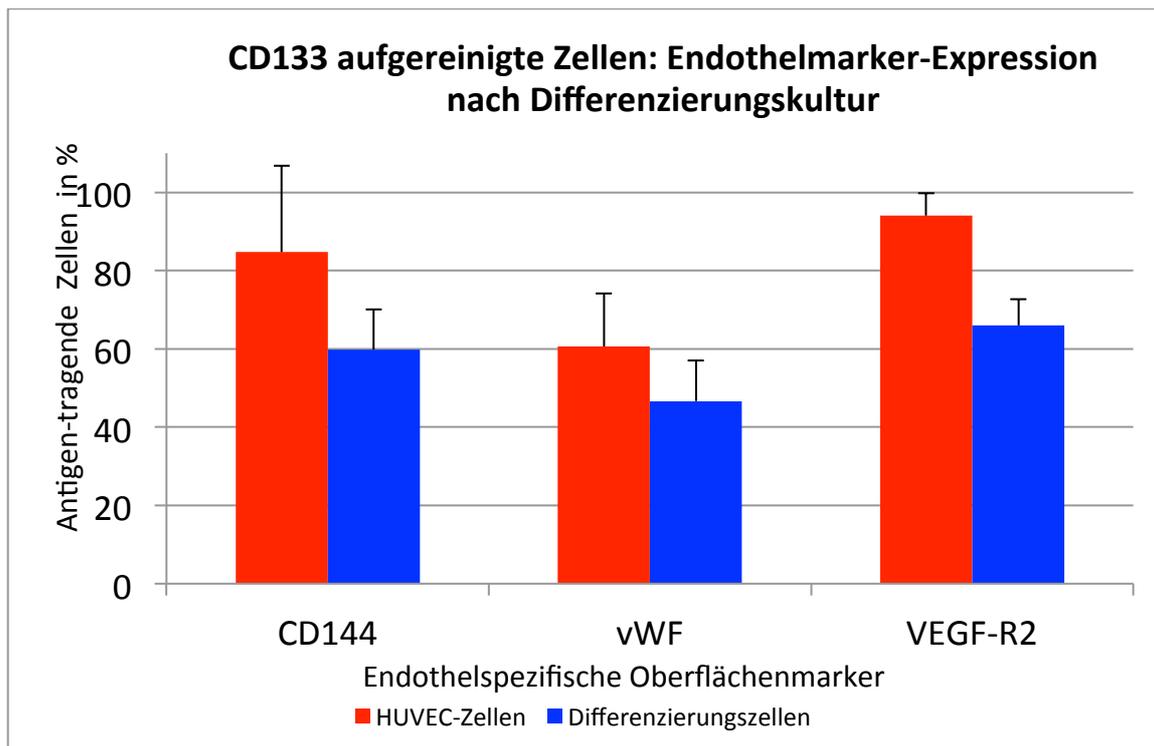


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Analyse der Expression endothelspezifischer Oberflächenmarker CD133 aufgereinigter Zellen nach Differenzierungskultur *in vitro*.

Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=$) und Standardabweichungen der immunzytologisch gefärbten CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur in %. Die Analyse erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung der endothelspezifischen Oberflächenmarker CD144 (VE-Cadherin), vWF und VEGF-R2 (KDR). Als Positivkontrolle dienten Zellen der HUVEC-Zellreihe.

3.4.2 Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen

Das Differenzierungsverhalten CD133 aufgereinigter Zellen unter Bortezomib-Einfluss wurde nach 14 tägiger Differenzierungskultur mittels Immunfluoreszenzanalyse analysiert. Im Gegensatz zu 3.4.1 wurde nicht nach endothelialen Oberflächenmarkern gefärbt, sondern die jeweilige Gesamtzellzahl der differenzierten Zellen unter steigender Bortezomib-Inkubation untersucht und anschließend zu der Gesamtzellzahl einer als Standard dienenden unbehandelten Zellprobe ins Verhältnis gesetzt. Ziel ist die Untersuchung des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen unter VEGF-Einfluss in reife Endothelzellen unter steigender Bortezomib-Konzentration.

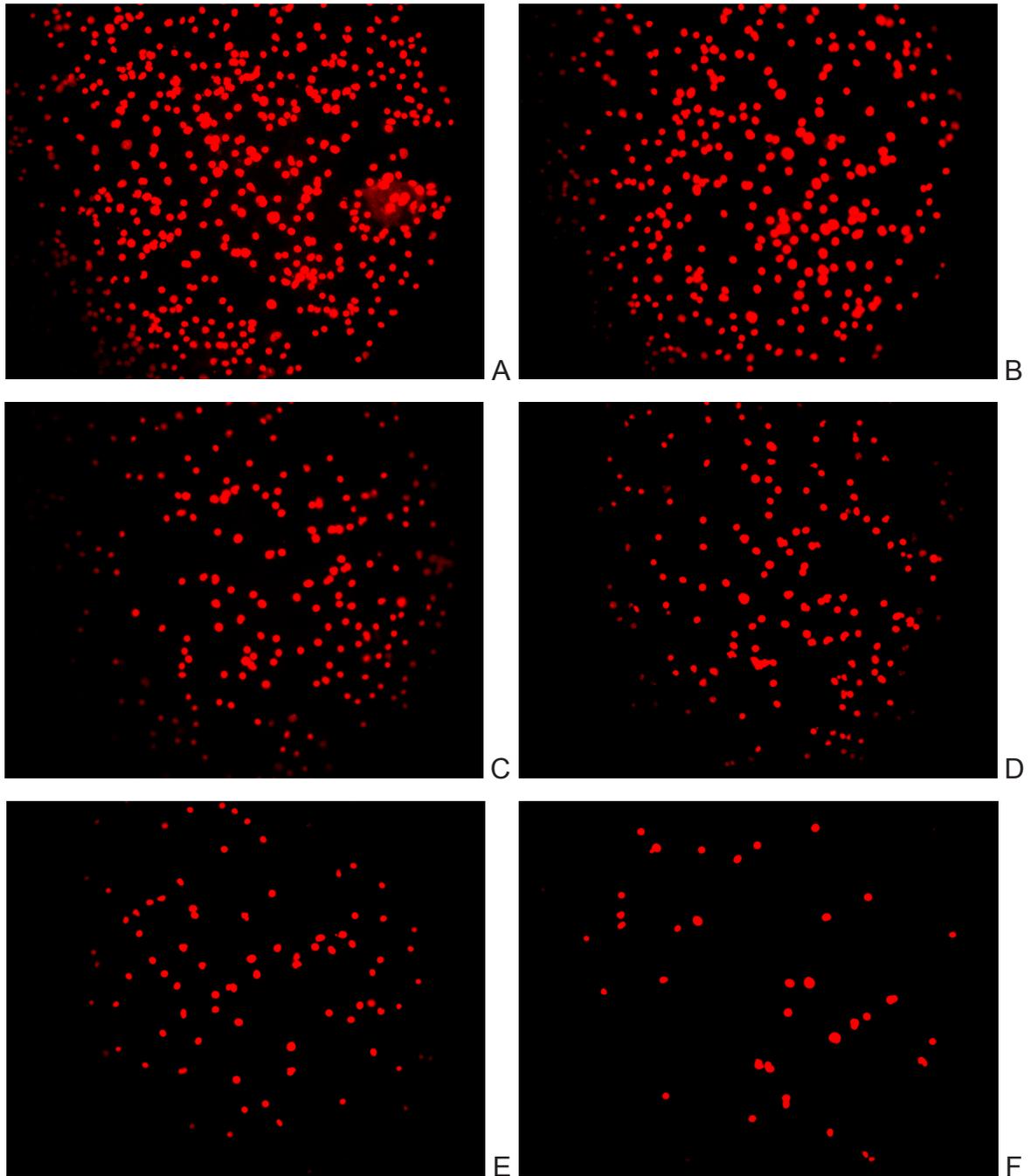


Abbildung 19: Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur *in vitro* unter steigender Bortezomib-Konzentration

Die Bilder A-F zeigen exemplarisch an einem Patienten digitale Fluoreszenzaufnahmen CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur unter dem Einfluss steigender Bortezomib-Konzentrationen (A = unb. B = 2nM C = 10nM D = 50nM E = 75nM F = 100nM). Die Zellfärbung zur Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Färbung der Zellkerne mit PI. Es ist eine Abnahme der Anzahl differenzierter Zellen mit steigender Zytostatika-Konzentration zu erkennen.

Abbildung 19 zeigt digitale Fluoreszenzaufnahmen differenzierter Zellen eines Patienten unter steigender Bortezomib-Konzentration. Bei den untersuchten Zellen handelt es sich um adhärenente Zellen, deren Zellkern mit PI zwecks Zellzahlbestimmung gefärbt wurde. Die Abnahme der Zellzahl differenzierter Zellen unter Bortezomib-Inkubation ist ergänzend in Abbildung 20 grafisch dargestellt. Beide Abbildungen zeigen eine deutliche Verringerung der Zellzahl mit steigender Zytostatika-Konzentration. Bereits ab einer Konzentration von 25 nM sinkt die Zellzahl unter 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, für eine Konzentration von 100 nM fällt die Zellzahl auf unter 20%.

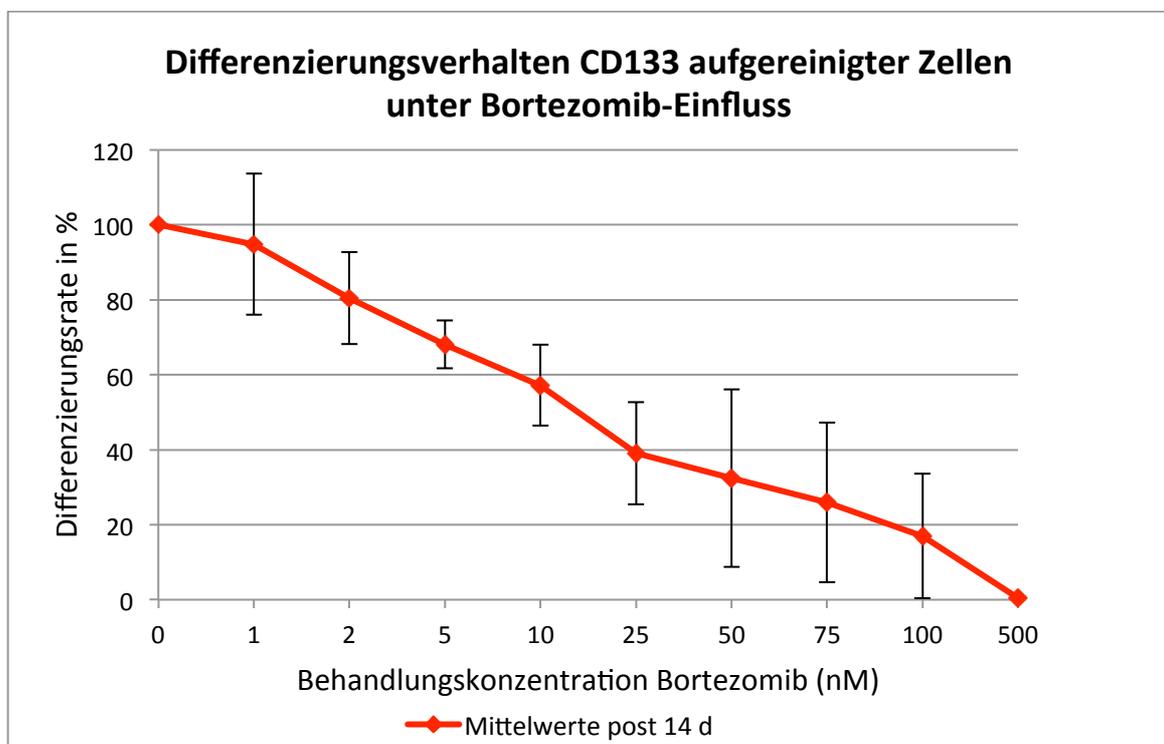


Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger *in vitro* Bortezomib-Inkubation mit aufsteigenden Zytostatika-Konzentrationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=7$ [1]-[100] $n=2$ [500]) und Standardabweichungen der Differenzierungsrate endothelialer Progenitorzellen nach 14tägiger Differenzierungskultur unter Bortezomib-Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen in %. Die Analyse erfolgte mittels PI-Färbung und anschließender Bestimmung der absoluten Zellzahl durch manuelles Auszählen.

Für die Inkubation mit 500 nM Bortezomib konnte eine durchschnittliche Reduktion der Zellzahl auf knapp 0.5% gezeigt werden. Die Abnahme der Zellzahl ist in diesem Zusammenhang bereits für niedrige Behandlungskonzentrationen statistisch signifikant. Insgesamt kann von einer statistischen Signifikanz der beobachteten Zellzahlreduktion der einzelnen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe für alle Konzentrationen ab 5 nM gesprochen werden ([5]: $p=0,05$ [10]: $p=0,04$ [25]: $p < 0,01$ [50]: $p < 0,01$ [75]: $p < 0,01$ [100]: $p < 0,01$).

4 Diskussion

4.1 Hintergrund

Hintergrund dieser Studie ist, dass die antiangiogenetische Wirkung des Zytostatikums Bortezomib auf endotheliale Progenitorzellen im Rahmen der Tumorangio-genese des Multiplen Myeloms noch weitgehend unerforscht ist. Im Laufe der letzten Jahre konnte bereits eine antiangiogenetische Wirkung Bortezomibs auf ausgereifte Endothelzellen durch unterschiedliche Mechanismen nachgewiesen werden. Zum einen lässt die Runterregulation der VEGF-Sekretion multipler Myelomzellen durch den Proteasominhibitor (Hayashi et al., 2003; Roccaro et al., 2006) und die damit verbundene Verringerung dieses für das Endothelwachstum essentiellen Wachstumsfaktors eine indirekte Beeinflussung der Angiogenese endothelialer Zellen durch das Zytostatikum vermuten (Tamura et al., 2010). Zum anderen konnten Roccaro et al. ergänzend hierzu 2006 einen direkt hemmenden Effekt Bortezomibs auf verschiedene Funktionen proangiogenetischen Zellverhaltens endothelialer Zellen Multipler Myelom-Patienten sowie HUVEC-Zellen nachweisen. Während Roccaro et al. 2006 in diesem Zusammenhang unter anderem eine dosisabhängige Inhibition von Chemotaxis, Zelladhäsionsverhalten auf Fibronektin und Tubulusbildung im Matrigel-Assay beider Zellgruppen zeigen konnten (Roccaro et al., 2006), wiesen Podar et al. bereits zwei Jahre zuvor eine dosisabhängige Reduktion der Überlebensrate und des Migrationsverhaltens von HUVEC-Zellen unter Bortezomib-Inkubation nach (Podar et al., 2004). Die *in vitro* Erforschung der antiangiogenetischen Effekte Bortezomibs auf endotheliale Progenitorzellen ist besonders im Hinblick auf ein besseres Verständnis des klinischen Wirkspektrums des Proteasomeninhibitors auf die Tumorangio-genese bedeutsam.

4.2 Phänotyp und Definition endothelialer Progenitorzellen

Wie in der Einleitung besprochen, ist der genaue Phänotyp endothelialer Progenitorzellen weiterhin umstritten, was in den letzten Jahren zunehmend zu Kontroversen und ausgeprägten Debatten innerhalb der aktuellen Studienlage geführt hat (Yoder und Ingram, 2009a). Die Verwendung der Stammzellmarker CD34 und CD133 zur Identifizierung endothelialer Vorläuferzellen als Teilmenge eines mononukleären Zellpools aus humanem Nabelschnurvenenblut bzw. G-CSF stimuliertem peripheren Blut wird aktuell noch immer von zahlreichen Forschergruppen favorisiert (Gehling et al., 2000; Wu et al., 2007; Ramos et al., 2010). Aufgrund der Tatsache, dass CD133 als Oberflächenmarker von sowohl hämatopoetischen (Miraglia et al., 1997) als auch endothelialen Vorläuferzellen exprimiert wird, ist eine Unterscheidung dieser Zellpopulationen nach Aufreinigung derzeit jedoch nicht sicher möglich (Ramos et al., 2010). Weiterhin wird die gegenwärtige Diskussion dadurch erschwert, dass einzelne Arbeitsgruppen die Differenzierungsfähigkeit CD133 positiver Zellen in Endothelzellen bezweifeln bzw. bestreiten (Timmermans et al., 2007; Case et al., 2007). Dem entgegen zu setzen ist, dass andere Studien zeigen konnten, dass CD133 positive Zellen unter bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* in mature Endothelzellen unter Expression typischer Endothelzell-Oberflächenmarker wie CD144 und vWF differenzieren können bzw. die Fähigkeit besitzen *in vitro* gefäßähnliche Strukturen zu bilden (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000; Quirinci et al., 2001; Ramos et al., 2010).

Zur Definition humaner endothelialer Progenitorzellen werden aktuell drei verschiedene Methoden bevorzugt (Yoder, 2009):

1. Die Kultivierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut auf Fibronektin-beschichteten Kulturplatten unter dem Einfluss variierender Wachstumsfaktoren unter Verwerfung der nicht-adhärenenten Zellen nach einer variierenden Anzahl an Tagen. Die Zellen der verbleibenden

- adhärenten Zellpopulation besitzen die Eigenschaft, low density-Lipoprotein aufnehmen und bestimmte Lektine binden zu können, und werden als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet.
2. Die Nutzung monoklonaler Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse (FACS-Analyse) einer bestimmten Zellpopulation. In Anlehnung an Asahara et al. haben Peichev et al. ein Protokoll für die Oberflächenmarker CD34, CD133 und KDR entworfen und dreifach-positive Zellen aus dem peripheren Blut bzw. Nabelschnurblut als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet.
 3. Die Verwendung sogenannter *in vitro* „colony forming cell assays“:
 - a. CFU(colony forming unit) – Hill – Assay
 - b. ECFC (endothelial colony forming cell) – Assays

(Yoder, 2009)

Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Aufreinigung nach CD133/CD34 positiven Zellen, und damit gleichzeitige Selektion endothelialer Progenitorzellen als prozentuale Teilmenge dieses Zellpools, stützt sich unter anderem auf die Arbeit von Peichev et al., die im Jahre 2000 eine Co-Expression des Oberflächenmarkers CD133 auf einem bedeutenden Anteil CD34/VEGF-R2-positiver Zellen nachweisen konnten. Methodisch wurden dabei initial CD34 positive Zellen immunmagnetisch aus Nabelschnurblut, G-CSF stimuliertem peripheren Blut sowie fötaler Leber isoliert und direkt nach Aufreinigung auf die Expression der Oberflächenmarker CD34, VEGF-R2 und CD133 untersucht. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe des Wachstumsfaktors FGF-2 drei Tage kultiviert, wonach die Zellpopulation nicht-adhärenter Zellen jeweils auf kollagenbeschichteten Kulturplatten für 14 Tage weiter kultiviert wurden. Die Differenzierung dieser Zellen zu ausgereiften Endothelzellen unter Kultur, und der Verlust des Oberflächenmarkers CD133 zu Gunsten der Endothelmarker vWF und CD144, führte zu der Hypothese, es handele sich bei der untersuchten Zellpopulation um endotheliale Progenitorzellen (Peichev et al., 2000).

Im Hinblick auf die immunomagnetische Isolation CD133 positiver Zellen aus einem zuvor G-CSF stimulierten mononukleären Zellpool wurde in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (Freund et al., 2006; Leor et al., 2006) eine Reinheit von durchschnittlich 98,6 Prozent erzielt. Im Verlauf der 21 tägigen Expansionskultur nahm die Expression des Stammzellmarkers rapide ab und fiel bereits innerhalb der ersten Woche auf unter 50 Prozent. Zum Behandlungszeitpunkt konnte somit lediglich eine Zellexpressionsrate von 2 Prozent nachgewiesen werden. Loges et al. konnten 2004 entsprechende Ergebnisse vorweisen, die zeigten, dass die Expression des Oberflächenmarkers CD133 zwischen Tag 24 und 29 wieder deutlich zunahm (Loges et al., 2004). Für den Rückgang der gemessenen CD133-Expression sind verschiedene Ursachen denkbar. Endotheliale Vorläuferzellen können, wie bereits in der Einleitung dargestellt, in frühe endotheliale Progenitorzellen (CD34+ CD133+) mit stammzelltypisch geringer Proliferationskapazität und späte endotheliale Progenitorzellen unterteilt werden. Späte Vorläuferzellen kennzeichnet dabei ein ausgeprägt hohes Proliferationsverhalten unter Verlust der Oberflächenmarker CD34 und CD133 bei zunehmender Expression endothelspezifischer Antigene (Napoli et al., 2010). Die in dieser Arbeit beobachteten hohen Proliferationsraten im Rahmen der Expansionskultur stützen die Annahme, dass es sich bei einem Großteil der Zellpopulation an Tag 21 um späte Endothelvorläuferzellen handelt. In diesem Zusammenhang könnte beispielsweise eine im Versuchsverlauf frühzeitige Umwandlung der Hauptanzahl früher endothelialer Progenitorzellen in späte endotheliale Progenitorzellen und die anschließende Proliferation dieser Zellen vermutet werden. Ebenfalls denkbar ist die Umwandlung eines lediglich geringen Anteils früher endothelialer Progenitorzellen in späte endotheliale Vorläuferzellen, wobei es im weiteren Expansionsverlauf durch das unterschiedliche Proliferationsverhalten beider Zellgruppen zu der gezeigten prozentualen Abnahme CD133 positiver Zellen kommt, ohne dass sich die eigentliche Anzahl CD133 positiver Zellen verringert.

Kritisch zu diskutieren ist ebenfalls die Frage nach einer möglichen Teildifferenzierung CD133 positiver Zellen in Zellen der hämatopoetischen Zelllinie

unter den in dieser Arbeit gewählten Kulturbedingungen. Da sowohl hämatopoetische Progenitorzellen (HPCs) als auch frühe endotheliale Progenitorzellen den Oberflächenmarker CD133 exprimieren (Eguchi et al., 2007), ist anzunehmen, dass sich in der immunomagnetisch aufgereinigten Zellfraktion neben den für den Versuch gewünschten endothelialen Progenitorzellen ebenfalls hämatopoetische Vorläuferzellen befinden. Das prozentuale Verhältnis beider Zellpopulationen zueinander ist dabei in dieser Versuchsanordnung unbekannt. Im Rahmen weiterführender Studien wäre in diesem Zusammenhang zusätzlich zu einer Reinheitskontrolle unter Expansionskultur (CD34/CD133) eine Untersuchung auf typische hämatopoetische Oberflächenmarker wie beispielsweise CD45 unter Expansionskultur im FACS-Zytometer wünschenswert. Ebenfalls denkbar wäre eine nähere Identifikation der immunomagnetisch aufgereinigten Zellpopulation im FACS-Zytometer mit einer Zusatzbestimmung von hämatopoetischen sowie monozytären Oberflächenmarkern wie beispielsweise CD14 und CD45, um beispielsweise konstruktiv die Ergebnisse von Rhode et al. miteinzubeziehen, welche in ihrer Studie von 2006 die Hypothese aufstellten, dass Monozyten und ihre Nachfolgerzellen phänotypisch endotheliale Progenitorzellen in zahlreichen experimentellen Modellen nachahmen können (Rhode et al., 2006).

4.3 Diskussion zum Proliferations- und Apoptoseverhalten endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomibeeinfluss

Ein Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Untersuchung der proliferationshemmenden Wirkung Bortezomibs auf endotheliale Progenitorzellen aus dem Blut Multipler-Myelom-Patienten. In Übereinstimmung mit den vorgelegten Ergebnissen konnten Roccaro et al. bereits 2006 einen inhibierenden Effekt des Klasse-I-Proteasomenhemmers auf die Proliferation reifer Endothelzellen eines vergleichbaren Patientenkollektivs nachweisen (Roccaro et al., 2006). Sowohl Roccaro et al. als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit der proliferations-

hemmenden Wirkung von Behandlungsdosis und Behandlungsdauer in klinisch relevanten Konzentrationsbereichen zeigen (siehe Abbildung 10). Zusätzlich konnte in der Studie von Roccaro et al. 2006 eine konzentrationsabhängige Reduktion der unter Studienbedingungen erreichten VEGF-Spiegel nachgewiesen werden. Die anzunehmende Interaktion zwischen endothelialen Progenitorzellen und reifen Endothelzellen im Rahmen angiogenetischer Prozesse, sowie die VEGF-Abhängigkeit beider Zellpopulationen, legen den Schluss nahe, dass eine anti-angiogenetische Teilwirkung Bortezomibs aufgrund der Proliferationshemmung beider Zellgruppen sowie der Reduktion des angiogenetisch regulativen Wachstumsfaktors VEGF erfolgt.

Wie in den Abbildungen 12 bis 16 zu sehen ist, konnten weiterhin eine dosisabhängige Abnahme des Zellüberlebens sowie eine proapoptotische Wirkung des Zytostatikums auf endotheliale Vorläuferzellen unter dosisabhängiger Induktion von sowohl Früh- als auch Spätapoptose nachgewiesen werden. Als entscheidender Wirkmechanismus Bortezomibs auf molekularer Ebene ist in diesem Zusammenhang die Inhibition von Nuklear Factor-kappa B (NF- κ B) zu nennen. NF- κ B ist in seiner inaktiven Form im Zytoplasma fast aller Zelltypen enthalten und beeinflusst als Transkriptasefaktor unterschiedliche Aspekte des Zellzyklus (Karin und Ben-Neriah, 2000). Die Aktivität von NF- κ B wird hierbei durch Bindung an "Inhibitor of kappa B" (I κ B) als spezifischen Inhibitor geregelt (Beg und Baldwin, 1993). Nach Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteolytischer Degradation von I κ B kommt es zur Translokation NF- κ Bs in den Zellkern (Zandi und Karin, 1999). Durch spezifische Bindung an sogenannte "target genes" wird die Transkription von multiplen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Apoptoseinhibitoren (inhibitor of apoptosis (IAPs) und Bcl-2) gefördert (Adams et al., 2000). Wie in Abbildung 21 schematisch dargestellt, blockiert Bortezomib die Aktivierung NF- κ Bs durch Inhibierung der proteosomalen Degradierung von I κ B, wodurch es indirekt zu einer Abnahme von IAPs und weiteren Störungen des Zellzyklus kommt, die bei ausbleibender Gegenregulation zum Zelltod führen können.

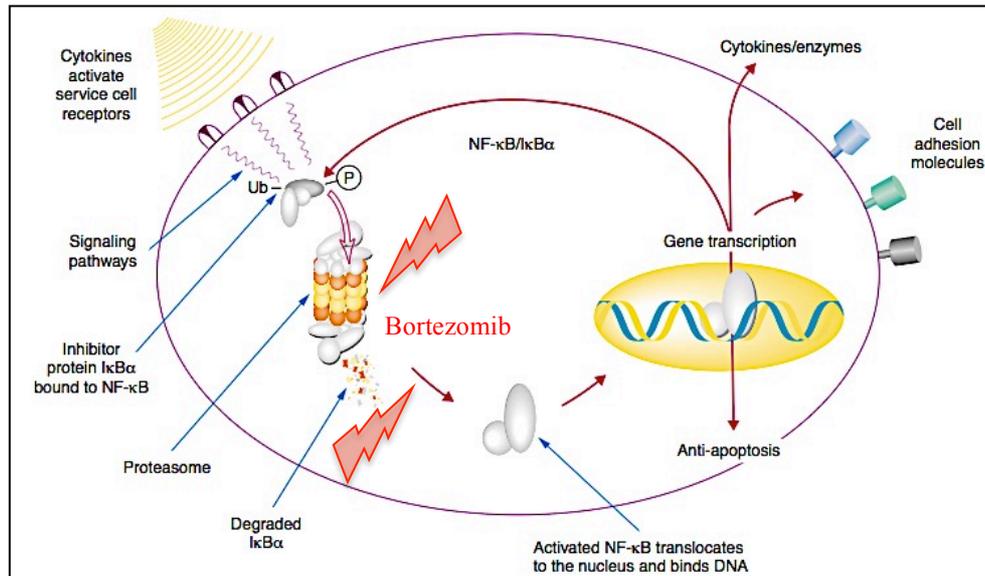


Abbildung 21: Bortezomib inhibiert den Transkriptasefaktor NF-κB

Bortezomib verhindert die Degradation des NF-κB-Inhibitors IκB und damit die Aktivierung des Transkriptasefaktors NF-κB [modifiziert nach Adams 2002b].

Die proapoptotische Wirkung Bortezomibs konnte bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für unterschiedliche Tumorentitäten bestätigt werden (Sunwoo et al., 2001; Williams et al., 2003; Nawrocki et al., 2004; Kelley et al., 2004; Codony-Servat et al., 2006). Hier ist in Bezug auf die vorliegende Arbeit im Besonderen das Multiple Myelom zu nennen (Hideshima et al., 2001; LeBlanc et al., 2002; Mitsiades et al., 2003). Bedeutsamerweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Tumorzellen deutlich anfälliger für die proapoptotischen Effekte von Proteasomeninhibitoren sind als normale Zellen (Soligo et al., 2001; Adams, 2002a; Ma et al., 2003), was klinische Bedeutung im Rahmen des vergleichsweise moderaten Nebenwirkungsprofils dieser noch jungen Zytostatikagruppe findet.

Wie in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt, befinden sich für beide in dieser Arbeit gewählten Inkubationszeiträume nach Bortezomib-Inkubation deutlich mehr Zellen im Stadium der Frühapoptose als im Stadium der Spätapoptose. Es stellt sich hierbei die Frage, in wie weit in Frühapoptose befindliche endotheliale Progenitorzellen in der Lage sind, sich durch zelleigene Reparaturmechanismen zu regenerieren. Da es zu dieser Thematik noch keine Literatur gibt, wären zur

Klärung der Nachhaltigkeit der Apoptoseinduktion durch Bortezomib weiterführende *in vitro* Versuche wünschenswert.

4.4 Diskussion zum Differenzierungsverhalten endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Einfluss

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Untersuchung des Differenzierungsverhaltens endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Einfluss. Wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt, konnte nach Differenzierungskultur die Zellexpression endothelzelltypischer Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, herrscht in der aktuellen Studienlage Uneinigkeit bezüglich der Differenzierungsfähigkeit CD133 positiver Zellen in reife Endothelzellen. In Übereinstimmung mit zahlreichen Studien kann diese Arbeit die Differenzierungsfähigkeit CD133 positiver Zellen in Endothelzellen bestätigen (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000; Quirinci et al., 2001; Ramos et al., 2010). Die Tatsache, dass die Expressionsrate aller untersuchten Antigene prozentual unterhalb der Kontrollgruppe liegt, könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass noch nicht alle Zellen vollständig differenziert sind, es sich also um Zwischenstufen mit unbekanntem noch nicht vollends ausgeprägtem endothelialen Oberflächenprofil handelt. Andererseits wäre das Vorhandensein einer zweiten Zellpopulation mit demnach nicht-endothelialen Oberflächenantigenen denkbar. Morphologisch müssten diese Zellen quasi Endothelzellen mimen, da in dieser Arbeit eine Differenzierung der ursprünglichen Suspensionszellen in für Gefäßzellen typische spindelförmig-adhärenente Zellteppiche beobachtet werden konnte. Zur Klärung dieser Frage wären weiterführende Studien unter Ausweitung der immunologisch untersuchten Oberflächenantigene nach Differenzierungskultur erstrebenswert. Im Vorfeld bedarf es auch in diesem Zusammenhang der eindeutigen Bestimmung des Phänotypes endothelialer Vorläuferzellen, um die zu differenzierende Ausgangspopulation sicher bestimmen zu können.

Bedeutenderweise konnte in dieser Arbeit eine dosisabhängige signifikante Inhibierung der Zelldifferenzierung endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19 und 20). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit kann hierbei kritisch hinterfragt werden, inwieweit ein Bortezomib-induziertes Zellsterben während der Differenzierungskultur die Endwerte falsch positiv beeinflusst. Für die Inhibierung der Tumorangiogenese im klinischen Alltag hat diese Unterscheidung vermutlich jedoch keine Relevanz, da sich beide inhibitorischen Effekte addieren.

4.5 Beitrag endothelialer Progenitorzellen zur Tumorangiogenese

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten zunehmend darauf hin, dass die Tumolvaskularisation unterschiedlicher Tumorentitäten im Rahmen der Tumorangiogenese nicht ausschließlich durch mature Endothelzellen erfolgt. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre lassen zunehmend erkennen, dass endotheliale Progenitorzellen als Vorläuferzellen mit hoher Proliferationskapazität im Rahmen des sogenannten *angiogenetic switch* in das jeweilige Tumorgebiet rekrutiert werden um dort durch Bildung eines endothelialen Zellpools maßgeblich zur Tumorgefäßbildung beizutragen (Vajkoczy et al., 2003; Ribatti, 2004; Nolan et al., 2007; Du et al., 2008). Einzelne Studien konnten in diesem Zusammenhang keinen Beitrag endothelialer Progenitorzellen zur Tumorangiogenese nachweisen und zweifeln demnach die Relevanz endothelialer Vorläuferzellen in Bezug auf Tumolvaskularisation und –ausbreitung an (De Palma et al., 2003; Göthert et al., 2004). Dementgegen vertreten Bagley et al., basierend auf ihren Forschungsergebnissen aus dem Jahre 2003, die Meinung, endotheliale Progenitorzellen seien ein deutlich besseres Modell zur Erforschung humaner Tumorendothelzellen als mature Endothelzellreihen (Bagley et al., 2003). Wie jedoch bereits im Vorfeld erläutert, ist diese Ergebnisdiskrepanz mit großer

Wahrscheinlichkeit durch uneinheitliches Studiendesign und das Fehlen eines einheitlichen Phänotypes zu erklären.

Der Beitrag endothelialer Progenitorzellen zur Tumervaskularisation des Multiplen Myeloms ist noch weitgehend unerforscht. Bekannt ist, dass die Dichte der Mikrogefäße im Knochenmark mit der Expression proangiogenetischer Faktoren sowie der Aktivität des Multiplen Myeloms korreliert (Vacca et al., 1994; Sezer et al., 2001; Pruneri et al., 2002; Rajkumar et al., 2002; Bhatti et al., 2006; Rana et al., 2010). Eine Zunahme der Mikrogefäßdichte des Knochenmarks führt dabei zu einem prognostischen Nachteil (Sezer et al., 2000). Zhang et al. untersuchten 2005 in ihrer Studie an 31 Patienten die Relation zwischen endothelialen Progenitorzellen und Tumoraktivität und konnten eine Korrelation zwischen erhöhten Endothelprogenitorzell-Leveln und erhöhten M-Protein-Werten als Marker für steigende Tumoraktivität zeigen (Zhang et al., 2005). Neuere Studien konnten ebenfalls erhöhte Serumlevel endothelialer Progenitorzellen im Blut von Patienten mit weiteren malignen Erkrankungen nachweisen (Dome et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnten unter anderem erhöhte EPC-Werte für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Dome et al., 2006), das hepatozelluläre Karzinom (Ho et al., 2006), das Mammakarzinom (Fürstenberger et al., 2006), das kolorektale Karzinom (Willett et al., 2004; Lin et al., 2007), das non-Hodgkin Lymphom (Igreja et al., 2007) und die akute myeloische Leukämie (AML) (Wierzbowska et al., 2005) festgestellt werden. Die Verwendung endothelialer Progenitorzellen als pathogenetische Biomarker für das Multiple Myelom, wie von Zhang et al. 2005 vorgeschlagen, stellt beispielsweise eine attraktive Möglichkeit für die Verifizierung des Therapieansprechens dar, bedarf bis zu ihrem Einsatz jedoch weiterführender Forschung. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen im Rahmen der Tumorangiogenese des Multiplen Myeloms als hämatologische Neoplasie noch unzureichend erforscht ist und abschließend erst nach eindeutiger Identifizierung des Phänotypes endothelialer Vorläuferzellen geklärt werden kann.

4.6 Limitierung der *in vitro* Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit sind endotheliale Progenitorzellen aus Stammzell-Leukapheresaten zur autologen Stammzelltransplantation an Multiplem Myelom erkrankter Patienten kultiviert und behandelt worden. Unter pathophysiologisch realen Bedingungen stehen endotheliale Progenitorzellen mit den sie umgebenden Myelomzellen in wechselseitiger Interaktion. Das Zusammenspiel dieser Zellen im Tumorgefäßbett ist in der *in vitro* Versuchsanordnung jedoch nicht gegeben. Myelomzellen stehen über eine Vielzahl von Zytokinen in enger Interaktion mit dem sie umgebenden Knochenmark (Mitsiades et al., 2004; Mitsiades et al., 2007). Die Sekretion einer Vielzahl von Botenstoffen wie beispielsweise ANG1, IL-6, IL-9, HGF, VEGF, MMP-9 und TNF- α beeinflusst hierbei sowohl die Myelomzelle selbst als auch das umgebende Knochenmarksmilieu, bestehend aus der extrazellulären Matrix, stromalen Knochenmarkszellen sowie Endothelzellen (Anargyrou et al. 2008). In Bezug auf die Tumervaskularisation sind im Besonderen der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF sowie das Interleukin-6 (IL-6) zu nennen, das einen der bedeutendsten Wachstumsfaktoren multipler Myelomzellen darstellt (Klein et al., 1990; Zhang et al., 1990; Klein und Bataille, 1992) und über einen parakrinen Rückkopplungsmechanismus ebenfalls an der Sekretion von VEGF beteiligt ist (Dankbar et al., 2000). Es ist zu vermuten, dass die Tumorzellen durch ähnliche wenn nicht gleiche Signalkaskaden, die zur Proliferation maturer Endothelzellen führen, die Proliferation endothelialer Progenitorzellen und ihre Differenzierung in reife Gefäßzellen beeinflusst. Ebenfalls ist nach erfolgreicher Rekrutierung ins Tumorgebiet die Sekretion tumorfördernder Zytokine und Wachstumsfaktoren von Seiten endothelialer Vorläuferzellen – gleich den bereits ins Tumorgebiet eingebundenen maturen Endothelzellen – anzunehmen. In wie weit und auf welche Weise endotheliale Progenitorzellen mit Myelomzellen interagieren, ist in weiterführenden präklinischen Studien zu klären. Auch hier ergibt sich erneut die Problematik, dass der Phänotyp endothelialer Progenitorzellen noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Ein weiterer Gesichtspunkt, der in der gewählten *in vitro* Versuchsanordnung nicht repräsentiert ist, ist das Zusammenspiel von endothelialen Progenitorzellen und weiteren – durch die Tumorzelle rekrutierten – Zellgruppen. Hier sind neben murenen Endothelzellen besonders hämatopoetische Progenitorzellen zu nennen. Ergün et al. vermuteten 2008 in diesem Zusammenhang eine enge reziproke Beziehung zwischen endothelialen und hämatopoetischen Progenitorzellen sowie sogenannten „cancer stem cells“ (CSC) als Teil eines einzigartigen Mikromilieus zu Gunsten der Tumervaskularisation und Metastasierung (Ergün et al., 2008). Mastzellen tragen durch die Sekretion von VEGF, MMP-9 sowie FGF ebenso wie Thrombozyten zur Tumorangio-genese bei (Ahn und Brown, 2009). Eine Interaktion endothelialer Progenitorzellen mit diesen und weiteren Zellgruppen, wie beispielsweise glatten Gefäßmuskelzellen oder Makrophagen, ist bisher zwar nicht erforscht, jedoch anzunehmen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass im Rahmen der Tumorangio-genese des Multiplen Myeloms ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Zellgruppen vermutet werden kann. Die Untersuchung der Wirkung Bortezomibs auf endotheliale Progenitorzellen als isolierte Zellpopulation gewährt dabei Einblick in einen Teilaspekt der antiangiogenetischen Wirkung des Proteasomeninhibitors auf die Tumorangio-genese des Multiplen Myeloms. In weiterführenden Grundlagenstudien scheint die *in vitro* Kombination endothelialer Progenitorzellen mit anderen Zellgruppen als sinnvoll, um der klinischen Realität möglichst nahe zu kommen. Dies zeigt weiterhin, dass in der präklinischen Tumor- und Therapieforschung auf Tierversuche nicht gänzlich verzichtet werden kann.

4.7 Ausblick

In der aktuellen Studienlage wird endothelialen Progenitorzellen eine immer größere Bedeutung im Rahmen der Tumorangio-genese solider Tumore wie auch hämatologischen Malignitäten wie dem Multiplen Myelom zugeschrieben. Die Entwicklung neuer onkologischer Therapiestrategien richtet sich demnach zunehmend speziell gegen Prozesse der Tumervaskularisation. Der

Proteasomeninhibitor Bortezomib wirkt als sogenanntes „Targeted Drug“ antiangiogenetisch auf das Multiple Myelom und wird bereits klinisch erfolgreich unter signifikanter Reduktion der Tumorausbreitung eingesetzt (Curran und McKeage, 2009).

Sowohl etablierte Therapieregime zur Behandlung des Myeloms als auch ihre Kombination mit beispielsweise Bortezomib sind in der aktuellen Studienlage relativ gut vertreten. Die antiangiogenetische Wirkung des Proteasomeninhibitors konnte zwar eindeutig gezeigt werden, *in vitro* Studien als Grundlage zum Verständnis seiner Wirkung – im Rahmen der Tumorangiogenese mit besonderem Fokus auf die Zellpopulation endothelialer Progenitorzellen – fehlen jedoch fast vollständig. Durch die gemeinsame Inkubation endothelialer Progenitorzellen mit Myelomzellen könnte die Interaktion zwischen Tumorzelle und Vorläuferzelle näher beleuchtet werden, um ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der Tumorangiogenese des Multiplen Myeloms zu erlangen. Von besonderem Interesse wäre hierbei die erneute Untersuchung des Proliferations- und Apoptoseverhaltens beider Zellgruppen unter Bortezomib-Inkubation sowie das Differenzierungsverhalten endothelialer Progenitorzellen unter Bortezomib-Inkubation. Vorab weiterführender Studien sollte mit hoher Forschungspriorität im Hinblick auf Schaffung einer gemeinsamen Forschungsgrundlage – und damit Studienvergleichbarkeit – die Bestimmung des Phänotyps endothelialer Progenitorzellen erfolgen. Erst danach können der Beitrag endothelialer Vorläuferzellen zur Tumorangiogenese des Multiplen Myeloms und die antiangiogenetischen Wirkmechanismen Bortezomibs in diesem Zusammenhang vollends verstanden werden.

5 Zusammenfassung

Der Klasse I-Proteasomeninhibitor Bortezomib wird derzeit als "Targeted Drug" erfolgreich im Rahmen der Zytostatikabehandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirksamkeit von Bortezomib auf endotheliale Progenitorzellen aus Stammzell-Leukapheresaten zur autologen Transplantation an Multiplem Myelom erkrankter Patienten zu untersuchen. Sie beinhaltet dabei die Fragestellung, ob *in vitro* eine antiproliferative, proapoptotische sowie differenzierungshemmende Wirkung des Proteasomeninhibitors auf endotheliale Progenitorzellen nachgewiesen werden kann. Als klinisch relevanter Hintergrund ist in diesem Zusammenhang der proangiogenetische Beitrag endothelialer Vorläuferzellen im Rahmen der Tumorangio-genese verschiedener Tumorentitäten wie auch dem Multiplen Myelom zu nennen. Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden keine Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit Bortezomibs auf endotheliale Vorläuferzellen zur Hemmung der Tumorangio-genese vorgelegt.

Um die antiproliferative, proapoptotische sowie differenzierungshemmende Wirkung Bortezomibs auf CD133 positive Zellen untersuchen zu können, wurden die Vorläuferzellen aus einem mononukleären Zellpool immunomagnetisch selektiert, nach durchflusszytometrischer Reinheitskontrolle kultiviert und anschließend mit aufsteigenden Bortezomib-Konzentrationen im klinisch-therapeutisch relevanten Bereich über einen Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Es folgten die Zelluntersuchung mit dem BrdU-Proliferations-ELISA und die durchflusszytometrische Analyse mit dem Annexin V-FITC Apoptose-Assay. Zusätzlich wurden die Zellen nach Differenzierungskultur immunzytologisch auf die Expression endothelialer Oberflächenmarker untersucht sowie das Zell-Differenzierungsverhalten in reife Endothelzellen unter Bortezomib-Einfluss analysiert. Nach immunomagnetischer Selektion wurde eine fast hundertprozentige Zellreinheit erreicht, wobei der Anteil CD133 positiver Zellen nach 21 tägiger Expansionskultur auf unerwartet niedrige Werte fiel. Durch die durchgeführten *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass bereits niedrige Bortezomib-

Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation CD133 aufgereinigter Zellen für beide Inkubationszeiträume führten, wobei die Verdopplung des Inkubationszeitraumes erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen eine signifikante Wirkverstärkung erzielte. Parallel dazu nahm das Zellüberleben nach 24 sowie 48 stündigem Behandlungszeitraum bei niedrigen Zytostatikakonzentrationen signifikant ab, wobei die Verdopplung des Inkubationszeitraumes ebenfalls erst ab höherer Behandlungskonzentration einen signifikanten Effekt zeigte. Früh- und Spätapoptose wurden für beide Behandlungszeiträume durch vergleichsweise niedrige Konzentrationen signifikant beeinflusst, die Verdopplung des Behandlungszeitraumes führte auch hier erst ab höherer Konzentration zu einer Wirkverstärkung. Die Differenzierung endothelialer Progenitorzellen in mature Endothelzellen unter Expression typischer Endothelzellantigene konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Endothelzelldifferenzierung unter VEGF-Einfluss ebenfalls bereits durch niedrige Zytostatikakonzentrationen signifikant reduziert.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Bortezomib in Konzentrationsbereichen unterhalb der therapeutisch erreichten Serumspiegel eine antiproliferative, proapoptotische und differenzierungshemmende Wirkung auf endotheliale Progenitorzellen hat, wobei ungeklärt bleibt, welche Zellpopulationen zusätzlich im behandelten Zellpool enthalten waren und wie ihr Einfluss auf die Tumorangio-genese im Zusammenspiel mit endothelialen Vorläuferzellen zu werten ist. Die Stammzellforschung steht im Moment vor der anspruchsvollen Aufgabe, den genauen Phänotyp endothelialer Progenitorzellen zu identifizieren. Erst nach eindeutiger Charakterisierung dieser Zellpopulation wird es möglich sein, die Rolle endothelialer Vorläuferzellen im Rahmen der Tumorangio-genese und die inhibierende Wirkung Bortezomibs auf die Tumovaskularisation vollends zu verstehen.

Literaturverzeichnis

1. **Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P, Hauser K, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Peters JM, Friess H, Folkman J, Huber PE:** Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *PNAS* 104:12890-12895 (2007).
2. **Adams J, Palombella VJ, Elliott PJ:** Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs* 18:109-121 (2000).
3. **Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ:** Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622 (1999).
4. **Adams J:** Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. *Curr Opin Chem Biol* 6:493-500 (2002a)
5. **Adams J:** The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer. *Breast Dis* 15:61-70 (2002b).
6. **Ahn GO, Brown JM:** Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis* 12:159-164 (2009).
7. **Anargyrou K, Dimopoulos MA, Sezer O, Terpos E:** Novel anti-myeloma agents and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* 49:667-689 (2008).
8. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattenman G, Isner JM:** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967 (1997).
9. **Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA:** Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res* 63:5866-5873 (2003).
10. **Beg AA, Baldwin AS Jr.:** The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 7:2064-2070 (1993).

11. **Bergers G, Benjamin LE:** Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410 (2003).
12. **Bhatti SS, Kumar L, Dinda AK, Dawar R:** Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: use of light microscopy as well as computerized image analyzer in the assessment of microvessel density and total vascular area in multiple myeloma and its correlation with various clinical, histological, and laboratory parameters. *Am J Hematol* 81:649-656 (2006).
13. **Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V:** Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231:474-488 (2004).
14. **Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, Fiedler W:** Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res* 300:65-71 (2004).
15. **Carmeliet P:** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395 (2000).
16. **Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram D:** Human CD34+ AC133+ VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 35:1109-1118 (2007).
17. **Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Olivia C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J:** Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:665-675 (2006).
18. **Coultas L, Chawengsakosphak K, Rossant J:** Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-945 (2005).
19. **Curran MP, McKeage K:** Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma. *Drugs* 69:859-888 (2009).
20. **Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J:** Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95:2630-2636 (2000).

21. **De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L:** Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9:789-795 (2003).
22. **Dome B, Dobos J, Tovari J, Paku S, Kovacs G, Ostros G, Timar J:** Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A* 73:186-193 (2008).
23. **Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J:** Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341-7347 (2006).
24. **Du, R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G:** HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13:206-220 (2008).
25. **Eguchi M, Masuda H, Asahara T:** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 11:18-25 (2007).
26. **EMA:** Velcade(bortezomib).
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000539/human_med_001130.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
Stand 13.11.2011 (2008)
27. **Ergün S, Hohn HP, Kilic N, Singer BB, Tilki D:** Endothelial and hematopoietic progenitor cells (EPCs and HPCs): hand in hand fate determining partners for cancer cells. *Stem Cell Rev* 4:169-177 (2008).
28. **FDA** Velcade (bortezomib) is approved for initial treatment of patients with multiple myeloma.
(<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm094633.htm>)
Stand: 13.11.2011 (2010)
29. **Ferrara N:** Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77:527-543 (1999).

30. **Freund D, Oswald J, Feldmann S, Ehninger G, Corbeil D, Bornhäuser M:** Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34⁺ and CD133⁺ blood stem cells derived from a single donor. *Cell Prolif* 39:325-332 (2006).
31. **Fürstenberger G, von Moos R, Lucas R, Thürlimann B, Senn HJ, Hamacher J, Boneberg EM:** Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer* 94:524-531 (2006).
32. **Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V:** Endothelial progenitor cells control the angiogenetic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319:195-198 (2008).
33. **Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W:** In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112 (2000).
34. **Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Göttgens B, Izon DJ, Begeley CG:** Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104:1769-1777 (2004).
35. **Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC:** Novel therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol* 120:10-17 (2003).
36. **Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC:** The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61:3071-3076 (2001).
37. **Ho JW, Pang RW, Lau C Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT:** Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 44:836-843 (2006).
38. **Hristov M, Ertl W, Weber PC:** Endothelial Progenitor Cells Mobilisation, Differentiation, and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1185-1189 (2003).

39. **Igreja C, Courinha M, Cachaco AS, Pereira T, Cabecadas J, da Silva MG, Dias S:** Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients. *Haematologica* 92:469-477 (2007).
40. **Karamysheva AF:** Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73:751-762 (2008).
41. **Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663 (2000).
42. **Kässmeyer S, Plendl J, Custodis P, Bahramsoltani M:** New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells. *Anat Histol Embryol* 38:1-11 (2009).
43. **Kelley TW, Alkan S, Srkalovic G, Hsi ED:** Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res* 28:845-850 (2004).
44. **Klein B, Bataille R:** Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 6:273-284 (1992).
45. **Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Portier M, Lu ZY, Wijdenes J, Brochier J, Bataille R:** Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* 1:193-201 (1990).
46. **LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neubergh D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC:** Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62:4996-5000 (2002).
47. **Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A:** Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 24:772-780 (2006).
48. **Lin EH, Hassan M, Li Y, Zhao H, Nooka A, Sorenson E, Xie K, Champlin R, Wu X, Li D:** Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence. *Cancer* 110:534-542 (2007).

49. **Loges S, Fehse B, Brockmann MA, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl M, Schuch G, Ergün S, Fischer U, Zander AR, Hossfeld DK, Fiedler W, Gehling UM:** Identification of the Adult Human Hemangioblast. *Stem Cells Dev* 13:229-242 (2004).
50. **Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S:** Impaired recruitment of bone-marrow–derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194-1201 (2001).
51. **Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, Wu Z, Borad MJ, Frantzen M, Roussos E, Neeser J, Mikail A, Adams J, Sjak-Shie N, Vescio RA, Berenson JR:** The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents.“ *Clin Cancer Res* 9:1136-1144 (2003).
52. **Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F:** Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97:3658-3661 (2001).
53. **Mani A, Gelmann EP:** The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer. *J Clin Oncol* 23:4776-4789 (2005).
54. **Mazitschek R, Baumhof P, Giannis A:** Peptidomimetics and angiogenesis. *Mini Rev Med Chem* 2:491-506 (2002).
55. **Melero-Martin JM, Dudley AC:** Concise review: Vascular stem cells and tumor angiogenesis. *Stem Cells* 29:163-168 (2011).
56. **Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW:** A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013-5021 (1997).
57. **Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S, Hideshima T, Chauhan D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC:** The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 21:1007-1034 (2007).

58. **Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC:** Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell* 6:439-444 (2004).
59. **Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC:** The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 101:2377-2380 (2003).
60. **Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D:** The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31:137-155 (2006).
61. **Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, Casamassimi A, Casini C, Al-Omran M, Ignarro LJ:** Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update. *Atherosclerosis* 215:9-22 (2011).
62. **Nawrocki ST, Sweeney-Gotsch B, Takamori R, McConkey DJ:** The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3:59-70 (2004).
63. **Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V:** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 15:1546-1558 (2007).
64. **O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J:** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285 (1997).
65. **O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J:** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328 (1994).
66. **Papetti M, Herman IM:** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C 947-970 (2002).
67. **Paramore A, Frantz S:** Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2:611-612 (2003).

68. **Pasquier E, Dias S:** Endothelial progenitor cells: hope beyond controversy. *Curr Cancer Drug Targets* 10:914-921 (2010).
69. **Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhz Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S:** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958 (2000).
70. **Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA:** Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Bio Chem* 269:7709-7718 (1994).
71. **Podar K, Shringarpure R, Tai YT, Simoncini M, Sattler M, Ishitsuka K, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC:** Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res* 64:7500-7506 (2004).
72. **Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S:** Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82:169-179 (1985).
73. **Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F, Baldessari V, Freschi M, Baldini L, Goldaniga M, Neri A, Carboni N, Bertolini F, Viale G:** Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 118:817-820 (2002).
74. **Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P:** Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6620-6625 (2008).
75. **Quirinci N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL:** Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*.115:186-194 (2001).
76. **Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Russell**

- SJ, Greipp PR:** Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 8:2210-2216 (2002).
77. **Ramos AL, Darabi R, Akbarloo N, Borges L, Catanese J, Dineen SP, Brekken RA, Perlingeiro RC:** Clonal analysis reveals a common progenitor for endothelial, myeloid, and lymphoid precursors in umbilical cord blood. *Circ Res* 107:1460-1469 (2010).
78. **Rana C, Sharma S, Agrawal V, Singh U:** Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma and its correlation with clinicopathological factors. *Ann Hematol* 89:789-794 (2010).
79. **Rhode E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D:** Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 24:357-367 (2006).
80. **Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D, Tabilio A, DiRenzo N, Guarini A, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A:** Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 14:1678-1685 (2008).
81. **Ribatti D:** The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res* 31:439-444 (2007).
82. **Ribatti D:** The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 8:294-300 (2004).
83. **Risau W:** Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* 386:671-674 (1997).
84. **Roccaro AM, Hideshima T, Raja N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC:** Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direkt and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 66:184-191 (2006).
85. **Sezer O, Niemöller K, Eucker J, Jakob C, Kaufmann O, Zavrski I, Dietel M, Possinger K:** Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 79:574-577 (2000).
86. **Sezer O, Niemöller K, Kaufmann O, Eucker J, Jakob C, Zavrski I, Possinger K:** Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients

- achieving a remission after chemotherapy. *Eur J Haematol* 66:238-244 (2001).
87. **Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS:** Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for anti-angiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 14:263-273 (2008).
88. **Soligo D, Servida F, Delia D, Fontanella E, Lamorte G, Caneva L, Fumiatti R, Lambertenghi Delilliers G:** The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI. *Br J Haematol* 113:126-135 (2001).
89. **Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, van Waes C:** Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1419-1428 (2001).
90. **Tamura D, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Matsumoto K, Kudo K, Aomatsu K Fujita Y, Watanabe T, Saijo N, Kotani Y, Nishimura Y, Nishio K:** Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci* 101:1403-1408 (2010).
91. **Tang DG, Conti CJ:** Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost* 30:109-117 (2004).
92. **Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J:** The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5:2638-2645 (1999).
93. **Tilki D, Hohn HP, Ergün B, Rafii S, Ergün S:** Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med* 15:501-509 (2009).
94. **Timmermans F, van Hauwermeiren F, de Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, de Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B:** Endothelial

- outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1572-1579 (2007).
95. **Urbich C, Dimmeler S:** Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95:343-353 (2004).
 96. **Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F:** Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87:503-508 (1994).
 97. **Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK:** Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* 197:1755-1765 (2003).
 98. **Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, Smolewski P:** Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 75:492-497 (2005).
 99. **Willetts CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK:** Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10:145-147 (2004).
 100. **Williams S, Pettaway C, Song R, Papandreou C, Logothetis C, McConkey DJ:** Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2:835-843 (2003).
 101. **Wu X, Lensch MW, Wylie-Sears J, Daley GQ, Bischoff J:** Hemogenic endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 25:2770-2776 (2007).
 102. **Yoder MC, Ingram DA:** Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol* 16:269-273 (2009a).
 103. **Yoder MC, Ingram DA:** The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth; Is there common ground

- for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? *Biochim Biophys Acta* 1796:50-54 (2009b).
104. **Yoder MC:** Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 7:49-52 (2009).
 105. **Zandi E, Karin M:** Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol* 19:4547-4551 (1999).
 106. **Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, Dai K, Berenson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Ozcelik T, Batuman OA:** Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 105:3286-3294 (2005).
 107. **Zhang XG, Bataille R, Jourdam M, Saeland S, Banchereau J, Mannoni P, Klein B:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood*: 76:2599-2605 (1990).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorangiogenese und „angiogenetic switch“.....	8
Abbildung 2: Mobilisation endothelialer Progenitorzellen (EPCs) aus dem Knochenmark.....	10
Abbildung 3: Strukturformel Bortezomib / PS-341	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweges	15
Abbildung 6: Prinzip des Annexin V-FITC Apoptose Assay.....	35
Abbildung 7: Darstellung der Reinheitsmessung CD133 positiver Zellen direkt nach der Aufreinigung (d0) in der FACS-Analyse in Form eines Dotplots.....	42
Abbildung 8: Darstellung der Reinheitsmessung CD133 positiver Zellen nach Isolation (d0) in der FACS-Analyse in Form eines 4Felder-Dotplots mit zugehöriger Isotypenkontrolle.....	43
Abbildung 9: Expression der Oberflächenmarker CD133 und CD34 unter Expansionskultur.....	44
Abbildung 10: <i>In vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.....	46
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse nach <i>in vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Mutliplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.	48
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse nach <i>in vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden	50
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse nach <i>in vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen über einen Behandlungszeitraum von 48 Stunden.	51
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse nach <i>in vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Mutliplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen. Darstellung der Frühapoptose.....	53

Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse nach <i>in vitro</i> Behandlung CD133 aufgereinigter Zellen von Patienten mit Mutliplem Myelom mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen.	54
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur <i>in vitro</i> , Aufnahmen in 20facher Vergrößerung	56
Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Analyse der Expression endothelspezifischer Oberflächenmarker CD133 aufgereinigter Zellen nach Differenzierungskultur <i>in vitro</i>	57
Abbildung 19: Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger Differenzierungskultur <i>in vitro</i> unter steigender Bortezomib-Konzentration	58
Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalyse des Differenzierungsverhaltens CD133 aufgereinigter Zellen nach 14 tägiger <i>in vitro</i> Bortezomib-Inkubation mit aufsteigenden Zytostatika-Konzentrationen.	59
Abbildung 21: Bortezomib inhibiert den Transkriptasefaktor NF- κ B.....	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Antikörper zur Reinheitskontrolle CD133 positiver Zellen nach Isolation im FACS-Zytometer.....	30
Tab. 2:	Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten für die Immunfluoreszenz-Analyse CD133 aufgereinigter Zellen nach Differenzierungskultur.....	39
Tab. 3:	Verlauf der Oberflächenexprimierung der Stammzellmarker CD133 und CD34 direkt nach Isolation und während 21 tägiger Expansionskultur in Prozent	43

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Thomas Wagner** für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation und die Möglichkeit zur experimentellen Arbeit in den Laboren der Abteilung bedanken. Seine stets engagierte und äußerst professionelle Betreuung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **Dr. rer. nat. Stephanie Stölting**, die mit außergewöhnlichem Engagement die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Sie stand mir jederzeit mit außerordentlicher Geduld, sowohl professionellem als auch persönlichem Rat zur Seite und war mir mit ihrer allzeit freundlichen und herzlichen Art eine große Unterstützung. Besonders durch die reibungslose Zusammenarbeit während der Korrekturphase in Dänemark und ihre zahlreichen Ideen und Vorschläge hat sie mich stets motiviert und ganz wesentlich zu der erfolgreichen Beendigung dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau **Claudia Kauderer** für die professionelle Einweisung in die Arbeitsmethoden der Zellkultur sowie die stets freundliche und tatkräftige Unterstützung während des gesamten experimentellen Teils dieser Arbeit. Auch Frau **Heike Albrecht** stand mir stets tatkräftig zur Seite.

Ferner möchte ich mich aufrichtig bei dem gesamten **Laborteam der Med I** sowie **Med II** sowie der **Abteilung für Immunologie** für größte Hilfsbereitschaft und eine stets freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern **Alexandra und Wolfgang Blöcker**, die mich immer liebevoll unterstützt und motiviert und diese Arbeit mit apothekischer Genauigkeit Korrektur gelesen haben. **Marte Bliksøen** und **Kerstin Knauer** haben mir immer Rückhalt gegeben und zählen zu den wichtigsten Menschen in meinem Leben. Meinem Freund **Ulf Tödt** danke ich in Liebe für seine uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung, endlose Tage auf dem Wasser und sandige Sonnenscheinkorrekturen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Svea Blöcker
Geburtsdatum/ -ort: 28.10.1981 in Lübeck
Familienstand: Ledig
Anschrift: Lüdenstorfer Feld 8
21614 Buxtehude



Schule und Studium:

1995-1999: Gymnasium Süd, Buxtehude
1999-2001: Halepaghen Gymnasium, Buxtehude
2001: Abitur, Note: sehr gut (1,3)
2001-2008: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2005-2008: Experimenteller Teil der Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik I des UK-SH, Campus Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Wagner
2007-2008: Praktisches Jahr am UK-SH, Campus Lübeck und Landspítali Reykjavík, Island
2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut (2,0)

Weiterführende Ausbildung:

2001-2002: Ohr- und Körperakupunktur, Bremer Ärztegesellschaft für Akupunktur und Schmerztherapie, Bremen
2003-2006: Ausbildung zur Therapeutin für Paar- und Familientherapie am Institut für Systemisch- Integrative Paar- und Familientherapie Hamburg (Europäisches Institut des Systemic Family Institute of California, Prof. M. Kirschenbaum)

Beruflicher Werdegang:

- 2009-2010: Assistenzarztstelle der Gefäßchirurgie am Universitätskrankenhaus Kopenhagen, Rigshospitalet/Gentofte, Dänemark (12 Monate)
- 2010: Assistenzarztstelle der Ophthalmologie am Universitätskrankenhaus Kopenhagen Glostrup, Dänemark (5 Monate)
- 2010-2011: Assistenzarztstelle der Ophthalmologie am Universitätskrankenhaus Odense, Dänemark (12 Monate)

Sprachkenntnisse:

- Deutsch: Muttersprache
- Englisch: Fließend mündlich und schriftlich
- Dänisch: Fließend mündlich und schriftlich
- Französisch: Gute Sprachkenntnisse
- Norwegisch: Gute Sprachkenntnisse

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen oder sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
