

Julia Dittrich  
Dr. med.

## **Über die Beteiligung humaner CD133<sup>+</sup> Stammzellen an der Tumorangiogenese von Plattenepithel-Karzinom-Xenografts in Nacktmäusen mittels Molekularer Bildgebung**

Geboren am 17.01.1979 in Darmstadt  
Staatsexamen am 13.06.2006 an der Universitätsklinik Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Wolfhard Semmler

Ziel meiner Arbeit war es, die Anreicherung und Differenzierung von CD133<sup>+</sup> humanen Stammzellen in hoch-(A-5RT3) und niedrig-(A-5g)-aggressiven Plattenepithel-Karzinom-Xenografts und deren mögliche Beteiligung an der Tumorangiogenese mittels nicht invasiver Bildgebung und histologischer Analyse zu untersuchen.

Hierfür wurden CD133 positive humane Stammzellen des peripheren Blutes gewonnen und mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO), <sup>111</sup>In-Oxinat und Quantum-Dots markiert. Es erfolgte die Injektion der vitalen Stammzellen in die Nacktmäuse. Um eine aktive Migration zu unterbinden, injizierte ich einer Kontrollgruppe bestrahlte Stammzellen. Zur Verhinderung der rezeptorvermittelten Migration wurden in einer anderen Kontrollgruppe die CD133<sup>+</sup> Stammzellen vor Injektion mit Glutaraldehyd fixiert. Eine weitere Gruppe an Versuchstieren erhielt keinerlei Zellen injiziert.

Die markierten Zellen wurden intravenös über die Schwanzvene der Nacktmäuse appliziert und für 4 Tage mittels MRT nicht invasiv verfolgt. Die Akkumulation der Zellen in den Tumoren und in anderen Organen, wurde anhand der Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Das Tumorgewebe wurde histologisch analysiert, die Zellen mittels Doppelimmunfluoreszenz lokalisiert und mögliche Differenzierungen untersucht.

Um Aussagen über den Einfluss der Zellen auf das Tumorwachstum geben zu können, wurde dieses in einer Versuchstiergruppe nach Injektion vitaler CD133<sup>+</sup> Stammzellen über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet und mit dem Tumorwachstum einer Versuchstiergruppe ohne Stammzellinjektion verglichen.

Auf Grund von Bildartefakten und Störfaktoren ließen sich die Ergebnisse der MRT-Messung nur eingeschränkt beurteilen. Zwar kam es nach Injektion der Zellen zu einer deutlichen Verkürzung der T2-Zeiten in den Tumoren, jedoch erschwerten Einblutungen und Nekrosen die Auswertung, so dass die Ergebnisse nur im Zusammenhang mit der Organverteilung und Differenzierung der Zellen zu bewerten waren.

In beiden Tumorentitäten konnte eine vermehrte Akkumulation der vitalen Stammzellen gefunden werden (gemessen anhand der Radioaktivität). In den benignen A-5g Tumoren zeigte sich im Vergleich zu den malignen Tumoren sogar eine 2,5fach höhere Anhäufung der vitalen Stammzellen. Die Verteilung der Stammzellen in den Organen und Tumoren unterschied sich in der Kontrollgruppe der bestrahlten Zellen kaum zu der Gruppe der vitalen Zellen.

In der Kontrollgruppe, der mit Glutaraldehyd fixierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen, hingegen zeigte sich eine signifikant niedrigere Akkumulation der Stammzellen in allen Organen und beiden Tumorentitäten.

Die Differenzierung der Zellen in den Tumoren wurde anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

In den malignen A-5RT3 Tumoren zeigten noch 20 ± 9% der Stammzellen eine CD133-Expression, in den benignen A-5g Tumoren wurden jedoch keine CD133 positiven

Stammzellen gefunden. Über 20% der Zellen zeigten sich in beiden Tumormodellen positiv für  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin, als Marker glatter Muskelzellen.  $17\% \pm 17\%$  der A-5RT3 Tumoren bzw.  $30\% \pm 14\%$  der A-5g Tumoren zeigten eine Co-Lokalisation für NG-2.

Eine CD31-Expression konnte in  $12\% \pm 10\%$  der Zellen der malignen bzw. in  $8\% \pm 2\%$  der benignen Tumoren gezeigt werden. Es konnte keine Expression für PDGF sowie humanes Lysozym als Makrophagenmarker nachgewiesen werden. Neben der Differenzierung der humanen Stammzellen zu glatten Muskelzellen und Perizyten, die für die Gefäßstabilität eine entscheidende Rolle spielen, differenzierten sich die humanen Stammzellen also in endotheliale Zellen.

Ein signifikant positiver Einfluss auf das Wachstum der malignen Tumoren konnte an Tag 7 nachgewiesen werden.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der verschiedenen Kontrollgruppen, so scheint die Migration der humanen Stammzellen in die Tumoren rezeptorabhängig zu verlaufen und keiner aktiven Migration zu unterliegen. Dies trifft vor allem für die benignen (A-5g)-Tumore zu. Die Verteilung und Differenzierung der Zellen der beiden Tumorentitäten könnte mit deren unterschiedlichem Angiogeneseverhalten erklärt werden. Die histologische Analyse der Tumoren zeigte vor allem in den malignen Tumoren, neben der CD133-Expression, eine Differenzierung der humanen Stammzellen in Endothelzellen. Da die Angiogenese maligner Tumoren als Grundvoraussetzung hämatogener Metastasierung, vor allem aus Migration und Proliferation, von Endothelzellen zur Neubildung der Tumorgefäße besteht, lassen unsere Ergebnisse die Annahme einer signifikanten Beteiligung der Stammzellen an der Gefäßbildung maligner Tumore zu. Im Fall einer vorübergehenden reversiblen Angiogenese, wie sie in benignen Tumorzellen vorliegt, scheint diese zu einer stärkeren Migration humaner CD133<sup>+</sup> Stammzellen zu führen und deren Differenzierung zu glatten Muskelzellen zu fördern, die ein wesentlicher Bestandteil reifer Gefäße sind.

Diese Studie zeigte somit die Beteiligung humaner CD133<sup>+</sup> Stammzellen an der Angiogenese verschiedener Tumorentitäten durch die Differenzierung in endotheliale Zellen und in die für die Gefäßstabilität notwendigen Perizyten. Weitere Studien zum Differenzierungsverhalten der CD133<sup>+</sup> Stammzellen sind jedoch erforderlich.