

Britta Engelhardt  
Dr. med.

## **Immunhistologische Untersuchungen von Ratten Morris Hepatomen nach Transfer von Anti-Angiogenesegenen**

Geboren am 05.03.1980 in Einbeck  
Staatsexamen am 29.05.05 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. sc. hum. Ralf Kinscherf

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Morris Hepatomen aus ACI Ratten bzw. RNU Nacktratten die Effekte der Überexpression der antiangiogenetischen Gene, wie humanes Angiostatin (h-ANG), humanes Troponin I (h-TnI) bzw. löslicher Rezeptor für VEGF (sFlt), auf Gefäß- ( $\alpha$ -Aktin, CD31), Proliferations- (PCNA), Entzündungsparameter (COX-2, MIF), tumorassoziierte Makrophagen (CD11b), Apoptose (TUNEL) bzw. auf die Nekrosefläche (immun)histologisch mittels computerunterstützter Morphometrie im Vergleich zu Wildtyptumoren untersucht. Die Herstellung der stabil transfizierten Zelllinien, die Überprüfung der Überexpression des jeweiligen Gens, Tumorwachstums- und Perfusionsmessungen mittels Positronenemissionstomographie (PET) wurden von Frau Kerstin Schmidt durchgeführt und sind Gegenstand ihrer Inauguraldissertation.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit soll eine Grundlage geschaffen werden, die Rolle und Mechanismen dieser antiangiogenetischen Gene in den komplexen Prozessen der Pathogenese von Tumoren und deren Einfluss auf die o.g. Parameter sowie auf Tumorprogression/ -regression besser zu verstehen.

Wir konnten erstmals zeigen, dass die Wachstumshemmung von Morris Hepatomen durch Überexpression antiangiogenetischer Gene unabhängig von der Vaskularisierung ist. Wir fanden bei den h-TnI-Tumoren eine verminderte, bei h-ANG-Tumoren dagegen sogar eine erhöhte Mikrogefäßdichte (CD31), obwohl das Tumorwachstum in beiden Gruppen signifikant gehemmt war. Die Makrogefäßdichte ( $\alpha$ -Aktin) war hingegen bei gentechnisch modifizierten und Wildtyptumoren vergleichbar. Die Nekrosefläche war bei h-ANG-Tumoren, sowohl bei ACI Ratten als auch bei RNU Nacktratten signifikant vermindert. Im Vergleich zum Wildtyp führte der Transfer des h-ANG- bzw. h-TnI-Gens bei Morris Hepatomen der ACI Ratten zu einer signifikanten Hemmung der Proliferationsrate, während die Apoptoserate bei h-ANG bzw. sFlt überexprimierenden Morris Hepatomen signifikant erhöht war. Bei Tumoren der RNU Nacktratten war die Proliferations- bzw. Apoptoserate ca. 3-4 fach höher als bei ACI Ratten. Sowohl bei ACI als auch bei RNU Ratten führte die

Überexpression von h-ANG, h-TnI bzw. sFlt zu einer Verminderung COX-2 positiver Zellen in den Tumoren. Die Anzahl MIF positiver Zellen war bei h-TnI überexprimierenden Tumoren sowohl bei ACI, als auch bei RNU Ratten signifikant erhöht. Des Weiteren fanden wir in h-ANG- und h-TnI-Tumoren eine verminderte Anzahl an CD11b positiven Makrophagen, die als Hauptquelle oxidativen Stresses gelten und am Tumorwachstum maßgeblich mitbeteiligt sein sollen.

Unsere Befunde zeigen erstmals, dass nach Transfer von Anti-Angiogeneseenen bei Morris Hepatomen die Hemmung des Tumorwachstums weniger durch die Vaskularisierung, sondern vielmehr durch Hemmung der Inflammation und Induktion proapoptotischer sowie antiproliferativer Signalkaskaden verursacht wird.

Da die Tumore (insbesondere die gentechnisch modifizierten) aller Gruppen der ACI Ratten weniger COX-2 bzw. PCNA und TUNEL positive Zellen aufwiesen, als die RNU Nacktratten, ist anzunehmen, dass T-Zellen Entzündungs-, Proliferations- bzw. Apoptoseprozesse in Tumoren hemmen und damit das Tumorwachstum beeinflussen können. Obwohl die untersuchten antiangiogenetischen Gene in Morris Hepatomen zu signifikanten Veränderungen von Gefäß-, Proliferations-, Apoptose- und Entzündungsparametern sowie zu Veränderungen der Nekrosefläche führten, scheinen diese Prozesse insgesamt wesentlich komplexer reguliert zu werden, als durch eines dieser Gene. Deshalb sollen Untersuchungen der o.g. Tumore mittels Gene Chip Arrays (Affimetrix 8800 Gene) Schlüsselgene (z.B. Apoptose-relevante) identifizieren, die dann anhand retroviraler Vektoren in Morris Hepatome transferiert werden könnten, um weitere *in vivo/ in vitro* Untersuchungen durchzuführen und deren Effizienz im Vergleich zu den bereits untersuchten Anti-Angiogeneseenen beim Tumorwachstum zu analysieren.