

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II (Hämatologie und Onkologie)

Hubertus Wald universitäres Tumorzentrum

Universitäres Cancer Center Hamburg

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

**Detektion und Analyse zirkulierender Endothelzellen bei Patienten mit  
metastasiertem Nierenzellkarzinom**

Dissertation

zum Erlangen des Doktorgrades der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Jakob Jäger**

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2011

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 15.02.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter/in: PD Dr. G. Schuch

Prüfungsausschuss, 3.Gutachter/in: PD Dr. N. Hansen-Algenstaedt

## Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung .....	1
2	Einleitung .....	2
2.1	Blutgefäßneubildung .....	2
2.1.1	Vaskulogenese .....	2
2.1.2	Angiogenese .....	3
2.2	Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF .....	3
2.3	Zirkulierende Endothelzellen .....	4
2.4	P1H12 .....	7
2.5	Nierenzellkarzinom .....	7
2.6	Metastasierung .....	8
2.7	Studie SU011248 (Sunitinib) .....	10
2.7.1	Indikation .....	10
2.7.2	Rationale .....	10
2.7.3	Tyrosinkinase .....	10
2.7.4	Pharmakologie .....	10
2.7.5	Zielsetzung .....	11
2.7.6	Studiendesign .....	11
2.7.7	Zielgrößen .....	12
2.7.8	Studientherapie .....	12
3	Material und Methoden .....	13
3.1	Material .....	13
3.1.1	Chemikalien .....	13
3.1.2	Laborgeräte .....	14
3.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	15
3.1.4	Lösungen und Puffer .....	16
3.2	Methoden .....	17
3.2.1	Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut oder Buffy Coats .....	17
3.2.2	Positive Kontrollzellen .....	18
3.2.3	Patientenproben .....	18
3.2.4	Immunhistochemische Färbung zirkulierender Endothelzellen .....	19
3.2.4.1	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung- APAAP-Färbung .....	19
3.2.4.1.1	Prinzip des immunhistochemischen APAAP-Nachweises .....	19

3.2.4.1.2	Färbung nach der APAAP-Methode.....	20
3.2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung zirkulierender Endothelzellen .....	22
3.2.4.2.1	Färbeprotokoll für die Antikörper P1H12 (CD146), VE-Cadherin (CD144), CD106 und CD62-E (E-Selectin) .....	22
3.2.4.2.2	KI67-Färbung .....	23
3.2.4.2.3	Caspase-3-Färbung .....	24
3.2.4.3	Doppelfärbung .....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	HUVECs - Einzelfärbung.....	26
4.1.1	P1H12 (CD146).....	27
4.1.2	VE-Cadherin .....	28
4.1.3	KI67 .....	30
4.1.4	CD106.....	31
4.1.5	CD62-E.....	32
4.1.6	Caspase-3.....	33
4.2	HUVECs - Doppelfärbung .....	34
4.3	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung .....	39
4.3.1	Validierung der Detektion von zirkulierenden Endothelzellen .....	39
4.3.2	Detektion von zirkulierenden Endothelzellen bei Tumorpatienten mit soliden Tumoren.....	40
4.3.3	Detektion von zirkulierenden Endothelzellen bei Sunitinib (SU011248)-therapierten Studienpatienten .....	41
4.4	Analyse der Endothelzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.	41
5	Diskussion .....	43
6	Fazit .....	52
7	Anhang .....	54
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	54
7.2	Tabellenverzeichnis .....	54
7.3	Literaturverzeichnis .....	56
	Danksagung .....	62
	Curriculum Vitae .....	63
	Eidesstattliche Versicherung .....	64

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Nierenzellkarzinom macht cirka drei Prozent aller Karzinome weltweit aus (Ferlay *et al.*, 2010). Durch weit verbreitete Nutzung verbesserter bildgebender Verfahren werden sie immer früher in ihrer Entwicklung entdeckt. Dies geschieht oftmals zufällig bei einer abdominalen Ultraschalluntersuchung oder während einer Computertomographie zur Abklärung unspezifischer Symptome (Patard *et al.*, 2002).

Trotz der häufigeren Früherkennung kommt es bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten im Laufe der Erkrankung zu einer Fernmetastasierung. Falls die Metastasen nicht chirurgisch entfernt werden können, muss zur Behandlung der Patienten eine systemische Therapie eingesetzt werden. In den letzten Jahren hat sich eine antiangiogenetische Therapie durchgesetzt, da das Nierenzellkarzinom in hohem Maße vaskularisiert ist (Wang *et al.*, 2006). Um die Behandlungseffektivität einer Therapie überprüfen zu können, wäre bei Patienten mit (metastasiertem) Nierenzellkarzinom ein Biomarker zum Monitoring sinnvoll. Zur Zeit nutzen jedoch weder die European Association of Urology noch die American Urological Association ein integriertes System molekularer Marker zur Abklärung des Nierenzellkarzinoms (Ljungberg *et al.*, 2007).

Bei der Suche nach einem geeigneten Marker liegt ein Schwerpunkt im Bereich der Angiogenese des Nierenzellkarzinoms. In den letzten Jahren sind dabei insbesondere zirkulierende Endothelzellen (CECs) in den Fokus für einen solchen Surrogatmarker gekommen (Beerepoot *et al.*, 2004).

Das Ziel der Arbeit bestand darin:

- 1) Die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen im Verlauf der Therapie mit Sunitinib zu quantifizieren. Dabei sollte untersucht werden, ob es durch die antiangiogenetische Therapie zu einer Zunahme oder Abnahme der CECs käme.
- 2) Zu untersuchen, ob das Ansprechen auf die Therapie sich aus einer Änderung in der Anzahl der CECs vorhersehen lässt.
- 3) Den Funktionszustand der CECs zu analysieren. Dabei sollte vor allem zwischen proliferierenden und apoptotischen Endothelzellen unterschieden werden.

Zu diesem Zwecke wurden im Rahmen der klinischen Studie SU011248 mit Sunitinib periphere Blutproben von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom gesammelt.

Die erste am Tag 1 der Therapie vor der ersten Medikamentengabe und die zweite am Ende des Therapiezyklus (Tag 28).

## 2 Einleitung

### 2.1 Blutgefäßneubildung

Blutgefäße sind Transport-, Austausch- und Kapazitätswege, die nervös, autonom und hormonal reguliert werden können. Sie erfüllen eine Vielzahl von lebenswichtigen Funktionen. Sie transportieren u.a. Blutgase, Nährstoffe, Wasser, Mineralien, Hormone, Stoffwechselprodukt und Zellen des Abwehrsystems. Mit ihrer Austauschfunktion versorgen sie das Gewebe mit diesen lebensnotwendigen Substanzen.

Blutgefäße besitzen einen charakteristischen Wandbau aus Tunica intima (kurz: Intima), Tunica media (kurz: Media) und Tunica externa (kurz: Adventitia), der durch das umliegende Gewebe und die funktionelle Beanspruchung geprägt wird (Semenza, 2007).

Die Intima ist die innerste Gefäßhaut. Die Grenze zum Blutstrom wird durch eine geschlossene Schicht von Endothelzellen gebildet, welche wieder durch die Basallamina begrenzt werden. Hierauf folgt das subendotheliale Bindegewebe mit Netzen aus Kollagenfasern.

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern. Je nach dem überwiegenden Anteil in den Arterien werden diese in einen elastischen und einen muskulären Typ unterschieden.

Die Adventitia bildet die äußerste Schicht. Sie besteht aus einem Geflecht von Kollagenfasern und verankert das Gefäß mit dem jeweiligen umgebenden Gewebe (Schiebler and Schmidt, 2002).

Die Blutgefäße müssen verschleißfest, verstellbar und regenerationsfähig sein und eine bestimmte Durchlässigkeit im Bereich der Austauschstrecken besitzen.

Das Gefäßsystem des Menschen entwickelt sich durch Vaskulo- und Angiogenese (Carmeliet, 2003).

#### 2.1.1 Vaskulogenese

Die Entstehung der Blutgefäße in der Embryonalzeit wird Vaskulogenese genannt. Sie beginnt mit der Ausbildung von Blutinseln aus Zellen mesodermalen Ursprungs im Dottersack. Die im Zentrum gelegenen Zellen entwickeln sich in die embryonale hämatopoetische Richtung, während sich die in der Peripherie liegenden Zellen zu Endothelzellen entwickeln. Es bilden sich die ersten vaskulären Strukturen aus, die so genannten Blutinseln (Risau and Flamme, 1995).

Die hämatopoetischen und endothelialen Zelllinien stimmen in einigen Antigen determinanten wie Sc11/Tal1, CD31, CD34, VE-Cadherin und VEGFR-2 überein (Ribatti, 2008), so dass

heute alles auf eine gemeinsame Vorläuferzelle von hämatopoetischen und endothelialen Zellen, die als Hämangioblast bezeichnet wird, hindeutet (Asahara *et al.*, 1997).

### **2.1.2 Angiogenese**

Die Bildung von neuen Blutgefäßen ist essentiell für Organwachstum und -Reparatur. Gehen diese Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen hervor, wird dies Angiogenese genannt (Carmeliet, 2005).

Tumore können sich nur bis zu einer Größe von 1–2 mm<sup>3</sup> durch Diffusion mit Nährstoffen versorgen, danach benötigen sie für ihr weiteres Wachstum eine funktionierende Blutgefäßneubildung (Carmeliet and Jain, 2000). Somit nimmt die Angiogenese beim Tumorwachstum und der Metastasierung eine wichtige Rolle ein.

Der Ablauf der Angiogenese beginnt mit der Veränderung der Endothelzellmorphologie in den in der Nähe des Tumors liegenden Kapillaren. Nachdem der Endothelzellkontakt unterbrochen wird, werden die Basallamina und die extrazelluläre Matrix durch sezernierte proteolytische Enzyme wie Metalloproteinasen und Plasmin aufgelöst. Die so frei gewordenen Endothelzellen proliferieren, wandern in das umliegende Gewebe und ordnen sich röhrenförmig an. Zur Stabilisierung des neuen Gefäßes bildet sich erneut eine Basallamina aus (Carmeliet, 2003).

Angiogenese stellt einen geordneten Prozess dar, der durch verschiedene Wachstumsfaktoren gesteuert wird. Der wichtigste, bekannte Faktor stellt VEGF (vascular endothelial growth factor) dar (Ferrara *et al.*, 2003).

## **2.2 Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF**

VEGF reguliert das Wachstum, die Migration, die Differenzierung und die Permeabilität der Endothelzellen.

Zu der VEGF-Familie gehören fünf VEGF-Glykoproteine (VEGF-A, -B, -C, -D und -E) und PGF -1 und -2 (placenta growth factor) (Winder and Lenz, 2010).

Jedes Mitglied der VEGF-Familie stellt ein hoch konserviertes, disulfid-gebundenes dimeres Glykoprotein dar. Die VEGF-Rezeptoren (VEGFRs) gehören zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Verschiedene Stimulatoren führen zu einer gesteigerten Genexpression von VEGF. Hypoxie, p53-Mutation, Östrogen und NO (Stickstoffmonoxid) sind einige Beispiele (Dor *et al.*, 2001).

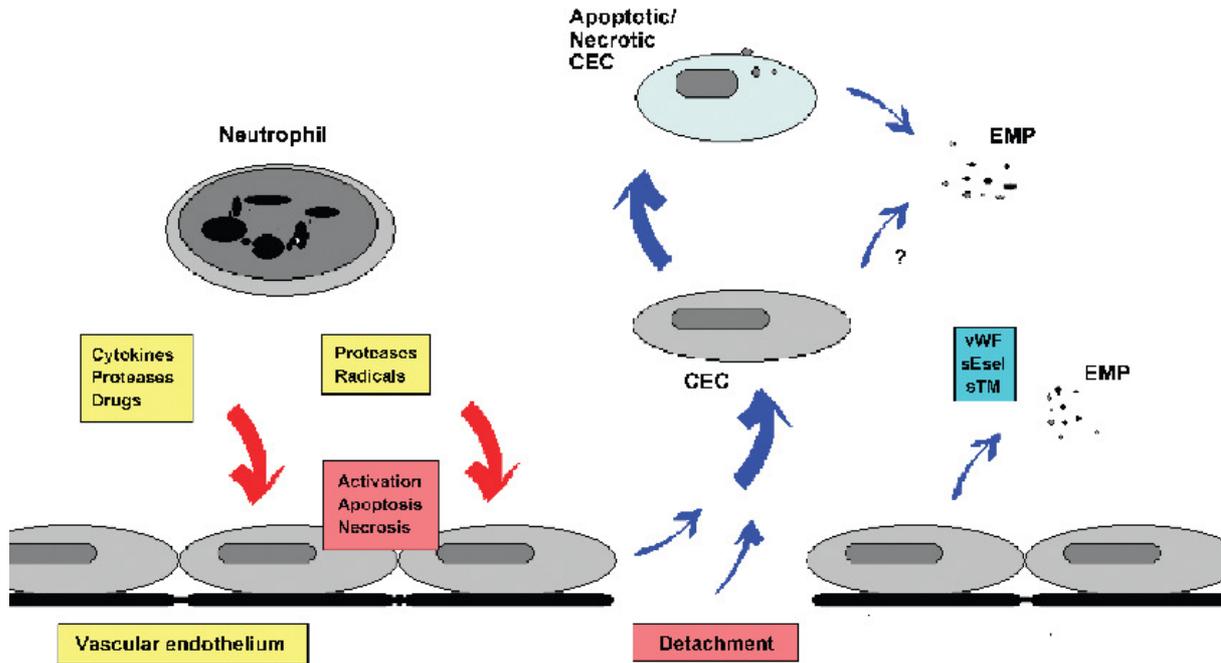
VEGF-A und sein Rezeptor VEGFR-2 sind für die Entwicklung von Gefäßen und Blutzellen notwendig (Ferrara *et al.*, 2003). Außerdem fördert VEGF-A das Aussprossen, die Migration

und die Proliferation von Endothelzellen. Durch die gesteigerte Gefäßbildung führen VEGF-A und sein Rezeptor zur Invasion von Tumorzellen in Gefäße und zu Fernmetastasierung (Ferrara, 2002).

### **2.3 Zirkulierende Endothelzellen**

Das Endothel, ein vitaler Baustein der vaskulären Wand, umfasst  $10^{13}$  endotheliale Zellen und bedeckt ca.  $7 \text{ m}^2$  eines durchschnittlichen Erwachsenen (Augustin *et al.*, 1994). Diese endothelialen Zellen stellen die physikalische Grenzfläche zwischen Blut und umgebendem Gewebe dar. Sie regulieren die Ernährung, den Austausch von Blutbestandteilen und nehmen an vielen physiologischen Ereignissen wie Hämostase, Inflammation und Angiogenese teil (Cines *et al.*, 1998).

Normalerweise sind zirkulierende Endothelzellen bei gesunden Probanden nur in geringen Zahlen im peripheren Blut zu finden (0,0001% - 0,01% der mononukleären Zellen) (Khan *et al.*, 2005). Ein vermehrtes Vorkommen der zirkulierenden Endothelzellen (CECs-Circulating Endothelial Cells) wird bei immunologischen und kardiovaskulären Erkrankungen (wie z.B. Sichelzellanämie (Solovey *et al.*, 1997), akutem Myokardinfarkt (Mutin *et al.*, 1999), Infektionen (z.B. Cytomegalievirusinfektion (Grefte *et al.*, 1993)) und neoplastischen Prozessen (Mancuso *et al.*, 2001;Zhang *et al.*, 2005;Beerepoot *et al.*, 2004;Kim *et al.*, 2003) beobachtet. Es wird angenommen, dass frei zirkulierende Endothelzellen durch direkte Schädigung aus den Wänden der Gefäße herausgelöst wurden (Lin *et al.*, 2000). Somit gewinnt die Anwesenheit von zirkulierenden Endothelzellen als Marker für einen vaskulären Schaden immer mehr an Bedeutung.



**Abbildung 1: Potentielle Mechanismen der Endothelzell-Freisetzung und der Formation von Mikropartikeln** (Goon *et al.*, 2006)

(CEC: circulating endothelial cell; EMP: endothelial microparticle; sTM: soluble thrombomodulin; sE-Sel: soluble E-selectin; vWF: von Willebrand factor)

Die gegenwärtige Meinung geht davon aus, dass die CECs nach einem schweren Schaden aus der Intima herausgelöst werden und nicht Initiator einer bestimmten Pathologie sind (Blann *et al.*, 2005). So zeigen CECs eine hohe Korrelation mit diversen endothelialen Dysfunktionen und inflammatorischen Markern (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zusammenhang der zirkulierenden Endothelzellen mit Entzündung und endothelialer Dysfunktion** (Goon *et al.*, 2006)

Referenz	Krankheit	Marker	Übereinstimmung mit der CEC-Anzahl	
			p (r)	P
(Chong <i>et al.</i> , 2004)	HI	FMD	-0,423	<0,002
		vWF	0,29	0,032
(Del Papa <i>et al.</i> , 2004)	Systemische Sklerose	sE-Sel	0,594	0,01
(Kas-Deelen <i>et al.</i> , 2000)	CMV	vWF		<0,001
(Lee <i>et al.</i> , 2005)	ACS	IL-6	0,55	<0,001
		vWF	0,44	<0,001
(Makin <i>et al.</i> , 2004)	Atherosklerose	vWF	0,40	<0,002
		TF	0,296	<0,021
(Rajagopalan <i>et al.</i> , 2004)	SLE	FMD	-0,32	<0,037
		TF	0,46	<0,002

HI: Herzinsuffizienz, CMV: Zytomegalie-Virus, ACS: akutes Koronarsyndrom, SLE: systemischer Lupus erythematodes, vWF: von Willebrand-Faktor, FMD: flow-mediated endothelial-dependent vasodilation (als Index für endotheliale Dysfunktion), sE-Sel: soluble E-Selectin, IL-6: Interleukin-6, TF: tissue factor (Thromboplastin)

Letztlich ist aber der genaue Ursprung der Endothelzellen unbekannt. Auch über den exakten Mechanismus der Freisetzung, zum Beispiel durch Einwirkung von Zytokinen, gibt es nur Spekulationen.

Als das Interesse in den 1970er Jahren auf die zirkulierenden Endothelzellen fiel, war ihre Detektion noch sehr ungenau. Es wurde nach den Zellen mit Methoden wie Lichtmikroskopie, Zellmorphologie, May Grünwald Giemsa Färbung und Dichtezentrifugation gesucht (Goon *et al.*, 2006).

Erst als 1991 neue monoklonale Antikörper gegen zwei Zelloberflächen-Antigene beschrieben wurden, wurde die Detektion der zirkulierenden Endothelzellen genauer (George *et al.*, 1992). George *et al.* nannten den von ihnen beschriebenen und gegen das Antigen CD146 gerichteten Antikörper S-Endo 1.

Kurze Zeit später beschrieben Solovey *et al.* zur Detektion von zirkulierenden Endothelzellen bei Sichelzellanämie einen weiteren Antikörper gegen CD146 und nannten ihn P1H12 (Solovey *et al.*, 1997). Nun waren Multicolour Flow Cytometry, real time PCR (polymerase chain reaction) und weitere Antikörperfärbungen möglich.

Bisher gibt es keinen klaren Konsens über die immunphenotypische Identifizierung der zirkulierenden Endothelzellen, Es ist jedoch im Allgemeinen anerkannt, dass sie Endothelmarker wie vWF, CD146 und vascular endothelial Cadherin (VE-Cadherin) exprimieren. Bei gleichzeitiger Abwesenheit des Leukozytenmarkers CD45 und des Stammzellmarkers CD133 können die Zellen eindeutig den Endothelzellen zugeordnet werden (Blann *et al.*, 2005).

Studien haben gezeigt, dass Tumorwachstum sehr von abnormer Angiogenese abhängt. Hierbei sichert die Gefäßneubildung eine adäquate Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren und unterstützt zudem die Tumorausbreitung (Folkman, 1995).

Eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden Endothelzellen wurde bei Patienten mit Lymphomen, Melanomen und Gliomen genauso wie bei Patienten mit Brust-, Kolon-, Magen-, Ösophagus-, Nierenzell- und Ovarialkarzinom beschrieben (Mancuso *et al.*, 2001;Zhang *et al.*, 2005;Beerepoot *et al.*, 2004;Kim *et al.*, 2003). Dennoch ist es weiterhin unklar, ob die zirkulierenden Endothelzellen lediglich Marker der endothelialen Dysfunktion sind oder sie im direkten Zusammenhang mit dem neoplastischen Prozess stehen.

Patienten mit einem fortschreitenden Tumorleiden und bereits vorhandenen Metastasen weisen im Vergleich zu gesunden Patienten eine 3,6-fach erhöhte zirkulierende Endothelzellzahl auf. Tumorpatienten in einem stabilen Zustand (stable disease) haben eine ähnlich niedrige Anzahl der CECs wie gesunde Kontrollpersonen. Die Zahl der zirkulierenden

Endothelzellen korreliert mit dem Tumorstadium und -wachstum (progressive/stable disease) und damit auch mit der Prognose für die Patienten (Beerepoot *et al.*, 2004).

### 2.4 P1H12

P1H12 ist ein monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop von CD146, das auf Endothelzellen exprimiert wird. Der Antikörper bindet an zirkulierende Endothelzellen im Menschen, im Hund, im Kaninchen und in der Maus.

P1H12 färbt weder im Knochenmark noch im peripheren Blut Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten oder Leukozyten an. Es werden nur die frei zirkulierenden Endothelzellen durch diesen Antikörper gefärbt.

### 2.5 Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom, auch Grawitz-Tumor oder Hypernephrom genannt, hat seinen Häufigkeitsgipfel bei über 50 Jahren. Bei einer Inzidenz von 10/100.000 Einwohnern kommt es bei Männern doppelt so häufig vor wie bei Frauen. Beim Nierenzellkarzinom handelt es sich um ein Adenokarzinom und wird als häufigster parenchymatöser Nierentumor des Erwachsenen beschrieben.

Der häufigste histologische Subtyp ist das Klarzellkarzinom (Storkel *et al.*, 1997).

Selten tritt eine familiäre Häufung bei chromosomaler Aberration sowie beim von-Hippel-Lindau-Syndrom auf (Linehan, 2000).

Die Ätiologie ist unbekannt, wobei Risikofaktoren Übergewicht, Bluthochdruck, Rauchen, Cadmiumexposition, Trichlorethen und erworbene Nierenzysten sind (Chow *et al.*, 2000).

Da über 60% der Nierenzellkarzinome asymptomatisch sind, gibt es keine typischen Frühsymptome. Daher kann bei Auftreten klinischer Zeichen bereits eine fortgeschrittene Tumorerkrankung vorliegen.

Die klassische Trias der klinischen Symptome ist Makrohämaturie (60%), Flankenschmerz (20-50%) und palpabler Flankentumor (20-40%). Weitere Symptome können Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, unklares Fieber, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und paraneoplastische Hormonbildung sein (Patard *et al.*, 2003).

Zum diagnostischen Vorgehen gehören zur Klärung der Ausbreitung des Tumors in die Nierenvene und die Vena Cava inferior eine (Farbdoppler)Sonographie, eine Angio-Computertomographie und eine Metastasensuche mit Röntgen-Thorax, Skelettszintigraphie, Sonographie und eine Computertomographie von Leber und Gehirn.

Die kurative Therapie bei Nierenzellkarzinom ohne Fernmetastasen besteht in der En-Bloc-

Entfernung von Tumor und Niere mit perirenal Fettkapsel, der Nebenniere, des Harnleiters und der Spermatika- bzw. Ovarialgefäße sowie einer Lymphadenektomie.

Bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Nierenzellkarzinom kommen folgende Medikamente in Frage:

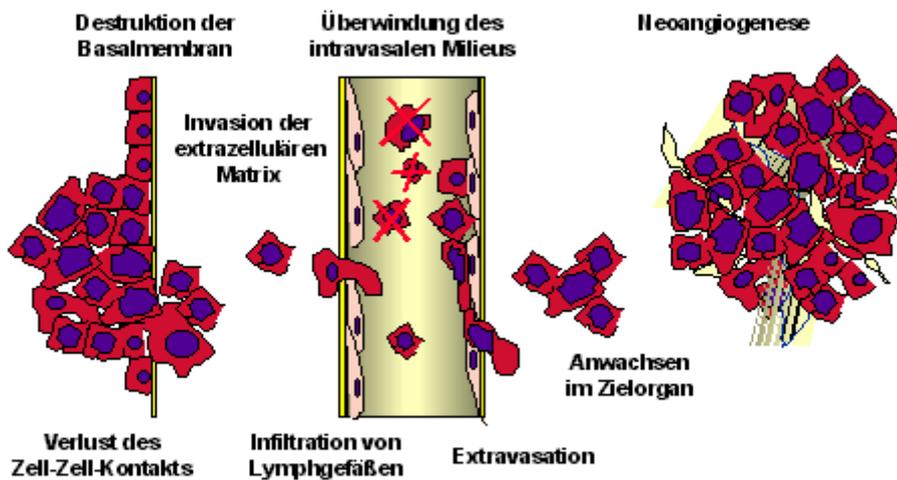
**Tabelle 2: Medikamentöse Therapieoptionen bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom**  
(Thompson, 2009)

Bevacizumab	First-line-Therapie in Kombination mit Interferon-alpha
Sorafenib tosylate	First-line-Therapie bei Patienten, bei denen Interferon-alpha oder Interleukin-2 nicht eingesetzt werden können, Second-line Therapie
Sunitinib	First- und second-line-Therapie
Temsirolimus	First-line-Therapie bei Patienten mit schlechter Prognose

## 2.6 Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung besteht grundlegend aus Intravasation und Extravasation von einzelnen Tumorzellen des Primärtumors. Ein Malignitätskriterium eines Tumors ist die Verschleppung von malignen Zellen. Damit es zu dieser Verschleppung kommen kann, müssen sich während der Intravasation einzelne Zellen aus dem primären Zellverband lösen. Dies geschieht unter anderem durch den Verlust von Zell-zu-Zell-Kontakten (zum Beispiel durch Runterregulation des Zell-zu-Zell-Adhäsions-Molekül E-Cadherin) (Mareel *et al.*, 1997). Um in die Lymph- oder Blutbahn zu gelangen, können sie mit Hilfe von Metalloproteasen die umgebenden Bindegewebsstrukturen auflösen (Ray and Stetler-Stevenson, 1994).

Nachdem die Tumorzellen in das Blutgefäßsystem eingedrungen sind, werden diese passiv mit dem Blutstrom verbreitet und bleiben in der terminalen Endstrombahn aufgrund ihrer Größe hängen. In dem nun folgenden Prozess der Extravasation können die Tumorzellen über Oberflächenrezeptoren an Endothelzellschichten haften, die interstitielle Matrix zerstören und in das umliegende Gewebe einwandern (Crawford and Matrisian, 1994). Dies ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.



**Abbildung 2: Formaler Ablauf der Infiltration, Destruktion und Metastasierung von malignen Tumoren**

<http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/stoll-christian-2001-03-06/HTML/stoll-ch1.html>;

29.07.2010; 11:00 Uhr)

Die Tumorzelle muss nun in einer für sie neuen Umgebung überleben. Entscheidend hierfür und noch vielmehr für das Wachstum ist die Fähigkeit neue Blutgefäße auszubilden. Um diese Tumorangiogenese zu ermöglichen, werden verschiedene Stoffe, vor allem VEGF, sezerniert (Folkman, 1997).

Es gibt Organe, die sehr häufig Orte für Metastasen sind. Hierzu gehören u.a. Knochen, Lunge und Leber.

Sehr selten kommen Metastasen z.B. in Milz, Herz und Skelettmuskulatur vor.

## **2.7 Studie SU011248 (Sunitinib)**

Bei dieser Studie handelt es sich um eine klinische Prüfung mit SU011248 bei Patienten mit metastasiertem Zytokin-refraktärem Nierenzellkarzinom, die für eine Teilnahme an anderen klinischen Prüfungen zu SU011248 nicht geeignet sind und einen Nutzen aus der Behandlung mit SU011248 ziehen könnten.

### **2.7.1 Indikation**

In die Studie konnten Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eingeschlossen werden.

### **2.7.2 Rationale**

SU011248 ist ein Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, der zur Behandlung nicht resezierbarer und/oder metastatisch maligner gastrointestinaler Stromatumore (GIST) und fortgeschrittener und/oder metastasierter Nierenzellkarzinome (MRCC) eingesetzt wird.

### **2.7.3 Tyrosinkinasen**

Tyrosinkinasen sind eine Gruppe von Proteinen aus der Familie der Proteinkinasen, deren Aufgabe die reversible Übertragung einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung) auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins ist. Dadurch wird die Aktivität des Zielproteins beträchtlich beeinflusst, weshalb Tyrosinkinasen auch als Teil von Rezeptorsystemen einen wichtigen Beitrag zur Signalübertragung leisten.

### **2.7.4 Pharmakologie**

Sunitinib hemmt verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dies sind unter anderen die Rezeptoren für PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), Kit (stem-cell factor (SCF)), FLT (fetal liver tyrosine kinase), CSF (colony-stimulating factor) und RET (glial cell-line derived neurotrophic factor) (Izzedine *et al.*, 2007). Diese Rezeptoren werden mit dem Tumorwachstum, der pathologischen Angiogenese und der Entwicklung von Metastasen bei Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (Heinrich *et al.*, 2002;Rubin *et al.*, 2002;Gilliland and Griffin, 2002;Gale and Yancopoulos, 1999). Unter der Behandlung mit Sunitinib können als unerwünschte Wirkungen Müdigkeit (30%), gastrointestinale-Störungen (> 20%) (Obstipation, Stomatitis), Bluthochdruck (17%), Hand-Fuß-Syndrom (30%), Lungenembolie (1%) und Thrombozytopenie (1%) auftreten (Motzer *et al.*, 2006).

### 2.7.5 Zielsetzung

Das primäre Ziel dieser Studie bestand darin, Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom die Möglichkeit zur Behandlung mit SU011248 zu geben, und zwar unter der Voraussetzung, dass alle unten stehenden Bedingungen zutreffen:

- a) Die Patienten waren nicht für eine Aufnahme in eine der laufenden klinischen Prüfungen mit SU011248 geeignet (wenn am Studienzentrum Studien der Phase I, II oder III zu SU011248 durchgeführt werden und Patienten mit Nierenzellkarzinom an diesen Studien teilnehmen können).
- b) Bei den Patienten lag ein Zytokin-refraktäres Nierenzellkarzinom vor.
- c) Die Patienten würden nach dem Ermessen des Prüfarztes möglicherweise einen klinischen Nutzen aus der Behandlung mit SU011248 ziehen.

Die weiteren Ziele dieser Studie waren

- die Beurteilung des Sicherheits- und Verträglichkeitsprofils von SU011248
- die Beurteilung der Antitumor-Wirksamkeit von SU011248 als Monopräparat in einer Dosierung von 50 mg p. o. bei Patienten mit metastasiertem Zytokin-refraktärem Nierenzellkarzinom

### 2.7.6 Studiendesign

Bei dieser Studie handelte es sich um eine unverblindete Therapie für Patienten mit metastasiertem Zytokin-refraktärem Nierenzellkarzinom, deren Tumorstatus und Behandlungshintergrund den unter „Zielsetzung“ aufgeführten Kriterien entsprach.

SU011248 wurde nach dem Schema 4/2 angewendet: Ein Zyklus bestand jeweils aus einer vierwöchigen Behandlungsphase mit SU011248 50 mg einmal täglich und einer darauf folgenden zweiwöchigen Therapiepause.

Die Tumorremission bzw. -progression wurde nach dem im jeweiligen Zentrum üblichen Verfahren der medizinischen Standardversorgung für Patienten mit Nierenzellkarzinom beurteilt. Im Rahmen dieses Studienprotokolls wurden nur in minimalem Umfang Daten zur Tumorevaluierung erfasst (größte Remission sowie Zeit bis zur Tumorprogression).

Patienten, die die Therapie mit SU011248 vertrugen, konnten die Behandlung im Rahmen dieses Studienprotokolls so lange fortsetzen, wie nach dem Ermessen des Arztes Hinweise auf eine Tumorkontrolle gegeben waren. Patienten, die zum Zeitpunkt der Marktzulassung von SU011248 noch an dieser Studie teilnahmen, konnten die Behandlung mit SU011248 so lange fortsetzen, wie nach Ansicht des Prüfarztes ein klinischer Nutzen der Behandlung gegeben ist. Alle Patienten wurden ab dem Zeitpunkt der erstmaligen Anwendung der Prüfmedikation

bis zu zwei Jahre lang hinsichtlich ihres Überlebens überwacht.

### **2.7.7 Zielgrößen**

Das primäre Ziel dieser Studie bestand darin, Patienten mit metastasiertem Zytokin-refraktärem Nierenzellkarzinom die Möglichkeit zur Behandlung mit SU011248 zu geben, und zwar unter den oben aufgeführten Voraussetzungen. Es erfolgte keine formelle Überprüfung einer Hypothese.

Zusätzlich wurden folgende klinische Zielgrößen evaluiert:

- Sicherheitsprofil von SU011248
- Gesamt-Überleben
- Zeit bis zur Tumorprogression
- Progressionsfreies Überleben
- Objektive Remissionsrate

### **2.7.8 Studientherapie**

Die Patienten erhielten SU011248 unverblindet in einer initialen Dosierung von 50 mg täglich über vier aufeinander folgende Wochen. Anschließend folgt eine Therapiepause von insgesamt zwei Wochen. Die Gesamtdauer eines Behandlungszyklus lag somit bei sechs Wochen. Die Anwendung von SU011248 erfolgte ab dem ersten Tag der Studie einmal täglich morgens p. o. unabhängig von Mahlzeiten. Richtlinien für Dosisreduktion beim Auftreten von behandlungsbedingten Toxizitäten wurden bereitgestellt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

In folgender Tabelle sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

Bezugsquelle	Chemikalie/Medizinprodukt
DAKO, Glostrup (Dänemark)	Dako Pen, S 2002
	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins, Z 0259
	APAAP, Mouse Monoclonal, Klon AP7/6/7, Isotyp IgG1κ, D 0651
	TRIS-Puffer pH=9,5, T 1503
	Trypanblau, Trypan Blue Solution 0,4%
	FITC-anti-mouse
	Naphtol-AS-Bi-Phosphat
	Mounting Medium, C563
Merck, Darmstadt	Aceton zur Analyse
	NaNO <sub>2</sub> Stocklösung, 9546
	Neufuchsin, 4041
	Na <sub>2</sub> HOP <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 1.06580.1000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4873.1000
	Natriumnitrit, 9546
	N,N-Dimethylformamid, 3053
	HCL 5 Molar, 9911
	Essigsäure 100%, 0063
	NaHCO <sub>3</sub> , 6329
	Hämalaun
Biotest AG, Dreieich	AB-Serum, 805135
Sigma, Deisenhofen	MOPC 21, M 9269
	Levamisol 0,625 M, L 9756
	Triton X100

Cambrex, New Jersey, USA	EGM-2-Komplettmedium
Biochrom AG, Berlin	Biocoll Separating Solution (Ficoll)
Chemicon, Temecula, USA	P1H12-Antikörper, MAB 2089
Baker, Deventer, Holland	NaCl 0278
Gibco, Karlsruhe	Trypsin-EDTA (10x)
Cell Signaling, Danvers, USA	Caspase-3 (ASP175)
Vector Laboratories, Burlingame, USA	Dapi counterstain, Cat. No. H-1000
	Vectashield-mounting-Medium
BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien	CD106 (555645)
	KI67 (610969)
Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	Texas Red AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG
GeneTex, Irvine, USA	VE-Cadherin (rabbit), CD144 (GTX74432)
Biocompare, San Francisco, USA	Mouse Anti-Human CD144 (Clone TEA 1/31)
Invitrogen, Darmstadt	CD62-E
	FBS
R&D Systems, Wiesbaden	TNF-alpha
	CD146/FITC
Lonza, Walkersville, USA	EGM-2
Büfa, Hude-Altmoorhause	Formaldehyd

### 3.1.2 Laborgeräte

Die folgende Tabelle listet die verwendeten Laborgeräte auf.

**Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte**

Bezugsquelle	Herstellerbezeichnung	Gerät
Forma Scientific, Marietta, USA	Water-Jacked Incubator	Brutschrank
Zeiss, Jena	Axiocvert 25	Umkehrmikroskop/ Fluoreszenz-Umkehrmikroskop
	Phomi 3	Mikroskop
	Axioplan	Fluoreszenz-Mikroskop
Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415	Zentrifuge für Reaktionsgefäße

	Reference 10, 100, 1000	Pipetten
Shandon Frankfurt	Cytospin 2	Zytozentrifuge
Brand, Wertheim	Neubauer-Zählkammer	Zellzählkammer
Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel	GFL Wasserbad	Wasserbad
Heraeus Instruments, Hanau	Lamin Air HB 2448	Sterile Werkbank
Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn	Pipetus-Akku	Pipettierhilfe
Schott-Geräte, Ludwigshafen	pH-Meter CG811	PH-Meter
ChromaVision Medical System, San Juan Capistrano, CA, USA	automated cellular imaging system	ACIS
Kryotec, Hamburg	Tiefkühler	Tiefkühltruhe (-80°C)
Labotect, Göttingen	Labotect Inkubator C200	Zellkulturinkubator
Scientific Industries, New York, USA	Vortex-Genie	Vortexer

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle zeigt die Verbrauchsmaterialien.

**Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Bezugsquelle	Verbrauchsmaterial
Sarstedt, Nümbrecht	Sterile Zellkulturflaschen, T25, T75, T175
	Pipettenspitzen: 10, 100, 1000µl
	Deckgläser
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	Objektträger
Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Discardit II Sterile Spitzen: 5, 10, 20 ml
BD Falcon, Heidelberg	Sterile Einwegpipetten, 1, 2, 5, 10, 25 ml
	Zentrifugenröhrchen: 15, 50 ml
Heinz Herenz, Hamburg	Pasteurpipetten 230 mm, Glas
Millipore, Schwalbach	Steriflip (Einweg-Sterilisationseinheit)

Schleicher & Schuell, Dassel	Papierfilter (595½ Folders Filters, Ø 185 mm)
Schott, Mainz	Glaswaren
VWR International, Dietikon, Schweiz	Sterile Syringe Filter 0,45 µm (Sterile Spitzenfilter)
Campus-Forschung, UKE, Hamburg	Alufolie
	Feuchte Kammer
	Dunkle Kammer
	Demineralisiertes Wasser

### 3.1.4 Lösungen und Puffer

In der folgenden Tabelle sind die genutzten Puffer und Lösungen aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer**

Lösung A	bestehend aus 78,8 ml demineralisiertem Wasser, 4,2 ml TRIS-Puffer pH = 9,5 und 200 µl Levamisol 0,625 M
Lösung B	bestehend aus 415 µl NaNO <sup>2</sup> (Natriumnitrit) Stocklösung und 166 µl 5%-igem Neufuchsin, die 3 Minuten inkubiert wurde
Lösung C	bestehend aus 42 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat, das in 500 µl Dimethylformamid gelöst wurde
Erylysepuffer	0,155 M NH <sub>4</sub> CL; 0,010 M KHCO <sub>3</sub> ; 0,001 M EDTA
10x PBS-Lösung	180 g NaCl, 28,66 g Na <sup>2</sup> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 2000 ml Aqua dest.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut oder Buffy Coats

Bei der Herstellung von Blutkonserven wird das Spenderblut (ca. 500 ml) in verschiedene Fraktionen, wie Erythrozytenkonzentrate, Plasma, thrombozytenreiches Plasma etc. aufgeteilt. Die sogenannten Buffy Coats enthalten die weißen Blutkörperchen, sie werden durch Zentrifugation aufgetrennt und üblicherweise verworfen. Für die Untersuchung wurden diese Buffy Coats von der Blutbank des UKE (Universitätsklinikum Eppendorf–Hamburg) bereitgestellt. Die Proben wurden anonymisiert abgegeben, so dass kein Rückschluss auf den Spender gezogen werden konnte.

Das Volumen der Buffy Coats betrug cirka 50 ml. Die daraus isolierten mononukleären Blutzellen wurden als Negativkontrolle verwendet

Die Buffy Coats wurden in EDTA-Röhrchen aufgenommen und in einem Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Die verdünnten Blutproben wurden im Verhältnis 2:3 auf FICOLL aufgetragen und bei Raumtemperatur 30 Minuten bei 400 g ohne Bremse abzentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die Schicht aus mononukleären Zellen, die genau zwischen dem FICOLL (unten) und dem Plasma/PBS (oben) lag, vorsichtig abpipettiert und 1:1 mit PBS verdünnt. Jetzt folgten noch mindestens drei Waschschrte (300 g, 5 Minuten, 4°C) mit PBS. Bei roten Zellpellets wurde zusätzlich eine Erylyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml eisgekühltem Erylysepuffer resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml PBS wurde die Suspension abzentrifugiert (300 g, 5 Minuten, 4°C). Es folgte ein weiterer Waschschrte.

Die Zellen wurden in Trypanblau mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Herstellung der Cytospins musste sofort im Anschluss erfolgen, da die Zellen in dem PBS-Puffer nur kurz überleben. In dieser Zeit müssen die Falconröhrchen ständig in Bewegung sein, da sich die Zellen sonst aneinander lagern. Die Zellen wurden so verdünnt, dass sich in 700 µl 700.000 Zellen befanden. Nun wurden je 700.000 Zellen auf die Objektträger zentrifugiert (Zytozentrifuge; Cytospin 2; Shandon Frankfurt).

Die Cytospins wurden mindestens 3 Stunden bei RT getrocknet. Danach wurden immer zwei Objektträger zusammen in Aluminiumfoliefolie gewickelt und bei - 80°C gelagert. Durch diese Lagerung sind die Zellen über Jahre haltbar.

### 3.2.2 Positive Kontrollzellen

Als Positivkontrolle wurden HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells;), vaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnurblutvene, verwendet. HUVECs wurden kommerziell von der Firma Cambrex erworben (Cambrex, Charles City, USA).

Die HUVECs wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit EGM-2-Komplettmedium bei 37°C, humider Atmosphäre und 5% CO<sup>2</sup> (Kohlenstoffdioxid) im Zellkultur-Inkubator kultiviert. Die Kultivierung der Zellen führte freundlicherweise Jasmin Otten (Dipl.-Biologin) durch.

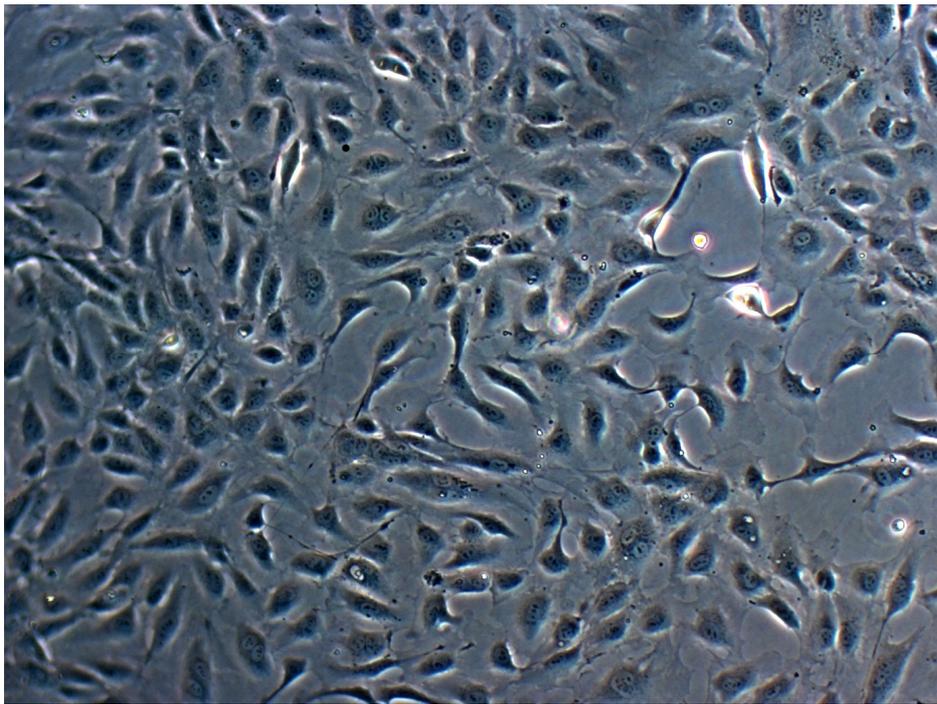


Abbildung 3: HUVECs in Zellkultur, 100-fache Vergrößerung

### 3.2.3 Patientenproben

Es wurden Blutproben von zwei gesunden Probanden (Blutspender) gesammelt, wie oben beschrieben aufgearbeitet und mit der APAAP-Methode gefärbt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Anzahl der vaskulären Endothelzellen bei gesunden Probanden ermittelt werden.

Zudem wurden Blutproben von acht Tumorpatienten außerhalb der Studie gesammelt, die alle maligne solide Tumore hatten und ihr Einverständnis erteilt hatten. Aus diesen Ergebnissen konnte die ungefähre Anzahl von vaskulären Endothelzellen in dem Blut der Tumorpatienten herausgefunden werden.

Im Rahmen der klinischen Studie SU011248 mit Sunitinib wurden periphere Blutproben von 14 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom gesammelt.

Die erste Blutprobe wurde am Tag 1 der Therapie vor der ersten Medikamentengabe und die zweite am Ende des Therapiezyklus (Tag 28) entnommen.

Alle Patienten stimmten der wissenschaftlichen Verwertung ihrer Proben zu.

### 3.2.4 Immunhistochemische Färbung zirkulierender Endothelzellen

#### 3.2.4.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung-APAAP-Färbung

##### 3.2.4.1.1 Prinzip des immunhistochemischen APAAP-Nachweises

1970 entwickelte Sternberger den immunhistochemischen Nachweis mittels Peroxidase-Anti-Peroxidase, dessen Methode als Vorbild für die heutigen immunhistochemischen Nachweise dient (Sternberger *et al.*, 1970). Bei der direkten Methode können im Gewebe liegende Antikörper oder Antigene direkt nachgewiesen werden. Bei der indirekten Methode, zu der auch der Nachweis mit Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase (APAAP) gehört, wird das entsprechende nachzuweisende Antigen mit einem Primärantikörper, einem Sekundärantikörper und erst dann mit dem APAAP-Komplex inkubiert (Abbildung 3). Durch diese verschiedenen "Etagen" von Antikörpern wird eine Verstärkung des Signals erreicht, da die Bindungsstellen für den APAAP-Komplex vervielfacht werden. Dadurch können auch geringe Mengen an Antigenen nachgewiesen werden.

In folgender Abbildung ist das Prinzip der Färbung dargestellt.

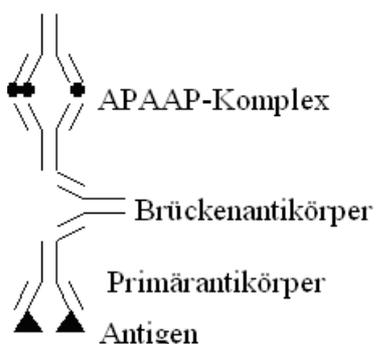


Abbildung 4: Schematische Darstellung der APAAP-Färbung

Das Antigen, das sich auf der Zelloberfläche befindet, wird zunächst von dem Primärantikörper gebunden. An diesen Antikörper bindet der Brückenantikörper (Z 259), der dann vom APAAP-Komplex erkannt und gebunden wird. Durch das Enzymsubstrat kann dieser Komplex sichtbar gemacht werden.

### **3.2.4.1.2 Färbung nach der APAAP-Methode**

Für die Färbung wurden die Objektträger etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in der Aluminiumfolie aufgetaut.

Die Zellareale wurden mit einem Dako Pen umkreist und die Objektträger 5 Minuten in 100%-igem Aceton fixiert. Danach wurden die Objektträger 3 mal 3 Minuten im PBS (phosphat bufferd saline)-Puffer (pH 7,4) gespült.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde anschließend auf jedes Zellareal 150 µl 10%-ige AB/PBS-Lösung pipettiert und in eine feuchte Kammer überführt.

Beim AB-Serum handelt es sich um humanes Serum der Blutgruppe AB, welches die unspezifischen Bindungen abdecken sollte.

Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde die AB/PBS-Lösung von den Objektträgern entfernt und sofort der Primärantikörper bzw. die negative Kontrolle auf die Zellen pipettiert.

Der Primärantikörper P1H12 wurde in der Konzentration von 1:100 auf die Zellareale gegeben.

Als Negativkontrolle wurde der Antikörper MOPC 21 (Maus IgG1κ) in der Verdünnung 1:500 mit 10%-igem AB/PBS-Serum verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden alle Objektträger 3 mal 3 Minuten mit der PBS-Lösung in getrennten Behältern gewaschen. Dann wurden die Objektträger einzeln wieder in die feuchte Kammer überführt und sofort mit dem nächsten Antikörper, dem Sekundärantikörper beschickt. Der Sekundärantikörper Z0259 reagiert mit allen murinen IgG-Unterklassen, Maus-IgA und Maus-IgM.

Die Objektträger wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend 3 mal 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Dann wurde der APAAP-Komplex in einer 1:100-Konzentration auf die Zellareale pipettiert.

Der APAAP-Komplex dient zur Visualisierung der Antikörperbindung und wird in der Immunzytochemie, beim Immunblotting und in ELISA-Verfahren verwendet. In der Immunzytochemie erweist sich der APAAP-Komplex besonders in Verbindung mit primären Mausantikörpern vorteilhaft bei der Anfärbung von Präparaten mit einem hohen Anteil an endogener Peroxidase, wie z.B. Blut und Knochenmark. Durch Zugabe von Levamisol zum Enzymsubstrat können endogene alkalische Phosphatasen inhibiert werden. Im APAAP-Komplex wird die alkalische Phosphatase von Levamisol nicht beeinflusst.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Objektträger 3 mal 3 Minuten in der PBS-Lösung gewaschen. In dieser Zeit wurde das Enzymsubstrat aus Lösung A, B und C (siehe „Lösungen und Puffer“) bei jeder Färbung frisch hergestellt.

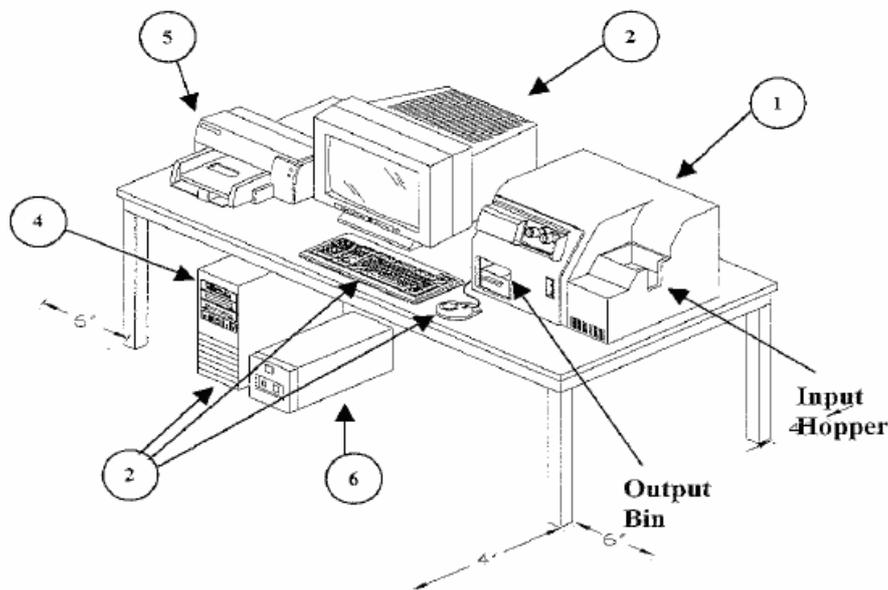
Lösung A und B wurden vermischt, bevor Lösung C hinzugeben wurde. Abschließend wurde die Substratlösung filtriert.

Auf jedes Zellareal wurden 180  $\mu$ l Enzymsubstrat pipettiert und alle Objektträger für 20 Minuten inkubiert. Nach dem 3 mal 3-minütigen Waschen in der PBS-Lösung folgte nun die Gegenfärbung mit Hämalaun.

Die Objektträger wurden für 20 Sekunden in eine 1:5 mit demineralisiertem Wasser verdünnte Hämalaun-Lösung und dann kurz in destilliertes Wasser getaucht. Danach wurden sie 3-4 mal in 0,1%-ige Essigsäure, 3-4 mal in destilliertes Wasser, 30 Sekunden in 0,1%-iges NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat) gegeben und schließlich 3 mal 3 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte mit dem DAKO-Mounting-Medium.

Nachdem dieses Medium getrocknet war, konnten die Objektträger mit einem Barcode versehen und in den ACIS (automated cellular imaging system) eingelesen werden (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** ACIS-Computer; 1: ACIS-Mikroskop; 2: Prozessor, Monitor, Tastatur und Maus, 4: CD-Laufwerk, 5: Drucker, 6: Stromversorgung

Das ACIS-System kann gefärbte Zellen aufgrund ihrer Farbe, Form und Größe erkennen und speichern. Dieses System besteht aus einem automatisierten, robotergesteuerten Mikroskop mit einem digitalen Bild-Prozessor, der die Analysierung der auf Glasobjektträgern fixierten Zellen übernimmt. Diese durchlaufen roboterbewegt und softwarekontrolliert den ACIS, während die digitale Kamera jedes Einstellungsfeld fotografiert. In diesen Einstellungsfeldern vergrößert das Mikroskop einzelne Gebiete mit positiven Ereignissen und speichert diese. Da jedes fotografierte Gebiet einem Einstellungsfeld zugeordnet werden kann, kann jede positive Zelle zurückverfolgt und genau auf dem Objektträger lokalisiert werden.

Da das Instrument täglich kalibriert werden muss, müssen bei jedem Durchlauf Kontrollobjektträger zur Verfügung stehen.

Die exzellente Sensitivität, die Reproduzierbarkeit der Daten und Zuverlässigkeit des ACIS wurde von Bauer *et al.* im Jahr 2000 getestet und validiert (Bauer *et al.*, 2000).

Ein solches Gerät ist in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Pantel vorhanden und konnte dort benutzt werden. Besondere Unterstützung erhielt ich durch Frau Dr. Riethdorf, die mich in das Gerät einwies und in der Auswertung unterstützte.

### **3.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung zirkulierender Endothelzellen**

Im Folgenden werden die Immunfluoreszenzfärbungen beschrieben.

Für den P1H12- und den VE-Cadherin-Antikörper wurde als Sekundärantikörper Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) genutzt. FITC ist eine grün fluoreszierende Substanz, die konjugiert am Antikörper zur Markierung von bestimmten Stoffen oder Zellen dienen kann.

Für die Antikörper KI67, CD106 und CD62-E wurden Texas-Red-markierte Sekundärantikörper genutzt. Texas Red ist eine rot fluoreszierende Substanz, die konjugiert am Antikörper zur Markierung von Zellen dienen kann. Somit ist ein qualitativer Nachweis bestimmter Oberflächenantigene möglich.

#### **3.2.4.2.1 Färbeprotokoll für die Antikörper P1H12 (CD146), VE-Cadherin (CD144), CD106 und CD62-E (E-Selectin)**

Der P1H12-Antikörper ist ein monoklonaler Anti-Endothelzell-Antikörper. P1H12 bindet an Endothelzellen im Menschen, im Hund, im Kaninchen und in der Maus.

VE-Cadherin ist ein weiterer Endothelzellmarker. Er kommt in Kontaktstellen aneinandergrenzender Endothelzellen vor.

CD106 ist ein Marker für aktivierte Endothelzellen. Eine Hochregulation von CD106 tritt als Folge der erhöhten Transkription (zum Beispiel als Reaktion auf Tumor-Nekrose-Faktor-

Alpha oder Interleukin-1) auf.

CD62-E ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches nur bei Endothelzellen vorkommt, welche durch Zytokine aktiviert wurden.

Die Objektträger wurden etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Aluminiumfolie aufgetaut.

Die Zellareale wurden mit dem Dako-Pen umkreist. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurde auf jedes Zellareal 500 µl 10%-ige AB/PBS-Lösung pipettiert und die Objektträger wurden in einer feuchten lichtundurchlässigen Kammer gelagert.

Nach 10 Minuten wurden die Objektträger 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen, dann der Primärantikörper auf die Zellen pipettiert und wieder in die Kammer gelegt.

P1H12: 1:150 = 6,67 µl/1 ml PBS-Lösung

VE-Cadherin: 1:200 = 5 µl/1 ml PBS-Lösung

CD106: 1:25 = 40 µl/1 ml PBS-Lösung

CD62-E: 1:50 = 20 µl/1 ml PBS-Lösung

Kontrolle: PBS-Lösung

Nun wurden die Objektträger 2 mal 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen und der Sekundärantikörper auf die Zellen pipettiert.

FITC: 1:150 = 6,67 µl/1 ml PBS-Lösung (für die Antikörper P1H12 und VE-Cadherin)

Texas Red: 1:300 = 3,33 µl/1 ml PBS-Lösung (für die Antikörper CD106 und CD62-E)

Nach 30 Minuten in der feuchten lichtundurchlässigen Kammer wurden die Objektträger 2 mal 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Zum Eindeckeln der Objektträger wurde Vectashield-Medium verwendet, in dem DAPI counterstain (4'-6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride) gelöst war. DAPI interkaliert in der DNA und färbt somit spezifisch Zellkerne an. Nun konnten die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden.

### **3.2.4.2.2 KI67-Färbung**

Das KI67-Antigen ist ein Proliferationsmarker. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das KI67-Antigen nicht. Die Färbung für KI67 gibt also unmittelbar Aufschluss über die Proliferationsrate der untersuchten Zellen.

Die Objektträger wurden etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Aluminiumfolie aufgetaut.

Die Zellareale wurden mit dem Dako-Pen umkreist und mit 3,7%-igem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden 200 µl 0,1%-ige TritonX100 Lösung auf die Zellareale pipettiert und nach 5 Minuten Inkubation 2 mal 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Nun wurde für weitere 30 Minuten 200 µl 2%-ige FBS- in PBS-Lösung (FBS= Fetal bovine serum) auf die Zellen gegeben.

Danach wurde die FBS/PBS-Lösung von den Objektträgern entfernt und sofort 150 µl des Primärantikörpers bzw. die negative Kontrolle auf die Zellen pipettiert und die Objektträger in eine feuchte lichtundurchlässige Kammer überführt.

KI67: 1:100 = 10 µl/1 ml 3%-ige FBS-Lösung in PBS-Lösung

Kontrolle: PBS-Lösung

Nach 60 Minuten wurden die Objektträger für 3 mal 3 Minuten in PBS-Lösung gewaschen. Nun wurden für weitere 60 Minuten 150 µl des Sekundärantikörpers auf die Zellareale pipettiert und die Objektträger wieder in die Kammer gelegt.

Texas Red: 1:300 = 3,33 µl/1 ml PBS-Lösung

Zum Schluss wurden die Objektträger 3 mal 3 Minuten in 10%-iger PBS-Lösung gewaschen. Zum Eindeckeln der Objektträger wurde Vectashield-Medium verwendet, in dem DAPI counterstain (4´6-Diamidine-2´Phenylindole Dihydrochloride) gelöst war. DAPI interkaliert in der DNA und färbt somit spezifisch Zellkerne an. Nun konnten die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden.

### **3.2.4.2.3 Caspase-3-Färbung**

In Anlehnung an das Färbeprotokoll des Caspase-3 Antikörpers der Firma Cell Signaling wurde unter unterschiedlichen Bedingungen nach verschiedenen Protokollen gefärbt.

Da diese jedoch alle ergebnislos blieben, wurde dieser Antikörper nicht weiter in die Immunfluoreszenz-Färbungen mit einbezogen.

### **3.2.4.3 Doppelfärbung**

Bei den Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurde zum einen der P1H12-Antikörper in Kombination mit dem Antikörper KI67 oder CD106 genutzt, zum anderen der VE-Cadherin-Antikörper in Kombination mit dem Antikörper KI67 oder CD62-E.

Es wurde zuerst nach dem Protokoll für KI67 oder CD106 oder CD62-E gefärbt und im Anschluss nach dem Protokoll für P1H12 oder VE-Cadherin. Bei diesen Doppelfärbungen wurde der Schritt des Eindeckelns zwischen den jeweiligen Primärantikörpern weggelassen.

Zudem wurde für die Darstellung von P1H12 ein mit FITC direkt markierter P1H12-Antikörper genutzt.

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-Methode die zirkulierenden Endothelzellen (CECs) zu detektieren und mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung zu analysieren.

Hierfür wurden zunächst die Endothelzellmarker P1H12 und VE-Cadherin, der Proliferationsmarker KI67, die Aktivierungsmarker CD106 und CD62-E und der Apoptosemarker Caspase-3 auf ihre Tauglichkeit für eine Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel von HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) untersucht.

Mit dem Ziel zirkulierende Endothelzellen nicht nur zu detektieren, sondern auch hinsichtlich ihres funktionalen Status‘ zu analysieren, wurden in einem weiteren Schritt die entsprechenden Antikörper in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen kombiniert.

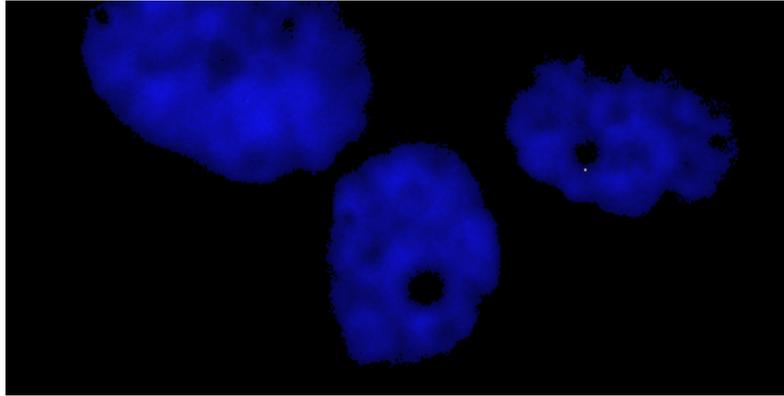
Nachdem dies an den HUVECs gelang, wurden zuerst die Proben der acht Patienten mit soliden Tumoren und später die der Studienpatienten nach der APAAP-Methode gefärbt. Dies erfolgte, um die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen im Verlauf der Therapie mit Sunitinib zu quantifizieren. Dabei sollte untersucht werden, ob es durch die antiangiogenetische Therapie zu einer Zunahme oder Abnahme der CECs kommt. Nun wurden die Patientenproben, bei denen zirkulierende Endothelzellen mit Hilfe der APAAP-Methode nachzuweisen waren, mit der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gefärbt und ausgewertet.

### 4.1 HUVECs - Einzelfärbung

Um die Immunfluoreszenzfärbung zu etablieren und um die optimale Konzentration der genutzten Antikörper herauszufinden, wurden zunächst HUVECs, welche auf Cytospins zentrifugiert wurden, mit verschiedenen primären und sekundären Antikörpern angefärbt und ausgewertet.

Es wurde insbesondere auf eine optimale Darstellung der gesuchten Zellen und auf den auftretenden Hintergrund, der vor allem durch den Sekundärantikörper bedingt wurde, geachtet.

Anschließend wurden Verdünnungsreihen von HUVECs und mononukleären Zellen, welche aus Buffy Coats gewonnen wurden, hergestellt und die Prozedur wiederholt.



**Abbildung 6: HUVECs, mit DAPI eingedeckelt, 100-fache Vergrößerung**

Auch wenn die HUVECs in den Verdünnungsreihen nur in sehr geringen Zahlen auf den Objektträgern vorkommen (5% bei 1:20; 1% bei 1:100; 0,2% bei 1:500 und 0,1% bei 1:1000), können diese morphologisch durch ihren deutlich größeren Umfang klar von den kleineren mononukleären Zellen unterschieden und somit gut detektiert und ausgewertet werden.

#### **4.1.1 P1H12 (CD146)**

Um die Einzelfärbung mit dem P1H12-Antikörper zu etablieren, wurden diverse Vorversuche durchgeführt. Hierbei war vor allem der durch den verwendeten mit FITC gekoppelten Sekundärantikörper entstehende Hintergrund zu beurteilen. Ziel war es eine Konzentration zu finden, die es zuließ, die Endothelzellen eindeutig als positiv zu identifizieren und die gleichzeitig einen so geringen Hintergrund verursachte, dass die P1H12-positiven Zellen nicht überlagert wurden und somit keine falsch positiven Ergebnisse auftraten.

Zu diesem Zweck wurden Objektträger mit unterschiedlicher Zellzahl der HUVECs hergestellt und angefärbt. Nach erfolgreichem Anfärben der HUVECs mit dem P1H12-Antikörper wurden Objektträger erstellt, auf die verschiedene Verdünnungsstufen von HUVECs, gemischt mit mononukleären Zellen (MNCs) in unterschiedlicher Dichte, aufgebracht wurden. Die MNCs wurden aus Buffy Coats gewonnen, welche von der Blutbank des UKE bereitgestellt wurden. Nun wurde der P1H12-Antikörper in Verdünnungen von 1:50 bis 1:300 und parallel hierzu der mit FITC gekoppelte Sekundärantikörper in Verdünnungen von 1:100 bis 1:350 getestet. Diese Vorversuche zeigten eine geeignete Verdünnung von 1:150 für den P1H12-Antikörper und ebenfalls 1:150 für den Sekundärantikörper.

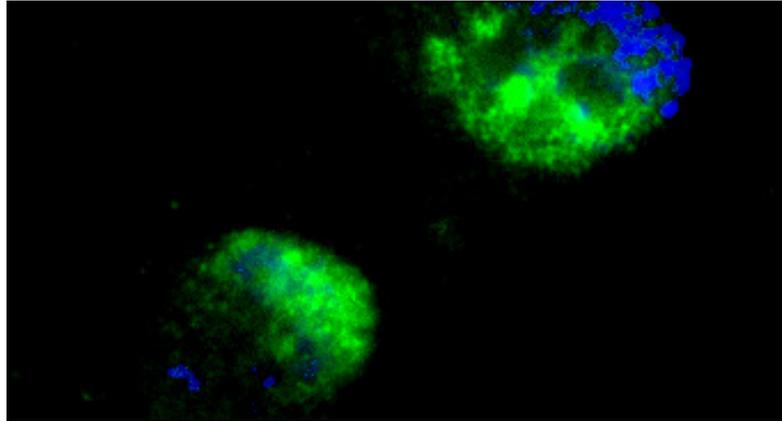


Abbildung 7: P1H12-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung

Es zeigte sich, dass der Antikörper bei allen Färbungen in über 90% der Fälle an die HUVECs band und sich somit sehr gut für die Darstellung von zirkulierenden Endothelzellen in der Immunfluoreszenzfärbung eignet.

Tabelle 7: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper P1H12 und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper

P1H12-FITC		
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	P1H12 positive HUVECs	P1H12 positive mononukleäre Zellen
nur HUVECs (10.000/Objektträger)	98%	0%
1:100 (10.000 Zellen/Objektträger)	94%	0%
1:500 (10.000 Zellen/Objektträger)	96%	0%
1:1.000 (10.000 Zellen/Objektträger)	95%	0%
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	90%	0%

#### 4.1.2 VE-Cadherin

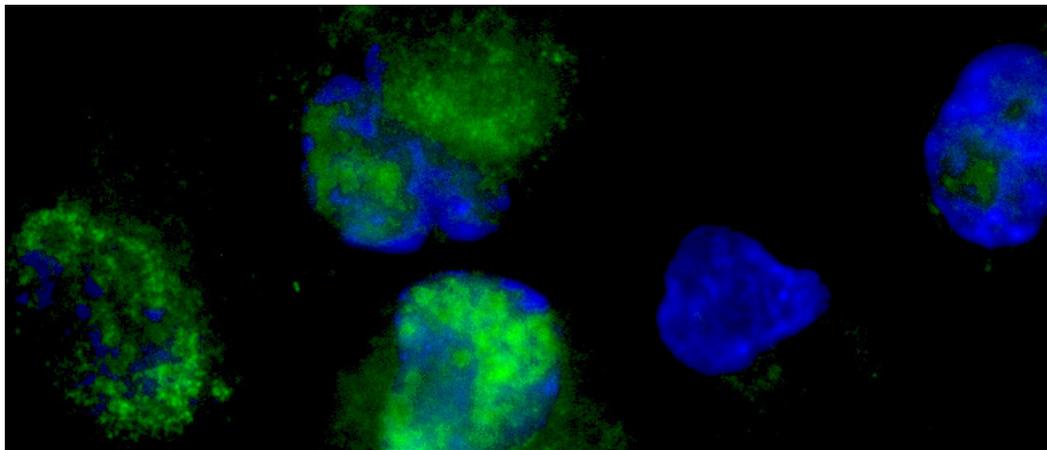
Um einen weiteren Endothelzellmarker nutzen zu können, wurde die Tauglichkeit des VE-Cadherin-Antikörpers für die Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

Zum einen wurde ein polyklonaler Kaninchen(rabbit)-Antikörper, zum anderen ein monoklonaler Maus(mouse)-Antikörper getestet.

Hierbei war wie bei dem P1H12-Antikörper vor allem der durch den verwendeten mit FITC gekoppelten Sekundärantikörper entstehende Hintergrund zu beurteilen. Auch hier war es Ziel eine Konzentration zu finden, die es zuließ, die Endothelzellen eindeutig als positiv zu identifizieren und die gleichzeitig einen so geringen Hintergrund verursachte, dass die

PIH12-positiven Zellen nicht überlagert wurden und somit keine falsch positiven Ergebnisse auftraten.

Zu diesem Zwecke wurden auch hier Objektträger mit unterschiedlicher Zellzahl der HUVECs hergestellt und mit beiden VE-Cadherin-Antikörpern angefärbt. Nun wurden ebenfalls Objektträger erstellt, auf die verschiedene Verdünnungsstufen von HUVECs gemischt mit mononukleären Zellen (MNCs) in unterschiedlicher Dichte aufgebracht wurden. Die MNCs wurden wieder aus Buffy Coats gewonnen, welche von der Blutbank des UKE bereitgestellt wurden. Nun wurden die VE-Cadherin-Antikörper in Verdünnungen von 1:25 bis 1:350 und parallel hierzu der mit FITC gekoppelte Sekundärantikörper in Verdünnungen von 1:100 bis 1:350 getestet. Diese Vorversuche zeigten eine geeignete Verdünnung von 1:200 für beide VE-Cadherin-Antikörper und 1:150 für den Sekundärantikörper.



**Abbildung 8: VE-Cadherin (mouse)-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung**

Zudem erfolgte die Färbung an Negativ-Kontrollen, die nur aus mononukleären Zellen bestanden. Es stellte sich heraus, dass der polyklonale (rabbit)-Antikörper unspezifischer an die mononukleären Zellen band und somit keine eindeutige Entscheidung zwischen Positiv- und Negativereignis zuließ. Dies führte zu der Entscheidung, diesen nicht weiter zu nutzen.

**Tabelle 8: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper VE-Cadherin (rabbit) und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper (MNCs: mononukleäre Zellen)**

<b>VE-Cadherin (rabbit) - FITC</b>		
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	VE-Cadherin positive HUVECs	VE-Cadherin positive mononukleäre Zellen
nur HUVECs (100.000 Zellen/Objektträger)	83%	0
1:1.000 (100.000 Zellen/Objektträger)	80%	bindet unspezifisch an alle MNCs
nur mononukleäre Zellen	0	bindet unspezifisch an alle MNCs

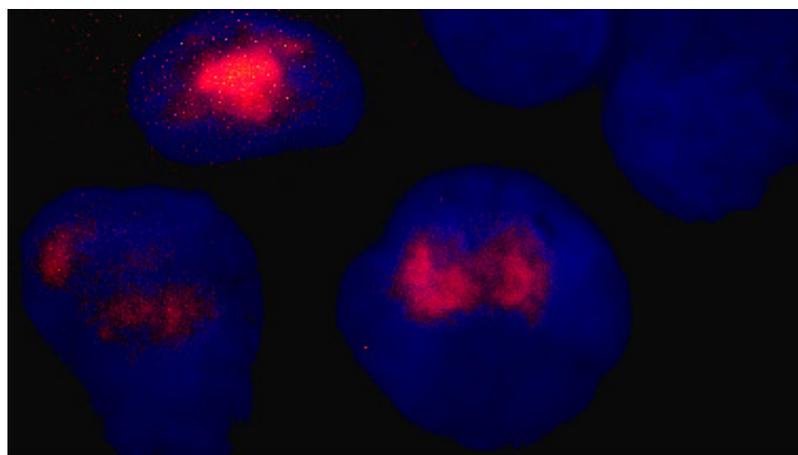
Bei dem monoklonalen Antikörper zeigte sich, dass dieser in bis zu einem Prozent der Fälle unspezifisch an die untersuchten mononukleären Zellen band. Dies würde bei den sehr geringen Zahlen der zu erwartenden Endothelzellen (0,0001% - 0,01% der im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen) zu einem Problem werden, denn mit diesem Antikörper hätte man mehr falsche Positivereignisse, als zirkulierende Endothelzellen zu erwarten wären. Somit fiel der Entschluss, diesen Antikörper zwar noch in den Doppelfärbungen weiter zu testen, aber ihn nicht für die endgültigen Färbungen an den Studienpatienten zu verwenden.

**Tabelle 9: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper VE-Cadherin (mouse) und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper**

<b>VE-Cadherin (mouse)-FITC</b>		
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	VE-Cadherin positive HUVECs	VE-Cadherin positive mononukleäre Zellen
nur HUVECs (100.000 Zellen/Objektträger)	78%	0
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	79%	0,1-1%
nur mononukleäre Zellen	0	0,1-1%

### 4.1.3 KI67

Um eine Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Proliferationsmarker KI67 zu etablieren, wurden Objektträger hergestellt, auf die zum einen HUVECs in unterschiedlicher Dichte aufgebracht wurden, zum anderen Objektträger mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von HUVECs und mononukleären Zellen in unterschiedlicher Dichte.



**Abbildung 9: KI67-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung**

An diesen Objektträgern wurde der KI67-Antikörper nacheinander gefärbt. Hier wurde insbesondere auf den durch den mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper auftretenden Hintergrund geachtet.

Die Hintergrundfärbung musste so gering sein, dass die proliferierenden Zellen als solche eindeutig zu identifizieren waren. Hierfür wurde der KI67-Antikörper in Verdünnungen von 1:50 bis 1:250 und parallel hierzu der Sekundärantikörper in Verdünnungen von 1:100 bis 1:500 getestet.

Hier zeigte sich eine ideale Konzentrationen von 1:100 für den KI67-Antikörper und 1:300 für den Sekundärantikörper.

Bei diesen Färbungen war zu beobachten, dass, wie bei den aus einer Kultur stammenden Endothelzellen zu erwarten war, über 40 % der HUVECs KI67-positiv waren. Zudem waren annähernd 10 % der mononukleären Zellen KI67-positiv. Da KI67 für eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung genutzt werden sollte, wurde nicht weiter untersucht welche Subpopulation der mononukleären Zellen KI67 exprimiert.

**Tabelle 10: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper KI67 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper**

<b>KI67 - Texas Red</b>		
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	KI67-positiv HUVECs	KI67-positiv mononukleäre Zellen
nur HUVECs (10.000 Zellen/Objektträger)	40%	
1:20 (500.000 Zellen/Objektträger)	47%	9%
1:1000 (50.000 Zellen/Objektträger)	49%	8%
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	45%	7%

#### 4.1.4 CD106

Der Aktivitätsmarker CD106 wurde zunächst an unbehandelten HUVECs getestet. Hierfür wurden HUVECs in unterschiedlicher Zellzahl auf die Objektträger aufgebracht. Nach den erfolgten Färbungen wurden Objektträger hergestellt, auf die verschiedene Verdünnungsstufen von HUVECs in mononukleären Zellen aufgebracht wurden. Nun wurde der CD106-Antikörper in Verdünnungen von 1:25 bis 1:200 und parallel der mit Texas Red gekoppelte Sekundärantikörper von 1:100 bis 1:500 getestet. Hier fiel wieder ein besonderes Augenmerk auf den durch den Texas Red verursachten Hintergrund bei gleichzeitiger eindeutiger Identifikation der CD106-positiv Zellen. Gute Ergebnisse wurden mit der

Konzentration 1:25 für den CD106-Antikörper und 1:300 für den Sekundär-Antikörper erzielt.

**Tabelle 11: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD106 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper**

<b>CD106-Texas Red</b>		
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	CD106 positive HUVECs	CD106 positive mononukleäre Zellen
nur HUVECs (10.000 Zellen/Objektträger)	20%	0%
nur HUVECs (50.000 Zellen/Objektträger)	12%	0%
1:10 (100.000 Zellen/Objektträger)	14%	0%
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	9%	0%

Um den Antikörper auf seine Fähigkeit zur Darstellung von aktivierten Zellen zu überprüfen, wurde dieser an Cytospins mit TNF-alpha aktivierten HUVECs getestet.

Hier bestätigte sich der Antikörper als Aktivitätsmarker.

**Tabelle 12: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD106 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper an TNF-alpha aktivierten HUVECs**

<b>CD106-Texas Red</b>	
TNF-alpha aktivierte HUVECs auf den Objektträgern	CD106-positive TNF-alpha aktivierte HUVECs
10.000 Zellen/Objektträger	75%
100.000 Zellen/Objektträger	83%

#### 4.1.5 CD62-E

Nachdem an dem Aktivitätsmarker CD106 gezeigt werden konnte, dass sich TNF-alpha-aktivierte HUVECs gut eignen, um weitere Aktivierungsmarker zu testen, wurden Objektträger mit TNF-alpha vorbehandelten HUVECs erstellt und der CD62-E-Aktivitätsmarker direkt auf diesen getestet.

Für die Kombination aus dem Primärantikörper CD62-E und dem Sekundärantikörper, der mit Texas Red gelabelt war, ergaben die in Vorversuchen getesteten Verdünnungsreihen (1:25 bis 1:200 für den CD62-E-Antikörper und 1:100 bis 1:500 für den Sekundär-Antikörper) gute Ergebnisse in den Konzentrationen 1:50 (CD62- E) und 1:300 (Texas Red).

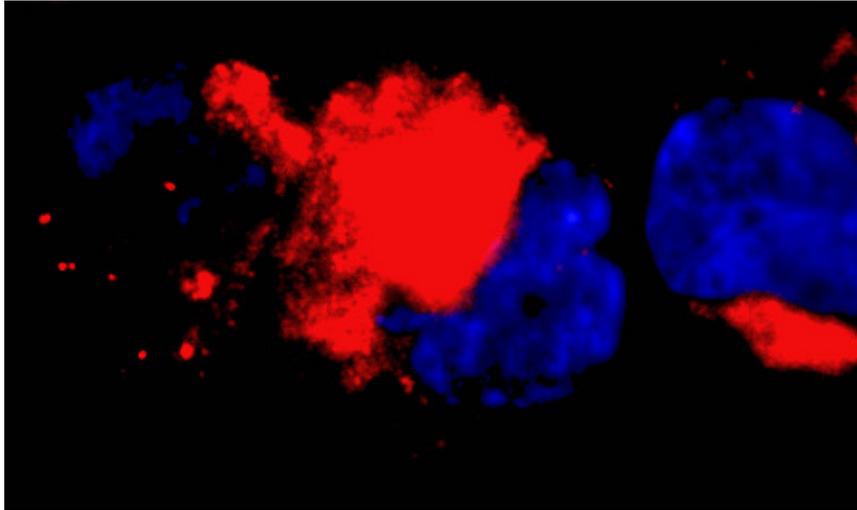


Abbildung 10: CD62-E-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung

Auch für diesen Aktivierungsmarker konnte somit gezeigt werden, dass er sich für die Darstellung aktivierter Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung eignet.

Tabelle 13: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD62-E und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper

CD62-E - Texas Red	
TNF-alpha-aktivierte HUVECs auf den Objektträgern	CD62-E-positive TNF-alpha-aktivierte HUVECs
10.000 Zellen/Objektträger	68%
100.000 Zellen/Objektträger	62%

#### 4.1.6 Caspase-3

Um einen Apoptosemarker für die Immunfluoreszenzfärbung nutzen zu können, wurde der Caspase-3-Antikörper auf seine Tauglichkeit untersucht. In Anlehnung an das Färbeprotokoll des Caspase-3-Antikörpers der Firma Cell Signaling wurde unter unterschiedlichen Bedingungen nach verschiedenen Protokollen gefärbt.

Der Apoptosemarker wurde an auf Objektträger aufgebrachten HUVECs getestet. Zum einen an nicht vorbehandelten HUVECs, zum anderen an solchen, die in Hungermedium kultiviert worden waren und demzufolge eine höhere Apoptoserate erwarten ließen. Zudem wurde eine Fixierung mit Methanol einer Vorbehandlung mit PBS gegenübergestellt.

Die Färbungen wurden sowohl im Kühlraum bei 4°C als auch bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Färbungen mit dem Caspase-3-Antikörper wurde das Färbeprotokoll für den KI67-Antikörper als Grundlage verwendet.

Diese Färbungen blieben alle erfolglos. Entweder war der Hintergrund zu stark oder der Caspase-3-Antikörper band an keine Zelle oder er band unspezifisch an alle.

So musste der Entschluss gefasst werden, dass dieser Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung nicht geeignet ist.

**Tabelle 14: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Caspase-3 Antikörper**

<b>Caspase- 3</b>	<b>Ergebnis</b>
<b>gefärbt nach dem KI67-Protokoll</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>Hungernde HUVECs auf Chamberslides,</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>18 Std Färbung</b>	
<b>17 Std Kühlschrank</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>17 Std Rüttler bei Raumtemperatur</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>16 Std Kühlschrank</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>16 Std Raumtemperatur</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>Methanol vorbehandelt</b>	keine brauchbaren Ergebnisse
<b>PBS vorbehandelt</b>	keine brauchbaren Ergebnisse

## 4.2 HUVECs - Doppelfärbung

Nachdem die verschiedenen Antikörper einzeln auf ihre Einsetzbarkeit überprüft wurden, wurden diese nun in verschiedenen Kombinationen in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung untersucht.

Ziel war es, mit der Doppelfärbung die Endothelzellen nicht nur zu detektieren, sondern, je nachdem, welcher weitere Antikörper eingesetzt wurde, auch genauer zu analysieren.

Da sich in den Einzelfärbungen der P1H12-Antikörper als der am besten reproduzierbare Endothelzellmarker bestätigt hatte, wurde dieser Antikörper zunächst in Kombination mit dem Proliferationsmarker KI67 und dem Aktivierungsmarker CD106 getestet.

Anhand von Objektträgern, die mit HUVECs gespickt waren und in verschiedener Dichte hergestellt wurden, sowie Objektträgern mit einer Verdünnung aus HUVECs und mononukleären Zellen konnte gezeigt werden, dass sich diese Antikörper auch gut auf die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung übertragen lassen.

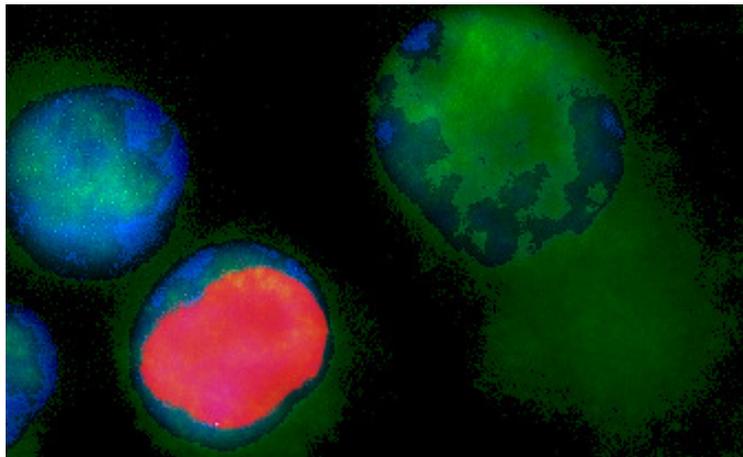


Abbildung 11: P1H12- und KI67-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung

In diesen Versuchen wurde zunächst nach dem Protokoll des Proliferationsmarkers KI67 gefärbt und in einem zweiten Schritt nach dem Protokoll für den Endothelzellmarker P1H12. Zwischen beiden Färbungen wurde der Schritt des Eindeckelns weggelassen, zudem wurde für den Schritt der P1H12-Färbung ein Antikörper genutzt, der direkt mit dem Sekundärantikörper gelabelt war. Dies war notwendig, da beide Primärantikörper aus der Maus gewonnen worden waren und es so zu falsch positiven Ergebnissen für den Endothelzellmarker hätte kommen können.

Tabelle 15: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern KI67 und P1H12 und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC)

KI67-Texas Red P1H12-FITC			
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	HUVECs positiv auf P1H12	HUVECs positiv auf KI67	HUVECs positiv auf P1H12 und KI67
nur HUVECs (10.000 Zellen/Objektträger)	91%	35%	33%
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	93%	31%	31%

Es zeigte sich, dass in über 90% der Fälle die HUVECs positiv auf den P1H12-Antikörper reagierten und in circa 30% der Fälle positiv auf den KI67-Antikörper. Zudem waren die HUVECs in über 30% der Fälle doppelt positiv auf beide Antikörper.

Diese nun etablierte Färbung ermöglichte die Detektion der Endothelzellen bei gleichzeitiger Aussage, ob die entsprechende Zelle proliferierte oder nicht.

Die Kombination der Primärantikörper CD106 und P1H12 wurde ebenfalls an Objektträgern mit HUVECs und einer Verdünnung von HUVECs mit mononukleären Zellen getestet. Auch hier ließen sich die Ergebnisse der Einzelfärbungen reproduzieren. In diesen Versuchen wurde zunächst nach dem Protokoll des Aktivierungsmarkers CD106 gefärbt und in einem zweiten Schritt nach dem Protokoll für den Endothelzellmarker P1H12. Zwischen beiden Färbungen wurde der Schritt des Eindeckelns weggelassen, zudem wurde für den Schritt der P1H12-Färbung ein Antikörper genutzt, der direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt war. Dies war notwendig, da beide Primärantikörper aus der Maus gewonnen worden waren und es so zu falsch positiven Ergebnissen hätte kommen können.

**Tabelle 16: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern CD106 und P1H12 und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC)**

<b>CD106-Texas Red-P1H12-FITC</b>			
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	HUVECs positiv auf P1H12	HUVECs positiv auf CD106	HUVECs positiv auf P1H12 und CD106
nur HUVECs (10.000 Zellen/Objektträger)	95%	15%	14%
1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	99%	17%	15%

Es zeigte sich, dass in über 90% der Fälle die HUVECs positiv auf den P1H12-Antikörper und in cirka 16% auf den CD106-Antikörper reagierten. Zudem waren die HUVECs in cirka 15% der Fälle doppelt positiv auf beide Antikörper.

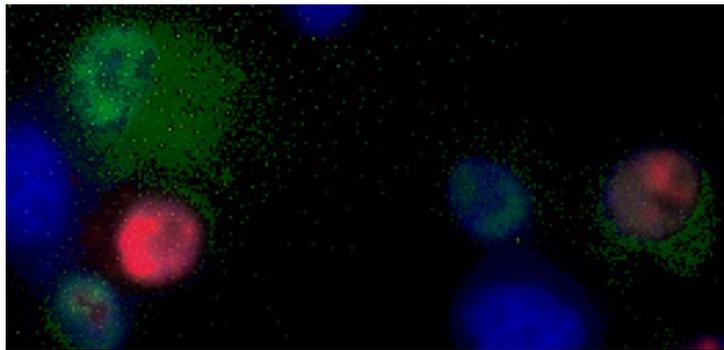
Dass die HUVECs in unter 20% der Fälle positiv auf den Aktivierungsmarker CD106 reagierten, erklärt sich dadurch, dass diese vorher nicht durch zum Beispiel TNF-alpha aktiviert wurden.

Diese nun etablierte Färbung ermöglichte die Detektion der Endothelzellen bei gleichzeitiger Aussage, ob die entsprechende Zelle aktiviert war oder nicht.

Schon in den Einzelfärbungen wurde deutlich, dass der polyklonale Kaninchen-VE-Cadherin-Antikörper aufgrund der unspezifischen Bindung an die mononukleären Zellen nicht geeignet war. Auch bei dem monoklonalen Maus-VE-Cadherin-Antikörper kam es aufgrund der in 0,1% bis 1% auftretenden unspezifischen Bindung an die mononukleären Zellen der hergestellten Objektträger zu Problemen. Diese unspezifische Bindung bedeutete, dass es zu

mehr falsch positiven Ergebnissen kommen würde, als zirkulierende Endothelzellen zu erwarten wären. Es erschienen dennoch die Ergebnisse einer Doppelfärbung mit dem monoklonalen VE-Cadherin-Antikörper von Interesse. Für diese Versuche wurde der Endothelzellmarker VE-Cadherin (mouse) mit dem Proliferationsmarker KI67 und dem Aktivierungsmarker CD62-E kombiniert.

Die Kombination des Endothelzellmarkers VE-Cadherin mit dem Proliferationsmarker KI67 wurde beispielhaft an Objektträgern mit HUVECs getestet.



**Abbildung 12: Färbung mit VE-Cadherin (mouse) und KI67, 25-fache Vergrößerung**

Hier zeigte sich, dass sich die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Einzelfärbungen reproduzieren ließen. In 79% der Fälle waren die HUVECs positiv auf VE-Cadherin und in 22% der Fälle positiv auf KI67, zudem in 12% der Fälle doppelt positiv auf beide Antikörper. Diese Ergebnisse entsprachen den vorher erwarteten und zeigten, dass es möglich ist, diese Antikörper in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zu kombinieren.

**Tabelle 17: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern KI67 und VE-Cadherin und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC)**

<b>KI67-Texas Red-VE-Cadherin-FITC</b>			
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs/mononukleäre Zellen)	HUVECs positiv auf VE-Cadherin	HUVECs positiv auf KI67	HUVECs positiv auf VE-Cadherin und KI67
nur HUVECs (100.000/Objektträger)	79%	22%	12%

Um die Kombination des Endothelzellmarkers VE-Cadherin mit dem Aktivierungsmarker CD62-E zu testen, wurden Objektträger genutzt, auf die zum einen TNF-alpha aktivierte HUVECs in einer Verdünnung mit mononukleären Zellen aufgebracht wurden und zum anderen unvorbehandelte HUVECs ebenfalls in einer Verdünnung mit mononukleären Zellen.

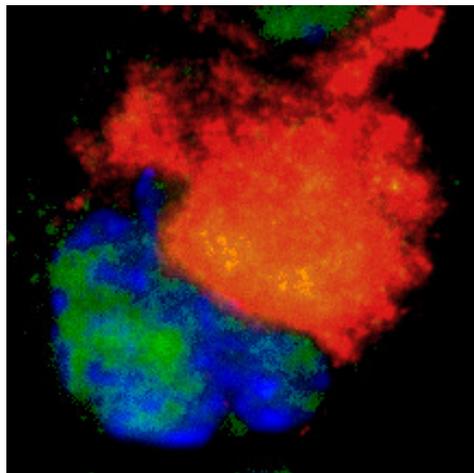
Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Immunfluoreszenz-Einzelfärbungen der beiden Antikörper als Kombination beider in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung übertragen ließ.

Bei den TNF-alpha vorbehandelten HUVECs zeigte sich wie zu erwarten, dass diese in 46% der Fälle positiv auf den Aktivierungsmarker CD62-E reagierten und zudem in 88% auf den Endothelzellmarker VE-Cadherin. Zudem waren sie in 41% doppelt positiv auf die beiden Antikörper.

**Tabelle 18: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern CD62-E und VE-Cadherin und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC)**

<b>CD62- E-TexasRed-VE-Cadherin-FITC</b>			
Verdünnung auf den Objektträgern (HUVECs bzw. TNF-alpha aktivierte HUVECs/ mononukleäre Zellen)	HUVECs positiv auf VE-Cadherin	HUVECs positiv auf CD62- E	HUVECs positiv auf VE-Cadherin und CD62- E
TNF-alpha aktivierte HUVECs (10.000 Zellen/Objektträger)	88%	46%	41%
HUVECs 1:1000 (100.000 Zellen/Objektträger)	75%	12%	9%

Grundsätzlich war also eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des Endothelzellmarkers VE-Cadherin (mouse) mit dem Proliferationsmarker KI67 und VE-Cadherin mit dem Aktivierungsmarker CD62-E möglich.



**Abbildung 13: VE-Cadherin (mouse)- und CD62-E-positive HUVEC, 100-fache Vergrößerung**

### 4.3 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung

Für die Detektion der zirkulierenden Endothelzellen fiel die Wahl auf die bereits etablierte APAAP-Färbung. Aufgrund früherer guter Erfahrungen wurden die gesammelten Blutproben à 700.000 Zellen auf Objektträger aufgebracht.

#### 4.3.1 Validierung der Detektion von zirkulierenden Endothelzellen

Für die Überprüfung des Antikörpers P1H12 wurden Objektträger mit einer Mischung aus HUVECs und mononukleären Zellen aus Buffy Coats in einem Verhältnis 1:1000 hergestellt. Die HUVECs stellten als P1H12-positive Zellen die Positivkontrolle dar.

Für einen Referenzwert bei gesunden Patienten wurden zwei Proben von gesunden Probanden gesammelt und diese nach der APAAP-Methode gefärbt. Bei diesen Proben wurde nur eine sehr geringe Zahl zirkulierender Endothelzellen (0,0001% - 0,01% der mononukleären Zellen (Khan *et al.*, 2005)) erwartet.

Um eine höhere Anzahl von Zellen beurteilen zu können, wurden jeweils drei Objektträger zusammengefasst und deren Mittelwert berechnet. Das heißt, es wurden jeweils 2.100.000 Zellen begutachtet.

Wie zu erwarten, konnten bei den gesunden zwei Probanden keine P1H12 positiven Zellen nachgewiesen werden. Bei den Objektträgern, auf die die Verdünnung der HUVECs in mononukleären Zellen aufgebracht wurde, konnte gezeigt werden, dass die HUVECs durchweg positiv auf den P1H12-Antikörper reagierten. So waren in einer Verdünnung von 1:1000 bei 700.000 Zellen 700 HUVECs, die morphologisch eindeutig identifiziert werden konnten, positiv auf den Endothelzellmarker P1H12.

**Tabelle 19: APAAP-Färbung von gesunden Probanden und mit einer Verdünnung von HUVECs mit mononukleären Zellen**

<b>APAAP- Färbung (P1H12)</b>	
<b>Proben</b>	<b>P1H12 positive Zellen</b>
gesunde Probanden	negativ auf P1H12
HUVECs/mononukleäre Zellen (1:1000)	700 Zellen

### 4.3.2 Detektion von zirkulierenden Endothelzellen bei Tumorpatienten mit soliden Tumoren

Es wurden Blutproben von acht Tumorpatienten mit soliden Tumoren gesammelt und die mononukleären Zellen auf Cytospins zentrifugiert.

Auch hier wurden je drei Objektträger à 700.000 Zellen, also 2.100.000 Zellen pro Patient, gefärbt und der Mittelwert gebildet.

Diese wurden nach der APAAP-Methode mit dem Antikörper P1H12 gefärbt und ausgewertet.

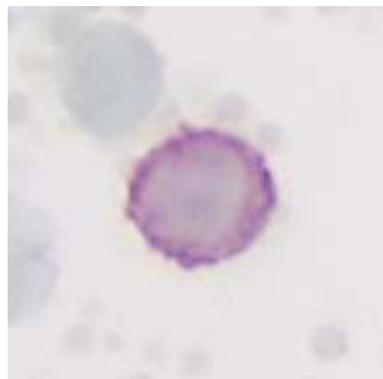


Abbildung 14: APAAP-Färbung (400-fache Vergrößerung), P1H12-positive Endothelzelle

Bei der Auswertung zeigte sich, dass, wie zu erwarten, nur geringe Zahlen von zirkulierenden Endothelzellen nachzuweisen waren.

Tabelle 20: Patienten mit soliden Tumoren, gefärbt nach der APAAP-Methode mit dem P1H12-Antikörper

Solide Tumore		
Patienten Nummer	Diagnose	P1H12 positive Zellen (pro 2.1Mio Zellen)
1	Mamma-CA	0
2	V.a. Nieren-CA	0
3	Magen-CA	7
4	rez. Mamma-CA	18
5	met. Nierenzell-CA	1
6	Appendix-CA, Peritoneal Carcinose	0
7	met. Prostata-CA	0
8	met. Mamma-Ca	1

Es waren vier Proben positiv auf CECs und diese zudem in sehr geringer Anzahl; in einem Fall 18 CECs pro 2.100.000 angefärbter mononukleärer Zellen, in den anderen drei positiven Proben zwischen 1 und 7 CECs pro 2.100.000 mononukleärer Zellen.

Die vier Proben, die positiv auf den P1H12-Antikörper reagierten und dementsprechend zirkulierende Endothelzellen aufwiesen, wurden für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung genutzt.

### **4.3.3 Detektion von zirkulierenden Endothelzellen bei Sunitinib (SU011248)-therapierten Studienpatienten**

Den 14 Patienten mit Hypernephrom, die innerhalb der Studie mit Sunitinib behandelt wurden, wurde am Tag 1 vor Medikamentengabe und am Tag 28 des Therapiezyklus` peripheres Blut abgenommen und auch bei diesen Proben je 700.000 mononukleäre Zellen auf Cytospins zentrifugiert.

Zu den beiden Zeitpunkten wurden jeweils drei Objektträger, das entspricht circa 2.100.000 Zellen, mit dem Antikörper P1H12 angefärbt und ausgewertet.

Bei der Auswertung der Färbungen zeigte sich, dass die nach der APAAP-Methode mit dem P1H12 Antikörper gefärbten Zellen trotz positiver Positivprobe (HUVECs) und mehrmaligem Wiederholen der Färbungen, negativ auf diesen Antikörper reagierten und somit mit dieser Methode weder vor Therapiebeginn noch am Tag 28 zirkulierende Endothelzellen nachweisbar waren.

Dies bedeutete, dass die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung nicht auf die Studienpatienten angewendet werden konnte.

## **4.4 Analyse der Endothelzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

Für die Analyse zirkulierender Endothelzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung sollten zunächst die Proben der vier Patienten mit soliden Tumoren mit der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gefärbt werden, bei denen aufgrund der vorangegangenen APAAP-Färbung CECs zu erwarten waren.

Bei der nun folgenden Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte sich, dass bei einer Dichte von 700.000 Zellen pro Objektträger die Zellen zu eng beieinander liegen und sich zudem in vielen Fällen überlagern. Diese Überlagerung verursacht bei der APAAP-Methode durch die

Kombination aus automatischer und manueller Auswertung und der Nutzung von nur einem Antikörper geringe Probleme, bei der rein manuellen Methode der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung hingegen konnte durch diese Überlagerung und der Nutzung zweier Antikörper ein Positivereignis nicht mehr sicher einer einzelnen Zelle zugeordnet werden. Außerdem führte die hohe Dichte der Zellen dazu, dass der jeweilige Sekundärantikörper trotz der hohen Verdünnung einen zu starken Hintergrund erbrachte und somit nicht mehr zwischen Positiv- und Negativereignissen unterschieden werden konnte. Auch neu angesetzte Versuche in unterschiedlich hohen Verdünnungen sowohl für die beiden Primärantikörper als auch für beide Sekundärantikörper lieferten keine Ergebnisverbesserung.

Diese Schwierigkeiten ließen sich nicht überbrücken, somit musste bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung Abstand von den Cytospins mit je 700.000 Zellen genommen werden

## 5 Diskussion

Das Nierenzellkarzinom macht cirka drei Prozent aller Karzinome weltweit aus (Ferlay *et al.*, 2010). Durch weit verbreitete Nutzung verbesserter bildgebender Verfahren werden sie inzwischen früher in ihrer Entwicklung entdeckt.

Zum Monitoring der Behandlungseffektivität einer Therapie, als Prognosefaktor und bei der Nachsorge spielen Biomarker eine immer bedeutendere Rolle. So ist zum Beispiel bei Erkrankungen wie dem Prostatakarzinom der Biomarker PSA (Prostata-spezifisches Antigen) oder CA125 beim Ovarialkarzinom als prognostischer Biomarker bekannt. Für das Nierenzellkarzinom fehlt ein solcher Marker bisher (Ljungberg *et al.*, 2007).

Auf der Suche nach einem entsprechenden Marker fiel der Fokus auf die Tumor-Neovaskularisation. Diese spielt eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum und dessen Metastasierung (Carmeliet and Jain, 2000), insbesondere beim Nierenzellkarzinom, das von Natur aus in hohem Maße vaskularisiert ist (Wang *et al.*, 2006).

Kleinere Tumore können sich über Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, dies wird allerdings ineffektiv, sobald die Tumorzellen weiter als 100 bis 200  $\mu\text{m}$  von einem Blutgefäß entfernt liegen (Carmeliet and Jain, 2000).

Ab einem Durchmesser von 1-2  $\text{mm}^3$  müssen Tumore für eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung an das Blutgefäßsystem angeschlossen werden (Naumov *et al.*, 2006).

Lange wurde angenommen, dass die Neovaskularisierung des Tumors ausschließlich durch Angiogenese geschieht. Bei der Angiogenese gehen die Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen hervor (Carmeliet, 2003). Damit Gefäßsprosse entstehen, muss die Basallamina zunächst abgebaut werden. Für diese Vorgänge ist eine Vielzahl von Faktoren und Rezeptoren erforderlich. Die wichtigsten gehören zu der Familie des VEGF (vascular endothelial growth factor) (Ferrara *et al.*, 2003).

Ein verwandter aber entscheidend anderer Vorgang der Blutgefäßbildung ist die Vaskulogenese. Dieser Begriff beschreibt eine Neuausbildung von Blutgefäßen durch aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen, welche unabhängig von bestehenden vaskulären Strukturen abläuft (Risau and Flamme, 1995). Der Begriff Vaskulogenese war für Prozesse im Embryo reserviert, heute wird jedoch angenommen, dass sowohl Angiogenese als auch Vaskulogenese eine Rolle bei der Tumolvaskularisation spielen (Asahara *et al.*, 1999). Bei der Vaskulogenese werden unreife Endothelprogenitorzellen durch Zytokine aus dem Knochenmark mobilisiert. Diese gelangen in die Tumorgefäße, proliferieren und differenzieren sich in reife Endothelzellen, integrieren sich in Blutgefäße und führen dadurch zu einer Zunahme des Gefäßbettes.

Unterstrichen wird die entscheidende Rolle der Vaskularisation beim Nierenzellkarzinom durch die Einführung einer anti-angiogenen Therapie. Ein Medikament dieser Klasse ist Sunitinib. Sunitinib hemmt verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dies sind unter anderen die Rezeptoren für PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), Kit (stem-cell factor (SCF)), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und RET (glial cell-line derived neurotrophic factor) (Izzedine *et al.*, 2007). Diese Rezeptoren werden mit dem Tumorwachstum, der pathologischen Angiogenese und der Entwicklung von Metastasen bei Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (Heinrich *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002; Gilliland and Griffin, 2002; Gale and Yancopoulos, 1999).

Die Einführung der anti-angiogenen Therapie unterstützt damit den Ansatz, die Tumor-Vaskularisation als möglichen Ansatz für einen Marker der Tumorentwicklung voranzutreiben. Verschiedene Möglichkeiten wie die Gefäßdichtemessung kleiner Gefäße (microvessel density – MVD) (Yoshino *et al.*, 1998) oder VEGF (Jacobsen *et al.*, 2000) als Biomarker zur Beurteilung des Krankheitsstadiums wurden schon früher diskutiert.

In den letzten Jahren ist der Fokus auf zwei Zellpopulationen in ihrer Rolle als Surrogatmarker für die Tumor-Neovaskularisation gefallen: zum einen auf die zirkulierenden Endothelzellen (circulating endothelial cells – CECs) und zum anderen auf die zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (circulating endothelial progenitors – CEPs).

Es konnte gezeigt werden, dass es im peripheren Blut von Erwachsenen zirkulierende Vorläuferzellen gibt, die aus dem Knochenmark entstammen (Asahara *et al.*, 1997). Asahara *et al.* waren die ersten, die die CEPs aus humanem Blut mit Hilfe von CD34-Antikörpern (einem Marker für hämopoetische Stammzellen) isolieren konnten. Mit der Nutzung von CD133, einem Antigen, welches primitive Stammzellen identifiziert, ließ sich der Rückschluss ziehen, dass die CEPs eine unreife Form der zirkulierenden Endothelzellen darstellen. Zudem wird vermutet, dass die CEPs eine Rolle in der Formation neuer Blutgefäße durch Vaskulogenese spielen (Rafii *et al.*, 2002). In der adulten Vaskulogenese können sich diese Vorläuferzellen in reife Endothelzellen differenzieren und werden deshalb zirkulierende endotheliale Progenitorzellen genannt (Aicher *et al.*, 2007).

Der Zusammenhang von CEPs und Tumorwachstum wurde in verschiedenen Studien untersucht. So haben Peters *et al.* anhand der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) nachgewiesen, dass bis zu 12,1% der endothelialen Zellen der Blutgefäße des Tumors aus dem Knochenmark stammen (Peters *et al.*, 2005). Dieser Nachweis wurde bei Patienten erbracht, die nach einer Knochenmarktransplantation von einem Spender des anderen Geschlechts einen Tumor entwickelten. Multicolor FISH mit X- oder Y-Chromosom-

spezifischen Sonden wurde mit Fluoreszenz-Antikörper-Färbung kombiniert. Endotheliale Zellen wurden mit einem Antikörper gegen von Willebrand Faktor (vWF) und Leukozyten mit CD45 und CD44-Antikörper identifiziert. Endothelzellen (vWF + CD45-) wurden als Spenderzellen eingestuft, wenn sie ein Y-Chromosom FISH-Signal (bei Mann-zu-Frau-Transplantationen) oder zwei X-Chromosom FISH-Signale (in Frau-zu-Mann-Transplantationen) enthielten.

Zudem wurden CEPs unter anderem in Zusammenhang mit einem murinem Neuroblastom-Modell (Davidoff *et al.*, 2001) und Lymphomen (Lyden *et al.*, 2001) gebracht.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der anderen Zellpopulation, den zirkulierenden Endothelzellen.

Bei gesunden Probanden sind CECs normalerweise nur in geringen Zahlen im peripheren Blut zu finden (0,0001% - 0,01% der mononukleären Zellen) (Khan *et al.*, 2005). Ein vermehrtes Vorkommen der zirkulierenden Endothelzellen ist bei immunologischen und kardiovaskulären Erkrankungen (wie z.B. Sichelzellanämie (Solovey *et al.*, 1997) und akuter Myokardinfarkt (Mutin *et al.*, 1999)), Infektionen (z.B. Cytomegalievirusinfektion (Grefte *et al.*, 1993)) und neoplastischen Prozessen (Mancuso *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Beerepoot *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003) deutlich erhöht. Es wird angenommen, dass frei zirkulierende Endothelzellen aus den Wänden der Gefäße herausgelöst wurden (Goon *et al.*, 2005). Letztlich ist aber der genaue Ursprung der Endothelzellen unbekannt. Auch über den exakten Mechanismus der Freisetzung, zum Beispiel durch Einwirkung von Zytokinen, gibt es nur Spekulationen.

In dieser Arbeit sollten zirkulierende Endothelzellen aus Patienten der Studie SU11248 mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom detektiert und analysiert werden.

Vorbereitend wurde hierfür eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung anhand von humanen endothelialen Zellen aus der Umbilikalvene (human umbilical vein endothelial cells – HUVECs) etabliert.

Seitdem Jaffe *et al* erfolgreich HUVECs kultivierten, konnten diese als Prototyp für reife Endothelzellen und auch als Positivkontrolle für zirkulierende Endothelzellen genutzt werden (Jaffe *et al.*, 1973).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Endothelzellmarker P1H12 und VE-Cadherin, der Proliferationsmarker KI67, die Aktivitätsmarker CD106 und CD62-E sowie der Apoptosemarker Caspase-3 bezüglich ihrer Tauglichkeit für diese Färbung untersucht.

Die Kombination dieser Marker in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung sollte eine genauere Analyse der Endothelzellen ermöglichen.

Anhand der Versuche mit den HUVECs und den erstellten Verdünnungsreihen konnte gezeigt werden, dass sich der P1H12-Antikörper sehr gut für die Immunfluoreszenzfärbung eignete (93% P1H12 positive HUVECs).

Der Aktivitätsmarker CD106 wurde anhand von HUVECs und TNF-alpha-aktivierten HUVECs überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass CD106 deutlich höher auf den TNF-alpha-aktivierten HUVECs (79% CD106 positive HUVECs) als bei den unbehandelten (27% CD106 positive HUVECs) exprimiert wurde und somit die zu erwartenden Ergebnisse bestätigte.

Die TNF-alpha vorbehandelten HUVECs wurden nach diesen positiven Ergebnissen genutzt, um auch den anderen Aktivierungsmarker, CD62-E, zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser sich ebenfalls für die Färbung aktivierter Endothelzellen eignete (53% positive TNF-alpha aktivierte HUVECs).

Auch der Proliferationsmarker KI67 wurde erfolgreich getestet (41% KI67 positive HUVECs und 8% KI67 positive mononukleäre Zellen).

Bei dem zweiten Endothelzellmarker VE-Cadherin konnte zunächst gezeigt werden, dass er ebenfalls die Endothelzellen zuverlässig darstellte (78% VE-Cadherin positive HUVECs). Es stellte sich allerdings heraus, dass er zudem 0,1 bis 1% der mononukleären Zellen anfärbte.

Da nur eine sehr geringe Anzahl an CECs (0,0001% - 0,01% der mononukleären Zellen (Khan *et al.*, 2005)) in den zu untersuchenden Proben zu erwarten war, bedeutete dies, dass mehr falsch positiv gefärbte Zellen auftauchen würden als zirkulierende Endothelzellen zu erwarten gewesen wären. So wurde dieser Antikörper zwar noch für weitere Versuche mit den Doppelfärbungen genutzt, aber für die Darstellung der zirkulierenden Endothelzellen wurde dieser aufgrund der zu erwartenden Irritationen durch die Anfärbung der mononukleären Zellen nicht weiter verwendet.

Die Färbungen mit dem Apoptosemarker Caspase-3 erbrachten trotz unterschiedlichster Färbeprotokolle und deren mehrfacher Überprüfung keine verwertbaren Ergebnisse. Es zeigte sich, dass der Antikörper entweder einen zu starken Hintergrund produziert oder der Caspase-3-Antikörper an keine Zelle oder aber unspezifisch an alle Zellen band, so dass dieser nach einigen Vorversuchen nicht weiter in diese Arbeit mit einbezogen wurde.

In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass sich die getesteten Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen auch für eine Immunfluoreszenz- Doppelfärbung eigneten.

Gute Ergebnisse lieferte der Endothelzellmarker P1H12 in Kombination mit dem Proliferationsmarker KI67 und dem Aktivierungsmarker CD106.

Es konnte gezeigt werden, dass sich für die drei Antikörper die Ergebnisse der vorher etablierten Einzelfärbung reproduzieren und sich auf eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung übertragen ließen. Dies ermöglichte nicht nur die Detektion der Endothelzellen mit dem P1H12-Antikörper, sondern auch eine Analyse der CECs, in diesem Falle unter der Fragestellung, ob sie aktiviert sind (CD106-Antikörper) oder proliferieren (KI67-Antikörper). Für den Endothelzellmarker VE-Cadherin konnte die grundsätzliche Tauglichkeit für eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde er beispielhaft in Kombination mit dem KI67-Antikörper und dem Aktivierungsmarker CD62-E getestet. Hier ließen sich die in den Einzelfärbungen erzielten Ergebnisse reproduzieren und auf eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung übertragen.

Somit war prinzipiell eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zur Detektion und Analyse hinsichtlich der Aktivierung und Proliferation der zirkulierenden Endothelzellen etabliert.

Ein anderer Schritt dieser Arbeit war es, mithilfe der APAAP(Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase)-Methode unter Nutzung des P1H12-Antikörpers die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen bei den Studienpatienten zu bestimmen.

Die APAAP-Methode und die folgende ACIS (automated cellular imaging system)-Auswertung bieten die Möglichkeit, den Objektträger automatisch auswerten zu lassen und anschließend jedes positive Ereignis am Computer beurteilen zu können. So können falsch angefärbte Partikel oder Zelltrümmer erkannt und aussortiert werden. Ein Nachteil dieser Methode muss darin gesehen werden, dass auch tote Zellen mit einer intakten Zellmembran angefärbt werden.

Im Rahmen der Studie wurden am Tag 1 des Therapiezyklus´ vor erster Medikamentengabe und am Tag 28 des Therapiezyklus´ periphere Blutproben entnommen und die mononukleären Zellen auf Cytospins zentrifugiert. Diese Proben konnten nun nach der APAAP-Methode mit dem P1H12-Antikörper, bei der HUVECs als Positivkontrolle mitgefärbt wurden, angefärbt und ausgewertet werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse über das Auftreten und die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen im peripheren Blut der Studienpatienten sollten mit dem nächsten Schritt, der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung, verglichen werden. Mit diesen durch die APAAP-Färbung gewonnenen Referenzwerte könnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gezielter nach den CECs gesucht, diese Zahlen mit der APAAP-Methode verglichen und zudem die CECs analysiert werden.

Bei der Auswertung der nach der APAAP-Methode gefärbten Blutproben der Studienpatienten zeigte sich, dass keine der Proben zirkulierende Endothelzellen aufwies. Schon die Vorversuche mit den Proben zweier gesunder Probanden und weitere acht Proben von Patienten mit soliden Tumoren, bei denen jeweils 2.100.000 Zellen angefärbt wurden, wiesen darauf hin, dass die CECs nur in sehr geringen Zahlen vorhanden waren. So waren die Proben der gesunden Probanden nach der APAAP-Methode beide negativ auf zirkulierende Endothelzellen. Bei den Proben der acht Patienten mit soliden Tumoren zeigte sich ebenfalls, dass nur bei vier Patienten CECs nachgewiesen werden konnten, zwei von ihnen in nur so geringer Anzahl (jeweils nur eine Zelle pro 2.100.000 gefärbter Zellen), dass diese auch falsch positiv sein könnten.

Das Problem des Nachweises der im peripheren Blut nur in sehr geringen Zahlen vorkommenden zirkulierenden Endothelzellen wird in der Literatur ausgiebig diskutiert.

Einen Ansatz stellen Verfahren zur Zellanreicherung dar. Viele Arbeitsgruppen nutzen Verfahren wie die Elimination roter Blutzellen (Hladovec *et al.*, 1978; Janssens *et al.*, 1999) oder die Konzentrierung der Zellen mittels Dichte-Zentrifugation (Percivalle *et al.*, 1993; Kas-Deelen *et al.*, 2000) oder Anreicherung durch immunomagnetische Verfahren (Bardin *et al.*, 1996; George *et al.*, 1993). Zur Darstellung der CECs werden monoklonale Antikörper gegen Zell-Oberflächen-Proteine in Verfahren wie der indirekten Immunfluoreszenz, der Immunzytochemie oder der Durchflusszytometrie eingesetzt. Bei gesunden Probanden ergibt dies zwischen null und zehn CECs pro Milliliter peripheres Blut (Dignat-George *et al.*, 2007). Aufgrund der verschiedenen genutzten Methoden und der unterschiedlichen untersuchten Krankheiten rangieren die CEC-Zahlen zwischen null Zellen pro Milliliter (Camoin-Jau *et al.*, 2000) und 39.000 Zellen pro Milliliter (Mancuso *et al.*, 2001) peripheres Blut.

Die Durchflusszytometrie scheint methodenbedingt höhere Ergebnisse zu liefern als die anderen Methoden. Bei dieser Methode werden bis zu 1.000-mal mehr CECs nachgewiesen als zum Beispiel bei der Anreicherung durch immunomagnetische Verfahren (Del Papa *et al.*, 2004; Mancuso *et al.*, 2001; Rajagopalan *et al.*, 2004). Eine Erklärung hierfür liegt methodenbedingt darin, dass unter anderem tote Zellen im FACS häufig in allen genutzten Farben leuchten, zudem auch Endotheliale-Mikropartikel mitgezählt werden, somit nicht intakte Endothelzellen zu deutlich höheren Zahlen führen (Blann *et al.*, 2005).

Einen grundsätzlichen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und der Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Endothelzellen konnten verschiedene Studien der letzten Jahre zeigen.

So haben zum Beispiel Mancuso *et al.*, die die CECs per Durchflusszytometrie maßen, eine fünffach erhöhte Anzahl zirkulierender Endothelzellen (39.100 CECs/ml) bei Patienten mit Brustkrebs (n = 46) und Lymphom (n = 30) im Vergleich zu gesunden Probanden (7.900 CECs/ml; n = 20) nachgewiesen (Mancuso *et al.*, 2001). In dieser Studie zeigte sich, dass die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen bei den Brustkrebspatienten mit und ohne Metastasierung keinen signifikanten Unterschied ergab, wohingegen eine Quadrantektomie (brusterhaltende chirurgische Entfernung) mit einer Reduzierung der CECs einherging. Zudem konnte gezeigt werden, dass Lymphom-Patienten mit kompletter Remission nach Chemotherapie (n = 7) CEC-Zahlen vergleichbar mit denen gesunder Probanden erreichten. Auch Beerepoot *et al.*, die eine Anreicherung durch immunomagnetische Verfahren nutzten, fanden eine 3,6-fache Erhöhung der zirkulierenden Endothelzellen (399 CECs/ml) bei Krebspatienten mit progredientem Verlauf (progressive disease) (n = 95) im Gegensatz zu Patienten in einem stabilen Zustand (stable disease) (n = 17), die vergleichbare Zahlen mit gesunden Probanden (121 CECs/ml) (n = 46) aufwiesen (Beerepoot *et al.*, 2004).

Norden-Zfoni *et al.* konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine zweifach höhere CEC-Anzahl bei Patienten mit metastasiertem gastrointestinalem Stromatumoren (GIST) (n = 73) im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen (n = 15) (Norden-Zfoni *et al.*, 2007). In dieser Studie wurden 540 CECs pro Milliliter peripheres Blut bei gesunden Probanden und 1.090 CECs pro Milliliter peripheres Blut bei Patienten mit metastasiertem GIST detektiert. Im Vergleich der drei Studien fallen die unterschiedlich gemessenen CEC-Zahlen ins Auge. Hier ist vor allem auf die unterschiedlichen Methoden zur Messung der zirkulierenden Endothelzellen und die verschiedenen Tumorentitäten hinzuweisen.

In einer 2009 veröffentlichten Studie zeigten Vroling *et al.* erhöhte Zahlen zirkulierender Endothelzellen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom unter Therapie mit Sunitinib auf (Vroling *et al.*, 2009). In dieser Studie wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie 23 Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom auf zirkulierende Endothelzellen vor, während und nach der Therapie mit Sunitinib hin untersucht. Es zeigte sich, dass unter Therapie die CEC-Zahlen von 69 Zellen pro Milliliter auf 180 Zellen pro Milliliter am Tag 14 des Therapiezyklus anstiegen. Die CEC-Anzahl ging nach dem Therapiezyklus auf die Zahlen vor Beginn der Therapie zurück. Diese Studie unterstreicht, wie wichtig ein Surrogatmarker zur Beurteilung des Therapieverlaufs beim Nierenzellkarzinom wäre, und sie weist darauf hin, dass trotz der sehr sensitiven Durchflusszytometrie die CEC-Anzahl beim Nierenzellkarzinom im Verhältnis zu anderen Tumorerkrankungen sehr gering ausfällt.

Mancuso *et al.* legten unter anderem einen Schwerpunkt auf die Charakterisierung

zirkulierender Endothelzellen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Probanden in 77 % der Fälle und bei Tumorpatienten in 43 % der Fälle die zirkulierenden Endothelzellen apoptotisch beziehungsweise nekrotisch waren (Mancuso *et al.*, 2009).

Dies unterstützt den Ansatz, zirkulierende Endothelzellen als Surrogatmarker für die klinische Wirkung bei anti-angiogener Therapie zu untersuchen und sie zudem genauer zu charakterisieren.

Bisher gibt es keinen klaren Konsens über die phenotypische Identifizierung der zirkulierenden Endothelzellen, so ist es jedoch im Allgemeinen anerkannt, dass sie Endothelmarker wie vWF, CD146 und vascular endothelial Cadherin (VE-Cadherin) exprimieren. Bei gleichzeitiger Abwesenheit des Leukozytenmarkers CD45 und des Stammzellmarkers CD133 können die Zellen eindeutig den Endothelzellen zugeordnet werden (Goon *et al.*, 2006).

Dieser Ansatz verdeutlicht die Schwächen der Nutzung eines einzelnen Antikörpers. Auch wenn lange der P1H12-Antikörper, der an CD146 bindet, zur Darstellung der CECs verwendet wurde, ist nach heutigem Stand der Literatur seine alleinige Nutzung zum Nachweis der CECs ungenügend. So wiesen zum Beispiel Pickl *et al.* eine geringe Expression von P1H12 auf aktivierten T-Lymphozyten nach (Pickl *et al.*, 1997), dies konnte von Elshal *et al.* bestätigt werden (Elshal *et al.*, 2005).

Viele Arbeitsgruppen nutzen weitere Antikörper um sicher zu gehen, dass CECs nachgewiesen werden und nicht andere Zellen des peripheren Blutes. Bisher ist kein Konsens über eine standardisierte Methode gefunden.

Khan *et al.* legten einen Schwerpunkt auf die Durchflusszytometrie als Standardverfahren (Khan *et al.*, 2005). Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, mehrere Antikörper einzusetzen und so sicher die CECs nachzuweisen.

Um dies zu erreichen, werden häufig die Antikörper P1H12, CD133 und CD45 in Kombination eingesetzt. Der Endothelmarker P1H12, der an CD146 bindet, weist die CECs nach. Zum Ausschluss der CD146 exprimierenden aktivierten T-Lymphozyten wird der Leukozytenmarker CD45 zu Hilfe genommen. Um sicher zu gehen, dass keine endothelialen Progenitorzellen nachgewiesen werden, kann der Stammzellmarker CD133 eingesetzt werden (Mancuso *et al.*, 2001; Norden-Zfoni *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2005).

Woywodt *et al.* hingegen machten den Vorschlag, die immunomagnetische Isolation von CECs zur Standardmethode zu machen (Woywodt *et al.*, 2006). Mit dieser seit 1992 eingesetzten Methode wurden viele Erfahrungen gesammelt (George *et al.*, 1992). Diese Methode setzt allerdings voraus, dass der Untersucher über große Erfahrung verfügt und die

CECs anhand ihrer Morphologie identifizieren kann. Da die Expression von P1H12 auf aktivierten T-Lymphozyten ein weiteres Problem darstellt, nutzten Woywodt *et al.* in einem folgenden Schritt den spezifischen Endothelzell-Marker Ulex Europeus Lectin-1 (UEA-1) (Woywodt *et al.*, 2004) in einer Fluoreszenz-Färbung, um sicher CECs nachzuweisen.

Diese unterschiedlich diskutierten Ansätze für standardisierte Verfahren und die sehr voneinander abweichend gemessenen Zahlen der CECs unterstreichen die Problematik des seltenen Vorkommens der zirkulierenden Endothelzellen im peripheren Blut, insbesondere bei Patienten mit Nierenzellkarzinom (Vroiling *et al.*, 2009).

Grundsätzlich erscheint es wichtig, den Ansatz des Nachweises von CECs im Zusammenhang mit dem Tumorwachstum weiter zu verfolgen. Es lässt sich aber darauf schließen, dass, wie in dem Falle dieser Arbeit, ein Studienkollektiv von 14 Patienten zu klein ist, um aussagekräftige Zahlen zu erhalten. Zudem scheinen die 2,1 Millionen nach der APAAP-Methode gefärbten Zellen zu wenig zu sein, um die CECs in größerer Anzahl nachweisen zu können.

Woywodt *et al.* beschreiben ergänzend, dass sich die Dichte-Zentrifugation und eine länger als vier Stunden dauernde Lagerung der CECs negativ auf die nachweisbare CEC-Anzahl auswirkt (Woywodt *et al.*, 2006). Nach 24 Stunden Lagerung ist nach deren Ergebnissen ein Verlust von 12,5% der CECs nachweisbar

Bis heute fehlt ein allgemein gültiger Konsens zum Nachweis der CECs, der dringend gefunden werden sollte. Nur so lassen sich die CEC-Zahlen sinnvoll vergleichen und diskutieren.

## 6 Fazit

In dieser Arbeit sollte die Anzahl zirkulierender Endothelzellen (CECs) im Verlauf der Therapie mit Sunitinib anhand eines Kollektivs von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom untersucht werden. Ziel war es die Konzentration der CECs zu bestimmen und diese in Hinsicht auf Proliferationsverhalten und Apoptose näher zu analysieren.

Für die Detektion wurde die bereits etablierte APAAP-Methode genutzt, mit der die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen bestimmt werden sollte.

Zur Analyse des Funktionszustandes der CECs wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung etabliert. Diese ermöglichte es, verschiedene Antikörper zu kombinieren und die Endothelzellen genauer zu charakterisieren.

Es konnte beispielhaft anhand von HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) gezeigt werden, dass grundsätzlich eine Kombination des Endothelzellmarkers P1H12 mit dem Proliferationsmarker KI67 und dem Aktivierungsmarker CD106 in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung möglich ist. Der P1H12-Antikörper konnte in der APAAP- und der Immunfluoreszenz-Färbung als geeigneter Endothelzellmarker bestätigt werden. Der KI67-Antikörper überzeugte in den Vorversuchen mit den HUVECs ebenso der CD106-Antikörper, insbesondere anhand von TNF-alpha vorbehandelten HUVECs. Somit können mithilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zum einen CECs mit dem P1H12-Antikörper detektiert und zum anderen mit den Antikörpern KI67 und CD106 charakterisiert werden. Vorversuche mit dem Ziel, auch apoptotische CECs nachweisen zu können, in denen unter anderem hungernde HUVECs mit dem Caspase-3 Antikörper angefärbt wurden, blieben erfolglos.

In weiteren Vorversuchen zeigte sich, dass die zirkulierenden Endothelzellen nur in sehr geringen Zahlen zu erwarten waren. Es wurden je 2.100.000 mononukleäre Zellen von acht unselektierten Tumorpatienten auf das Vorhandensein von CECs untersucht. Dabei konnten nur in vier von acht Patienten CECs nachgewiesen werden und bei diesen nur in sehr geringer Anzahl. Die 14 Nierenzellkarzinompatienten, die in der Sunitinib-Studie behandelt worden waren, waren in den APAAP-Färbungen durchweg negativ auf den P1H12-Antikörper. Somit ließen sich in dieser Patientengruppe mit dieser Methode keine CECs nachweisen.

Diese negativen Ergebnisse ließen keine Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung bei den Studienpatienten zu.

Grundsätzlich sind die zirkulierenden Endothelzellen als Surrogatmarker zum Einschätzen des Tumorstatus‘ und des Verlaufs einer eingeleiteten Therapie durchaus weiter zu untersuchen. Zudem sollte die Charakterisierung der CECs weiter vorangetrieben werden, um mehr über

ihren Funktionszustand während des Tumorwachstums und einer Therapie in Erfahrung bringen zu können. Allerdings müssen dazu die Methoden weiter verfeinert und in ihrer Sensitivität und Reproduzierbarkeit weiterentwickelt werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Potentielle Mechanismen der Endothelzell-Freisetzung und der Formation von Mikropartikeln .....	5
Abbildung 2:	Formaler Ablauf der Infiltration, Destruktion und Metastasierung von malignen Tumoren.....	9
Abbildung 3:	HUVECs in Zellkultur, 100-fache Vergrößerung .....	18
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der APAAP-Färbung.....	19
Abbildung 5:	ACIS-Computer .....	21
Abbildung 6:	HUVECs, mit DAPI eingedeckelt, 100-fache Vergrößerung.....	27
Abbildung 7:	P1H12-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung .....	28
Abbildung 8:	VE-Cadherin (mouse)-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung .....	29
Abbildung 9:	KI67-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung .....	30
Abbildung 10:	CD62-E-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung .....	33
Abbildung 11:	P1H12- und KI67-positive HUVECs, 100-fache Vergrößerung.....	35
Abbildung 12:	Färbung mit VE-Cadherin (mouse) und KI67, 25-fache Vergrößerung .....	37
Abbildung 13:	VE-Cadherin (mouse)- und CD62-E-positive HUVEC, 100-fache Vergrößerung.....	38
Abbildung 14:	APAAP-Färbung (400-fache Vergrößerung), P1H12-positive Endothelzelle .....	40

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenhang der zirkulierenden Endothelzellen mit Entzündung und endothelialer Dysfunktion .....	5
Tabelle 2:	Medikamentöse Therapieoptionen bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom..	8
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien .....	13
Tabelle 4:	Verwendete Laborgeräte.....	14
Tabelle 5:	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	15
Tabelle 6:	Verwendete Lösungen und Puffer .....	16
Tabelle 7:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper P1H12 und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper .....	28
Tabelle 8:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper VE-Cadherin (rabbit) und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper .....	29
Tabelle 9:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper VE-Cadherin	

	(mouse) und dem mit FITC gelabelten Sekundärantikörper .....	30
Tabelle 10:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper KI67 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper .....	31
Tabelle 11:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD106 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper .....	32
Tabelle 12:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD106 und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper an TNF-alpha aktivierten HUVECs .....	32
Tabelle 13:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD62-E und dem mit Texas Red gelabelten Sekundärantikörper .....	33
Tabelle 14:	Immunfluoreszenzfärbung mit dem Caspase-3 Antikörper .....	34
Tabelle 15:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern KI67 und P1H12 und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC) .....	35
Tabelle 16:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern CD106 und P1H12 und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC) .....	36
Tabelle 17:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern KI67 und VE-Cadherin und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC) .....	37
Tabelle 18:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit den Primärantikörpern CD62-E und VE-Cadherin und den jeweiligen Sekundärantikörpern (Texas Red und FITC) .....	38
Tabelle 19:	APAAP-Färbung von gesunden Probanden und mit einer Verdünnung von HUVECs mit mononukleären Zellen .....	39
Tabelle 20:	Patienten mit soliden Tumoren, gefärbt nach der APAAP-Methode mit dem P1H12-Antikörper .....	40

### 7.3 Literaturverzeichnis

- Aicher,A., Rentsch,M., Sasaki,K., Ellwart,J.W., Fandrich,F., Siebert,R. *et al.* (2007) Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res* 100: 581-589.
- Asahara,T., Masuda,H., Takahashi,T., Kalka,C., Pastore,C., Silver,M. *et al.* (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228.
- Asahara,T., Murohara,T., Sullivan,A., Silver,M., van der,Z.R., Li,T. *et al.* (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967.
- Augustin,H.G., Kozian,D.H., and Johnson,R.C. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16: 901-906.
- Bardin,N., George,F., Mutin,M., Brisson,C., Horschowski,N., Frances,V. *et al.* (1996) S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 48: 531-539.
- Bauer,K.D., de,I.T.-B., Diel,I.J., Hawes,D., Decker,W.J., Priddy,C. *et al.* (2000) Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 6: 3552-3559.
- Beerepoot,L.V., Mehra,N., Vermaat,J.S., Zonnenberg,B.A., Gebbink,M.F., and Voest,E.E. (2004) Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol* 15: 139-145.
- Blann,A.D., Woywodt,A., Bertolini,F., Bull,T.M., Buyon,J.P., Clancy,R.M. *et al.* (2005) Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 93: 228-235.
- Camoin-Jau,L., Kone-Paut,I., Chabrol,B., Sampol,J., and gnat-George,F. (2000) Circulating endothelial cells in Behcet's disease with cerebral thrombophlebitis. *Thromb Haemost* 83: 631-632.
- Carmeliet,P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.
- Carmeliet,P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936.
- Carmeliet,P., and Jain,R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
- Chong,A.Y., Blann,A.D., Patel,J., Freestone,B., Hughes,E., and Lip,G.Y. (2004) Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation* 110: 1794-1798.
- Chow,W.H., Gridley,G., Fraumeni,J.F., Jr., and Jarvholm,B. (2000) Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 343: 1305-1311.

- Cines,D.B., Pollak,E.S., Buck,C.A., Loscalzo,J., Zimmerman,G.A., McEver,R.P. *et al.* (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561.
- Crawford,H.C., and Matrisian,L.M. (1994) Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 14: 234-245.
- Davidoff,A.M., Ng,C.Y., Brown,P., Leary,M.A., Spurbeck,W.W., Zhou,J. *et al.* (2001) Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res* 7: 2870-2879.
- Del Papa,N., Colombo,G., Fracchiolla,N., Moronetti,L.M., Ingegnoli,F., Maglione,W. *et al.* (2004) Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 1296-1304.
- Dignat-George,F., Sabatier,F., Blann,A., and Woywodt,A. (2007) Detection of circulating endothelial cells: CD146-based magnetic separation enrichment or flow cytometric assay? *J Clin Oncol* 25: e1-e2.
- Dor,Y., Porat,R., and Keshet,E. (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1367-C1374.
- Elshal,M.F., Khan,S.S., Takahashi,Y., Solomon,M.A., and McCoy,J.P., Jr. (2005) CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 106: 2923-2924.
- Ferlay,J., Parkin,D.M., and Steliarova-Foucher,E. (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46: 765-781.
- Ferrara,N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2: 795-803.
- Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.
- Folkman,J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Folkman,J. (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79: 1-8.
- Gale,N.W., and Yancopoulos,G.D. (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066.
- George,F., Brisson,C., Poncelet,P., Laurent,J.C., Massot,O., Arnoux,D. *et al.* (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 67: 147-153.

- George,F., Brouqui,P., Boffa,M.C., Mutin,M., Drancourt,M., Brisson,C. *et al.* (1993) Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 82: 2109-2116.
- Gilliland,D.G., and Griffin,J.D. (2002) Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 274-281.
- Goon,P.K., Boos,C.J., and Lip,G.Y. (2005) Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. *Clin Lab* 51: 531-538.
- Goon,P.K., Lip,G.Y., Boos,C.J., Stonelake,P.S., and Blann,A.D. (2006) Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 8: 79-88.
- Grefte,A., van der,G.M., van,S.W., and The,T.H. (1993) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 167: 270-277.
- Heinrich,M.C., Blanke,C.D., Druker,B.J., and Corless,C.L. (2002) Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20: 1692-1703.
- Hladovec,J., Prerovsky,I., Stanek,V., and Fabian,J. (1978) Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr* 56: 1033-1036.
- Izzedine,H., Buhaescu,I., Rixe,O., and Deray,G. (2007) Sunitinib malate. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 357-364.
- Jacobsen,J., Rasmuson,T., Grankvist,K., and Ljungberg,B. (2000) Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 163: 343-347.
- Jaffe,E.A., Hoyer,L.W., and Nachman,R.L. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52: 2757-2764.
- Janssens,D., Michiels,C., Guillaume,G., Cuisinier,B., Louagie,Y., and Remacle,J. (1999) Increase in circulating endothelial cells in patients with primary chronic venous insufficiency: protective effect of Ginkor Fort in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 7-11.
- Kas-Deelen,A.M., De Maar,E.F., Harmsen,M.C., Driessen,C., Van Son,W.J., and The,T.H. (2000) Uninfected and cytomegalic endothelial cells in blood during cytomegalovirus infection: effect of acute rejection. *J Infect Dis* 181: 721-724.
- Khan,S.S., Solomon,M.A., and McCoy,J.P., Jr. (2005) Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 64: 1-8.
- Kim,H.K., Song,K.S., Kim,H.O., Chung,J.H., Lee,K.R., Lee,Y.J. *et al.* (2003) Circulating numbers of endothelial progenitor cells in patients with gastric and breast cancer. *Cancer Lett* 198: 83-88.
- Lee,K.W., Lip,G.Y., Tayebjee,M., Foster,W., and Blann,A.D. (2005) Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105: 526-532.

- Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A., and Hebbel, R.P. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: 71-77.
- Linehan, W.M. (2000) Molecular genetics of kidney cancer: implications for the physician. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 13: 368-371.
- Ljungberg, B., Hanbury, D.C., Kuczyk, M.A., Merseburger, A.S., Mulders, P.F., Patard, J.J., and Sinescu, I.C. (2007) Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol* 51: 1502-1510.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L. *et al.* (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-1201.
- Makin, A.J., Blann, A.D., Chung, N.A., Silverman, S.H., and Lip, G.Y. (2004) Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J* 25: 371-376.
- Mancuso, P., Antoniotti, P., Quarna, J., Calleri, A., Rabascio, C., Tacchetti, C. *et al.* (2009) Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res* 15: 267-273.
- Mancuso, P., Burlini, A., Pruneri, G., Goldhirsch, A., Martinelli, G., and Bertolini, F. (2001) Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97: 3658-3661.
- Mareel, M., Boterberg, T., Noe, V., Van, H.L., Vermeulen, S., Bruyneel, E., and Bracke, M. (1997) E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol* 173: 271-274.
- Motzer, R.J., Rini, B.I., Bukowski, R.M., Curti, B.D., George, D.J., Hudes, G.R. *et al.* (2006) Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 295: 2516-2524.
- Mutin, M., Canavy, I., Blann, A., Bory, M., Sampol, J., and gnat-George, F. (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93: 2951-2958.
- Naumov, G.N., Akslen, L.A., and Folkman, J. (2006) Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5: 1779-1787.
- Norden-Zfoni, A., Desai, J., Manola, J., Beaudry, P., Force, J., Maki, R. *et al.* (2007) Blood-based biomarkers of SU11248 activity and clinical outcome in patients with metastatic imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Clin Cancer Res* 13: 2643-2650.
- Patard, J.J., Leray, E., Rodriguez, A., Rioux-Leclercq, N., Guille, F., and Lobel, B. (2003) Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 44: 226-232.
- Patard, J.J., Rodriguez, A., Rioux-Leclercq, N., Guille, F., and Lobel, B. (2002) Prognostic significance of the mode of detection in renal tumours. *BJU Int* 90: 358-363.

- Percivalle,E., Revello,M.G., Vago,L., Morini,F., and Gerna,G. (1993) Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* 92: 663-670.
- Peters,B.A., Diaz,L.A., Polyak,K., Meszler,L., Romans,K., Guinan,E.C. *et al.* (2005) Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11: 261-262.
- Pickl,W.F., Majdic,O., Fischer,G.F., Petzelbauer,P., Fae,I., Waclavicek,M. *et al.* (1997) MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol* 158: 2107-2115.
- Rafii,S., Lyden,D., Benezra,R., Hattori,K., and Heissig,B. (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2: 826-835.
- Rajagopalan,S., Somers,E.C., Brook,R.D., Kehrer,C., Pfenninger,D., Lewis,E. *et al.* (2004) Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood* 103: 3677-3683.
- Ray,J.M., and Stetler-Stevenson,W.G. (1994) The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7: 2062-2072.
- Ribatti,D. (2008) Hemangioblast does exist. *Leuk Res* 32: 850-854.
- Risau,W., and Flamme,I. (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.
- Rubin,B.P., Schuetze,S.M., Eary,J.F., Norwood,T.H., Mirza,S., Conrad,E.U., and Bruckner,J.D. (2002) Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. *J Clin Oncol* 20: 3586-3591.
- Schiebler,T.H., and Schmidt,W. (2002) Anatomie Springer-Verlag, pp. 156-157.
- Semenza,G.L. (2007) Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem* 102: 840-847.
- Solovey,A., Lin,Y., Browne,P., Choong,S., Wayner,E., and Hebbel,R.P. (1997) Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 337: 1584-1590.
- Sternberger,L.A., Hardy,P.H., Jr., Cuculis,J.J., and Meyer,H.G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-333.
- Storkel,S., Eble,J.N., Adlakha,K., Amin,M., Blute,M.L., Bostwick,D.G. *et al.* (1997) Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80: 987-989.
- Thompson,J.A. (2009) Metastatic renal cell carcinoma: current standards of care. *Clin J Oncol Nurs* 13 Suppl: 8-12.

Vroiling,L., van,d., V, de Haas,R.R., Haanen,J.B., Schuurhuis,G.J., Kuik,D.J. *et al.* (2009) Increased numbers of small circulating endothelial cells in renal cell cancer patients treated with sunitinib. *Angiogenesis* 12: 69-79.

Wang,J.H., Min,P.Q., Wang,P.J., Cheng,W.X., Zhang,X.H., Wang,Y. *et al.* (2006) Dynamic CT Evaluation of Tumor Vascularity in Renal Cell Carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 186: 1423-1430.

Winder,T., and Lenz,H.J. (2010) Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer. *Gastroenterology* 138: 2163-2176.

Woywodt,A., Blann,A.D., Kirsch,T., Erdbruegger,U., Banzet,N., Haubitz,M., and gnat-George,F. (2006) Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 4: 671-677.

Woywodt,A., Goldberg,C., Scheer,J., Regelsberger,H., Haller,H., and Haubitz,M. (2004) An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. *Ann Hematol* 83: 491-494.

Yoshino,S., Kato,M., and Okada,K. (1998) Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 5: 119-123.

Zhang,H., Vakil,V., Braunstein,M., Smith,E.L., Maroney,J., Chen,L. *et al.* (2005) Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 105: 3286-3294.

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. C. Bokemeyer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen, danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Fiedler für die zuverlässige und stetige Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner vorliegenden Promotionsarbeit. Außerdem danke ich ihm für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jasmin Otten, die mich engagiert und kompetent betreut und mich während der gesamten Zeit meiner Promotionsarbeit tatkräftig und großzügig unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei Gabi Vohwinkel, der gesamten Arbeitsgruppe und dem (ehemaligen) „Pavillon 29“ für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit im Labor.

Ich danke Prof. Dr. med. Pantel für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Tumorbiologie. Dr. rer. nat. S. Riethdorf danke ich für die unkomplizierte, hilfsbereite Einarbeitung in die APAAP-Färbung, die Bereitstellung des ACIS-Computer und die Unterstützung bei der Auswertung. Ich bedanke mich besonders bei den MTAs des Institutes für Tumorbiologie, die mir äußerst freundlich, hilfsbereit und kompetent geholfen haben.

Für die großzügige Bereitstellung von Proben möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Blutbank/Zellseparation bedanken.

## **Curriculum Vitae**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Hamburg, den 20.03.2012

Jakob Jäger