

Aus dem Institut für Anatomie II
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Fusionieren Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes spontan mit
humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark?**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thorsten Derlin
aus Hamburg

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 10.08.2009
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. S. Klutmann
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. H.-E. Laack

I. Arbeitshypothese und Fragestellung	8
II. Einleitung.....	9
2.1 Stammzellen.....	9
2.1.1 Eigenschaften embryonaler und adulter Stammzellen	9
2.1.2 Mesenchymale Stammzellen und maligne Tumore	11
2.1.3 Mesenchymale Stammzellen für experimentelle onkologische Therapieansätze ..	12
2.2 Tumorstammzellen.....	13
2.2.1 Analogien zwischen den Prinzipien der Stammzell- und Tumorzellbiologie.....	13
2.2.2 Stammzellen als mögliche Ursprungszellen von malignen Tumoren.....	14
2.2.3 Tumorstammzellen.....	16
2.3 Die Bedeutung von Zellfusionen.....	18
2.3.1 Zell- und Membranfusion als grundlegendes biologisches Prinzip	18
2.3.2 Zellfusion und maligne Transformation.....	19
2.4 Metastasierung maligner Tumore.....	23
2.4.1 Metastasierung als mehrschrittiger Prozess	23
2.4.2 Das Konzept der epithelial-mesenchymalen Transition als Voraussetzung der Metastasierung	25
2.4.3 Organpräferenz.....	26
2.4.4 Der Chemokinrezeptor CXCR4	26
2.4.5 Das Bizeklam AMD3100-Octahydrochlorid als CXCR4-Inhibitor.....	30
2.5 Das kleinzellige Bronchialkarzinom	31
2.5.1 Epidemiologie	31
2.5.2 Therapie und Prognose.....	32
III. Material und Methoden	33
3.1 Die Zelllinien.....	33
3.1.1 Die mesenchymale Stammzelllinie	33
3.1.2 Die Bronchialkarzinomzelllinien	33
3.1.3 Die Kolonkarzinomzelllinie HT29.....	33
3.2 Geräte und Verbrauchsmittel	33
3.3 Zellkultur	34
3.3.1 Kultivierung von humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien	34
3.3.2 Kultivierung der humanen Kolonkarzinomzelllinie.....	35
3.3.3 Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	35
3.3.4 Kryokonservierung von Zellen.....	36
3.3.5 Revitalisierung kryokonservierter Zellen.....	36
3.3.6 Detektion einer möglicherweise vorhandenen Mykoplasmen-Kontamination.....	37
3.3.7 Zellzählung.....	37
3.4 Zellmorphologie koinkubierter mesenchymaler Stammzellen und kleinzelliger	38

3.4.1 Lichtmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkulturbedingungen.....	38
3.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkulturbedingungen.....	38
3.5 Zytochemie.....	39
3.5.1 Quantum Dot Markierung mesenchymaler Stammzellen in Zellsuspension.....	39
3.5.2 Markierung von Tumorzellen mittels 5-Chloromethylfluoresceindiacetat.....	40
3.5.3 Markierung von Tumorzellen mittels der FITC-konjugierten Choleratoxinuntereinheit B.....	41
3.6 Quantifizierung von Zelladhäsion und Zellfusion.....	42
3.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Zelladhäsion unter Standardzellkulturbedingungen.....	42
3.6.2 Durchflusszytometrie.....	43
3.6.2.1 Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	43
3.6.2.2 Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29.....	44
3.7 Pharmakologische Beeinflussung der Ereignishäufigkeit in der Durchflusszytometrie.....	44
3.7.1 Inhibition von CXCR4 mittels monoklonalen Antikörpern.....	44
3.7.2 Inhibition von CXCR4 mittels AMD3100 Octahydrochlorid.....	45
3.7.3 Beeinflussung durch den β -HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin.....	46
3.7.3.1 Quantifizierung von auftretenden Zellfusionen.....	46
3.7.3.2 Aufnahme von Quantum Dots unter Atorvastatin.....	46
3.8 Laser Scanning Zytometrie.....	47
3.9 Lektinzytochemie.....	49
3.9.1 Nachweis einer veränderten Expression von Oberflächenglykokonjugaten unter Inkubation mit Atorvastatin in H82.....	49
3.10 Statistische Auswertungen.....	51
IV. Ergebnisse.....	53
4.1 Zellmorphologie und Adhäsionsverhalten koinkubierter mesenchymaler Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	53
4.1.1 Lichtmikroskopische Beurteilung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	53
4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkultur- bedingungen.....	57
4.2 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Zelladhäsion unter Standardzellkulturbedingungen.....	59
4.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	61
4.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	61

4.3.2 Ergebnisse der Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und der Kolonkarzinomzelllinie HT29.....	63
4.3.3 Pharmakologische Beeinflussung der Zellfusion in der Durchflusszytometrie	64
4.3.3.1 Inhibition von CXCR4 mittels monoklonalen Antikörpern.....	64
4.3.3.2 Inhibition von CXCR4 mittels AMD3100-Octahydrochlorid	64
4.3.3.3 Beeinflussung durch den β -HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin.....	66
4.3.3.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung von auftretenden Zellfusionen.....	66
4.3.3.3.2 Aufnahme von Quantum Dots unter Atorvastatin.....	68
4.4 Ergebnisse der Laser Scanning Zytometrie.....	68
4.5 Ergebnisse der Lektinzytochemie	70
4.5.1 Nachweis einer veränderten Expression von Oberflächenglykokonjugaten unter.....	70
V. Diskussion	76
VI. Zusammenfassung.....	86
VII. Literaturverzeichnis	87
VIII. Danksagung.....	107
IX. Lebenslauf.....	108
X. Eidesstattliche Versicherung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kasette (ATP binding cassette)
AML	akute myeloische Leukämie
Asp	Aspartat
bcl-2	B-Zell-Lymphom 2 (b-cell lymphoma 2)
Bmi-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
° C	Grad Celsius
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
Con A	Concanavalin A
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
d	Tag(e) (day)
Da	Dalton (Da)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ES cells	Embryonale Stammzellen (Embryonic Stem cells)
et al.	und andere (et alii/aliae)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward light scatter)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde (hour)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus (human immunodeficiency virus)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HSC	hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic Stem Cells)

ICM	innere Zellmasse (I nner C ell M ass)
k	k ilo
MAPK	m itogen- a ctivated p rotein k inase
min	M inute(n)
ml	m illiliter
mM	m illimolar
mRNA	Botenribonukleinsäure (m essenger r ibonucleic a cid)
MSC	mesenchymale Stammzellen (M esenchymal S tem C ells)
MAPC	multipotente adulte Vorläuferzellen (M ultipotent A dult P rogenitor C ells)
NOD	n on- o bese d iabetic
P	P opulation
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (p hosphate b uffered s aline)
PFA	P araformaldehyd
PHA-L	P haseolus vulgaris L eucoagglutinin
rpm	Umdrehungen pro Minute (r ounds p er m inute)
SCID	Schwere kombinierte Immunschwäche (s evere c ombined i mmunodeficiency)
SDF-1	stromal cell- d erived f actor-1
Shh	S onic h edgehog
SSC	Seitwärtsstreulicht (s ide light s catter)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (t ransforming g rowth f actor β)
U	Umdrehungen
WGA	W heat G erm A gglutinin
Wnt	W ingless i nt-1
z.B.	zum B eispiel

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Komplexe Tumor-Stroma-Interaktionen spielen beim Primärtumorwachstum und bei der Tumormetastasierung eine wichtige funktionelle Rolle. In das Tumorstroma werden dabei mesenchymale Stammzellen eingebaut, über deren Interaktion mit den dort vorhandenen Tumorzellen wenig bekannt ist. Diese Stammzellen kommen neben dem Primärtumor auch in denjenigen Organen - wie z.B. dem Knochenmark - vor, in welche die Tumoren metastasieren. Ein Paradebeispiel für eine solche frühzeitige Fernmetastasierung in ein Organ ist das Knochenmark, wohin das kleinzellige Bronchialkarzinom bevorzugt metastasiert.

Zellfusionen zwischen Tumorzellen und Stammzellen könnten dabei zum Erwerb von zur Metastasierung notwendigen Eigenschaften wie Selbsterneuerung, Migrations- und unbegrenzter Proliferationsfähigkeit führen. Solche Zellhybride könnten Wachstumsfaktoren sezernieren und sich autokrin selbst stimulieren

Eine besondere Bedeutung besitzt hierbei die CXCR4/CXCL12-Achse: Viele Tumorzellen exprimieren den Rezeptor CXCR4, wobei diese bevorzugt in Organe, in welchen das Zytokin CXCL12 ausgeschüttet wird, metastasieren. Da Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes den Rezeptor CXCR4 und mesenchymale Stammzellen seinen Liganden CXCL12 exprimieren, könnten durch Zellfusion Hybridzellen mit einer autokrinen Stimulation dieses Chemokinweges entstehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, folgende Fragen zu klären:

- Kommt es in vitro zu spontanen Fusionen zwischen Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und mesenchymalen Stammzellen?
- Wenn ja, welche der untersuchten Zelllinien zeigt die höchste Fusionsfrequenz?
- Lässt sich durch Inhibition des Chemokinrezeptors CXCR4 eine Alteration der Fusionsfrequenz erreichen?
- Lässt sich durch eine pharmakologische Beeinflussung der Zellmembranfluidität eine Alteration der Fusionsfrequenz erreichen?
- Spiegelt sich eine pharmakologisch erreichte Alteration der Membranzusammensetzung und damit -fluidität auch in der Glykokalyx, deren Synthese über Lipidvorstufen erfolgt, wider?

II. Einleitung

2.1 Stammzellen

2.1.1 Eigenschaften embryonaler und adulter Stammzellen

Stammzellen und insbesondere deren mögliche klinisch-therapeutische Anwendungen sind in den letzten Jahren zunehmend zum Gegenstand medizinischer Forschung geworden.

Dabei wird unter Stammzellen eine Zellpopulation verstanden, welche über eine sogenannte asymmetrische Teilung zur Selbsterneuerung (self-renewal) befähigt ist. Während bei der klassischen mitotischen Teilung aus der Ursprungszelle zwei identische Tochterzellen hervorgehen, gehen bei der asymmetrischen Teilung eine sich differenzierende Tochterzelle sowie eine zur erneuten Teilung befähigte, undifferenzierte Stammzelle hervor. Durch diesen asymmetrischen Teilungsprozess wird der Erhalt der undifferenzierten Stammzellpopulation ermöglicht (Herzog et al., 2003). Ferner sind diese zunächst nicht spezialisierten Zellen aufgrund sowohl biochemischer als auch physiologischer Stimuli in der Lage, sich in spezialisierte Zellen zu differenzieren (Jiang et al., 2002).

Grundlegend wird zwischen zwei Entitäten von Stammzellen unterschieden: Dabei werden die sogenannten embryonalen Stammzellen (Embryonic Stem cells = ES cells) von adulten oder somatischen Stammzellen abgegrenzt. Die pluripotenten embryonalen Stammzellen leiten sich von der Inneren Zellmasse (Inner Cell Mass = ICM) der Blastozyste ab und sind in vivo zur Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter befähigt. Wenngleich die Isolierung von humanen embryonalen Stammzellen möglich ist, ist ihre Verwendung in Forschung und Therapie jedoch höchst umstritten (Thomson et al., 1998; Frankel, 2000). Hingegen lassen sich adulte Stammzellen aus verschiedenen Organen beziehungsweise Geweben des menschlichen Organismus isolieren; sie besitzen jedoch nicht eine gleichwertige Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und können sich nicht in sämtliche Zelltypen des Organismus differenzieren.

Während lange Zeit angenommen wurde, dass es sich bei diesen adulten Stammzellen um organspezifische Stammzellen handelt, welche sich nur zu Zellen des originären Gewebes, aus welchem sie isoliert wurden, entwickeln können, mehren sich Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht ausschließlich um determinierte Vorläuferzellen handelt, sondern dass zumindest einigen dieser adulten Stammzellen in Abhängigkeit von ihrem Ursprungsgewebe die Möglichkeit einer multipotenten Differenzierung gegeben ist.

Das Knochenmark ist ein Ort, an dem sich besonders viele Stammzellen befinden. Es enthält zwei wesentliche Typen von Stammzellen: Zum einen hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic Stem Cells = HSC), deren Nachkommen sich in die verschiedenen Typen der reifen Blutzellen differenzieren können, zum anderen mesenchymale Stammzellen (Marrow Stromal Cells; Mesenchymal Stem Cells = MSC), deren Nachkommen die Fähigkeit besitzen, sich in diverse mesenchymale Zelltypen zu differenzieren wie Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten; diese Stammzellen besitzen *in vitro* eine begrenzte Proliferationsfähigkeit. Im Gegensatz hierzu kann aus Kulturen dieser mesenchymalen Stammzellen eine Zellpopulation mit unbegrenzter Proliferationsfähigkeit und bemerkenswert breiten Differenzierungsmöglichkeiten isoliert werden, nämlich multipotente adulte Progenitorzellen (Multipotent Adult Progenitor Cells = MAPC).

Bei mesenchymalen Stammzellen kann eine Differenzierung entlang mesenchymaler Linien zu verschiedenen Geweben wie beispielsweise Knochen-, Binde-, Fett- oder Knorpelgewebe und dem Stroma des Knochenmarks beobachtet werden (Herzog et al., 2003; Pittenger et al., 1999). Zusätzlich wurde die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen beschrieben (Ferrari et al., 1998). Ebenso wird derzeit die Möglichkeit der Regeneration infarzierten Myokardgewebes mittels mesenchymaler Stammzellen intensiv untersucht: Es wird postuliert, dass lokal applizierte Stammzellen in der Lage sind, *de novo* Myokardgewebe zu bilden (Orlic et al., 2001).

Allerdings können sich aus dem Knochenmark isolierte Stammzellen wahrscheinlich nicht nur entlang mesenchymaler, sondern darüber hinaus auch entlang endo- und neuroektodermaler Linien differenzieren (Jiang et al., 2002; Mezey et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Petersen et al., 1999; Scintu et al., 2006). Für diese aus Kulturen humaner mesenchymaler Stammzellen isolierten, sogenannten multipotenten adulten Vorläuferzellen wird damit eine Differenzierungsmöglichkeit über die eigene Linie hinaus postuliert (Herzog et al., 2003; Schwartz et al., 2002).

Für dieses Differenzierungsphänomen, das als Plastizität bezeichnet wird - wobei unter Plastizität die Fähigkeit einer aus einem spezifischen adulten Gewebe isolierten Zellpopulation verstanden wird, sich in Zellen zu differenzieren, welche anhand ihres Genexpressionsmusters sowie ihres funktionalen Phänotyps einem anderen adulten Gewebe zuzuordnen sind - gibt es unterschiedliche, teils widersprüchliche Erklärungsansätze (Herzog et al., 2003).

Die Transplantation von aus dem adulten Knochenmark isolierten Zellen hat *in vivo* zu unerwarteten Phänotypen wie Muskel-, Leberzellen oder Neuronen geführt (Terada et al.,

2002). Als ein wesentlicher zum Phänomen der Plastizität führender Mechanismus werden Zell-Zell-Fusionen diskutiert, durch welche eine Stammzelle mit einer somatischen Zelle ein Heterokaryon formt, welches das Genexpressionsmuster der somatischen Zelle übernimmt (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Herzog et al., 2003). Auch wenn die Zellfusion keinen eigentlichen Mechanismus der Differenzierung darstellt, könnten weite Teile der Ergebnisse zur Plastizität auf Fusionsphänomenen beruhen, wenn Stammzellen nicht über Transdifferenzierung, sondern über Zellfusion zur Entstehung nicht dem Knochenmark zuzuordnender Zelltypen beitragen (Wang et al., 2003). Gleichzeitig könnten jedoch auch durch Fusion entstandene Zellen eine enorme physiologische Bedeutung besitzen.

2.1.2 Mesenchymale Stammzellen und maligne Tumore

Ein Tumor kann als ein Organäquivalent betrachtet werden, welches aus den eigentlichen malignen Zellen sowie einer großen Zahl an primär nicht malignen Zellen, dem tumorassoziierten Stroma, besteht. Dieses Stroma besitzt eine zentrale Rolle bei der Erhaltung und Progression des malignen Tumors. Während Zell-Zell-Kontakte, die extrazelluläre Matrix sowie sezernierte Faktoren des Stromas beispielsweise über die Aufrechterhaltung der Zellpolarität hemmende Wirkungen auf Ansiedlung, Wachstum und Ausbreitung von Tumorzellen ausüben, kann bei der entsprechenden Expression von Rezeptoren durch die Tumorzellen auch eine wachstumsfördernde Wirkung auf maligne Zellen ausgeübt werden (Bissell und Radisky, 2001).

Mesenchymale Stammzellen werden im Rahmen chronischer Inflammation in geschädigte Gewebe rekrutiert (Fox et al., 2007; Karnoub et al., 2007). Verschiedenste pathologische Prozesse, denen lediglich die Gewebsschädigung gemein ist, können zu einer Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen führen: Dazu zählen die cerebrale Ischämie, toxische Schädigungen oder Hautverletzungen (Ortiz et al., 2003; Sasaki et al., 2008).

Auch viele maligne Tumoren können als Ort chronischer Inflammation begriffen werden (Coussens und Werb, 2002; Dvorak, 1986). Daher werden mesenchymale Stammzellen auch in maligne Tumore und deren Metastasen rekrutiert (Karnoub et al., 2007; Studeny et al., 2002).

Mesenchymale Stammzellen verändern dort durch die Ausschüttung parakriner Faktoren die Wachstumsbedingungen der Tumorzellen und können so das Wachstum von Tumorzellen fördern, eine besondere Rolle spielt hierbei die Sekretion von CXCL12 (Orimo et al., 2005).

Ferner können mesenchymale Zellen jedoch auch über die Exkretion bestimmter Faktoren wie dem Chemokin CCL5 eine Steigerung der Motilität, der Invasionsfähigkeit und damit des metastatischen Potenzials evozieren (Karnoub et al., 2007). Aktiviertes Stroma kann im Rahmen chronischer inflammatorischer Prozesse sogar selbst als Karzinogen wirken und zur Bildung maligner Tumore beitragen, und zwar vor allem über die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie TGF- β (Dolberg et al., 1985; Sieweke et al., 1990).

Für das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte beispielsweise gezeigt werden, dass extrazelluläre Matrixproteine, welche von mesenchymalen Zellen sezerniert wurden, die Tumorzellen vor der Apoptose bewahren können, was zur Chemoresistenz der Tumoren beitragen könnte (Sethi et al., 1999).

2.1.3 Mesenchymale Stammzellen für experimentelle onkologische Therapieansätze

Die mögliche Anwendung von mesenchymalen Stammzellen als Vektoren für experimentelle, insbesondere gentherapeutische Therapieansätze wird derzeit intensiv untersucht. Ihre besondere Eignung als Vektor gründet sich auf mehrere Faktoren. Zum einen lassen sich mesenchymale Stammzellen mit Adeno- oder Lentiviren einfach und hochquantitativ transduzieren (McMahon et al., 2006), zum anderen lassen sich mesenchymale Stammzellen eines Patienten einfach gewinnen und kultivieren (Corsten und Shah, 2008). Insbesondere ihr ausgeprägter Pathotropismus begründet jedoch ihre Eignung als Vektor für experimentelle Therapieansätze; so können Stammzellen als Vehikel genutzt werden, um effektiv verschiedene Tumoren zu infiltrieren, wie beispielsweise Gliome (Aboody et al., 2000). Diese Eigenschaften lassen mesenchymale Progenitorzellen ebenfalls geeignet erscheinen, auch im Rahmen der experimentellen Therapie benigner Erkrankungen als Vektoren zu dienen. Gleichzeitig können sie über ihre intrinsischen Eigenschaften wie ihre Plastizität eine lokale Wirkung entfalten, beispielsweise im Bereich kardiovaskulärer oder neurodegenerativer Erkrankungen (Srivastava und Ivey, 2006; Lindvall et al., 2004).

Mögliche unerwünschte Interaktionen zwischen den applizierten Stammzellen und den Zielzellen, welche möglicherweise sogar zu einer Progression der malignen Erkrankung führen könnten, werden dabei bisher wenig berücksichtigt.

2.2 Tumorstammzellen

2.2.1 Analogien zwischen den Prinzipien der Stammzell- und Tumorzellbiologie

Ausgehend von Analogien zwischen den zellbiologischen Eigenschaften insbesondere hämatopoetischer Stammzellen und hämatologischer maligner Erkrankungen wurden bestimmten Subpopulationen von Tumorzellen Stammzeleigenschaften zugeschrieben. Diese Stammzellen besitzen eine zentrale Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von malignen Erkrankungen; sie werden im englischsprachigen Schrifttum als cancer stem cells (Tumorstammzellen) bezeichnet (Reya et al., 2001; Savona und Talpaz, 2008).

Tumorstammzellen besitzen Merkmale, die zur zellbiologischen Definition normaler Stammzellen herangezogen werden wie z. B. die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (self-renewal).

Die Theorie der Tumorstammzellen postuliert, dass analog zu adulten Stammzellen nur ein Teil der malignen Zellen zu unbegrenzter Proliferation fähig ist und damit den wesentlichen Faktor für Persistenz und Progression der malignen Erkrankung darstellt. Diese Tumorstammzellen teilen sich analog zu normalen Stammzellen ebenfalls asymmetrisch (Reya et al., 2001).

Signalwege, welche für die Erneuerung normaler Stamm- und Progenitorzellpopulationen während der Entwicklung essentiell sind, werden bei einer Vielzahl maligner Zellpopulationen dysreguliert und sind auch in ihrer onkogenen Bedeutung gut charakterisiert: Die sezernierten Glykoproteine der Wnt-Familie besitzen eine Schlüsselrolle bei Entwicklungsprozessen vieler Spezies, so beeinflussen sie beispielsweise die Zellpolarität (Cardigan und Nusse, 1997). Wnt-Proteine fördern das Wachstum hämatopoetischer Progenitorzellen und inhibieren deren Differenzierung (Willert et al., 2003). Ein Endpunkt der Wnt-Signalkaskade ist damit die Erhaltung einer undifferenzierten Stammzellpopulation (Kielman et al., 2002; Korinek et al., 1998). Gleichzeitig werden Mutationen und damit eine Aktivierung des Wnt-Signalweges bei verschiedenen Tumoren angetroffen, insbesondere beim Kolonkarzinom und Leukämien (Reya und Clevers, 2005; Chan et al., 1999; Peifer und Polakis, 2000).

Andere Signalwege, welche sowohl bei der Aufrechterhaltung von Stammzellpopulationen angetroffen werden als auch bei der Onkogenese zentrale Bedeutung besitzen, sind nicht nur der Notch-, sondern auch der Shh- (sonic hedgehog) Signalweg, aber auch die Überexpression des Onkogens bcl-2 (Taipale und Beachy, 2001; Domen et al., 1998).

Mutationen, welche zur Dysregulation von Signalwegen führen, die an der Selbsterneuerung von Stammzellpopulationen beteiligt sind, können also diverse maligne Erkrankungen auslösen (Pardal et al., 2003). So hängt beispielsweise die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen vom Protoonkogen Bmi-1 ab, jedoch ebenso die Proliferation leukämischer Stammzellen: Bmi-1 negative leukämische Stammzellen sind nach Transplantation in ein Mausmodell nicht befähigt, eine Erkrankung zu induzieren (Lessard und Sauvageau, 2003; Park et al., 2003).

2.2.2 Stammzellen als mögliche Ursprungszellen von malignen Tumoren

Für die meisten malignen Erkrankungen ist die eigentliche Zielzelle der malignen Transformation nicht bekannt. Aufgrund mehrerer Beobachtungen erscheint jedoch die Annahme gerechtfertigt, dass im Gewebe liegende Stammzellen das Ziel onkogener Mutationen sein könnten, und zwar eher als differenzierte Zellen des jeweiligen Gewebetyps. Sowohl Stammzellen als auch Tumorzellen haben ein unbegrenztes Proliferationspotential mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Reya und Clevers, 2005). Ferner besitzen beide Zelltypen die Fähigkeit der Differenzierung in normale oder pathologische Gewebe mit unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika und ebenso unterschiedlichem verbleibenden Proliferationspotential (Fidler und Hart, 1982; Fidler und Kripke, 1977).

Da die meisten Tumoren einen klonalen Ursprung besitzen, muss die ursprünglich den Tumor induzierende maligne Zelle phänotypisch unterschiedlich differenzierte Zellen hervorbringen, darunter sowohl Zellen, welche zur Aufrechterhaltung einer proliferierenden Subpopulation dienen, als auch weit differenzierte Tumorzellen ohne nennenswertes Proliferationspotential, welche oft Charakteristika des Ursprungsgewebes exponieren (Reya et al, 2001; Fearon et al., 1987). Somit sind bei Tumorzellen Prozesse zu beobachten, die analog zur Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen ablaufen.

Die Zielzelle der malignen Transformation selbst kann also prinzipiell eine Progenitorzelle beziehungsweise eine differenzierte Zelle sein, die durch kontinuierliche Mutagenese dedifferenziert und Stammzeleigenschaften gewinnt wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung oder eine im Gewebe liegende Stammzelle, welche durch Aktivierung von Onkogenen und Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen maligne Charakteristika ausbildet (Pardal et al., 2003). Eine im Gewebe liegende Stammzelle besitzt also bereits a priori Eigenschaften, welche ebenfalls maligne Zellen kennzeichnen wie Selbsterneuerung, unbegrenzte

Proliferationsfähigkeit und Differenzierung in phänotypisch distinkte Tochterzellen; sie muß diese Eigenschaften nicht zusätzlich zu anderen notwendigen Mutationen wie beispielsweise dem Verlust der Kontaktinhibition erwerben. Gleichzeitig haben differenzierte Zellen lediglich eine kurze Lebenszeit, in der Mutationen akquiriert werden können (Pardal et al., 2003). Zusätzlich besitzen leukämische Stammzellen ein Profil an Oberflächenmarkern, das denen normaler hämatopoetischer Stammzellen ähnlich ist (Bonnet und Dick, 1997). Im Gewebe liegende Stammzellen erscheinen also als wahrscheinliche Ursprungszelle maligner Erkrankungen. Eine Übersicht der malignen Transformation bei beiden putativen Zielzellen sowie eine Gegenüberstellung zur normalen Stammzellbiologie findet sich in Abbildung 1.

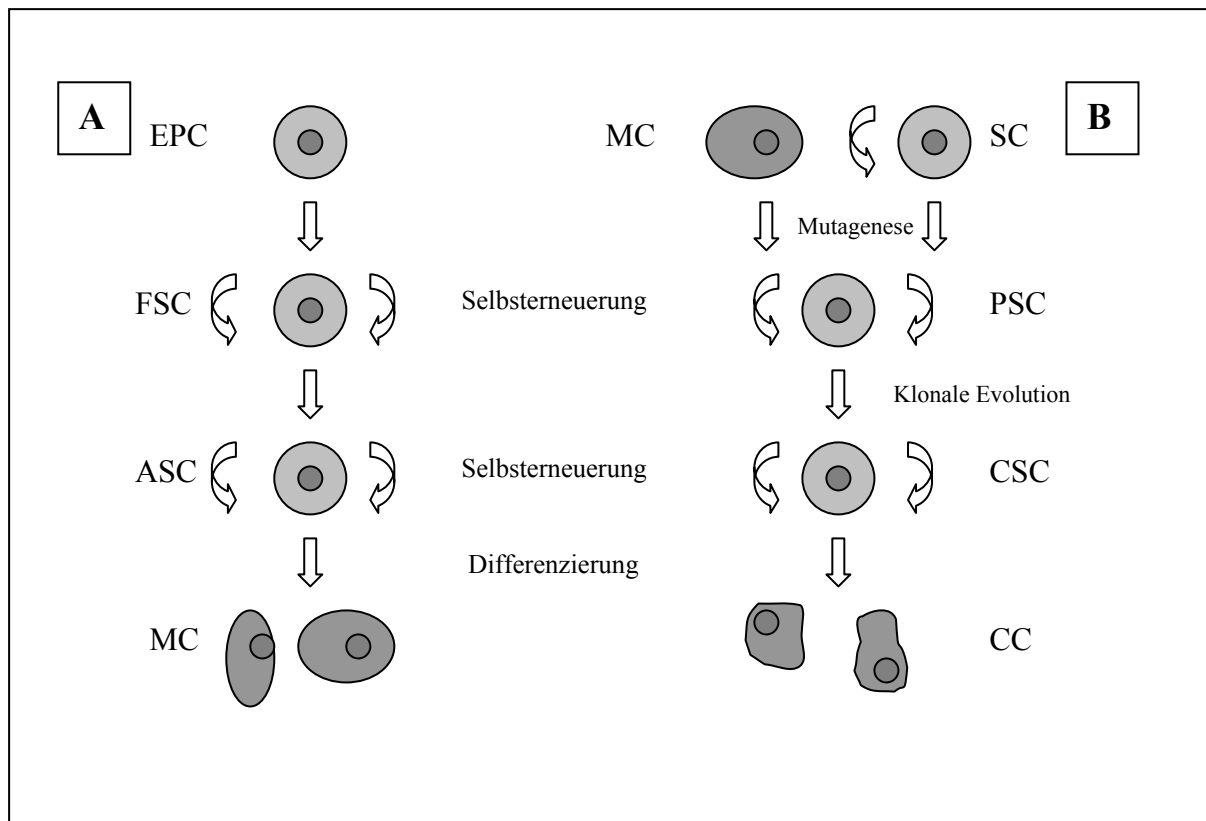


Abbildung 1: Darstellung normaler und maligner Zelldifferenzierungsmodelle (modifiziert nach Pardal et al., 2003)

A: Modell einer normalen Zelldifferenzierung: Ausgehend von pluripotenten embryonalen Vorläuferzellen (Embryonic Precursor Cell=EPC) entwickeln sich über die Zwischenstufe der fetalen Stammzellen (Fetal Stem Cell=FSC) schließlich adulte Stammzellen (Adult Stem Cell=ASC); aus diesen entstehen dann differenzierte Zellen mit begrenztem proliferativen Potential.

B: Modell einer malignen Transformation: Differenzierte Zellen (Mature Cell=MC) erwerben über Mutagenese die Fähigkeit zur Selbsterneuerung oder bereits hierzu befähigte Stammzellen (Stem Cell=SC) erfahren onkogene Mutationen. Über praemaligne Stammzellen (Premalignant Stem Cells=PSC) entstehen dann schließlich Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells=CSC); aus diesen entstehen dann differenzierte Tumorzellen (Cancer Cells=CC) mit begrenztem proliferativen Potential.

2.2.3 Tumorstammzellen

Es konnte zuerst für hämatonkologische Erkrankungen gezeigt werden, dass lediglich ein kleiner Anteil der malignen Zellen zu unbegrenzter Proliferation und der Ausbildung von Kolonien in Weichagar befähigt ist (Bruce und van der Gaag, 1963). Diese Zellen werden als leukämische Stammzellen bezeichnet (Park et al., 1971). Es handelt sich hierbei um eine Subpopulation maligner Zellen, die anhand der Expression von bestimmten

Oberflächenmarkern von nicht in gleichem Maße proliferationsfähigen Zellen unterschieden werden konnte. So konnte bei der akuten myeloischen Leukämie gezeigt werden, dass lediglich CD34⁺CD38⁻ Leukämiezellen in der Lage sind, nach Transfer in NOD/SCID Mäusen eine AML zu induzieren. Sie besitzen damit charakteristische Merkmale des Phänotyps hämatopoetischer Stammzellen (Bonnet und Dick, 1997). CD34⁺CD38⁺ Leukämiezellen waren hierzu nicht befähigt, obwohl sie einen blastischen Phänotyp besitzen. Auch für die chronisch myeloische Leukämie konnten in den unterschiedlichen Erkrankungsphasen Tumorstammzellen identifiziert werden, die anhand distinkter biochemischer und zellbiologischer Marker als eigenständige Subpopulation gekennzeichnet werden können (Savona und Talpaz, 2008; Jamieson et al., 2004).

Neben der Beobachtung, dass nur ein geringer Teil einer Tumorzellpopulation befähigt ist, in Weichagar Kolonien zu bilden, wird diese Theorie auch von dem Phänomen gestützt, dass gewöhnlich eine große Anzahl an Tumorzellen notwendig ist, um in einem Xenograftmodell Tumoren zu induzieren (Hamburger und Salmon, 1977; Al-Hajj et al., 2003).

Gleichzeitig können bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen einzelne disseminierte Tumorzellen im Blut oder Knochenmark detektiert werden, ohne dass diese Patienten jemals ein metastatisches Stadium ihrer Erkrankung entwickeln (Reya et al., 2001).

Die phänotypische Heterogenität vieler Tumore ist wahrscheinlich nicht nur auf eine kontinuierliche Mutagenese, sondern auch auf eine aberrante Differenzierung von Tumorzellen zurückzuführen, wenn innerhalb eines Tumors einzelne Zellen unterschiedliche Differenzierungsmerkmale des ursprünglichen Gewebes aufweisen, so dass neben Stammzellen auch Tumorstammzellen unterschiedlich differenzierte Zellen hervorbringen; als Beispiel sei hier die variable Expression maligner Marker bei der chronisch myeloischen Leukämie angeführt (Reya et al., 2001).

Die Existenz von Tumorstammzellen wird auch für die meisten soliden Tumore postuliert und konnte inzwischen für eine Vielzahl dieser Tumore auch experimentell gestützt werden wie beispielsweise für das Mammakarzinom (Al-Hajj et al., 2003), das Kolonkarzinom (O'Brien et al., 2007), das maligne Melanom (Schatten et al., 2008) und für Hirntumoren (Singh et al., 2004).

Während bisherige onkologische Therapien darauf abzielen, die sichtbare Tumormasse zu verkleinern und an ihrem potentiellen Erfolg hieran evaluiert sind, könnte, neben einer postulierten Akquisition von resistenzbegründenden Mutationen, auch das teils distinkte Muster biochemischer und zellbiologischer Eigenschaften der Tumorstammzellen eine Erklärung für das lokale und distante Rezidivieren maligner Erkrankungen darstellen

(O'Brien et al., 2007; Reya et al., 2001). Dies wird insbesondere dadurch unterstrichen, dass Tumorstammzellen teils Proteine exprimieren, welche wie ABC Transporter eine Chemoresistenz vermitteln können (Schatton et al., 2008; Zhou et al., 2001). Differenzierte Zellen sind daher empfindlicher gegenüber Chemotherapeutika (Pardal et al., 2003). Eine geringere Suszeptibilität oder eine Resistenz der Tumorstammzellen gegenüber üblichen Chemotherapeutika könnte also eine Erklärung für das Versagen dieser Therapien bezüglich einer dauerhaften Tumorkontrolle bilden (Williams et al., 1987). Ebenso konnte in Gliomen für Tumorstammzellen eine hohe Radioresistenz nachgewiesen werden, welche diese Stammzellen von normalen Gliomzellen unterscheidet (Bao et al., 2006). Zukünftige Therapien werden also auch die Vernichtung der Tumorstammzellen zum Ziel haben müssen (Schatton et al., 2008; Reya et al., 2001). Aufgrund der eminenten Bedeutung von sowohl hämatopoetischen als auch gewebeständigen adulten Stammzellen für den Organismus und den Erhalt der Funktionsfähigkeit seiner Organe scheint die Anwendung selektiv stammzelltoxischer Substanzen mit dem Ziel der Depletion der Tumorstammzellpopulation jedoch problematisch (Pardal et al., 2003). Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass es durch Kombination des Anthrazyklins Idarubicin und einem Proteasomeninhibitor möglich ist, selektiv leukämische Stammzellen zu zerstören, ohne dabei die normalen hämatopoetischen Stammzellen in intolerablem Maße zu beeinträchtigen (Guzman et al., 2002).

2.3 Die Bedeutung von Zellfusionen

2.3.1 Zell- und Membranfusion als grundlegendes biologisches Prinzip

Sowohl die Fusion von Zellen als auch die Fusion von Zellmembranen ist ein weit verbreitetes Phänomen von grundlegender Notwendigkeit im Bereich entwicklungsbiologischer, physiologischer, jedoch ebenfalls pathologischer Prozesse bei multizellulären Organismen (Sapir et al., 2008; Chen und Olson, 2005).

Zellfusionen können in der Entwicklung ubiquitär von der Befruchtung bei Säugetieren über die Bildung des Synzitiotrophoblasten bis zur Muskelentwicklung durch Fusion von mononukleären Myoblasten beobachtet werden (Taylor, 2002; Primakoff und Myles, 2007; Borges et al., 2003; Abmayr et al., 2003). Bei Makrophagen führen Differenzierungs- und

schließlich Fusionsprozesse zur Bildung von Riesenzellen (Anderson, 2000; Vignery, 2000; Teitelbaum und Ross, 2003).

Im Rahmen der zuletzt intensiv untersuchten Möglichkeit der Regeneration verletzter oder alternder Zellen durch Stammzellen ist eine Fusion als möglicher Mechanismus in Erscheinung getreten; Fusionen zwischen Progenitorzellen und Zellen des Zielgewebes konnten in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, so zum Beispiel mit Purkinje-Neuronen, Kardiomyozyten und auch Hepatozyten (Alvarez-Dolado et al., 2003; O'Malley und Scott, 2004). Auch weiter differenzierte Zellen wie Makrophagen scheinen bei reparativen Vorgängen über Zellfusionen beteiligt, zumindest ist dies bei hepatischen Erkrankungen beschrieben worden (Willenbring et al., 2004).

Bekanntes Beispiel für eine gewünschte, artefiziell herbeigeführte Zellfusion ist die Bildung von immortalisierten Hybridom- aus Myelomzellen und Lymphozyten zur Herstellung monoklonaler Immunglobuline (Köhler und Milstein, 1975).

Neben einer grundlegenden Rolle von Zellfusionen im Rahmen physiologischer Prozesse sind im pathologischen Bereich gestörte von unregulierten Fusionen zu differenzieren (Chen und Olson, 2005).

Defekte der Zellfusion beispielsweise bei Myoblasten tragen wahrscheinlich zur Pathogenese der myotonen Dystrophie und bei Osteoklasten zur Entwicklung der Osteopetrose bei (Farkas-Bargeton et al., 1988; Teitelbaum und Ross, 2003; Miyamoto und Suda, 2003).

Jedoch kann auch eine erhöhte Rate an Fusionen mit pathologischen Ereignissen verknüpft sein: Seit mehr als 45 Jahren ist bekannt, dass bestimmte Viren Zellfusionen induzieren und so schließlich zur Bildung von Synzities führen können (Okada, 1962). Membranhüllte Viren selbst erlangen Zugang zu ihrer Zielzelle über die Fusion ihrer Oberflächenmembran mit entweder der Plasmamembran der Zelle oder der Membran endozytotischer Vesikel (Earp et al., 2005; Sieczkarski und Whittaker, 2005).

2.3.2 Zellfusion und maligne Transformation

Die Hypothese, dass Zell-Zell-Fusionen an der Progression maligner Erkrankungen wesentlich beteiligt sein könnten, unterliegt aktuell einer intensiven wissenschaftlichen Auseinandersetzung (Bjerkvig et al., 2005; Pawelek und Chakraborty, 2008). Die zu Grunde liegenden Annahmen sind allerdings bereits deutlich älter, so auch jene, dass Krebszellen aus der Hybridisierung von somatischen Zellen und Leukozyten hervorgingen (Rachkovsky et

al., 1998), erweitert durch die Hypothese, dass metastatische Zellen aus der Fusion von Tumorzellen und Lymphozyten entstünden und schließlich, dass die geno- und phänotypische Vielfalt verschiedener Tumorentitäten auf Zellfusionen zurückzuführen sei (Mekler, 1971; Warner, 1975).

Das Phänomen einer spontanen Fusion zwischen Tumorzellen sowohl untereinander als auch zwischen malignen und normalen somatischen Zellen ist hinreichend bekannt und trägt wahrscheinlich zur genetischen und damit auch phänotypischen Heterogenität von Tumoren bei (Wakeling et al., 1994; Larizza und Schirmacher, 1984). Ebenfalls wurde belegt, dass derartige Fusionsereignisse mit der konsekutiven Bildung von Hybridzellen nicht auf Zellkulturen beschränkt sind, sondern auch in vivo vorkommen (Goldenberg et al., 1974).

Tumorzellen fusionieren in vivo mit einer Vielzahl von Zellen, so auch mit mesenchymalen und epithelialen Zellen; insbesondere konnten auch Fusionen mit Stammzellen belegt werden (Pawelek und Chakraborty, 2008; Rizvi et al., 2006). Beim multiplen Myelom konnte eine überraschend hohe Fusionsrate zwischen Osteoklasten und Myelomzellen beobachtet werden: Bis zu 30 % der Zellkerne der isolierten Osteoklasten waren maligner Herkunft, Hinweis auf eine enorme Bedeutung dieser Fusionszellen für die Pathobiologie der Erkrankung (Andersen et al., 2007). Gleichzeitig wandern mesenchymale Stammzellen in Bereiche mit vorherrschender Gewebsschädigung oder chronischer Inflammation ein (Jiang et al., 2002; Coussens und Werb, 2002). Hierdurch können diese Stammzellen in unmittelbare räumliche Nähe zu Tumorzellen und damit ihrem möglichen Fusionspartner gelangen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch die eingewanderten mesenchymalen Stammzellen selbst Ursprung eines epithelialen Tumors werden können: So wurde beobachtet, dass in durch eine Helicobacter Infektion chronisch entzündete Mukosa eingewanderte mesenchymale Stammzellen über Metaplasie und dysplastische Veränderungen die Ursprungszellen eines Magenkarzinoms darstellen können und damit den Ursprung eines epithelialen Tumors (Houghton et al., 2004).

Tumorzellhybridisierungen können relevante Veränderungen der Genexpression bedingen; dies wiederum kann zur Entwicklung von Subpopulationen mit veränderter biologischer Aggressivität und einem höherem malignen Potential führen, wenn beispielsweise hämatopoetische oder lymphoretikuläre, zur Migration befähigte Zellen Eigenschaften auf bis hierhin nicht zur Metastasierung fähige Tumorzellen übertragen (Lagarde und Kerbel, 1984). Die Expression von Genen beider fusionierender Linien kann eine Vielzahl von Eigenschaften der resultierenden metastastischen Zellen erklären wie Migration oder den

Tropismus für Organe wie Lymphknoten, Leber, Gehirn und Knochenmark (Pawelek und Chakraborty, 2008). Gleichzeitig werden bestimmte, eine Resistenz gegen Medikamente vermittelnde Glykoproteintypen sowohl in Tumorzellen als auch in Zellen des Knochenmarkes wie Makrophagen gefunden; als Beispiel seien hier P-Glykoproteine angeführt (Gottesman und Ling, 2006).

In Abgrenzung zum eigentlichen Konzept der Tumorstammzellen könnten also für eine Metastasierung essentielle Eigenschaften wie Migrationsfähigkeit, Selbsterneuerung und unbegrenzte Proliferationsfähigkeit nicht durch maligne Transformation von im Gewebe liegenden Stammzellen, sondern durch Fusion von Tumorzellen mit eingewanderten Stammzellen beziehungsweise anderen aus dem Knochenmark stammenden Zellen herrühren (Pawelek und Chakraborty, 2008). Dieses Konzept bietet eine alternative Erklärung zur Grundlage der Metastasierung, wenn Zellen, die Metastasen bilden, nicht aus disseminierten Tumorstammzellen, sondern hybridisierten Tumorzellen hervorgehen.

Die Herkunft der eigentlichen Tumorstammzellen (cancer stem cells) ist letztlich nicht gesichert. Viele Faktoren sprechen für die sequentielle Akquisition von Mutationen durch im Gewebe liegende Stammzellen (Al-Hajj et al., 2003; Reya et al., 2001). Das traditionelle Modell der klonalen Evolution einer Tumorzellpopulation durch schrittweise erfolgende Mutationen erscheint vor dem Hintergrund der erfolgten Beobachtungen eher unwahrscheinlich (Nowell, 1976). Jedoch bleibt ebenfalls die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass Tumorstammzellen aus der Fusion von Stammzellen und somatischen Zellen entstehen könnten (Bjerkvig et al., 2005). Dabei könnten sowohl die Stamm- als auch die Tumorzellen oder sogar beide Zelltypen zuvor in Bezug zur Entwicklung eines Malignoms stehende Mutationen erworben haben. Zu erwarten wären aneuploide Zellen mit ausgeprägten chromosomalen Aberrationen, wie sie tatsächlich für viele Krebserkrankungen typisch sind (Duesberg, 2005). Aufgrund von möglichen Reduktionsteilungen im Anschluss an eine solche Fusion ist dieser Mechanismus jedoch auch bei schließlich diploiden Zellen in Betracht zu ziehen (Bjerkvig et al., 2005).

Die entstehenden Hybridzellen können phänotypische Charakteristika lediglich eines Zelltyps aufweisen, was ohne detaillierte genetische Analyse als De- oder Transdifferenzierung aufgefasst werden könnte (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

Eine Übersicht der möglichen Ursprünge von Tumorstammzellen liefert Abbildung 2.

Zusätzlich trägt die Fusion von Tumorzellen mit normalen somatischen Zellen innerhalb eines Tumors zur phänotypischen Vielfalt innerhalb desselben bei und erzeugt atypische

Zellen unklarer biologischer Signifikanz, beispielsweise im Bereich des Endothels (Hida und Klagsbrun, 2005).

Die Fusion von Zellen ist abhängig von ihrer Membranstruktur, insbesondere der Anwesenheit bestimmter Glykoproteine, wie durch Anwendung bestimmter Pharmaka gezeigt werden konnte. So ließ sich durch Anwendung des β -HMG-CoA-Reduktasehemmers Lovastatin die Fusion von Myoblasten inhibieren, welche einen frühen Schritt in der Entwicklung der Muskelfaser darstellt (Jamieson et al., 1992). Auch durch Anwendung des Statins Mevastatin konnte eine Fusionsinhibition erzielt werden, gleichzeitig konnte eine Reduktion der Bindung der Lektine ConA und WGA an Oberflächenoligosaccharide beobachtet werden, woraus eine statinbedingte Reduktion von Oberflächenglykoproteinen bei Myoblasten abgeleitet wurde (Belo et al., 1993).

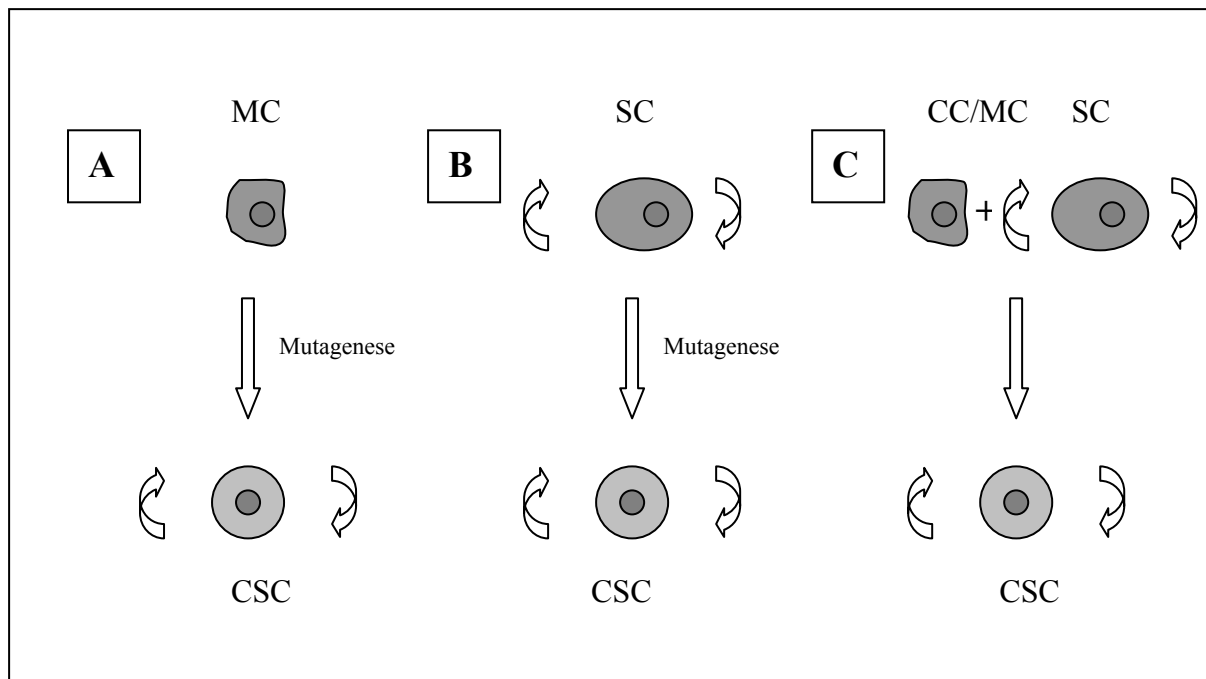


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Modelle zur Entstehung von Tumorstammzellen (modifiziert nach: Bjerkvig et al., 2005).

A: Modell der Tumorstammzellentstehung aus einer differenzierten Zelle: Ausgehend von einer differenzierten Zelle (Mature Cell=MC) findet über sequentiell erworbene Mutationen ein Erwerb von malignen und Stammzeleigenschaften statt.

B: Modell der Tumorstammzellentstehung aus einer adulten Stammzelle: Im Gewebe liegende Stammzellen (Stem Cell=SC) erfahren eine maligne Transformation.

C: Modell der Tumorstammzellentstehung durch Fusion: Differenzierte Zellen (MC) oder bereits maligne Zellen (Cancer Cell=CC) fusionieren mit im Gewebe liegenden Stammzellen (SC). Eine anschließende Mutagenese zur Malignisierung ist nicht in jedem Fall erforderlich.

Gemeinsamer Endpunkt ist die Entstehung einer Tumorstammzelle (Cancer Stem Cell=CSC). Semizirkuläre Blockpfeile: Selbsterneuerung.

2.4 Metastasierung maligner Tumore

2.4.1 Metastasierung als mehrschrittiger Prozess

Metastasen und damit nicht die zugehörigen Primärtumoren sind verantwortlich für ungefähr 90 % der Krebstodesfälle (Eccles und Welch, 2007). Bei bestimmten soliden malignen Tumoren wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom oder dem Pankreaskarzinom liegt zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits eine ausgedehnte Metastasierung vor (Nguyen und

Massagué, 2007). Andererseits präsentieren sich Metastasen teils ohne fassbaren Primarius (van de Wouw et al., 2003).

Metastasierung als Prozess der Ausbreitung von Tumorzellen von ihrem primären Entstehungsort an distante Manifestationsorte mit der konsekutiven Ausbildung von Tumorabsiedlungen ist Gegenstand intensiver Forschungen, wobei ein integrierendes Gesamtkonzept jedoch fehlt (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003; Gupta und Massagué, 2006). Dabei wird ein mehrschrittiges, sequentielles Grundmuster postuliert, dessen einzelne Schritte vollständig abgelaufen sein müssen, bevor eine Metastase klinisch manifest wird: Die Angiogenese im Bereich des Primärtumors oder indirekt die Ausbreitung über lymphatische Gefäße und dann folgend Blutgefäße ermöglicht die Intravasation von Tumorzellen, welche dann in der Zirkulation überleben müssen, bis es schließlich zu Extravasation in das ein Gefäß umgebende Gewebe kommt. Dort müssen die Tumorzellen in der Lage sein zu proliferieren, wozu schließlich auch hier neue Blutgefäße notwendig sind (Chambers et al., 2002; Folkman, 1992; Woodhouse et al., 1997).

Der Metastasierungsprozeß erscheint dabei äußerst ineffizient, insofern man die Entwicklung klinisch evidenter Metastasen als Endpunkt betrachtet, denn während bei Tumorpatienten vergleichsweise hohe Zahlen einzelner disseminierter Tumorzellen (Disseminated Tumour Cells=DTC) in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnten, bleibt deren Bedeutung und hier insbesondere die Frage, warum nur ein äußerst geringer Anteil dieser Zellen sich zu dann klinisch detektierbaren Metastasen weiterentwickelt, immer noch unklar (Luzzi et al., 1998; Pantel et al., 2008).

Das Knochenmark scheint dabei das bevorzugte Organ für die Ausbreitung von disseminierten Tumorzellen darzustellen (Pantel und Alix-Panabières, 2007). Dabei korreliert das Vorhandensein dieser Tumorzellen im Knochenmark beispielsweise beim Mammakarzinom klar mit der Entwicklung von hämatogenen Fernmetastasen und einer insgesamt schlechten Prognose (Braun et al., 2005). Es könnte daher ein Reservoir für rezirkulierende Tumorzellen darstellen, von wo aus die sekundäre Besiedlung anderer Organe erfolgen könnte; gleichzeitig könnten diese Zellen zwischen Metastasen rezirkulieren (Pantel et al., 2008). Die Ausbreitung einzelner Tumorzellen ist möglicherweise ein früherer Schritt der malignen Progression als bisher angenommen; vor dem Hintergrund des Konzeptes der disseminierten Tumorzellen erfolgt damit auch die Metastasierung teilweise als früher Schritt der malignen Erkrankung (Hüsemann et al., 2008; Pantel und Brakenhoff, 2004).

Eine mögliche Erklärung der fehlenden Progression dieser Tumorzellen zu klinisch evidenter Metastasen könnte das Tumorstammzellkonzept liefern (Reya et al., 2001). Demnach wären

nur disseminierte Tumorstammzellen zur Proliferation und damit Ausbildung von Metastasen befähigt, nicht jedoch differenzierte Tumorzellen, welche weder das notwendige Potential zur Selbsterneuerung besitzen noch zur Bildung differenzierungsfähiger Tochterzellen in der Lage wären (Brabletz et al., 2005). Mögliche Interaktionen zwischen den disseminierten Tumorzellen und den im Knochenmark befindlichen Stammzellen sind wenig untersucht; vor dem Hintergrund der immer noch unklaren Entstehungsweise von Tumorstammzellen und dem möglichen Mechanismus der Bildung durch Fusion zwischen Stammzellen und Tumorzellen scheint die Bevorzugung des Knochenmarkes als Sammelpunkt für disseminierte Tumorzellen jedoch höchst interessant, da hier unterschiedliche Stammzelltypen in Kontakt zu diesen Tumorzellen gelangen können (Bjerkvig et al., 2005). Das Knochenmark könnte damit ein zentrales Kompartiment für die maligne Progression allgemein und den Metastasierungsprozess im Besonderen darstellen.

2.4.2 Das Konzept der epithelial-mesenchymalen Transition als Voraussetzung der Metastasierung

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozeß, innerhalb dessen epitheliale Zellverbände ihre Polarität und Zell-Zell-Kontakte verlieren und dabei einen ausgeprägten Umbau ihres Zytoskelettes erfahren, der dazu führt, dass diese Zellen migrieren können, was einem mesenchymalen Phänotyp entspricht. Diese Zellen exprimieren mesenchymale Marker und werden migrationsfähig; hiermit wird die Wanderung dieser Zellen an Orte der Organbildung ermöglicht (Thiery, 2002). Die epithelial-mesenchymale Transition stellt eine grundlegende Voraussetzung vieler entwicklungsbiologischer Prozesse dar wie beispielsweise der Gastrulation, der Bildung der Neuralleiste, der Herzentwicklung oder der Bildung des muskuloskelettalen Systems (Kang und Massagué, 2004). Viele Proteine, die teils als Transkriptionsfaktoren Schlüsselrollen bei der EMT im Rahmen der Entwicklung einnehmen, spielen ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Tumorprogression. Ein zentraler Moment der EMT ist der Verlust der Expression von E-Cadherin, das einen wichtigen Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte darstellt (Brabletz et al., 2005). Fehlt E-Cadherin, wird der Übergang von Adenomen zu Karzinomen beobachtet und die Invasivität von Tumorzellen nimmt zu (Thiery, 2002).

Brabletz et al. (2005) schlugen ein Konzept wandernder Stammzellen vor: Tumorstammzellen, die eine epithelial-mesenchymale Transition erfahren haben, gewinnen

im Gegensatz zu stationären Tumorstammzellen Mobilität und sind anschließend dazu befähigt, zu metastasieren. Diese Tumorstammzellen erhalten Charakteristika eines mesenchymalen Phänotypes wie eine Aktivierung des TGF- β -Signalweges (Eger et al., 2004).

Jedoch kann auch durch Fusion ein Heterokaryon entstehen, welches phänotypische Charakteristika beider Fusionspartner exprimiert (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Herzog et al., 2003). Der Beitrag von Zellfusionen mit mesenchymalen Stammzellen zu Prozessen ähnlich der epithelial-mesenchymalen Transition und damit der Erzeugung einer migrationsfähigen Tumorstammzelle ist bisher kaum untersucht.

2.4.3 Organpräferenz

Bestimmte Tumorentitäten zeigen charakteristische Metastasierungsmuster: So manifestieren sich beispielsweise Fernmetastasen des Adenokarzinoms der Prostata bevorzugt im Knochenmark, während Metastasen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms vorzugsweise im Knochenmark, den Nebennieren und im Gehirn in Erscheinung treten (Weiss, 1992).

Zwei Hypothesen konkurrieren um die Erklärung dieses Phänomens. Paget formulierte erstmals die Hypothese, dass diese Präferenzmuster Ergebnis einer damals noch nicht näher beschriebenen Abhängigkeit von Tumorzelle und Zielorgan sein könnten (Paget, 1889; Poste und Paruch, 1989). Demgegenüber vermutete Ewing, dass Zirkulationsmuster zwischen Primärtumor und Manifestationsort der Metastasen diese Organpräferenz erklären könnten (Ewing, 1928). Neuere Untersuchungen zeigen, dass keine dieser Theorien alleine in der Lage ist, klinisch evidente Metastasierungsmuster zu erklären (Zetter, 1990; Fidler, 2001).

Deshalb muss nach neuen Erklärungen für das Problem der Organpräferenz gesucht werden. Ein Ansatz könnte darin bestehen, dass man die Stimulation der Tumorzellen durch Chemokine in Betracht zieht.

2.4.4 Der Chemokinrezeptor CXCR4

Chemokine sind kleine Proteine niedriger Molekularmasse (5-15 kDa), deren Nomenklatur und Klassifikation auf der Zahl und Anordnung von Cysteinresten in konservierten Lokalisationen beruht. Hiervon ausgehend lassen sich vier Hauptgruppen von Chemokinen unterscheiden: CXC, CC, C und CX3C. Chemokine stellen chemotaktisch wirksame

Zytokine dar, deren Ausschüttung die gerichtete Migration von Leukozyten verursacht, wobei die Freisetzung diese Botenstoffe durch pathogene Stimuli, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann (Zlotnik und Yoshie, 2000). Die Migration der den entsprechenden Rezeptor exprimierenden Zellen erfolgt dabei entlang eines chemischen Gradienten (Balkwill, 2004). Chemokinsignalwege besitzen eine gut dokumentierte Rolle bei der Migration von Zellen, insbesondere beim homing von Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen zu bestimmten Organen (Peled et al., 1999; Baggiolini, 1998; Homey et al., 2002), aber auch im Rahmen der Myelopoese und anderer entwicklungsbiologischer Prozesse wie der Migration von Neuronen im Cerebellum (Ma et al., 1998). In Knockout-Modellen der CXCR4/CXCL12 Achse kommt es dementsprechend zu Defekten in der Kolonisierung des Knochenmarkes durch hämatopoetische Stammzellen und zu Entwicklungsdefekten verschiedener Organe wie beispielsweise des Gehirns (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998).

Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen und werden neben Leukozyten auch auf endothelialen und einigen epithelialen Zellen gefunden, insbesondere solchen, die eine maligne Transformation erfahren haben (Müller et al., 2001; Wang et al., 1998).

In malignen Tumoren kommt es neben der Ansammlung von eigentlichen Tumorzellen charakteristischerweise zu einem leukozytären Infiltrat. Das hierdurch entstehende Chemokinnetzwerk innerhalb des Tumors beeinflusst wahrscheinlich Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration von Tumor- und Stromazellen (Balkwill und Mantovani, 2001).

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften sind Chemokine mit ihren Rezeptoren und ihre tumorbiologische Bedeutung seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen geworden (Müller et al., 2001). Chemokine beeinflussen zentrale Bereiche der Tumorprogression wie das Wachstum von Tumorzellen, die Angiogenese und die Immunantwort gegen maligne Zellen (Luboshits et al., 1999; Tachibana et al., 1998; Vicari et al., 2000).

Der in seiner tumorbiologischen Bedeutung am besten untersuchte Chemokinrezeptor ist CXCR4 (Balkwill, 2004). Dieser Rezeptor besitzt in Abgrenzung zu den meisten anderen Chemokinrezeptoren lediglich einen bekannten Liganden, nämlich CXCL12. Während der Entwicklung steuert die CXCR4/CXCL12-Achse die Migration von embryonalen Zellen bei der Vaskularisierung des Gastrointestinaltraktes, der Mobilisierung von hämatopoetischen

Stammzellen, dem homing von Stammzellen und dem Transport von naiven Lymphozyten (Balkwill, 2004; Tachibana et al., 1998).

Diverse Tumorentitäten exprimieren den Rezeptor CXCR4, während in denjenigen Organen, welche ein häufiges Ziel der Metastasierung darstellen wie beispielsweise Lymphknoten, Leber und Knochenmark, CXCL12 exprimiert wird (Dorsam und Gutkind, 2007). Entsprechend geht die vermehrte Expression von CXCR4 auf Tumorzellen mit einer erhöhten Metastasierungshäufigkeit und einer schlechten Prognose einher (Balkwill, 2004). Dies ist vor allem auf die starke chemotaktische Wirkung des CXCL12 zurückzuführen.

CXCL12 wird neben der physiologischen Sekretion auch am Ort einer Gewebeschädigung sezerniert wie lokal nach einem Myokardinfarkt, nach einer Ischämie der Extremitäten oder nach Radio- beziehungsweise Chemotherapie (Kucia et al., 2005; Ponomaryov et al., 2000).

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Stammzellen exprimiert ebenfalls CXCR4 (Ma et al., 1998). Damit ist zu vermuten, dass nach einer posttherapeutischen Schädigung eines malignen Tumors oder von Metastasen, beispielsweise nach kurativ intendierter Radiatio, über eine Ausschüttung von CXCL12 nicht nur Stammzellen an den Ort der Schädigung rekrutiert werden, sondern auch Tumorzellen (Kucia et al., 2005). Hierdurch könnte eine Repopulation der eigentlich therapierten Metastase durch CXCR4⁺ Tumorzellen erfolgen. Gleichzeitig ergeben sich jedoch bereits durch die einwandernden Stammzellen negative Auswirkungen, wenn durch sezernierte Chemokine wie CCL5 Invasivität, Migrationsfähigkeit und damit das metastastische Potenzial der verbliebenen Tumorzellen gesteigert werden (Karnoub et al., 2007).

Bei einer Vielzahl von Tumoren konnte eine CXCR4-Expression nachgewiesen werden, jedoch oft nur bei einer Subpopulation der Tumorzellen (Balkwill, 2004). Normale Zellen des Brustgewebes exprimieren CXCR4 lediglich in einem geringen Maße oder gar nicht, in Metastasen finden sich hingegen Brustkrebszellen, welche stark positiv für CXCR4 sind (Müller et al., 2001). Die Expression dieses Rezeptors ist bei vielen dieser malignen Tumoren aberrant und als ein negativer prognostischer Faktor zu betrachten. So fand sich unter anderem eine prognostisch ungünstige Expression von CXCR4 beim Mammakarzinom (Smith et al., 2004; Kang et al., 2005; Müller et al., 2001), beim metastasierten Prostatakarzinom (Akashi et al., 2008), bei Ovarialkarzinomzellen (Scotton et al., 2001), beim kolorektalen Karzinom (Ottaiano et al., 2006) und beim malignen Melanom (Scala et al., 2005).

Die CXCR4/CXCL12-Achse besitzt für Tumorzellen zwei wesentliche Bedeutungen: Zum einen findet über sie eine Steigerung der Migrationsfähigkeit und Invasivität der malignen

Zellen statt, zum anderen verstärkt sie das Zellwachstum und die Überlebensfähigkeit (Balkwill, 2004).

Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms exprimieren eine hohe Dichte von CXCR4 Rezeptoren; eine Aktivierung des CXCR4/CXCL12-Signalweges bei diesen Zellen führt zu einer gesteigerten integrinvermittelten Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix sowie an Stromazellen (Burger et al., 2003; Hartmann et al., 2004; Hartmann et al., 2005). Diese Stromazellinteraktion ist in der Lage, Tumorzellen vor einer chemotherapieinduzierten Apoptose zu schützen (Hartmann et al., 2005). Ferner erhöht CXCL12 die Motilität von Tumorzellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und deren Proliferationsrate (Kijima et al., 2002).

Durch Stimulation mit CXCL12 ließ sich bei Zellen eines Ovarialkarzinoms eine gesteigerte DNA-Synthese und somit eine Verstärkung des Zellwachstums hervorrufen, gleichzeitig wanderten diese Zellen entlang eines CXCL12-Gradienten (Scotton et al., 2002).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass CXCL12 die Fusion von Monozyten *in vitro* stimuliert, damit könnte ein Beitrag zu Entstehung von Tumorstammzellen möglich sein (Bjerkvig et al., 2005; Wright et al., 2005).

Bei einigen Tumoren ließ sich mRNA für das Chemokin CXCL12 im Primärtumor selbst nachweisen, so beim Pankreaskarzinom, bei Gliomen und beim Ovarialkarzinom: Analog zur Rolle des CXCL12 im Knochenmark sollte hierdurch bei CXCR4⁺ Zellen eher eine Retention dieser Zellen innerhalb der Primärlokalisation als eine Dissemination ausgelöst werden (Balkwill, 2004). Die Wechselwirkungen innerhalb der CXCR4/CXCL12-Achse müssen jedoch als dynamischer Prozess betrachtet werden. In Tumorregionen, in denen CXCL12 exprimiert wird, könnte dieses durch Proteasen abgebaut werden und durch lokale Bedingungen die CXCR4-Expression gesteigert werden; somit könnten einzelne Subpopulationen von Tumorzellen zur Auswanderung angeregt werden, auch wenn CXCL12 als Ligand prinzipiell präsent ist (Balkwill, 2004).

Beim Mammakarzinom ließ sich durch Inhibition von CXCR4 mittels eines monoklonalen Antikörpers *in vivo* die Metastasierungsrate signifikant reduzieren (Müller et al., 2001).

Durch Depletion des Membrancholesterols mittels eines β -HMG-CoA-Reduktasehemmers konnte die Migration von CXCR4⁺ Tumorzellen entlang eines CXCL12-Gradienten gestört werden (Kucia et al., 2005). Durch eine verminderte Inkorporation von Cholesterol in die Zellmembran kommt es wahrscheinlich zu einer Behinderung der Bildung von lipid rafts, worauf bei Tumoren verschiedene therapeutische Effekte durch Statine zurückzuführen sein dürften (Schmidmaier et al., 2004).

Aufgrund der Bedeutung der CXCR4/CXCL12-Achse für die Tumorzellproliferation und innerhalb des Metastasierungsprozesses scheint ihre pharmakologische Beeinflussung therapeutische Möglichkeiten zu eröffnen.

2.4.5 Das Bizyklam AMD3100-Octahydrochlorid als CXCR4-Inhibitor

Bizyklame wurden ursprünglich als Inhibitoren der Replikation des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)-1 und HIV-2 identifiziert (De Clercq et al., 1992; De Clercq et al., 1994; Donzella et al., 1998). Das Bizyklam 1,1'-[1,4-phenylenbis(methylen)]bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-octahydrochlorid (AMD3100-Octahydrochlorid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ist ein hochspezifischer und potenter Antagonist an CXCR4. Die beiden über einen Phenylenbismethylen-Linker verbundenen Zyklamreste binden an die Aspartatreste Asp¹⁷¹ in der Transmembrandomäne IV und Asp²⁶² in der Transmembrandomäne VI des Rezeptors und verhindern so wahrscheinlich eine für den Übergang vom inaktiven zum aktiven Rezeptorzustand notwendige Konformationsänderung (Gerlach et al., 2001; Rosenkilde et al., 2004; Rosenkilde et al., 2007). AMD3100 inhibiert damit neben der durch CXCL12 induzierten Internalisierung des Rezeptors auch die nachgeordnete Signalkaskade mit einem ausbleibenden intrazellulären Anstieg des freien Calciums und schließlich chemotaktische Phänomene, wobei sich durch Substitution mit Metallionen die Affinität von AMD3100 zum Rezeptor um ein Vielfaches steigern lässt (Schols et al., 1997; Hatse et al., 2002; Gerlach et al., 2003).

Aufgrund der CXCR4-Überexpression auf Zellen verschiedener Tumorentitäten werden therapeutische Möglichkeiten einer Inhibition des Rezeptors untersucht. Bei primären cerebralen Malignomen konnten im Mausmodell eine Wachstumsverlangsamung von transplantierten Tumoren beobachtet werden sowie synergistische Effekte einer Applikation von AMD3100 zur Chemotherapie (Rubin et al., 2003; Redjal et al., 2006). Therapeutische Effekte der Substanz konnten ebenso beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom wie beim peritoneal metastasiertem Magenkarzinom gefunden werden (De Falco et al., 2007; Yasumoto et al., 2006).

Das Bizyklam AMD3100 ist also in der Lage, zuverlässig die CXCR4/CXCL12-Achse zu unterbrechen und damit die über diesen Signalweg vermittelten Effekte wie die gerichtete Zellmigration zu unterbinden.

Die Anwendung von CXCR4-Antagonisten im hämatoonkologischen Bereich wird derzeit intensiv untersucht, insbesondere scheint sich die Substanz im Bereich der Mobilisierung von hämatopoetischen Progenitorzellen als hilfreich zu erweisen. So konnte durch die Gabe von AMD3100 bei Probanden eine starke Leukozytose und eine Erhöhung der Anzahl an CD34⁺ Zellen im peripheren Blut ausgelöst werden, da die migrationsinhibierende Wirkung des CXCL12 aufgehoben wurde (Liles et al., 2003). Durch Applikation von AMD3100 in Kombination mit G-CSF bei Patienten mit Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphomen, die durch übliche Mobilisierungsprotokolle keine Stammzellen für eine autologe Stammzelltransplantation sammeln konnten, ließ sich schließlich doch eine ausreichende Zahl CD34⁺ Zellen rekrutieren (Calandra et al., 2008).

Damit ist vorstellbar, dass eine CXCR4-Inhibition zu einer verringerten Migration von Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes ins Knochenmark führen würde. Gleichzeitig müsste jedoch die Migrationsbereitschaft im Knochenmark befindlicher CXCR4⁺ Tumorzellen wieder erhöht werden.

2.5 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

2.5.1 Epidemiologie

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein maligner Tumor der Lunge, welcher durch eine kurze Tumorverdopplungszeit, eine frühzeitige lympho- und hämatogene Metastasierung, häufiges Auftreten paraneoplastischer Syndrome, eine dramatische initiale Antwort auf Chemotherapie und Radiatio sowie durch eine hohe Rezidivneigung, und damit eine äußerst ungünstige Prognose, gekennzeichnet ist (Elias, 1997; Stupp et al., 2004).

Als eigenständige pathologische Entität innerhalb der Gruppe der malignen Lungentumoren wurde das kleinzellige Bronchialkarzinom erstmals von Azzopardi vor annähernd fünf Jahrzehnten beschrieben, seit nun drei Jahrzehnten wird es auch als eigenständige klinische Entität betrachtet (Azzopardi, 1959; Cohen et al., 1978). Sein Anteil an den primären, bösartigen Lungentumoren beträgt näherungsweise 13-20 % (Simon und Turrisi, 2007).

Den wesentlichen Risikofaktor für das Auftreten dieses Malignoms stellt das Zigarettenrauchen dar, wobei insbesondere starke Raucher betroffen sind (Ettinger und Aisner, 2006). Insgesamt wurden im Jahr 2007 213380 Neuerkrankungen an bösartigen pulmonalen Tumoren und Tumoren des Bronchialsystems in den Vereinigten Staaten

diagnostiziert, wobei die Gesamtinzidenz seit Jahren kontinuierlich ansteigt (Jemal et al., 2007). Dessen ungeachtet ist jedoch über die letzten Jahrzehnte wahrscheinlich aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten ein deutlicher Rückgang des proportionalen Anteils des kleinzelligen Bronchialkarzinoms an allen malignen pulmonalen Tumoren zu verzeichnen, welcher sich in den Vereinigten Staaten zwischen 1986 und 2002 von 17,26 % auf 12,95 % verringerte (Govindan et al., 2006); dabei erhöhte sich in den Vereinigten Staaten der Anteil der Frauen an der Gesamtinzidenz des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zwischen 1973 und 2002 von 28 auf 50 % (Govindan et al., 2006).

2.5.2 Therapie und Prognose

Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird primär chemotherapiert, und zwar mit einem platinhaltigen Kombinationschema zusammen mit Etoposid (Sundstrom et al., 2002). Stadienabhängig wird diese durch eine lokale Radiatio sowie eine kraniale Bestrahlung ergänzt (Warde und Payne, 1992). In sehr frühen Tumorstadien scheint eine Resektion des Primärtumors prognostisch sinnvoll (Simon et al., 2001; Shepherd et al., 1991).

Derzeit werden unterschiedliche neue Ansätze zur Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms intensiv untersucht, so zum Beispiel der Einsatz von Angiogenese- und Tyrosinkinaseinhibitoren (Spigel et al., 2007).

Ebenso wird versucht, durch Hochdosischemotherapien gefolgt von Stammzelltransplantationen zum Ausgleich der myelotoxischen Wirkungen einer solchen Therapie höhere Überlebensraten zu erzielen (Iwasaki et al., 2005; Pasini et al., 2002).

Die Vielzahl potentieller Interaktionen transplanteder Stammzellen mit den Tumorzellen und die daraus resultierenden möglichen Auswirkungen auf tumorbiologische, hämatologische oder pharmakologische Prozesse stellen sich bis heute wenig untersucht dar.

Die Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist äußerst ungünstig, bei eingetretener Fernmetastasierung infaust. Die mediane Überlebenszeit ohne Behandlung liegt zwischen zwei und vier Monaten (Simon und Turrisi, 2007).

III. Material und Methoden

3.1 Die Zelllinien

3.1.1 Die mesenchymale Stammzelllinie

Die humane mesenchymale Stammzelllinie hmsc T. M. wurde von Frau PD Dr. rer. nat. C. Lange (Zentrum für Innere Medizin, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf) etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Die Bronchialkarzinomzelllinien

Es wurden vier verschiedene, umfassend charakterisierte, humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien verwendet. Die Zelllinie NCI-H82 wurde 1978 von A.F. Gazdar aus einem Pleurapunktat etabliert, die Zelllinie SW2 im Labor von Dr. S.D. Bernal, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA, aus einer Knochenmarksmetastase, die klassische Zelllinie OH1 und die Zelllinienvariante OH3 aus einem Primärtumor.

Die Bronchialkarzinomzelllinien wurden sämtlich freundlicherweise von Prof. Dr. med. Uwe Zangemeister-Wittke (Zentrum Klinische Forschung, Labor für Molekulare Onkologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Die Kolonkarzinomzelllinie HT29

Die umfassend charakterisierte Zelllinie HT29 wurde 1964 aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons isoliert und diente in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle für die Fusionsexperimente.

3.2 Geräte und Verbrauchsmittel

Spezielle Methoden-bezogene Geräte, Verbrauchsmittel und Kits werden in Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt. Weitere eingesetzte Geräte und Verbrauchsmittel entsprechen den üblichen Laborstandards und werden nicht weiter aufgeführt.

3.3 Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit den mesenchymalen Stammzellen, den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien und der Kolonkarzinomzelllinie erfolgten ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank (SterilGARD®, Class II Type A/B₃, Biological Safety Cabinet; The Baker Company, Sanford, Maine, USA) unter sterilen Bedingungen.

Die Kultivierung der jeweiligen Zelllinie erfolgte im entsprechenden Kulturmedium unter Standardbedingungen (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂/95 % Luft) in einem Hera Cell Brutschrank (Heraeus Instruments, Deutschland).

3.3.1 Kultivierung von humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien

Die Kultivierung der Bronchialkarzinomzellen erfolgte in 50 cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) in einem Brutschrank unter den oben beschriebenen Standardbedingungen.

Als Nährmedium für die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien diente Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (Gibco® RPMI 1640; Invitrogen, Carlsbad, USA), welches zusätzlich mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS; Gibco®), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco®) versetzt wurde. Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet.

Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte je nach Wachstum der Zellen zwei- bis dreimal pro Woche, indem je nach Zelldichte ein Teil der Zellen abgesaugt wurde und die Zellkulturflaschen wieder auf insgesamt 25 ml Kulturmedium aufgefüllt wurden. Einmal pro Woche wurden alle Bronchialkarzinomzellkulturen in sterile 30 ml-Kunststoffröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert, bei 1000 U/min 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden vorsichtig in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Tumorzellsuspension wurden je nach Bedarf für geplante Experimente auf neue Zellkulturflaschen aliquotiert, die bereits mit 25 ml Kulturmedium aufgefüllt waren. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurde der Inhalt dieser Zellkulturflaschen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurde dann die gewünschte Zellzahl für die Experimente entnommen.

3.3.2 Kultivierung der humanen Kolonkarzinomzelllinie

Die humanen Kolonkarzinomzelllinie HT 29 wurde analog den übrigen Tumorzellen in 50 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen in RPMI 1640 Medium kultiviert; hinsichtlich Kultivierung und Passagierung wurde mit dieser Zelllinie verfahren wie oben bereits bezeichnet (s. 3.3.1).

3.3.3. Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Als Nährmedium für die humane mesenchymale Stammzelllinie hmsc T. M. diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco® DMEM; 1000 mg/L Glukose, 4 mM L-Glutamin, 110 mg/L Natriumpyruvat; Invitrogen, Carlsbad, USA), welches zusätzlich mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS; Gibco®), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco®) versetzt wurde. Dieser Ansatz wird im Folgenden als Stammzellkulturmedium bezeichnet. Ein Wechsel des Stammzellkulturmediums erfolgte dreimal die Woche.

Die Kultivierung erfolgte in 175 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) bis zu einer ungefähr 80 %-igen Konfluenz. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde nach Absaugen des Kulturmediums die Zellkulturflasche mit 15 ml PBS (Gibco® PBS; Invitrogen, Carlsbad, USA) gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco® Trypsin-EDTA; Invitrogen, Carlsbad, USA) für die Dauer von 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Das Trypsin-EDTA wurde nach Ablauf dieser Zeit durch Zugabe des Stammzellkulturmediums im Verhältnis 1:1 inaktiviert, um so die Ablösereaktion zu unterbinden und eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

Anschließend wurde die so gewonnene Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen, die zuvor mit 15 ml Stammzellkulturmedium befüllt worden waren, verteilt oder Experimenten zugeführt.

Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte dann bis zum erneuten Erreichen einer ungefähr 80 prozentigen Konfluenz, bevor erneut passagiert wurde.

3.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Um sowohl Standardisierung als auch Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden vor Beginn der Versuchsreihen Aliquots aller oben genannten Zelllinien kryokonserviert.

Hierzu wurden Zellen der entsprechenden Zelllinie wie zuvor beschrieben (s. 3.3.1 und 3.3.3) in Suspension gebracht und in 30-ml-Kunststoff-Röhrchen bei 1500 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt.

Die resultierenden Zellpellets wurden anschließend in Gefriermedium (Cryo-safe Ir, c.c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland) resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials, Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark) auf identische Aliquots von 1 ml verteilt. Diese wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers für 40 min bei -25 °C tiefgefroren und hiernach über Nacht auf -80 °C herabgekühlt. Im Anschluss daran erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Die Kryokonservierung der humanen mesenchymalen Stammzellen hmsc T. M. erfolgte als Passage 5 (P₅).

3.3.5 Revitalisierung kryokonservierter Zellen

Zur Revitalisierung von zuvor kryokonservierten Zellen wurde die benötigte Anzahl von Zellpellets bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut und auf zuvor mit dem entsprechenden Kulturmedium befüllte Zellkulturflaschen verteilt. Eine Kultivierung erfolgte unter den zuvor beschriebenen Standardbedingungen, bis eine hinreichende Zelldichte erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wie zuvor beschrieben (s. 3.3.1 und 3.3.3) in Suspension gebracht und den entsprechenden Experimenten zugeführt beziehungsweise erneut auf Zellkulturflaschen verteilt.

Um Passageeffekte zu minimieren, wurden sämtliche im Folgenden beschriebenen Experimente mit humanen mesenchymalen Stammzellen der Passagen 8 bis 13 (P₈-P₁₃) durchgeführt. Versuche mit murinen mesenchymalen Stammzellen wurden mit Zellen der Passage 4 bis 8 (P₄-P₈) vorgenommen. Keine der Tumorzelllinien wurde mehr als zwanzigmal passagiert.

3.3.6 Detektion einer möglicherweise vorhandenen Mykoplasmen-Kontamination

Zur Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination durch Mykoplasmen im Vorfeld der weiter unten beschriebenen Aliquotierung und Kryokonservierung der Zelllinien bzw. der durchzuführenden Versuchsreihen, wurde der Mykoplasma Hoechst Stain Kit (MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Deutschland) auf Basis einer Fluoreszenz-vermittelten Darstellung der DNS eingesetzt. Der Test ist zum Nachweis der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenpezies geeignet und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei keiner der Zelllinien konnte eine Kontamination festgestellt werden.

3.3.7 Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer eingesetzt. Die Zählkammer weist folgende Maße auf: Tiefe 0,100 mm, Fläche 1 mm²; sie beinhaltet ein Gitternetz, das aus 4 Quadranten mit jeweils sechzehn Quadraten besteht.

Zunächst wurde aus einer Zellsuspension mit Hilfe von PBS (Gibco®) eine Verdünnung von 1:10 hergestellt. Anschließend wurden 10 µl dieser Suspension in eine Zählkammer pipettiert und insgesamt vier Großquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die dabei erhaltene Zellzahl wurde durch vier dividiert, um die Zellzahl pro Quadrant zu erhalten, anschließend mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dann mit 10⁴ multipliziert, da ein Großquadrat ein Volumen von 0,1 mm³ besitzt. Hierdurch wurde die Zellzahl pro ml Suspension errechnet.

$$\frac{\text{Gesamtzahl der Zellen aller Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor (10)} \times 10^4}{\text{Anzahl der Quadranten}} = \text{Zellzahl / ml}$$

Abbildung 3: Formel für die Berechnung der Zellzahl mittels der Zählkammer nach Neubauer

Diese Methode ist wegen ihrer Genauigkeit der maschinellen Zellzählung insbesondere bei Suspensionen mit geringen Zellzahlen oder Zellkonglomeraten überlegen, weshalb nach Abschluss der Etablierungsphase vollständig auf die maschinelle Zählung verzichtet wurde.

3.4 Zellmorphologie koinkubierter mesenchymaler Stammzellen und kleinzelliger Tumorzellen

3.4.1 Lichtmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkulturbedingungen

Die morphologische Beurteilung der jeweiligen koinkubierten humanen Stammzell- und Tumorzellpräparationen unter den oben näher bezeichneten Standardzellkulturbedingungen erfolgte unter Verwendung eines entsprechenden Photomikroskops (Axiovert 35, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) als Durchlichtmikroskopie. Hierzu wurden zunächst aus einer Zellsuspension unter Standardbedingungen expandierter Stamm- und Tumorzellen unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (s. 3.3.7) die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden je 100.000 mesenchymale Stammzellen auf zuvor mit Stammzellkulturmedium befüllte 50 cm²-Zellkulturflaschen verteilt; diese wurden über Nacht inkubiert, so dass ein Anwachsen der normalerweise adhärent wachsenden Zellen möglich war. Anschließend wurde, um avitale Zellen zu entfernen, das Medium abgesaugt sowie einmalig mit PBS (Gibco®) gespült. Schließlich wurden 500.000 Tumorzellen der jeweiligen Tumorzelllinie in 15 ml Stammzellkulturmedium suspendiert und vorsichtig zu den Stammzellen gegeben. Diese Zellen wurden dann wiederum unter Standardbedingungen für 48 h koinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, dreimalig vorsichtig mit PBS gespült um nicht adhärente Zellen zu entfernen, mit Stammzellkulturmedium aufgefüllt und anschließend in einem inversen Photomikroskop die Zellmorphologie beurteilt. Gleichzeitig wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der adhären Zellen gewonnen.

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkulturbedingungen

Um Zelladhäsionen von Stamm- und Tumorzellen morphologisch genauer zu charakterisieren, wurden koinkubierte Zellen rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Hierzu wurde zunächst bei humanen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellkulturen die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt (s. 3.3.7; zu den Kulturbedingungen s. 3.3.1 und 3.3.3). Dann wurden 20.000 humane mesenchymale Stammzellen in 2 ml Stammzellkulturmedium gegeben, welches wiederum in eine 35 mm Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben wurde, auf deren Boden sich ein zuvor autoklaviertes Borosilikatdeckglas (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) befand. Nach einer Inkubation unter Standardbedingungen über Nacht wurde das Medium abgesaugt, einmalig mit PBS gespült und dann 2 ml neues Stammzellkulturmedium hinzugefügt, in dem 100.000 Tumorzellen der Zelllinie H82 resuspendiert worden waren. Diese Zellen wurden für 48 h koinkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium mit den in Suspension befindlichen Zellen abgesaugt und dreimalig vorsichtig mit PBS gespült. Dann wurde das Präparat für die Dauer von 24 h in 3 % Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), gelöst in PBS, fixiert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurde das Präparat dreimalig für jeweils 5 min in 0,1 M Saccharose-Phosphat-Puffer gewaschen und über eine aufsteigende Ethanolreihe vollständig entwässert, bis zuletzt eine Inkubation für zweimalig 1 h in absolutem Ethanol erfolgte. Anschließend wurde das Präparat nach der critical-point-Methode in CO₂ getrocknet und mit Hilfe von Leitsilber auf einen Probenhalter montiert. Dann wurden die Präparate in einer Hochvakuumkleinbeschichtungsanlage mit einer Goldschicht von 15 nm überzogen. Anschließend wurden die Präparate in einem Rasterelektronenmikroskop des Typs DSM 940 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Gleichzeitig wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der adhärennten Zellen gewonnen.

3.5. Zytochemie

3.5.1 Quantum Dot Markierung mesenchymaler Stammzellen in Zellsuspension

Unter Standardbedingungen expandierte mesenchymale Stammzellen wurden wie oben näher bezeichnet in Suspension gebracht und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die für den jeweiligen Versuch benötigte Anzahl an Stammzellen wurde in einem 30 ml-Kunststoffröhrchen 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann in 1 ml Stammzellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.

Die Quantum Dots (QTracker® 655 Cell Labeling Kit; Molecular Probes™, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit dem Trägerprotein konjugiert, in Stammzellkulturmedium gelöst und für 30 s zentrifugiert; die konjugierten Quantum Dots wurden dann zu den bereits in Suspension befindlichen Stammzellen gegeben und vorsichtig unter Verwendung einer Mikroliterpipette durchmischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Stammzellen für 60 min in der Quantum Dot Lösung von dann 5 nM, nach deren Abschluss die Stammzellen wie oben bezeichnet zentrifugiert und dann in 15 ml Stammzellkulturmedium resuspendiert wurden. Dieser Reinigungsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurden die markierten Zellen durch ein Zellsieb (BD Falcon™; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) in ein Rundbodenröhrchen gegeben. Die so aufgereinigten, markierten Zellen wurden dann den entsprechenden Experimenten zugeführt.

3.5.2 Markierung von Tumorzellen mittels 5-Chloromethylfluoresceindiacetat

Hierzu wurde bei unter Standardbedingungen expandierten Tumorzellen zunächst die Zellkonzentration (Zellzahl/ml) unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (s. 3.3.7) bestimmt, die benötigte Zellzahl entnommen und anschließend die Zellsuspension in 30-ml Kunststoffröhrchen bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert sowie der Überstand verworfen.

Das 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (Cell Tracker™ Green CMFDA; Molecular Probes™, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) wurde in DMSO auf 10 mM verdünnt. In serum- und zusatzfreiem RPMI 1640 (Gibco®) wurde dann eine entsprechende Menge der Lösung bis zu einer Konzentration von 5 µM weiter verdünnt. Hierin wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und dann für 45 min unter Standardbedingungen inkubiert, um die Aufnahme des frei membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffes zu ermöglichen. Anschließend wurde die Zellsuspension wie oben näher bezeichnet zentrifugiert und zweimalig in serumfreien RPMI 1640 gewaschen. Danach wurde in 15 ml Kulturmedium resuspendiert, für weitere 30 min inkubiert, um die Glutathion-S-Transferase vermittelte Impermeabilisierung zu ermöglichen, und dann insgesamt dreimalig mit Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die markierten Zellen durch ein Zellsieb (BD Falcon™; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) in ein Rundbodenröhrchen gegeben.

Die so aufgereinigten, markierten Zellen wurden dann den entsprechenden Experimenten zugeführt.

3.5.3 Markierung von Tumorzellen mittels der FITC-konjugierten Cholera Toxin Untereinheit B

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden Tumorzellen auch mit einer FITC-konjugierten Cholera Toxin Untereinheit markiert. Hierzu wurde ebenfalls bei unter Standardbedingungen expandierten Tumorzellen zunächst die Zellkonzentration (Zellzahl / ml) unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (s. 3.3.7) bestimmt, die benötigte Zellzahl entnommen und anschließend die Zellsuspension in 30-ml-Kunststoffröhrchen bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert sowie der Überstand verworfen. Die FITC-konjugierte Cholera Toxin Subunit B (Cholera Toxin Subunit B from *Vibrio cholerae*; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) wurde gemäß den Angaben des Herstellers in destilliertem Wasser gelöst. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml serumfreien Medium, in dem die FITC-konjugierte Cholera Toxin Untereinheit B in einer Konzentration von 8 µg/ml gelöst war, für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wie oben näher bezeichnet zentrifugiert und zweimalig in serumfreien RPMI 1640 gewaschen. Die so aufgereinigten, markierten Zellen wurden dann den entsprechenden Experimenten zugeführt.

Tabelle 1: Darstellung der Emissionsmaxima und Absorptionscharakteristika der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in Methanol. Cell Tracker™ Green CMFDA ist bis zu seiner Umsetzung durch zytoplasmatische Esterasen nicht fluoreszierend. Die angegebenen Werte beziehen sich deshalb auf die umgesetzte Substanz.

Fluoreszenzmarker	Hersteller	Anregung	Emissionsmaximum
QTracker® 655	Molecular Probes™	405 – 615 nm	655 nm
Cell Tracker™ Green CMFDA	Molecular Probes™	492 nm (Absorptionsmaximum)	517 nm
FITC an Cholera Toxin Subunit B	Sigma-Aldrich®	495 nm (Absorptionsmaximum)	525 nm

3.6. Quantifizierung von Zelladhäsion und Zellfusion

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Zelladhäsion unter Standardzellkulturbedingungen

Um die Adhäsion von humanen kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen an humane mesenchymale Stammzellen semiquantitativ beurteilen zu können und damit über die Häufigkeit adhäsiver Prozesse das Fusionspotential abschätzen zu können, wurden zuvor fluoreszenzmarkierte und dann koinkubierte Stamm- und Tumorzellen mikroskopisch untersucht.

Hierzu wurden jeweils 20.000 mittels Quantum Dots markierte und in 2 ml Stammzellkulturmedium suspendierte Stammzellen (s. 3.3.3) in die Kammern eines Zweikammerobjektträgers (Lab-Tek® Chamber-Slide™; Nalge Nunc, Rochester, USA) gegeben und über Nacht inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gespült; anschließend wurden 100.000 zuvor mittels Celltracker™ Green CMFDA (s. 3.2) markierte Tumorzellen in 2 ml Stammzellkulturmedium suspendiert und ebenfalls in die Kammer gegeben. Die Zellen wurden für 48 h unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Dann wurde das Medium mit den in Suspension befindlichen Tumorzellen abgesaugt und dreimalig vorsichtig mit PBS gespült. Nach Entfernung der Kammer wurden die Präparate mit DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) mit einem Deckglas versehen.

Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot 2, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) betrachtet, und es wurde die Zahl der isoliert liegenden Stammzellen im Verhältnis zu den Stammzellen mit an diesen adhärenen Tumorzellen bestimmt. Dazu wurden insgesamt 100 Stammzellen ausgezählt. Dieser Versuch wurde für alle Tumorzelllinien durchgeführt und zweimal wiederholt. Gleichzeitig wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der adhärenen Zellen ausgewertet.

3.6.2 Durchflusszytometrie

3.6.2.1 Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Zunächst wurden für die Stammzelllinie und die benötigte Tumorzelllinie jeweils eine Zellkulturflasche angelegt und diese so lange mit dem entsprechenden Medium inkubiert, bis im Fall der Stammzellen ungefähr 80 % des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt beziehungsweise im Fall der Tumorzelllinie ungefähr 10 Millionen Zellen in der Flasche gewachsen waren.

Dann wurden die Stammzellen wie zuvor beschrieben mit Quantum Dots markiert und mittels einer Neubauer-Zählkammer 100.000 Zellen ausgezählt; diese wurden in 15 ml Stammzellkulturmedium suspendiert in eine 50 cm²-Zellkulturflasche (Sarstedt, Newton, USA) gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das bedeckende Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit 15 ml PBS serumfrei gespült. Dann wurden 1 Million zuvor mittels CellTracker™ Green CMFDA markierte Tumorzellen in 15 ml Stammzellkulturmedium suspendiert und zu den Stammzellen hinzugegeben. Es folgte eine Koinkubation unter Standardzellkulturbedingungen für 48 h. Im Anschluss hieran wurde der Überstand in ein 30-ml-Kunststoffröhrchen abpipettiert und lichtgeschützt abgestellt. Zu den adhärenen Zellen wurde dann 10 ml Trypsin-EDTA gegeben und die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 5 min wurden 10 ml Stammzellkulturmedium hinzugefügt um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren und damit auch eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Diese Zellsuspension wurde zum bereits abpipettierten Überstand in das entsprechende Kunststoffröhrchen gegeben, um alle adhärenen und in Suspension befindliche Zellen eines Ansatzes zu vereinen; diese wurden wie zuvor beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 1 ml FACS-Puffer (DPBS; Gibco®; Invitrogen, Carlsbad, USA + 10 % FCS; Gibco®) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein Zellsieb in ein Rundbodenröhrchen gegeben. Transport und Analyse erfolgten soweit möglich lichtgeschützt.

Analyse und Auswertung erfolgten unter Verwendung eines Durchflusszytometers (FACSAria™; BD Biosciences, San Jose, USA) sowie der korrespondierenden Software (BD FACSDiva™, BD Biosciences, San Jose, USA), wobei jeweils circa 100.000 Ereignisse einbezogen wurden.

Dieser Versuch wurde für alle Tumorzelllinien in einem dreifachen Ansatz durchgeführt und insgesamt dreimal unabhängig wiederholt.

3.6.2.2 Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29

Um zu untersuchen, ob das Phänomen einer Stammzell-Tumorzellfusion auf die verwendeten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien beschränkt ist, wurde die durchflusszytometrische Quantifizierung auch für eine andere Tumorzelllinie vorgenommen, nämlich die Kolonkarzinomzelllinie HT29. Hierzu wurden die Tumor- und humanen mesenchymalen Stammzellen wie zuvor beschrieben expandiert, markiert und einer durchflusszytometrischen Analyse zugeführt, wobei je Messung 100.000 Ereignisse einbezogen wurden (s. 3.6.2.1).

Dieser Versuch wurde ebenfalls in einem dreifachen Ansatz durchgeführt und insgesamt dreimalig unabhängig wiederholt.

3.7 Pharmakologische Beeinflussung der Ereignishäufigkeit in der Durchflusszytometrie

Um die Beeinflussbarkeit der Detektionshäufigkeit doppelt markierter Zellen zu untersuchen, wurde exemplarisch anhand der Tumorzelllinie H82 die Wirkung verschiedener Substanzen quantifiziert, welche direkt oder indirekt fusions- oder adhäsionsrelevante Zelloberflächenstrukturen verändern.

3.7.1 Inhibition von CXCR4 mittels monoklonalen Antikörpern

Um die Wirkung einer Inhibition und damit funktionellen Inaktivierung des CXCR4 zu untersuchen, wurde ein muriner Antikörper gegen humanes CXCR4 (monoclonal anti-human CXCR4 antibody, MAB172; R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet; hierbei handelt

es sich um einen funktionell blockierenden Antikörper. Stammzellen wurden wie zuvor beschrieben mittels Quantum Dots markiert und über Nacht in einer 50 cm²-Zellkulturflasche inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml Stammzellkulturmedium ersetzt, in welchem der Antikörper gegen CXCR4 nach Rekonstitution mit DPBS zuvor in einer Konzentration von 10 µg/ml gelöst worden war.

Die mittels CellTracker™ Green CMFDA markierten Tumorzellen wurden ebenfalls in antikörperhaltigem Kulturmedium suspendiert; nach 1 h getrennter Inkubation wurden beide Zelllinien zusammengegeben und für weitere 48 h unter Standardbedingungen koinkubiert. Als Kontrolle diente ein paralleler Ansatz mit antikörperfreiem Kulturmedium. Weitere Vorbereitung, Analyse und Auswertung erfolgten wie zuvor beschrieben (s. 3.6.2.1), wobei in einem zweifachen Ansatz jeweils 100.000 Ereignisse in die Analyse einbezogen wurden. Dieser Versuch wurde insgesamt zweimalig unabhängig voneinander durchgeführt.

3.7.2 Inhibition von CXCR4 mittels AMD3100 Octahydrochlorid

Mit AMD3100 Octahydrochlorid steht ein etablierter und gut untersuchter, potenter CXCR4 Antagonist zur Verfügung (De Clercq et al., 1992), dessen Wirkung auf die Detektionshäufigkeit untersucht wurde.

Hierzu wurden Stammzellen wie zuvor beschrieben mittels Quantum Dots markiert und über Nacht in einer 50 cm²-Zellkulturflasche inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml Stammzellkulturmedium ersetzt, in welchem zuvor AMD3100 Octahydrochlorid (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) in einer Konzentration von 10 µg/ml gelöst worden war. Markierte Tumorzellen wurden bei gleicher Konzentration ebenfalls in diesem Kulturmedium suspendiert. Es folgte eine getrennte Inkubation für 1 h, nach deren Ablauf die Zellen zusammengegeben und für weitere 48 h unter Standardbedingungen koinkubiert wurden. Als Kontrolle diente ein paralleler Ansatz mit inhibitorfreiem Kulturmedium. Weitere Vorbereitung, Analyse und Auswertung erfolgten wie zuvor beschrieben; es wurden für die inhibitorexponierten und nicht exponierten Zellen in einem jeweils zweifachen Ansatz pro Ansatz drei Einzelmessungen vorgenommen, in die jeweils 50.000 Ereignisse einbezogen wurden. Dieser Versuch wurde mit der Tumorzelllinie H82 insgesamt viermal unabhängig durchgeführt.

3.7.3 Beeinflussung durch den β -HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin

3.7.3.1 Quantifizierung von auftretenden Zellfusionen

Um den Effekt eines durch den β -HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin veränderten Mevalonatstoffwechsels zu quantifizieren, wurden Tumor- und mesenchymale Stammzellen in einem statinhaltigen Kulturmedium expandiert. Hierzu wurde zunächst in DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöstes, aus Tabletten isoliertes Atorvastatin (Pfizer Inc., New York, USA) in Kultur- beziehungsweise Stammzellkulturmedium auf 10 μ M verdünnt.

In diesen Medien wurden im Anschluß an eine reguläre Passagierung Stamm- und Tumorzellen für die Dauer von 8 d getrennt expandiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgezählt, markiert, aufgereinigt, über 48 h koinkubiert und dann entsprechend für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

Bei der ursprünglichen Passagierung wurden ebenfalls Zellen auf Zellkulturflaschen verteilt, welche dann im entsprechenden atorvastatinfreiem Medium expandiert und analog für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet wurden. Die so gewonnenen Proben dienten als Kontrollen.

Anschließend wurde in einem Durchflusszytometer die Anzahl der doppelt markierten Einzelzellen bestimmt, wobei jeweils 100.000 Zellen in eine Analyse einbezogen wurden.

Dieser Versuch wurde für die unter und ohne Atorvastatin expandierten Zelllinien jeweils in einem dreifachen Ansatz durchgeführt, wobei für jeden Ansatz zwei FACS-Analysen durchgeführt wurden. Es fanden insgesamt drei unabhängige, vollständige Wiederholungen des Versuches statt.

3.7.3.2 Aufnahme von Quantum Dots unter Atorvastatin

Da die zelluläre Aufnahme der konjugierten Quantum Dots über eine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt, wurde untersucht, ob aufgrund eines durch Atorvastatin veränderten Mevalonatstoffwechsels und damit einer Beeinflussung der Membranzusammensetzung sowohl der Zellmembran, aber auch endozytotischer Vesikel, eine Veränderung der Markeraufnahme zu beobachten ist, welche letztlich die gemessene Zahl an Ereignissen im FACS beeinflussen könnte.

Hierzu wurden humane mesenchymale Stammzellen bei ausreichender Zelldichte passagiert und auf Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Hälfte der Stammzellen wurde wie oben beschrieben unter Standardbedingungen in atorvastatinhaltigem Stammzellkulturmedium (10 μ M) für 8 d expandiert. Die andere Hälfte wurde parallel in zusatzfreiem Stammzellkulturmedium kultiviert. Diese Zellen dienten als Kontrolle.

Anschließend wurden die beiden Zellpopulationen wie zuvor beschrieben mit QTracker® 655 oder 585 markiert und jeweils 100.000 Zellen in einer 50 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium abgesaugt und einmalig mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mittels Trypsinierung abgelöst und wie oben beschrieben für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

Nach Gating der lebenden Zellen wurde im Falle einer annähernden Normalverteilung der gefärbten Zellpopulation der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität bestimmt. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der unter Atorvastatin expandierten Stammzellen wurde dann mit dem entsprechenden Wert der zusatzfrei expandierten Zellen korreliert. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

3.8 Laser Scanning Zytometrie

Um die erhaltenen quantitativen Ergebnisse zur Fusionshäufigkeit zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen mit einer unabhängigen zweiten Methode zu überprüfen, wurde eine Laser Scanning Zytometrie ausgewählter Präparate durchgeführt. Diese Methode bietet gegenüber der Durchflusszytometrie den Vorteil, dass gleichzeitig zur Zytometrie mikroskopisch überprüft werden konnte, ob es sich bei den registrierten, doppelt markierten Ereignissen tatsächlich um markierte Zellen oder Artefakte handelte.

Zunächst wurde für die Stammzelllinie und die jeweils benötigte Tumorzelllinie eine Zellkulturflasche angelegt und die Zelllinie wie oben beschrieben expandiert. Dann wurden die Stammzellen wie zuvor beschrieben mittels Quantum Dots markiert (s. 3.5.1) und mittels einer Neubauer-Zählkammer 100.000 Zellen ausgezählt; diese wurden in 15 ml Stammzellkulturmedium suspendiert in eine 50 cm²-Zellkulturflasche (Sarstedt, Newton, USA) überführt. Nach Inkubation über Nacht wurde das bedeckende Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmalig mit 15 ml PBS serumfrei gespült. Dann wurden 1 Million zuvor mittels CellTracker™ Green CMFDA markierte Tumorzellen in 15 ml Stammzellkulturmedium suspendiert und zu den Stammzellen hinzugegeben. Es folgte eine

Koinkubation unter Standardzellkulturbedingungen für 48 h. Im Anschluss hieran wurde der Überstand in ein 30 ml-Kunststoffröhrchen abpipettiert und lichtgeschützt abgestellt. Zu den adhären Zellen wurde dann 10 ml Trypsin-EDTA gegeben und die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 5 min wurden 10 ml Stammzellkulturmedium hinzugefügt um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren und damit auch eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Diese Zellsuspension wurde zum bereits abpipettierten Überstand in das entsprechende Kunststoffröhrchen gegeben, um alle adhären und in Suspension befindliche Zellen eines Ansatzes zu vereinen; diese wurden wie zuvor beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 4 % Paraformaldehyd resuspendiert und für 5 min hierin belassen. Nach einer weiteren Zentrifugation und dem Absaugen des Überstandes wurde in 1 ml FACS-Puffer (DPBS; Gibco®; Invitrogen, Carlsbad, USA + 10 % FCS; Gibco®) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein Zellsieb in ein Rundbodenröhrchen gegeben und so mit PBS verdünnt, dass sich in 100 µl 20.000 Zellen befanden. Alle Arbeitsschritte erfolgten soweit möglich lichtgeschützt.

Für die Herstellung von Cytospins wurden silanierte Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) verwendet. Mittels Cytospineinsatz wurden die Zellen in einer entsprechenden Zentrifuge (Universal 32 R; Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 4 min bei 1500 rpm zentrifugiert, nachdem die Halterungen, Trichter und Objektträger nach Anleitung zusammengebaut und in den Rotor eingehängt worden waren. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Objektträger mit den fixierten Zellen wurden schließlich luftgetrocknet und bis zur Analyse bei 4°C gekühlt gelagert.

Die Analyse der Fusionshäufigkeit erfolgte durch Bestimmung der Anzahl doppelt markierter Zellen unter Verwendung eines Laser Scanning Zytometers (LSC™) sowie der korrespondierenden Software zur Auswertung der gewonnenen Daten WinCyte® (beide CompuCyte Corp., Cambridge, Massachusetts, USA).

Als Kontrollen dienten hierbei mit QTracker® 655 markierte Stamm- sowie CellTracker™ Green markierte Tumorzellen der entsprechenden Linie.

Anhand der maximalen pixelbezogenen Fluoreszenzintensität (Colour Max Pixel) dieser Kontrollen wurden zunächst Gates zur Abgrenzung markierter und nicht markierter Zellen unter Berücksichtigung der Autofluoreszenz und der Fluoreszenz des jeweilig anderen Farbstoffes im anderen Kanal definiert. Anschließend wurden zunächst sicher im grünen Bereich emittierten Ereignisse quantifiziert, welche dann dahingehend überprüft wurden, ob sie auch im roten Bereich emittierten. Die so gefundenen doppelt markierten Ereignisse

wurden mikroskopisch kontrolliert, um zu bestätigen, dass es sich tatsächlich um markierte Zellen handelte. Dieser Versuch wurde exemplarisch für die Zelllinie SW2 in einem dreifachen Ansatz durchgeführt. Das Experiment wurde insgesamt dreimal unabhängig wiederholt.

3.9. Lektinzytochemie

3.9.1 Nachweis einer veränderten Expression von Oberflächenglykokonjugaten unter Inkubation mit Atorvastatin in H82

Um die durch die Beeinflussung durch den β -HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Atorvastatin veränderte Expression von Glykoproteinen und Glykolipiden im Bereich der Zellmembran der eingesetzten Tumorzelllinie näher zu charakterisieren, wurden verschiedene biotinylierte Lektine eingesetzt, nämlich Concanavalin A (Con A; Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), Wheat Germ Agglutinin (WGA; Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) und Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L; Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA). Eine Übersicht über Herkunftsspezies und Zuckerspezifität der eingesetzten Lektine findet sich in Tabelle 2.

Die Bindung der Lektine wurde über einen mit Streptavidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Hierzu wurde bei unter Standardbedingungen mit oder ohne Atorvastatinzusatz expandierten H82-Zellen zunächst die Zellkonzentration (Zellzahl / ml) unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (s. 3.3.7) bestimmt und anschließend die Zellsuspension in 30-ml-Kunststoffröhrchen bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert sowie der Überstand verworfen.

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten mit auf 4 °C gekühlten Medien und Reagenzien; alle Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls bei 4 °C.

Die so gewonnenen Zellpellets wurden in 10 ml serum- und zusatzfreiem RPMI 1640 (Gibco®) resuspendiert und dann ein weiteres Mal zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in PBS gelöstem einprozentigen PFA für die Dauer von 5 min fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde abermals in einer Menge RPMI 1640 resuspendiert, welche entsprechend der zuvor bestimmten Zellzahl zu einer Zellkonzentration von 1 Mio. Zellen pro ml führte. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurden in Kunststoffröhrchen eingestellt und in einer Kühlzentrifuge (Universal 32 R; Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen,

Deutschland) insgesamt dreimal bei 4000 U/min für 3 min zentrifugiert und anschließend jeweils wieder in serumfreien RPMI 1640 resuspendiert, um das PFA aus der Suspension zu entfernen. Das so entstandene Pellet wurde mit dem jeweiligen in 200 µl RPMI 1640 gelösten Lektin in einer Konzentration von 10 µg/ml für 30 min inkubiert. Das Kunststoffröhrchen wurde dann auf 1 ml RPMI 1640 aufgefüllt und das Pellet wiederum zweimal in serumfreien Medium gewaschen, um nicht gebundenes Lektin zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt. Um eine Fluoreszenzmarkierung des gebundenen Lektins zu erreichen, wurde das Pellet vorsichtig in 200 µl Streptavidin-Alexa Fluor® 488-Konjugat (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) resuspendiert, welches zuvor in einem Verhältnis von 1:500 in serumfreien RPMI 1640 verdünnt worden war, und für weitere 30 min unter Lichtabschirmung inkubiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und zweimalig in PBS gewaschen, um nicht gebundenes Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoffkonjugat zu entfernen. Das so entstandene Zellpellet wurde in 1 ml FACS-Puffer gelöst, in ein Rundbodenröhrchen mit integriertem Zellsieb gegeben und auf Eis einer FACS-Analyse zugeführt.

Analyse und Auswertung erfolgten unter Verwendung eines Durchflusszytometers (BD FACSAria™) sowie der korrespondierenden Software (FACSDiva™), wobei für jede Messung jeweils ca. 50.000 Ereignisse einbezogen wurden.

Als Maß der Fluoreszenz wurde im zeitlichen Verlauf der Versuchsreihen die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Unter Verwendung dieser sind zwar die Messwerte innerhalb der Versuche vergleichbar, stellen aber keine Absolutwerte dar.

Dieser Versuch wurde bei mit oder ohne Atorvastatinzusatz expandierten Tumorzellen für jedes Lektin in einem zweifachen Ansatz durchgeführt und in insgesamt vier unabhängigen Versuchen wiederholt. Als Negativkontrolle dienten mit oder ohne Atorvastatinzusatz expandierte Tumorzellen, an denen keine Lektinfärbung vorgenommen wurde.

Tabelle 2: Übersicht der im Rahmen der Charakterisierung der durch den β -HMG-CoA-Reduktaseinhibitor Atorvastatin veränderten Glykokonjugatexpression in H82 eingesetzten Lektine

Lektin	Herkunftsspezies	Hersteller	Konjugat	Zuckerspezifität
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	Sigma-Aldrich	Biotinkonjugat	α -D-Mannose α -D-Glucose
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	Vector Laboratories	Biotinkonjugat	N-Acetylglucosamin
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vector Laboratories	Biotinkonjugat	Kohlenhydrate vom komplexen Typ

3.10 Statistische Auswertungen

Für die entsprechenden statistischen Berechnungen sowie für die Erstellung der gezeigten Diagramme wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet, wobei hier p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet wurden.

Um eine Aussage über die angenommene Fusionshäufigkeit der eingesetzten Zelllinien treffen zu können, wurde die gemessene Anzahl doppelt markierter Zellen im FACS zunächst auf die Gesamtzahl der erfassten Zellen in der durchflusszytometrischen Messung bezogen. Im Rahmen der vergleichenden Betrachtung der Zelllinien kamen dann nach Prüfung der Normalverteilung eine univariate Varianzanalyse sowie anschließend ein Tukey's Multiple Comparison Test zum Vergleich der Zelllinien untereinander zur Anwendung. Die Bronchialkarzinomzelllinien wurden dann mittels eines Dunnett's Multiple Comparison Tests mit der Kolonkarzinomzelllinie verglichen.

Im Rahmen der Auswertung der Versuche zur Fusionsinhibition durch den murinen Antikörper, das Bicyklam AMD3100 sowie das Statin wurde zunächst mittels eines Kolmogorov-Smirnov-Testes die Normalverteilung der Messwerte geprüft. Anschließend fand ein ungepaarter zweiseitiger t-Test Anwendung, um eine statistisch signifikante Beeinflussung der Fusionshäufigkeit zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen durch die eingesetzten Substanzen zu prüfen. Entsprechend wurde in der

Auswertung der Versuche zur Lektinzytochemie verfahren. Bei der Auswertung der Versuche mittels Laser Scanning Cytometry wurde nach Prüfung der Normalverteilung der Messwerte ebenfalls ein ungepaarter zweiseitiger t-Test angewendet, um die Ergebnisse mit den Messwerten der Durchflusszytometrie zu vergleichen.

Die Ergebnisse zur Adhäsion wurden mittels eines nichtparametrischen Kruskal-Wallis Testes auf signifikante Unterschiede geprüft.

IV. Ergebnisse

4.1 Zellmorphologie und Adhäsionsverhalten koinkubierter mesenchymaler Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

4.1.1 Lichtmikroskopische Beurteilung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten, humanen mesenchymalen Stammzellen imponierten unter Standardzellkulturbedingungen innerhalb des betrachteten Passagezeitraumes als adhärent, teilweise überlappend wachsend, wobei sich vom morphologischen Standpunkt prinzipiell zwei unterschiedliche, mononukleäre Zellkonfigurationen mit prominenten Nukleoli abgrenzen ließen: zum einen flächige, breitbasig adhärente, eher polygonale Zellen mit peripher teils unscharfer Begrenzung, zum anderen eher spindelförmig elongierte Zellen.

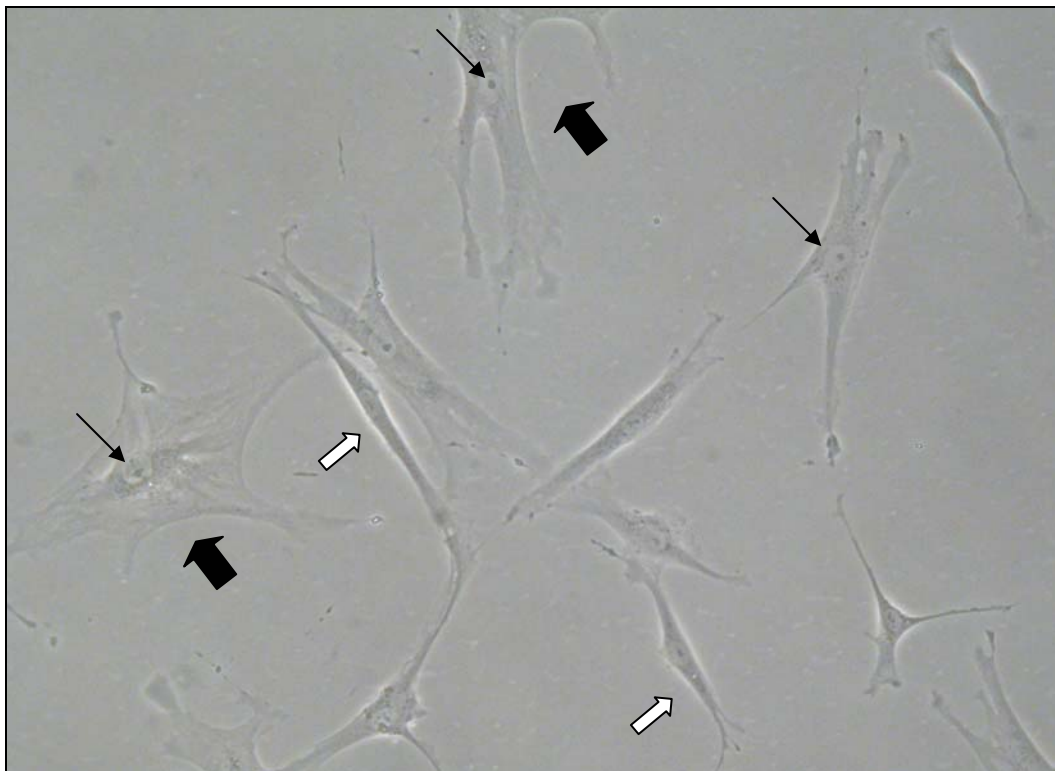


Abbildung 4: Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) unter Standardzellkulturbedingungen. Morphologisch lassen sich zwei unterschiedliche Zellkonfigurationen unterscheiden: (1) spindelförmige Zellen (weiße Blockpfeile) und (2) flächige, polygonale, breitbasig adhärente Zellen (schwarze Blockpfeile). Schwarze dünne Pfeile: Zellkerne.

Bei Koinkubation von mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes fanden sich im Falle der Zelllinie H82 nach 24 h Tumorzellaggregate an der Stammzelloberfläche mit fehlender Abgrenzbarkeit von Zellgrenzen zwischen der einzelnen Tumorzellen. Im Falle der Zelllinie SW2 fanden sich nach einem Tag Koinkubation neben kleineren Zellaggregaten einzeln liegende, spindelförmig elongierte Tumorzellen, adhärierend an der Stammzelloberfläche. Bei der Zelllinie OH1 bildeten sich vorzugsweise haufenförmige, größere Zellaggregate an den Stammzelloberflächen, während sich im Falle der Zelllinie OH3 eher lineare Anlagerungen von Tumorzellen beobachten ließen.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen koinkubierter Tumor- und mesenchymaler Stammzellen (Abb. 5 und 6).

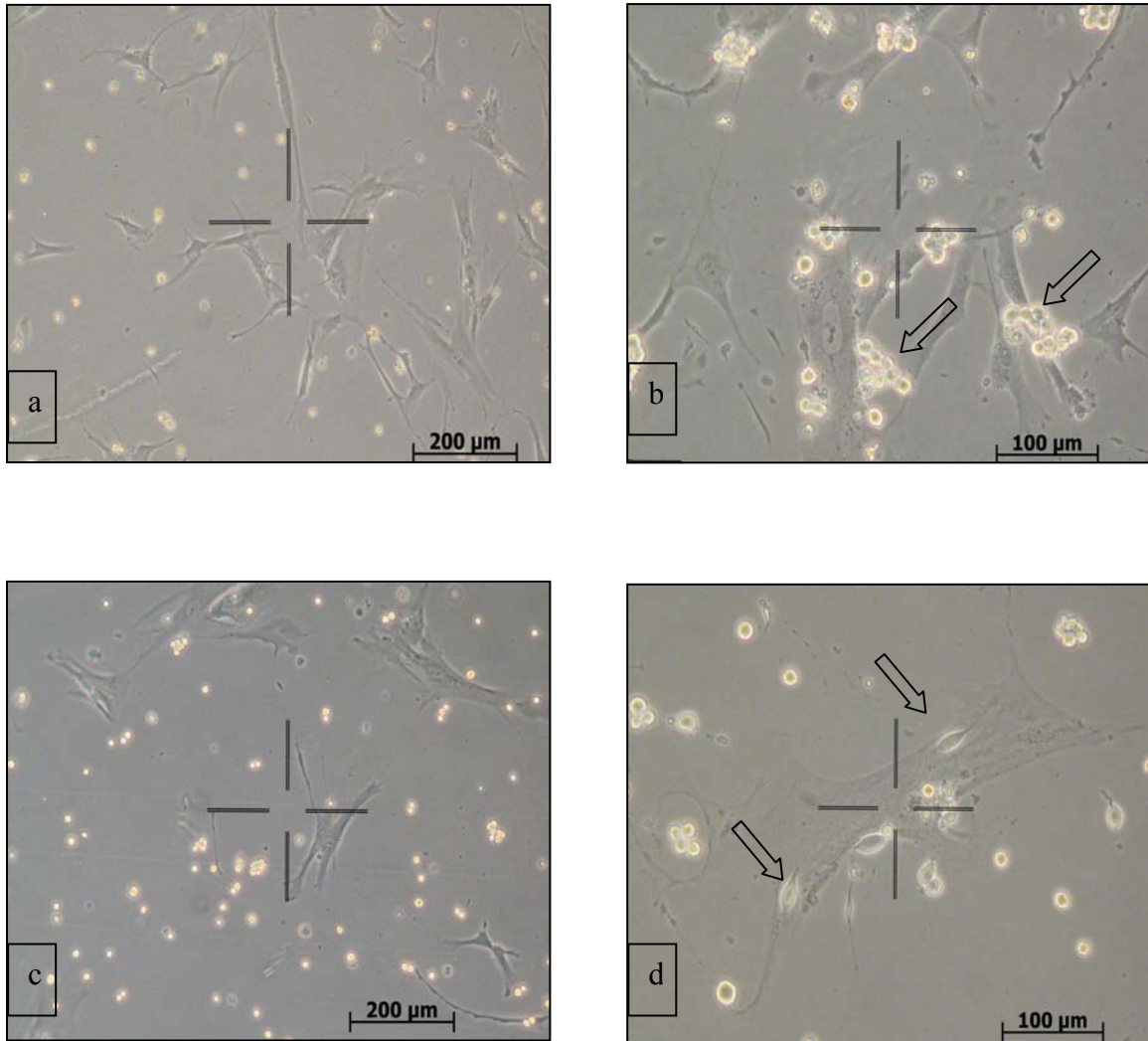


Abbildung 5: Humane mesenchymale Stammzellen und kleinzellige Tumorzellen in Koinkubation nach 0 und 24 h (a-d): (a) H82 in Suspension über adhärennten Stammzellen direkt nach Koinkubation, (b) Anlagerung und Formation von Tumorzellaggregaten nach 24 h (schwarze Blockpfeile), (c) SW2 in Suspension direkt nach Koinkubation mit adhärennten Stammzellen sowie (d) SW2 24 h nach Koinkubation mit nun spindelförmig elongierten, angelagerten Tumorzellen (schwarze Blockpfeile).

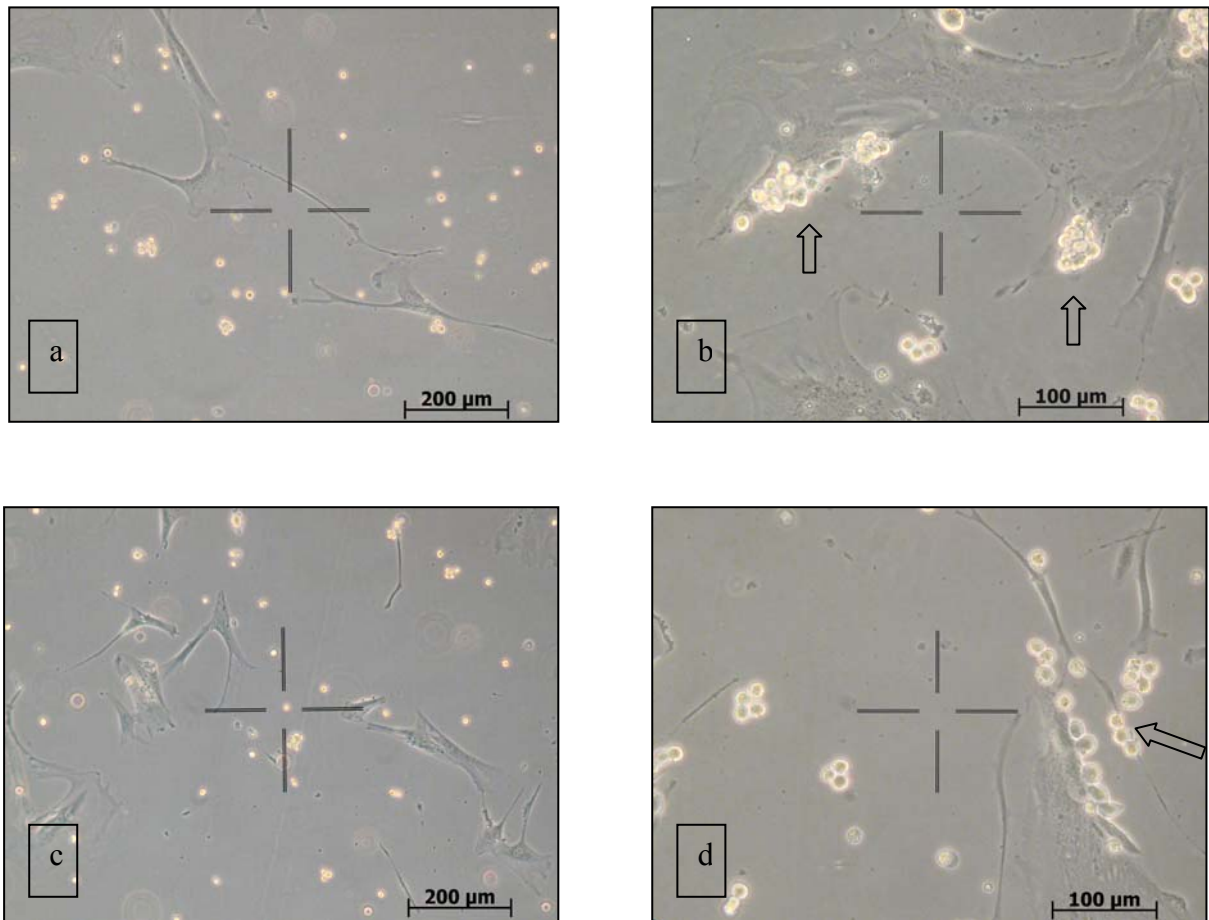


Abbildung 6: Humane mesenchymale Stammzellen und kleinzellige Tumorzellen in Koinkubation nach 0 und 24 h (a-d): (a) OH1 in Suspension über adhärennten Stammzellen direkt nach Koinkubation, (b) nach 24 h Aggregation von Tumorzellen vorzugsweise im Bereich von Stammzellen (schwarze Blockpfeile), (c) OH3 in Suspension direkt nach Koinkubation mit adhärennten Stammzellen sowie (d) 24 h nach Koinkubation mit nun peripher entlang der Stammzelle und ihren Zellfortsätzen angelagerten Tumorzellen (schwarze Blockpfeile).

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung unter Standardzellkulturbedingungen

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung von Einzelzellen nach Koinkubation von humanen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen der Zelllinie H82 fanden sich nach 48 h vereinzelte, bereits lichtmikroskopisch beobachtete, spindelförmig elongierte Tumorzellen sowie teils haufenförmige, teils eher linear angeordnete Zellaggregate. Es zeigte sich eine Adhärenz der Tumorzellen an die mesenchymalen Stammzellen. Zwischen den einzelnen Tumorzellen imponierte eine fehlende klare Definition der Zellgrenzen als Zeichen von Tumorzellfusionen. Die nachstehenden Abbildungen verdeutlichen die beobachteten Zellinteraktionen (Abb. 7).

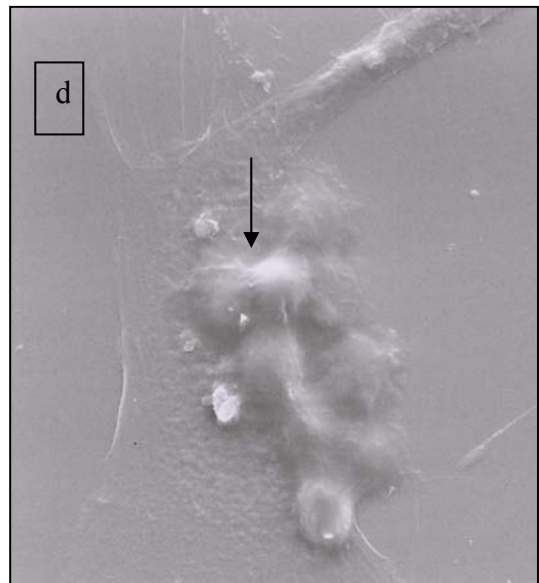
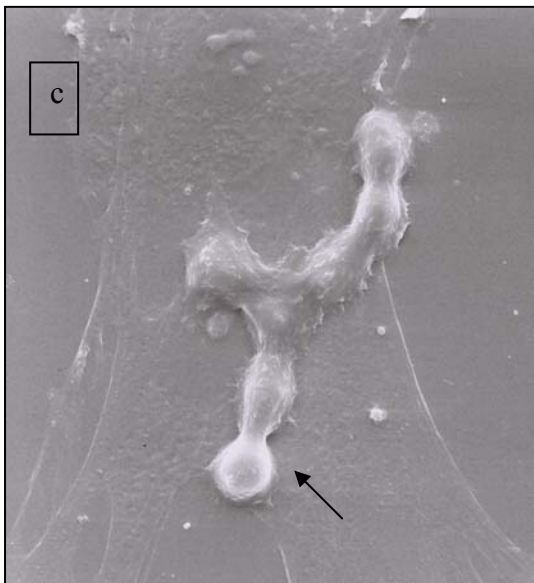
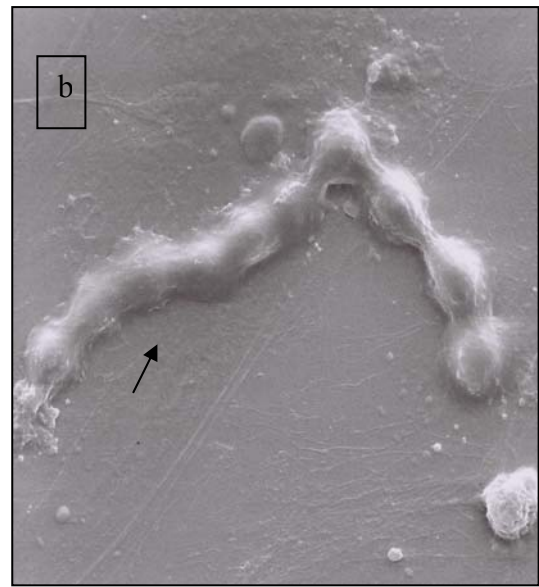
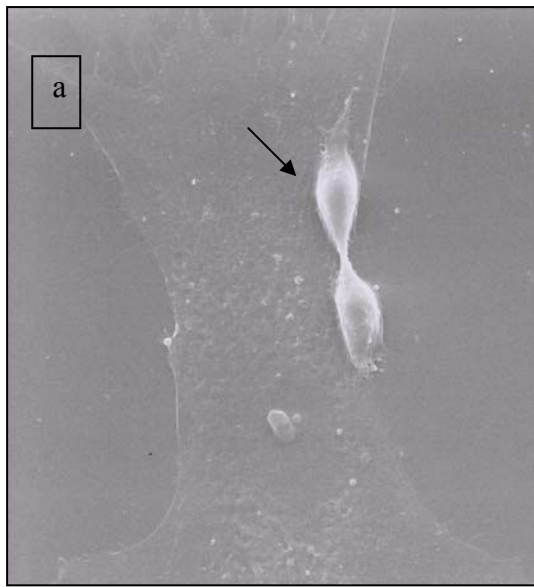


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Darstellung von an humanen mesenchymalen Stammzellen (hmsc) adhären den Tumorzellen der Zelllinie H82 (a-d): Spindelförmige Elongation von adhären ten Tumorzellen (a), kettenförmige Anordnung von fusionierenden Tumorzellen (b), Abflachung fusionierender Tumorzellen an der Zellmembran der Stammzelle und (c) fehlende Darstellung von Zellgrenzen bei fusionierenden H82 mit teils kugelig, teils stark abgeflacht imponierenden Tumorzellen (d). Schwarze Pfeile: Tumorzellen.

4.2 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Zelladhäsion unter Standardzellkulturbedingungen

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von koinkubierten mesenchymalen Stamm- und Tumorzellen konnte nach Ablauf von 48 h bei Zellen sämtlicher verwendeter Zelllinien eine Adhärenz an Stammzellen beobachtet werden. Diese war im Fall der Zelllinie H82 am frühesten ausgeprägt; hier fanden sich bereits nach wenigen Stunden größere Zahlen adhärerender Tumorzellen. Interessanterweise zeigten sich die deutlichsten Adhäsionsphänomene bei Zellen der Linie SW2; hier konnten nach 48 h große Tumorzellaggregate an der Stammzelloberfläche dargestellt werden. Eine zusammenfassende Darstellung der Adhäsionshäufigkeit findet sich in Abb. 8.

Bei der Beobachtung adhärerender Tumorzellen konnten äußerst selten Einzelzellen beobachtet werden, welche nach 48 h Koinkubation sowohl den Oberflächenfluoreszenzmarker als auch die zytosolisch lokalisierten Quantum Dots trugen; somit konnten fusionierte Einzelzellen direkt dargestellt werden (s. Abb. 10).

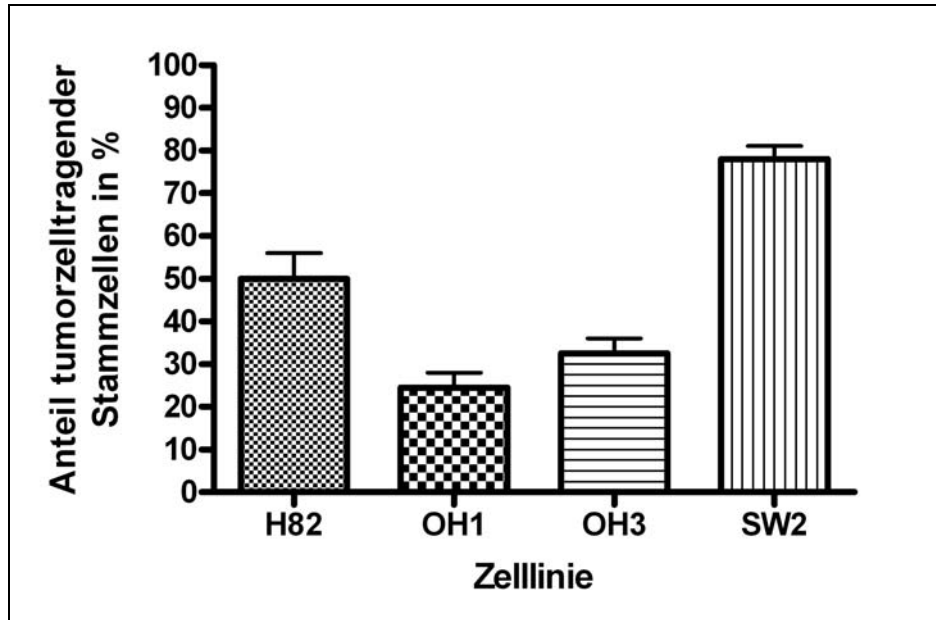


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Häufigkeit von an mesenchymalen Stammzellen adhärerenden Tumorzellen bei den eingesetzten Tumorzelllinien nach 48 h Koinkubation. Auffällig ist die ausgeprägte Adhärenz von Zellen der Linie SW2 an mesenchymale Stammzellen. Die dargestellten Unterschiede sind allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,083$).

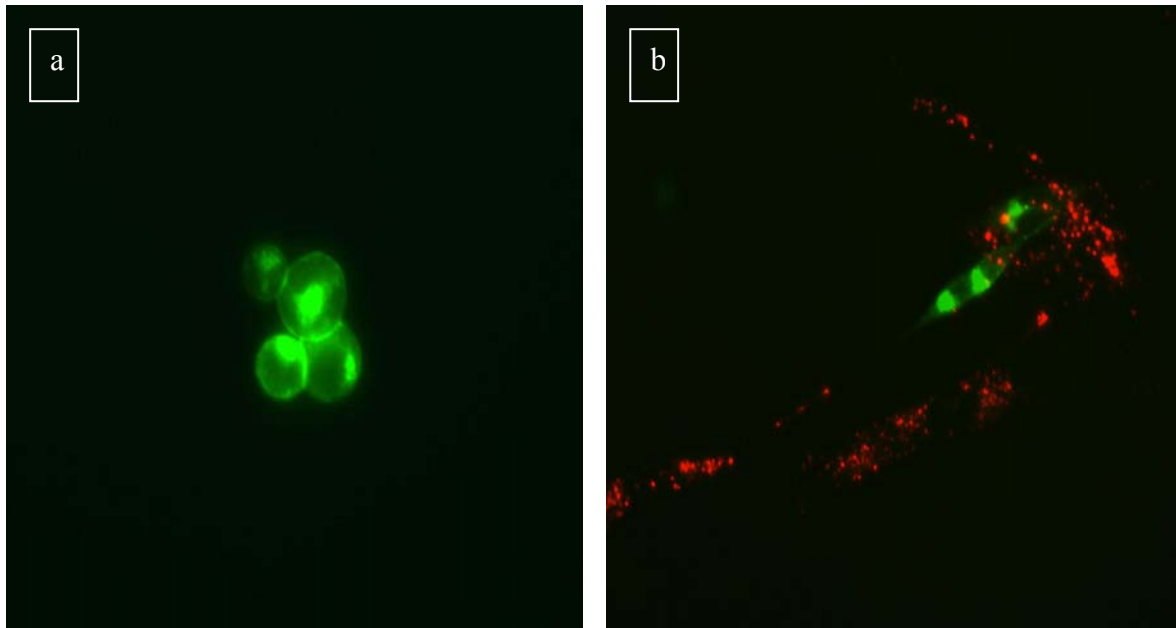


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und humanen mesenchymalen Stammzellen (hmsc). Mittels (a) grün fluoreszierender, FITC-konjugierter Choleratoxinuntereinheit B markiertes Tumorzellaggregat und (b) spindelförmig elongierte Tumorzellen an der Oberfläche mit rot fluoreszierenden Quantum Dots markierter Stammzellen.

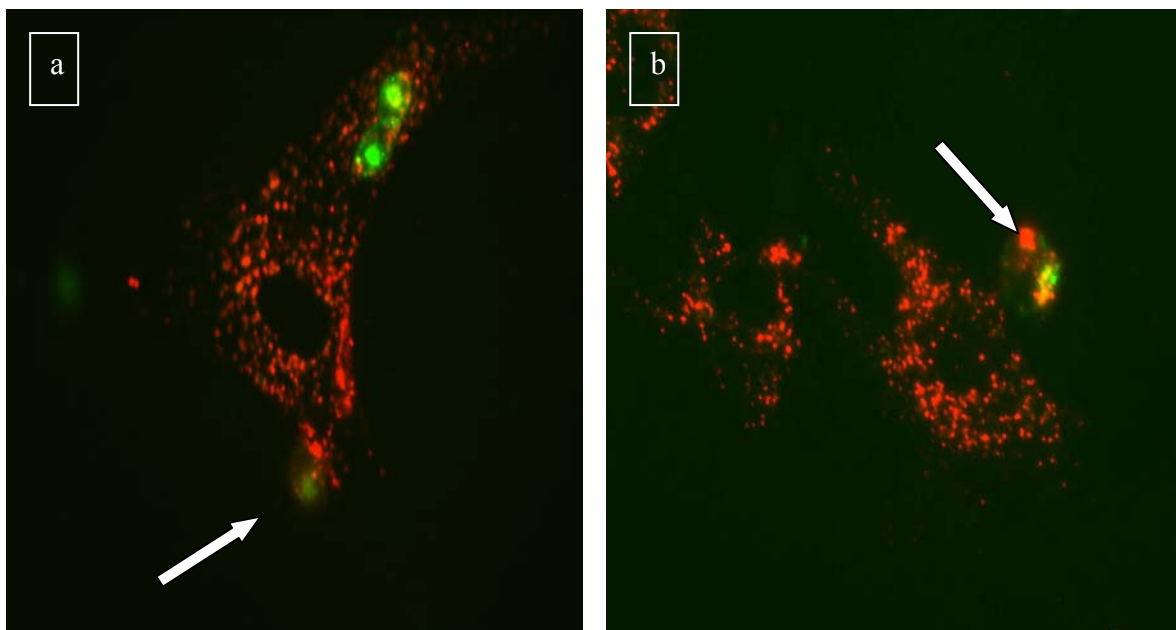


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von an humanen mesenchymalen Stammzellen (hmsc) adhätierenden Tumorzellen der Zelllinie H82. Die kleineren Bronchialkarzinomzellen sind mit der grün fluoreszierenden, FITC-konjugierten Choleratoxinuntereinheit B markiert, welche an GM_1 -Ganglioside bindet. Die flächigen mesenchymalen Stammzellen sind mit rot fluoreszierendem QTracker® 655 markiert. Man erkennt bei den Stammzellen kleinzellige Tumorzellen, welche Quantum Dot-haltiges Zytoplasma der Stammzellen aufgenommen haben (a,b). Weißer Pfeil: Doppelt markierte Tumorzelle.

4.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

4.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die nachstehenden Abbildungen zeigen die Häufigkeit doppelt markierter Zellen in den durchflusszytometrischen Analysen für die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen. In sämtlichen Einzelmessungen aller Zelllinien ließen sich doppelt markierte Zellen als Surrogat für stattgehabte Zellfusionen nachweisen. Das Auftreten von Zellfusionen stellt hierbei ein insgesamt seltenes Ereignis dar, wobei für alle verwendeten Zelllinien eine Fusionsfrequenz in ähnlicher Größenordnung beobachtet werden konnte. Hierbei ergab sich in der univariaten Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien ($p = 0,0101$). Für die Zelllinie OH3 fanden sich die höchsten Werte doppelt markierter Zellen mit einem Mittelwert von $2,14 \pm 0,64 \%$; die Fusionshäufigkeit war statistisch signifikant niedriger als für die Zelllinie SW2 ($p < 0,05$). Zu den Zelllinien H82 und OH1 ergab sich kein signifikanter Unterschied. Für die Zelllinie H82 betrug die Häufigkeit doppelt markierter Zellen $2,11 \pm 0,59 \%$. Auch hier war ein signifikanter Unterschied lediglich im Vergleich zur Zelllinie SW2 festzustellen ($p < 0,05$). Im Falle der Zelllinie OH1 fanden sich doppelt markierte Zellen in $1,68 \pm 1,01 \%$; die Fusionshäufigkeit war dabei im Vergleich zu keiner anderen beobachteten Zelllinie statistisch signifikant unterschiedlich. Die niedrigste Detektionsrate doppelt markierter Zellen fand sich bei der Zelllinie SW2 mit durchschnittlich $1,03 \pm 0,65 \%$ mit einem wie zuvor bereits erwähnt statistisch signifikantem Unterschied gegenüber den anderen Zelllinien mit Ausnahme von OH1.

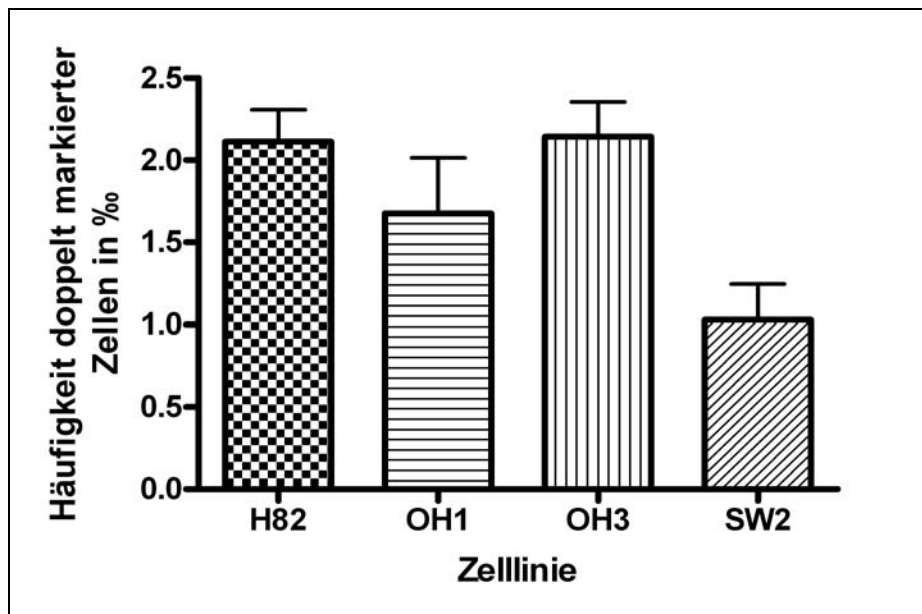


Abbildung 11: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Häufigkeit doppelt markierter Zellen in den durchflusszytometrischen Analysen für die einzelnen Zelllinien in %. SW2 zeigte eine statistisch signifikant niedrigere Fusionshäufigkeit als OH3 und H82 ($p < 0,05$).

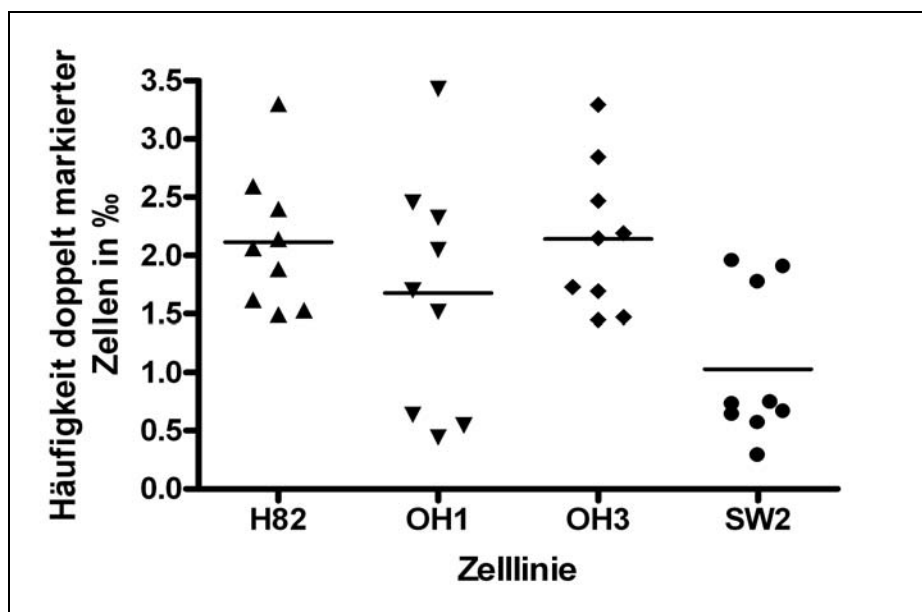


Abbildung 12: Scatter plot der Häufigkeit doppelt markierter Zellen in der Durchflusszytometrie für die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien. Im Vergleich zu Zellen der Linien OH3 und H82 zeigten Zellen der Linie SW2 eine statistisch signifikant niedrigere Fusionsfrequenz ($p < 0,05$).

4.3.2 Ergebnisse der Quantifizierung der auftretenden Zellfusionen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und der Kolonkarzinomzelllinie HT29

Bei der Kolonkarzinomzelllinie HT29 fand sich die höchste Häufigkeit doppelt markierter Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse. Vermutete Zellfusionen wurden mit einer Rate von $4,71 \pm 1,86$ % detektiert. Im Vergleich zu den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien ergab sich damit ein statistisch signifikanter Unterschied zu allen untersuchten Linien ($p < 0,01$). Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Häufigkeit aufgefundener doppelt markierter Zellen bei HT29 im Vergleich zu den Bronchialkarzinomzelllinien.

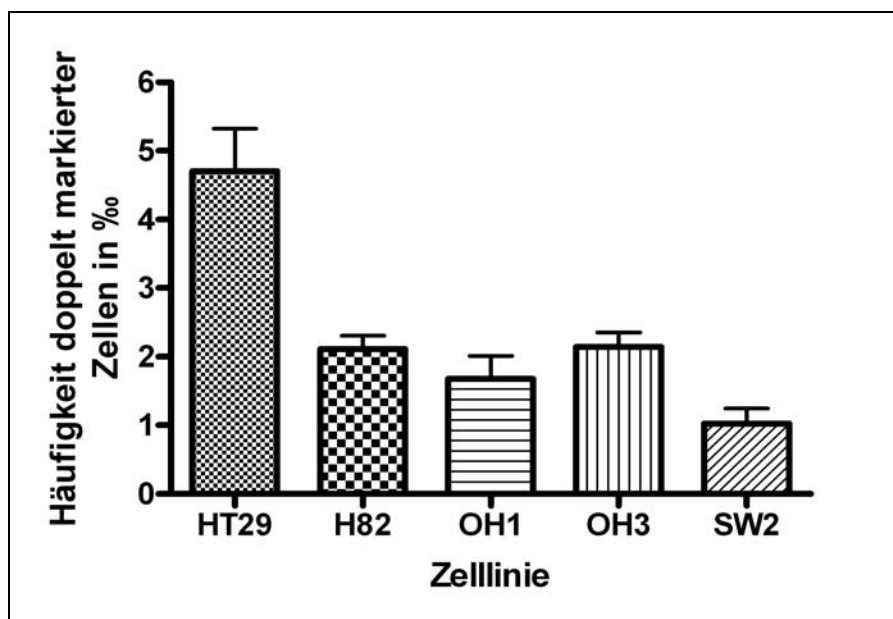


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Häufigkeit doppelt markierter Zellen in den durchflusszytometrischen Analysen für die einzelnen Zelllinien in %. Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 zeigte eine statistisch signifikant höhere Fusionshäufigkeit als alle Bronchialkarzinomzelllinien ($p < 0,01$).

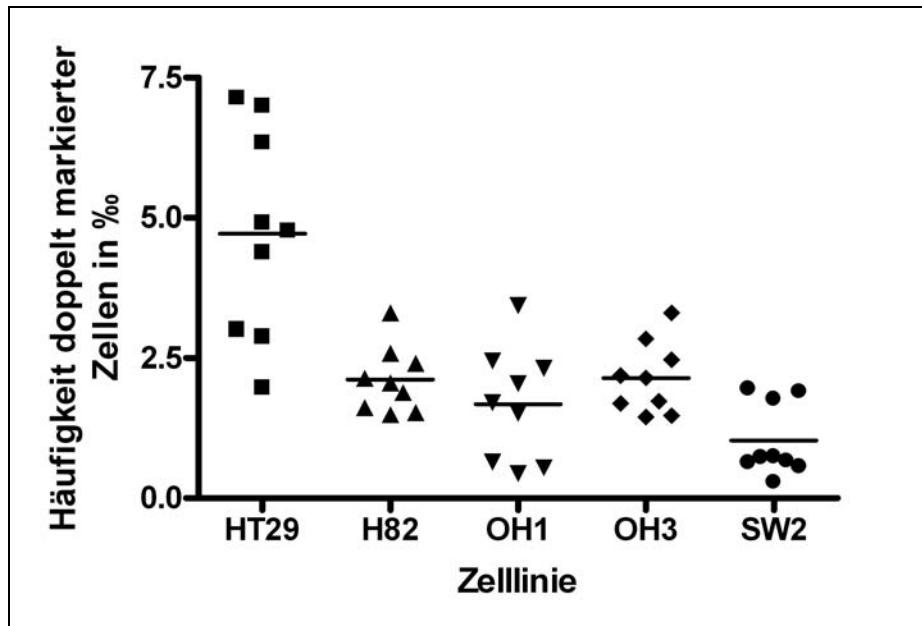


Abbildung 14: Scatter plot der Häufigkeit doppel markierter Zellen in der Durchflusszytometrie für Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT 29 und Zellen des kleinzelligen Bronchiakarzinoms. Die Fusionsfrequenz der Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 ist höher als die der verwendeten Zellen des Bronchiakarzinoms ($p < 0,01$).

4.3.3 Pharmakologische Beeinflussung der Zellfusion in der Durchflusszytometrie

4.3.3.1 Inhibition von CXCR4 mittels monoklonalen Antikörpern

Bei der Untersuchung der Wirkung einer CXCR4-Inhibition auf die Häufigkeit von Fusionsereignissen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und der Tumorzelllinie H82 durch Gabe eines inhibierenden, murinen Antikörpers gegen diesen Rezeptor konnte nach 48 h bei einer Konzentration des Antikörpers von 10 $\mu\text{g/ml}$ keine signifikante Beeinflussung der Ereignishäufigkeit festgestellt werden ($p > 0,05$).

4.3.3.2 Inhibition von CXCR4 mittels AMD3100-Octahydrochlorid

Die Wirkung einer Gabe des Bicyklams auf die Häufigkeit von Fusionsereignissen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und der Tumorzelllinie H82 ist in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt. Die Anzahl der als doppel markiert gemessenen Zellen in der zusatzfreien Kontrolle wurde auf den Wert 1 normiert und in Bezug zu den als doppel

markiert gemessenen Zellen bei einer Konzentration von 10 µg/ml AMD3100 Octahydrochlorid gesetzt. Bei dieser Konzentration konnte nach 48 h in allen Versuchen eine deutliche Zunahme der zweifach markierten Zellen beobachtet werden, und zwar erhöhte sich der Mittelwert detektierter doppelt markierter Zellen auf 100.000 untersuchte Zellen von $36,04 \pm 3,83$ auf $77,63 \pm 9,85$; dieser Anstieg war in Relation zur Kontrolle klar signifikant ($p = 0,0003$).

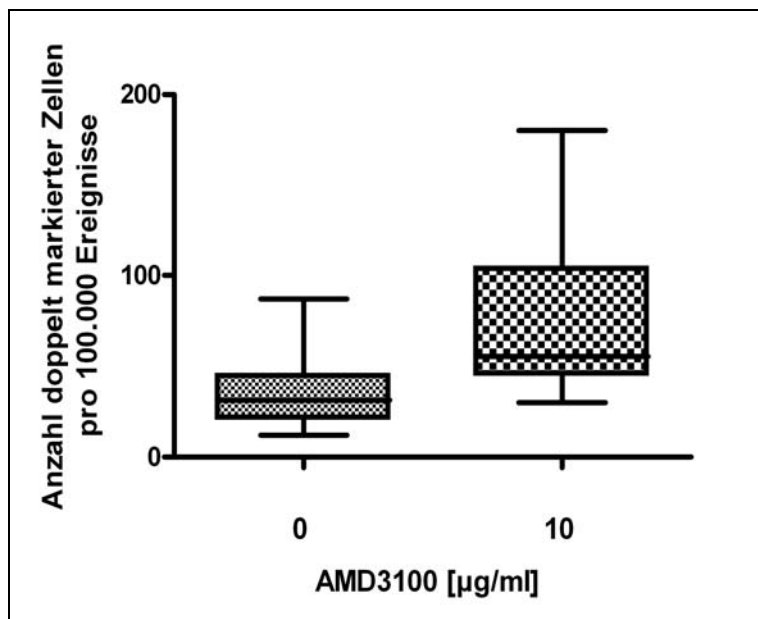


Abbildung 15: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung des CXCR4-Inhibitors AMD3100 auf die Fusionshäufigkeit zwischen Zellen der Tumorzelllinie H82 und Zellen der Stammzelllinie hmsc bei einer Konzentration von 0 und 10 µg/ml des Bicyklams; angegeben ist die absolute Zahl der Fusionen auf 100.000 gemessene Ereignisse in der Durchflusszytometrie ($p = 0,0003$).

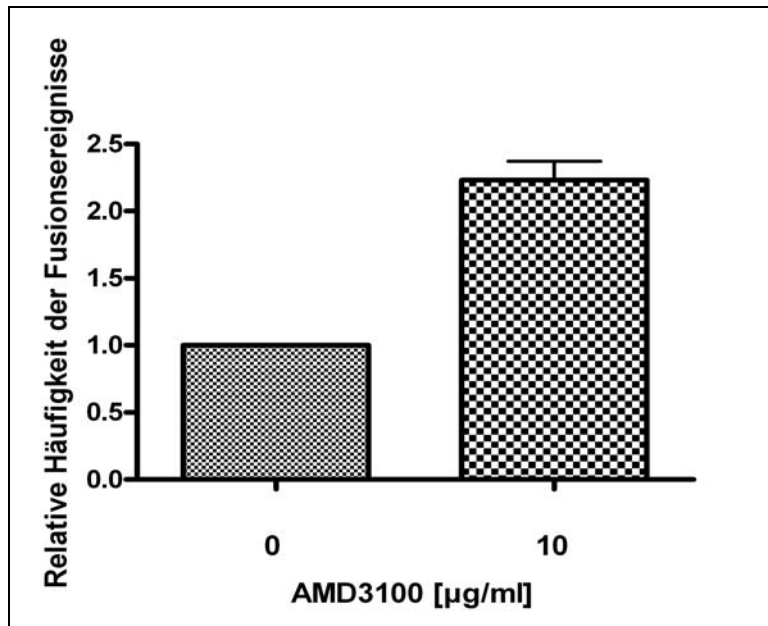


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung des CXCR4-Inhibitors AMD3100 auf die Fusionshäufigkeit zwischen Zellen der Tumorzelllinie H82 und Zellen der Stammzelllinie hmsc bei einer Konzentration von 0 und 10 µg/ml des Bicyklams. Die Kontrolle wurde auf den Wert 1 normiert. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Fusionsereignisse ($p = 0,0003$).

4.3.3.3 Beeinflussung durch den β -HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin

4.3.3.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung von auftretenden Zellfusionen

Die Wirkung einer Gabe des Statins auf die Häufigkeit von Fusionsereignissen zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen und der Tumorzelllinie H82 ist in den Abbildungen 17 und 18 zusammenfassend dargestellt. Die Anzahl der als doppelt markiert gemessenen Zellen in der zusatzfreien Kontrolle wurde auf den Wert 1 normiert und in Bezug zu den als doppelt markiert gemessenen Zellen bei einer Konzentration von 10 µM Atorvastatin gesetzt. Bei dieser Konzentration konnte nach 48 h in allen Versuchen eine deutliche Zunahme der zweifach markierten Zellen beobachtet werden, und zwar erhöhte sich der Mittelwert detektierter doppelt markierter Zellen von $74,78 \pm 7,53$ auf $126,2 \pm 10,37$. Damit ergab sich eine Erhöhung der Detektionsrate doppelt markierter Zellen auf 169 % der Kontrolle. Dieser Anstieg war in Relation zur Kontrolle klar signifikant ($p = 0,0003$).

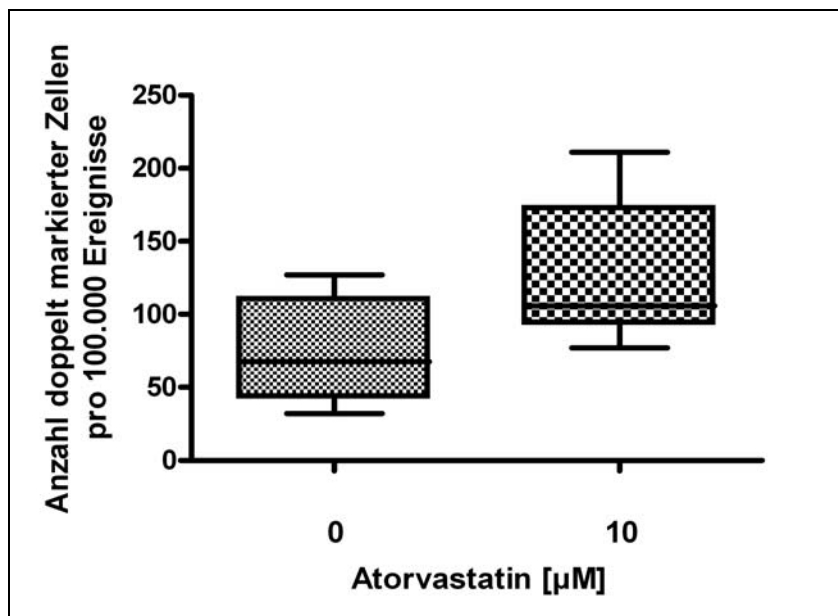


Abbildung 17: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung des β -HMG-CoA-Reduktaseinhibitors Atorvastatin auf die Fusionshäufigkeit zwischen Zellen der Tumorzelllinie H82 und Zellen der Stammzelllinie hmsc bei einer Konzentration von 0 und 10 μM des Statins; angegeben ist die absolute Zahl der Fusionen auf 100.000 gemessene Ereignisse in der Durchflusszytometrie ($p = 0,0003$).

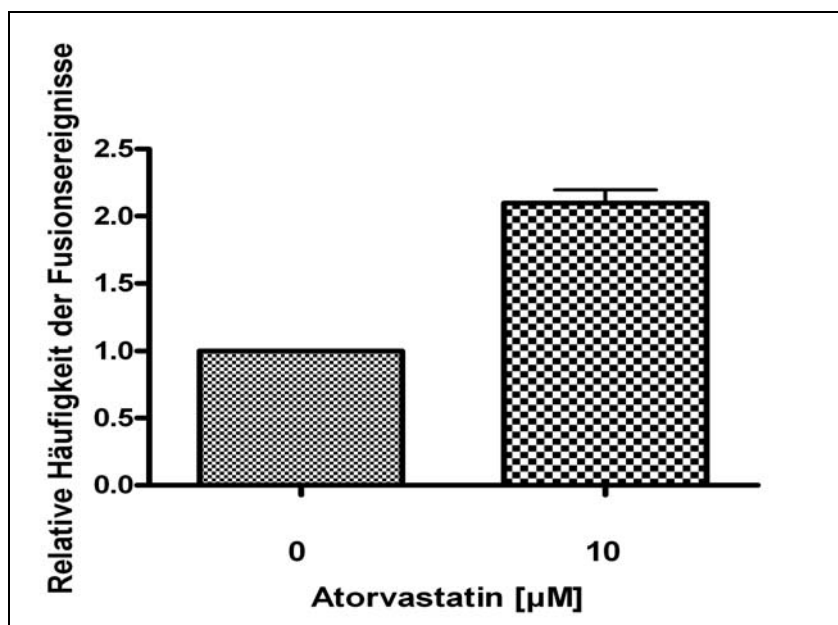


Abbildung 18: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung des β -HMG-CoA-Reduktaseinhibitors Atorvastatin auf die Fusionshäufigkeit zwischen Zellen der Tumorzelllinie H82 und Zellen der Stammzelllinie hmsc bei einer Konzentration von 0 und 10 μM des Statins. Die Kontrolle wurde auf den Wert 1 normiert. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Fusionsereignisse ($p = 0,0003$).

4.3.3.2 Aufnahme von Quantum Dots unter Atorvastatin

Bei der eingesetzten Konzentration des Statins konnte nach 48 h in den untersuchten Proben keine statistisch signifikante Beeinflussung der Aufnahme der Quantum Dots beobachtet werden; es fanden sich sowohl leichte Zunahmen als auch leichte Abnahmen der Fluoreszenzintensität als Korrelat der Markeraufnahme. Somit konnte eine relevante Beeinflussung der Endozytose-vermittelten Markeraufnahme ausgeschlossen werden.

4.4 Ergebnisse der Laser Scanning Zytometrie

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Fusionsfrequenz zwischen Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und mesenchymalen Stammzellen mittels Laser Scanning Cytometry (LSC), welche exemplarisch für die Zelllinie SW2 durchgeführt wurde, ist in Abbildung 20 dargestellt. Die mittels LSC gemessene Fusionsfrequenz war statistisch signifikant niedriger als die mittels Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) bestimmte Fusionshäufigkeit ($p = 0,0094$). Während die mittlere Fusionsfrequenz für die Zelllinie SW2 in der LSC mit $0,35 \pm 0,07 \text{ ‰}$ gemessen wurde, ergab sich in der FACS-Analyse eine mittlere Fusionshäufigkeit von $1,03 \pm 0,22 \text{ ‰}$.

Dieser Unterschied wurde im Wesentlichen durch eine hohe Fusionsfrequenz in einer der drei Versuchsdurchführungen verursacht; die gemessenen Fusionsereignisse unter Vernachlässigung dieser Versuchswiederholung stimmten weitestgehend überein (s. Abb. 21).

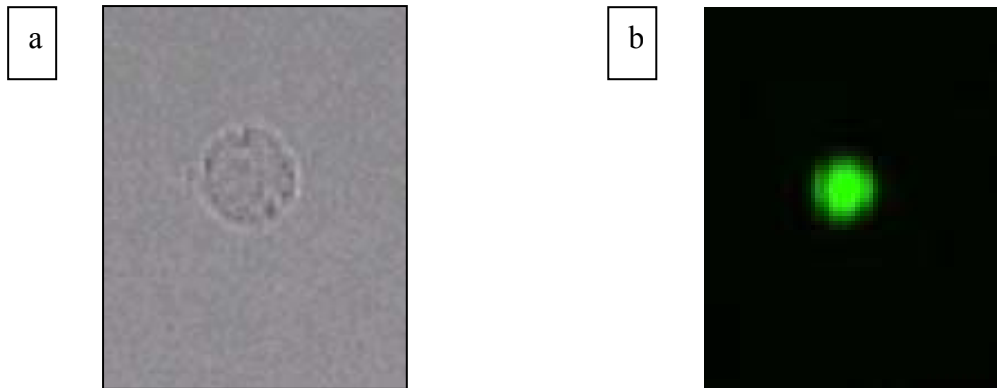


Abbildung 19: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme während der Laser Scanning Zytometrie einer Tumorzelle der Zelllinie SW2. Lichtmikroskopische Bestätigung (a), dass es sich bei der detektierten, beide Markierungen tragenden Zelle (b) um eine Einzelzelle handelt und damit nicht um ein Zellaggregat oder Artefakt.

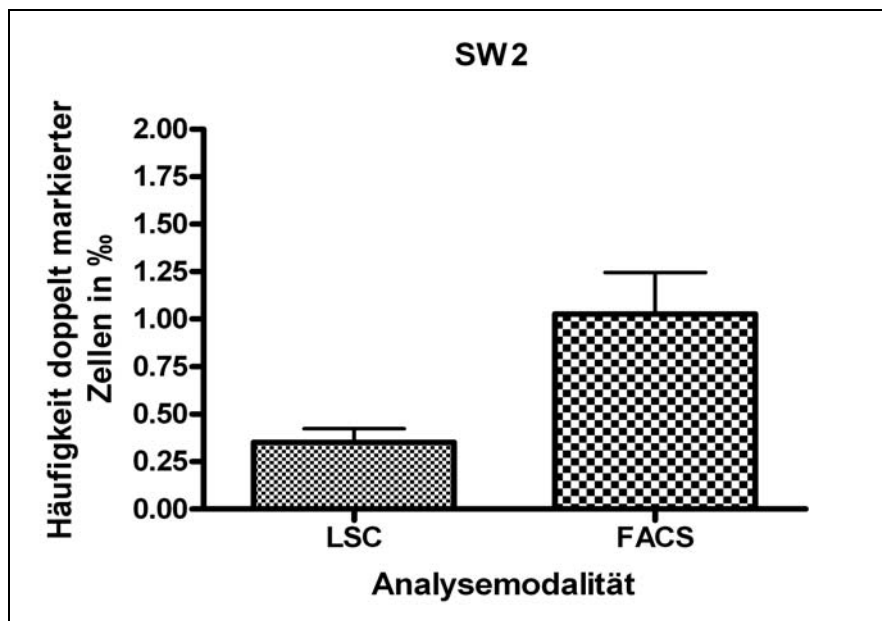


Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der Detektionshäufigkeit doppelt markierter Zellen in der Laser Scanning Cytometry (LSC) und im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) bei der Zelllinie SW2. Der Unterschied in der detektierten Fusionsfrequenz zwischen Zellen der Tumorzelllinie SW2 und Zellen der Stammzelllinie hmsc ist statistisch signifikant ($p = 0,0094$).

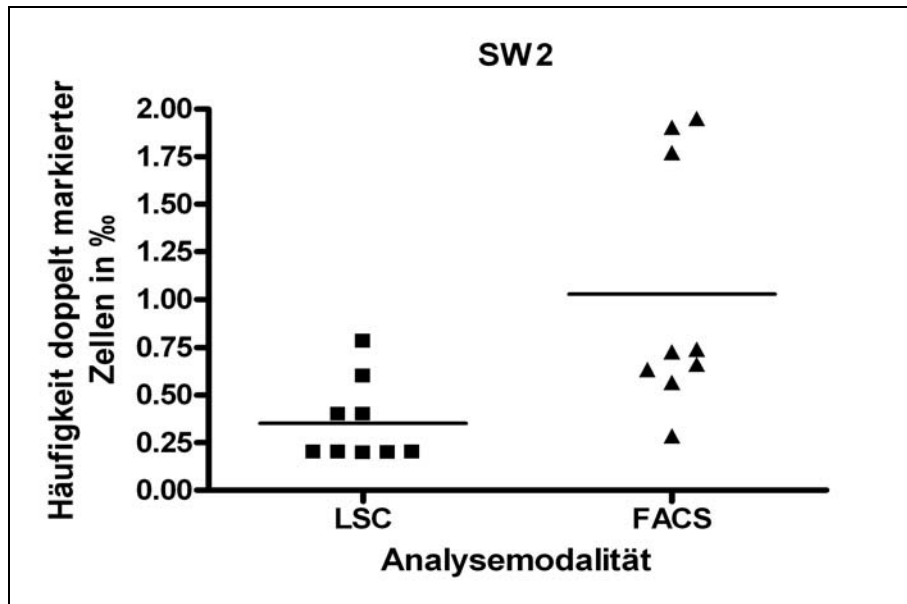


Abbildung 21: Scatter plot der Fusionsfrequenz zwischen Zellen der Zelllinien SW2 und hm5c in der Laser Scanning Cytometry (LSC) und im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). Die detektierte Fusionshäufigkeit stimmt in beiden Analysemodalitäten weitestgehend überein. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich aus einer höheren Fusionsfrequenz in einer der drei Versuchsdurchführungen ($p = 0,0094$).

4.5 Ergebnisse der Lektinzytochemie

4.5.1 Nachweis einer veränderten Expression von Oberflächenglykokonjugaten unter Inkubation mit Atorvastatin in H82

Die nachstehenden Abbildungen zeigen die zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen zur Expression von Oberflächenglykokonjugaten mittels Durchflusszytometrie (Abb. 23-25). Entsprechend Zellgröße (*Forward Scatter*) und Granularität (*Side Scatter*) wurde zunächst die vitale Gesamtpopulation der untersuchten Zellen definiert. Innerhalb dieser ließen sich zwei Subpopulationen eingrenzen, nämlich eine im folgenden als P3 bezeichnete Subpopulation etwas größerer und niedriggranulärer Zellen sowie eine im folgenden als P4 bezeichnete Subpopulation kleinerer hochgranulärer Zellen. Aus jeder dieser Zellpopulationen wurde jeweils eine weitere Subpopulation definiert, welche im Vergleich zur Autofluoreszenz der Kontrollen einen eindeutigen Markierungserfolg zeigte, so dass in diesen Untergruppen lediglich sicher markierte Zellen verglichen wurden.

Für Concanavalin A bindende Oberflächenglykokonjugate ließ sich nach Kultivierung im atorvastatinhaltigen Kulturmedium in keiner der betrachteten Zellpopulationen eine signifikante Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität als Surrogat der Lektinbindung beobachten.

Für Wheat Germ Agglutinin bindende Oberflächenglykokonjugate ließ sich ebenfalls nach Kultivierung im atorvastatinhaltigen Kulturmedium in keiner der betrachteten Zellpopulationen eine signifikante Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität als Surrogat der Lektinbindung beobachten.

Für *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin bindende Oberflächenglykokonjugate zeigte sich in der Gesamtpopulation sowie in allen untersuchten Subpopulationen ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität nach Expansion im statinhaltigen Kulturmedium (10 μ M Atorvastatin); dieser war für die Gesamtpopulation statistisch signifikant ($p = 0,0397$). Hier erhöhte sich die mittlere Fluoreszenzintensität von 2567 ± 410 auf 3027 ± 401 .

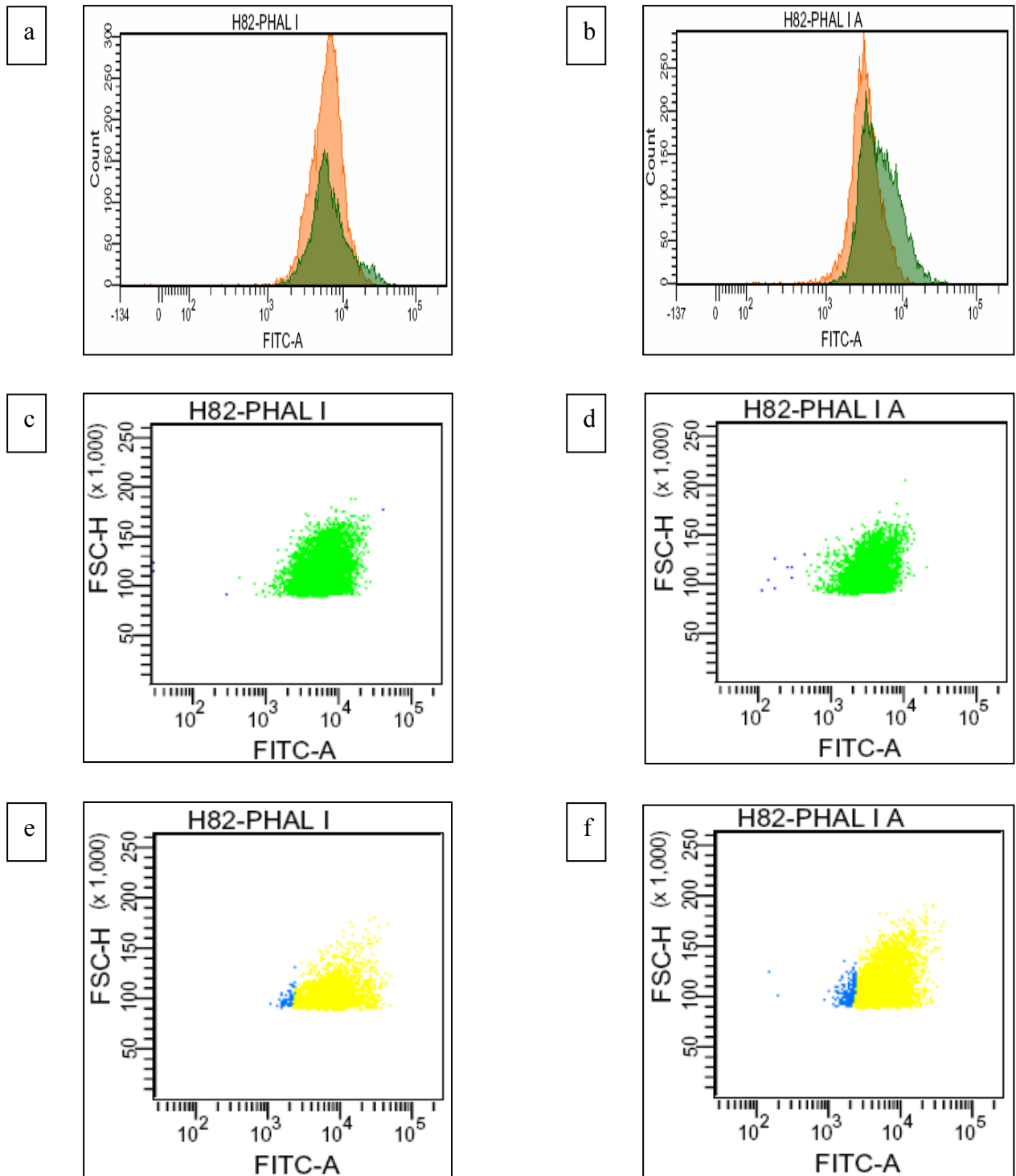


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung des Lektins PHA-L an Zellen der Tumorzelllinie H82 nach Inkubation mit Atorvastatin mit Vergleich zur Kontrolle. Darstellung der Fluoreszenzintensität der Kontrolle (a) gegenüber den unter Einfluss des Statins expandierten Zellen (b); man erkennt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Orangefarbene Fläche: P3, grüne Fläche: P4. Darstellung des sicher markierten Anteils der Subpopulation P3 (hellgrüne Punkte) und dem nicht markierten Anteil (blaue Punkte) der Kontrolle (c) gegenüber den unter Einfluss des Statins expandierten Zellen (d). Darstellung des sicher markierten Anteils der Subpopulation P4 (gelbe Punkte) und dem nicht markierten Anteil (blaue Punkte) der Kontrolle (e) gegenüber den unter Einfluss des Statins expandierten Zellen (f).

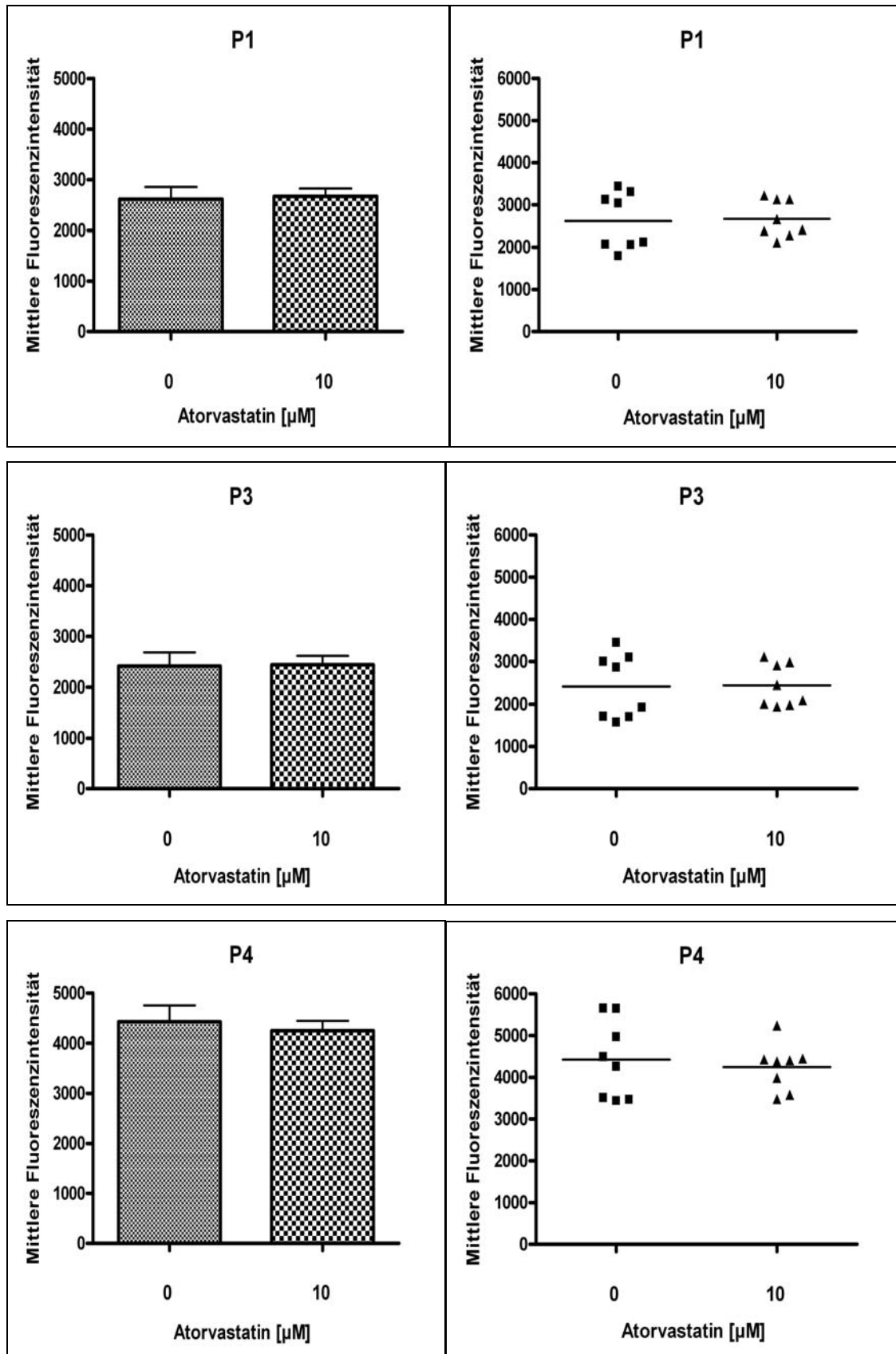


Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung der in der Durchflusszytometrie detektierten mittleren Fluoreszenzintensität des Lektin/Streptavidinkonjugates an H82 für Concanavalin A (Con A) in Abhängigkeit von der Statinkonzentration im Kulturmedium. In keiner untersuchten Zellpopulation konnte eine statistisch signifikante Änderung der Lektinbindung beobachtet werden ($p > 0,05$).

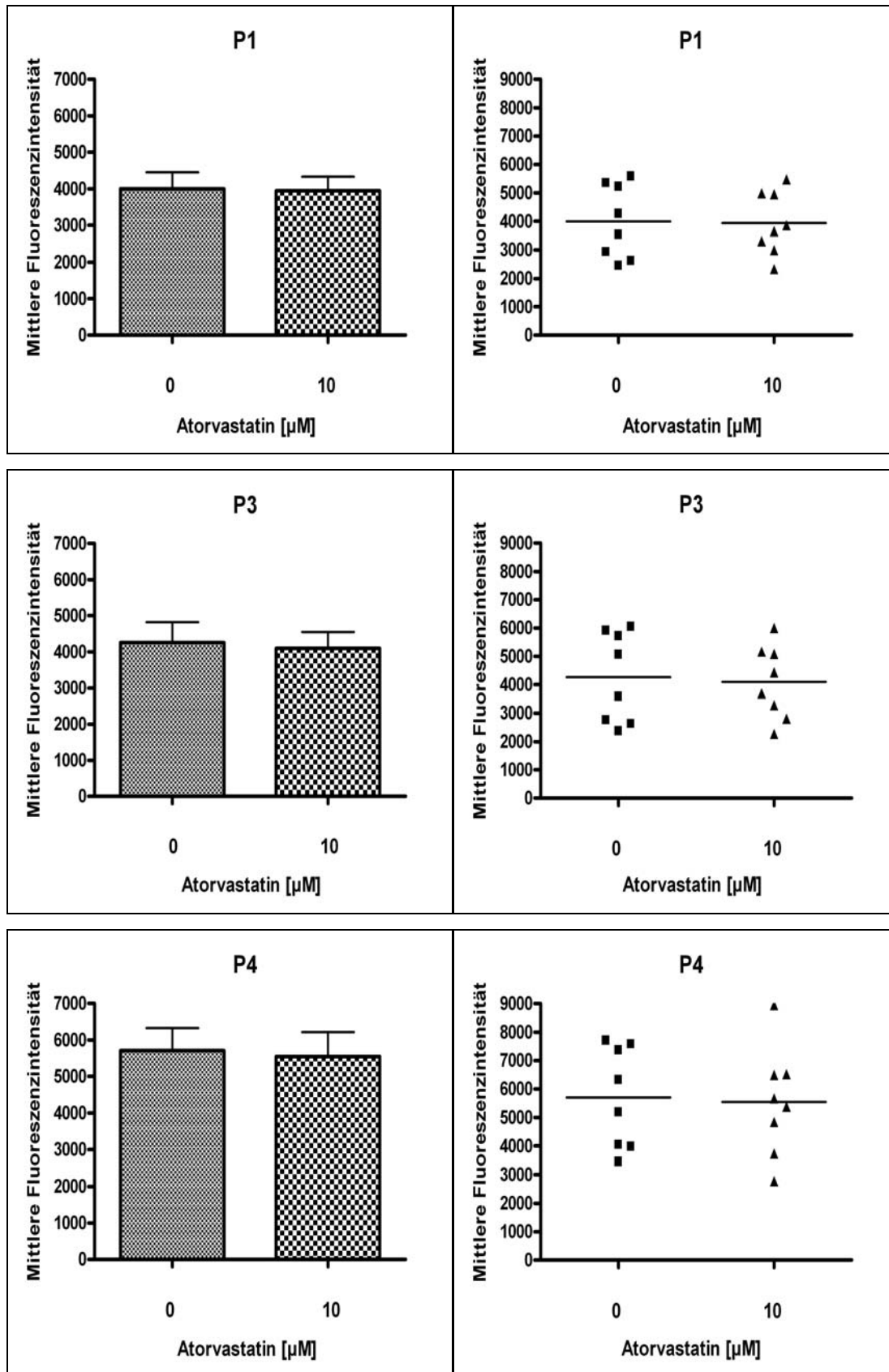


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der in der Durchflusszytometrie detektierten mittleren Fluoreszenzintensität des Lektin/Streptavidinkonjugates an H2 für Wheat Germ Agglutinin (WGA) in Abhängigkeit von der Statinkonzentration im Kulturmedium. In keiner untersuchten Zellpopulation konnte eine statistisch signifikante Änderung der Lektinbindung beobachtet werden ($p > 0,05$).

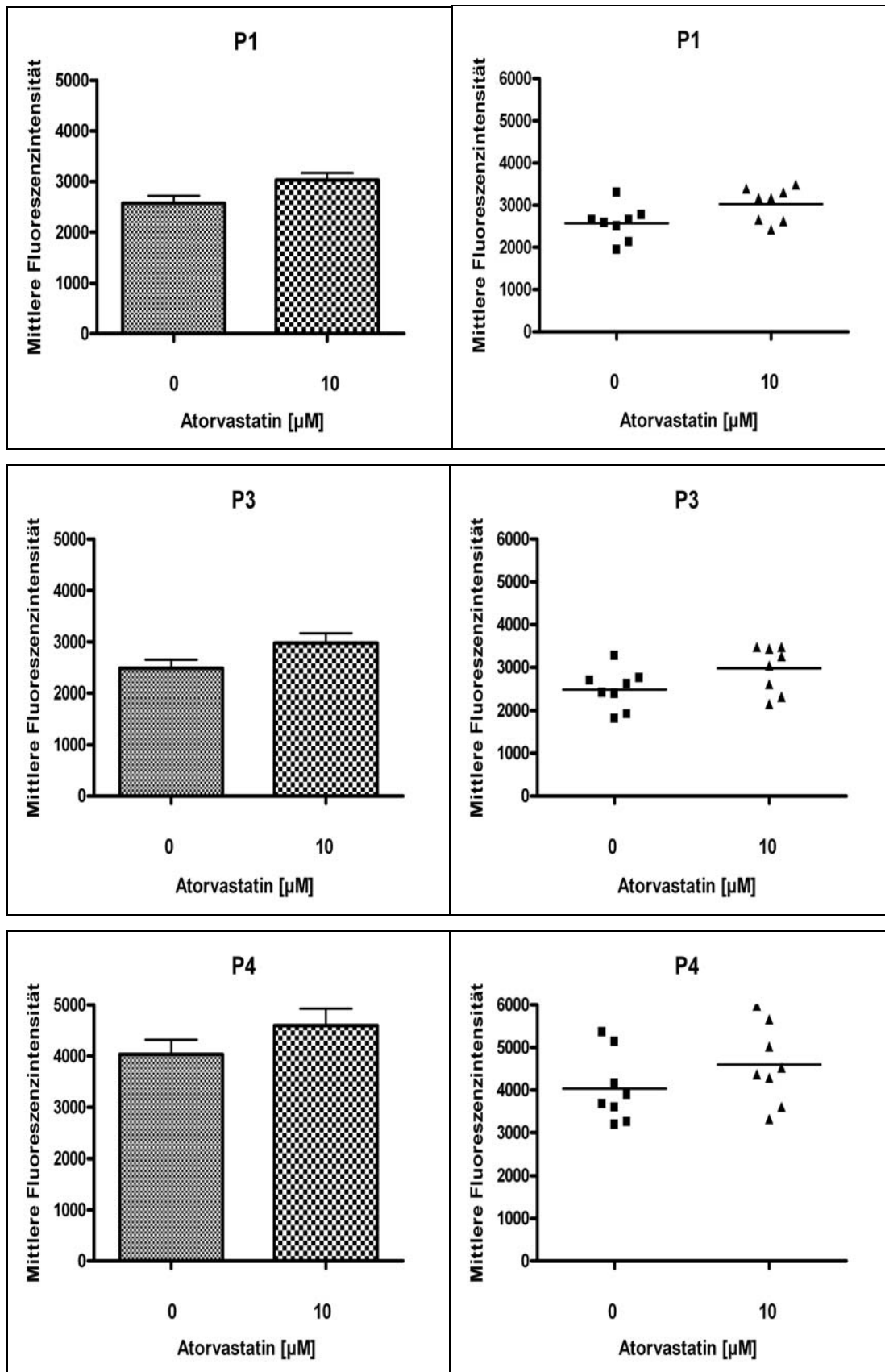


Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der in der Durchflusszytometrie detektierten mittleren Fluoreszenzintensität des Lektin/Streptavidinkonjugates an H2 für *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin (PHA-L) in Abhängigkeit von der Statinkonzentration im Kulturmedium. Die Änderung der Lektinbindung ist für die Gesamtpopulation P1 statistisch signifikant ($p = 0,0397$).

V. Diskussion

Stammzellen und insbesondere deren potentielle klinisch-therapeutische Relevanz sind in den letzten Jahren zunehmend zum Gegenstand medizinischer Forschung geworden.

Die besondere Eignung von Stammzellen für therapeutische Anwendungen gründet sich auf deren Plastizität, also der Fähigkeit, sich in Zellen zu differenzieren, welche anhand ihres Genexpressionsmusters sowie ihres funktionalen Phänotyps einem anderen adulten Gewebe zuzuordnen sind, aus welchem sie isoliert wurden (Herzog et al., 2003). Für mesenchymale Stammzellen wurde einer Differenzierung entlang mesenchymaler, aber eben auch endo- und neuroektodermaler Linien beschrieben (Jiang et al., 2002; Mezey et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Petersen et al., 1999; Scintu et al., 2006; Herzog et al., 2003; Schwartz et al., 2002). Daher werden derzeit verschiedene Anwendungsbereiche, welche von der Stammzellplastizität profitieren könnten, evaluiert wie beispielsweise die Regeneration von Myokardgewebe nach ischämischer Infarzierung (Orlic et al., 2001) oder von Leberzellen (Petersen et al., 1999). Es ist Gegenstand kritischer Diskussion, inwieweit einer intrinsischen Plastizität zugeschriebene Ergebnisse bezüglich von vermuteten Differenzierungsmöglichkeiten dieser Stammzellen auf Fusionsphänomenen beruhen könnten (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

Wenngleich Anwendungsmöglichkeiten mesenchymaler Stammzellen auch im Rahmen maligner Erkrankungen experimentell untersucht werden beziehungsweise bereits klinisch als autologe oder allogene Stammzelltransplantation nach Chemotherapie angewendet werden, sind mögliche Interaktionen von Tumor- und Stammzellen bisher kaum untersucht (Corsten und Shah, 2008).

Intensiv werden hingegen derzeit Eigenschaften und Vorkommen sogenannter Tumorstammzellen untersucht, einer Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften wie der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur unbegrenzten Proliferation (Savona und Talpaz, 2008; Jamieson et al., 2008; Reya et al., 2001). Die Existenz derartiger Tumorstammzellen konnte unter anderem für das Mammakarzinom (Al-Hajj et al., 2003), das Kolonkarzinom (O'Brien et al., 2007), das maligne Melanom (Schatton et al., 2008) und für Hirntumoren (Singh et al., 2004) belegt werden. Diesen Tumorstammzellen wird eine zentrale Bedeutung bei der Genese und Progression maligner Tumore zugeschrieben (Reya et al., 2001; O'Brien et al., 2007). Die Herkunft dieser Zellen ist jedoch derzeit letztlich ungeklärt.

Gegenstand dieser Arbeit war es daher, Zell-Zell-Interaktionen zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms *in vitro* zu charakterisieren und hierbei insbesondere zu prüfen, ob Zellfusionen zwischen diesen Zellentitäten zu beobachten sind. Vergleichsweise wurden hier Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 einbezogen.

Licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch konnte dabei die Adhäsion von Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms an mesenchymale Stammzellen beobachtet werden, wobei diese Tumorzellen sonst üblicherweise im Medium flottieren; die Anlagerung von Tumorzellen war dabei im Fall der Zelllinie SW2 am ausgeprägtesten. Die Tumorzellen bildeten auf den Stammzellen größere Zellaggregate. Die hierbei durch die Apposition der Zellmembranen auftretende, enge räumliche Beziehung von Stamm- und Tumorzellmembran könnte den Beginn einer Zellfusion markieren. Fluoreszenzmikroskopisch konnten schließlich Einzelzellen beobachtet werden, welche beide Fluoreszenzmarker trugen; somit konnte eine direkte Darstellung fusionierter Zellen erfolgen. In den zur weiteren Quantifizierung der beobachteten Fusionsphänomene durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte für alle untersuchten Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms das Vorhandensein doppelt markierter Zellen als Surrogat für stattgehabte Fusionen bestätigt werden. Interessanterweise bewegte sich die dabei beobachtete Fusionsfrequenz bei den untersuchten Zelllinien in einer ähnlichen Größenordnung. So konnten fusionierte Zellen bei der Zelllinie OH3 in $2,14 \pm 0,64$ ‰, bei der Zelllinie OH1 in $1,68 \pm 1,01$ ‰, und bei den Zelllinien H82 und SW2 in $2,11 \pm 0,59$ ‰ beziehungsweise in $1,03 \pm 0,65$ ‰ gefunden werden. Hierbei ergab sich im Vergleich mit den übrigen Tumorzelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms lediglich für die Zelllinie SW2 ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Die aufgefundene Fusionshäufigkeit stimmt dabei mit den in der einschlägigen Literatur für andere Tumorentitäten beschriebenen Fusionsfrequenzen weitestgehend überein. Das insgesamt überaus seltene Ereignis einer Fusion von aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen mit den von Terada et al. (2002) verwendeten embryonalen Stammzellen wurde bei 2-11 auf 10^6 Knochenmarksstammzellen beobachtet; die niedrigere Fusionsfrequenz in seinen Experimenten könnte darauf zurückzuführen sein, dass dem Fusionspartner andere Stammzellen und nicht Tumorzellen angeboten wurden, deren hohe Fusionsneigung – insbesondere auch bei Koinkubation mit Stammzellen - weithin bekannt ist (Wakeling et al., 1994; Larizza und Schirmacher, 1984; Goldenberg et al., 1974; Pawelek und Chakraborty, 2008; Rizvi et al., 2006). So konnten Janzen et al. (1971) nach Koinjektion zweier unterschiedlicher Tumorzelllinien, nämlich

Sarkom- und Lymphomzellen, in 3 % der sich entwickelnden Tumore mittels Chromosomenuntersuchung Hybridzellen detektieren. Später beschrieben Rachkovsky et al. (1998) zwischen Melanomzellen und Makrophagen - als einem weiteren von Knochenmarkstammzellen abstammenden Zelltyp - eine Fusionsfrequenz von 1 Hybridzelle auf 10^{5-7} Zellen.

In der Durchflusszytometrie fanden sich nicht nur auch Fusionen zwischen mesenchymalen Stammzellen und den Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT29, sondern die Fusionsfrequenz war mit $4,71 \pm 1,86$ ‰ sogar statistisch signifikant höher als für alle untersuchten Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Jordan et. al. (1999) konnten immunhistochemisch und durchflusszytometrisch nachweisen, dass Zellen der Linie HT29 ebenfalls CXCR4 exprimieren und dass dieser Rezeptor funktional aktiv ist. Insofern bleibt zu überprüfen, ob es auch bei diesen Tumorzellen über die CXCR4/CXCL12-Achse zu einer gerichteten Migration, Adhäsion und schließlich Fusion mit mesenchymalen Stammzellen kommt oder ob in Anbetracht der hohen spontanen Fusionsneigung von Tumorzellen hier ein Basisphänomen beobachtet wurde und eine Zellfusion zwischen den Zellentitäten Stammzelle und Tumorzelle ein verbreitetes Phänomen darstellt (Pawelek und Chakraborty, 2008; Rizvi et al., 2006).

Die in der Durchflusszytometrie bestimmte Fusionshäufigkeit zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen wurde mit den Ergebnissen einer unabhängigen Methode, der Laser Scanning Zytometrie, verglichen; hierbei zeigte sich unter Berücksichtigung der methodisch bedingten Unterschiede insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren: So wurde in der Laser Scanning Zytometrie die Fusionsfrequenz mit $0,35 \pm 0,07$ ‰ gegenüber $1,03 \pm 0,22$ ‰ in der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierdurch konnte zum einen das Auftreten von doppelt markierten Zellen bestätigt werden, zum anderen konnte mit der Laser Scanning Zytometrie gezeigt werden, dass es sich bei den detektierten Ereignissen in der Tat um intakte Einzelzellen handelt.

Die zell- und tumorbiologische Bedeutung der im Rahmen einer Zellfusion entstehenden Hybridzellen ist letztlich ungeklärt und Gegenstand kritischer Diskussion; insbesondere erscheint eine Rolle dieser Zellen im Rahmen des Metastasierungsprozesses möglich (Pawelek und Chakraborty, 2008). Die Genese einer Subpopulation zur Metastasierung befähigter Tumorzellen innerhalb der Gesamtpopulation nicht metastasierender Zellen ist bisher nicht befriedigend erklärt. Es ist bekannt, dass Tumorzellen geno- und letztlich phänotypische Alterationen nicht nur durch schrittweise akquirierte Mutationen, sondern auch durch Zellfusion erwerben können (Lagarde und Kerbel, 1984). Dabei können Subpopulationen

veränderter biologischer Aggressivität und mit einem höherem malignen Potential entstehen. Eine Rolle von Tumorzellhybriden bei der Entstehung metastasierungsfähiger Zellen wurde mehrfach postuliert (Mekler, 1971; Goldenberg et al., 1974). Diese ursprünglichen Konzepte fokussierten jedoch auf beobachtete Fusionen mit Leukozyten. Bedeutsam erscheint in diesem Zusammenhang, dass mesenchymale Stammzellen in maligne Tumore und deren Metastasen rekrutiert werden (Karnoub et al., 2007; Studeny et al., 2002). Dieses Phänomen scheint dadurch erklärbar, dass viele maligne Tumoren als Ort chronischer Inflammation begriffen werden können (Coussens und Werb, 2002; Dvorak, 1986). In ebensolche Bereiche werden mesenchymale Stammzellen bekanntermaßen rekrutiert (Ortiz et al., 2003; Sasaki et al., 2008). Mesenchymale Stammzellen verändern dort durch die Ausschüttung parakriner Faktoren wie CXCL12 die Wachstumsbedingungen der Tumorzellen und können über die Exkretion bestimmter Faktoren wie dem Chemokin CCL5 eine Steigerung der Motilität, der Invasionsfähigkeit und damit des metastatischen Potenzials bewirken (Karnoub et al., 2007; Orimo et al., 2005). Neben dieser Förderung der lokalen Progression scheint jedoch wichtiger zu sein, dass durch Zellhybridisierungen hier Zellen mit einem metastastischem Phänotyp entstehen könnten; interessanterweise ähnelt die Genexpression metastatischer Tumorzellen derjenigen von migrationsfähigen Knochenmarkszellen (Pawelek und Chakraborty, 2008). Bjerkvig et al. (2005) formulierten die Hypothese, dass Tumorstammzellen aus ebensolchen Zellfusionen hervorgehen könnten. Dieses Konzept besitzt aufgrund der Tatsache, dass Tumorzellen Stammeigenschaften wie Migrationsfähigkeit, Selbsterneuerung und unbegrenzte Proliferationsfähigkeit direkt durch Hybridisierung erwerben könnten und nicht erst durch schrittweise Mutationen akquirieren müssten, eine besondere Attraktivität. Interessanterweise sind viele Hybridzellen durch chromosomale Aberrationen und eine Aneuploidie gekennzeichnet, beides Kennzeichen maligner Zellen (Duesberg, 2005). Jedoch könnten durch Reduktionsteilungen nach Fusion teils wieder Zellen mit einem zahlenmäßig normalen Chromosomensatz entstehen, so dass letztlich auch diploide Zellen fusionierte Zellen repräsentieren können (Bjerkvig et al., 2005).

Gleichzeitig ist nicht geklärt, inwieweit bereits temporäre Membranfusionen zwischen Stamm- und Tumorzellen zu Transdifferenzierungsphänomenen beitragen könnten. So konnte ein interzellulärer Austausch von Proteinen und sogar Organellen über nanotubuläre Verbindungen beobachtet werden (Rustom et al., 2004). Hierdurch können nicht im jeweiligen Fusionspartner exprimierte Proteine ausgetauscht werden, und zwar über temporäre, tubulär konfigurierte Membranausstülpungen zwischen Zellen.

Das Phänomen einer spontanen Fusion zwischen Tumorzellen sowohl untereinander als auch zwischen malignen und somatischen Zellen ist bekannt und trägt wahrscheinlich zur genetischen und damit phänotypischen Heterogenität von Tumoren bei (Wakeling et al., 1994; Larizza und Schirmacher, 1984).

Ferner konnte sowohl in vitro als auch in vivo belegt werden, dass aus dem Knochenmark stammende Stammzellen mit einer Vielzahl anderer Zellen fusionieren, beispielsweise mit Kardiomyozyten, Hepatozyten oder Purkinjezellen (Alvarez-Dolado et al., 2003; O'Malley und Scott, 2004). Stammzellen können mit einer somatischen Zelle ein Heterokaryon formen, welches das Genexpressionsmuster der somatischen Zelle übernimmt. Hierdurch können sie den Phänotyp des Fusionspartners adoptieren. In der Literatur wird dies sowohl als möglicher Mechanismus der Transdifferenzierung von Stammzellen, aber ungleich wichtiger als Argument gegen bestimmte beobachtete Differenzierungsvorgänge angeführt, insbesondere gegen solche, bei denen eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nicht nur entlang der mesenchymalen Linie postuliert wurde (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Herzog et al., 2003). Somit wird deutlich, dass ein bedeutender Anteil der einer intrinsischen Plastizität der Stammzellen zugeschriebenen Differenzierungsphänomene auf Zellfusionen beruhen könnte.

Bei einer Vielzahl solider maligner Tumoren ist das Vorhandensein einzelner disseminierter Tumorzellen in verschiedenen anderen Organen nachgewiesen worden. Die Präsenz einer relativ großen Zahl von Einzelzellen stellt sich im Verhältnis zur im direkten Vergleich hierzu gleichzeitig niedrigen Rate an klinisch evidenten Metastasen auffällig diskrepant dar. Pardal et al. (2003) führten die Unterschiede im Potential zur Tumorinduktion auf intrinsische Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorzellen zurück ohne letztlich differenzierte Faktoren zur Genese dieser Unterschiede benennen zu können; eine zufrieden stellende Erklärung für diese scheinbare Ineffizienz des Metastasierungsprozesses konnte somit bisher nicht gefunden werden (Pantel et al., 2008). Interessanterweise scheint hierbei das Knochenmark das zentrale Zielkompartiment einer solchen Disseminierung zu sein. Innerhalb des Knochenmarkes können verschiedene, auch mesenchymale Stammzelltypen in Kontakt zu diesen Tumorzellen gelangen (Bjerkvig et al., 2005). Dabei könnten in einer geringen Frequenz durch Zellfusion Hybridzellen entstehen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und unbegrenzter Proliferation besitzen würden. Diese fusionierten Zellen könnten damit zu klinisch evidenten Metastasen voranschreiten. Ebenso könnten die entstandenen Hybridzellen die für viele aus dem Knochenmark stammende Zellen typische Eigenschaft der Migrationsfähigkeit besitzen (Brabletz et al., 2005). Daher ist anzunehmen,

dass solche Zellen den Ursprung weiterer Metastasen in anderen Organen bilden könnten beziehungsweise, dass derartige Hybridzellen die zwischen Metastasen rezirkulierenden Tumorzellen darstellen.

Zusammenfassend könnten durch Zellfusion entstandene Hybridzellen somit sowohl den Ursprung der zur eigentlichen Tumorprogression erforderlichen Tumorstammzellen als auch die Ursache für das selten zu beobachtende Fortschreiten disseminierter Tumorzellen zu evidenten Metastasen darstellen. Ferner bietet das Konzept der Zellfusion eine schlüssige Erklärung für den Metastasierungsprozess überhaupt.

Interessanterweise besitzen viele Tumorentitäten hinsichtlich ihres Metastasierungsmusters eine Organpräferenz: So lassen sich beim kleinzelligen Bronchialkarzinom überzufällig häufig Metastasen im Knochenmark, aber auch in den Nebennieren und im Gehirn beobachten (Weiss, 1992). Im Knochenmark und in Lymphknoten sowie anderen Organen, welche ein häufiges Ziel einer Metastasierung darstellen, wird vermehrt CXCL12 ausgeschüttet (Dorsam und Gutkind, 2007; Balkwill, 2004). Gleichzeitig konnte auf Zellen maligner Tumore die Expression des entsprechenden Chemokinrezeptors CXCR4 nachgewiesen werden, so beim Mammakarzinom (Müller et al., 2001), beim malignen Melanom (Scala et al., 2006) und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Belperio et al., 2004). Entsprechend der zugrundeliegenden Annahme einer Involvierung der CXCR4/CXCL12-Achse bei der Filialisierung fand sich in Metastasen des letztgenannten Tumors eine höhere Expression von CXCR4 als im Primärtumor selbst (Phillips et al., 2003). Burger et al. (2004) konnten zeigen, dass Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes CXCR4 exprimieren; eine Aktivierung der CXCR4/CXCL12-Achse führt dabei zu einer gesteigerten Proliferationsrate der Tumorzellen und erhöht deren Motilität (Kijima et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob eine Inhibierung der CXCR4/CXCL12-Achse zu einer Verringerung der Fusionsfrequenz zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen führt, wurde der CXCR4-Inhibitor AMD3100 eingesetzt; hierbei fand sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml interessanterweise eine signifikante Erhöhung der Detektionsrate an Zellen, welche mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren (s. Abbildung 4.12). Diese Beobachtung widerspricht zunächst der nahe liegenden Annahme, dass durch eine Unterbrechung der CXCR4/CXCL12-Achse Chemotaxis und zielgerichtete Adhäsion von Tumorzellen an Stammzellen und damit letztlich die Fusionsfrequenz abnehmen müssten. Für das Bicyklam AMD3100 ist jedoch eine milde partialagonistische Aktivität (CXCL12-ähnlich) beschrieben (Trent et al., 2003). CXCL12 unterstützt die Proliferation von

CXCR4⁺ Tumorzellen über eine direkte Förderung des Zellwachstums sowie der Überlebensfähigkeit der Tumorzellen (Balkwill, 2004). Daher bleibt zu überprüfen, ob es sich bei der höheren Detektionsrate fusionierter Zellen unter Inkubation mit AMD3100 teils um das Korrelat einer medikamentös induzierten, erhöhten Proliferations- und Überlebensfähigkeit von Tumorzellen nach Fusion handeln könnte.

Durch Gabe des monoklonalen Antikörpers MAB172 gegen CXCR4 ließ sich keine Änderung der Fusionsfrequenz erreichen. Möglicherweise blockiert dieser Antikörper CXCR4 nicht vollständig. Im Gegensatz zu AMD3100 blockiert dieser Antikörper jedoch nicht die Internalisierung des Rezeptors, so dass nicht-antikörperbesetztes CXCR4 wieder exponiert wird und für eine Bindung von CXCL12 weiter zur Verfügung steht. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Einfluss auf die Fusionshäufigkeit darstellen. Ferner ist anzumerken, dass dieser Antikörper im Gegensatz zum Bizeyklam AMD3100 über keine intrinsische Aktivität verfügt. Somit kann es im Fall des Antikörpers nicht zu einem partialagonistischen Effekt kommen, welcher über eine erhöhte Überlebens- und Proliferationsfähigkeit von CXCR4⁺ Zellen eine gesteigerte Fusionsfrequenz vorspiegeln könnte.

Da mesenchymale Stammzellen CXCL12 und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes CXCR4 exprimieren, wäre denkbar, dass durch Zellfusion Hybridzellen mit einer Coexpression von Rezeptor und Ligand entstünden, was zu einer autokrinen Stimulation des Signalweges führen könnte. Diese Zellen müssten dann stärker proliferieren als die ursprünglichen Tumorzellen.

Die Bedeutung der CXCR4/CXCL12-Achse im Rahmen der Zellmigration von Leukozyten und hämatopoetischen Stammzellen ist gut charakterisiert (Baggiolini, 1998; Homey et al., 2002; Tachibana et al., 1998). Die Migration bestimmter Stammzellen und die Metastasierung von CXCR4⁺ Tumorzellen unterliegt dabei ähnlichen Mechanismen (Kucia et al., 2005). Burger et al. (2003) konnten nicht nur nachweisen, dass Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes CXCR4 exprimieren, sondern auch, dass durch diesen Chemokinrezeptor eine integrinvermittelte Adhäsion an Stromazellen gefördert wird. Ngo et al. (2008) zeigten kürzlich, dass AMD3100 beim Morbus Waldenström die Adhäsion von CXCR4⁺, malignen Zellen an Stroma- und Endothelzellen unterbindet. Möglicherweise bedingt die Blockade chemotaktischer Wirkungen des CXCL12 über eine geringere Adhäsion und Tumorzellaggregatbildung an der Oberfläche von Stammzellen eine konsekutiv höhere Fusionsrate, und zwar entweder über eine Erhöhung an freien, nicht durch Tumorzellaggregate blockierten, fusionsrelevanten Oberflächenrezeptoren oder über eine

Alteration dem CXCR4 nachgeschalteter biochemischer Prozesse eine gesteigerte Fusionsneigung. Bemerkenswerterweise erhöht AMD3100 in vivo die Mobilität und Migrationsbereitschaft von CXCR4⁺ Zellen (Calandra et al., 2008; Liles et al., 2003). Daher bleibt vor dem Hintergrund der beobachteten Ergebnisse zu vermuten, dass, selbst wenn eine CXCR4-Inhibition die zielgerichtete Chemotaxis und Adhäsion von Tumorzellen an mesenchymale Stammzellen verringert, eine gesteigerte Mobilität der in Suspension befindlichen Tumorzellen in vitro trotzdem zu einem häufigeren Kontakt potentieller Fusionspartner und damit schließlich zu höheren Fusionsfrequenzen führen könnte.

Interessanterweise lässt sich durch Substitution mit Metallionen die Affinität von AMD3100 zum Rezeptor um ein Vielfaches steigern (Gerlach et al., 2003). Ob hierdurch auch die zellbiologischen Effekte des CXCR4 Inhibitors wie die erhöhte Fusionsfrequenz gesteigert werden, bleibt zu überprüfen.

In der Literatur sind erfolgreiche Versuche einer Reduktion der Metastasierungshäufigkeit in vivo durch Inhibition der CXCR4/CXCL12-Achse dokumentiert, und zwar beispielsweise für das Mammakarzinom (Müller et al., 2001). Wenn hierdurch allerdings gleichzeitig aufgrund von Zellfusionen zwischen Stamm- und Tumorzellen Hybridzellen entstünden, welche für eine Metastasierung essentielle Eigenschaften wie Migrationsfähigkeit, Selbsterneuerung und unbegrenzte Proliferationsfähigkeit von im Gewebe liegenden Stammzellen erhielten, könnten unbeabsichtigt biologisch aggressivere Tumorzellen entstehen (Pawelek und Chakraborty, 2008; Lagarde und Kerbel, 1984). Daher unterstreichen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse die Notwendigkeit der kritischen Überprüfung des eventuellen Einsatzes von CXCR4-Inhibitoren zur Prävention einer Metastasierung.

Simons postulierte bereits vor zwanzig Jahren die Existenz von lipid rafts, dynamischen, heterogenen Ansammlungen von Cholesterol und Sphingolipiden in der Lipidmembran der Zelle (Simons und van Meer, 1988). Diese lipid rafts können Proteine einschließen wie die α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen oder Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), welche Glykoproteine in der Lipidmembran verankern (Simons und Toomre, 2000). Lipid rafts mit den enthaltenen Sphingolipiden, Cholesterol und Glycolipiden sind sowohl an Endozytosevorgängen als auch an Membranfusionen bei verschiedenen Virusfamilien beteiligt (Hanzal-Bayer und Hancock, 2007; Teissier und Pécheur, 2007).

In der Literatur wird für Statine über eine Beeinflussung der Cholesterol- und Dolicholsynthese eine Fusionsinhibition beschrieben: So konnten Jamieson et al. (1992) zeigen, dass sich die Fusion von Myoblasten mittels des Statins Lovastatin verhindern lässt. Belo et al. (1993) konnten bei Myoblasten vertiefend eine verringerte Bindung der Lektine

Con A und WGA an Oberflächenglykoproteine beschreiben, wenn diese unter Einfluss von Lovastatin beziehungsweise Mevastatin inkubiert wurden, so dass postuliert wurde, dass eine verringerte Expression von fusogenen Oberflächenglykoproteinen zu einer reduzierten Fusionsfrequenz führen würde. Um eine potentielle Inhibition von Zellfusionen zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen durch Statine zu überprüfen, wurde daher die Fusionsfrequenz unter Statinexposition gegenüber einer Kontrollgruppe bestimmt. Gleichzeitig wurde eine Charakterisierung der Expression von Oberflächenglykoproteinen mittels Durchflusszytometrie angestrebt. Interessanterweise fand sich auch hier eine statistisch signifikante Erhöhung der Fusionsfrequenz, und zwar auf 169 % der Kontrolle.

Kucia et al. (2005) konnten demonstrieren, dass durch Depletion des Membrancholesterols mittels eines β -HMG-CoA-Reduktasehemmers die Migration von CXCR4⁺ Tumorzellen entlang eines CXCL12 Gradienten gestört werden kann, wobei wahrscheinlich die Bildung von lipid rafts gestört wird (Schmidmaier et al., 2004). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen könnte die erhöhte Fusionsfrequenz zwischen Stamm- und Tumorzellen unter Atorvastatin auf eine zumindest funktionelle Depletion von CXCR4 und damit eine verringerte Adhäsion und gesteigerte Tumorzellmobilität zurückzuführen sein, wenngleich der genaue Mechanismus der Erhöhung der Fusionsrate Gegenstand weiterer Untersuchungen sein muss.

Da Quantum Dots über den Mechanismus einer rezeptorvermittelten Endozytose aufgenommen werden, galt es, eine Beeinflussung der Markierung durch eine Statingabe mit einer konsekutiven Veränderung der Membranzusammensetzung auszuschließen. Hierzu wurde die mittlere Fluoreszenzintensität nach Quantum Dot Markierung von mit und ohne Atorvastatinzusatz expandierten Stammzellen bestimmt, wobei sich kein statistisch signifikanter Unterschied beobachten ließ, so dass eine Beeinflussung ausgeschlossen werden konnte.

Um eine veränderte Expression von Oberflächenglykokonjugaten unter Atorvastatineinfluss näher zu charakterisieren, wurden Lektine mit einer Zuckerspezifität gegen α -D-Glucose, α -D-Mannose, N-Acetylglucosamin und Kohlenhydrate vom komplexen Typ eingesetzt. Hierbei fand sich zum einen eine statistisch signifikant erhöhte Bindung des Lektins PHA-L bei unter Atorvastatineinfluss inkubierten Tumorzellen, zum anderen keine signifikante Beeinflussung des Bindungsverhaltens der zur Charakterisierung der Myoblasten verwendeten Lektine Con A und WGA. Die mittlere Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie für PHA-L erhöhte sich in allen untersuchten Subpopulationen, wobei der Anstieg für die Gesamtpopulation statistisch signifikant war. Somit konnte gezeigt

werden, dass unter Atorvastatin die Expression bestimmter Oberflächenglykoproteine alteriert wird, wodurch eine Änderung des Fusionsverhaltens zu erwarten ist. Anzuführen ist hier, dass die von Jamieson et al. (1992) beschriebene Fusionsinhibition sich auf Versuche mit gleichartigen Zellen (Myoblasten) bezieht; ferner ist vorstellbar, dass die durch Statine alterierte Expression von Oberflächenglykoproteinen für verschiedene Zelllinien nicht identisch ist.

Vor dem Hintergrund, dass eine Anwendung von β -HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren zunehmend sowohl in der Prävention maligner Erkrankungen als auch in deren Therapie diskutiert wird, scheint die mögliche Beeinflussung von Stammzell-Tumorzellinteraktionen bisher wenig berücksichtigt und sollte somit Gegenstand weiterer Untersuchungen sein (Kusama et al., 2002; Paragh et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten nicht nur spontane Fusionen zwischen Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass die Fusionsfrequenz pharmakologisch durch Veränderung der Zellmembranstruktur und durch Inhibition von Chemokinwegen beeinflusst werden kann. Die weitere Charakterisierung der entstehenden Hybridzellen und ihre Bedeutung für den Metastasierungsprozess *in vivo* sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

VI. Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes sezernieren das Chemokin CXCL12, das vom Chemokinrezeptor CXCR4 auf Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinomes gebunden wird und so zu einer Wachstumsstimulation führt, weshalb es vermutlich zu einer besonders häufigen Metastasierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms in das Knochenmark kommt. Durch Fusion von CXCR4⁺ Tumorzellen mit CXCL12 exprimierenden Stammzellen könnten so Zellen mit einem aktivierten autokrinen Signalweg entstehen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Frage einer möglichen Zellfusion zwischen Stamm- und Tumorzellen für vier Bronchialkarzinomzelllinien (H82, SW2, OH1, OH3) zu untersuchen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Fusionsfrequenz pharmakologisch beeinflusst werden kann.

Das seltene Ereignis einer Tumorzell-/Stammzellfusion konnte fluoreszenzmikroskopisch, durchflusszytometrisch und in der Laser Scanning Zytometrie bestätigt und quantifiziert werden. Dazu wurde eine direkte, quantitative Nachweismethode für Zellfusionen mittels Durchflusszytometrie entwickelt. Die höchste Fusionsfrequenz unter den Bronchialkarzinomzellen konnte dabei bei der Zelllinie OH3 beobachtet werden, nämlich $2,14 \pm 0,64$ %. Die Fusionsfrequenz konnte sowohl durch Gabe des - die Zellmembranfluidität beeinflussenden - β -HMG-CoA-Reduktaseinhibitors Atorvastatin als auch durch Blockade des Rezeptors CXCR4 mittels des Bicyklams AMD3100 in signifikantem Maße erhöht werden. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass durch das Statin eine relevante Beeinflussung der Aufnahme an Quantum Dots erfolgt. Mit dem verwendeten blockierenden Antikörper gegen CXCR4 ließ sich die Fusionsfrequenz hingegen nicht beeinflussen. Die nähere, exemplarisch für die Zelllinie H82 durchgeführte durchflusszytometrische Charakterisierung der durch Atorvastatin hervorgerufenen Veränderungen in der Glykokonjugatzusammensetzung der Zellmembran zeigte eine signifikant erhöhte Expression von komplexen Kohlenhydratresten. Da ein deutlicher Einfluss sowohl einer Statingabe als auch einer CXCR4-Inhibition auf die Interaktion von Tumor- und Stammzellen gefunden wurde, sollte vor dem Hintergrund der zunehmenden tumortherapeutischen und präventiven Anwendung dieser Substanzen die Relevanz dieser Ergebnisse für die Progression der malignen Erkrankung in Tiermodellen und weiteren experimentellen Studien überprüft werden.

VII. Literaturverzeichnis

Abmayr SM, Balagopalan L, Galletta BJ, Hong SJ (2003) Cell and molecular biology of myoblast fusion. *Int Rev Cytol* 225:33-89

Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12846-12851

Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y, Fuse H (2008) Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* 99:539-542

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973

Andersen TL, Boissy P, Sondergaard TE, Kupisiewicz K, Plesner T, Rasmussen T, Haaber J, Kølvråa S, Delaissé JM (2007) Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer-host partnership? *J Pathol* 211:10-17

Anderson JM (2000) Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 7:40-47

Azzopardi JG (1959) Oat-cell carcinoma of the bronchus. *J Pathol Bacteriol* 78:513-519

Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565–568

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756-760

-
- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4:540-550
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet* 357:539–545
- Belo RS, Jamieson JC, Wright JA (1993) Studies on the effect of mevastatin (lovastatin) and mevastatin (compactin) on the fusion of L6 myoblasts. *Mol Cell Biochem* 126:159-167
- Belperio JA, Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Keane M, Strieter R (2004) The SDF-1/CXCL12/CXCR4 biological axis in non small cell lung cancer metastases. *Chest* 125:156S.
- Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1:46-54
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ (2005) Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 5:899-904
- Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med* 3:730–737
- Borges M, Bose P, Frank HG, Kaufmann P, Pötgens AJ (2003) A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 24:282-293
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5:744-749
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353:793-802
- Bruce WR, van der Gaag H (1963) A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 199:79–80
- Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA (2003) Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells

mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22:8093-8101

Calandra G, McCarthy J, McGuirk J, Tricot G, Croker SA, Badel K, Grove B, Dye A, Bridger G (2008) AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34⁺ cells from non Hodgkin-lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and / or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant* 41:331-338

Cardigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286-3305

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer* 2:563–572

Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in β -catenin. *Nature Genet* 21:410–413

Chen EH, Olson EN (2005) Unveiling the Mechanisms of Cell-Cell Fusion. *Science* 308:369-373

Cohen MH, Matthews MJ (1978) Small cell bronchogenic carcinoma: A distinct clinicopathologic entity. *Semin Oncol* 5:234-243

Corsten MF, Shah K (2008) Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare. *Lancet Oncol* 9:376-384

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Baba M, Schols D, Nakashima H, Balzarini J, Debyser Z, Murrer BA, Schwartz D, et al. (1992) Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5286-5290

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Balzarini J, Witvrouw M, De Vreese K, Debyser Z, Rosenwirth B, Peichl P, Datema R, Thornton D, Skerlj RT, Gaul F, Padmanabhan S, Bridger G, Henson G, Abrams MJ (1994) Highly potent and selective inhibition of human

immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100.
Antimicrob Agents Chemother 38:668-674

De Falco V, Guarino V, Avilla E, Castellone MD, Salerno P, Faviana P, Basolo F, Santoro M, Melillo RM (2007) Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer. *Cancer Res* 67:11821-11829

Dolberg DS, Hollingsworth R, Hertle M, Bissell MJ (1985) Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science* 230:676-678

Domen, J, Gandy KL, Weissman IL (1998) Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 91:2272–2282

Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP (1998) AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4:72-77

Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:79-94

Duesberg P (2005) Does aneuploidy or mutation start cancer? *Science* 307:41

Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650-1659

Earp LJ, Delos SE, Park HE, White JM (2005) The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:25–66

Eccles SA, Welch DR (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369:1742-1757

Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, Mikulits W, Beug H, Foisner R (2004) beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 23:2672-2680

Elias AD (1997) Small cell lung cancer: State-of-the-art therapy in 1996. *Chest* 112:251S-258S

Ettinger DS, Aisner J (2006) Changing face of small cell lung cancer: real and artifact. *J Clin Oncol* 24:4526-4527

Ewing J (1928) *Neoplastic Diseases. A Treatise on Tumors.* 3rd edn. WB Saunders Co., Philadelphia London, pp 77-89

Farkas-Bargeton E, Barbet JP, Dancea S, Wehrle R, Checouri A, Dulac O (1988) Immaturity of muscle fibers in the congenital form of myotonic dystrophy: Its consequences and its origin. *J Neurol Sci* 83:145-159

Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238:193-197

Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by marrow-derived myogenic precursors. *Science* 279:1528-1530

Fidler IJ (2001) Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10:257-269

Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev. Cancer* 3:453-458

Fidler IJ, Hart IR (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217:998-1003

Fidler IJ, Kripke ML (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197:893-895

-
- Folkman, J. (1992) The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol* 3:65–71
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 137:491-502
- Frankel, MS (2000) In search of stem cell policy. *Science* 298:1397
- Gerlach LO, Jakobsen JS, Jensen KP, Rosenkilde MR, Skerlj RT, Ryde U, Bridger GJ, Schwartz TW (2003) Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* 42:710-717
- Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW (2001) Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 276:14153-14160
- Goldenberg DM, Pavia RA , Tsao MC (1974) In vivo hybridisation of human tumour and normal hamster cells. *Nature* 250:649–651
- Gottesman MM, Ling V (2006) The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* 580:998-1009
- Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J (2006) Changing epidemiology of small cell lung cancer in the United States over the past three decades: Analysis of the surveillance, Epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol* 24:4539-4544
- Gupta GP, Massagué J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679–695
- Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT (2002) Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16220-16225
- Hamburger AW, Salmon SE (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197:461-463
- Hanzal-Bayer MF, Hancock JF (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* 581:2098-2104

Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling cooperate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24:4462-4471

Hartmann TN, Burger M, Burger JA (2004) The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents* 18:126-130

Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* 527:255-262

Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102:3483-3493

Hida K, Klagsbrun M (2005) A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res* 65:2507-2510

Hirsch FR, Matthews MJ, Aisner S, Campobasso O, Elema JD, Gazdar AF, Mackay B, Nasiell M, Shimosato Y, Steele RH (1988) Histopathologic classification of small cell lung cancer: Changing concepts and terminology. *Cancer* 62:973-977

Homey B, Muller A, Zlotnik A (2002) Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature Rev. Immunol* 2:175-184

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306:1568-1571

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13:58-68

Iwasaki Y, Nagata K, Nakanishi M, Natuhara A, Kubota Y, Ueda M, Arimoto T, Hara H (2005) Double-cycle, high-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide followed by peripheral blood stem-cell transplantation for small cell lung cancer. *Chest* 128:2268-2273

Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL (2004) Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351:657-667

Jamieson JC, Wayne S, Belo RS, Wright JA, Spearman MA (1992) The importance of N-linked glycoproteins and dolichyl phosphate synthesis for fusion of L6 myoblasts. *Biochem Cell Biol* 70:408-412

Janzen HW, Millman PA, Thurston OG (1971) Hybrid cells in solid tumors. *Cancer* 27:455-459

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57:43-66

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49

Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J (1999) Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 104:1061-1069

Junker K, Wiethage T, Muller KM (2000) Pathology of small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:361-368

Kang Y, Massagué J (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118:277-279

Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RTE, Jiang WG (2005) The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. *Breast* 14:360-367

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-563

Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R (2002) Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet* 32:594-605

Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rolins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R (2002) Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62:6304-6311

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H (1998) Depletion of epithelia stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genet* 19:1–5

Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23:879-894

Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Inoue M, Nakamura H (2002) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 122:308-317

Lagarde AE, Kerbel RS (1984) Somatic cell hybridization in vivo and in vitro in relation to the metastatic phenotype. *Biochim Biophys Acta* 823:81–110

Larizza L, Schirmacher V (1984) Somatic cell fusion as a source of genetic rearrangement leading to metastatic variants. *Cancer Metastasis Rev* 3:193–222

Lessard J, Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423:255-260

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC (2003) Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102:2728-2730

Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders - how to make it work. *Nat Med* 10:S42-50

Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306:194-196

Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A (1999) Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res* 59:4681-4687

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:622-632

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153:865-873

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9448-9453

McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'shea C, Strappe P, Howard L, Murphy M, Barry F, O'Brien T. (2006) Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev* 15:87-96

Mekler LB (1971) [Hybridization of transformed cells with lymphocytes as 1 of the probable causes of the progression leading to the development of metastatic malignant cells] *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 26:80-89

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 90:1779-1782

Miyamoto T, Suda T (2003) Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 52:1-7

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:24-25

Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE (2002) Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165:6590-6598

Ngo HT, Leleu X, Lee J, Jia X, Melhem M, Runnels J, Moreau AS, Burwick N, Azab AK, Roccaro A, Azab F, Sacco A, Farag M, Sackstein R, Ghobrial IM (2008) SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 112:150-158

Nguyen DX, Massagué J (2003) Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8:341-352

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-110

Okada Y (1962) Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp Cell Res* 26:98-107

O'Malley K, Scott EW (2004) Stem cell fusion confusion. *Exp Hematol* 32:131-134

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-348

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8407-8411

Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napolitano M, Ierano C, Calemme R,

Leonardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuozzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S (2006) Overexpression of both CXCR4 chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-II colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:2795-2803

Paget, S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1:99-101

Pantel K, Alix-Panabières C (2007) The clinical significance of circulating tumor cells. *Nature Clin Pract Oncol* 4:62–63

Pantel K, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4:448-456

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8:329-340

Paragh G, Kertai P, Kovacs P, Paragh G Jr, Fülöp P, Foris G (2003) HMG CoA reductase inhibitor fluvastatin arrests the development of implanted hepatocarcinoma in rats. *Anticancer Res* 23:3949-3954

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3:895-902

Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA (1971) Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J. Natl Cancer Inst* 46:411–422

Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305

Pasini F, Durante E, De Manzoni D, Rosti G, Pelosi G (2002) High-dose chemotherapy in small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 22:3465-3472

Pawelek JM, Chakraborty AK (2008) Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nat Rev Cancer* 8:377-386

Peifer M, Polakis P. (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609

Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283:845-848

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170

Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM (2003) The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1676-1686

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147

Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T (2000) Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106:1331-1339

Poste G, Paruch L (1989) Stephen Paget, M. D., F. R. C. S., (1855–1926): a retrospective. *Cancer Metastasis Rev* 8:93–97

Primakoff P, Myles DG (2007) Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Lett* 581:2174-2180

Rachkovsky M, Sodi S, Chakraborty A, Avissar Y, Bologna J, McNiff JM, Platt J, Bermudes D, Pawelek J (1998) Melanoma x macrophage hybrids with enhanced metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 16:299-312

Redjal N, Chan JA, Segal RA, Kung AL (2006) CXCR4 inhibition synergizes with cytotoxic chemotherapy in gliomas. *Clin Cancer Res* 12:6765-6771

Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434:843-850

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111

Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, Bailey AS, Decker AD, Willenbring H, Grompe M, Fleming WH, Wong MH (2006) Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6321-6325

Rosenkilde MM, Gerlach LO, Hatse S, Skerlj RT, Schols D, Bridger GJ, Schwartz TW (2007) Molecular mechanism of action of monocyclam versus bicyclam non-peptide antagonists in the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 282:27354-27465

Rosenkilde MM, Gerlach LO, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW (2004) Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J Biol Chem* 279:3033-3041

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13513-13518

Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303:1007-1010

Sapir A, Avinoam O, Podbilewicz B, Chernomordik LV (2008) Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence. *Dev Cell* 14:11-21

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180:2581-2587

Savona M, Talpaz M (2008) Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 8:341-350

Scala S, Giuliano P, Ascierto PA, Ierano C, Franco R, Napolitano M, Ottaiano A, Lombardi ML, Luongo M, Simeone E, Castiglia D, Mauro F, De Michele I, Calemma R, Botti G, Caraco C, Nicoletti G, Satriano RA, Castello G (2006) Human melanoma metastases express functional CXCR4. *Clin Cancer Res* 12:2427-2433

Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, Napolitano M, Franco R, Botti G, Castello G (2005) Expression of CXCR4 predicts prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 11:1835-1834

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451:345-349

Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G (2004) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 104:1825-1832

Schols D, Struyf S, Van Damme J, Esté JA, Henson G, De Clercq E (1997) Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* 186:1383-1388

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109:1291-1302

Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argiolu F, Ristaldi MS, Sogos V (2006) Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci* 7:14

Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR (2001) Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61:4961-4965

Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR (2002) Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62:5930-5938

Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, Haslett C (1999) Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5:662-668

Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, Shaikh Z, Goldstraw P (2007) The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:1067-1077

Shepherd FA, Ginsberg RJ, Feld R, Evans WK, Johansen E (1991) Surgical treatment for limited small-cell lung cancer: the University of Toronto Lung Oncology Group experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101:385-393

Sieczkarski SB, Whittaker GR (2005) Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:1-23

Sieweke MH, Thompson NL, Sporn MB, Bissell MJ (1990) Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta. *Science* 248:1656-1660

Simon G, Ginsberg RJ, Ruckdeschel JC (2001) Small-cell lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 11:165-188

Simon GR, Turrisi A, American College of Chest Physicians (2007) Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132:324S-339S

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39

Simons K, van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27:6197-6202

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker GD (2004) CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64:8604-8612

Spigel DR, Hainsworth JD, Simons L, Meng C, Burris HA 3rd, Yardley DA, Grapski R, Schreeder M, Mallidi PV, Greco FA; Minnie Pearl Cancer Research Network (2007) Irinotecan, carboplatin, and imatinib in untreated extensive-stage small-cell lung cancer: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Thorac Oncol* 2:854-861

Srivastava D, Ivey KN (2006) Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature* 441:1097-1099

Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62:3603-3608

Stupp R, Monnerat C, Turrisi AT 3rd, Perry MC, Leyvraz S (2004) Small cell lung cancer: State of the art and future perspectives. *Lung Cancer* 45:105-117

Sundstrom S, Bremnes RM, Kaasa S, Aasebo U, Hatlevoll R, Dahle R, Boye N, Wang M, Vigander T, Vilsvik J, Skovlund E, Hannisdal E, Aamdal S (2002) Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *J Clin Oncol* 20:4665-4672

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393:591-594

Taipale J, Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411:349-354

-
- Taylor MV (2002) Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol* 12:R224-228
- Teissier E, Pécheur EI (2007) Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur Biophys J* 36:887-99
- Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638-649
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-454
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147
- Trent JO, Wang ZX, Murray JL, Shao W, Tamamura H, Fujii N, Peiper SC (2003) Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists. *J Biol Chem* 278:47136-47144
- van de Wouw AJ, Jansen RL, Speel E J, Hillen HF (2003) The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review. *Ann. Oncol* 14:191-196
- Vianello F, Papeta N, Chen T, Kraft P, White N, Hart WK, Kircher MF, Swart E, Rhee S, Palu G, Irimia D, Toner M, Weissleder R, Poznansky MC (2006) Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *J Immunol* 176:2902-2914
- Vicari AP, Ait-Yahia S, Chemin K, Mueller A, Zlotnik A, Caux C (2000) Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol* 165:1992-2000
- Vignery A (2000) Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81:291-304

Wakeling WF, Greetham J, Bennett DC (1994) Efficient spontaneous fusion between some co-cultured cells, especially murine melanoma cells. *Cell Biol. Int* 18:207–210

Wang JM, Deng X, Gong W, Su S (1998) Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 220:1-17

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901

Warde P, Payne D (1992) Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol* 10:890-895

Warner TF (1975) Cell hybridization: an explanation for the phenotypic diversity of certain tumours. *Med Hypotheses* 1:51–57

Watanabe M, Matsuyama W, Shirahama Y, Mitsuyama H, Oonakahara K, Noma S, Higashimoto I, Osame M, Arimura K (2007) Dual effect of AMD3100, a CXCR4 antagonist, on bleomycin-induced lung inflammation. *J Immunol* 178:5888-5898

Weiss L (1992) Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin. Exp. Metastasis* 10:191–199

Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M (2004) Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nature Med* 10:744-748

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448-452

Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ (1987) Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316:1435-1440

Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2005) Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 36:840-853

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80:1529–1537

Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I (2006) Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* 66:2181-2187

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545-548

Zetter BR (1990) The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med* 322:605-612

Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7:1028-1034

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393:595-599

VIII. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Schumacher für die freundliche Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für zahllose Anregungen und Überlegungen zum Gegenstand dieser Arbeit.

Herrn A. Düsedau danke ich für die Anleitung und Betreuung der FACS-Versuche und für seine Geduld.

Herrn Dr. R. Müller danke ich für die Anleitung und Betreuung der Versuche mit dem Laser Scanning Cytometer.

Frau Dr. C. Lange danke ich für die freundliche Überlassung der mesenchymalen Stammzelllinien.

Herrn Prof. Dr. U. Zangemeister-Wittke danke ich für die freundliche Überlassung der Bronchialkarzinomzelllinien.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der Laborarbeiten bedanke ich mich bei Frau Susanne Feldhaus, Frau Renate Gehrke und Herrn Klaus Siebert.

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten

Thorsten Derlin,
geb. am 10.02.1981 in Hamburg

Schulbildung

1987-1991 Grundschule Mühlenredder, Reinbek
1991-2000 Sachsenwaldschule Gymnasium Reinbek
Juni 2000 Abitur

Hochschulstudium

2000-2001 Studium der Rechtswissenschaften, Universität Hamburg
seit 2001 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
2003 Ärztliche Vorprüfung
2006-2007 Praktisches Jahr
2007 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Januar 2008 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für
Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

X. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Thorsten Derlin