

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereiches der Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin,
angefertigt in der Abteilung Experimentelle Onkologie
der Firma Schering AG Berlin**

Antiestrogene und Endometriumkarzinome

**Effekte von Antiestrogenen auf Tumorwachstum und Expression von
Estrogen-, Progesteron- und epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren**

in vitro und *in vivo*

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Cynthia Obodozie
Tierärztin aus Hannover**

**Berlin 2002
Journal - Nr.: 2679**

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches der Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Dekan: Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter: PD Dr. R. Scherkl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. R. Schneider
Dritter Gutachter: Prof. Dr. R. Rudolph**

Tag der Promotion: 7. März 2003

Meiner Mama

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
<i>A.1</i>	<i>Hormonelle Therapie maligner Tumore</i>	<i>1</i>
A.1.1	Grundlagen und Prinzipien hormoneller Therapien	1
A.1.2	Therapeutische Interventionen beim Mammakarzinom	1
<i>A.2</i>	<i>Endometriumkarzinome</i>	<i>4</i>
A.2.1	Allgemeine Bedeutung und Therapieformen von Endometriumkarzinomen	4
A.2.2	Antiestrogene zur Behandlung von Endometriumkarzinomen	5
<i>A.3</i>	<i>Problemstellung</i>	<i>6</i>
B	Literatur	7
<i>B.1</i>	<i>Der Estrogenrezeptor</i>	<i>7</i>
B.1.1	Aufbau des Estrogenrezeptors	7
B.1.2	Wirkungsmechanismus des aktivierten Estrogenrezeptors	8
<i>B.2</i>	<i>Estrogenrezeptor-Liganden</i>	<i>10</i>
B.2.1	Estrogene — endogene Liganden des Estrogenrezeptors	10
B.2.2	Antiestrogene — exogene Liganden des Estrogenrezeptors	11
<i>B.3</i>	<i>Expression von Estrogen-, Progesteron- und epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in endometrialen Adenokarzinomzellen</i>	<i>15</i>
B.3.1	Regulation der Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren in endometrialen Zellen	15
B.3.2	Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in endometrialen Zellen	17
<i>B.4</i>	<i>Zellwachstum und Zelltod</i>	<i>18</i>
B.4.1	Grundlagen, Regulation und Beeinflussung des Zellzykluses	18
B.4.2	Ursachen der Entwicklung einer Apoptose in Zellen	19
<i>B.5</i>	<i>Testmodelle</i>	<i>20</i>
B.5.1	Endometriumkarzinom-Zelllinien	20
B.5.2	<i>In vitro</i> -Proliferationstest	21
B.5.3	<i>In vivo</i> -Testmodelle	21

C	Material und Methoden	23
<i>C.1</i>	<i>IN VITRO-Tumorzellwachstum</i>	23
C.1.1	Material und Geräte	23
C.1.2	Zelllinien und allgemeine <i>in vitro</i> -Kulturbedingungen	25
C.1.3	<i>In vitro</i> -Proliferationstest für endometriale Adenokarzinomzellen	27
C.1.4	Auswertung und Statistik des <i>in vitro</i> -Proliferationstests für endometriale Adenokarzinomzellen	28
<i>C.2</i>	<i>IN VIVO-Tumorstwachstumsmodelle</i>	30
C.2.1	Material und Geräte	30
C.2.2	Tiere, Haltung und Fütterung	31
C.2.3	Tumormodelle zur Untersuchung der Proliferation von endometrialen Adenokarzinomzellen <i>in vivo</i>	31
C.2.4	Auswertung und Statistik der Tumormodelle für endometriale Adenokarzinomzellen <i>in vivo</i>	33
<i>C.3</i>	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	33
C.3.1	Material und Geräte	33
C.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes von Zellen oder Tumorgewebsstücken	35
C.3.3	Bestimmung des Estrogen- und Progesteronrezeptorgehaltes in Tumorzellen oder -geweben	36
C.3.4	Bestimmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Gehaltes in Tumorzellen	38
C.3.5	Bestimmung der Cyclin D1- und p21-Expression in Tumorzellen	39
C.3.6	Auswertung und Statistik proteinbiochemischer Methoden	41
<i>C.4</i>	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	42
C.4.1	Material und Geräte	42
C.4.2	Bestimmung der Zellverteilung einzelner Proben auf verschiedene Zellzyklusstadien	42
C.4.3	Auswertung und Statistik molekularbiologischer Methoden	43
<i>C.5</i>	<i>Pathohistologische Methoden</i>	44
C.5.1	Material und Geräte	44
C.5.2	Gewinnung, Aufarbeitung und Vorbereitung der mikroskopischen Schnitte des Tumormaterials endometrialer Adenokarzinomzellen	45
C.5.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Tumorgewebschnitten	45

C.5.4	Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebschnitten	46
C.5.5	Nachweis von Apoptosen in histologischen Tumorgewebschnitten	47
C.5.6	Auswertung und Statistik pathohistologischer Methoden	48
D	Ergebnisse	49
D.1	<i>IN VITRO-Studien</i>	49
D.1.1	Etablierung des <i>in vitro</i> -Proliferationstests an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7	49
D.1.2	Wachstumskurven der Endometriumkarzinomzelllinien zur Bestimmung der Zellzahl	52
D.1.3	Hormonsensitivität und Estrogenrezeptor-Expression von Endometriumkarzinomzellen	53
D.1.4	Stimulierung der Proliferation von Endometriumkarzinomzelllinien durch Estradiol	55
D.1.5	Inhibierung der estrogenstimulierten Proliferation von Endometriumkarzinomzellen durch Antiestrogene	56
D.2	<i>IN VIVO – Studien</i>	59
D.2.1	Wachstum von Endometriumkarzinomen in estrogensupplementierten SCID Mäusen	59
D.2.2	Inhibition des Wachstums von Endometriumkarzinomen durch Antiestrogene in estrogensupplementierten und tamoxifenbehandelten SCID Mäusen	63
D.2.3	Histologische Untersuchung der Endometriumkarzinome aus den <i>in vivo</i> -Experimenten	67
D.3	<i>Wirkungsmechanismus reiner Antiestrogene in Endometriumkarzinomzellen</i>	72
D.3.1	Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Antiestrogene in den endometrialen Tumoren aus den <i>in vivo</i> -Versuchen	72
D.3.2	Untersuchung des Zellzyklusses in endometrialen Adenokarzinomzellen nach Stimulation mit reinen Antiestrogenen	73
D.3.3	Bestimmung der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin D1 und p21 in den ER-positiven endometrialen Adenokarzinomzellen	77
D.4	<i>Wirkung reiner Antiestrogene auf die Expression von Estrogen-, Progesteron- und epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in endometrialen Adenokarzinomzellen</i>	78

D.4.1	Nachweis der Estrogenrezeptor-Destabilisierung durch Antiestrogene in den endometrialen Adenokarzinomen der ER-positiven Zelllinien Ishikawa und ECC-1	79
D.4.2	Wirkung reiner Antiestrogene auf die Progesteronrezeptor-Expression in endometrialen Adenokarzinomen	86
D.4.3	Wirkung reiner Antiestrogene auf die Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in endometrialen Adenokarzinomen	91
E	Diskussion	93
E.1	<i>Diskussion</i>	93
E.1.1	Vergleich von AlamarBlue und Kristallviolett zur Messung der Zellproliferation	93
E.1.2	Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den Endometriumkarzinomen	94
E.1.3	Expression der zellzyklusrelevanten Proteine Cyclin D1 und p21 in endometrialen Adenokarzinomzellen nach Behandlung mit reinen Antiestrogenen	95
E.2	<i>Ergebnisdiskussion</i>	96
E.2.1	Estrogenstimulierte und antiestrogeninhibierte Proliferation von humanen Endometriumkarzinomen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	96
E.2.2	Pathologisch-histologische Veränderungen der Tumore nach Antiestrogenbehandlung	101
E.2.3	Wirkungsmechanismus reiner Antiestrogene in Endometriumkarzinomen	102
E.2.4	Effekte von Estrogen auf die Regulation von Estrogen- und Progesteronrezeptor-Expression in endometrialen Adenokarzinomen	104
E.2.5	Reine Antiestrogene als selektive Estrogenrezeptor-Destabilisatoren in endometrialen Adenokarzinomen	105
E.2.6	Expression des Progesteronrezeptors nach Antiestrogenbehandlung in endometrialen Adenokarzinomen	106
E.2.7	Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors nach Antiestrogenbehandlung in endometrialen Adenokarzinomen	108
F	Zusammenfassung	110
F.1	<i>Summary</i>	113
G	Literaturverzeichnis	115

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Therapeutische, hormonelle Interventionen beim Mammakarzinom	3
Abb.2 Funktionelle Domänen (A-F) des humanen Estrogenrezeptors	8
Abb.3 Wirkungsmechanismus des estradiol(E ₂)-bedingten Wachstums einer Tumorzelle	9
Abb.4 Strukturformeln der ineinander umwandelbaren Estrogene Estradiol und Estron	10
Abb.5 Strukturformel des synthetischen Ethinylestradiols	10
Abb.6 Strukturformeln der nichtsteroidalen, partialagonistischen Antiestrogene Tamoxifen und Raloxifen	12
Abb.7 Strukturformeln der steroidalen, reinen Antiestrogene ZK 191703 und ICI 182,780	14
Abb.8 Regulation der Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren (ER, PgR) in endometrialen Zellen innerhalb des Menstruationszyklus	16
Abb.9 Akkumulation der zyklisch exprimierten Cycline in einer Zelle	18
Abb.10 Stimulierung der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durch Estradiol (E ₂)	50
Abb.11 Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen MCF-7 durch ZK 191703	52
Abb.12 Charakterisierung der Endometriumkarzinom-Zelllinien in Bezug auf eine Estrogenrezeptor-Expression	54
Abb.13 Estrogenrezeptor-Expression in Ishikawazellen unter modifizierten Kulturbedingungen	55
Abb.14 Effekte verschiedener Estradiolkonzentrationen auf die Proliferation humaner Endometriumkarzinomzellen.	56
Abb.15 Effekte verschiedener Antiestrogen-Konzentrationen auf die Proliferation humaner, estrogenstimulierter Endometriumkarzinomzellen.	58
Abb.16 Das Wachstum von Ishikawatumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifensupplementierten SCID Mäusen	59
Abb.17 Das Wachstum von ECC-1-Tumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifensupplementierten SCID Mäusen	60
Abb.18 Das Wachstum von MFE-296- und MFE-280-Tumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifensupplementierten SCID Mäusen	61
Abb.19 Expression der Estrogenrezeptoren in den <i>in vivo</i> -Tumoren von Ishikawa- und ECC-1-Zellen	62
Abb.20 Expression der Estrogenrezeptoren in den <i>in vivo</i> -Tumoren von MFE-296- und MFE-280-Zellen	63

Abb.21 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine und partialagonistische Antiestrogene in den Endometriumkarzinommodellen Ishikawa und ECC-1	65
Abb.22 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine Antiestrogene im Endometriumkarzinommodell MFE-280	66
Abb.23 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine Antiestrogene verschiedener Dosierungen im Endometriumkarzinommodell Ishikawa	66
Abb.24 Hemmung der tamoxifenstimulierten Tumorproliferation durch reine und partialagonistische Antiestrogene im Endometriumkarzinommodell Ishikawa	67
Abb.25 Tumorzellen/Stroma-Verhältnis von Tumoren Estrogenrezeptor-negativer, endometrialer Adenokarzinom-Zelllinien	69
Abb.26 Tumorzellen/Stroma-Verhältnis von Tumoren Estrogenrezeptor-positiver, endometrialer Adenokarzinom-Zelllinien	70
Abb.27 Differenzierungsgrad in Tumoren der Zelllinie ECC-1, etabliert aus einem humanen, endometrialen Adenokarzinom	71
Abb.28 Zellzyklusanalyse in Ishikawazellen	75
Abb.29 Zellzyklusanalyse in ECC-1-Zellen	76
Abb.30 Apoptosephase der Zellzyklusanalyse in ECC-1-Zellen	77
Abb.31 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawa- und ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	80
Abb.32 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawa- und ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	81
Abb.33 Expression der Estrogenrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen ohne Estradiol	82
Abb.34 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawatumoren	83
Abb.35 Expression der Estrogenrezeptoren alpha ($ER\alpha$) in Tumoren der Zelllinie Ishikawa	84
Abb.36 Expression der Estrogenrezeptoren in ECC-1-Tumoren	85
Abb.37 Expression der Progesteronrezeptoren in Ishikawazellen bei Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	86
Abb.38 Expression der Progesteronrezeptoren in Ishikawazellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	87

Abb.39 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen bei Inkubation mit reinen AE verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	88
Abb.40 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	89
Abb.41 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen ohne Estradiol	89
Abb.42 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Tumoren	90
Abb.43 Expression der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Ishikawazellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	92
Abb.44 Expression der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10^{-10} M Estradiol	92

Tabellenverzeichnis

Tab.1 Periphere Wirkungen von Antiestrogenen im Vergleich zu Estrogenen (modifiziert nach Holst 2000)	13
Tab.2 Humane Endometrium-Adenokarzinomzelllinien, ihre Herkunft und <i>in vitro</i> -Kulturbedingungen	25
Tab.3 Prozentuale Wachstumsraten der estradiolstimulierten Proliferation von Mammakarzinomzellen MCF-7	50
Tab.4 Optimale Zellzahl pro Loch einer 96-Lochplatte für Proliferationsversuche mit Endometriumkarzinom-Zelllinien	53
Tab.5 Apoptotische Zellen/1000 Tumorzellen in histologischen Tumorschnitten aus den Zelllinien ECC-1, Ishikawa und MFE-280 einzelner Versuchsgruppen	73
Tab.6 <i>In vitro</i> -Expression der Estrogen(ER)-, Progesteron(PgR)- und Epidermalen Wachstumsfaktor(EGFR)-Rezeptoren in humanen, endometrialen Adenokarzinomzelllinien unter Standardbedingungen (Median)	78

Abkürzungsverzeichnis

AE	Antiestrogen(e)
AF	transkriptionale Aktivierungsfunktion
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinolinsäure
CCS	<i>charcoal stripped</i> FCS
cdK	cyclin-abhängige Kinasen
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E ₂	17β-Estradiol
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermale(r) Wachstumsfaktor Rezeptor(en)
EGTA	Glycoetherdiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ER	Estrogenrezeptor(en)
ERE	<i>estrogen response elements</i>
ETOH	Ethanol absolut
FACS	<i>Fluorescent attended cell sorting</i>
FCS	fetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IC ₅₀	50%-Wachstumshemmung
ITS	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit
KG	Körpergewicht
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
n	Probenzahl pro Versuchsgruppe
OD	optische Dichte
p	Pellet
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>

PgR	Progesteronrezeptor(en)
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
POD	Peroxidase
RH	Releasing Hormon(e)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERD	selektive(r) Estrogenrezeptor-Destabilisator(en)
SERM	selektive(r) Estrogenrezeptor-Modulator(en)
SL	Stammlösung
SPF	spezifisch pathogen frei
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TGF α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TSV	Tumorzellen/Stroma-Verhältnis
TUNEL	TdT vermittelte Nukleotid-Endanlagerung
UTP	Uridintriphosphat
VE-Wasser	vorentsalztes Wasser

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jens Hoffmann. Er gab mir dieses interessante Thema und ermöglichte mir das eigenständige Arbeiten innerhalb seiner Arbeitsgruppe. Er war stets bereit, mir mit guten Ratschlägen, Anregungen und Diskussionen beiseite zu stehen.

Herrn Prof. Dr. M. R. Schneider und Herrn Dr. K. Bosslet danke ich dafür, daß ich in der Onkologischen Abteilung meine Arbeit durchführen durfte. Beide waren gern bereit, für Diskussionen und kritische Durchsichten meiner Arbeiten Zeit zu investieren.

Frau Dr. R. Lichtner danke ich für ihre Ratschläge und Literaturtips hinsichtlich zellkultureller und proteinbiochemischer Arbeiten.

Bei Herrn Dr. R. Vonk und Herrn Dr. Harald Nusser möchte ich mich herzlich für die intensiven Gespräche über statistische Auswertungen in der Forschung bedanken.

Herrn PD Dr. R. Scherkl und Herrn Prof. Dr. R. Rudolph danke ich für ihre Betreuung meiner Arbeit seitens der Freien Universität Berlin.

Frau Marianne Bahr und Herrn Manfred Leidecker möchte ich ganz besonders herzlich danken: für die Einarbeitung sowohl in vitro als auch in vivo, für ihre sachkundige Hilfe, zuverlässige Unterstützung, produktiven Ratschläge und Diskussionen, aber auch für die motivierenden und stützenden Gespräche. Ich danke für das gute und harmonische Arbeitsklima in unserem Labor. Ich werde diese Phase meines Lebens als sehr schöne Zeit immer im Gedächtnis behalten.

Frau Sigrun Wellershoff, Herrn Andreas Jung, Herrn Willi Ebel, Herrn Henk Zimmermann und Frau Lucienne Konrath sowie allen anderen namentlich hier nicht erwähnten Mitarbeitern(innen) der Onkologischen Abteilung, der Toxikologie

und der FKHT möchte ich ebenso herzlich für ihre Ratschläge und Unterstützung danken.

Privat bedanke ich mich bei Holger, meiner Mutter und meinen Freunden für ihre fortwährende Geduld und Treue in dieser arbeitsintensiven Zeit.

Ich danke der Schering AG, Berlin für die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Cynthia Obodozie
Geburtsdatum 07. November 1970
Geburtsort Hannover
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Ausbildung

Schule:

Sept. 1977 – Juli 1981 Paul-Simmel-Grundschule, Berlin
Sept. 1981 – Juni 1990 Gymnasium Steglitz, Berlin
Abschluss Abitur

Studium:

Okt. 1992 – Jan. 1999 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
Abschluss Approbation als Tierärztin

Praktika:

Jan. 1988 Kleintierpraxis, Berlin
Juni 1992 Gemischtpraxis, Kenia
Juli 1996 – Aug. 1996 Kleintierpraxis, Berlin
Sept. 1996 Großtierpraxis, bei Bremen
Okt. 1997 – Dez. 1997 Kleintierpraxis, Berlin
Jan. 1998 – Febr. 1998 Großtierpraxis, bei Bremen
wissenschaftlich orientiert
März 1998 – April 1998 Schering AG, Abteilung Allgemeine Pharmakologie unter Frau Dr. F. McDonald

Promotion

Mai 1999 – Sept. 2001 „*Untersuchung der Wachstumshemmung von Endometriumkarzinomen durch Antiöstrogene*“ in der Experimentellen Onkologie der Schering AG Berlin

Etappen der Promotionsarbeit

Mai 1999 – Mai 2000 *in vitro* Assays zur Proliferationshemmung

Febr. 2000 – Febr. 2001	<i>in vivo</i> Assays zur Proliferationshemmung
Juli 1999 – April 2001	Enzymimmunoassays für ER und PgR
Nov. 2000 – April 2001	Histologische Methoden (HE, Ki-67, ER α , Apoptose)
März 2001 – Mai 2001	Enzymimmunoassay für EGFR
März 2001 – Juni 2001	Durchflußzytometrie (Zellzyklus)
April 2001 – Juni 2001	Westernblotanalyse (Cyclin D1, p21)

Fortbildung

Juni 2001	Weiterbildung „ <i>Versuchstierkundliche Grundlagen und tierexperimentelle Methoden</i> “, Heidelberg
-----------	---

Berufliche Tätigkeiten

ab Oktober 2001	wissenschaftliche Angestellte in der KTB Tumorforschungs GmbH, Abteilung Vaskuläre Biologie und Angiogeneseforschung, Freiburg
-----------------	--

Ich versichere, alle Arbeiten selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln durchgeführt zu haben.

Die Tierversuche wurden gemäß des nationalen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 und der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes vom 09.02.2000 vor dem Hintergrund der Richtlinien des Rates der Europäischen Union vom 24.11.1986 ausgeführt.

Freiburg, den 18.10.2002

Cynthia Obodozie