

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**In-vitro Untersuchungen zum Glioblastom-induzierten
Tropismus und zur Migrationsfähigkeit humaner mesenchymaler
Progenitorzellen des Knochenmarks**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Julia Roider
aus Rosenheim

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Straube

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Friedrich-Wilhelm Kreth

Prof. Dr. med. Andreas Nerlich

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Tobias Birnbaum

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Ziele der Arbeit	6
1.2	Glioblastom.....	8
1.2.1	Epidemiologie.....	8
1.2.2	Ätiologie	8
1.2.3	Histologie	8
1.2.4	Klinik.....	10
1.2.5	Therapie und Prognose.....	10
1.2.5.1	Chirurgische Therapie.....	10
1.2.5.2	Strahlentherapie.....	11
1.2.5.3	Chemotherapie	11
1.2.5.4	Lokale Therapieverfahren	12
1.2.5.5	Probleme der konventionellen Therapie	13
1.2.5.6	Experimentelle Therapiekonzepte.....	14
1.2.5.6.1	„Targeted“-Therapie	14
1.2.5.6.2	Hemmung der Angiogenese	15
1.2.5.6.3	Lokale Immuntherapie	15
1.2.5.6.4	Gentherapie.....	16
1.3	Stammzellen.....	17
1.3.1	Neurale Stammzellen in der Therapie des Glioblastoms.....	17
1.3.2	Humane mesenchymale Progenitorzellen des Knochenmarks in der Therapie des Glioblastoms.....	19
1.4	Chemokine	21
1.4.1	Interleukin-8	22

1.4.2	Transforming Growth Factor Beta 1 und Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor.....	23
1.4.3	Epidermal Growth Factor	23
1.4.4	Platelet-derived Growth Factor.....	24
1.4.5	Neurotrophin-3 und Brain-derived Neurotrophic Factor.....	24
1.4.6	Human Ciliary Neurotrophic Factor	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Zellen.....	26
2.1.1	Zellkultur.....	26
2.1.2	Gewinnung und Isolierung der hMSC.....	29
2.1.3	Gewinnung von glioblastomkonditioniertem Medium	31
2.2	Fluorescence Activated Cell Sorting-Analyse	32
2.3	Migrationsassay.....	33
2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	37
2.5	Immunfluoreszenzfärbung	39
2.6	Statistik	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Charakterisierung der hMSC	42
3.2	Migration der hMSC.....	44
3.2.1	Identifizierung der Kandidatenchemokine	44
3.2.2	Konzentrationsabhängige Migration der hMSC.....	46
3.2.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	48
3.2.4	ELISA.....	50
3.2.5	Neutralisationsversuche	50
4	Diskussion.....	55

5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
7	Anhang.....	81
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	81
7.2	Abbildungsverzeichnis	83
7.3	Tabellenverzeichnis	84
8	Danksagung.....	85

1 Einleitung

1.1 Ziele der Arbeit

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste maligne hirneigene Tumor beim Erwachsenen. Wegen seiner ausgeprägten Invasivität und Aggressivität ist seine Prognose infaust. Konventionelle Therapiekonzepte wie Operation, Radiatio und Chemotherapie bewirken nur eine marginale Verlängerung der Überlebenszeit. Daher sucht man derzeit nach neuen Therapieansätzen wie beispielsweise der zellbasierten Gentherapie. Hierbei soll das Glioblastom zusätzlich zur konventionellen Therapie mit Hilfe gentechnisch veränderter zellulärer Vektoren lokal bekämpft werden.

Vielversprechende Kandidaten für eine zellbasierte Gentherapie des Glioblastoms sind die humanen mesenchymalen Progenitorzellen des Knochenmarks (hMSC). Sie zeigen *in-vitro* und *in-vivo* einen ausgeprägten glioblastom-induzierten Tropismus. Zudem sind sie einfach in der Handhabung, weil sie leicht zu gewinnen, in Kultur zu vervielfältigen und anschließend autolog zu transplantieren sind. Die Hintergründe der gezielten Migration und die biologischen Wechselwirkungen zwischen hMSC und Glioblastomzellen sind bislang allerdings kaum verstanden. Die Kenntnis dieser Wechselwirkungen ist aber essentielle Voraussetzung für die zukünftige Verwendung von hMSC als therapeutische Vektoren beim Menschen.

In Vorarbeiten konnte bereits die migrationsfördernde Wirkung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) auf hMSC nachgewiesen werden (Schichor et al., 2006). Die promigratorische Wirkung von VEGF-A alleine war aber um einiges schwächer als die von glioblastomkonditioniertem Medium. Deshalb schlussfolgerten wir, dass an der Vermittlung der glioblastomgerichteten Migration der hMSC noch andere Chemokine beteiligt sein müssen. Mit vorliegender Arbeit sollen deshalb jene von den Glioblastomen produzierten Chemokine, welche

(neben VEGF-A) einen migrationsfördernden Effekt auf hMSC haben, identifiziert werden.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden folgenden Untersuchungen durchgeführt:

- Migrationsassays mit der Boyden Kammer, wobei zunächst einige bekannte glioblastomassoziierte Kandidaten (Interleukin-8, Neurotrophin-3, Transforming Growth Factor Beta 1, Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor, Epidermal Growth Factor, Platelet-derived Growth Factor, Brain-derived Neurotrophic Factor, Human Ciliary Neurotrophic Factor) auf ihre migrationsfördernde Wirkung auf hMSC getestet wurden,
- Migrationsassays mit der Boyden Kammer, wobei die in Schritt 1 positiv getesteten Chemokine im glioblastomkonditioniertem Medium durch Zusatz spezifischer Antikörper neutralisiert wurden, um die funktionelle Bedeutung dieser Chemokine für die glioblastomgerichtete Migration zu beweisen,
- Nachweis der Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der hMSC mittels Immunfluoreszenzfärbungen,
- Quantifikation der Sekretion der entsprechenden Chemokine durch die Glioblastomzellen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Identifizierung der am glioblastominduzierten Tropismus beteiligten Chemokine ist ein wichtiger Schritt hin zur Etablierung zellbasierter Strategien in der Therapie des Glioblastoms. In Kombination mit bewährten Therapieschemata soll dies zukünftig zu einem längeren Überleben der an Glioblastom erkrankten Patienten führen.

1.2 Glioblastom

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz intrakranieller Tumore in Deutschland beträgt bei Männern etwa 3500 und bei Frauen etwa 2900 pro Jahr (Becker et al., 1997). Das Glioblastom hat daran einen Anteil von 22.6% (Davis et al., 1999). Damit ist das Glioblastom bei Erwachsenen der häufigste hirneigene maligne Hirntumor. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 50 und 70 Jahren (Remmele et al., 1995).

1.2.2 Ätiologie

Ätiologisch kann man die Glioblastome in drei Gruppen unterteilen. Von der hereditären Form werden die primäre und die sekundäre Form unterschieden. Während die primäre Form sich de novo entwickelt, entsteht das sekundäre Glioblastom aus einem bereits vorhandenen, niedrigmalignen Gliom. Am häufigsten ist hierbei die Entstehung eines Glioblastoms aus einem Astrozytom. Seltener kann man auch die sekundäre Malignisierung eines Oligodendroglioms beobachten (Schlegel et al., 2001). Manche Autoren beschreiben auch die Entwicklung eines Glioblastoms aus einem Ependymom (Burger, 1990).

1.2.3 Histologie

Das Glioblastom gehört zur Gruppe der Gliome. Diese Gruppe wird je nach Ursprungsgewebe weiter unterteilt in eine astrozytäre, eine oligodendrozytäre und eine ependymale Reihe sowie Mischformen hieraus. Nach der derzeit gültigen WHO-Klassifikation für intrakranielle Tumore werden die Gliome zusammen mit den anderen Tumoren neuronaler Herkunft unter dem Überbegriff „Tumore des neuroepithelialen Gewebes“ zusammengefasst. In der histologischen Gradierung

kann man niedrigmaligne Gliome (WHO Grad I und II) von der anaplastischen Form (WHO Grad III) abgrenzen. Das hochmaligne Glioblastom entspricht dem WHO Grad IV und wird der astrozytären Reihe zugeordnet (Kleihues et al., 2002). Hierbei ist das wichtigste Unterscheidungskriterium zu einem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) die flächenhafte Nekrose des Tumors. Außerdem findet man eine sogenannte „bunte Schnittfläche“ mit Zysten, Blutungen und Tumorerfallshöhlen, die ihm auch die Bezeichnung „Glioblastoma multiforme“ eingebracht hat. Die Gruppe der Glioblastome kann man laut WHO-Klassifikation in die Varianten Riesenzellglioblastom, kleinzelliges Glioblastom, Gliosarkom und Glioblastom mit sarkomatöser Komponente unterteilen. Histologisch kann man das seltene Rundzellglioblastom von der fusiformen und der multiformen Form abgrenzen (Zülch et al., 1986).

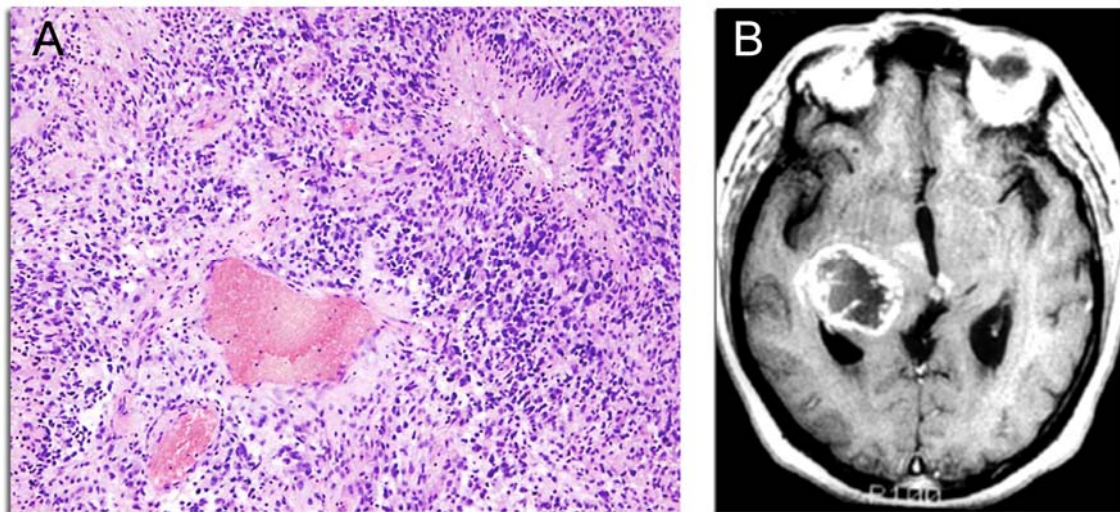


Abbildung 1: Glioblastom (Astrozytom) WHO Grad IV. Histologisches Präparat mit typischen strichförmigen Nekrosen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)(A). MRT transversale Schnittführung, nach Kontrastmittel (B).

1.2.4 Klinik

Klinisch ist die Gruppe der Glioblastome gut von anderen Hirntumoren abzugrenzen. Dies liegt an ihrem raschen Größenwachstum mit konsekutiv fortschreitender Hirndrucksteigerung und den dadurch bedingten typischen Symptomen wie Persönlichkeitsverfall und schließlich Bewusstseinsstrübung bis zum Koma. Als Frühsymptomatik können epileptische Anfälle auftreten. Später kommen dann frühmorgendlicher Kopfschmerz begleitet von Übelkeit und Erbrechen sowie fokale Symptome wie Paresen, Sehstörungen oder Aphasien hinzu (Berghoff et al., 1962).

1.2.5 Therapie und Prognose

Unbehandelt hat das Glioblastom eine Prognose im Bereich von wenigen Wochen. Derzeitiger Standard bei der Behandlung eines Glioblastoms ist die möglichst vollständige Resektion des kontrastmittelaufnehmenden Tumors mit nachfolgender Strahlentherapie und konkomitanter sowie adjuvanter Therapie mit Temozolomid, einem neuen Imidazotetrazin-Derivat. Unter dieser kombinierten Behandlung wird eine Steigerung der 2-Jahres-Überlebensrate auf 26% im Vergleich zu 10% bei alleiniger Strahlentherapie erreicht. Die mediane Überlebenszeit beträgt 15 versus 12 Monate, das progressionsfreie Überleben 7.2 versus 5 Monate (Stupp et al., 2005).

1.2.5.1 Chirurgische Therapie

Die Bedeutung der operativen Radikalität für die Prognose des Glioblastoms gehört zu den fortdauernden Kontroversen der chirurgischen Neuroonkologie. Nach neuer Studienlage ist die radikale makroskopische Komplettresektion des Tumors die Therapie der ersten Wahl (Stummer et al., 2002). Durch Anwendung neuer Verfahren wie der intraoperativen Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure kann intraoperativ das Glioblastomgewebe besser sichtbar

gemacht und gezielt reseziert werden (Stummer et al., 2000). Trotz dieser und anderer etablierter Techniken wie Neuronavigation oder kortikaler Stimulation wird bei dem Versuch, den Tumor vollständig zu resezieren, jedoch auch immer gesundes Gewebe geschädigt. Potentielle neurologische Ausfälle, vor allem wenn sie Werkzeugleistungen betreffen, beschränken deshalb die operative Radikalität (AWMF-Leitlinien, 2005).

1.2.5.2 Strahlentherapie

Die adjuvante Strahlentherapie in Dosierungen von 54 - 60 Gy, nach Möglichkeit 60 Gy (1.8 - 2 Gy-Fraktionen), gehört zur Standardtherapie des Glioblastoms (Laperriere et al., 2002). Zielvolumenkonzept, Bestrahlungstechnik, Gesamtdosis und Fraktionierung werden im Wesentlichen durch die Ausbreitungscharakteristik des Tumors, die Dosiswirkungsbeziehung des Glioblastomgewebes sowie die Strahlenempfindlichkeit benachbarter Risikostrukturen bestimmt. Die Therapie erfolgt perkutan mit Hilfe individuell angepasster Maskenfixationssysteme, um die Reproduzierbarkeit und Positioniergenauigkeit der Bestrahlungsfelder zu erhöhen (Kortmann et al., 1998). Die Verlängerung der medianen Überlebenszeit durch diese Therapie beträgt etwa sechs Monate (AWMF-Leitlinien, 2005). Bei älteren Patienten kann eine akzelerierte hypofraktionierte Strahlentherapie mit 30 - 45 Gy in 3 Gy-Fraktionen erfolgen. Diese palliative Strategie führt zu einer verkürzten Behandlungsdauer der Patienten.

1.2.5.3 Chemotherapie

Die Chemotherapie hat lange Zeit eine untergeordnete Rolle in der Behandlung des Glioblastoms gespielt. Auch durch verschiedenste Schemata, welche vor allem in der Rezidivtherapie eingesetzt wurden, konnte jeweils nur eine marginale Verlängerung der medianen Überlebenszeit erreicht werden. Bisher dominierten die Nitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU, CCNU) aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit und

wurden vor allem in der multimodalen Rezidivtherapie angewendet. So zum Beispiel das PCV-Schema mit Procarbazin 60mg/m² p.o. D8 - D21, CCNU 110mg/m² p.o. D1 und Vincristin 1.4mg/m² i.v. D8 und D29 für sechs bis acht Wochen (AWMF-Leitlinien, 2005).

Nach neuester Studienlage wird eine begleitende und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid zusätzlich zur Strahlentherapie als Primärtherapie des Glioblastoms empfohlen. Als Schema hat sich Temozolomid 150 - 200mg/m² p.o. an D1 - D5 alle vier Wochen etabliert (AWMF-Leitlinien, 2005). In der Studie hat sich weiterhin gezeigt, dass molekulargenetische Faktoren bei der Effektivität alkylierender Substanzen (wie beispielsweise Temozolomid) eine ausschlaggebende Bedeutung einnehmen. So profitierten vor allem jene Patienten von einer Therapie mit Temozolomid, welche eine Methylierung des Promotors des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens (MGMT) aufweisen. MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, das die durch Temozolomid induzierten Alkylierungen repariert und dessen Expression durch die Methylierung der Promoterregion negativ reguliert wird. Die Methylierung der Promoterregion von MGMT war ein unabhängiger, günstiger prognostischer Faktor (Hegi et al., 2005).

Neoadjuvante Chemotherapien zeigen bei Glioblastomen bislang keinen Behandlungsvorteil (Grossmann et al., 2003).

1.2.5.4 Lokale Therapieverfahren

In experimentellen Ansätzen werden zur Schonung des gesunden Gewebes in der Therapie des Glioblastoms lokale Therapieverfahren angewendet. Dazu gehören zum Beispiel die Radionuklidtherapie unter Verwendung von implantierten Kathetern. Daneben kann im Rahmen einer Operation eine lokale Chemotherapie mit BCNU-freisetzenden Polymeren (BCNU-Wafer) zum Einsatz kommen.

1.2.5.5 Probleme der konventionellen Therapie

Trotz der oben genannten Fortschritte bleiben die bisherig erzielten Therapieergebnisse bei der Behandlung des Glioblastoms äußerst unbefriedigend. Selbst nach vollständiger Tumorresektion gefolgt von postoperativer Radiatio und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid sind diese Tumore bislang nicht kurativ behandelbar (Dunn et al., 2003; Stupp et al., 2005).

Die kurze Überlebenszeit bei der Diagnose Glioblastom hat mehrere Gründe. Die chirurgische Therapie sieht sich folgenden Problemen gegenüber: Zum einen sind Glioblastome häufig frontotemporal im tiefen Marklager der Großhirnhemisphären lokalisiert und damit schwer zugänglich. Zum anderen befinden sie sich häufig primär in eloquenten Hirnarealen, so dass eine operative Entfernung nicht ohne Verursachung oder Verschlechterung eines fokalneurologischen Defizits möglich ist. Außerdem besitzen Glioblastomzellen die Eigenschaft, sich vom primären Tumorverband zu lösen und diffus in das umliegende Nervengewebe einzuwachsen. Dort bilden sie Mikrosatelliten, welche weder intraoperativ noch kernspintomographisch sicher von dem umliegenden gesunden Nervengewebe abzugrenzen sind (Black et al., 1997). Dies ist der Hauptgrund für die hohe Rezidivquote, auch nach makroskopisch vollständiger chirurgischer Resektion. Zudem sind Glioblastome hochmaligne Tumore, welche durch eine pathologische Gefäßneubildung mit defekter Blut-Hirn-Schranke charakterisiert sind.

Der klinische Verlauf nach der Resektion wird durch das biologische Verhalten der Tumorzellen und die Ansprechrate auf Radiatio und Chemotherapie bestimmt. Dabei sehen sich Radiatio und Chemotherapie verschiedenen Schwierigkeiten gegenüber. Zum einen weisen Glioblastome einen hohen Anteil primär chemoresistenter Zellpopulationen auf. Zum anderen ist die Passage der Chemotherapeutika aus dem Blut in das Gewebe durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert. Diese weist zwar in der Umgebung der meisten Glioblastome Störungen auf, die jedoch so inhomogen sind, dass die gleichmäßige Erreichbarkeit aller Tumorareale für die Chemotherapie nicht erwartet werden kann. Ein weiteres Problem stellt die gegenüber dem normalen Hirngewebe häufig

reduzierte Perfusion des Tumorareals dar. Zudem besteht bei Glioblastomen eine verminderte Oxygenierung und eine lange Zellzykluszeit. Die für eine erfolgreiche Therapie benötigten Dosen der Therapeutika würden zu inakzeptablen toxischen systemischen Plasmaspiegeln führen. Eine Erhöhung der Strahlendosis würde durch Nekrose und Ödem einen unannehmbaren Gewebeschaden und neurologische Defizite verursachen (Black et al., 1997).

1.2.5.6 Experimentelle Therapiekonzepte

Aufgrund der oben aufgeführten Schwierigkeiten bei der konventionellen Therapie des Glioblastoms wurde in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf die interventionelle molekulare Neuroonkologie gerichtet.

Hierbei wird versucht, die entarteten Glioblastomzellen spezifisch auf molekularer Ebene anzugreifen. In Kombination mit herkömmlichen Behandlungsmethoden kann dies zu einer Maximierung des Therapieerfolges führen. Hierbei werden zahlreiche unterschiedliche Ansätze verfolgt, von denen im Folgenden einige kurz beschrieben werden.

1.2.5.6.1 „Targeted“-Therapie

Zahlreiche Signalwege, die zur Proliferation und zum Überleben von Tumoren beitragen, werden über Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF) und ihre Rezeptoren vermittelt (Jendrossek et al., 2003). Da Glioblastome den Rezeptor für EGF überexprimieren, stellt die Verwendung von Tyrosinkinase Inhibitoren wie Gefitinib einen vielversprechenden Ansatz dar (Kesari et al., 2006). Derzeit befindet sich die Kombination aus dem Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-Rezeptor Inhibitor Imatinib in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Hydroxyurea in der klinischen Prüfung.

1.2.5.6.2 Hemmung der Angiogenese

In diesem Ansatz wird versucht, die für das Wachstum des Glioblastoms notwendige gesteigerte Angiogenese auf molekularer Ebene zu unterbinden. Eine Möglichkeit ist hierbei die Blockade des für die Angiogenese essentiellen VEGF-A (Fong et al., 1999). Eine andere Möglichkeit ist die intratumorale Langzeitapplikation von Endostatin, einem potenten antiangiogenetisch wirksamen Protein (Joki et al., 2001). Auch antiangiogenetische Ansätze wie beispielsweise die Verwendung des oralen Endothelin-A-Rezeptorantagonisten Atrasentan befinden sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phuphanich et al., 2008).

1.2.5.6.3 Lokale Immuntherapie

Bei der lokalen Immuntherapie wird versucht, das körpereigene Immunsystem für die Bekämpfung des Tumors zu stimulieren. Durch die lokale Anwendung der Immuntherapie soll zum einen das gesunde Gewebe geschont, und zum anderen die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden.

Eine Methode der Immuntherapie ist die unspezifische Stimulation des lokalen Immunsystems des Gehirns. Hierbei werden immunmodulatorische Chemokine wie zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2) entweder prä-, oder postoperativ stereotaktisch in den Tumorsitus appliziert (Merchant et al., 1992).

Eine andere Methode ist die intratumorale Applikation von autologen Lymphozyten. Bei dieser Methode, die als lokale adaptive Immuntherapie bezeichnet wird, werden zunächst Lymphozyten aus dem peripheren Blut gewonnen. Diese werden dann *ex-vivo* stimuliert und daraufhin reimplantiert. Die Stimulation erfolgt hier beispielsweise durch IL-2 (Barba et al., 1989).

Die sogenannte passive Immuntherapie stellt eine weitere Methode der lokalen Immuntherapie dar. Dabei werden gegen Tumorantigene gerichtete Antikörper in den Tumorsitus injiziert, um das umgebende Immunsystem zu stimulieren. Es werden hierbei unter anderem Antikörper gegen Tenascin verwendet. Dieses

Protein wird von Glioblastomzellen im Vergleich zum umgebenden Gewebe überexprimiert (Bigner et al., 1998).

1.2.5.6.4 Gentherapie

Neben den oben angeführten experimentellen Therapiekonzepten kommt für die Behandlung des Glioblastoms die Anwendung von Gentherapie in Frage (Alavi et al., 2001). Darunter versteht man den Versuch, Zielgene mit Hilfe eines Vektors in Zellen des an Glioblastom erkrankten Individuums einzubringen. Mit Hilfe der Gentherapie sollen die etablierten Therapien in ihrer Effektivität gesteigert werden.

Zu den Zielgenen gehören sowohl Gene, die wie p53 die Apoptose der Tumorzellen induzieren, als auch solche, die den Körper zu einer effektiveren Immunantwort gegen den Tumor anregen sollen (Li et al., 1999; Ali et al., 2004). Daneben wird auch versucht, Inhibitoren der Angiogenese wie Angiostatin in die Zielzellen einzubringen (Ma et al., 2002). Die Art der Zielzellen variiert je nach Forschungsrichtung von den Glioblastomzellen selbst über Immunzellen zu Endothelzellen. Weiterhin sollen mit Hilfe der Gentherapie selektiv Tumorzellen mit konditional zytotoxischen Genen transfiziert werden. Hierbei wird in die Tumorzellen ein Enzym wie die Thymidinkinase eingebracht. Dieses Enzym aktiviert nun ein Prodrug wie Ganciclovir spezifisch in der Tumorzelle zu einer toxischen Substanz (Nestler et al., 2004).

Während es *in-vitro* zahlreiche Möglichkeiten gibt, die Zielzellen mit den Zielgenen zu transfizieren, eignen sich hierfür im klinischen Bereich vor allem virale Vektoren. Dazu gehören neben Retroviren wie dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus und dem HIV-1-based Lentiviral-Vektor auch die Adenoviren (Ali et al., 2005).

Trotz vielversprechender Erfolge der Gentherapie in klinischen Studien gibt es einige gravierende Schwierigkeiten. Zum einen ist zurzeit das Ausmaß des Gentransfers und der Genexpression allgemein noch gering, weshalb oft hohe Dosen

des Vektors benötigt werden. Dies wirft sicherheitstechnische Bedenken auf, da durch hohe Dosen vermehrt entzündliche Reaktionen auftreten können. Darüber hinaus muss auch die Dauer der Genexpression und damit die Wirkdauer optimiert werden. Diese kann durch unspezifischen Einbau des Gens oder immunologische und entzündliche Reaktionen gegen das Genprodukt oder das Gen stark beeinträchtigt sein. Antikörperbildung gegen virale Vektoren kann zum Beispiel ihre wiederholte Anwendung verhindern. Zum anderen birgt die Verwendung viraler Vektoren Risiken wie das Auftreten vermehrungsfähiger Vektoren, die Etablierung neuer Virusstämme oder die Neubildung eines Tumors. Die hier aufgeführten Schwierigkeiten erklären die aktuelle intensive Suche nach neuen Vektoren wie zum Beispiel Stammzellen.

1.3 Stammzellen

1.3.1 Neurale Stammzellen in der Therapie des Glioblastoms

Aufgrund der oben beschriebenen Limitierung konventioneller Konzepte versucht man in letzter Zeit in der Therapie des Glioblastoms neue Wege zu beschreiten. Hierbei soll das Glioblastom mit Hilfe gentechnisch veränderter zellulärer Vektoren lokal bekämpft werden. Diese zellulären Vektoren sollten die Fähigkeit besitzen, die disseminiert im gesunden Gewebe liegenden Glioblastomzellen aufzuspüren. Dadurch bringen sie die Therapeutika unter Schonung des gesunden Gewebes direkt zu den Glioblastomzellen. Solche potentielle zelluläre Vektoren für die Therapie von Glioblastomen sind Stammzellen.

Da der Begriff „Stammzelle“ in der Literatur nicht einheitlich verwendet wird, sollen an dieser Stelle die Begriffe noch einmal definiert werden. Unter einer totipotenten Stammzelle versteht man eine solche Zelle, aus der sich ein kompletter lebender Organismus entwickeln kann. Aus einer pluripotenten Stamm-

zelle hingegen können zwar noch alle Zelllinien (auch die des Nervensystems) entstehen, jedoch nicht mehr die Trophoblasten der Plazenta. Pluripotente Stammzellen sind gleichbedeutend mit Embryonalen Stammzellen (ESC), deren Potential für eine klinische Anwendung bereits vielfach untersucht worden ist. So zum Beispiel für die Herstellung von Hauttransplantaten oder die Erzeugung von Dopamin bei der Behandlung des Morbus Parkinson (Shamblott et al., 1998; Cohen et al., 2006; Rodriguez-Gomez et al., 2007). Die meisten Stammzellen fallen jedoch unter den Begriff der multipotenten Stammzelle. Jene Stammzellen werden meistens durch das Organ definiert, in dem sie *in-vivo* beobachtet werden und von dem sie abstammen. Ihr Potential, sich durch entsprechende Stimuli in unterschiedliche Zelllinien auszudifferenzieren, ist aktuell Schwerpunkt zahlreicher Forschungen. Diese Stammzellen werden auch als adulte Stammzellen bezeichnet.

Unter Neuralen Stammzellen (NSC) versteht man Stammzellen, die folgende drei Kriterien aufweisen: Sie können sich in neurales Gewebe ausdifferenzieren oder stammen vom Nervensystem ab, sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sie können sich in andere Zelllinien mittels asymmetrischer Zellteilung ausdifferenzieren (Gage, 2000). Im adulten Gehirn findet man NSC in der subventrikulären Zone, im Bulbus olfactorius oder im Hippocampus.

NSC besitzen unter gewissen physiologischen und pathologischen Umständen migratorische Eigenschaften. So wurde unter anderem nach einem Schlaganfall die Migration von NSC nachgewiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass oxidativer Stress und traumatisch verändertes Hirngewebe im Allgemeinen einen Einfluss auf die Migration von NSC haben (Arvidsson et al., 2002).

Es wurde beobachtet, dass NSC einen ausgeprägten Tropismus zu Glioblastomzellen aufweisen. Wenn sie direkt in das Tumorbett implantiert werden, verteilen sie sich durch die gesamte Neoplasie und weisen sogar die Fähigkeit auf, einzelne verstreut liegende Tumorzellen „aufzuspüren“. Selbst nach Implantation in die kontralaterale Hemisphäre wandern NSC gezielt in das Tumorbett ein (Aboody et al., 2000). NSC, die *ex-vivo* mit dem Prodrug-Aktivierungsenzym Cytosin-

desaminase transfiziert worden sind, zeigen dieselben migratorischen Eigenschaften (Huber et al., 1994). Dies führt nach einer Behandlung mit Fluorocytosin zu einer verlängerten Lebenszeit im experimentellen Glioblastommodell (Aboody et al., 2000). Auch in anderen Forschungsansätzen konnten bei der Verwendung genetisch modifizierter NSC bedeutende tumorhemmende Effekte aufgezeigt werden. NSC produzierten je nach Ansatz Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-12 (IL-12) oder den Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) (Benedetti et al., 2000; Ehtesham et al., 2002; Ehtesham et al., 2002).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse besitzen NSC zwei große Nachteile. Die Gewinnung adulter NSC gestaltet sich aufgrund der dafür notwendigen neurochirurgischen Operation als technisch äußerst schwierig. Dagegen bringt die Verwendung embryonaler NSC neben immunologischen Risiken vor allem eine schwerwiegende ethische Problematik mit sich. Deshalb ist man dazu übergegangen, nach alternativen Zelllinien zu suchen. Diese sollten ähnliche Eigenschaften wie NSC aufweisen, aber unproblematischer in der Handhabung sowie ethisch unbedenklich sein.

1.3.2 Humane mesenchymale Progenitorzellen des Knochenmarks in der Therapie des Glioblastoms

Im Knochenmark findet man neben den hämatopoetischen Progenitorzellen (HSC) auch zahlreiche undifferenzierte Stromazellen. Eine Subpopulation dieses heterogenen Zellpools wird als hMSC bezeichnet. Im Knochenmark unterstützen hMSC die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen. hMSC sind multipotente Zellen, das heißt sie können in Abhängigkeit vom jeweiligen biochemischen Milieu sowohl *in-vitro*, also auch *in-vivo*, zu vollkommen unterschiedlichen Zelltypen differenzieren. So können sie sich in der entsprechenden Umgebung nicht nur mesenchymal (Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Band-, Gefäßzellen), sondern auch ektodermal (unter anderem neuronale Zellen) differenzieren (Pittenger et al., 1999; Jiang et al., 2002; Prockop, 1997). hMSC

können außerdem nach verschiedenen Gewebeverletzungen aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Nach einem Herzinfarkt (Shake et al., 2002; Barbash et al., 2003), nach einem Schlaganfall (Ji et al., 2004; Wang et al., 2002) und nach einer Knochen-, beziehungsweise Knorpelverletzung (Murphy et al., 2003) wurde diese Mobilisierung der hMSC aus dem Knochenmark bereits nachgewiesen. Die Fähigkeit, bei Bedarf aus dem Knochenmarkpool in unterschiedliche Organe (unter anderem Herz und zentrales Nervensystem) einzuwandern und dort zu verschiedenen Zelltypen auszudifferenzieren, begründet das derzeitige große Interesse verschiedener Fachrichtungen, hMSC im Rahmen neuer Therapiestrategien nutzbar zu machen.

hMSC haben gegenüber NSC einige entscheidende Vorteile. Zum einen sind sie im Gegensatz zu adulten NSC sehr einfach zu gewinnen. Dies geschieht mittels einer Knochenmarksaspiration, welche einen Standardeingriff darstellt. hMSC sind dann leicht aus dem gewonnenen Aspirat zu isolieren und anschließend in Kultur zu vermehren (Colter et al., 2000). Danach können sie mit Hilfe bekannter Techniken genetisch verändert werden (Conget et al., 2000). Außerdem können sie nach Gewinnung und Kultur autolog transplantiert werden, was eine Immunsuppression und die damit verbundenen Risiken unnötig macht. Auch scheinen hMSC an sich immunmodulatorische Eigenschaften zu haben und damit hypoimmunogen zu sein (Di Nicola et al., 2002; Le Blanc, 2006). Im Gegensatz zu zum Beispiel viralen Vektoren oder ESC bergen sie damit eine geringere Gefahr einer entzündlichen Reaktion des Empfängergewebes.

hMSC zeigen wie NSC eine gerichtete Migration zu Glioblastomen, sowohl nach intrakranieller, als auch nach intravasaler Injektion (Nakamizo et al., 2005). Zudem üben Interferon- β (IFN- β) oder Interleukin-2 (IL-2) produzierende hMSC einen hemmenden Einfluss auf Glioblastomzellen *in-vitro* und *in-vivo* aus und führen damit zu einer verlängerten Überlebenszeit im Tiermodell (Nakamura et al., 2004). Ihre Verwendung ist im Gegensatz zur Verwendung embryonaler NSC ethisch unproblematisch.

Diese Erkenntnisse machen hMSC zu möglichen Vektoren für die Gentherapie und die spezifische lokale Chemotherapie von Glioblastomen und damit zu einer vielversprechenden Alternative zu sowohl ESC als auch NSC (Nakamizo et al., 2006; Nakamura et al., 2004; Schichor et al., 2006).

1.4 Chemokine

Um hMSC in Zukunft für alternative Therapiestrategien nutzbar zu machen, müssen zunächst die biochemischen Wechselwirkungen zwischen Glioblastomzellen und hMSC untersucht werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind größtenteils noch unverstanden. Eine zentrale Frage dabei ist, welche Chemokine die Mobilisierung und die Migration der hMSC vermitteln. Die Identifizierung und Evaluation jener Chemokine, welche die Migration der hMSC zum tumorös veränderten Gewebe beeinflussen, ist Inhalt dieser Arbeit. Der Auswahl der zu untersuchenden Chemokine wurden zwei Überlegungen zugrundegelegt.

Zum einen gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass hMSC bei hypoxischen Gewebeschäden wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall mit Hilfe von angiogenetischen Faktoren aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden und in das geschädigte Gewebe migrieren (Wang et al., 2002; Price et al., 2003). In vorausgegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde zudem die chemotaktische Wirkung von VEGF-A auf die Migration der hMSC nachgewiesen (Schichor et al., 2006). VEGF-A fördert die Mitose von Gefäßendothelzellen und nimmt dadurch eine Schlüsselstellung in der Regulation der Angiogenese ein. Außerdem scheint es einen entscheidenden Beitrag zur Neovaskularisation von Glioblastomen zu leisten (Alvarez et al., 1992). Deswegen wurden als mögliche Kandidaten für die Vermittlung der Migration der hMSC solche Chemokine ausgewählt, die wie Interleukin-8 (IL-8), Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1), EGF oder PDGF eine Rolle in der Angiogenese spielen (Koch et al., 1992; Üki et al., 1992; Vlodavsky et al., 1990).

Zum anderen wurde die chemotaktische Wirkung von Neurochemokinen wie Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor (GDNF) und Human Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) auf die Migration der hMSC getestet. Diese Chemokine werden in Glioblastomen überexprimiert (Hamel et al., 1993; Wiesenhofer et al., 2000; Weis et al., 1999). Zudem stimulieren sie die Migration unterschiedlicher Zelltypen wie beispielsweise glatter Gefäßmuskelzellen, Neuronen und Gliazellen (David et al., 1993; Lewin et al., 1996). Diese physiologischen Funktionen machen sie zu möglichen Kandidaten für die Vermittlung der Migration der hMSC. Im Folgenden werden die biologischen Wirkungen der getesteten Chemokine kurz dargestellt.

1.4.1 Interleukin-8

IL-8 gehört zur Familie der alpha Chemokine. Es ist ein proinflammatorisches Chemokin, welches in zahlreichen entzündlichen Prozessen des Körpers eine wichtige Rolle spielt. IL-8 wirkt chemotaktisch nicht nur auf neutrophile, sondern auch auf eosinophile und basophile Granulozyten sowie auf T-Zellen. Außerdem vermittelt es zahlreiche andere proinflammatorische Wirkungen wie zum Beispiel die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an die Oberfläche von Endothelzellen. Zahlreiche Zellen können IL-8 produzieren (neben Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Chondrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen auch viele Tumorzelllinien) (Baggiolini et al., 1989). Daneben spielt IL-8 eine wichtige Rolle bei der Angiogenese von malignen Tumoren, insbesondere bei der des Glioblastoms (Koch et al., 1992). In neueren Studien wurde zudem nachgewiesen, dass sich die Expression von IL-8 proportional zum Malignitätsgrad von Gliomen verhält (Kargiotis et al., 2006).

1.4.2 Transforming Growth Factor Beta 1 und Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor

TGF- β ist der Oberbegriff für eine Anzahl sich in gewissen Peptidsequenzen unterscheidender Chemokine. Dazu gehört neben TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 1.2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5 auch GDNF.

TGF- β 1 ist ein polypeptidischer Wachstumsfaktor. Fast alle bisher untersuchten Säugetierzellen weisen einen spezifischen Rezeptor für TGF- β 1 auf, seine Effekte auf die verschiedenen Zellarten sind hierbei jedoch unterschiedlich. Während das Chemokin auf Zellen mesenchymalen Ursprungs stimulierend wirkt, hat es auf neuroektodermale und epitheliale Zellen einen inhibitorischen Effekt (Miyazono et al., 1992). In malignen Zellen kommt es zu einer Überproduktion von TGF- β 1. Dies führt durch Neovaskularisation zu einem verstärkten Wachstum des Tumorgewebes (Üki et al., 1992). TGF- β 1 wirkt außerdem als autokriner Wachstumsfaktor auf Glioblastome (Jennings et al., 1998).

Für GDNF wurde eine Wirkung auf das Überleben und die Reifung verschiedener Neurone des peripheren und zentralen Nervensystems nachgewiesen. Dazu gehören neben den Purkinjezellen, den Motoneuronen und den sympathischen Neuronen auch die Dopamin-produzierenden Neurone des Mittelhirns (Hou et al., 1996). In Glioblastomen kommt es zu einer massiven Überexpression dieses Chemokins, was zu einer gesteigerten Proliferation des Tumorgewebes führt (Wiesenhofer et al., 2000).

1.4.3 Epidermal Growth Factor

EGF gehört zu einer größeren Familie von Wachstumsfaktoren mit zahlreichen biologischen Wirkungen. So wird zum Beispiel die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen und epithelialen Zellen über EGF vermittelt. Außerdem besitzt EGF eine chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten und Epithelzellen (Carpenter, 1985). Der Rezeptor für EGF wird zudem auf Glioblastomzellen überexprimiert und

korreliert positiv mit der Malignität des Tumors (Kesari et al., 2006). *In-vivo* konnte zudem nachgewiesen werden, dass EGF unter anderem auf die Angiogenese und die Ausdifferenzierung von Epithelien wirkt. Dies geschieht durch Unterstützung der Mitose der Gefäßepithelzellen (Dunn et al., 2000).

1.4.4 Platelet-derived Growth Factor

Obwohl PDGF vor allem in Megakaryozyten produziert wird, schütten auch zahlreiche andere Zellarten wie zum Beispiel Fibroblasten, Gliazellen und Astrozyten dieses Chemokin aus. Zudem wirkt PDGF möglicherweise als autokriner Wachstumsfaktor auf Gliome (Hermanson et al., 1992). Auch scheint das Chemokin eine entscheidende Rolle in der Neoangiogenese von Tumoren zu spielen. Neben seiner neuromodulatorischen Wirkung auf das Nervengewebe wurde auch eine potente chemotaktische Wirkung von PDGF auf hämatopoetische Zellen und mesenchymale Zelllinien nachgewiesen (Westermarck et al., 1993).

1.4.5 Neurotrophin-3 und Brain-derived Neurotrophic Factor

NT-3 und BDNF gehören zur Familie der Neurotrophine. Diese Chemokine spielen eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Nervenzellen, sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem. Auch scheinen sie bei der Regeneration von Nervengewebe eine Rolle zu spielen. Ihre Wirkung auf das Gewebe ist in vielen Bereichen additiv (Barde, 1990). BDNF und NT-3 werden in großem Maße von Glioblastomzellen sezerniert, allerdings besitzen sie keine promotische Wirkung auf die malignen Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ihre Rolle in diesem Prozess eher parakrin als autokrin zu werten ist (Hamel et al., 1993).

1.4.6 Human Ciliary Neurotrophic Factor

CNTF ist strukturell verwandt mit den Chemokinen IL-11 und IL-6. Dieses Chemokin scheint eine überlebensfördernde Wirkung auf unterschiedliche Nervenzellen zu haben. Dazu gehören unter anderem die Neurone in sympathischen Ganglien, die sensiblen Hinterhornneurone des Rückenmarks und Neurone im Hippocampus. Außerdem verhindert seine Ausschüttung die Axondegeneration nach Durchtrennung eines Nerven (David et al., 1993). CNTF wird von Glioblastomzellen vermehrt gebildet (Weis et al., 1999).

Das genaue Verständnis der dem glioblastominduzierten Tropismus zugrunde liegenden Wechselwirkungen zwischen hMSC und Tumorzellen ist Voraussetzung für die Entwicklung hMSC-basierter Ansätze in der Therapie des Glioblastoms. Diese könnten zukünftig in Kombination mit bewährten Therapieschemata zum verlängerten Überleben der an Glioblastom erkrankten Patienten beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Zellkultur

Sowohl für die hMSC, als auch für die verwendeten Tumorzelllinien wurden dieselben Methoden der Zellkultur verwendet.

Die Zellen wurden in einem Standardbrutschrank (37° Celsius, 5% CO₂-Anteil, 100% Luftfeuchtigkeit) aufbewahrt.

Zur Herstellung des Nährmediums wurde α -modified-essential-medium (α -MEM) mit 20% fetalem Kälberserum (FBS), 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin versetzt (20% α -MEM). Die Zellen wuchsen in Zellkulturflaschen der Größe 185cm², 80cm² oder 25cm² in einer Konzentration von 400 Zellen/cm². Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Sobald die Zellen subkonfluent waren, wurden sie mit Hanks Balanced Salt Solution, 0.25% Trypsin, 1mM EDTA und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach drei Minuten wurde die Wirkung des Trypsins mit serumhaltigem α -MEM gestoppt und diese Suspension anschließend bei 400g für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 20% α -MEM resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Die Zellen aus dem repräsentativen Aliquot von 1ml wurden dazu vierfach mit Trypanblau 0.4% verdünnt. Hierfür wurden 10 μ l aus dem Aliquot entnommen und mit 40 μ l Trypanblau vermischt. Daraufhin wurden die in vier Quadranten sichtbaren Zellen unter dem Mikroskop (10x) ausgezählt. Die Konzentration der Zellen wurde daraufhin mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration Zellen (Zellen/ml)} = \text{Ergebnis} \times \text{Volumen Aliquot} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Zellen wurden dann in einer Dichte von 400 Zellen/cm² in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Die neue Flasche der Größe 185cm² wurde wieder mit 20ml α -MEM befüllt und in den Brutschrank gelegt. Für die Zellkulturflaschen der Größen 80cm² und 25cm² wurden jeweils 10ml, beziehungsweise 5ml α -MEM verwendet.

Die nicht unmittelbar für die Versuche verwendeten Zellen wurden bei -195° Celsius in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst und ausgezählt. Daraufhin wurden sie in einer Konzentration von jeweils 1x10⁶ Zellen/ml 1:10 mit 20% α -MEM verdünnten Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen gegeben.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt der Röhrchen zunächst zehnfach mit 20% α -MEM verdünnt und für zehn Minuten bei 400g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 20% α -MEM resuspendiert, die Zellen ausgezählt und in einer Konzentration von 400 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen gegeben.

Die verwendeten Materialien, Geräte und Reagenzien mit Typ-, und Herstellerbezeichnungen sind jeweils am Ende eines Unterpunktes tabellarisch aufgeführt.

Material	Typ	Firma	Sitz
Autoklav	Varioklav 400	H+P Labortechnik	Oberschleißheim, Dtlid.
Brutschrank	Hera Cell	Kendro	Langenselbold, Dtlid.
Einfrigergerät	Cryo	Nalge Nunc International	Wiesbaden, Dtlid.
Einfrierröhrchen	1.8ml	Nalge Nunc International	Wiesbaden, Dtlid.
Gefrierschrank	-80° Celsius	Nalge Nunc International	Wiesbaden, Dtlid.
Kühl-, und Gefrierschrank	4° Celsius, -20° Celsius	Siemens	München, Dtlid.
Kulturflaschen	25cm ² , 80cm ² , 185cm ²	Nalge Nunc International	Rochester, USA
Mikroskop	CK40	Olympus	Hamburg, Dtlid.
Pipetten/Pipettenspitzen	10, 20, 100, 200, 1000ml	Eppendorf	Hamburg, Dtlid.
Pipettierhilfe	Pipetus- Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Dtlid.
Reaktionsgefäße	1.5ml Eppendorf- Cups	Eppendorf	Hamburg, Dtlid.
Reaktionsgefäße	15ml, 50ml Falcon	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Kendro	Langenselbold, Dtlid.
Stickstofftonne	BT 55	Air Liquide	Düsseldorf, Dtlid.
Zählhilfe	Neubauerkammer	Brand	Wertheim, Dtlid.
Zellschaber	BD Falcon	BD Biosciences	Bedford, USA
Zentrifuge	Rotanta	Hettich Laborapparate	Bäch, Schweiz

Tabelle 1: Materialien und Geräte für die Zellkultur

Material	Typ	Firma	Sitz
D-Glutamin	≥ 98% (TLC)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Dimethylsulfoxid	reinst	Merck	Darmstadt, Dtld.
Fetales bovines Serum	Heat Inactivated, Non-USA origin, sterile-filtered, cell culture tested	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Hanks Balanced Salt Solution	Modified	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Penicillin/ Streptomycin	100x	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Rohmedium	Minimal Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Trypanblau	0.4% Trypan Blue	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Trypsin	0.25% Trypsin- EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.

Tabelle 2: Reagenzien für die Zellkultur

2.1.2 Gewinnung und Isolierung der hMSC

Die für die Versuche benötigten hMSC wurden aus nicht verwertbarem Restmaterial von Knochenmarkspenden gewonnen. Dafür wurde das individuelle Einverständnis jedes Spenders und ein Votum der Ethikkommission zur Verwendung der hMSC eingeholt.

Zur Aufbereitung wurden die Beutel und das zugehörige Filtersystem der Knochenmarkspende zunächst mit 100ml 20% α -MEM gespült und das gewonnene Material über einem Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μ m gefiltert. Die mononukleären Zellen wurden aus dem Knochenmarkmaterial mittels der Ficoll

Dichte Gradient-Methode isoliert. Bei dieser Methode wurde Histopaque verwendet, eine Lösung die aus Polysucrose und Natrium-Diatrizoat besteht und bei 25° Celsius eine Dichte von 1.077g/ml aufweist. Die Präparation bei Raumtemperatur begann damit, dass 15ml Histopaque in ein 50ml Zentrifugenröhrchen pipettiert wurden. Darüber wurden vorsichtig 30ml Knochenmarkmaterial geschichtet und anschließend für 35 Minuten bei 400g zentrifugiert (siehe dazu auch Abbildung 2).

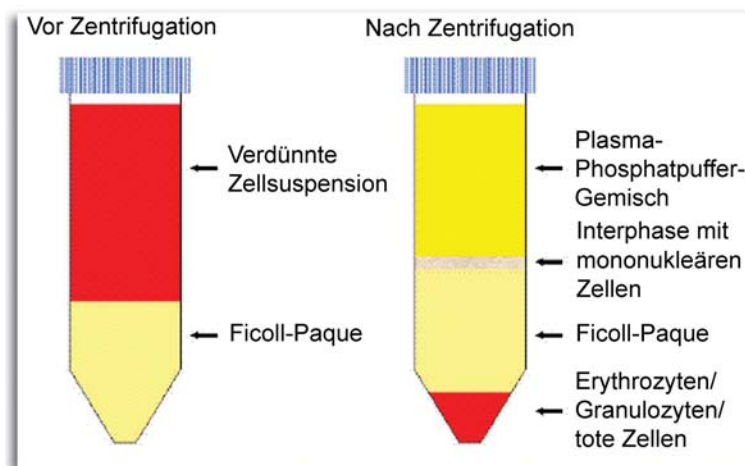


Abbildung 2: Ficoll Dichte Gradient-Methode. Nach Zentrifugation bildet sich eine Flüssigkeitsäule mit vier Schichten, die ihrer Dichte und ihrem spezifischen Gewicht nach wie skizziert angeordnet sind.

Die Schicht mit den mononukleären Zellen wurde daraufhin in ein neues Gefäß gegeben, mit gleicher Menge an 20% α -MEM vermischt und anschließend für zehn Minuten bei 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschritt noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-kammer ausgezählt. Die mononukleären Knochenmarkzellen wurden daraufhin zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/25cm² in Zellkulturflaschen eingebracht und 48 Stunden bei 37° Celsius bebrütet. Nach Wechseln des Mediums waren nur noch hMSC in den Flaschen, weil diese sich im Gegensatz zu den anderen

mononukleären Zellen an den Plastikboden der Zellkulturflaschen adhären, eine typische fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen und unter Zusatz von FBS proliferieren. Die Populationsverdopplungszeit betrug 33 Stunden. Wenn die Zellen nach circa sechs bis acht Tagen subkonfluent waren, wurden sie wie oben beschrieben gesplittet und in einer Konzentration von 400 Zellen/cm² in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen zwei bis fünf verwendet.

Material	Typ	Firma	Sitz
Histopaque	1.077g/ml	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtlid.
Zellsieb	70µm	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA

Tabelle 3: Materialien und Reagenzien für die Ficoll Dichte Gradient-Methode

2.1.3 Gewinnung von glioblastomkonditioniertem Medium

Es wurden für die Versuche die humanen Glioblastomlinien U-373, U-251 und MZ-54 verwendet. Die Zellen (je 1x10⁶ in 75cm² Zellkulturflaschen) wurden mit 10% α-MEM kultiviert, bis sie zu 80% konfluent waren. Je 1x10⁶ Zellen wurden daraufhin für 48 Stunden mit serumfreiem α-MEM bebrütet, der Überstand wurde abpipettiert und zehn Minuten bei 400g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der so gewonnene zellfreie Überstand wurde dann als glioblastomkonditioniertes Medium für die Versuche verwendet. Die Aliquots der konditionierten Medien wurden bei -20° Celsius aufbewahrt.

2.2 Fluorescence Activated Cell Sorting-Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ist die am häufigsten verwendete Methode der Immunphänotypisierung. Dabei wird die Expression verschiedener Antigene auf der Oberfläche von Zellen analysiert. Dadurch kann dann ein Rückschluss auf die Zugehörigkeit der untersuchten Zellen zu einer bestimmten Zellreihe gezogen werden.

Um sicherzustellen, dass mit der weiter oben beschriebenen Ficoll Dichte Gradient-Methode die gewünschten hMSC gewonnen wurden, wurde an drei verschiedenen Proben eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst wie weiter oben beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst und ausgezählt. Anschließend wurde eine Zellsuspension der Konzentration 2×10^5 Zellen/200 μ l hergestellt. Die Aliquots wurden dann für zwanzig Minuten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (anti-CD 11b, anti-CD 14, anti-CD 31, anti-CD 34, anti-CD 44 und anti-CD 105) auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Die Analyse der fixierten Zellen erfolgte mit einem FACScan Flow Cytometer. Die Daten aus 100 000 Ereignissen wurden dann unter Verwendung der Cell Quest Software analysiert.

Material	Typ	Firma	Sitz
Antikörper	anti-CD 11b, anti-CD 14, anti-CD 31, anti-CD 34, anti-CD 44, anti-CD 105	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
FACS Kit	Phosflow Starter Kit	Pharmingen	San Diego, USA
FACS Software	Cell Quest Software	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtlid.
Zytometer	FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA

Tabelle 4: Materialien und Reagenzien für die FACS-Analyse

2.3 Migrationsassay

Für die Migrationsversuche wurde eine 48-Well Chemotaxiskammer (modifizierte Boyden Kammer) verwendet. Mittels der Boyden Kammer wurde die Zellmigration der hMSC unter Stimulierung verschiedener chemotaktisch wirksamer Agenzien im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Als Chemotaxis bezeichnet man die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemotaxinen.

Die modifizierte Boyden Kammer besteht aus drei Komponenten, dem Boden, welcher 48 Vertiefungen in zwölf mal vier Reihen aufweist, einer Gummidichtung und einer Deckplatte. Gummidichtung und Deckplatte zeigen analog dem Boden 48 durchgehende Aussparungen.

Es wurden 1×10^6 hMSC pro Versuch eingesetzt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden entfernt und in serumfreiem α -

MEM suspendiert. Die Testproben waren serumfreies α -MEM als Negativkontrolle und 20% α -MEM als Positivkontrolle, die zu testenden Wachstumsfaktoren suspendiert in serumfreiem α -MEM und das glioblastomkonditionierte Medium (der serumfreie Überstand der Glioblastomlinien U-373, U-251 und MZ-54).

Zuerst wurden die entsprechenden Testproben in einer Menge von jeweils 30 μ l in die unteren Wells der Boyden Kammer gegeben. Zwischen Boden und Gummidichtung wurde dann ein Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 8 μ m platziert, durch welchen die hMSC migrieren mussten. Danach wurden jeweils 50 μ l der suspendierten hMSC in die oberen Wells der Boyden Kammer eingefüllt. In jedem Well befand sich dann eine Menge von 5×10^4 hMSC. Anschließend wurde die Kammer mit sechs Schrauben fest verschlossen. Nach dem Befüllen wurde die Kammer für die Dauer der Migration (vier Stunden) bei 37° Celsius in einer 5% CO₂ enthaltenden Wasserdampf-atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit wanderten die Zellen vom oberen Kompartiment entlang des Chemotaxisgradienten durch den Polycarbonat-Filter. Anschließend wurde der Filter entfernt und die den oberen Wells zugewandte Seite dreimal mit PBS gewaschen, um die nicht durch den Filter migrierten hMSC zu entfernen.

Nach Lufttrocknen der Filtermembran wurden jene Zellen mit Methanol fixiert, die durch die Poren auf die untere Hälfte der Boyden Kammer gewandert waren. Diese wurden dann mittels Hämacytometer gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe dazu Abbildung 3). Dabei wurden in 40x Vergrößerung jeweils alle gewanderten Zellen pro Well ausgezählt. Jede Versuchsreihe wurde doppelt angesetzt und dreimal wiederholt.

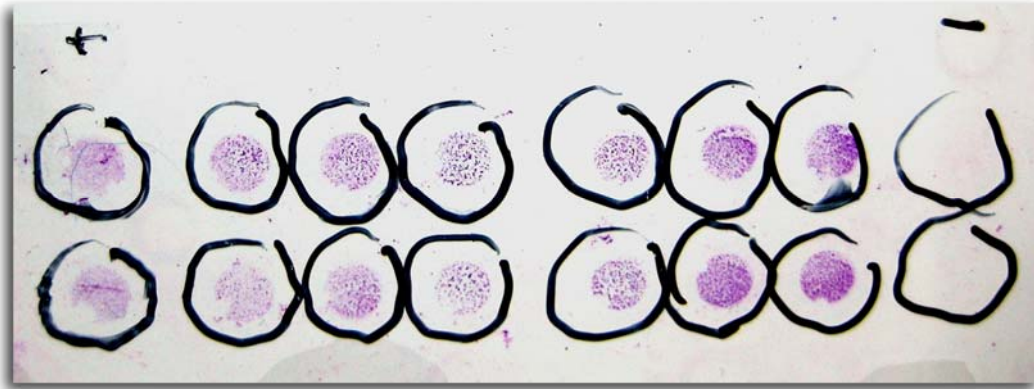


Abbildung 3: Makroskopische Ansicht einer Filtermembran mit migrierten und eingefärbten hMSC. Von links nach rechts: Positivkontrolle, hMSC+IL-8, hMSC+NT-3, hMSC+TGF- β 1, hMSC+MZ-54, hMSC+U-373, hMSC+U-251, Negativkontrolle

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Migrationsversuche vergleichen zu können, wurde ein Migrationsindex (MI) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{MI} = \frac{\text{Ergebnis Probe}}{\text{Ergebnis Nullprobe}}$$

Die Versuche wurden mit folgenden Chemokinen durchgeführt: EGF (50ng/ml, 5ng/ml, 0.5ng/ml), TGF- β 1 (10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0.01ng/ml), IL-8 (1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 30ng/ml, 3ng/ml, 0.3ng/ml), BDNF (100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml), NT3 (100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml), CNTF (50ng/ml, 5ng/ml, 0.5ng/ml), PDGF (50ng/ml, 5ng/ml, 0.5ng/ml) und GDNF (50ng/ml, 5 ng/ml, 0.5ng/ml).

Außerdem wurde die chemotaktische Wirkung von glioblastomkonditionierten Medien der Zelllinien U-373, U-251 und MZ-54 untersucht. Schließlich wurde die chemotaktische Wirkung der glioblastomkonditionierten Medien nach Neutralisierung der Chemokine TGF- β 1, NT-3 und IL-8 analysiert und mit der Wirkung der jeweiligen nativen glioblastomkonditionierten Medien verglichen. Diese wurden dafür jeweils 30 Minuten lang mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen humanes NT-3 (5 μ g/ml), IL-8 (5 μ g/ml) und TGF- β 1 (100 μ g/ml) präinkubiert und anschließend die Migrationsversuche durchgeführt.

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde wiederum ein Migrationsindex (MI) errechnet. Dabei diente das glioblastomkonditionierte Medium ohne die neutralisierenden Antikörper als Kontrolle:

MI = Ergebnis Probe / Ergebnis Kontrolle
--

Material	Typ	Firma	Sitz
Färbelösung	Hämacolor	Merck	Darmstadt, Dtlid.
Filter	8µm	Neuro Probe Inc.	Gaithersburg, USA
Glasobjektträger, Deckgläser	26 x 76 mm	Menzel	Braunschweig, Dtlid.
Methanol	Pro analysi	Merck	Darmstadt, Dtlid.
Migrationskammer	Boyden Kammer	Neuro Probe Inc.	Gaithersburg, USA
Mikroskop	Fluoreszenz B60	Olympus	Hamburg, Dtlid.

Tabelle 5: Materialien und Reagenzien für das Migrationsassay

Material	Typ	Firma	Sitz
Chemokin	BDNF	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	CNTF	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	GDNF	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	IL-8	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	NT-3	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	PDGF	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
Chemokin	TGF- β 1	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
monoklonale AK	Anti-IL-8, Anti-TGF- β 1	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtld.
monoklonaler AK	Anti-NT-3	R&D Systems	Minneapolis, USA

Tabelle 6: Chemokine und Antikörper

2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe dieser Methode können zum Beispiel Proteine in Proben nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, sich an den nachzuweisenden Stoff zu binden. Jene Antikörper sind mit einem Enzym gekoppelt. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des untersuchten Proteins.

Um nachzuweisen, dass die von uns verwendeten Glioblastomzellen die Chemokine IL-8, TGF- β 1 und NT-3 produzieren, wurde einmalig ein jeweiliger

ELISA durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Konzentrationen jener Chemokine in den glioblastomkonditionierten Medien der Zelllinien MZ-54, U-373 und U-251 bestimmt. Dabei wurden die Anwendungshinweise der Hersteller befolgt. Vor Beginn der Messung wurde die benötigte Anzahl an Microplatesstreifen in den vorgegebenen Rahmen der 96-Well-Mikrotiterplatte eingespannt. Nach dem Prinzip des „Sandwich Enzym Immunoassay“ war der für das zu messende Chemokin spezifische, monoklonale coating-Antikörper bereits an den Boden der Wells gebunden. Durch Zugabe der glioblastomkonditionierten Medien beziehungsweise des Standards band sich das darin enthaltene Chemokin daraufhin an diesen spezifischen Antikörper. In den Standardproben befand sich eine Verdünnungsreihe bekannter Mengen des zu messenden Chemokins, mit deren Hilfe am Ende eine Kalibrierungskurve zur Chemokinmengenbestimmung der glioblastomkonditionierten Medien erstellt werden konnte. Während der Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur band der Antikörper in den Wells nun das gesamte zu messende Chemokin. Dann wurden alle ungebundenen Substanzen mit Hilfe eines Waschpuffers abgewaschen und dieser Schritt dreimal wiederholt. Anschließend wurde ein mit einer Peroxidase verknüpfter, polyklonaler Antikörper gegen das zu messende Chemokin dazu pipettiert. Wie schon zuvor, wurde die Messplatte zwei Stunden inkubiert und wiederum viermal gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Schließlich wurde in jedes Well Peroxidase-spezifisches Substrat pipettiert, wobei je nach Chemokinmenge und somit veränderter Antikörperkonzentration ein unterschiedlich intensiver Farbumschlag entstand. Nach zwanzig Minuten wurde diese Reaktion mit Hilfe einer Stopplösung beendet.

Zur Berechnung des Chemokingehaltes der Proben wurden in einem Photometer bei 570nm Wellenlänge die Extinktionen aller Proben gemessen. Mit Hilfe der bekannten Chemokin-Standardkurven konnte somit der Gehalt des entsprechenden Chemokins in den Plasmaproben berechnet werden.

Material	Typ	Firma	Sitz
ELISA	IL-8, TGF- β 1	R&D Systems	Minneapolis, USA
ELISA	NT-3	Raybiotech Inc.	Norcross, USA
Photometer	UVM 340	Deelux Labortechnik	Gödenstorf, Dtlid.

Tabelle 7: Materialien und Reagenzien für das ELISA

2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Als Immunfluoreszenzfärbung wird eine Methode bezeichnet, mit der Proteine (wie beispielsweise Chemokinrezeptoren) mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dabei wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Es ist der sogenannte Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Detektion erfolgt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die Chemokinrezeptoren für IL-8, TGF- β 1 und NT-3 auf der Oberfläche der hMSC nachgewiesen. Dafür wurden die hMSC zunächst zwanzig Minuten mit 4% Paraformaldehyd behandelt und damit fixiert. Danach wurde für eine Stunde eine Lösung aus Triton X und Ziegen Serum hinzugegeben. Damit wurde eine Permeabilisierung der Zellmembran erreicht und zudem wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Als nächstes wurden die entsprechenden Primärantikörper (CXCR1, TGF- β -RII und TrkC) hinzugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Darauf schloss sich ein Waschschriff an. Anschließend wurden TRITC-konjugierte Sekundärantikörper hinzugegeben und 30 Minuten lang inkubiert. Als letztes wurden die Zellkerne der hMSC mit Diamidiophenylindol (DAPI) eingefärbt. Alle Bilder wurden mit Hilfe eines

Fluoreszenzmikroskops, welches mit einer Digitalkamera ausgestattet ist, gewonnen.

Material	Typ	Firma	Sitz
Diamidiophenylindol	10 ng/ml	Invitrogen	Karlsruhe, Dtlid.
Fluoreszenzmikroskop	Vision	Zeiss	Hallbergmoos, Dtlid.
Paraformaldehyd	Pro analysi	Merck	Darmstadt, Dtlid.
Primärantikörper (IgG Maus)	CXCR1, TGF- β -RII, TrkC 1:200	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtlid.
Sekundärantikörper (Ziege)	TRITC konjugiert 1:200	Jackson Immunoresearch	West Grove, USA
Software	KS 300	Zeiss	Hallbergmoos, Dtlid.
Triton X-100	0.3%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Dtlid.
Ziegenserum	10%	Dako	Glostrup, Dänemark

Tabelle 8: Materialien und Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung der Migrationsversuche wurden die ANOVA-Varianzanalyse und der Dunnett's Test verwendet. Für die Neutralisationsversuche wurde der Student's t-test verwendet. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ als signifikant, ab $p < 0.01$ als hochsignifikant angesehen. Für die statistischen Berechnungen wurden die Programme Excel und Prism4 verwendet.

Programm	Firma	Sitz
Excel	Microsoft	Redmond, USA
Prism4	GraphPad Software	San Diego, USA

Tabelle 9: Programme für die Statistik

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt. Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung jener Chemokine, welche den glioblastominduzierten Tropismus der hMSC vermitteln.

3.1 Charakterisierung der hMSC

In diesem Versuchsabschnitt sollte nachgewiesen werden, dass die in den Migrationsversuchen verwendeten mononukleären Zellen hMSC waren. Hierfür wurde mittels der FACS-Analyse eine phänotypische Charakterisierung der verwendeten Zelllinien durchgeführt. Dies erfolgte an drei der Spenderproben, welche auch für die Versuche eingesetzt wurden.

hMSC werden hier definiert als mononukleäre Zellen, welche die folgenden Kriterien aufweisen:

- Sie sind positiv für die Oberflächenmarker CD 105 und CD 44, während sie für andere Marker mononukleärer Zelltypen des Knochenmarks wie CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ sind.
- In Zellkultur zeigen sie eine typische fibroblastenähnliche Morphologie, sind adhärent am Flaschenboden und zeigen (anders als beispielsweise Endothelzellen) eine Proliferation unter FBS.

Mit der Ficoll Dichte Gradient-Methode werden mononukleäre Zellen isoliert. Im Knochenmark befinden sich neben hMSC noch zahlreiche andere mononukleäre Zellen, welche eine den hMSC ähnliche Morphologie und Funktion aufweisen. Dieser Versuchsabschnitt dient zum Nachweis, dass die mit der oben genannten Methodik isolierten mononukleären Zellen hMSC sind.

CD 34 wird auf hämatopoetischen Stammzellen (HSC) exprimiert, CD 11b auf Makrophagen und Monozyten, CD 14 auf Monozyten und CD 31 auf

Endothelzellen. Wie in Abbildung 4 ersichtlich, waren die mittels FACS-Analyse untersuchten Zellen sowohl positiv für CD 105 (99%) als auch für CD 44 (95%), während sie für CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ waren.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der phänotypischen Charakterisierung der hMSC überein (Reyes et al., 2001; Conget et al., 1999; De Ugarte et al., 2003). Somit konnte bestätigt werden, dass mit der verwendeten Methodik hMSC aus dem Knochenmarkaspirat isoliert wurden.

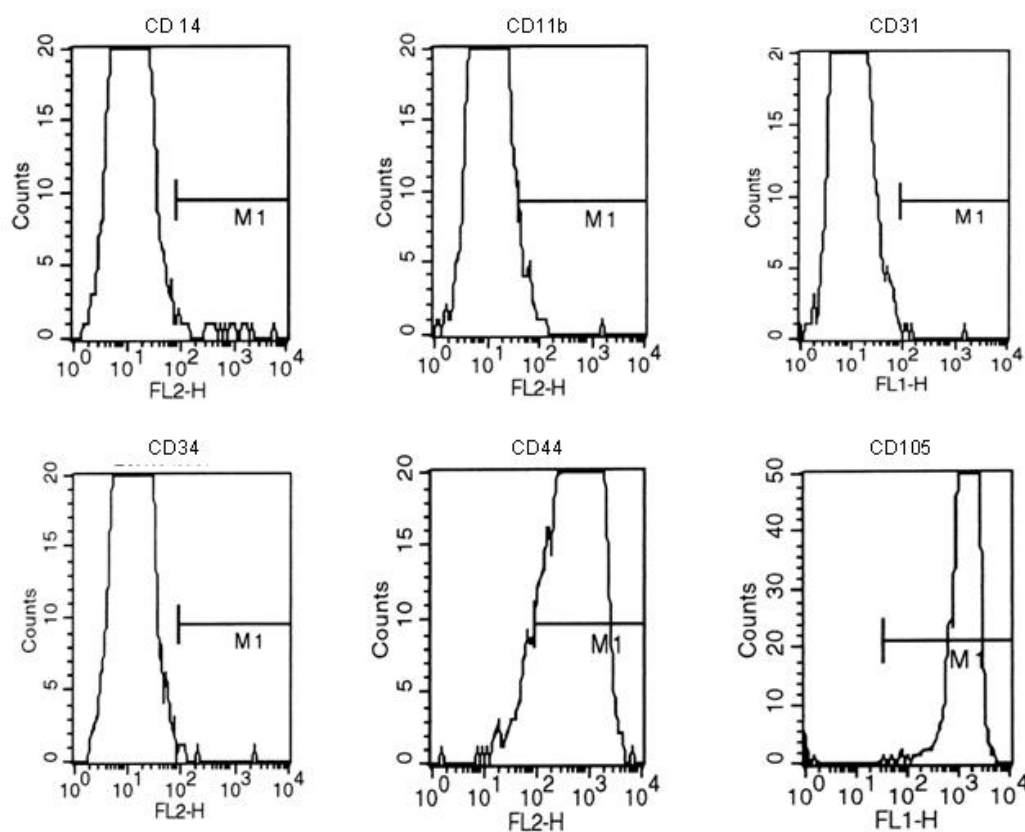


Abbildung 4: Ergebnisse der FACS-Analyse. Die untersuchten Zellen waren positiv für die Oberflächenmarker CD 44 und CD 105, während sie für CD 14, CD 11b, CD 31 und CD 34 negativ waren.

3.2 Migration der hMSC

3.2.1 Identifizierung der Kandidatenchemokine

Ziel des nachfolgend beschriebenen Versuchsabschnittes war es, aus dem Pool der vorausgewählten Kandidatenchemokine jene zu identifizieren, welche die Migration von hMSC signifikant beeinflussen. Hierfür wurden die Chemokine EGF, TGF- β 1, IL-8, BDNF, NT-3, CNTF, PDGF und GDNF auf ihre chemotaktische Wirkung auf hMSC hin untersucht. Hierzu wurde mit dem weiter oben beschriebenen modifizierten Boyden Kammer Assay gearbeitet. In Abbildung 5 ist ein Filter der Boyden Kammer nach Migration und Einfärbung der hMSC zu sehen.

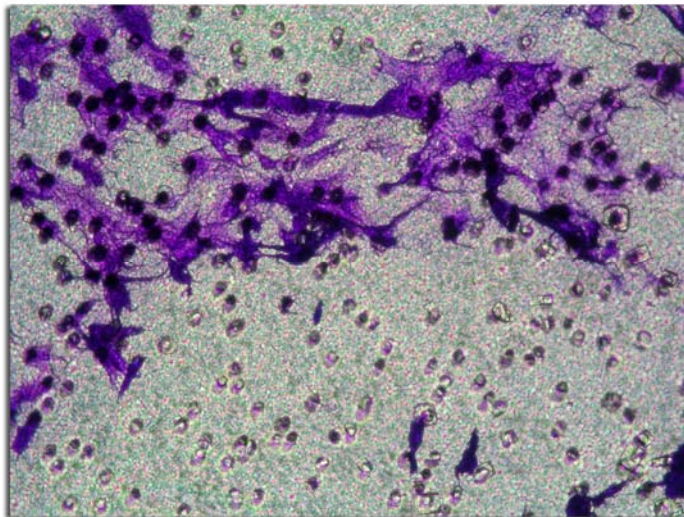


Abbildung 5: Mikroskopische Ansicht einer Filtermembran mit migrierten und eingefärbten hMSC. Zu erkennen sind die Poren der Filtermembran sowie zahlreiche spindel-, bis sternförmig ausgezogene hMSC, welche größtenteils untereinander vernetzt sind.

Die entsprechenden Chemokine wurden in ihrer jeweiligen, in der Literatur beschriebenen Wirkungskonzentration eingesetzt (Mukaida et al., 1992;

Gospodarowicz et al., 1987; Huang et al., 1986; Beckmann et al., 1988; Barnard et al., 1990; Carpenter et al., 1985; Rosenthal et al., 1990; Schroder et al., 1987; Eide et al., 1993; Airaksinen et al., 2002). Bei unklarer Signifikanz der Ergebnisse wurden zusätzlich 1:10 Verdünnungsreihen des entsprechenden Chemokins ausgetestet. In Abbildung 6 sind die erzielten Resultate grafisch dargestellt.

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Migrationsversuche vergleichen zu können, wurde ein Migrationsindex (MI) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{MI} = \text{Ergebnis Probe} / \text{Ergebnis Nullprobe}$$

EGF wurde in den Konzentrationen 50ng/ml, 5ng/ml und 0.5ng/ml eingesetzt und zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikante Wirkung auf die Migration der hMSC (MI = 1.1). Ebenso wenig hatten GDNF (5ng/ml) (MI = 0.7), CNTF (5ng/ml) (MI = 0.6), BDNF (10ng/ml) (MI = 1.3) und PDGF (5ng/ml) (MI = 1.1) einen signifikanten migrationsfördernden Effekt.

Da IL-8 zwei physiologische Wirkungsbereiche aufweist, wurde es in den Konzentrationen 1µg/ml, 0.1µg/ml und 3ng/ml ausgetestet. Die Konzentrationen von TGF-β1 und NT-3 waren 0.1ng/ml beziehungsweise 10ng/ml. IL-8 zeigte in einer Konzentration von 3ng/ml einen Migrationsindex von 1.7, während TGF-β1 und NT-3 einen Migrationsindex von jeweils 2.0 aufwiesen. Damit zeigten diese drei Chemokine, wie in Abbildung 6 ersichtlich, einen im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant gesteigerten Effekt auf die Migration der hMSC. Der stärkste chemotaktische Effekt wurde durch glioblastomkonditioniertes Medium erzielt und variierte zwischen den einzelnen Tumorzelllinien. So betrug der Migrationsindex bei U-373 4.2, bei U-251 4.8 und bei MZ-54 5.3.

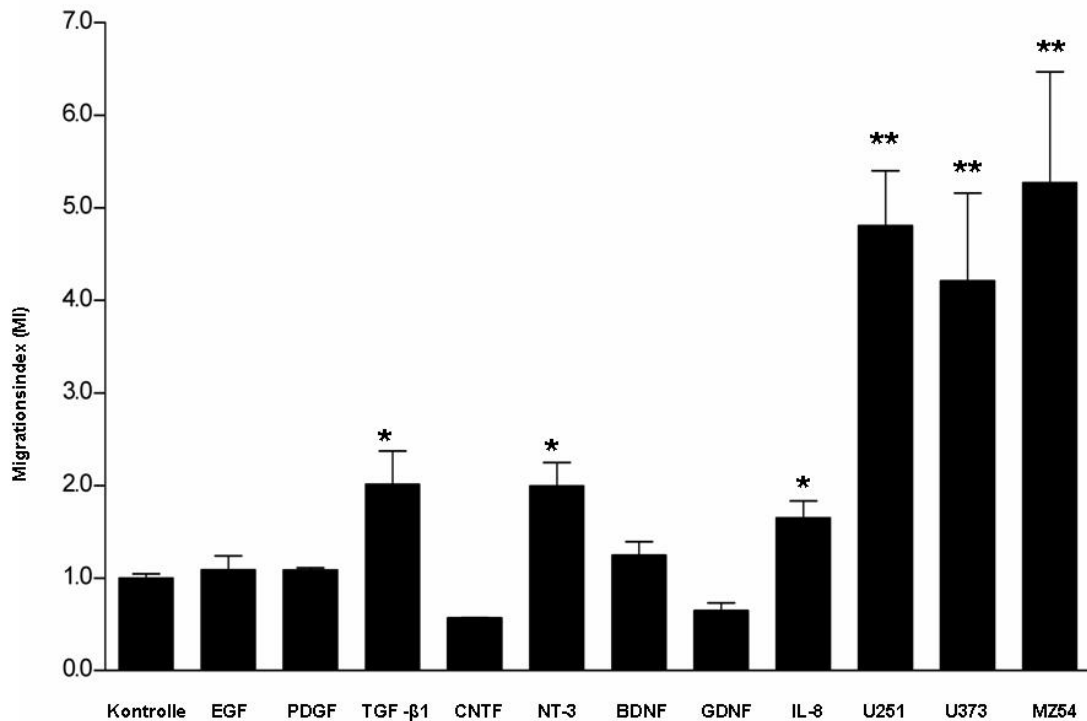


Abbildung 6: Ergebnisse der Migrationsversuche. Mit den glioblastomkonditionierten Medien wurde der stärkste chemotaktische Effekt erzielt. Signifikante Ergebnisse wurden zudem bei den Chemokinen TGF-β1, NT-3 und IL-8 beobachtet. Die Chemokine EGF, PDGF, CNTF, BDNF und GDNF zeigten keine promigratorische Wirkung auf hMSC. Balken: Migrationsindices, Fehlerbalken: Standardabweichung, ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.01$.

3.2.2 Konzentrationsabhängige Migration der hMSC

Inhalt dieses Versuchabschnittes war die Frage, ob die migrationsfördernde Wirkung der Chemokine IL-8, TGF-β1 und NT-3 auf die hMSC konzentrationsabhängig ist. Hierfür wurden die entsprechenden Chemokine in 1:10 Verdünnungsreihen eingesetzt, wobei die Maximalkonzentration jeweils die zehnfache der in der Literatur beschriebenen physiologischen Wirkungskonzentration war. Die verwendeten Konzentrationen waren für IL-8 30ng/ml, 3ng/ml und 0.3ng/ml; für TGF-β1 1ng/ml, 0.1ng/ml und 0.01ng/ml und für NT-3 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, zeigten alle drei untersuchten Chemokine einen signifikanten, konzentrationsabhängigen chemotaktischen Effekt auf die hMSC. Während bei IL-8 und NT-3 der maximale Effekt erst bei der höchsten Konzentration von 30ng/ml beziehungsweise 100ng/ml erzielt wurde, zeigte sich dieser bei TGF- β 1 bereits bei einer Konzentration von 0.1ng/ml. Hierbei war der maximale Migrationsindex bei TGF- β 1 2.0, bei NT-3 2.2 und bei IL-8 2.3. In der höchsten Verdünnungsstufe zeigte keines der Chemokine einen signifikanten migrationsfördernden Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle (IL-8: MI = 1.3, TGF- β 1: MI = 1.3, NT-3: MI = 1.4).

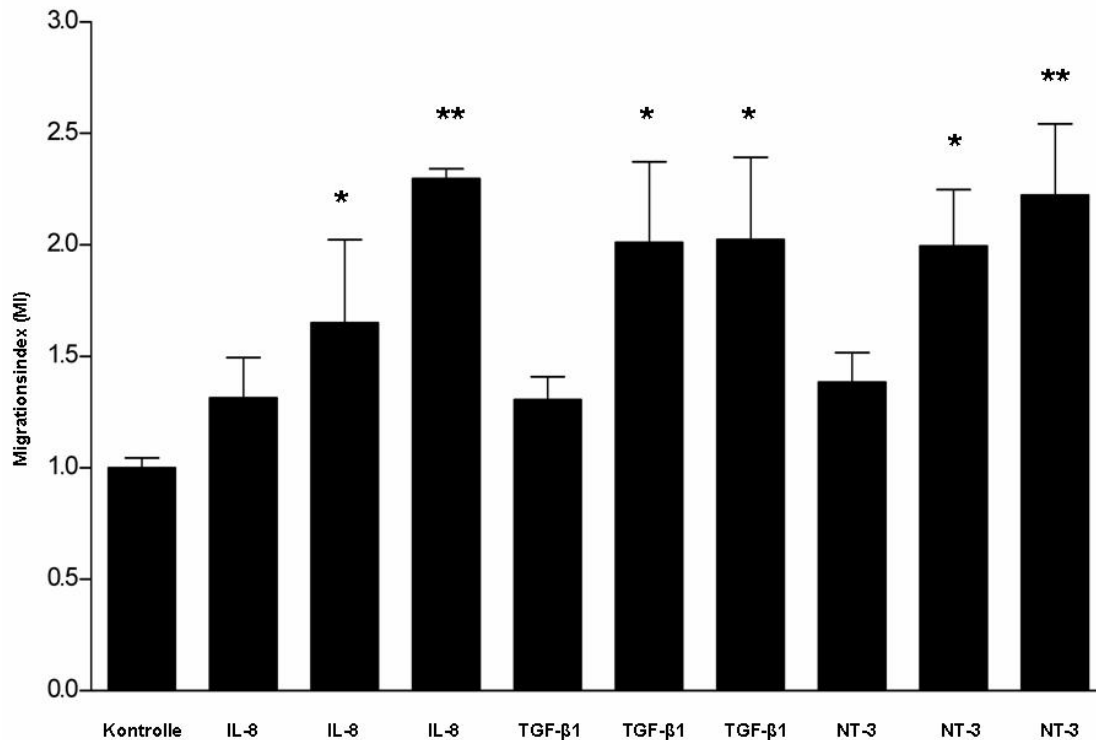


Abbildung 7: Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Migrationsversuche mit den Chemokinen IL-8, TGF-β1 und NT-3. Für alle drei getesteten Chemokine war der chemotaktische Effekt auf hMSC konzentrationsabhängig. Während bei IL-8 und NT-3 der maximale chemotaktische Effekt erst in der höchsten Konzentration erzielt wurde, zeigte sich dieser bei TGF-β1 bereits in der physiologischen Wirkkonzentration (TGF-β1: MI = 2.0, IL-8: MI = 2.3, NT-3: MI = 2.2). Balken: Migrationsindices, Fehlerbalken: Standardabweichung, ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.01$.

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

In den vorausgegangenen Versuchsabschnitten wurde die migrationsfördernde Wirkung der Chemokine IL-8, TGF-β1 und NT-3 auf hMSC nachgewiesen. Ziel dieses Versuchsabschnittes war die Darstellung der Rezeptoren jener Chemokine auf der Oberfläche der hMSC mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich, zeigten so gut wie alle hMSC eine starke Expression des IL-8 Rezeptors CXCR1. Ebenso exprimierte die Mehrheit der hMSC den NT-3 Rezeptor TrkC sowie den TGF- β 1 Rezeptor TGF- β -RII. Als Negativkontrolle diente eine Färbung ohne Zusatz eines Primärantikörpers. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass hMSC spezifische Rezeptoren für IL-8, TGF- β 1 und NT-3 exprimieren.

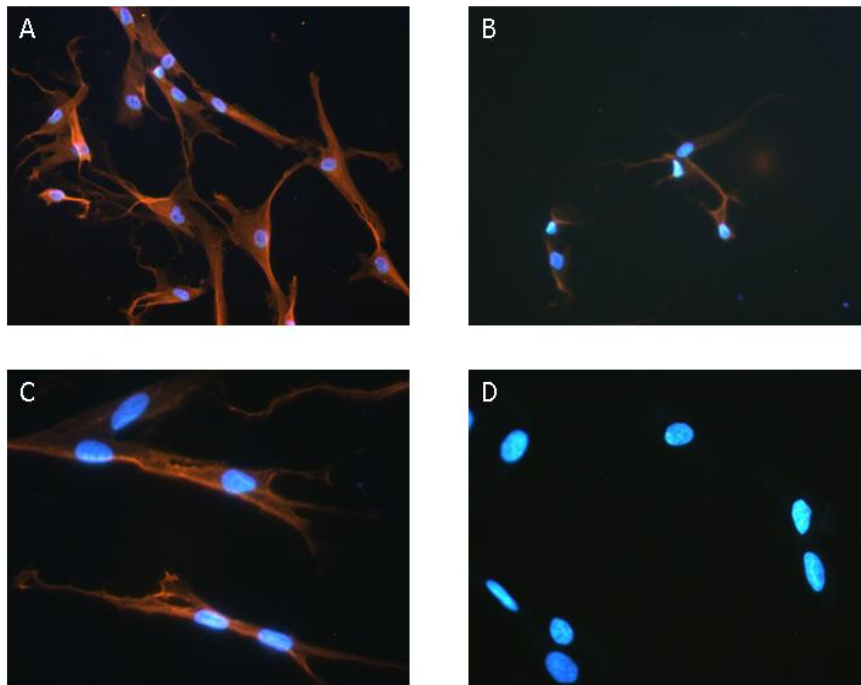


Abbildung 8: Nach Immunfluoreszenzfärbung zeigen sich auf der Oberfläche der hMSC die Rezeptoren CXCR1 (A), TGF- β -RII (B) sowie TrkC (C). Bild D zeigt die Negativkontrolle ohne vorherige Anwendung des Primärantikörpers. Originalvergrößerung (A) und (B) x 200, (C) und (D) x 400.

3.2.4 ELISA

Ziel dieses Versuchsabschnittes war der Nachweis der Produktion der Chemokine IL-8, NT-3 und TGF- β 1 durch Glioblastomzellen. Hierfür wurde mittels ELISA die Konzentration der Chemokine IL-8, NT-3 und TGF- β in den konditionierten Medien der Glioblastomlinien U-251, U-373 und MZ-54 bestimmt.

Wie in Tabelle 10 ersichtlich, produzierten alle drei Glioblastomlinien die untersuchten Chemokine in relevanten Mengen, obgleich die Konzentrationen zwischen den einzelnen Zelllinien erheblich variierten. Die in der Literatur beschriebene physiologische und von uns in den Versuchen verwendete Wirkungskonzentration ist für IL-8 3ng/ml, für TGF- β 1 0.1ng/ml und für NT-3 10ng/ml.

	IL-8 (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)	NT-3 (ng/ml)
U-251	1.02	3.10	13.21
U-373	6.46	1.15	6.67
MZ-54	11.68	2.59	8.01

Tabelle 10: Ergebnisse der ELISAs. Die in den glioblastomkonditionierten Medien nachgewiesenen Konzentrationen der Chemokine stimmten mit den in den Migrationsversuchen verwendeten Konzentrationen überein.

3.2.5 Neutralisationsversuche

Dieser letzte Versuchsabschnitt hatte zum Inhalt, die funktionelle Bedeutung der Chemokine IL-8, TGF- β 1 und NT-3 für den chemotaktischen Effekt von glioblastomkonditioniertem Medium auf hMSC nachzuweisen. Hierfür wurden Neutralisationsexperimente mit spezifischen Antikörpern für die drei Chemokine durchgeführt. Die chemotaktische Wirkung des glioblastomkonditionierten Medi-

ums wurde hierfür jeweils vor und nach Zugabe des entsprechenden Antikörpers verglichen.

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde wiederum ein Migrationsindex (MI) errechnet. Dabei diente das konditionierte Medium ohne die neutralisierenden Antikörper als Kontrolle:

$$\text{MI} = \text{Ergebnis Probe} / \text{Ergebnis Kontrolle}$$

Im Vergleich mit nicht behandeltem glioblastomkonditioniertem Medium kam es bei allen drei Chemokinen nach Neutralisierung zu einer bedeutenden Abnahme der Migration der hMSC (siehe Abbildungen 9 - 11). Im Falle von IL-8 war die Abnahme der chemotaktischen Wirkung bei den Glioblastomlinien U-373 und MZ-54 statistisch signifikant. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, verringerte sich der Migrationsindex jeweils auf 0.6. Auch bei der Tumorzelllinie U-251 zeigte sich eine Abnahme der chemotaktischen Wirkung durch Neutralisierung von IL-8. Diese war jedoch mit einem Migrationsindex von 0.7 aufgrund der Standardabweichung statistisch nicht signifikant. Interessanterweise zeigte diese Zelllinie im ELISA die geringste Produktion von IL-8.

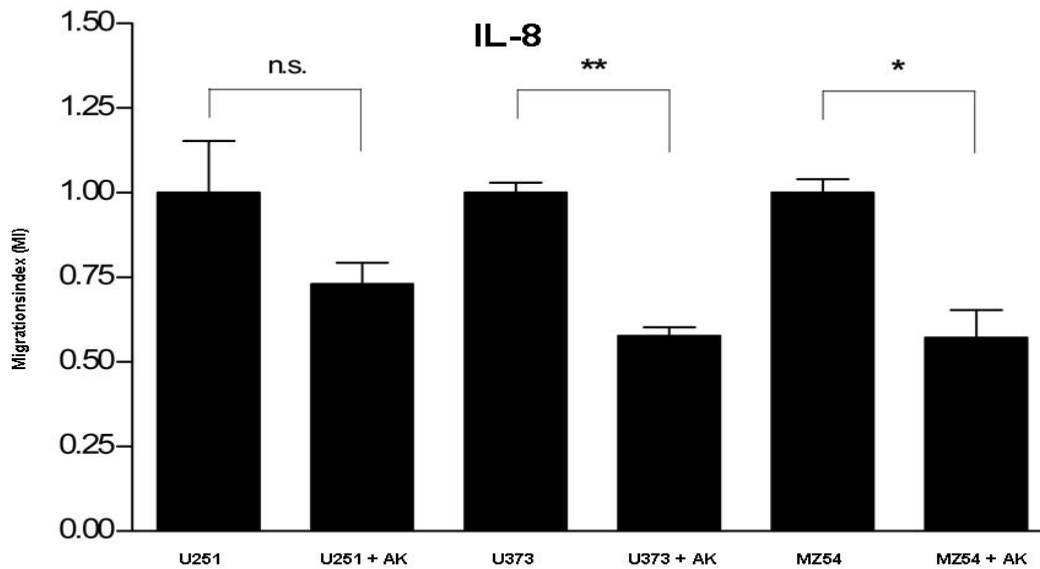


Abbildung 9: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit IL-8. Bei den Tumorzelllinien U-373 und MZ-54 führte die Neutralisation von IL-8 zu einer Abnahme des Migrationsindex auf 0.6. Bei U-251 verringerte sich die Migration der hMSC auf MI = 0.7. Balken: Migrationsindices, Fehlerbalken: Standardabweichung, ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.01$.

Durch Neutralisierung von TGF- β 1, beziehungsweise NT-3 zeigte sich bei allen untersuchten Glioblastomlinien eine statistisch signifikante Abnahme des Migrationsindex im Vergleich zur Kontrolle ohne Neutralisierung. Bezüglich TGF- β 1 kam es bei U-373 zur Abnahme des Migrationsindex auf 0.5, bei MZ-54 auf 0.6 und bei U-251 auf 0.7 (siehe Abbildung 10). Wie in Abbildung 11 ersichtlich, verringerte sich bei NT-3 der Migrationsindex für U-251 und U-373 auf jeweils 0.7, für MZ-54 auf 0.6.

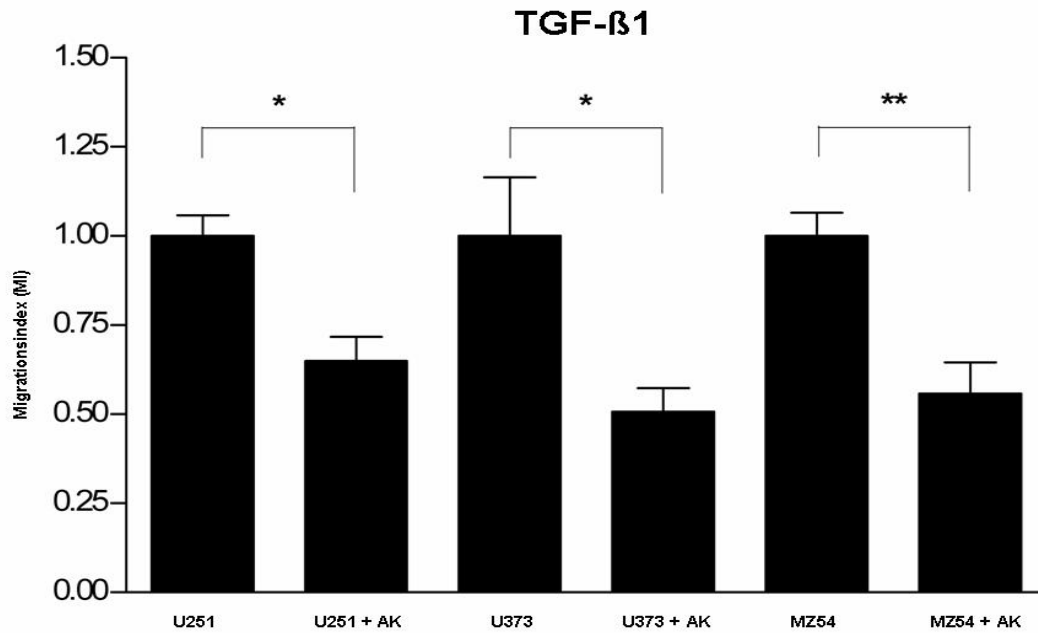


Abbildung 10: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit TGF- β 1. Die Migration der hMSC nahm nach Zugabe des neutralisierenden Antikörpers bei allen drei glioblastomkonditionierten Medien signifikant ab (U-251: MI = 0.7, U-373: MI = 0.5, MZ-54: MI = 0.6). Balken: Migrationsindices, Fehlerbalken: Standardabweichung, ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.01$.

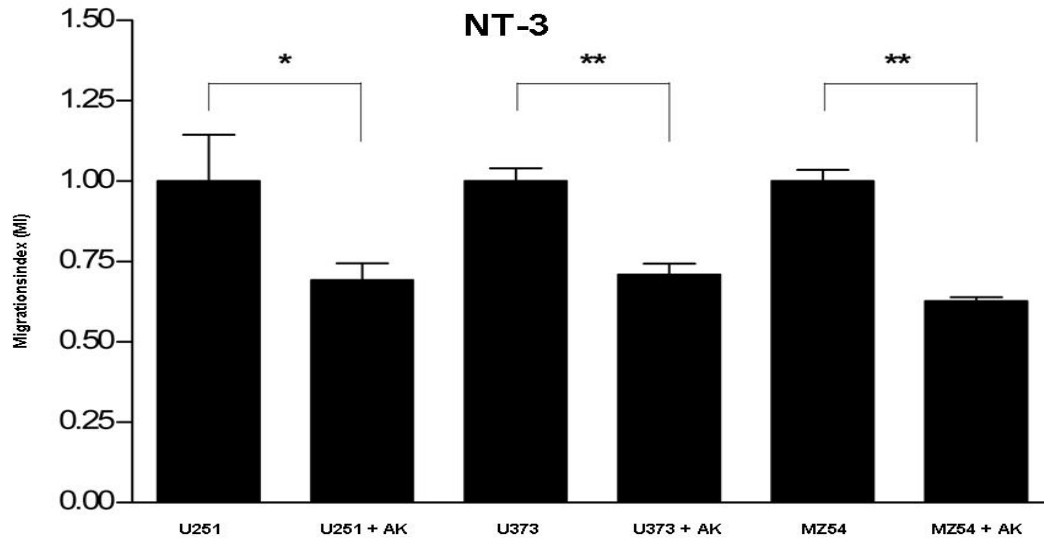


Abbildung 11: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit NT-3. Nach Zugabe des neutralisierenden Antikörpers nahm die Migration der hMSC bei allen untersuchten Tumorzelllinien signifikant ab (U-251: MI = 0.7, U-373: MI = 0.7, MZ-54: MI = 0.6). Balken: Migrationsindices, Fehlerbalken: Standardabweichung, ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.01$.

Die durch die vorliegende Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen auf, dass die Chemokine IL-8, TGF- β 1 und NT-3 einen signifikanten migrationsfördernden Effekt auf hMSC besitzen. Inwiefern dies im Kontext des glioblastominduzierten Tropismus der hMSC einzuordnen ist, soll in der folgenden Diskussion erläutert werden.

4 Diskussion

Für die schlechte Prognose des Glioblastoms gibt es mehrere Gründe. Zum einen weisen diese Tumore eine ausgeprägte Invasivität auf. Einzelne maligne Zellen lösen sich vom Tumorzellverband und wachsen weit bis in das gesunde Gewebe vor. Dies ist der Hauptgrund für die hohe Rezidivquote auch nach makroskopisch vollständiger chirurgischer Resektion. Zum anderen sind die Möglichkeiten einer gezielten und lokalen Therapie dieser Tumorsatelliten bislang aufgrund fehlender geeigneter Vektoren eingeschränkt.

In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte, dass neben NSC und HSC auch MSC einen starken glioblastominduzierten Tropismus aufweisen. Dies macht sie zu aussichtsreichen Kandidaten für ihre Verwendung als zelluläre Vektoren in der Therapie des Glioblastoms (Nakamizo et al., 2005; Aboody et al., 2000; Tabatabai et al., 2005). Dies liegt daran, dass hMSC gegenüber NSC einige entscheidende Vorteile besitzen. Zum einen sind sie mittels Knochenmarksaspiration sehr einfach zu gewinnen und im Anschluss zu isolieren (Colter et al., 2000). Da hMSC extrem proliferativ sind, können sie zudem leicht vermehrt und anschließend autolog transplantiert werden. Das macht die mit erheblichen Nebenwirkungen belastete Immunsuppression unnötig. Außerdem weisen hMSC immunmodulatorische Eigenschaften auf. So schwächt ihre Anwesenheit beispielsweise die graft-versus-host Reaktion bei der allogenen Transplantation von HSC ab (Chung et al., 2004). Ein zusätzlicher Pluspunkt der hMSC ist die Tatsache, dass ihre Verwendung, im Gegensatz zur Verwendung von ESC, ethisch unproblematisch ist.

Allerdings ist über den genauen molekularen Mechanismus des glioblastominduzierten Tropismus der hMSC bisher wenig bekannt. Um hMSC zukünftig in der Therapie des Glioblastoms einsetzen zu können, ist das genaue Verständnis der Wechselwirkungen zwischen hMSC und Glioblastomzellen nötig. Es wird vermutet, dass die Migration der hMSC ähnlich derer der HSC über lösliche Polypeptide, sogenannte Chemokine vermittelt wird. Welche Chemokine jedoch genau an dem Prozess beteiligt sind, war bislang unklar.

Die pathologischen Vorgänge, welche bei einem Gewebeuntergang stattfinden, führen zu Veränderungen im biochemischen Milieu des Körpers. Dies verursacht in den hMSC eine veränderte Regulation der Transkription und damit eine Anpassung dieser Zellen an die neuen Aufgaben und die veränderte Umgebung. So verläuft die Mobilisierung der hMSC aus dem Knochenmark in das periphere Blut und die darauf folgende Einwanderung jener Zellen in das entsprechende Gewebe schrittweise über Veränderungen der Zellen auf molekularer Ebene. An diesem komplexen Prozess ist eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokine und Rezeptoren beteiligt (Korbling et al., 2003). So wurde herausgefunden, dass hMSC zahlreiche Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1 und c-met funktionell auf ihrer Oberfläche exprimieren. Über diese Rezeptoren scheint die Migration der hMSC zu Stellen des Gewebeuntergangs hin vermittelt zu werden. Die Migration wird dabei gezielt gerichtet, je nachdem über welchen Rezeptor der Signalweg läuft. Hierbei sind die Rezeptoren CXCR5, CCR7, CXCR4 und CCR10 mit der Migration der hMSC in sekundäre Lymphorgane assoziiert. Dieser Prozess wird auch als „Homing“ bezeichnet. CCR4 und CCR10 sind mit dem Homing der hMSC in die Haut assoziiert, während über CCR10 zugleich auch die Migration jener Zellen in die Speicheldrüsen und in den Dünndarm vermittelt wird. Die Rezeptoren CXCR3, CCR5 und CCR1 sind in die Vermittlung von Entzündungsprozessen involviert (von Lüttichau et al., 2005; Sordi et al., 2005; Honczarenko et al., 2006). Die Migration von hMSC zu Orten des ischämischen Hirnschadens wird wahrscheinlich zumindest teilweise über das Monozyten-Chemoattraktives Protein-1 (MCP-1), das Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1a) und IL-8 vermittelt (Wang et al., 2002). CXCR1 und CXCR2 sind Rezeptoren für IL-8, ihre Expression auf hMSC spricht für eine Rolle dieses Chemokins im Prozess des Homings jener Zellen (Ringe et al., 2007). Ponte et al. beobachteten, dass viele Chemokine nach vorheriger Inkubation der hMSC mit TNF- α wirksamer waren als ohne Inkubation. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Mobilisierung der hMSC und ihre Migration zu Stellen des Gewebeuntergangs vom systemischen Entzündungszustand des Körpers abhängig ist. Der Transduktionssignalweg, welcher über die

Stimulation von Wnt/ β -Catenin vermittelt wird, könnte eine Schlüsselstellung in der Vermittlung der Migration und Gewebeinvasion der hMSC einnehmen (Neth et al., 2006). Über diesen Signalweg, an dessen Ende sich der Transkriptionsfaktor β -Catenin im Zellkern anhäuft, werden zudem die Proliferation und die Erhaltung der Pluripotenz von HSC und MSC vermittelt (Reya et al., 2002; De Boer et al., 2004).

Es ist schon länger bekannt, dass physiologische Prozesse nach einem traumatischen, ischämischen oder entzündlichen Gewebeschaden die Mobilisation und Migration der hMSC und die darauf folgende Geweberegeneration vermitteln (Shake et al., 2002; Barbash et al., 2003; Ji et al., 2004; Wang et al.; Murphy et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass humane Glioblastomzellüberstände *in-vitro* einen starken chemotaktischen Effekt auf hMSC besitzen. Die Neutralisation von VEGF-A, einem Chemokin welches von Glioblastomzellen überexprimiert wird, führt zu einer signifikanten Abnahme dieses chemotaktischen Effektes (Schichor et al., 2006). Die chemotaktische Wirkung wird jedoch nicht vollkommen blockiert. Deshalb wurde die Hypothese formuliert, dass neben VEGF-A noch zahlreiche andere von den Glioblastomzellen sezernierte Chemokine an der tumorvermittelten Migration der hMSC beteiligt sind. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass die Chemokine IL-8, TGF- β 1 und NT-3 *in-vitro* eine chemotaktische Wirkung auf hMSC haben. Für EGF, BDNF, CNTF, PDGF und GDNF konnte diese migrationsfördernde Wirkung dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse unserer Arbeit legen somit nahe, dass im Falle des Glioblastoms weniger die unspezifische Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes als vielmehr die Tumorzellen selbst die Migration der hMSC vermitteln.

Neben VEGF-A werden auch IL-8, TGF- β 1 und NT-3 von Glioblastomen überexprimiert (Charalambous et al., 2005; Desbaillets et al., 1999; Hamel et al., 1993; Platten et al., 2001). Die Hypoxie, welche vor allem im Zentrum der Tumormasse der Glioblastome WHO Grad IV vorherrscht, führt zu einem weiteren Anstieg der VEGF-A, IL-8 und TGF- β 1 Expression. Dies geschieht zum Teil über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)

(Kargiotis et al., 2006). Alle vier Chemokine stellen zudem Schlüsselchemokine in der Vermittlung der Tumorneoangiogenese dar. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Vermittlung von sowohl Angiogenese als auch glioblastom-induzierter Migration der hMSC über ähnliche Signalwege erfolgen (Kargiotis et al., 2006; Donovan et al., 1995; Brat et al., 2005).

HIF-1 und eines seiner Zielgene, VEGF-A, spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung des Wachstums und der Metastasierung von Glioblastomen. VEGF-A bindet an zwei spezifische Rezeptoren (VEGF-R1, VEGF-R2), welche mit dem p38 MAPK Signalweg und dem Protein Kinase C/ Raf-MEK-MAP Kinase Signalweg verbunden sind. Über diese Signalwege erfolgt eine starke Aktivierung der Mitose und der Chemotaxis von sowohl Endothelzellen als auch NSC (Kargiotis et al., 2006). Neben der enzymatischen Degradation der Basalmembran sind die Migration und Proliferation von Endothelzellen mit anschließender Tubusformation als die wichtigsten Schritte der Angiogenese anzusehen. Durch seine promitotische Wirkung auf Endothelzellen stellt VEGF-A somit einen wesentlichen Induktor der Gefäßneubildung dar.

IL-8 vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an den CXCR-1 Rezeptor. Sein Expressionsniveau korreliert positiv mit dem Malignitätsgrad von Gliomen. IL-8 hat eine starke chemotaktische Wirkung auf Leukozyten und kann die Angiogenese unabhängig von VEGF-A induzieren (Kargiotis et al., 2006).

Neben VEGF-A und IL-8 scheint auch TGF- β 1 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Glioblastomen zu spielen. So fördert es die Tumorprogression durch Verstärkung der Motilität und Invasivität der Glioblastomzellen und durch Suppression des Immunsystems des Betroffenen. Außerdem beeinflusst TGF- β 1 die Proliferation und Differenzierung zahlreicher Zelllinien, welche in der Angiogenese eine Rolle spielen. Durch seinen Einfluss wird die Expression von α v β 3 Integrin und von Matrix-Metallo Proteinase-2 in Endothelzellen gesteigert. Dadurch wird die Endothelzellmigration und Formation von Blutgefäßen erleichtert (Kargiotis et al., 2006).

Durch seine Bindung an den TrkC Rezeptor, zu dem es höchste Affinität besitzt, vermittelt NT-3 nicht nur die Proliferation und Differenzierung von Neuronen, sondern auch die Migration von glatten Muskelzellen und Gliazellen (Donovan et al., 1995). Obwohl die exakten molekularen Mechanismen noch nicht vollkommen verstanden sind, wird eine autokrine und/ oder parakrine Rolle der über-exprimierten Neurotrophine und ihrer spezifischen Rezeptoren bei der Pathogenese von Glioblastomen vermutet (Hamel et al., 1993).

Wie oben ausgeführt spielen die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Chemokine eine Schlüsselrolle sowohl in der Promotion der Tumorangiogenese als auch in der Vermittlung des glioblastominduzierten Tropismus der hMSC. Somit liegt die Hypothese nahe, dass hMSC in dem Prozess der Tumorangiogenese eine aktive Rolle spielen. Dieser Beitrag der hMSC könnte auf zwei Arten erfolgen. Entweder direkt durch Differenzierung der hMSC in Endothelzellen, Perizyten oder glatte Muskelzellen oder indirekt durch Differenzierung in „unterstützende“ Stromazellen. Diese Stromazellen könnten entweder eine Wirkung auf die extrazelluläre Matrix ausüben und/ oder die Migration, Invasion oder Proliferation von Endothel und/ oder glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen. Für eine Beteiligung der MSC in angiogenetischen Prozessen sprechen mehrere aktuelle Publikationen. In einem Hundemodell eines chronisch ischämischen Herzversagens wurde nachgewiesen, dass MSC von dem hypoxischen Myokard angezogen wurden und sich zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen ausdifferenzierten. Dies führte zu einer dichteren Gefäßversorgung des Herzens (Silva et al., 2005). Andererseits scheinen MSC, die von einer fokalen zerebralen Ischämie angezogen werden, das funktionelle Outcome durch indirekte Effekte wie die Verhinderung von Vernarbung und Apoptose und die Förderung der Angiogenese durch die Sekretion von zahlreichen Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu verbessern (Li et al., 2005; Chen et al., 2003). Außerdem wurde herausgefunden, dass MSC die proangiogenetische Wirkung von VEGF-A in einem *in-vitro* Kokultur Assay verstärken (Tille et al., 2002). Wenn man all diese Ergebnisse auf das Glioblastommodell überträgt, könnten die hMSC entweder

direkt oder indirekt eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese des Glioblastoms spielen.

Aufgrund unserer Ergebnisse liegt deshalb die Schlussfolgerung nahe, dass die Kombination aus jeglicher hMSC-basierter Therapie mit antiangiogenetischen Strategien (wie zum Beispiel VEGF-A-Rezeptorantagonisten) nicht vielversprechend ist, da die Antagonisierung des angiogenetischen Potentials einen negativen Einfluss auf die Migration der hMSC haben könnte.

Wegen ihres starken glioblastominduzierten Tropismus und ihrer leichten Handhabung stellen hMSC vielversprechende Vektoren für genbasierte Strategien in der Therapie des Glioblastoms dar. Der Beitrag der hMSC zu den pathologischen Veränderungen im Gehirn eines Patienten mit Glioblastom ist aber noch weithin unverstanden. Es müssen zukünftig noch zahlreiche *in-vitro* und *in-vivo* Studien unternommen werden, um die genauen Interaktionen zwischen hMSC und Glioblastomen zu verstehen. Zudem gilt es zu klären, ob und wenn ja, in welchem Rahmen hMSC einen Beitrag zur Angiogenese der Glioblastome leisten und damit möglicherweise selber einen tumorwachstumsfördernden Effekt haben könnten.

Gegen die hier erwähnte Hypothese des entweder direkten oder indirekten Beitrages der hMSC zur Tumorangio-genese und Tumorprogression sprechen mehrere Literaturquellen. So konnten Nakamura et al. einen antitumorösen Effekt von GFP-markierten, aber ansonsten unveränderten MSC in einem Rattenmodell nachweisen. Es wurde vermutet, dass dieser Effekt auf die Sekretion von Nerve Growth Factor (NGF) und/ oder Angiopoetin-1 (Ang-1) durch die MSC zurückzuführen ist. Dies führt dann in der Konsequenz zu einer Induktion der Differenzierung und damit zu einer Inhibition des Tumorwachstums. Andererseits könnte der beobachtete antitumoröse Effekt auch durch eine Verbesserung der Blut-Hirn-Schranke durch die MSC bedingt sein (Nakamura et al., 2004).

Zum Thema der tumorinduzierten Migration von Progenitorzellen finden sich zahlreiche publizierte Arbeiten mit teilweise widersprüchlichen Forschungs-

ergebnissen. Während in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ein starker chemotaktischer Effekt von VEGF-A auf hMSC nachgewiesen werden konnte, postulierten Nakamizo et al., dass EGF, PDGF und SDF-1, aber nicht VEGF-A oder bFGF die Schlüsselmediatoren des glioblastominduzierten Tropismus der hMSC seien (Schichor et al., 2006; Nakamizo et al., 2005). Diese Ergebnisse wiederum widersprechen denen der vorliegenden Arbeit, in denen kein chemotaktischer Effekt von PDGF und EGF auf hMSC beobachtet werden konnte. Während unsere Arbeitsgruppe eine starke Expression des IL-8 Rezeptors CXCR-1 auf der Oberfläche der hMSC darstellen konnte, wurde von Honczarenko et al. keine Expression dieses Rezeptors auf den hMSC nachgewiesen (Honczarenko et al., 2006). Honczarenko beobachtete stattdessen eine starke Expression des SDF-1 Rezeptor CXCR-4, was wiederum von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnte (von Lüttichau et al., 2005). Die hier genannten widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch eines der Hauptprobleme der Arbeit mit hMSC bedingt sein: Diese Zelllinie ist bisher noch nicht gut charakterisiert. Vermutlich verbirgt sich unter dem Begriff „mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks“ eine Anzahl verschiedener Subpopulationen von Progenitorzellen, deren Unterscheidung anhand der gängigen Methoden bislang noch nicht etabliert ist. In der vorliegenden Arbeit wurden hMSC definiert als mononukleäre Zellen des Knochenmarks, welche für die Oberflächenmarker CD 105 und CD 44 positiv sind, während sie für CD 11b, CD 14, CD 31 und CD 34 negativ sind. Zudem wiesen sie in Zellkultur die Kriterien Adhäsion an den Zellflaschenboden, typische fibroblastenähnliche Morphologie und Proliferation unter FBS auf. In anderen Arbeitsgruppen wurden zur Charakterisierung der hMSC andere Methoden angewendet. Während einige Arbeitsgruppen hMSC rein phänotypisch anhand eines Expressionsmusters von Oberflächenmolekülen definierten (Mansilla et al., 2006), wurden hMSC anderenorts auch zusätzlich hinsichtlich ihres genetischen Profils und ihrer zytochemischen Eigenschaften charakterisiert (Luz et al., noch nicht veröffentlichte Ergebnisse; Dominici et al., 2006). Zudem sind neben der Art der Isolation auch die Zellkulturbedingungen ausschlaggebend für die Subpopulation der hMSC, die unter den gegebenen

Rahmenbedingungen vorzugsweise proliferiert. So scheint zum Beispiel die Art und der Inhalt des verwendeten FBS eine entscheidende Rolle auf die Proliferation einer bestimmten Subpopulation zu spielen.

Um diese Probleme in Zukunft vermeiden zu können, müssen hMSC besser definiert und die Methoden der Isolation, Kultur und Charakterisierung standardisiert werden. Dafür sind hMSC-spezifische Oberflächenmarker und bessere Kenntnisse über die einzelnen im Knochenmark vorhandenen Subpopulationen der Progenitorzellen notwendig.

Die in dieser Arbeit dargestellten Erkenntnisse wurden durch Beobachtungen *in-vitro* gewonnen. Ob diese Mechanismen auch *in-vivo* Bestand haben, kann erst durch Tierversuche bestätigt werden. Auch müssen mittels *in-vivo* Experimenten die Risiken einer genbasierten Therapiestrategie hinreichend untersucht werden. So könnte es zum Beispiel für den Fall, dass hMSC direkt in die pathologischen Blutgefäße einwandern, bei der Verwendung von mit einem „suicide gene“ transfizierten hMSC zu starken Blutungen kommen. Deshalb müssen noch zahlreiche *in-vitro* und vor allem *in-vivo* Assays unternommen werden, um die genauen Interaktionen zwischen hMSC und Glioblastomzellen besser verstehen zu können. Erst Langzeitstudien werden die Sicherheit der Verwendung von hMSC als zelluläre Vektoren in der Therapie des Glioblastoms abschließend klären können.

Das Wissen um die Chemokine, die den chemotaktischen Effekt der Glioblastomzellen auf hMSC vermitteln, hat einen konkreten Verwendungsansatz. Der Erfolg einer jeden zellbasierten Gentherapie hängt hauptsächlich von der Effektivität ab, mit der die transfizierten Zellen in das Tumorgewebe eingebracht werden können. Unselektierte hMSC stellen, wie weiter oben beschrieben, einen heterogenen Zellpool dar. Deshalb könnte die Effektivität einer hMSC-basierten Gentherapie wahrscheinlich durch eine Präselektion der hMSC gesteigert werden. Diese Selektion könnte zum Beispiel anhand der Identifizierung der Expression der Chemokinrezeptoren VEGF-R, CXCR-1, TGF- β -R und TrkC durchgeführt werden. Über diese Rezeptoren wird nach unseren Ergebnissen der glioblastominduzierte

Tropismus der hMSC vermittelt. Außerdem könnte durch die Analyse des partikulären Chemokinexpressionsprofils der unterschiedlichen Tumorproben womöglich die „beste“ hMSC Subpopulation eines jeden individuellen Patienten gefunden werden. Auch somit könnte mittels einer Präselektion der hMSC einem durch Variieren des Chemokinexpressionsprofils begründeten Fehlschlagens der Therapie vorgebeugt werden. Um für die klinische Verwendung relevante Erkenntnisse zu schaffen, müssen in Zukunft noch *in-vivo* Studien über die Effektivität von unselektierten versus präselektierten hMSC unternommen werden.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme ist ein maligner hirneigener Tumor mit einer bislang infausten Prognose. Humane mesenchymale Progenitorzellen des Knochenmarks (hMSC) zeigen *in-vitro* und *in-vivo* einen ausgeprägten glioblastom-induzierten Tropismus. Sie sind einfach in der Handhabung, weil sie leicht zu gewinnen, in Kultur zu vervielfältigen und anschließend autolog zu transplantieren sind. Diese Eigenschaften machen hMSC zu vielversprechenden Kandidaten für eine zellbasierte Gentherapie des Glioblastoms.

Die molekularen Mechanismen, welche zu der gerichteten Migration der hMSC hin zu den Glioblastomzellen führen und die biologischen Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und Tumorzellen sind bisher kaum verstanden. Um erste Einblicke in diese Wechselwirkungen zu erlangen, wurden im Rahmen des vorliegenden Promotionsvorhabens *in-vitro* Untersuchungen zu den Grundlagen des glioblastominduzierten Tropismus von hMSC durchgeführt. Die Fragestellung befasste sich insbesondere damit, welche Chemokine an der Vermittlung der glioblastomgerichteten Migration von hMSC beteiligt sind.

Hierzu wurden Migrationsversuche mit einer modifizierten Boyden Kammer durchgeführt, wobei zunächst einige bekannte glioblastomassoziierte Chemokin-kandidaten (IL-8, NT-3, TGF- β 1, EGF, CNTF, GDNF, PDGF und BDNF) getestet wurden. Eine signifikante chemotaktische Eigenschaft auf hMSC wurde hierbei für IL-8, TGF- β 1 und NT-3 beobachtet. Die promigratorische Wirkung dieser drei Chemokine erwies sich hierbei als konzentrationsabhängig. Im Weiteren wurde nachgewiesen, dass die bekannte chemotaktische Wirkung von glioblastom-konditioniertem Medium auf hMSC durch die Zugabe von IL-8, TGF- β , beziehungsweise NT-3 neutralisierenden Antikörpern signifikant reduziert wird. Somit konnte funktionell nachgewiesen werden, dass diese Chemokine tatsächlich eine Rolle beim glioblastominduziertem Tropismus der hMSC spielen. Ergänzend wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Expression der entsprechenden Chemokin-

rezeptoren auf den hMSC nachgewiesen und die Sekretion der Chemokine durch die Glioblastomzellen mittels ELISA quantifiziert.

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass auch VEGF-A eine chemotaktische Wirkung auf hMSC besitzt. Wie VEGF-A werden auch IL-8, TGF- β 1 und NT-3 von Glioblastomen überexprimiert. Zudem wird über diese Chemokine die Neoangiogenese jener Tumore vermittelt. Dies führt zu der Hypothese, dass Glioblastome die Migration der hMSC aus dem peripheren Blut in das Tumorgebiet über angiogenetische Signalwege vermitteln. Damit könnten hMSC an dem Prozess der Angiogenese des Glioblastoms beteiligt sein.

Ein genaues Verständnis des möglichen Beitrages von hMSC zum Glioblastomwachstum ist eine unabdingbare Voraussetzung für ihre mögliche klinische Anwendung als gentherapeutische Vektoren beim Menschen. Deshalb müssen zukünftig neben weiteren *in-vitro* vor allem *in-vivo* Studien mit Langzeitbeobachtungen im Tiermodell durchgeführt werden. In diesen Studien sollten die Auswirkungen einer Transplantation nativer hMSC einerseits und genetisch modifizierter therapeutischer hMSC andererseits auf das Glioblastomwachstum untersucht werden. Die vielversprechenden Ergebnisse der bisher vorliegenden Arbeiten lassen hoffen, dass in nicht allzu ferner Zukunft eine bessere Therapie für Patienten mit Glioblastom gefunden werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Aboody 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(23):12846-51.

Airaksinen MS, Saarma M (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.*; 3(5):383-94. Review.

Alavi JB, Eck SL (2001). Gene therapy for high grade gliomas. *Expert Opin Biol Ther.*; 1(2):239-52. Review.

Ali S, Curtin JF, Zirger JM, Xiong W, King GD, Barcia C, Liu C, Puntel M, Goverdhana S, Lowenstein PR, Castro MG (2004). Inflammatory and anti-glioma effects of an adenovirus expressing human soluble Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (hsFlt3L): treatment with hsFlt3L inhibits intracranial glioma progression. *Mol Ther.*; 10(6):1071-84.

Ali S, King GD, Curtin JF, Candolfi M, Xiong W, Liu C, Puntel M, Cheng Q, Prieto J, Ribas A, Kupiec-Weglinski J, van Rooijen N, Lassmann H, Lowenstein PR, Castro MG (2005). Combined immunostimulation and conditional cytotoxic gene therapy provide long-term survival in a large glioma model. *Cancer Res.* 2005; 65(16):7194-204.

Alvarez JA, Baird A, Tatum A, Daucher J, Chorsky R, Gonzalez AM, Stopa EG (1992). Localization of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human glial neoplasms. *Mod Pathol.*; 5(3):303-7.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.*; 8:963–970.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.*; 84(4):1045-9. Review.

Baird A, Walicke PA (1989). Fibroblast growth factors. *Br Med Bull.*; 45(2):438-52. Review.

Barba D, Saris SC, Holder C, Rosenberg SA, Oldfield EH (1989). Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J Neurosurg.*; 70(2):175-82.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J (2003). Systemic delivery of bone- marrow derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.*; 108:863-868.

Barde YA (1990). The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.*; 2(4):237-48. Review.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL (1990). The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta.*; 1032(1):79-87. Review.

Becker N, Wahrendorf J (1997). Krebsatlas der BRD. Springer.; 1981-1990.

Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B, Di Marco E, Di Fiore PP, Robbins KC, Aaronson SA (1988). Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science.*; 241(4871):1346-9.

Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, Galli R, Selleri S, Di Meco F, De Fraja C, Vescovi A, Cattaneo E, Finocchiaro G (2000). Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med.*; 6(4):447-50.

Berghoff W, Maurer M, Oberdisse K, Tönnis W, Wilcke O (1962). Handbuch der Neurochirurgie IV/3: Klinik und Behandlung der raumbeengenden intrakraniellen Prozesse III. Springer- Verlag Heidelberg.

Bigner DD, Brown MT, Friedman AH, Coleman RE, Akabani G, Friedman HS, Thorstad WL, McLendon RE, Bigner SH, Zhao XG, Pegram CN, Wikstrand CJ, Herndon JE 2nd, Vick NA, Paleologos N, Cokgor I, Provenzale JM, Zalutsky MR (1998). Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *J Clin Oncol.*; 16(6):2202-12.

Black PM, Loeffler J (1997). Cancer of the Nervous System. Oxford: Blackwell.

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol.*; 7(2):122-33. Review.

Burger PC (1990). Classification, Grading and Patterns of Spread of Malignant Gliomas. In: Apuzzo MLJ (Ed.). Malignant cerebral glioma. American Association of Neurological Surgeons 1991.

Carpenter G (1985). Epidermal growth factor: biology and receptor metabolism. *J Cell Sci Suppl.*; 3:1-9. Review.

Charalambous C, Pen LB, Su YS, Milan J, Chen TC, Hofman FM (2005). Interleukin-8 differentially regulates migration of tumor-associated and normal human brain endothelial cells. *Cancer Res.*; 65(22):10347-54.

Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M (2003). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res.*; 73(6):778-86.

Chung NG, Jeong DC, Park SJ, Choi BO, Cho B, Kim HK, Chun CS, Won JH, Han CW (2004). Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal

graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.*; 80(4):370-6.

Cohen S, Leshanski L, Itskovitz-Eldor J (2006). Tissue engineering using human embryonic stem cells. *Methods Enzymol.*; 420:303-15.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97:3213–8.

Conget PA, Minguell JJ (2000). Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol.*; 28:382–90.

Conget PA, Minguell JJ (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.*; 181(1):67-73.

David S, Yancopoulos GD (1993). The molecular biology of the CNTF receptor. *Curr Opin Cell Biol.*; 5(2):281-5. Review.

Davis FG , McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML (1999). The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors. Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer.*; 85:485-491.

De Boer J, Wang HJ, Van Beitterswijk C (2004). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*; 10:393–401.

Desbaillets I, Diserens AC, de Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG (1999). Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene.*; 18(7):1447-56.

De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003). Differential expression of stem cell mobilization-

associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett.*; 89(2-3):267-70.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.*; 99(10):3838-43.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*; 8(4):315-7.

Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L (1995). Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol.*; 147(2):309-24.

Dunn IF, Black PM (2003). The neurosurgeon as a local oncologist: cellular and molecular neurosurgery in malignant glioma therapy. *Neurosurgery.*; 52:1411-1422; discussion 1422-1414.

Dunn IF, Heese O, Black PM (2000). Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J Neurooncol.*; 50(1-2):121-37. Review.

Ehtesham M, Kabos P, Gutierrez MA, Chung NH, Griffith TS, Black KL, Yu JS (2002). Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.*; 62(24):7170-4.

Ehtesham M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS (2002). The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res.*; 62(20):5657-63.

Eide FF, Lowenstein DH, Reichardt LF (1993). Neurotrophins and their receptors-current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol.*; 121(2):200-14. Review.

Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.*; 59(1):99-106.

Gage FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science.*; 287(5457):1433-8. Review.

Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1987). Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl.*; Suppl 5:15-26. Review.

Grossman SA, O'Neill A, Grunnet M, Mehta M, Pearlman JL, Wagner H, Gilbert M, Newton HB, Hellman R (2003). Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 2394. *J Clin Oncol.*; 21:1485-91.

Hamel W, Westphal M, Szonyi E, Escandon E, Nikolics K (1993). Neurotrophin gene expression by cell lines derived from human gliomas. *J Neurosci Res.*; 34(2):147-57.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.*; 352(10):997-1003.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nistér M (1992). Platelet-derived growth factor and its receptors in human

glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.*, 52:3213-3219.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.*; 24(4):1030-41.

Hou JG, Lin LF, Mytilineou C (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem.*; 66(1):74-82.

Huang SS, Kuo MD, Huang JS (1986). Transforming growth factor activity of bovine brain-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.*; 139(2):619-25.

Huber BE, Richards CA, Austin EA (1994). Virus-directed enzyme/prodrug therapy (VDEPT). Selectively engineering drug sensitivity into tumors. *Ann N Y Acad Sci.*; 716:104-14; discussion 140-3.

Jendrossek V, Belka C, Bamberg M (2003). Novel chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs.*; 12(12):1899-924. Review.

Jennings MT, Pietenpol JA (1998). The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol.*; 36(2):123-40. Review.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS (2004). Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem cells.*; 22:415-427.

Jiang J, 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.

Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PM (2001). Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol.*; 19(1):35-9.

Kargiotis O, Rao JS, Kyritsis AP (2006). Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol.*; 78(3):281-93.

Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY (2006). Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep.*; 8(1):58-70.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 61:215-225.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.*; 258(5089):1798-801.

Korbling M, Estrov Z (2003). Adult stem cells for tissue repair—A new therapeutic concept? *N Engl J Med.*; 349:570–582.

Kortmann RD, Becker G, Kühl J, Bamberg M (1998). Strahlentherapie bei malignen Gliomen. *Onkologe.*; 4:608-17.

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002). The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.*; 64(3):259-273.

Le Blanc K (2006). Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.*; 8(6):559-61. Review.

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 3. überarbeitete Auflage 2005, ISBN3-13-132413-9; Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Lewin GR, Barde YA (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.*; 19:289-317. Review.

Li H, Alonso-Vanegas M, Colicos MA, Jung SS, Lochmuller H, Sadikot AF, Snipes GJ, Seth P, Karpati G, Nalbantoglu J (1999). Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma. *Clin Cancer Res.*; 5(3):637-42.

Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M (2005). Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.*; 49(3):407-17.

Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, Xiao X (2002). Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther.*; 9(1):2-11.

Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, Bossi S, Lamonega R, Guzman A, Nunez A, Gil MA, Piccinelli G, Ibar R, Soratti C (2006). Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.*; 38(3):967-9.

Merchant RE, McVicar DW, Merchant LH, Young HF (1992). Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant interleukin-2 alone or in combination with systemic interferon-alpha. Results of a phase I clinical trial. *J Neurooncol.*; 12(1):75-83.

Miyazono K, Heldin CH (1992). Structure, function and possible clinical application of transforming growth factor-beta. *J Dermatol.*; 19(11):644-647.

Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, Matsushima K (1992). Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8)

and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol.*; 36(8):773-789.

Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FB (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*; 48:3464-3474.

Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.*; 65(8):3307-18.

Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H (2004). Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.*; 11(14):1155-64.

Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar LK, Chakravarti A, Muzikansky A, Stemmer-Rachamimov A, Chiocca EA, Aguilar-Cordova E, Hochberg FH (2004). The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J Neurooncol.*; 67(1-2):177-88.

Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C (2006). Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.*; 24(8):1892-903.

Phuphanich S, Carson KA, Grossman SA, Lesser G, Olson J, Mikkelsen T, Desideri S, Fisher JD; for the New Approaches to Brain Tumor Therapy (NABTT) CNS Consortium (2008). Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol.*; 10(4):617-623.

Pittenger MS, 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.

Platten M, Wick W, Weller M (2001). Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech.*; 52(4):401-10. Review.

Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, Charbord P, Domenech J (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.*; 25(7):1737-45.

Price MJ, Frantzen M, Kar S, McClean D, Gou G, Shah PK, Martin BJ, Makkar RR (2003). Intravenous allogeneic mesenchymal stem cells home to myocardial injury and reduce left ventricular remodeling in a porcine balloon occlusion-reperfusion model of myocardial infarction. *J Am Coll Card.*; 41:269A.

Prockop DJ (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.*; 276:71-74.

Remmele W, Pfeiffer J, Schröder JM [Hrsg.] (1995). Pathologie: Neuropathologie, Skelettmuskulatur, Sinnersorgane: 6. Band. Springer- Verlag Heidelberg.

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.*; 423:409–414.

Reyes M, Verfaillie CM (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci.*; 938:231-3; discussion 233-5.

Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittinger M (2007). Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.*; 101(1):135-46.

Rodriguez-Gomez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB, McKay RD (2007). Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells.*; 25(4):918-28.

Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramie GR, Nikolics K, Winslow JW (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron.*; 4(5):767-73.

Sato Y, Shimada T, Takaki R (1991). Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.*; 180(2):1098-102.

Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn JC, Goldbrunner R (2006). Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol.*; 199(2):301-10.

Schlegel J, Peraud A, Bise K (2001). WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In: Reulen HJ, Kreth FW (Bandherausgeber), Tumorzentrum München (Hrg.). Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks. W. Zuckschwerdt Verlag München 2001.

Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol.*; 139(10):3474-83.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects [discussion *Ann Thorac Surg.*; 73:1926]. *Ann Thorac Surg.*; 73:1919-1925.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95(23):13726-31.

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.*; 111(2):150-6.

Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.*; 106(2):419-27.

Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ (2000). Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg.*;93(6):1003-13.

Stummer W, Steiger HJ (2002). Resection of glioblastoma. *J Neurosurg.*; 96(4):809-10.

Stupp R., Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Cairncross JG, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.*; 352(10):987-96.

Tabatabai G, Bahr O, Mohle R, Eyupoglu IY, Boehmler AM, Wischhusen J, Rieger J, Blumcke I, Weller M, Wick W (2005). Lessons from the bone marrow: how malignant glioma cells attract adult haematopoietic progenitor cells. *Brain.*; 128(Pt 9):2200-11.

Tille JC, Pepper MS (2002). Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res.*; 280(2):179-91.

Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, Ikeda T, Amuro Y, Hada T, Higashino K (1992). Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta.*; 1137(2):189-96.

Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z (1990). Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*; 9(3):203-26. Review.

Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R, Nelson PJ (2005). Human adult CD34-progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev.*; 14(3):329-36.

Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M (2002). MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology.*; 7:113-117.

Weis J, Schonrock LM, Zuchner SL, Lie DC, Sure U, Schul C, Stogbauer F, Ringelstein EB, Halfter H (1999). CNTF and its receptor subunits in human gliomas. *J Neurooncol.*; 44(3):243-53.

Westermark B, Heldin CH (1993). Platelet-derived growth factor. Structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol.*; 32(2):101-5. Review.

Wiesenhofer B, Stockhammer G, Kostron H, Maier H, Hinterhuber H, Humpel C (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor (GFR-alpha 1) are strongly expressed in human gliomas. *Acta Neuropathol (Berl.)*; 99(2):131-7.

Zülch K, Bailey P (1986). Brain Tumors, Their Biology and Pathology. Springer-Verlag Heidelberg.

7 Anhang

7.1 *Abkürzungsverzeichnis*

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
ACNU	Nimustin
AK	Antikörper
Ang-1	Angiopoetin-1
BCNU	Carmustin
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
CCNU	Lomustin
CNTF	Human Ciliary Neurotrophic Factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidiophenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESC	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDNF	Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GY	Gray
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IFN-β	Interferon beta

IL	Interleukin
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktives Protein-1
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MI	Migrationsindex
MIP-1a	Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
NGF	Nerve Growth Factor
NSC	Neurale Stammzelle
NT-3	Neurotrophin-3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCV	Procarbazin, Lomustin, Vincristin
PDGF	Platelet- derived Growth Factor
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Cell-derived Factor-1
TGF- β 1	Transforming Growth Factor beta 1
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Including Ligand
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
α - MEM	α -Minimal Essential Medium

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: <i>Christaras A (2003)</i> . Glioblastom.....	7
Abbildung 2: Ficoll Dichte Gradient-Methode.....	28
Abbildung 3: Makroskopische Ansicht einer Filtermembran mit migrierten und eingefärbten hMSC.....	33
Abbildung 4: Ergebnisse FACS-Analyse.....	41
Abbildung 5: Mikroskopische Ansicht einer Filtermembran mit migrierten und eingefärbten hMSC.....	42
Abbildung 6: Ergebnisse der Migrationsversuche.....	44
Abbildung 7: Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Migrationsversuche mit den Chemokinen IL-8, TGF- β 1, NT-3.....	46
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung.....	47
Abbildung 9: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit IL-8.....	50
Abbildung 10: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit TGF- β 1.....	51
Abbildung 11: Ergebnisse der Neutralisierungsversuche mit NT-3.....	52

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien und Geräte für die Zellkultur.....	28
Tabelle 2: Reagenzien für die Zellkultur	29
Tabelle 3: Materialien und Reagenzien für die Ficoll Dichte Gradient-Methode	31
Tabelle 4: Materialien und Reagenzien für die FACS-Analyse.....	33
Tabelle 5: Materialien und Reagenzien für das Migrationsassay	36
Tabelle 6: Chemokine und Antikörper	37
Tabelle 7: Materialien und Reagenzien für das ELISA	39
Tabelle 8: Materialien und Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung	40
Tabelle 9: Programme für die Statistik	41
Tabelle 10: Ergebnisse der ELISAs.....	48

8 Danksagung

Am Ziel eines langen Weges ist es mit ein besonderes Anliegen, all denen meinen Dank auszusprechen, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden.

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Straube für die Überlassung des Themas, sowie für die ständige Unterstützung und Förderung meiner Person, welche weit über die normale Betreuung eines Doktoranden hinaus ging, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Birnbaum für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Ohne ihn wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern und besonders bei den Spendern der Stiftung Aktion Knochenmarkspende Bayern in Gauting für die freundliche Überlassung des Restmaterials der Knochenmarkspende.

Ich danke allen Mitarbeitern der Neurologischen und Neurochirurgischen Klinik Großhadern sowie insbesondere den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppen Straube, Goldbrunner und Pfister für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, Philipp, Philipp, Heinz, Ana, Ferdi und Joe, von denen jeder einzelne seinen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.