

Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. J.C. Tonn

In vitro Charakterisierung von Migration und Invasion adulter humaner
mesenchymaler Stammzellen in Interaktion mit humanen Gliomen

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

vorgelegt von
Nima Etminan

aus
Hagen

Jahr
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. R. Goldbrunner

Mitberichterstatter: PD Dr. med. E.M. Grasbon-Frodl
PD Dr. med. B. Wowra

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ch. Schichor

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.2008

*Dedicated to my dearest Uncle Zabi, who among
many others struggles with cancer everyday*

1.	Einleitung	1
1.1	Klassifikation von Hirntumoren	1
1.2	Glioblastoma multiforme	2
1.2.1	Einordnung und Epidemiologie	2
1.2.2	Klinik und Diagnostik	2
1.2.3	Therapiestrategien und Prognose	4
1.3	Sphäroidmodell	6
1.4	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	7
1.5	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	9
1.6	Zielsetzung	11
2.	Materialien	13
2.1	Geräte und Laborhilfen	13
2.2	Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel	13
2.3	Chemikalien	14
2.3.1	Feststoffe, Lösungsmittel und Farbstoffe	14
2.3.2	Puffer und Lösungen	14
2.3.3	Wachstumsfaktoren und Antikörper	14
2.3.4	ECM- Komponenten	14
2.4	Reagenzien für Zellkultur	15
2.5	Zellkulturmedien	15
2.6	Zelllinien:	17
3.	Methoden	18
3.1	Zellbiologische Grundlagen	18
3.1.1	Kultivierung von Zellen	18
3.1.2	Einfrieren und Lagerung	19
3.1.3	Auftauen von Zellen	19
3.2	Coaten von Zellkulturflaschen mit Agar	19
3.3	Anlegen von Sphäroid-Kulturen	20
3.4	Coaten von Zellkulturschalen mit Komponenten der Extrazellulärmatrix	21
3.5	Konditionierung von Tumormedien	21
3.6	DiI Färbung	21
3.7	Isolierung humaner Stammzellen	23
3.8	Funktionelle Assays	24
3.8.1	Migrationsassay	24
3.8.2	Konfrontationsassay	26
3.8.3	Chemokineseassay	27

3.9	Statistik	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Migration	29
4.1.1	Migration muriner neuraler Stammzellen auf Laminin	29
4.1.2	Migration humaner mesenchymaler Stammzellen auf Laminin	30
4.1.3	Migration von hMSC auf Laminin und Tenascin	31
4.2	Chemokineseassay	33
4.3	Invasion	34
4.3.1	C6 VEGF-sense vs. C17.2	34
4.3.2	C6 VEGF-antisense vs. C17.2	35
4.3.3	hMSC NN22 vs. U373 GFP	35
4.3.4	hMSC NN23 vs. U373 GFP	36
4.3.5	hMSC NN 23 DiI vs. U373 GFP	36
5.	Diskussion	38
5.1	Migration von Stammzellen	38
5.2	hMSC als therapeutische Vektoren	39
5.3	ECM Komponenten und deren Einfluss auf die Migration der hMSC	40
5.4	Invasion und Integration von hMSC in Gliome	41
5.5	Einfluss von VEGF auf Stammzellmigration	42
6.	Zusammenfassung	45
7.	Abkürzungen	47
8.	Abbildungsverzeichnis	48
9.	Literaturverzeichnis	49

1. Einleitung

1.1 Klassifikation von Hirntumoren

Wie bei anderen tumorösen Erkrankungen erfolgt auch bei intrakraniellen Tumoren eine Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumoren, wobei vier histologische Charakteristika zur Einteilung genutzt werden. Diese sind Kernatypien, Mitosen, Endothelproliferationen und Nekrosen. Die zuvor international anerkannte Einteilung der Gehirntumore der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in vier Grade, wurde zugunsten einer Einteilung nach der Histogenese der Tumore, erweitert (Kleihues et al. 2002).

Histogenese	Beispiele
Neuroepitheliale Tumore	<ul style="list-style-type: none">• Astrozytom• Glioblastom• Ependymom• Oligodendrogliom• Neuroblastische Tumore• Embryonale Tumore
Tumore der peripheren Nerven	<ul style="list-style-type: none">• Schwannome• Neurofibrome
Tumore der Meningen	<ul style="list-style-type: none">• Meningeome• mesenchymale nicht-meningotheliale Tumore• primäre melanozytische Läsionen
Lymphome und hämatopoetische Neoplasien	<ul style="list-style-type: none">• Maligne Lymphome• Plasmozytom• granulozytische Sarkome
Keimzelltumore	<ul style="list-style-type: none">• Germinom,• Embryonales Karzinom• Choriokarzinom• Teratome
Tumore der Sellaregion	<ul style="list-style-type: none">• Kraniopharyngeome• granuläre Zelltumore
Metastatische Tumore	<ul style="list-style-type: none">• Ursprung von extrazerebralen Tumoren

Abb. 1: Auszug aus der WHO Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems

1.2 Glioblastoma multiforme

1.2.1 Einordnung und Epidemiologie

Die Mehrzahl aller intrakraniellen Tumoren geht von Zellen des Hirnparenchyms aus. Man spricht dann, im Gegensatz zu Metastasen oder Meningeomen von so genannten hirneigenen Tumoren. Die häufigsten hirneigenen Tumoren oder Gliome sind die Astrozytome.

Die Astrozytome werden nach der WHO in vier Grade eingeteilt, wobei das pilozytische Astrozytom WHO° I die benigne Form der astrozytären Tumoren darstellt und die am häufigsten auftretende maligne Verlaufsform das Glioblastoma multiforme (GBM) WHO° IV ist.

Als seine histopathologischen Charakteristika gelten Gewebs- und Zellpolymorphien, Gefäßproliferationen mit arteriovenösen Fisteln, Gefäßthrombosen, Blutungen und zentraler Nekrose (Kleihues et al. 2002). Der Tumor geht meistens von der weißen Substanz aus und ist hauptsächlich in den Großhirnhemisphären lokalisiert. Vom Corpus callosum ausgehend, kann sich ein Glioblastom in beiden Hemisphären ausbreiten und bietet dann das typische Bild eines so genannten Schmetterlingsglioms.

Mit 12-15% ist es die häufigste intrakranielle Neoplasie und macht 80% der malignen Gliome aus (Radhakrishnan et al. 1995). Die Inzidenz liegt bei 2-3 pro 100.000 und das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 50.-70. Lebensjahr.

Hinsichtlich seiner Entstehung, muss das primäre GBM de novo von dem durch Progression entstandenem, sekundären GBM unterschieden werden. Während das primäre GBM direkt über eine Mutation oder Verlust verschiedener Gene oder Genprodukte aus differenzierten Astrozyten oder neuroepithelialen Vorläuferzellen hervorgehen kann, entsteht das sekundäre GBM über eine schrittweise Progression oder Malignisierung aus niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytomen.

1.2.2 Klinik und Diagnostik

Das Glioblastom kann sich entweder durch fokale oder generalisierte neurologische Ausfallerscheinungen klinisch präsentieren. Generalisierte Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen sind zumeist Ausdruck eines erhöhten intrakraniellen Drucks.

Kopfschmerzen kommen bei etwa 50% der Patienten mit Gehirntumoren als initiales Symptom vor (Forsyth et al. 1993).

Fokale Symptome wie Hemiparesen, Aphasie, Hemianopsie aber auch fokale Krampfanfälle, können die intrakranielle Lokalisation des Tumors reflektieren.

Krampfanfälle sind ein häufiges Symptom bei Erstmanifestation des Glioblastoms und postiktale Paresen bzw. Aphasie (Todd'sches Phänomen) können einen Rückschluss auf die Lokalisation zu lassen.

Für die Diagnostik stehen neben Klinik und Anamnese insbesondere bildgebende Verfahren wie CT und MRT zur Verfügung. Das MRT mit Gadolinium ist Mittel der Wahl zum Nachweis von intrakraniellen Tumoren (Castel et al. 1989), da dieses die zuverlässige Diagnostik, die Tumorabgrenzung sowie die sensitive postoperative Tumornachsorge (Tumorrreste und -rezidive) ermöglicht. Glioblastome zeigen im MRT ein charakteristisches ringförmiges und girlandenartiges Kontrastmittelenhancement mit unscharfer Begrenzung, zentraler Nekrose und perifokalem Ödem, als Ausdruck einer Blut-Hirn-Schrankenstörung.

Neuere bildgebende Verfahren wie die MR-Spektroskopie, FET-Positronen-Emissionstomographie sowie die Diffusions-gewichtete MRT können zusätzliche Informationen bezüglich der Dignität bzw. der differentialdiagnostischen Überlegungen liefern.

Differentialdiagnostisch zum Glioblastom kommen Metastasen, Abszesse oder anderen hirneigene Tumore in Betracht.

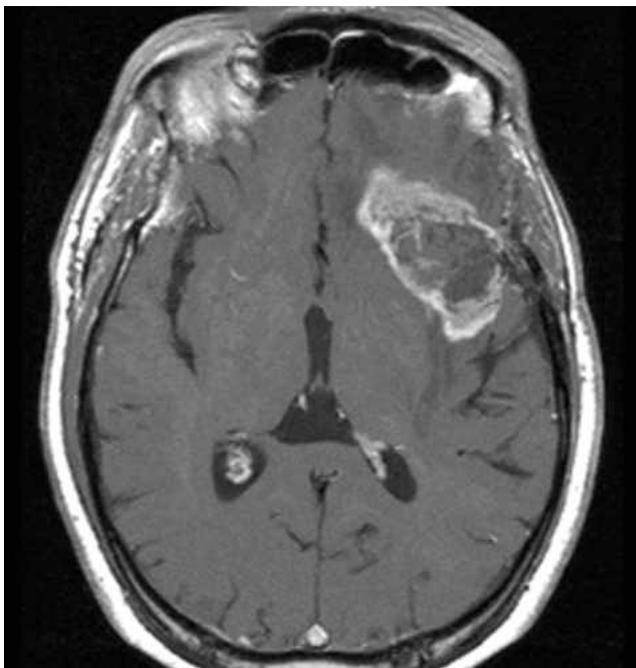


Abb. 3: T1-gewicht. MRT nach Gadolinium Gabe: Es zeigt sich die für das GBM typische ringförmige KM-Anreicherung im Bereich des linken Temporallappens.

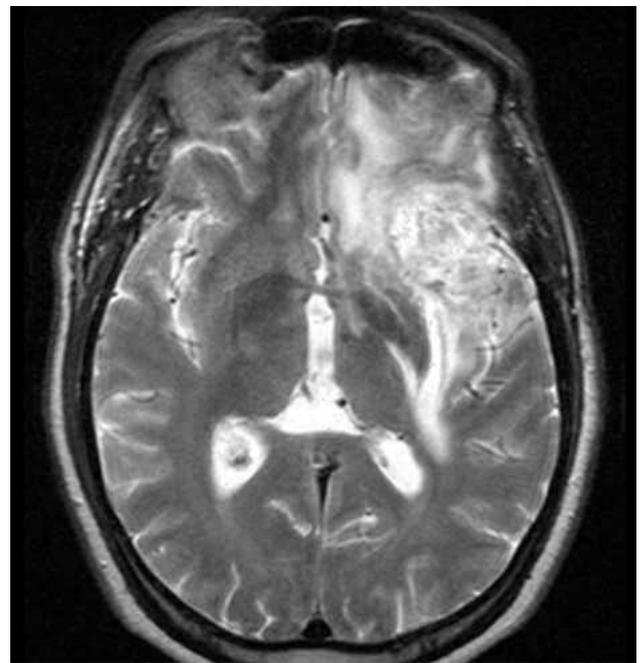


Abb. 4: T2-gewicht. MRT des gleichen Patienten: Das ausgeprägte perifokale Ödem ist ein weiteres neuroradiologisches Kriterium des GBM.

1.2.3 Therapiestrategien und Prognose

Die Therapie des GBM besteht initial, sofern möglich, in der chirurgischen Extirpation des Tumors. Die größtmögliche Exzision steht mit, einer längeren Prognose und einer Verbesserung der neurologischen Ausfälle sowie der Lebensqualität im Zusammenhang (Hess et al. 1999) (Simpson et al. 1993) (Brown et al. 2005). Mittels fluoreszenzgestützter Resektion mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), einem Abbauprodukt der Hämbiosynthese, welches enzymatisch in Gliomzellen zu fluoreszierenden Porphyrinen umgewandelt wird und in diesen akkumuliert, ließ sich zeigen, dass eine vollständigere chirurgische Resektion und somit auch ein längeres progressionsfreies Intervall erreicht wird (Stummer et al. 2006). Der kontrastmittel-aufnehmende Tumoranteil wurde, nach Ergebnissen aus der postoperativen MRT-Bildgebung, mittels 5-ALA in 65% vs. 36% in der Kontrollgruppe chirurgisch komplett reseziert. Das progressionsfreie Intervall nach 6 Monaten betrug in der ALA-Gruppe 41,0 % vs. 21,1% der Patienten in der Kontrollgruppe.

Die Operation stellt aber nur ein lokales Therapieinstrument dar, wobei das GBM nicht als eine lokale Erkrankung anzusehen ist, da einzelne Gliomzellen bis zu 7 cm von Primärtumor migrieren und das normale Gehirngewebe invadieren. Dass zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Infiltration der gegenüberliegenden Hemisphäre vorliegt, konnte bereits in den 50er Jahren von Scherrer (Laws et al. 1993) gezeigt werden.

Ausgangspunkt für eine Rezidivbildung ist die von Gliomzellen umgebene Infiltrationszone. Wegen der funktionellen Bedeutung der Umgebung ist auch eine großzügige Resektion nicht möglich bzw. sinnvoll. In 96% der Fälle geht das Rezidiv von dem Resektionsrand bzw. innerhalb von 3 cm von dem Rand der Resektionshöhle entfernt aus (Giese et al. 2001). Die Ursache hierfür liegt zum einen in der hohen Zelldichte von invasiven Zellen in der direkten Umgebung des Tumors, zum anderen kann es durch postoperativen Veränderungen der Extrazellulärmatrix im Sinne eines glialen Narbengewebes bedingt sein (Giese et al. 2001).

Die invasiven Zellen scheinen über eine erhöhte Resistenz gegen antiproliferative und apoptose-induzierenden Therapien zu verfügen und entziehen sich so den adjuvanten Modalitäten wie Chemo –oder Bestrahlungstherapie.

Glioblastome sezernieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche ihr Wachstum, ihr invasives Verhalten und auch die Therapieresistenz bedingen.

Zu den wichtigsten Faktoren gehören VEGF (Vascular endothelial growth factor), welches die Neoangiogenese in Gliomen stimuliert, EGF (Epidermal growth factor), der über die Hochregulierung von Proteasen die Invasion von Gliomzellen fördert und SF/HGF (Scatter factor/hepatocyte growth factor) mit seiner Wirkung auf Vaskularisierung und Proliferation von

Gliomen (Mueller et al. 2003). Gliome produzieren unter anderem Zytokine wie IL-1 (Interleukin-1), IL-6 und IL-8 und induzieren über diese unter anderem Gliomzellproliferation (Mueller et al. 2003).

Prognostisch relevant sind außerdem Lebensalter, Ausmaß der Begleiterkrankungen und fokale neurologische Defizite (Scott et al. 1999).

Der Operation folgt in der Regel die Radiotherapie, d.h. 15 Gy direkt im Bereich des Tumorbetts, sowie 45 Gy Ganzhirnbestrahlung (Walker et al. 1978). Eine zusätzliche Chemotherapie hat einen signifikanten Einfluss auf die Prognose (Fine et al. 1993). Die Wirksamkeit und die milden Nebenwirkungen von Temozolomid, einem oralen Alkylanz, machen es in der adjuvanten Therapie des GBM zum Chemotherapeutikum der ersten Wahl (Yung et al. 1999). Die Methylierung der Promoterregion des Gens für das DNS-Reparatur Enzyms O6-methylguanin-DNS-methyltransferase (MGMT) ist dabei ein Indikator für das Ansprechen von Glioblastomen auf Temozolomid (Esteller et al. 2000).

Hegi und Mitarbeiter (Hegi et al. 2005) konnten zeigen, dass eine frühe und konkomitane Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid bei Patienten mit inaktiviertem MGMT die mittlere Überlebenszeit auf 21,7 Monate steigern konnte vs. 15,3 Monate bei Patienten mit alleiniger initialer Radiotherapie. Die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit aktiviertem MGMT betrug 12,7 Monate nach kombinierter Radio-/Chemotherapie vs. 11,8 Monate bei Patienten, welche nur einer Radiotherapie zugeführt worden sind. Das bedeutet, dass Patienten mit Glioblastom und inaktiviertem MGMT von einer Chemotherapie mit Temozolomid profitieren, während Patienten mit aktiviertem MGMT nicht signifikant von dieser Chemotherapie profitieren.

Bei konkomitanter Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid beträgt die mittlere Überlebenszeit von den Patienten mit GBM in der Arbeit von Stupp (Stupp et al. 2005) 14,6 Monate vs. 12,1 Monate bei Patienten, welche nur mit einer Radiotherapie behandelt worden sind.

Eine Ursache für die Strahlenresistenz von Glioblastomen und deren Rezidiv nach Strahlentherapie ist die durch Tumorstammzellen vermittelte Aktivierung von „DNA damage checkpoints“ Antworten, dass heißt es wird ein komplexes regulatorisches Netzwerk in Zellen aktiviert, welches Schäden innerhalb der DNS erkennt und repariert (Bao et al. 2006). Die DNS Reparatur nach Bestrahlung, führt dazu, dass der DNS-schädigende Effekt der Radiotherapie neutralisiert wird und es kommt so zu einer Strahlenresistenz der bestrahlten Gliome. Die Rekrutierung von CD-133 (Prominin-1) exprimierenden Tumorstammzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Strahlenresistenz, da diese Zellfraktion nach Bestrahlung in erhöhter Anzahl in Gliomen auftritt und die Strahlenresistenz sich durch spezifische Hemmung von Rezeptoren in diesen Zellen rückgängig machen lässt. CD-133 ist ein Marker, welcher sowohl in neuronalen Stammzellen, wie auch in Tumorstammzellen, zu finden ist (Singh et al. 2004).

Die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit GBM beträgt nach Diagnosestellung trotz kombinierter multimodaler Therapieansätze 12-18 Monate (Forsyth et al. 1993) (Castel et al. 1989) (Burger et al. 1987).

Experimentell werden verschiedene gentherapeutische Ansätze im Rahmen einer adjuvanten Therapie des Glioblastoms in klinischen Studien erprobt. Ein Beispiel wäre die Therapie von Glioblastomen mittels Herpes simplex Virus Tymidin-kinase (HSV-Tk)- tragenden Retroviren und Ganciclovir (Prados et al. 2003). Das Prinzip dieser Therapie beruht auf der intra- und postoperativen Applikation von Vektor-produzierenden Zellen, welche das Suizidgen HSV-Tk tragen, im Bereich der Resektionshöhle. Durch die lokale Applikation der Vektor-produzierenden Zellen kommt es zur Transduktion des Suizidgens auf die schnell proliferierenden Gliomzellen. Nach systemischer Verabreichung des Virostatikum Ganciclovir kommt es innerhalb der HSV-Tk tragenden Gliomzellen zur enzymatischen Umwandlung und Phosphorylierung des Ganciclovir zu Ganciclovir-Triphosphat. Ganciclovir-Triphosphat führt durch Hemmung der DNS-Polymerase zu der Unfähigkeit der Gliomzellen zu proliferieren und somit zu deren Zelltod. Die Wirkung dieser Therapie wird derzeit in einer randomisierten, multizentrischen Phase III-Studie beurteilt.

Der limitierende Faktor einer Gentherapie mit „nicht-migrierenden“ Vektorzellen ist deren räumlich beschränkte Wirkung im Bereich der Resektionshöhle (Rainov et al. 2006), so dass die migrierten bzw. invasiven Gliomzellen fernab der Resektionshöhle von der zytotoxischen Wirkung der Gentherapie verschont bleiben und den Ursprung für ein Tumorrezidiv bilden können.

1.3 Sphäroidmodell

Das Sphäroidmodell ist ein in-vitro Tumormodell und stellt eine drei-dimensionale, multizelluläre und sphärisch-wachsende Zellanhäufung dar. Die experimentelle Anwendungsmöglichkeit des Sphäroidmodells ist sehr vielfältig, z.B. in Studien über Zell-Zell-Interaktionen, Tumormetabolismen und Konzentrationsgradienten (Kunz-Schughart et al. 2004). Bereits 1957 führten Moscona und Mitarbeiter (Moscona et al. 1957) Untersuchungen mit Kokulturen von Tumoraggregaten und Gewebszellen durch, um die Tumorzellinvasion zu studieren. Seither wird dieses Modell für Invasionsversuche und auch für in-vitro Therapieansätze genutzt, da Tumorsphäroide gegenüber soliden in-vivo Tumoren einen ähnlichen histologischen Aufbau sowie auch eine ähnliche Extrazellulärmatrix aufweisen (Nedermann et al. 1984). Die Fähigkeit Komponenten der Extrazellulärmatrix zu synthetisieren, war eingeschränkt bzw. nicht vorhanden, wenn die Tumoren als Monolayer-Kultur gezüchtet wurden. Durch die vielfach gesteigerte Produktion von tumorspezi-

fischen-Antigenen durch Tumorsphäroide (Mueller-Klieser et al. 1987) eignen sich diese besser für Kokulturen oder antigenbasierte Therapien von Tumoren als Monolayer-Kulturen.

Eine weitere Gemeinsamkeit von soliden Tumoren und in-vitro Tumorsphäroiden ist der Proliferationsgradient, d.h. dass durch die herabgesetzte Diffusion von Sauerstoff, Kohlendioxid und Ernährungsfaktoren im Kern von Sphäroiden im Vergleich zu der Oberfläche die Proliferationsaktivität von Zellen in diesen Arealen sich auch unterscheidet. Die herabgesetzte Diffusion, mit reduziertem Gas- und Stoffaustausch in den tiefen und zentralen Arealen von Sphäroiden führt zu einer erniedrigten Proliferationsrate von Zellen bis hin zur G₀-Phase des Zellzyklus, ähnlich der gefäßfernen Areale in soliden Tumoren (Bauer et al. 1982).

Tumorsphäroide verfügen außerdem über ausgeprägte interzelluläre Kontakte und tumorähnlichen Wachstumseigenschaften (Mueller-Klieser et al. 1987). Histologisch können Sphäroide in drei Zonen untergliedert werden: Die äußere Schicht der großkernigen proliferierenden Zellen, die mittlere Schicht der kleineren und wenig oder nicht-proliferierenden Zellen und die zentrale Nekrosezone (Mueller-Klieser et al. 1987).

Als dreidimensionale in-vitro Zellkultur entspricht diese im Gegensatz zu einer Monolayerkultur histomorphologisch, physiologisch und funktionell einem in-vivo Mikrotumor. Daher eignet sich dieses Modell sehr gut für die Durchführung von Migrationsversuchen und Konfrontationskulturen.

1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Die für die verschiedenen Assays benutzten humanen mesenchymalen Stammzellen wurden aus Knochenmarksspenden gewonnen, nachdem die zur Spende gedachten hämatopoetischen Zellen durch die Mitarbeiter der Blutbank entfernt worden waren. Die Spender wurden über die experimentelle Nutzung der Zellen aufgeklärt und willigten darin ein, ein entsprechendes Votum der Ethikkommission lag vor.

Erstmals wurden fibroblasten-ähnliche Zellen im Knochenmark von Friedenstein und Mitarbeiter im Jahre 1970 (Friedenstein et al. 1970) beschrieben und deren Eigenschaften charakterisiert. Diese Zellen wurden dann später von Caplan (Haynesworth et al. 1992) und Gronthos (Gronthos et al. 1996) isoliert, expandiert und als mesenchymale Stammzellen (MSC) benannt.

hMSC sind nicht-hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks und sind multipotente Progenitorzellen verschiedener mesenchymaler Zellreihen, wie z.B. Stromazellen, Adipozyten, Fibroblasten etc (Pittenger et al. 1999). Neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC), sind

eine weitere Subgruppe der Knochenmarksstammzellen die Hämangioblasten, welche in der Regeneration von Gefäßen eine wichtige Rolle spielen.

hMSC werden durch Dichtegradient-Zentrifugation nach Ficoll als mononukleäre Zellfraktion separiert und anschließend mittels Adhärenz an Plastik in vitro kultiviert.

Morphologisch handelt es sich bei den hMSC um spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Zellen, welche in-vitro an Plastik adhäreren, Kolonien ausbilden und sich im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in vitro über viele Passagen teilen.

Für hMSC gibt es keinen spezifischen Oberflächenmarker, jedoch weisen die Zellen in Kultur ein typisches Muster mit den Markern CD105 und CD44 auf (Schichor et al. 2006) und sie zeigen eine starke und stabile Expression (Schichor et al. 2006) des Vascular endothelial growth factor-2 (VEGF-2) Rezeptors, wodurch auch eine direkte Wirkung von VEGF auf hMSC Rekrutierung und Migration (Chen et al. 2004) begründet sein könnte (siehe unten).

Funktionell sind hMSC nicht phagozytierende Zellen, welche sich in Knochen-, Fett-, Skelett- oder Herzmuskelzellen aber auch in Gliazellen oder Neurone differenzieren können (Pittenger et al. 1999).

Experimentell werden die multipotenten Eigenschaften der hMSC in verschiedenen Fachrichtungen wie Kardiologie, Gastroenterologie und Neurologie zur Regenerierung von Organen bzw. zur Behandlung erforscht (Orlic et al. 2001) (Kim et al. 2004). Das Potential von hMSC für Geweberegeneration (Horwitz et al. 2002), Gentherapie (Chamberlain et al. 2004) und als therapeutisches Vehikel (Nakamura et al. 2004) wird in verschiedenen Arbeiten untersucht bzw. beschrieben.

Da sich humane mesenchymalen Stammzellen einfach durch Knochenmarkspunktion und anschließende Zellkultur isolieren lassen und sich in neurale Stammzellen transdifferenzieren können (Hermann et al. 2004), sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob hMSC über vergleichbare migratorische Eigenschaften (siehe unten) wie neurale Stammzellen verfügen.

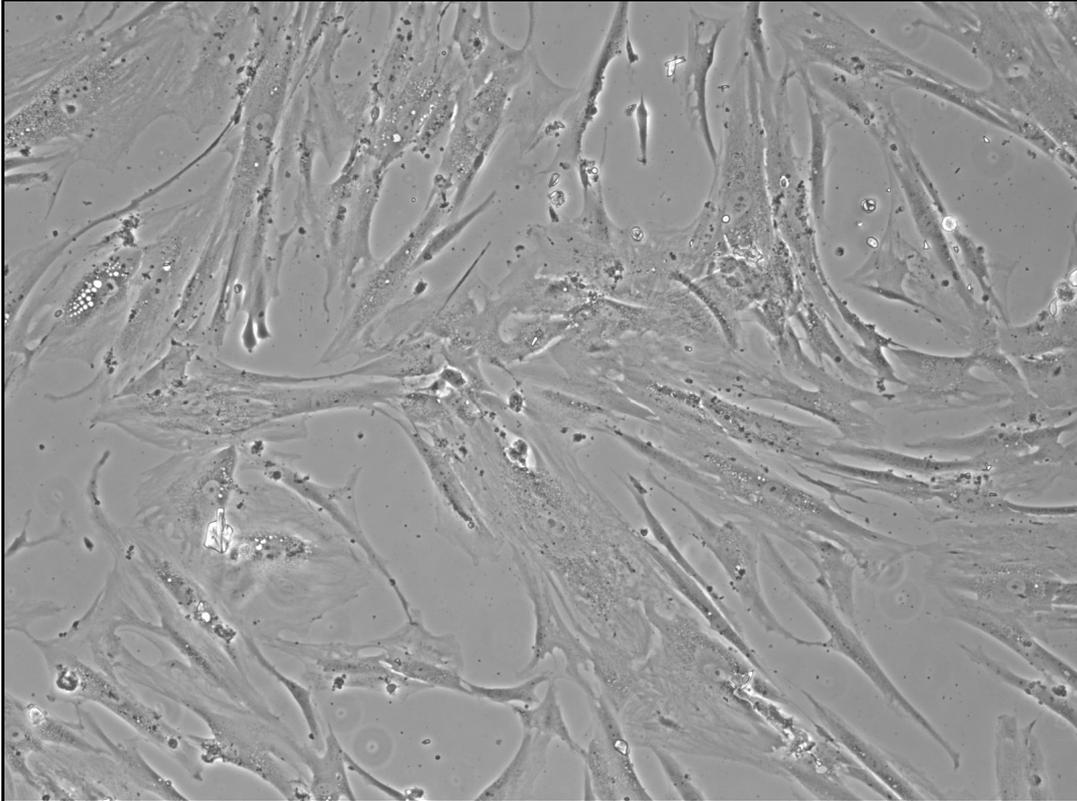


Abb. 4: 40x vergrößerte Aufnahme einer hMSC Monolayer-Kultur (NN20 Zellen). Es lassen sich die fibroblasten-ähnliche Struktur und die typischen spindelförmigen Ausläufer erkennen.

1.5 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF ist ein Glykoproteindimer mit einer Größe von 36-46 kDa, welches in den vier humanen Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ charakterisiert werden konnte (Ferrara et al. 2004).

Das Endothel-spezifische Mitogen VEGF spielt unter anderem eine essentielle Rolle in der Regulierung der Vaskulogenese des menschlichen Embryos (Risau et al. 1995), in der Angiogenese des vaskulären Systems des Menschen (Risau et al. 1997) sowie auch in der Neoangiogenese (Folkman et al. 1995) von Tumoren.

VEGF bindet an zwei verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren, flt-1 (fms-like tyrosin kinase) bzw. VEGFR-1 und Kdr-Flk-1 (fetal liver kinase-1) bzw. VEGFR-2. VEGF ist ein wichtiger Faktor in der Neoangiogenese von Gliomen, wird in diesen durch Gliomzellen produziert (Plate et al. 1995) und wirkt über eine Stimulation von Endothelzellen auf deren Proliferation.

Eine hohe VEGF Expression in Gliomen ist vor allem in Zellen in der Nähe von nekrotischen Tumoranteilen vorzufinden und die Konzentration von VEGF in Glioblastomen korreliert mit dem Grad der Vaskularisierung (Plate et al. 1995).

In malignen Gliomen ist die Konzentration von VEGF 50-fach höher als in gesundem Gehirngewebe (Plate et al. 1992).

Das bedeutet, dass VEGF sowohl physiologisch wie auch pathophysiologisch ein wichtiges Regulator-Protein darstellt und eine essentielle Rolle in der Proliferation und Invasion von Gliomen spielt.

Chen und Mitarbeiter (Chen et al. 2004) stellten in ihrer Arbeit die Wirkung von VEGF in der Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen im Rahmen der Knochenheilung vor, so dass davon auszugehen ist, dass VEGF auch als Botenstoff in der Rekrutierung und Migration von hMSC eine wichtige Rolle spielt.

1.6 Zielsetzung

Die Behandlung von Patienten mit Glioblastom scheitert in den meisten Fällen trotz kompletter chirurgischer Resektion und Anwendung von multimodalen adjuvanten Radio- und Chemotherapiekonzepten. Die Therapieresistenz ist vor allem in der frühen und diffusen Infiltration des, den Primärtumor umgebenden Gehirnparenchyms begründet. Die invadierenden Gliomzellen sind den aktuellen therapeutischen Modalitäten nicht zugänglich und sind der Ausgangspunkt für rezidivierendes Tumorwachstum, vor allem in der Umgebung der ursprünglichen Resektionshöhle. Viel versprechende gentherapeutische Konzepte wurden zum einem durch die eingeschränkte Verteilung bei lokaler Anwendung, zum anderen durch die Toxizität bei systemischer und intravenöser Gabe in ihrer Wirksamkeit limitiert.

Durch Aboody und Mitarbeiter (Aboody et al. 2000) wurde im Rattenmodell demonstriert, dass nach intrazerebraler Implantation eines Glioblastoms intravenös verabreichte murine neurale Stammzellen (NSC), ein extensives migratorisches Verhalten in Richtung des Tumors zeigen und in die Tumormasse invadieren. Des Weiteren infiltrierte die Stammzellen nicht nur die Grenze zwischen invasivem Tumor und gesundem Hirnparenchym, sondern suchten auch einzelne, vom ursprünglichen Primärtumor abgelöste und ausgewanderte Gliomzellen, in weiter entfernten Gehirnarealen, auf.

Es wurde jedoch von den Autoren nicht dargestellt, ob die erwähnte Kollokalisierung von Glioblastomzellen und neuronalen Stammzellen auf einer direkten Interaktion dieser beiden Zellarten oder vielmehr auf einem chemotaktischen Effekt ausgehend vom dem degenerativ bzw. inflammatorisch veränderten Tumormilieu beruhte. Glioblastomzellen invadieren das gesunde Gehirn unter anderem durch Adhäsion an Moleküle der Extrazellulärmatrix und Proteolyse mittels Matrixmetalloproteinasen und schaffen sich dadurch einen „Weg“ durch das Parenchym (Goldbrunner et al. 1999). Ob die Interaktion einzelner invadierender Gliomzellen und hMSC darauf beruht, dass die hMSC durch das von Gliomzellen geschaffene permissive Milieu in der Extrazellulärmatrix passiv den Tumorzellen folgen oder durch eine gerichtete Migration, die Tumorzellen aufsuchen, ist ungeklärt. In Glioblastom tragenden Nacktmäusen führte die lokale und systemische Applikation von murinen NSC, welche mit dem Enzym Cytosindesaminase transfiziert worden waren, nach Gabe von 5-Fluorcytosin zu einer signifikanten Massenreduktion des Tumors (Aboody et al. 2000).

Die Therapie des Glioblastoms mit neuronalen Stammzellen, welche mit einem Suizidgen transfiziert worden sind, wäre dementsprechend eine Möglichkeit, die bestehenden Therapiekonzepte zu ergänzen, um die einzelnen, für den Progress der Erkrankung ursächlichen, invasiven Gliomzellen, fernab des Primärtumors zu zerstören.

Einer Nutzung von neuronalen Stammzellen, als therapeutisches Vehikel zur Therapie des Glioblastoms würden jedoch mehrere Probleme im Wege stehen:

Einerseits ist die NSC C17.2 eine immortalisierte Zelllinie, welche durch Transfektion mit einem c-myc-tragendem Retrovirus eine unphysiologische Proliferationsrate besitzt. Da dieses Retrovirus eine ungehemmte mitotische Aktivität bewirkt, ist die Anwendung bei Patienten, abgesehen von der praktischen Durchführung, aufgrund einer fraglichen Tumorigenität dieser Zellen nicht durchführbar. Auch die Tatsache, dass die Zelllinie embryonalen Ursprungs ist, führt zu ethischen und zahlreichen ungelösten praktischen Problemen, da humane embryonale Stammzellen in Deutschland zur Anwendung an Patienten nicht verfügbar sind. Schließlich ist es ohne eine operative, stereotaktische Gewinnung aus dem paraventriculären Marklager nicht möglich, humane neurale Stammzellen zu gewinnen und aufgrund ihrer eingeschränkten proliferativen Eigenschaften in ausreichender Zahl zur Verfügung zu haben.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit eine potentielle und verfügbare Alternative zu NSC mit vergleichbaren Eigenschaften zu finden. Adulte mesenchymale Stammzellen können in Mesenchymzellen verschiedenster Gewebearten transdifferenziert werden und auch in bestehendes Parenchym eines Empfängerorgans, funktionell integriert werden (Pittenger et al. 1999) (Orlic et al. 2001) (Kim et al. 2004); dieses wurde auch im zentralen Nervensystem gezeigt. Nach stereotaktischer Implantation von MSC in vivo bei Ratten mit zerebraler Ischämie, kam es zur Integration der MSC und Expression von astrozytären, oligodendroglialen und neuronalen Markern in MSC (Zhao et al. 2002). Außerdem führte die Implantation der MSC zur signifikanten Regredienz der neurologischen Ausfälle in vivo.

Padovan et al demonstrierten, dass auch in vitro eine Transdifferenzierung von hMSC mit Expression von neuronalen Markern möglich ist (Padovan et al. 2003). hMSC können einfach aus dem Knochenmark adulter Spender per Beckenkammpunktionen isoliert werden. Sollten diese Stammzellen die gleichen invasiven und migratorischen Eigenschaften wie NSC im Bezug auf humanen Gliome besitzen, könnten diese nach Transfektion mit einem therapeutischen Gen als autologes Transplantat in Patienten mit malignen Gehirntumoren dienen. Autologe Transplantation bedeutet, dass Spender und Empfänger dieselbe Person sind und somit eine Immunsuppression unnötig ist. Ob die Migration und Invasion adulter Stammzellen durch Metabolite, welche durch Gliomzellen sezerniert werden, beeinflusst wird, war zum Zeitpunkt des Projektbeginns nicht bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von hMSC und Gliomzellen, zwei Zelltypen, welche normalerweise im Patienten, soweit bekannt, keine Berührungspunkte aufweisen, zu charakterisieren. Dabei sollte insbesondere bestimmt werden, ob die migratorischen und die invasiven Charakteristika der mesenchymalen Stammzellen in Anwesenheit von Gliomzellen oder auch nur von tumorkonditioniertem Medium bzw. VEGF verändert werden.

2. Materialien

2.1 Geräte und Laborhilfen

Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Canon
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Glaszylinder	Schott, Mainz
Konfokalmikroskop Leica TCSNT	Leica, Heidelberg
Mikroskop	Hund, Wetzlar
Mikrowellenherd	Toshiba, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Glas 5, 10, 20 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, elektrisch	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Hartenstein, Würzburg
Waage	Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge mit Kühlung	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

Boyden Chamber	Neuro Probe Gaithersburg, USA
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg
Einmalkanülen	B. Braun, Spangenberg
Objektträger	Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Greiner, Würzburg
Polykarbonat Filter (8 µm Porengröße)	Neuro Probe Gaithersburg, USA
Tubes (15, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes

Zellkultur Well-Platten (24, 96 well)
Zellkulturflaschen (25, 75 cm²)

Nunc, Wiesbaden
Nunc, Wiesbaden

2.3 Chemikalien

2.3.1 Feststoffe, Lösungsmittel und Farbstoffe

Agar Noble
DiI
Ficoll-Paque Plus, 1.077g/ml

Sigma-Aldrich, München
Molecular Probes, Oregon
Sigma-Aldrich, München

2.3.2 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

8,0 g NaCl
+ 0,2 g KCl
+ 1,44 g Na₂HPO₄*12 H₂O
+ 0,24 g KH₂ PO₄

werden in 1000 ml Aqua destilata gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.

2.3.3 Wachstumsfaktoren und Antikörper

Recombinant Human VEGF, 495MV
Recombinant Murin VEGF, 493MV

R+D Systems, Minneapolis, USA
R+D Systems, Minneapolis, USA

2.3.4 ECM- Komponenten

Laminin (L-6274)	Sigma-Aldrich, München
Tenascin (CC-065)	Chemicon, Temecula

2.4 Reagenzien für Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's modified Egel's medium (DMEM) mit 1g/l Glucose	Seromed Biochrome, Berlin
Fetales Kälberserum	Seromed Biochrome, Berlin
Geneticin G 418	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin, 200mM	Costar, Bodenheim
Nicht-essentielle Aminosäuren(100 x)	Costar, Bodenheim
Penicillin (10000 IU/ml)/	Gibco BRL, Paisley
Streptomycin (100 mg/ml)	Seromed Biochrome, Berlin
Sodium Pyruvat	Seromed Biochrome, Berlin
Trypanblau (0,5 %ige Lösung)	Serva Feinbiochemica
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Paisley
Ultra pure Water	Seromed Biochrome, Berlin

2.5 Zellkulturmedien

- a. für humane mesenchymale Stammzellen (NN20, NN22, NN23) :

- 375 ml DMEM
- + 100 ml FCS (20%), hitzeinaktiviert
- + 10 ml L-Glutamin
- + 5 ml nicht essentielle Aminosäuren
- + 5 ml Penicillin/Streptomycin
- + 5 ml Sodium Pyruvat

- b. für transfizierte Zelllinien (U373 GFP, C6 VS, C6 AS)

- 420 ml DMEM
- + 50 ml FCS (10%), hitzeinaktiviert
- + 10 ml L-Glutamin
- + 5 ml nicht essentielle Aminosäuren
- + 5 ml Penicillin/Streptomycin
- + 5 ml Natrium Pyruvat
- + 6 ml Geneticin (entspricht Konz. 240 µg/10 ml)

c. für alle anderen Zelllinien :

- 425 ml DMEM
- + 50 ml FCS (10%), hitzeinaktiviert
- + 10 ml L-Glutamin
- + 5 ml nicht essentielle Aminosäuren
- + 5 ml Penicillin/Streptomycin
- + 5 ml Natrium Pyruvat

d. Einfriermedium :

- 50 ml DMEM-Vollmedium incl. 10 ml FCS
- + 40 ml FCS
- + 10 ml DMSO

2.6 Zelllinien:

Zelllinie/Zelltyp	Abkürzung	Transfektion
C6-wildtype Rattengliom	C6	nicht transfiziert
C6-antisense Rattengliom	C6-AS	Transfektion mit Plasmid, das eine Hemmung der VEGF- Expression bewirkt
C6-sense Rattengliom	C6-VS	Transfektion mit Plasmid, das eine vermehrte VEGF-Expression bewirkt
C17.2 Murine neurale Stammzelle	C17.2	Transfektion mit c-myc-tragendem Retrovirus, welches ungehemmte mitotische Aktivität bewirkt
U373 Humanes Gliom	U 373	nicht transfiziert
U373 GFP Humanes Gliom	U373 GFP	Transfektion mit Plasmid, welches die Produktion des green-fluorescent Protein bewirkt
U-251 MG Humanes Gliom	U-251 MG	nicht transfiziert
Humane adulte mesenchymale Stammzellen	NN20, NN22 und NN23	nicht transfiziert

Abb. 5. : Zelllinien

Die Rattengliomzelllinien wurden durch Dr. med. Masato Sasaki transfiziert (Goldbrunner et al. 2000).

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Grundlagen

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Materialien wurden zunächst in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Die C6-Ratten- und U373-Humangliomzelllinien wurden als Monolayer in Dulbeccos's modified Eagles's medium (DMEM) mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM 100) sowie Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Bei der murinen Stammzelllinie C17.2 wurde in gleicher Weise verfahren.

Den Kulturmedien der Zelllinien C6 VS, C6 AS und U373 GFP wurden zusätzlich, zur Aufrechterhaltung einer stabilen Transfektion, das Antibiotikum Geneticin (G418) [Konz: 240 µl/10 ml Medium] zugesetzt. Da die für die Transfektion verwendeten Plasmide, ein Resistenzgen gegen Geneticin beinhalten, sterben nicht-transfizierte Zellen bei Zugabe von Geneticin ab.

Das Kulturmedium der humanen Stammzellen NN20, NN22 und NN23 beinhaltete 20% FCS, da sich nach Durchführung von Verdünnungsreihen zeigte, dass niedrigere Konzentrationen von FCS mit einer deutlich reduzierten Proliferationsrate der Stammzellen einhergingen.

Es erfolgte eine tägliche Wachstumskontrolle der Zelllinien mittels Phasenkontrastmikroskop. Waren die Zellen zu 70-80% konfluent gewachsen, konnten diese unter sterilen Bedingungen in Laminar Air Flow Werkbänken passagiert werden. Hierzu wurde bei den verwendeten 75 cm² Zellkulturflaschen 10 ml Phosphat-buffered-Saline (PBS)-Lösung zum Vorwaschen hinzugegeben, um Reste von im Medium enthaltenen FCS zu neutralisieren. Die eigentliche Trennung vom Boden, erfolgte durch Zugabe von 3 ml 0,05%iger Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Inkubation über 2 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die gelösten Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und je nach Wachstumsdichte 1:10 oder 1:20 geteilt und anschließend mit 10 ml Medium aufgefüllt. Überschüssige Zellen wurden verworfen, zum Einfrieren oder zum Anlegen von Sphäroiden verwendet.

Jede 3. Passage wurde nach dem Abtrypsinieren zentrifugiert, um so toxische Stoffe (z.B. Trypsin-EDTA) von den Zellen zu trennen:

Hierzu wurde die Zellsuspension, nach Inaktivieren mit DMEM, in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben und fünf Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand

abgegossen, das Pellet aufgewirbelt, mit DMEM resuspendiert und in die Zellkulturflasche gegeben.

3.1.2 Einfrieren und Lagerung

Überschüssige Zellen bzw. für aktuelle Versuche nicht benötigte Zellen wurden wie folgt eingefroren: Die beim Trypsinieren entstandene Einzellsuspension wurde in 4°C kaltes Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Tube gegeben, welches anschließend in einer Zentrifuge bei 800 U/min und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert wurde. Nach Abpipettieren des Überstandes konnte das Zellpellet mit Einfriermedium, (bestehend aus 50% Vollmedium, 40% FCS und 10% DMSO) resuspendiert werden, und je nach Zelldichte auf 1ml fassende Kryoröhrchen verteilt werden. Wurden diese, nach eintägiger Zwischenlagerung bei -70°C, in flüssigen Stickstoff umsortiert, war eine Lagerung des Materials ohne zeitliche Begrenzung möglich.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Zuerst wurde ca. 6-7 ml kaltes Medium in ein 15 ml Tube pipettiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in einem bei 37°C vorgeheizten Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eiskristall zu sehen war. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde sofort in das vorbereitete Tube gegeben und zentrifugiert (1200 U/min, zehn Minuten, 4°C, ungebremst). Den Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in ca. 5 ml erwärmtes 10%iges (bzw. 20%iges bei humanen Stammzellen) Medium aufgenommen und in eine mittlere Mediumflasche überführt, in die bereits 10 ml 10%iges Medium vorgelegt worden waren. Wichtig war die Verwendung von G418-freiem, d.h. antibiotika-freiem, Medium bei allen aufzutauenden Zelllinien. Erst bei dem zweiten Umsetzen durften die in Absatz 2.5 beschriebenen Zellkulturmedien verwendet werden.

3.2 Coaten von Zellkulturflaschen mit Agar

Zum Anlegen von Sphäroidkulturen, Migrationsassays und Invasionsassays war es notwendig, Zellkulturflaschen nach dem Verfahren von Yuhás (Yuhás et al. 1977) bzw. 96-Well-Platten zu coaten (1% Agar in Medium) Dafür wurde Noble Agar verwendet, von welchem 1,0 g in 20 ml Ultra pure Water gelöst wurden und 2-3-mal bei 400 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht wurden. Vor dem Aufkochen wurde bei 60°C zunächst 80 ml pures DMEM (nur mit L-Glutamin ver-

setzt) im Wasserbad erhitzt, anschließend zu dem gelösten Agar pipettiert und gut durchgemischt. Auf eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm²), wurde möglichst blasenfrei 9ml des flüssigen Agars pipettiert. Bei der Beschichtung von 24 bzw. 96-Well Platten wurde in gleicher Weise verfahren wobei 500 µl bzw. 100 µl pro Well hinzupipettiert wurde. Die gecoateten Platten mussten bei Zimmertemperatur ca.15 Minuten austrocknen und vor Gebrauch mindestens 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt werden. Die maximale Lagedauer der mit Agar gecoateten Platten liegt bei vier Wochen.

3.3 Anlegen von Sphäroid-Kulturen

Für das Ansetzen von Migrations- und Invasionsversuchen wurden Sphäroide benötigt und diese wurden analog der Methode von Yuhas (Yuhas et al. 1977) hergestellt. Um diese zu gewinnen, wurde, wie zuvor beschrieben, eine konfluente 75 cm² Flasche der jeweiligen Monolayerkultur, aptrysiniert. Von der Zellsuspension wurden etwa 6 ml auf eine mit Agar beschichtete 75 cm² Zellkulturflasche gegeben, mit 14 ml frischem Medium vermischt und 2 Tage bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden ca. 100-150 µm kleine Sphäroide mit Hilfe einer 10 µl Pipette und eines Phasenkontrastmikroskops unter der Laminar Air Flow abpipettiert und einzeln in eine beschichtete und mit 100 µl Medium/Well gefüllte 96-Well-Platte (pro Well ein Sphäroid) pipettiert. Die 96-Well Platte wurde dann ca. 2-3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis die Sphäroide 200-250 µm groß waren. Durch das Trennen von Sphäroiden in einzelne Wells, kann verhindert werden, dass mehrere Sphäroide zusammenwachsen. Sphäroide können maximal 8-10 Tage in den Wells kultivieren werden, jedoch sollte alle vier Tage einen Mediumwechsel vorgenommen werden. Hierzu wurde unter mikroskopischer Sicht und in der Laminar Flow vorsichtig 95 µl des alten Mediums abpipettiert und 100µl frisches Kulturmedium wieder in das Well hinzugegeben.

3.4 Coaten von Zellkulturschalen mit Komponenten der Extrazellulärmatrix

Um den Einfluss von Laminin und Tenascin als Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) auf das Migrationsverhalten von Sphäroiden zu untersuchen, mussten die 24- bzw. 96-Well-Platten mit diesen beschichtet (gecoatet) werden. So wurden die Proteine in der Laminar Flow in einer Konzentration von 20 µg/ml in PBS-Lösung verdünnt. Anschließend wurden 50 µl/Well (96-Well-Platte) bzw. 200 µl/Well (24-Well Platte) der Lösung gleichmäßig in die Wells pipettiert und bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung, vorsichtig und ohne den beschichteten Well-Boden zu beschädigen, abpipettiert. Zuletzt wurden die beschichteten Wells vorsichtig mit 50 µl/Well (96- Well Platte) bzw. 200 µl/Well (24-Well- Platte) PBS-Lösung gespült und diese dann abpipettiert. Die beschichteten Platten konnten bei 4° C im Kühlschrank maximal 1 Woche gelagert werden.

3.5 Konditionierung von Tumormedien

Das Konditionieren von Tumormedien diente der Eruiierung einer möglichen Wirkung des Tumorzellüberstands auf das Migrationsverhalten von Stammzell- und Gliomsphäroiden. Hierzu wurde eine mit C6 (für murine Assays) bzw. U373 (für humane Assays) zu 40-50 % konfluente 75 cm² Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium (incl. 10 % FCS) über 2 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und bei 1200 U/min und 18°C über fünf min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun, nach Filtrierung durch 8µm Polykarbonat Filter, vorsichtig in 1 ml Tubes überführt und konnte bei -20° C sieben Tage gelagert werden.

3.6 DiI Färbung

Der lipophile Membranfarbstoff DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) ermöglicht das schnelle und einfache Färben von humanen Stammzellen, um diese in Kokulturen bzw. in In-vivo-Versuchen fluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können.

Bei der Färbung mit DiI von Stammzellsphäroiden wurde die Stammlösung (2,5 mg/ml) auf eine Konzentration 10 µg/ml im Zellkulturmedium verdünnt. Dies entsprach der Konzentration der Arbeitslösung. Anschließend wurden die zu färbenden Stammzellsphäroide jeweils in ein Well einer mit Nobel Agar beschichteten 96-Well-Platte vereinzelt. Das in den Wells enthaltene Me-

dium wurde vorsichtig, unter mikroskopischer Sicht und in der Laminar Flow abpipettiert. Es wurden dann 300 μ l/Well der Arbeitslösung appliziert und diese bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, wurde die DiI Lösung abpipettiert und der im Well verbliebene Sphäroid 3-4-mal mit PBS vorsichtig gewaschen, um so Farbreste zu entfernen. Nun konnten die gefärbten Sphäroide für Konfrontationsversuche genutzt werden. Mit einem Fluoreszenzfilter der Wellenlänge 450-500 nm fluoreszierten die markierten Zellen in einem roten Farbton.

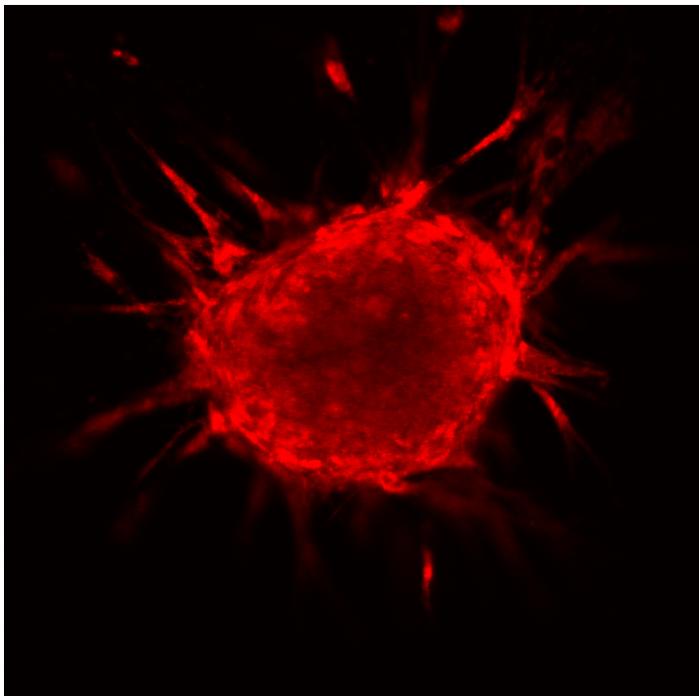


Abb. 6: DiI markierter Stammzellsphäroid in Kollagengel, mit einzelnen, den Sphäroid bereits radiär verlassenden Zellen, welche in die umgebende Matrix invadieren.

3.7 Isolierung humaner Stammzellen

Das Material für die Isolierung von humanen Knochenmarkstammzellen, wurde aus den Residuen von Knochenmarkspenderbeuteln gewonnen. Die Isolierung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte über eine Dichtegradient-Zentrifugation (Boeyum et al.1968) und Adhärenz an Plastik (Friedenstein et al. 1970). Hierzu wurden die Filter sowie der Beutel unter sterilen Bedingungen mit ca. 90 ml Zellkulturmedium mehrmals durchgespült. Nach dem Filtrieren durch 70 µm Nylon Filter, um Gewebs- und Knochenfragmente zu entfernen, wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf vier 50 ml Tubes verteilt. Anschließend wurde die Suspension mit Ficoll Lösung, langsam und ohne die Zellsuspension aufzuwirbeln, unterschichtet und diese bei 800 U/min über 35 min ungebremst zentrifugiert. Dann wurden ca. 5-7 ml der mononukleären Zellfraktion, d.h. der Interphasering, abgenommen, diese auf 25 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt und bei 600 U/min über zehn Minuten ungebremst zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 20 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut bei 250 g über zehn Minuten ungebremst zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, jedoch wurde, anschließend das Pellet in 10 ml des Stammzellmediums (20% FCS) aufgenommen und in eine 75 cm² Nunc Kulturflaschen gegeben. Die mesenchymalen Stammzellen wurden nach ihrer Adhärenz an Plastik isoliert. Die nicht-adhärenente Zellfraktion wurde nach 48 Stunden durch Mediumwechsel und waschen mit PBS entfernt. Mesenchymale Zellen der 2. Passagen wurden für die Experimente genutzt.

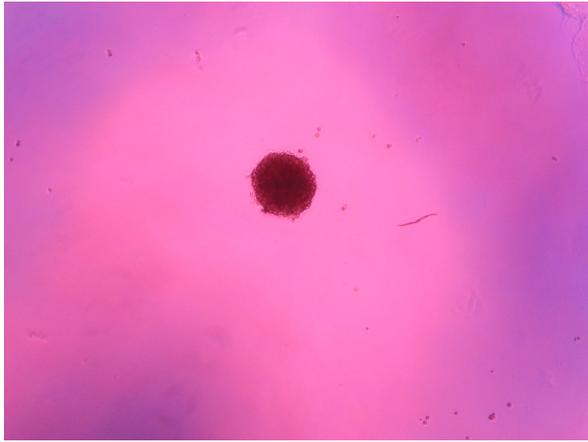
3.8 Funktionelle Assays

3.8.1 Migrationsassay

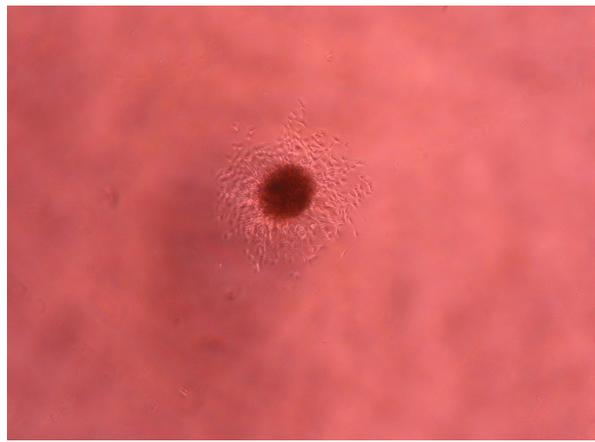
Der Migrationsassay diente der Charakterisierung des migratorischen Verhaltens von Stammzellsphäroiden auf verschiedenen Komponenten der Extrazellulärmatrix und Zugabe von potentiellen Stimulantien der Migration (Chemoattractants). Es wurde vor allem ein Vergleich zwischen muriner und humaner Stammzellmigration vorgenommen, der Kontrolle dienten murine bzw. humane Gliomsphäroide. Für die Durchführung des Assays wurden in der Vorbereitung Sphäroide mit einem Durchmesser von ca. 150-200µm hergestellt. Es wurde die Migration der Zellen HMSC NN20, 22, 23, C6, C17.2 und U373 bzw. U373 GFP untersucht. Nach o. g. Protokoll wurden 96-Well-Platten mit den Matrices Laminin und Tenascin gecoatet. Ungecoatete Platten dienten der Kontrolle.

Als Mediumzusätze wurden humanes oder murines VEGF, in einer Konzentration von 7,5 ng gelöst in 300 µl Kulturmedium pro Well (entspricht 2,5 ng/100 µl) oder 300 µl Kulturmedium incl. 150 µl tumorkonditioniertes Medium, verwendet. Die Kultur bzw. Kontrollmedien enthielten 10% FCS.

Pro Matrix (Laminin, Tenascin, Plastik) und pro Mediumzusatz (Kontrolle, VEGF, TKM) wurden je ein Sphäroid in vier Wells in der Laminar Flow und unter mikroskopischer Sicht in die Mitte des Wells platziert. Das Umsetzen der Sphäroide, aus den mit Nobel Agar gecoateten 96-Well-Platten in die Wells der jeweiligen Versuchsplatte erfolgte mit Hilfe einer 20 µl Eppendorfpipette. Mit einer Einstellung von 3 µl Aspirationsvolumen, wurden die Sphäroide möglichst in das Zentrum eines Wells platziert. Befand sich ein Sphäroid anschließend nicht in der Mitte des Wells, wurde dieser mit Hilfe einer 26 G Kanüle manuell und ohne dabei den Agar des Wells zu zerkratzen zentral platziert. Dies entsprach der Stunde 0. Die Migration der einzelnen Zellen aus dem Sphäroid wurde fotografisch dokumentiert. Die Einstellungen am Mikroskop (5x Objektiv) und an der Kamera (4,3x Zoom), durften während des Versuches nicht verändert werden. Die Versuchsplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt im Brutschrank gelagert. Im weiteren Verlauf wurden die Sphäroide alle zwölf Stunden über 48 Stunden mit den oben genannten Einstellungen fotografiert.



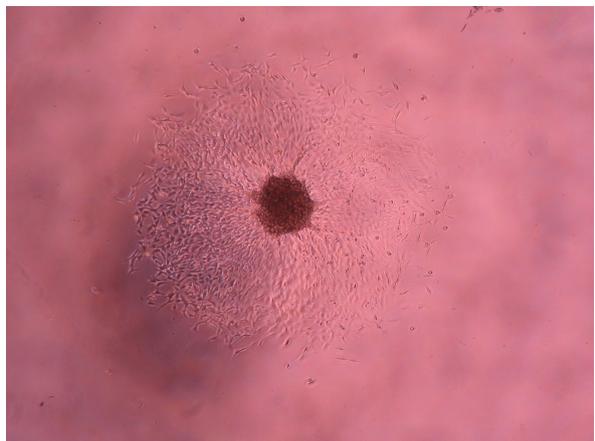
C6 Sphäroid auf Laminin bei Stunde 0



C6 Sphäroid auf Laminin bei Stunde 12



C6 Sphäroid auf Laminin bei Stunde 36



C6 Sphäroid auf Laminin bei Stunde 48

Abb. 7: C6 Migrationsassay auf Laminin mit Tumorkonditioniertem Medium

Auswertung des Migrationsareals:

Das Migrationsareal wurde mit Hilfe des Programms OPTIMAS® der Firma MediaCybernetics vermessen. Bevor die Sphäroide vermessen werden konnten, musste die Software zunächst kalibriert werden. Hierzu wurde eine Aufnahme einer geeichten (z.B. 100 µm) Strecke benötigt, welche mit den gleichen Einstellungen (5x Objektiv, 4,3 Zoom) analog des eigentlichen Assays durchgeführt worden ist. Die Strecke wurde anschließend unter Markierung einer Strecke manuell vermessen und es wurde eingegeben, wie groß die Strecke tatsächlich war. Das Migrationsareal wurde in µm² ausgedrückt. Das Areal wurde manuell umfahren, wobei zu beachten war, dass einzelne „Ausreißerzellen“ vernachlässigt werden sollten, da diese die Messung verfälschen würde. Das bedeutet, daß das Areal markiert wird, in welchem sich der Großteil der migrierten Zellen befand und dieses Areal wird mit der Ausgangsgröße des Sphäroides in Bezie-

lung gesetzt wurde. Bei gleicher Ausgangsgröße der Sphäroide konnten unterschiedliche Ansätze verglichen werden.

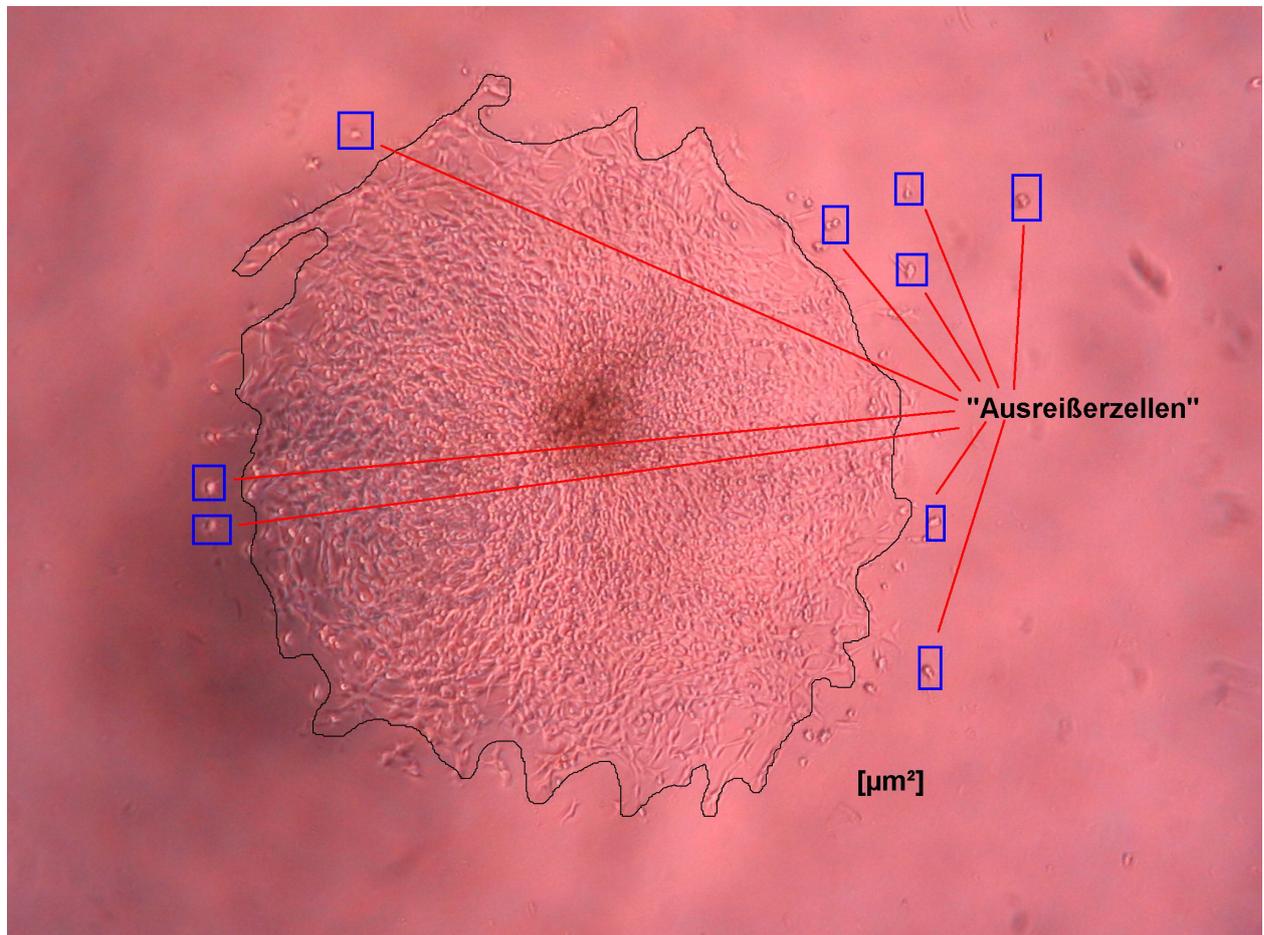


Abb. 8 : Ausmessen der Migrationsfläche mit dem OPTIMAS® Programm

3.8.2 Konfrontationsassay

Die Zellen C6 VS/AS/GFP, C17.2, U373 GFP, NN 22 und 23 wurden genutzt. Für die Versuchsdurchführung wurden Sphäroide gleicher Größe (150- 200 µm Durchmesser) sowie annähernd runder Morphologie verwendet. Nachdem zuvor in jedes Well 200µl Kulturmedium pipettiert worden war, wurden die Sphäroide mit Hilfe einer 20 µl Eppendorfpipette (3µl Aspirationsvolumen) unter mikroskopischer Sicht und in der Laminar Flow umgesetzt. Es wurde pro Well jeweils ein Stammzellsphäroid mit einem Gliomsphäroid auf einer mit Nobel Agar beschichteten 96-Well-Platte konfrontiert. Jeder Ansatz wurde 4-fach durchgeführt. Unter Zuhilfenahme einer Kanüle wurden die beiden Sphäroide miteinander in Kontakt gebracht.

Anschließend (Stunde 0) wurden die Kokulturen mittels Digitalkamera (4,3 Zoom) und Mikroskop (5x Objektiv) fotografiert und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Wells wurden nach 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden bzw. nach 3, 6, 12 und 24 Stunden fotografiert. Die abgeschlossene Konfrontation wurde bildmorphologisch definiert, d.h. wenn die beiden Sphäroide von der ursprünglichen „Hantelform“ zu einem Sphäroid konfluieren.

Um einzelne humane Stammzellen in einem Tumorsphäroid nachweisen zu können, mussten diese mit dem roten Membranfarbstoff DiI gefärbt werden. Als Tumorsphäroid wurde die grünfluoreszierende Zelllinie U373 GFP benutzt. Um toxische Effekte durch das Antibiotikum Geneticin, welches für die GFP-transfizierten U373 Zellen benötigt wurde, auf die humanen Stammzellensphäroide zu vermeiden, wurde nur in der Kokultur auf dessen Zusatz verzichtet.

Mittels Laser Scanning Konfokalmikroskopie (Laserforschungslabor München) konnten die Kokulturen in Schnittbildtechnik durchgescannt und so einzelne in den Tumorsphäroid invadierende Stammzellen nachgewiesen werden.

3.8.3 Chemokineseassay

Der Assay diente der Untersuchung des Einfluss von tumorkonditioniertem Medium verschiedener humaner Gliomzelllinien auf die Migration von hMSC. Hierzu wurden die drei Gliomzelllinien U-251MG, U-373 und MZ-54GB in serum-freien Medium (1x10⁶ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen) passagiert. Das tumorkonditionierte Medium wurde gewonnen, in dem nach 24 Stunden die Zellen gesplittet und bei 1000 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipetiert wurde. Die chemokinetische Aktivität von hMSC als Reaktion auf die TKM von Gliomen, wurde mittels modifiziertem 48-well Boyden Chamber Assay untersucht. Zusätzlich wurde Effekt von VEGF-A auf die Migration in Konzentrationen von 1, 5 und 25 ng/ml untersucht. Als eine Kontrolle wurde monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) in verschiedenen Konzentrationen (5, 50 und 500 ng/ml) benutzt.

Die Zellen wurden mittels Trypsin-EDTA abtrypsiniert und in einer Zahl von 1x10⁶ in serum-freies Medium resuspendiert. 30 µl der Testmedien, welche TKM, VEGF-A oder MCP-1 versetzt wurden, wurden jeweils in das untere Well der Boyden Kammer gegeben; 5 x 10⁴ hMSC/50 µl wurden in das obere Well der Boyden Kammer hinzugefügt. Das obere und das untere Well wurden durch einen Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 8 µm voneinander getrennt. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C wurden die Filter entfernt und die Oberseite der Filter dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen, welche zur Unterseite des Filters migriert waren, wurden mit Methanol fixiert, mit Haemacolor gefärbt und anschließend mittels Lichtmikroskopie

gezählt. Die durchschnittliche Anzahl der migrierten Zellen, wurde durch Auszählung von mindestens 20 Zufallsfeldern pro Well beurteilt. Boyden-Kammer Assays, welche serum-freies Medium und Medium mit 20% FCS beinhalteten, dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Jeder Versuch wurde zweifach ausgeführt und dreimal wiederholt.

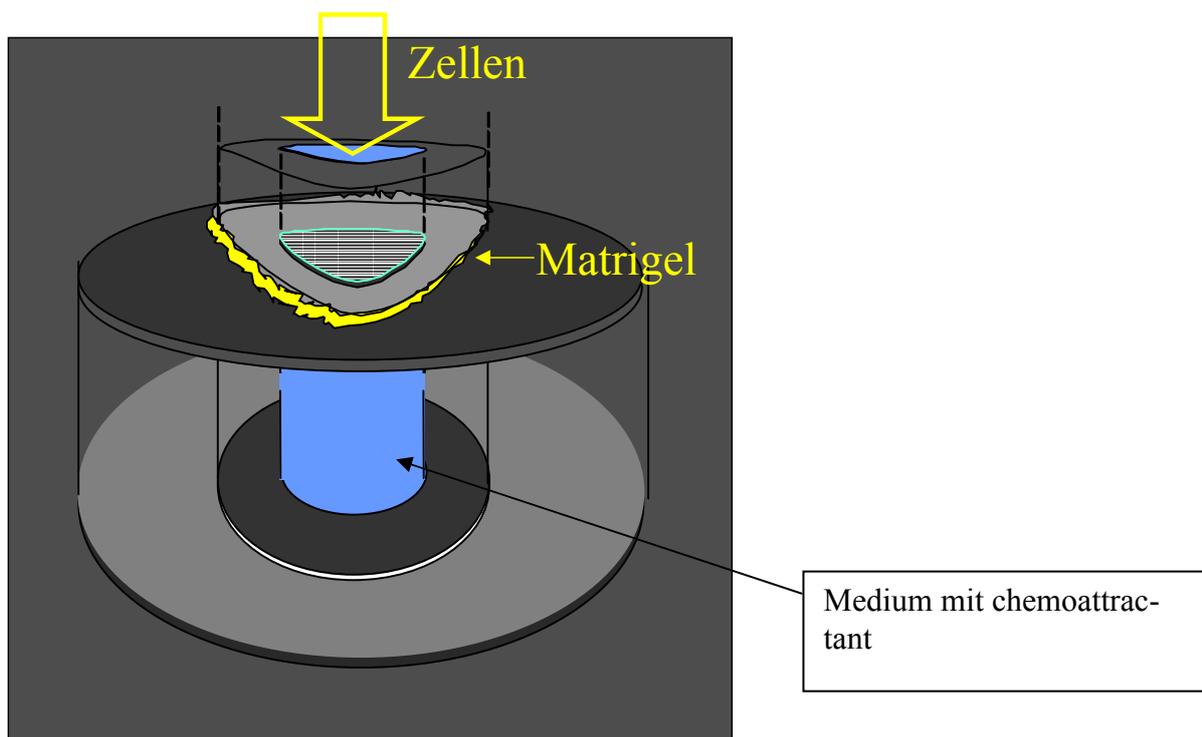


Abb. 9: Boyden-Kammer, schematisch

3.9 Statistik

Für die statistische Analyse der Migration und der Chemokineseassays, wurden der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test und der Dunn's Test' (Dunn's multiple comparison Test) verwendet. Die Negativ-Kontrollen wurden gegen die tumorkonditionierten Medien, VEGF und MCP-1 verglichen. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

4.1 Migration

4.1.1 Migration muriner neuraler Stammzellen auf Laminin

Untersucht wurde die Stammzellmigration der murinen Stammzelllinie C17.2 auf Laminin mit verschiedenen Medien, d.h. einem Kontrollmedium (ohne zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren, jedoch incl. 5% FCS), einem Medium welches zusätzlich VEGF (murin) in einer Konzentration 2,5 ng/100µl enthalten hat sowie einem Medium, welches zu 50% aus tumorkonditioniertem Medium(TKM) bestand.

Es konnte gezeigt werden, dass nach zwölf Stunden eine signifikante Steigerung ($p \leq 0,0005$) der Stammzellmigration in der TKM Gruppe um das Dreifache erreicht wurde. Gegenüber der Kontrollgruppe führte die Stimulation durch VEGF nach 12 Stunden zunächst nicht zu einer Steigerung der Migration. Nach 24 Stunden zeigte sich sowohl in der TKM-Gruppe als auch in der VEGF-Gruppe, erneut eine signifikante Steigerung der Stammzellmigration im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Migration der Stammzellen nach VEGF Stimulation betrug ca. das 1,5-fache der Kontrollgruppe und nach TKM Stimulation war die Migration um das 5-fache erhöht.

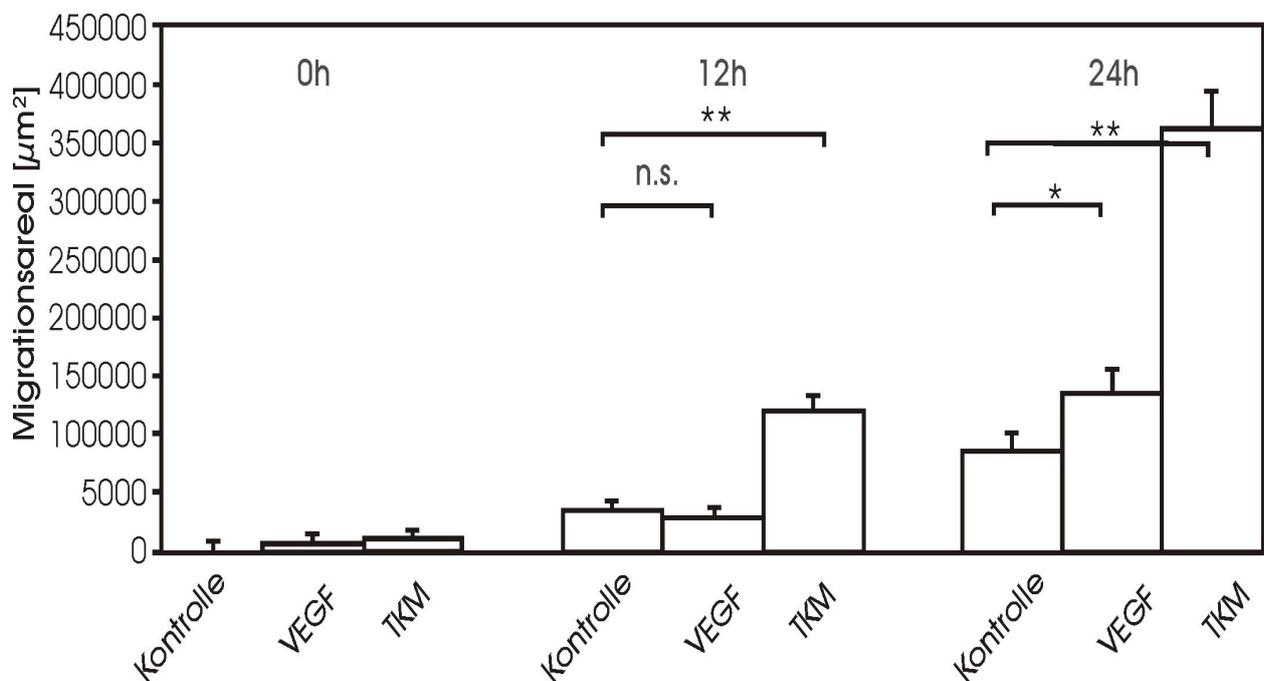


Abb. 10: Murine C17.2 auf Laminin

** : $P \leq 0,0005$, * : $P \leq 0,05$, n.s. : nicht signifikant, TKM: Tumorkonditioniertes Medium

4.1.2 Migration humaner mesenchymaler Stammzellen auf Laminin

Es wurde die Migration humaner mesenchymaler Stammzellen auf Laminin mit Stimulation durch VEGF sowie durch tumorkonditioniertes Medium untersucht. Eine signifikante Steigerung der Migration in der TKM Gruppe nach 12 Stunden um 43% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Normalmedium konnte nachgewiesen werden. Die Migration der hMSC nach 12 Stunden und nach Stimulation durch VEGF war nur leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe und es fand sich keine signifikante Steigerung. Nach 24 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der hMSC Migration in der VEGF Gruppe um 28% ($p \leq 0,0005$). Der Überstand der humanen Gliomzelllinie U373 stimulierte die hMSC Migration im Vergleich zur VEGF-Gruppe um mehr als das Doppelte ($p \leq 0,0005$).

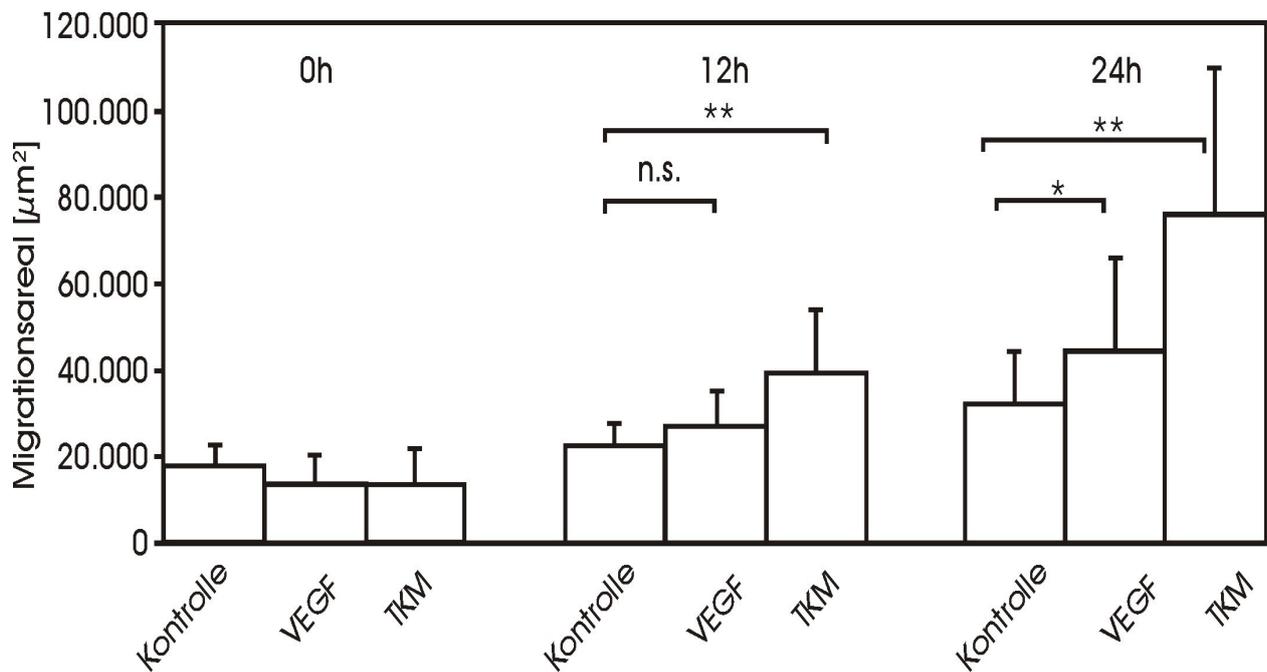


Abb. 11: HMSC auf Laminin mit VEGF- und TKM-Stimulation und Kontrolle
**: $P \leq 0,0005$, *: $P \leq 0,05$, n.s. : nicht signifikant, TKM: Tumorkonditioniertes Medium

4.1.3 Migration von hMSC auf Laminin und Tenascin

Um zu untersuchen, wie die hMSC auf unterschiedlichen ECM Komponenten migrieren, wurde die Migration von hMSC auf Laminin und Tenascin miteinander verglichen.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p \leq 0,0005$) der Migration der hMSC nach 24 Stunden sowohl auf Laminin wie auch auf Tenascin. Für Laminin betrug die Steigerung der Migration nach 24 Stunden 47%, für Tenascin 71%.

Im Vergleich zu Tenascin zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der hMSC- Migration auf Laminin.

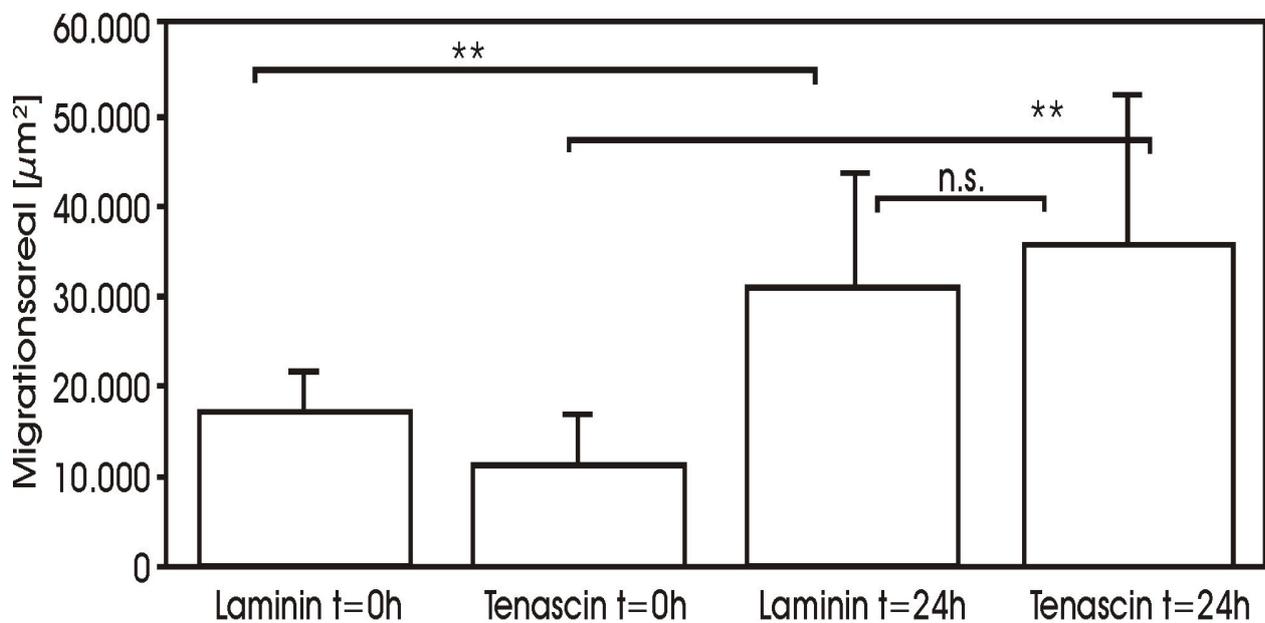


Abb. 12: HMSC auf Laminin und Tenascin

** : $P \leq 0,0005$, n.s. : nicht signifikant

4.1.4 Migration von hMSC und U373 auf Laminin und Tenascin

Um die Unterschiede des Migrationsverhaltens von humanen Stammzellen und Gliomzellen auf den ECM Komponenten Laminin und Tenascin zu charakterisieren, wurden diese miteinander verglichen. Es zeigte sich, wie zuvor beschrieben, bei den hMSC eine signifikante Steigerung der Migration nach 24 Stunden auf Laminin und Tenascin, jedoch war die Geschwindigkeit bzw. die Zunahme der Migrationsfläche nach 24 Stunden der U373 Gliomzelllinie um mehr als 15-fache höher.

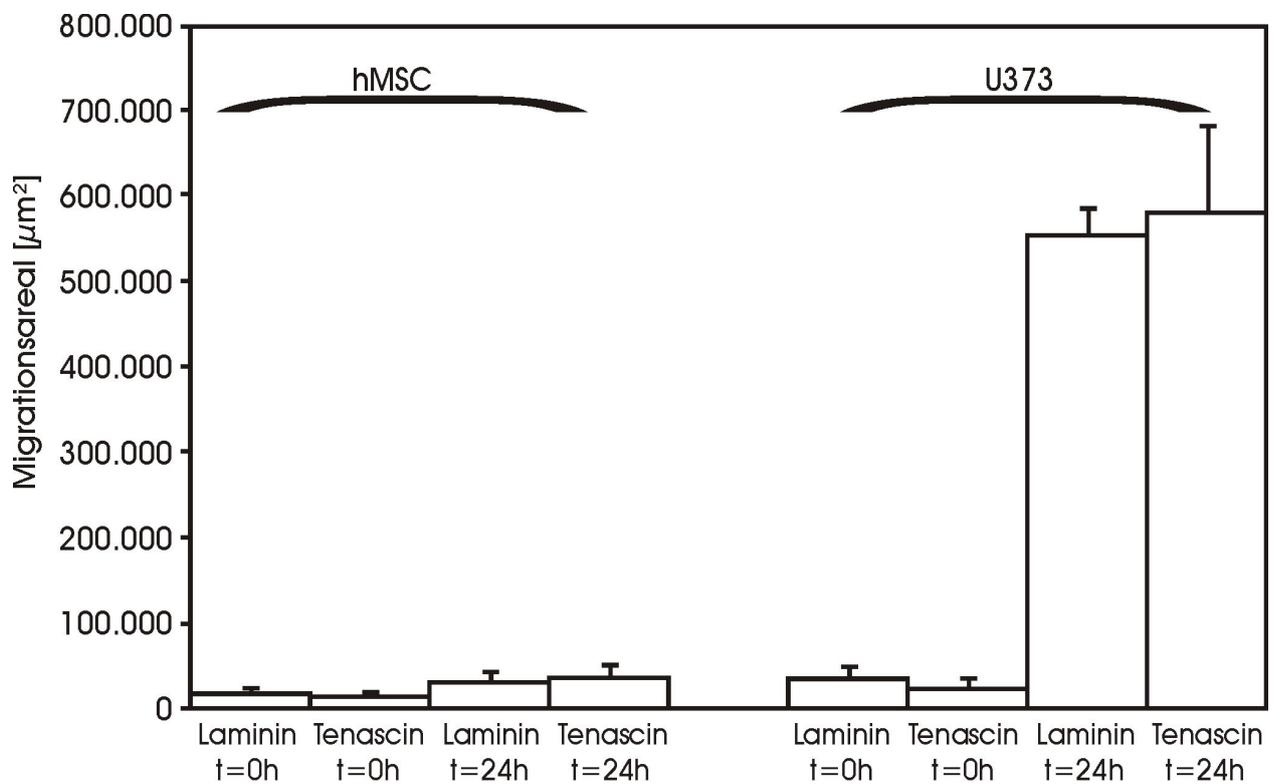


Abb. 13: HMSC, U373 auf Laminin und Tenascin

4.2 Chemokineseassay

Im Vergleich zum serum-freien Normalmedium zeigte jedes der tumorkonditionierten Medien (serum-frei) in den Boyden Chamber Assays einen signifikanten Chemokinese-verstärkenden Effekt der hMSC. Nach Stimulation mit dem Überstand von MZ-54GB-, U373- und U-251MG-Zellen war die Anzahl der migrierten Zellen an der Unterseite des Filters der Boyden-Kammer durchschnittlich 19-fach, 23-fach und 27-fach höher im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (durchschnittliche Werte von migrierten Zellen per Zufallsfeld; $p \leq 0,05$ für MZ-54GB; $p \leq 0,01$ für U373 und U-251MG). Um zu eruieren, ob VEGF-A oder MCP-1, von welchem bekannt ist, dass es die Migration von adulten NSC stimuliert, in der Stimulation von Stammzellmigration involviert sind, wurden die Zellen mit diesen beiden Faktoren stimuliert.

MCP-1 hatte keinen Effekt auf die Stammzellmigration, jedoch konnte in Bezug auf das VEGF-A eine konzentrationsabhängige Steigerung der Stammzellmigration nachgewiesen werden. Trotz der niedrigen Konzentration (1 und 5 ng/ml) zeigte sich eine 3-fache bzw. 8-fache Steigerung der Stammzellmigration im Vergleich zu den Negativkontrollen. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant in den nicht-parametrischen Tests. Bei einer Konzentration von 25ng/ml, betrug die Stammzellmigration das 20-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Steigerung war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

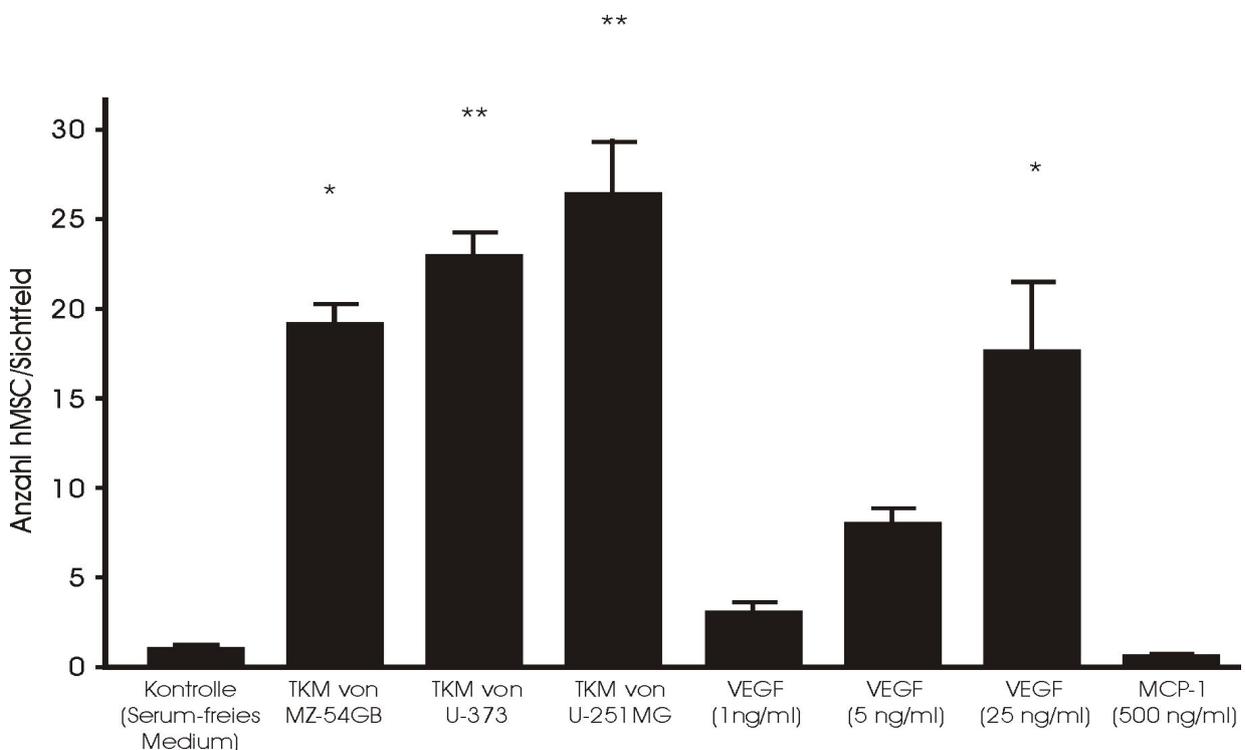


Abb. 14 : HMSC Chemokineseassay mit VEGF- und TKM-Stimulation, MCP-1 und Kontrolle

** $: P \leq 0,0005$, * $: P \leq 0,05$, TKM: Tumorkonditioniertes Medium

4.3 Invasion

Die Konfrontationsassays dienen dem Vergleich des Invasionsverhalten von murinen und humanen Stammzellsphäroide in Gliomsphäroide sowie der Untersuchung der Wirkung von VEGF auf die Invasion muriner Stammzellen. Der Versuch wurde über 48 Stunden in einem 4-fach Ansatz dokumentiert. Um eruieren zu können, ob die Invasion von Stammzell- oder Gliomsphäroid ausgeht, wurde eine Fluoreszenzfärbung mit DiI durchgeführt und die Konfrontation mit U373 GFP Zellen mittels Konfokalmikroskopie dokumentiert.

4.3.1 C6 VEGF-sense vs. C17.2

Die VEGF-exprimierende Zelllinie C6 VEGF-sense wurde mit der NSC Zelllinie C17.2 konfrontiert.

Es zeigte sich, dass nach zwölf Stunden, in allen vier Ansätzen eine Invasion der Sphäroide stattgefunden hatte und diese nach sechs weiteren Stunden (Stunde 18) größtenteils, d.h. 3 von 4, zu einem Sphäroid konfluieren. Nach 24 Stunden war die Invasion in allen Ansätzen beendet. Die Invasion von C17.2 Zellen in VEGF-sezernierende C6 Gliome war ungefähr dreimal schneller, als die von C17.2 in nicht-VEGF-sezernierende C6 Zellen.

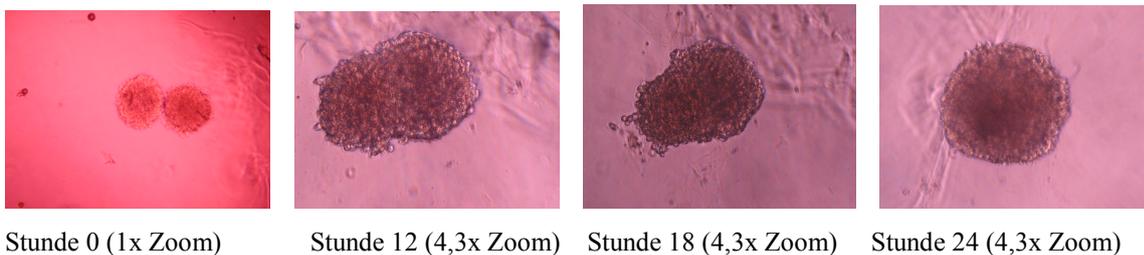


Abb. 15: C6 VEGF-sense (links) vs. C17.2 (rechts)

4.3.2 C6 VEGF-antisense vs. C17.2

Die in der VEGF-Expression gehemmte Zelllinie C6-Antisense wurde mit der NSC Zelllinie C17.2 konfrontiert.

Nach zwölf Stunden konnte in den vier Ansätzen bildmorphologisch nur ein geringer Fortschritt der Invasion im Vergleich zu den C6-sense Zellen beobachtet werden. Nach 24 Stunden war die Invasion der C17.2 Sphäroide ungefähr zur Hälfte abgeschlossen und nach 36 Stunden war die Invasion in drei von den vier Ansätzen beendet. Im Vergleich zu der Invasion der C17.2 in die C6-sense Zellen, war die Invasion somit ungefähr um den Faktor 2-3 langsamer.

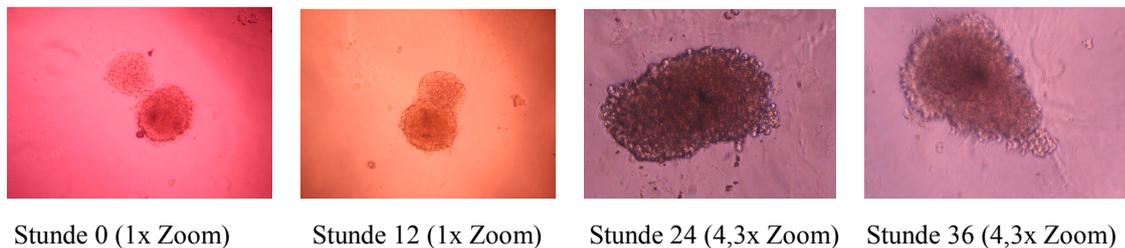


Abb. 16: C6 VEGF-antisense (links) vs. C17.2 (rechts)

4.3.3 hMSC NN22 vs. U373 GFP

Die humane Stammzellen NN22 wurde mit der humanen, GFP-transfizierten Gliomzelllinie U373 konfrontiert.

Nach zwölf Stunden war die Invasion der NN22 Sphäroide bereits zur Hälfte abgeschlossen. Nach 18 Stunden war die Invasion in drei von vier Ansätzen beendet, nach 24 Stunden in allen Ansätzen beendet. Die hMSC Sphäroide zeigten im Vergleich zu den murinen v-myk transfizierten C17.2 Zellen ein ähnlich oder sogar noch schnelleres Invasionverhalten.

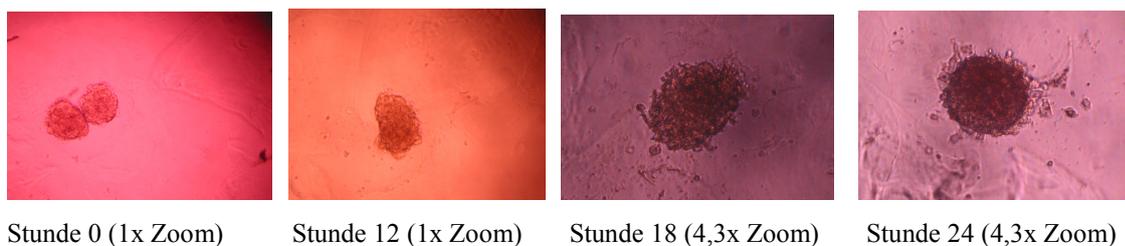


Abb. 17: hMSC NN22 (links) vs. U373 GFP (rechts)

4.3.4 hMSC NN23 vs. U373 GFP

Die humanen Stammzellen NN23 wurde mit der humanen, GFP-transfizierten Gliomzelllinie U373 GFP konfrontiert.

Nach zwölf Stunden war die Invasion der NN 23 Sphäroide in die U373 GFP Sphäroide, fast vollständig abgeschlossen. Nach 18 Stunden waren alle NN23 Sphäroide in die U 373 GFP Gliome invadiert. Es zeigte sich eine noch schnellere humane Stammzellinvasion im Vergleich zu der NN22 und der murine C17.2 Zelllinie.

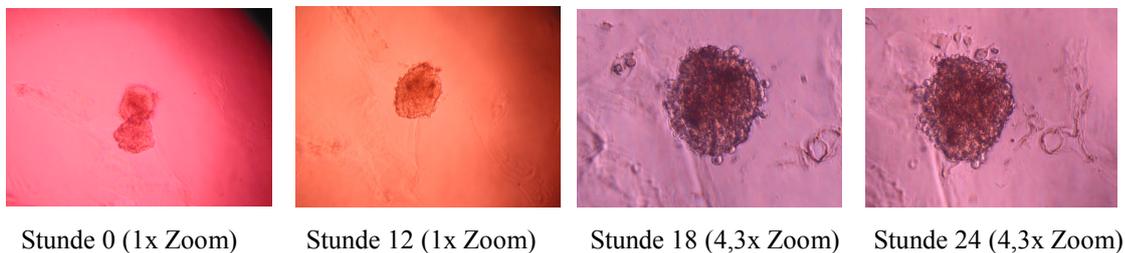
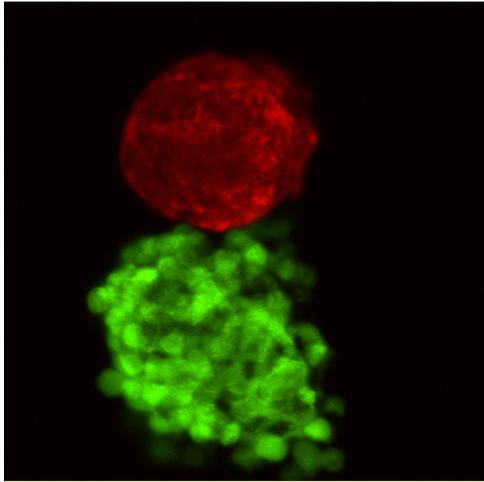


Abb. 18: hMSC NN23 (oben) vs. U373 GFP (unten)

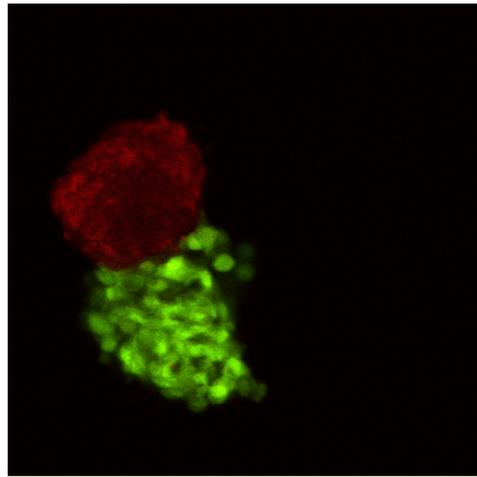
4.3.5 hMSC NN 23 DiI vs. U373 GFP

Um unterscheiden zu können, ob die Invasion von dem hMSC Sphäroid oder von dem U373-Sphäroid ausgeht, wurden die Stammzellsphäroide mit dem roten Membranfarbstoff DiI gefärbt und anschließend mit dem GFP transfizierten Gliom konfrontiert. Mittels Laser-Konfokalmikroskopie erfolgte dann die Dokumentation

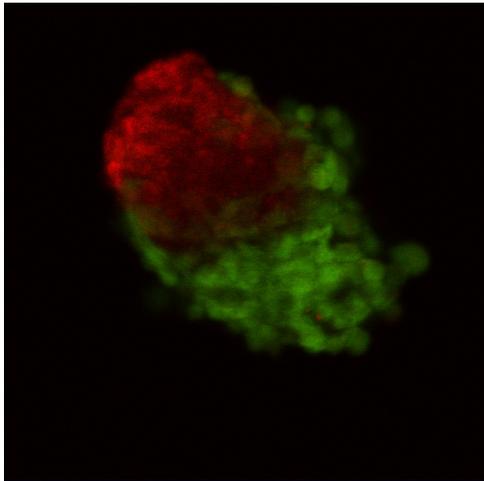
Es zeigte sich bereits nach drei Stunden das Konfluieren der Sphäroide in allen vier Ansätzen. Nach sechs Stunden zeigte sich eine fast vollständige Invasion des hMSC Sphäroiden in den Gliomsphäroid. Zwölf Stunden nach Versuchsbeginn war in allen Ansätzen der Stammzellsphäroid vollständig in den Gliomsphäroid invadiert und es konnten innerhalb des Gliomsphäroids die DiI markierten Stammzellen nachgewiesen werden.



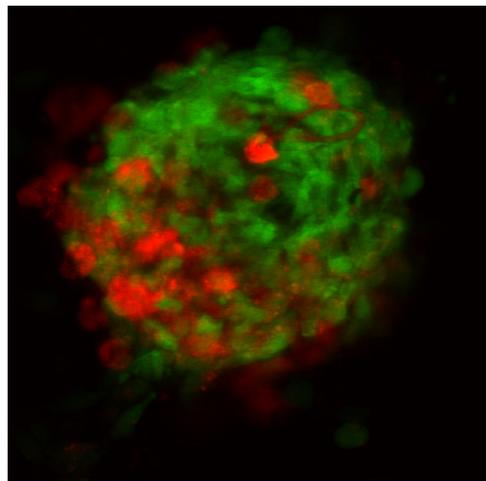
Stunde 0



Stunde 3



Stunde 6



Stunde 12

Abb. 19: DiI (rot) markierte hMSC vs. U373 GFP Gliom (grün)

5. Diskussion

Die Kolokalisation von murinen Gliomzellen und murinen embryonalen C17.2 Stammzellen sowie die verlängerte Überlebenszeit von Tieren mit intrakraniell implantierten Gliomen nach Applikation von transfizierten Stammzellen, stützen die Hypothese, dass Stammzellen als zellulärer Vektor für eine Gentherapie maligner Gliome dienen könnten (Aboody et al. 2000).

5.1 Migration von Stammzellen

Aboody und Mitarbeiter (Aboody et al. 2000) konnten demonstrieren, dass murine neurale Stammzellen (NSC) einen Tropismus in Richtung eines intrakraniellen Glioms zeigen, d.h. bei Präsenz eines Glioms eine gerichtete Migration zum Tumor hin vollziehen. Die Autoren zeigten im Tierversuch, dass intrazerebral platzierte murine NSC einen Tropismus zu dem Primärtumor, aber auch zu der Infiltrationszone und bis hin zu weit vom Primärtumor gelegenen Tumorzellen aufweisen. Die Stammzellen migrierten auch nach stereotaktischer Implantation, über das Corpus callosum bzw. über die Kommissuren in die kontralaterale Hemisphäre in Richtung des Primärtumors bzw. der invadierenden Gliomzellen. Selbst nach systemischer intravenöser Gabe einer NSC Suspension, konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. Die Autoren hatten jedoch keine Interaktion des Tumors und der Stammzellen auf der Basis von sezernierten Faktoren in ihrer Analyse beschrieben.

Die Mechanismen der Rekrutierung von Stammzellen sind weitgehend ungeklärt, jedoch konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem Chemokin Rezeptor 4 (CXCR 4), welcher von NSC exprimiert wird, von anderen Autoren beschrieben werden. Eine Blockade dieses Rezeptors führte zu einem weitestgehenden Migrationsarrest der Stammzellen (Ehtesham et al. 2004).

Neurale Stammzellen werden im adulten humanen ZNS in der subventrikulären Zone sowie entlang der gesamten Neuralachse beschrieben (D'Amour et al. 2003).

Auch wenn die Vision einer Anwendung von neuronalen Stammzellen als Therapievektor bei Patienten theoretisch möglich erscheint, birgt sie dennoch nahezu unüberwindliche praktische Hürden:

Adulte Neurale Stammzellen könnten nur durch eine zusätzliche Operation, im Sinne einer stereotaktisch durchgeführten Punktion und Asservierung von Zellen aus dem Bereich des Hippocampus bzw. der subventrikulären Zone, gewonnen werden. Diese Methode wäre nicht nur komplikationsbehaftet, da diese Zellen mengenmäßig in nur geringer Anzahl im ZNS vertreten sind

und somit wiederholte Punktionen durchgeführt werden müssten, sondern die geringe proliferative Aktivität bzw. das geringe proliferative Potential erfordern auch eine hohe Zellzahl, um diese therapeutisch nutzen zu können. Außerdem wäre eine autologe Anwendung der Zellen mit dem theoretischen Risiko behaftet, dass die neuralen Stammzellen des Gliompatienten bereits durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche von dem Gliom sezerniert wurden, verändert sind und somit ein Malignitätspotential, einen tumorigenen Faktor, darstellen. Die Möglichkeit der Nutzung von humanen, embryonalen Stammzellen ist derzeit, aufgrund ethischer Probleme und juristische Gegebenheiten nicht gegeben.

Aufgrund der oben genannten Umstände beschäftigte sich diese Arbeit mit der Möglichkeit, humane mesenchymale Stammzellen als autologen therapeutischen Vektor im Rahmen einer Therapie des Glioblastoms zu nutzen. Weiterhin konnte untersucht werden, ob von Gliomen sezernierte, lösliche Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine) zu dieser Rekrutierung beitragen.

5.2 hMSC als therapeutische Vektoren

Jedes adulte Gewebe enthält Populationen von Progenitorzellen, welche die Kapazität zur Erneuerung bzw. Heilung nach Ischämie, Trauma, metabolischer oder entzündlicher Schädigung oder infolge von Altersprozessen haben.

hMSC verfügen über die Eigenschaft sowohl im ZNS wie auch im übrigen Organismus, durch Transdifferenzierung Reparaturmechanismen zu induzieren (Zhao et al. 2002) (Chu et al. 2004).

Adultes Knochenmark beinhaltet sowohl hämatopoetische Stammzellen wie auch mesenchymale Progenitorzellen (Knochenmarksstromazellen, hMSC), welche zu der Regenerierung von mesenchymalen Geweben wie Knochen, Knorpel, Muskulatur, Bänder, Sehnen und Fettgewebe beitragen. Pluripotente humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (hMSC) können sich in Zellen des hämatopoetischen Systems, Osteoblasten, Chondroblasten, Fettzellen und Myoblasten differenzieren (Pittenger et al. 1999). Humane mesenchymale Stammzellen zeigen die Fähigkeit Gewebsschäden zu lokalisieren und zu diesen zu migrieren (Zipori et al. 2004). Weiterhin können mesenchymale Stammzellen nicht nur aus Knochenmark, sondern auch aus nahezu allen Geweben der Maus isoliert werden (Beyer et al. 2006).

Mit Hilfe der Zellkultur können die bei einer Knochenmarkspunktion in Lokalanästhesie gewonnenen Stammzellen eine Zahl von ca. 10^{13} erreichen, welches ungefähr der Gesamtmenge von hMSC im adulten Organismus entspricht (Schichor et al. 2006). Dieses relative einfach Verfahren steht der aufwendigeren und risikoreichen operativen Extraktion von neuralen Stammzellen gegenüber.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit, hMSC als therapeutischen Vektor gegen maligne intrazerebrale Gliome einzusetzen, geprüft sowie die Vergleichbarkeit des migratorischen und invasiven Verhaltens der hMSC gegenüber der in diesem Zusammenhang bereits beschriebenen murinen neuralen Stammzellen untersucht. Da VEGF-A in malignen Gliomen im Rahmen der Neoangiogenese in hohem Maße expremiert und bei der Zell- und Gefäßproliferation von Gliomen eine wesentliche Rolle spielt, wurde die Rolle von VEGF-A bei der Migration und Invasion von Gliomen und Stammzellen untersucht.

Da VEGF auch in der Rekrutierung von hMSC im Rahmen der Frakturheilung eine Rolle spielt, sollte der Effekt von VEGF auf Stammzellmigration geprüft und charakterisiert werden (Chen YJ et al. 2004).

Der stimulierende Effekt von tumorkonditioniertem Medium auf die Migration von Stammzellen konnte gezeigt werden (Heese et al. 2005), so dass analog zu VEGF-A dieser Effekt auch im Bezug auf hMSC untersucht und nachvollzogen werden sollte.

Da das Zwischenspiel von Gliomen und der murinen neuralen Stammzelllinie C17.2 gut untersucht und charakterisiert worden war sowie ein Tropismus in Richtung maligner Gliome gezeigt werden konnte, wurde C17.2 als Positivkontrolle benutzt.

5.3 ECM Komponenten und deren Einfluss auf die Migration der hMSC

Laminin ist eine der wichtigsten Komponenten der nicht-kollagenen Glykoproteine der Extrazellulärmatrix und hat eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen bei Zell-Basalmembran-Interaktionen wie Adhäsion, Migration und Proliferation (Kleinman et al. 1982).

Unter Adhäsion versteht man einen Rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der Extrazellulärmatrix (ECM). Die Adhäsion stellt den initialen Schritt der Invasion von Tumorzellen dar. So kommt es nach Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix zur Degradierung der ECM mittels Proteasen (Goldbrunner et al. 1999) und anschließender Migration der Tumorzellen durch die Matrix. Kearns und Mitarbeiter (Kearns et al. 2003) untersuchten die Effekte der ECM Komponenten Laminin, Fibronectin und Chondroitinproteoglykansulfat auf die Migration muriner zerebellärer neuraler Stammzellsphäroide. Es zeigte sich, dass Laminin die höchste permissive Eigenschaft für Stammzellsphäroide aufweist und dass eine Abhängigkeit zwischen der migratorischen Kapazität von Neurosphären und der Expression von Integrinen, welche sich an Laminin und Fibronectin binden, besteht.

Ob die permissive Eigenschaft von Laminin, als ein essentieller Bestandteil der Migration und Invasion von Stammzellen, sich auch auf humane mesenchymale Stammzellen übertragen lässt, sollte daher untersucht werden.

Die Moleküle der Tenascinfamilie (Tenascin-C,-X und -R) sind eine weitere Komponente der ECM und spielen in der Modulation von Adhäsion im Rahmen von Invasion eine wichtige Rolle. Tenascin-C ist aus dieser Gruppe das am Besten charakterisierte. Es kann adhäsive sowie antiadhäsive Zellkontakte vermitteln (Huang et al. 2001) und wird im adulten Organismus vermehrt in Tumoren, wie z.B. Glioblastomen oder Mammakarzinomen, exprimiert. Es scheint auf das Glioblastom eine fördernde Wirkung auf Proliferation und Migration zu haben und seine vermehrte Expression korreliert mit einem erhöhten Malignitätsgrad in Gliomen (Herold-Mende et al. 2002). Die Verwendung von Tenascin in den Migrationsassays, diente der Feststellung, ob Tenascin auf hMSC auch eine migrations- und proliferationsfördernde Wirkung hat und ob hMSC bei der Migration durch die ECM von der erhöhten Expression von Tenascin in Gliomzellen profitieren.

In den Migrationsassays von hMSC und U373 zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Migration von hMSC auf Laminin vs. hMSC auf Tenascin. Im Vergleich zu den U373 Zellen, war die Migration der hMSC auf den unterschiedlichen ECM Komponenten deutlich geringer. Dies könnte an der unterschiedlichen Expressierung von Integrinen in Gliomen und hMSC liegen, da diese im Rahmen der Adhäsion von den migrierenden Zellen als Ligand an die Moleküle der ECM benötigt werden. Da hMSC im Gegensatz zu Gliomzellen physiologische Proliferationsraten und Invasioneigenschaften aufweisen, war eine geringere Migration von hMSC im Vergleich zu Gliomen zu erwarten.

5.4 Invasion und Integration von hMSC in Gliome

Der Invasionsassay diente dem Vergleich der invasiven Eigenschaften von murinen und humanen Stammzellsphäroiden sowie der Untersuchung, inwiefern die Anwesenheit von VEGF das Invasionsverhalten von Stammzellen beeinflusst. Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob die Invasion eines Sphäroids in den anderen von Stammzellen oder von Gliomzellen ausging.

In den Invasionsassays von DiI-markierten hMSC Sphäroiden vs. U373 GFP Gliome zeigte sich eine frühzeitige Invasion des primären hMSC Sphäroids und die Integration einzelner Stammzellen in den Gliomsphäroid. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass der wachsende Gliomsphäroid aufgrund eines hohen Zellumsatzes sowie Strukturveränderungen, die Stammzellen als unterstützende mesenchymale Stromazellen integriert. Diese These wird durch die Arbeit von Nakamizo und Mitarbeiter (Nakamizo et al. 2005) gestützt, in welcher in vivo gezeigt werden konnte, dass hMSC nach lokaler und intravasaler Applikation und nach Migration in humane Gliome integrieren und dass dieser Prozess durch Wachstumsfaktoren verstärkt wird. Auch aus anderen Arbeiten geht hervor, dass hMSC sich in gliale Zellen, u. a. auch Astrozyten, transdifferenzieren können

und sich anschließend in das Stroma von Gliomen integrieren, um so bei der Formierung der Stromastruktur und im Rahmen der Größenzunahme bei der Gewebsumstrukturierung mitzuwirken (Glass et al. 2005). Eine andere Rolle wäre die unterstützende Wirkung im Rahmen von Gewebshheilung in Gliomen und Aufrechterhaltung eines intakten Tumormilieus, um so das Tumorstadium zu verstärken, da Nakamizo (Nakamizo et al. 2005) in seiner Arbeit auch zeigen konnte, dass Tiere mit intrakraniellen Gliomen nach intratumoraler Implantation nicht-sekretierender hMSC eine deutlich reduzierte Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten.

In der gleichen Arbeit (Nakamizo et al. 2005) führte die Transfektion der hMSC mit einem therapeutischen Gen, welches eine erhöhte Sekretion von IFN- β verursachte, und anschließende Implantation in Gliome *in vivo*, zu einem signifikant längerem Überleben der Tiere, so dass hMSC als zellulärer Träger eines therapeutischen Gens in Gliome dienen könnten.

Nakamura und Kollegen konnten außerordentliche migratorische Eigenschaften und direkte Invasion von murinen MSC in Rattengliome *in vivo* nachweisen (Nakamura et al. 2004). Dieses wird auch durch die Arbeit von Lee und Kollegen, welche einen Tropismus von Subtypen humaner mesenchymaler Stammzellen in Richtung intrakranieller Pathologien (Lee et al. 2003), zum Beispiel simultan implantierte Gliome *in vivo*, nachweisen konnten, gestützt. Diese Arbeiten präsentieren jedoch keine Daten bezüglich der möglichen Mechanismen, welche den Tropismus der hMSC bedingen. Es könnte auch vermutet werden, dass diese Motilität zum Teil durch die entzündliche Umgebungsreaktion im Bereich des Tumors bedingt ist, da auch Chemokine bzw. Zytokine durch Verletzungen oder Narbengewebe eine Migration von neuronalen Stammzellen induzieren (Sun et al. 2004).

Ein Kandidatmolekül für die Regulierung der hMSC Migration, könnte das von Gliomen sezernierte VEGF (vascular endothelial growth factor) sein.

5.5 Einfluss von VEGF auf Stammzellmigration

VEGF-reguliertes Verhalten von mesenchymalen Stammzellen scheint eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Chondrozyten und epiphysealer Vaskularisation (Maes et al. 2002) (Maes et al. 2004) zu spielen. hMSC können eine Vielzahl von Zytokinen, unter anderem auch VEGF, produzieren und so die Vaskularisation von Knochen, aber auch die Differenzierung von Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten (Kinnaird et al. 2004) vermitteln.

In embryonalen Stammzellen scheint VEGF eine wichtige Rolle als autokriner Faktor zum Überleben bei Hypoxie (Brusselmans et al. 2005) zu spielen. Des Weiteren wurde in verschiedenen Ar-

beuten am Herzen bei chronischer und akuter Ischämie eine Akkumulation von hMSC sowie deren regenerativen Kapazitäten am infarzierten Myokard gezeigt (Orlic et al. 2003) (Penn et al. 2004). Es kommt hier zu einer Integrierung von hMSC in das ischämische Gewebe mit einer Differenzierung in glatte Muskulatur oder Endothelzellen. Die Rolle von VEGF-A konnte in diesem spezifischen Kontext noch nicht ausreichend geklärt werden.

(Chen YJ et al. 2004) konnten demonstrieren, dass die Rekrutierung von hMSC im Rahmen der Regeneration von Knochen chemotaktisch durch VEGF-A Expression vermittelt wird.

Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle der VEGF Produktion von Gliomen und die VEGF-abhängige Rekrutierung von hMSC untersucht, da die VEGF-A Produktion in Gliomen sowie die Rekrutierung anderer Zellenlinien, z.B. Endothelzellen, durch VEGF bereits in anderen Arbeiten untersucht und aufgezeigt werden konnte (Goldbrunner et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass das migratorische Verhalten von hMSC signifikant durch VEGF-A gesteigert werden konnte. Gleiches gilt für die murine C17.2 NSC Linie. In den murinen Konfrontationsassays mit VEGF-sense und VEGF-antisense C6 Gliomen vs. murine C17.2 NSC, zeigte sich auch dass die Invasion der C17.2 Sphäroide in VEGF-produzierende C6 Sphäroide, ungefähr dreimal schneller war im Vergleich zu C6 Gliomen, welche kein VEGF produzieren.

Daher konnte VEGF-A als ein signifikanter Motilitätsfaktor für mesenchymale und neurale Vorläuferzelle in vitro bestimmt werden.

Die Tatsache, dass tumorkonditioniertes Medium von Gliomen sowohl die Migration wie auch die Invasion von hMSC ungefähr um das Doppelte stimulierte, im Vergleich zu VEGF-A alleine, deutet auf die Beteiligung weiterer chemotaktischer Faktoren hin.

Heese und Mitarbeiter (Heese et al. 2005) untersuchten in ihrer Arbeit die Zusammensetzung von tumorkonditionierten Medien unterschiedlicher humaner Gliomzelllinien sowie deren chemotaktischer Effekt auf die C17.2 Zelllinie. Auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration von C17.2 Zellen durch tumorkonditionierte Medien auf das 5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren konnten 13 verschiedene Wachstumsfaktoren in den tumorkonditionierten Medien identifiziert werden, von welchen vor allem SF/HGF die größte migratorische Stimulation induzierte.

In Kooperation mit dem neurologischen Forschungslabor des Klinikum Grosshadern (Prof. Straube und Mitarbeiter) wurde der Chemokineseassay mittels tumorkonditioniertem Medium und der Boyden Kammer durchgeführt. Die Boyden-Kammer (Boyden et al. 1962) besteht aus zwei übereinander liegenden Kammern, die durch einen Kernporen-Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 5-12 μm , meist 8 μm , voneinander getrennt sind. Grundsätzlich werden die hMSC in die obere der beiden Kammern auf dem Polycarbonat-Filter ausgesät und ihre Migration durch den Filter hindurch auf die untere Seite mittels Mikroskopie quantifiziert.

Bei den untersuchten hMSC (Schichor et al. 2006) zeigte sich, dass durch tumorkonditioniertes Medium der Zelllinie U-251MG, welche außerordentlich mehr VEGF-A als die anderen benutzten Zelllinien produziert, eine deutlichere Steigerung der Migration erreicht wurde. Bei MCP-1 konnte kein migrations-steigernder Effekt nachgewiesen werden. Wang et al (Wang et al. 2002) postulierten, dass MCP-1 aus hypoxisch-geschädigtem ZNS Gewebe einen chemotaktischen Effekt auf rodente MSC hat, da diese Zellen eine gesteigerte Migration nach Stimulation mit MCP-1 in dem Boyden Chamber Assay gezeigt haben.

Eine Ursache für diese Ergebnisse könnten die großen Unterschiede in der Rezeptor Expression zwischen humanen und rodenten mesenchymalen Stammzellen sein.

6. Zusammenfassung

Das invasive und infiltrative Wachstum sowie das unvermeidbare Rezidivwachstum des Glioblastoma multiforme nach erfolgter Behandlung durch Operation, Radio- und Chemotherapie, stellen eine große therapeutische Herausforderung dar und erfordern eine effiziente und den Patienten zumutbare Therapie.

Nach lokaler Implantation bzw. nach systemischer intravenöser Gabe konnte eine extensive Migration muriner neuraler Stammzellen (NSC) in Gegenwart eines Glioblastoms nachgewiesen werden. Die migratorischen Eigenschaften und die Massenreduktion des Tumors durch Transfektion der NSC mit einem therapeutischen Gen ließen die NSC als einen zellulären und tumorspezifischen Therapieträger in Frage kommen.

Die in der Zielsetzung aufgeführten Probleme, welche sich durch eine Therapie mit embryonalen neuralen Stammzellen ergeben würden, erforderten eine potente und verfügbare Alternative als zelluläres therapeutisches Vehikel in der Therapie des Glioblastoms.

In dieser Arbeit wurden die migratorischen und invasiven Eigenschaften von humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen mit denen von murinen neuralen Stammzellen verglichen sowie der Einfluss von Komponenten der Extrazellulärmatrix, tumorkonditionierten Medien und VEGF untersucht, um die prinzipielle Eignung von hMSC als Träger einer autologen Stammzelltherapie bei Patienten mit einem Glioblastoma multiforme, zu untersuchen.

Es wurden humane mesenchymale Stammzellen von Knochenmarksspendern isoliert und deren Eigenschaften mit denen der murinen NSC C17.2 Zelllinie verglichen, weil deren Eignung als zellulärer Vektor im Rahmen der Gliomtherapie bereits beschrieben ist. Um die migratorischen Eigenschaften von Stammzellen und Gliomen zu untersuchen, wurden die Versuche jeweils mit der humanen U373 Gliomzelllinie sowie der rodenten C6 Gliomzelllinie durchgeführt. Bei den murinen Invasionsassays wurden zusätzlich VEGF-sense- und VEGF-antisense-C6 Gliome benutzt, um den Einfluss von VEGF auf die Invasion von murinen neuralen Stammzellen (C17.2) zu untersuchen.

In den Migrationsassays konnte nachgewiesen werden, dass sich die C17.2 Zellmigration durch VEGF-A stimulieren ließ. Dieser Effekt konnte signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe durch den Überstand der C6 Gliomzelllinie gesteigert werden. Dieser Effekt konnte auch bei den humanen mesenchymalen Stammzellen beobachtet werden. VEGF-A führte zu einem Anstieg der Migration um ungefähr 30%. Des Weiteren führte die Zugabe von gliomkonditioniertem Medium der Zelllinie U373 zu einem Anstieg der hMSC Migration um ungefähr 100% im Vergleich zu VEGF-A. Im Vergleich zur Migration auf Laminin, zeigte sich kein signifikanter Un-

terschied der hMSC Migration auf Tenascin. Verglichen mit der U373 Gliomzelllinie ist die Migrationsgeschwindigkeit von hMSC auf Komponenten der Extrazellulärmatrix deutlich geringer. In den humanen Konfrontationsassays zeigten die hMSC eine extensive Invasion in U373 Gliomsphäroide. Mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie konnte innerhalb von 12 Stunden gezeigt werden, dass DiI-markierte Stammzellen aus dem Sphäroidverband in den GFP-transfizierten Gliomsphäroid invadieren, dort integriert werden und sich weiterhin vital teilen. In den murinen Konfrontationsassays wurde die Abhängigkeit des invasiven Verhaltens der neuronalen Stammzelllinie C17.2 von VEGF mittels transfizierter C6 Gliome untersucht. Die Invasion der C17.2 Sphäroide in VEGF-produzierende C6 Sphäroide war ungefähr dreimal schneller im Vergleich zu C6 Gliomen, welche kein VEGF sezernieren. In den Chemokinesesassays mittels der Boyden-Kammer konnte die signifikante Stimulation der hMSC-Migration durch verschiedene tumorkonditionierte Medien im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt werden. Des Weiteren ließ sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration von hMSC durch VEGF-A nachweisen. In niedrigen Konzentrationen von 1 und 5 ng/ml zeigte sich ein 3-facher bzw. 8-facher Anstieg der Stammzellmigration im Vergleich zur Negativkontrolle mit MCP-1. In Konzentrationen von 25 ng/ml zeigte eine Erhöhung der Stammzellmigration um das 20-fache.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Vergleichbarkeit der Migration und Invasion humaner mesenchymaler Stammzellen und muriner neuronaler Stammzellen und zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Migration und Invasion von hMSC von VEGF-A und anderen Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren in tumorkonditionierten Medien.

Da die Motilität und Invasivität von hMSC und mNSC sehr ähnlich ist, könnten hMSC als therapeutische zelluläre Vektoren gegen Gliome dienen.

7. Abkürzungen

Abb.	- Abbildung
5-ALA	- 5-Aminolävulinsäure
DiI	- 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	- Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNS	- Desoxyribonucleinsäure
ECM	- Extrazellulärmatrix
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	- Epidermal growth factor
FCS	- Foetales Kälberserum
Flt-1	- Fms-like tyrosin kinase
GBM	- Glioblastoma multiforme
GFP	- Green fluorescence protein
Gy	- Gray
hMSC	- Humane mesenchymale Stammzellen
HSC	- Hämatopoetische Stammzellen
HSV-Tk	- Herpes simplex Virus-Thymidin-Kinase
IU	- International units
KCl	- Kaliumchlorid
Kdr-Flk-1	- Fetal liver kinase-1
MCP-1	- Monocyte-chemoattractant-protein-1
MGMT	- Methylguanin-DNS-methyltransferase
ml	- Millilitre
MRT	- Magnet Resonanz Tomogramm
NaCl	- Natriumchlorid
ng	- Nanogramm
mNSC	- Murine neurale Stammzellen
PBS	- Phosphat gepuffertes Salin
SF/HGF	- Scatter factor/Hepatocyte growth factor
TKM	- Tumorkonditioniertes Medium
VEGF	- Vascular endothelial growth factor
Vs.	- Versus
WHO	- World Health Organisation

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : Auszug aus der WHO Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems

Abb. 2 : T1-gewicht. MRT eines GBM nach Gadolinium Gabe

Abb. 3 : T2-gewicht. MRT des gleichen Patienten^

Abb. 4 : 40x vergrößerte Aufnahme einer hMSC Monolayer-Kultur (Zelllinie NN20)

Abb. 5 : Zelllinien

Abb. 6 : DiI markierter Stammzellsphäroid in Kollagengel

Abb. 7 : C6 Migrationsassay auf Laminin mit TKM

Abb. 8 : Ausmessen der Migrationsfläche mit dem Optimas® Programm

Abb. 9 : Boyden-Kammer, schematisch

Abb. 10: Murine C17.2 auf Laminin

Abb. 11: hMSC auf Laminin mit VEGF- und TKM-Stimulation und Kontrolle

Abb. 12: hMSC auf Laminin und Tenascin

Abb. 13: hMSC, U373 auf Laminin, Tenascin

Abb. 14: hMSC Chemokineseassay mit VEGF- und TKM-Stimulation, MCP-1 und Kontrolle

Abb. 15: C6 VEGF-sense vs. C17.2

Abb. 16: C6 VEGF-antisense vs. C17.2

Abb. 17: hMSC NN22 vs. U373 GFP

Abb. 18: hMSC NN23 vs. U373 GFP

Abb. 19: DiI (rot) markierte hMSC vs. U373 GFP Gliom (grün)

9. Literaturverzeichnis

- ABOODY K. S., BROWN A., RAINOV N.G., BOWER K.A., LIU S., YANG W., SMALL J. E., HERRLINGER U., OUREDNIK V., BLACK P. M., BREAKFIELD X. O., SNYDER E. Y. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97: 12846-12851
- BAO S., WU Q., MCLENDON R.E., HAO Y., SHI Q., HJELMELAND A.B., DEWHIRST M.W., BIGNER D.D. RICH J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, Vol 444: 756-760.
- BAUER K. D., KENG P., SUTHERLAND R.M. Isolation of quiescent cells from multicellular tumor spheroids using centrifugal elutriation. *Cancer Res* 1982 : 42 72-78
- BEYER NN, DA SILVA MEIRELLES L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006;174:249-82
- BOEYUM A. Isolation of mononuclear cells. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97 :77-89
- BOYDEN S. Chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962;115 453-66.
- BROWN P.D., BALLMAN K.V., RUMMANS T.A., MAURER M.J., SLOAN J.A., BOEVE B.F., GUPTA L., Tang-WAI D.F., ARUSELL R.M., Clark M.M., Buckner J.C. A prospective study of quality of life in adults with newly diagnosed high-grade gliomas : The Impact of the extent of resection on quality of life and survival. *Neurosurgery* 2005 57:495-504
- BRUSSELMANS K., BONO F., COLLEN D., HERBERT J. M., CARMELIET P., DEWERCHIN M. A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J Biol Chem* 2005 280: 3493-3499.
- BURGER P.C., GREEN S.B. Patient age, histologic features, and length of survival in Patients with GBM. *Cancer* 1987 59: 1617-1625
- CASTEL J.C., CAILLE J.M. : Imaging of irradiated brain tumours. Value of magnetic resonance imaging. *J Neuroradial* 1989;16:81-132
- CHAMBERLAIN J.R., SCHARZE U, WANG P.R., HIRATA R.K., HANKENSON K.D., PACE J.L., et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 2004;303:1198-1201.
- CHEN Y. J., WURTZ T., WANG C. J., KUO Y. R., YANG K. D., HUANG H. C., WANG F. S. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res* 2004 22: 526-534
- CHU K., KIM M., PARK K.I., JEONG S.W., PARK H.K., KANG K.S., JUNG K.H., KIM J., KIM S.U., ROH J.K. Human neural stem cells improve sensorimotoric deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 2004 :1016(2):145-53
- D'AMOUR K. A. and GAGE F. H.:Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003 100; Suppl 1:11866-72.

EHTESHAM M., YUAN X., KABOS P., CHUNG N.H, LIU G., AKAKSAKI Y, BLACK K.L., YU J.S. Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4, *Neoplasia* 2004; 6 287-293

ESTELLER M., GARCIA-FONCILLAS J., ANDION E., GOODMAN S.N., HIDALGO O.F., VANACLOCHA V., BALIN S.B., HERMAN J.G. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343:1350-1354

FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: Basic Science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611

FINE H.A., DEAR K.B., LOEFFLER J.S., BLACK P.M., CANELLOS G.P. Meta Analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; 71:2585-2597

FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995: 1: 27-31

FORSYTH P.A, Posner J.B. Headaches in Patients with brain tumors, a study of 111 Patients. *Neurology* 1993;43:1678-1683

FRIEDENSTEIN A.J., CHAILAKHJAN R.K., LALYKINA, K.S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet* 1970;3(4):393-403

GIESE A., WESTPHAL M. Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 217-225

GLASS R, SYNOWITZ M, KRONENBERG G, WALZLEIN JH, MARKOVIC DS., WANG LP, GAST D, KIWIT J, KEMPERMANN G, KETTENMANN H. Glioblastoma-induced Attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J Neurosci* 2005;25:2637-2646

GOLDBRUNNER R.H., BENDSZUS M., SASAKI M., KRAEMER T., PLATE K.H., ROOSEN K., TONN J.-C.: Vascular endothelial growth factor-driven Glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 2000; 47: 921-930

GOLDBRUNNER R. H., BERNSTEIN J. J. , PLATE K. H., VINCE G. H., ROOSEN K. and TONN J. C. Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *J Neurosci Res* 1999 55: 486-495.

GOLDBRUNNER R.H., BERNSTEIN J.J., TONN J.C. Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir* 1999;141(3):295-305

GRONTHOS S., SIMMONS P. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematol* 1996, 5:15

HAYNESWORTH S.E., BARBER M.A., CAPLAN I.A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cell are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992, 13:69-80

HEESE O., DISKO A., ZIRKEL D., WESTPHAL M., LAMSZUS K. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro-oncol* 2005 Oct;7(4):476-84.)

HEGI M., DISERENS A.C., GORLIA T., HAMOU M.F., DE TRIBOLET N., WELLER M., KROS J. M., STUPP R. et al. MGMT gene silencing and benefit from Temozolmide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352: 997-1003

HERMANN A., GASTL R., LIEBAU S., POPA MO, FIEDLER J., BOEHM BO., MAISEL M., LERCHE H., SCHWARZ J., BRENNER R., STORCH A. Efficient generation of neural stem-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Science* 2004; 117:4411-4422.

HEROLD-MENDE C., MUELLER M.M., BONSANTO M.M., SCHMITT H.P., KUNZE S., STEINER H.H. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression, *Int J Cancer Res.* 2002 ;98(3):362-9

HESS K.R. Extent of resection as prognostic variable. *J Neurooncology* 1999; 42:227-231

HORWITZ E.M, GORDON P.L., KOO, W.K., MARX J.C., NEEL M.D., MCNALL R.Y., et al. Isolated allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:8932-37

HUANG W., CHIQUET-EHRISMANN R., MOYANO J.V., GARCIA-PARDO A., OREND G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res* 2001, 61:8586-94

KEARNS S.M., LAYWELL E.D., KUKEROV V.K., STEINDLER D.A. Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exper Neurol* 2003 182 240-244.

KIM S. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology* 2004 Sep; 24(3):157-71.

KINNAIRD T., STABILE E., BURNETT M. S., EPSTEIN S. E. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ.Res.* 2004 20;95: 354-363

KINNAIRD T., STABILE E., BURNETT M. S., LEE C. W., BARR S., FUCHS S., EPSTEIN S. E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ.Res.* 2004 194: 678-685

KINNAIRD T., STABILE E., BURNETT M. S., SHOU M., LEE C. W., BARR S., FUCHS S., EPSTEIN S. E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004 109: 1543-1549.

KLEIHUES P., LOUIS D.N., SCHEITHAUER B. W., RORKE L. B., REIFENBERGER G., BURGER P. C., CAVENEE W. K. : The WHO Classification of tumores of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61: 215-225

KLEINMAN H.K., MCGARVEY M.L., LIOTTA L.A., ROBEY P.G., TRYGGVASON K., MARTIN G.R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *J Biochemistry* 1982, 6188-6193

KUNZ-SCHUGHART L.A., FREYER J.P., HOFSTAEDTER F., EBNER R. L et al : The use of 3D-Cultures for throughput screening: The multizellular Spheroid Modell. *J Biomol Scr* 2004, 273-285

LAWS E.R. Jr., GOLDBERG W.J., BERNSTEIN J.J.: Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited. *Int J Dev Neurosci* 1993 11:691-697

LEE J., ELKAHLOUN A. G., MESSINA S. A., FERRARI N., XI D., SMITH C. L., COOPER R., Jr., ALBERT P. S., FINE H. A. Cellular and genetic characterization of human adult bone marrow-derived neural stem-like cells: a potential antiglioma cellular vector. *Cancer Res* 2003 63: 8877-8889.

MAES C., STOCKMANS I., MOERMANS K., VAN LOOVEREN R., SMETS N., CARMELIET P., BOUILLON R., CARMELIET G. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J.Clin.Invest* 2004 113: 188-199.

MAES C., CARMELIET P., MOERMANS K., STOCKMANS I., SMETS N., COLLEN D., BOUILLON R., CARMELIET G.. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2002 111: 61-73.

MARX J.C., NEEL M.D., MCNALL R.Y., et al. Isolated allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:8932-37

MOSCONA J.E. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc Natl Acad Sci* 1957, 43:184-194.

MUELLER-KLIESER W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987, 113: 101-122

MUELLER M. M., WERBOWETSKI T., MAESTRO DEL R.F. Soluble factors involved in glioma invasion. *Acta Neurochir* 2003 ;145: 999-1008

NAKAMIZO A., MARINI F., AMANO T., KHAN A., STUDENY M., GUMIN J., LANG F.F. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005;65 3307-3318

NAKAMURA K., ITO Y., KAWANO Y., KUROZUMI K., KOBUNE M., TSUDA H., BIZEN A., HONMOU O., NIITSU Y., HAMADA H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004. 11: 1155-1164.

NEDERMANN T., NORLING B., GLIMELIUS B., CARLSSON J., BRUNK U.: Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1984: 44 3090-3097.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Transplanted Adult Bone Marrow Cells Repair Myocardial Infarcts in Mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001 a;938:221-9

- ORLIC D., KAJSTURA J., CHIMENTI S., BODINE D. M., LERI A., ANVERSA P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; 7 Suppl 3:86-8.: 86-88
- PADOVAN CS; JAHN K, BIRNBAUM T., REICH P, SOSTAK P, STRUPP M, STRAUBE A. Expression of neuronal markers in differentiated marrow cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant.* 2003;12:839-848
- PENN M. S., ZHANG M., DEGLURKAR I., TOPOL E. J. Role of stem cell homing in myocardial regeneration. *Int.J.Cardiol* 2004 ;95 Suppl 1:S23-5.: S23-S25
- PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS, R., MOSCA J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S., MARSHAK, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science* 1999: 284 143-147
- PLATE K.H., BREIER G., WEICH H.A., RISAU W.: Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845-848
- PLATE K.H, RISAU W.: Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 1995; 15: 339-47.
- PRADOS M.D., MCDERMOTT M., CHANG S.M., WILSON C.B., FICK J., CULVER K.W. et al. Treatment of progressive or recurrent glioblastoma multiforme in adults with herpes simplex virus thymidine kinase vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration: a phase I/II multi-institutional trial. *J Neurooncol* 2003;65 269-278.
- RADHAKRISHNAN K., MOKRI B., PARISI J.E., O'FALLON W.M., SUNKU J., KURLAND L.T: Trends in incidence of primary brain tumors. *Ann Neurol* 1995;37:67-73
- RAINOV N.G., SÖHLING A., HEIDECKE V.: Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 2006; 20 1-13
- RISAU W:Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997: 386 671-674.
- RISAU W, FLAMME I:Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995 :11 73-91
- SCHICHOR C., BIRNBAUM T., ETMINAN N., SCHNELL O., GRAU S., MIEBACH S., ABOODY K., PADOVAN C., STRAUBE A., TONN J.C., GOLDBRUNNER R. :Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC) *Exp Neurol* 2006, 199: 301-10.
- SCOTT J.N., REWCASTLE N.B., BRASHER P.M., FULTON D., MACKINNON J.A., HAMILTON M., CAIRNCROSS J.G., FORSYTH P. Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? *Ann Neurol* 1999;46:183-188
- SIMPSON J.R., HORTON J., SCOTT C., CURRAN W.J., RUBIN P., FISCHBACH J., ISAACSON S., ROTMAN M., ASBELL S.O., NELSON J.S. et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:239-244
- SINGH S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432, 396-401

STUMMER W., PICHLMEIER U., MEINEL T.H., WIESTLER O.D., ZANELLA F., REULEN H.J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet* 2006, Vol 7: 392-401

STUPP R., MASON W. P., VAN DEN BENT M.J., WELLER M., FISHER B., TAPHOORN M.J.B., MIRIMANOFF R. O. et al: Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *N Engl J Med* 2005, 352:987-996

SUN L., LEE J., and FINE H. A. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J.Clin.Invest* 2004. 113: 1364-1374.

WALKER M.D., ALEXANDER E. Jr., HUNT W.E., MACCARTY C.S, MAHALEY J.Jr, MEALEY J. Jr., OWENS G., RANSOHOFF J 2nd, ROBERTSON J.T., SHAPIRO W.R., SMITH K.R. Jr, WILSON C.B., STRIKE T.A. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J Neurosurg* 1978; 49:333-343

WANG L, LI Y, CHEN J, GAUTAM SC, ZHANG Z, LU M, CHOPP M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002;7:113-7

YUHAS JM, LI AP, MARTINEZ AO, LADMAN AJ. A Simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1977; 37:3639-3643

YUNG W.K., PRADOS M.D., YAYA-TUR R., ROSENFELD S.S., BRADA, M., FRIEDMANN H.S., ALBRIGHT R. OLSON, J., CHANG S.M., LEVIN, V.A et al Multicenter phase II trial of temozolomide in patient with anaplastic astrocytoma. *J Clin Oncology* 1999; 17:3693

ZHAO LR, DUAN WM, REYES M, KEENE CD, VERFAILLIE CM, LOW WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20

ZIPORI D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 2004: 33 211-215.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. J.C. Tonn danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Universitätsklinik München sowie auch für die konstruktiven Vorschläge zur Umsetzung des Projektes.

Bei Herrn PD Dr. R.H. Goldbrunner bedanke ich mich besonders für das interessante Thema, die gute Betreuung, seine Unterstützung und auch, dass er mich für das Fach der Neurochirurgie begeistern konnte und mich in meinem Berufswunsch bestärkt hat.

Herrn Dr. Ch. Schichor gilt mein besonderer Dank, da er für Fragen und Probleme immer erreichbar war, mich sehr gut betreut hat und sein stetes Interesse zum Fortgang dieser wissenschaftlichen Arbeit maßgeblich beigetragen hat. Ohne ihn wäre die vorliegende Dissertation nicht zustande gekommen.

Herrn Dr. T. Birnbaum und Dr. C. Padovan danke ich für die Einarbeitung in die Stammzellisolation und für die gute Kooperation.

Danken möchte ich besonders Frau S. Miebach, Frau S. Lang, Herrn M. Heide und Dr. S. Grau für die Einarbeitung in die Zellkultur, die hilfreiche Unterstützung während der Experimente und für die Anregungen zur Verbesserung und Durchführung des Projektes.

Bei den Mitarbeitern des Laser Forschungsinstitutes der LMU bedanke ich mich für die Bereitstellung ihrer Räume und Geräte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich vor allem bei meinen geliebten Eltern und meinem Bruder Yama, welche während des gesamten Studiums an mich geglaubt haben und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Ohne sie hätte ich meine Ziele und Wünsche nicht verfolgen und erreichen können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nima Etminan
Geburtsdatum: 14. April 1978
Geburtsort: Hagen, Deutschland
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Qudsia Etminan
Dr. med. Khalil Etminan
Geschwister: Yama Etminan
Staatsangehörigkeit: deutsch
Email: etminan@uni-duesseldorf.de

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschohle Boloh, Hagen
1988 - 1998 Ricarda-Huch-Gymnasium, Hagen
1998 Erwerb der AHZB

Studium

04/1999 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

2001 **Ärztliche Vorprüfung**, Düsseldorf

2002 **Erstes Staatsexamen**, Düsseldorf

2002 - 2004 Technische Universität, München

2004 **Zweites Staatsexamen**, München

2004 - 2005 **Praktisches Jahr**
1. Terial: Chirurgie, Universitätsspital, Zürich, Schweiz
2. Terial: Neurochirurgie, Universitätsklinik Düsseldorf
3. Terial: Innere Medizin, Universitätsklinik, Düsseldorf

06/2005 **Drittes Staatsexamen**, Düsseldorf
und **Approbation** als Arzt

Famulaturen

04/2001 Abdominal Chirurgie, Marien-Hospital, Witten
07/2001 Allgemeinmedizin Dr. Olomi, Chicago, USA
09//2001 Innere Medizin, Dr. Etminan, Witten
09/2002 Neurochirurgie, Klinikum Großhadern, München
08/2003 Traumatologie, Rotes Kreuz Krankenhaus, München

Facharztausbildung

07/2005 - dato Facharztausbildung in der Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Stipendien

04/2007 Forschungsstipendium der Stiftung Neurochirurgische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie

Berufserfahrung

2001- 2002 Chirurgische Assistenz in Plastischer Chirurgie, Dr. Ansari, Düsseldorf

2002 - 2003 Erstellen und Korrektur medizinischer Artikel, Content und Online Services, ArztpartnerAlmeda AG, München

Publikationen

1. Schichor, C., Birnbaum, T., **Etminan, N.**, Schnell, O., Grau, S., Miebach, S., Aboody, K., Padovan, C., Straube, A., Tonn, J.C., and Goldbrunner, R. 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* 199:301-310.
2. Stummer, W., Beck, T., Beyer, W., Mehrkens, J.H., Obermeier, A., **Etminan, N.**, Stepp, H., Tonn, J.C., Baumgartner, R., Herms, J., and Kreth, F.W. 2007. Long-sustaining response in patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: Case study. *J Neurooncol Epub* 6.11.07