

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. M. Westphal

Charakterisierung des gliomassoziierten Migrationsverhaltens  
neuraler Stammzellen *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Andreas Disko  
aus Barcelona / Spanien

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 30.05.2007  
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. K. Lamszus  
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. A. R. Zander  
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. C. Hagel

# Charakterisierung des gliomassoziierten Migrationsverhaltens neuraler Stammzellen *in vitro*

<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>Einleitung.....</b>	<b>- 6 -</b>
<i>Glioblastoma multiforme</i> .....	- 6 -
<i>Neurale Stammzellen</i> .....	- 8 -
<i>In vitro Migrationsassays</i> .....	- 11 -
<i>Wachstumsfaktoren</i> .....	- 13 -
Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF).....	- 13 -
Epidermal growth factor (EGF).....	- 14 -
Fibroblast growth factor (FGF-1 und FGF-2) .....	- 14 -
Platelet-derived growth factor (PDGF-AA, PDGF-BB).....	- 14 -
Insulin-like growth factor (IGF-1 und IGF-2).....	- 15 -
Transforming growth factor (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ und TGF- $\beta_2$ ) .....	- 15 -
Midkine und Pleiotrophin (MK und PTN).....	- 16 -
<i>Problemstellung</i> .....	- 16 -
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>- 18 -</b>
<i>Zelllinien</i> .....	- 18 -
<i>Medien und Zellkultur</i> .....	- 19 -
<i>Gewinnung von konditioniertem Medium</i> .....	- 20 -
<i>Modifizierter Boydenkammer-Migrationsassay</i> .....	- 20 -
<i>Sphäroid-Kokultur-Assay</i> .....	- 22 -
<i>RT-PCR Analyse</i> .....	- 23 -
<i>Statistische Analyse</i> .....	- 25 -

<b>Ergebnisse</b> .....	- 27 -
<i>Chemotaktische Stimulation der neuralen Stammzellmigration</i> .....	- 27 -
<i>Stimulation der Stammzellinvasion</i> .....	- 33 -
<i>Stammzellinvasion versus Stammzellmigration</i> .....	- 34 -
<i>Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren</i> .....	- 35 -
<b>Diskussion</b> .....	- 38 -
<b>Zusammenfassung</b> .....	- 46 -
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	- 47 -
<b>Statistische Daten</b> .....	- 48 -
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	- 53 -
<b>Danksagung</b> .....	- 59 -
<b>Lebenslauf</b> .....	- 60 -

## Arbeitshypothese und Fragestellung

Untersuchungen der Arbeitsgruppe um E. Snyder haben gezeigt, dass neurale Stammzellen *in vivo* die Eigenschaft haben, zu einzelnen Glioblastomzellkolonien zu migrieren. Daher wären diese Stammzellen als ideales Transportvehikel für Proteine zur Hemmung der Invasion, Proliferation und Angiogenese von malignen Gliomen denkbar. Bisher ist dieses Migrationsverhalten jedoch nicht systematisch untersucht worden.

Wir nehmen an, dass die Stammzellen durch die von Gliomen exzessiv sezernierten Wachstumsfaktoren zur Migration stimuliert werden, weswegen wir den Effekt von konditionierten Medien verschiedener Glioblastomzelllinien sowie von isolierten Wachstumsfaktoren auf ihr Migrationsverhalten im Boydenassay untersuchten. Als Gegenhypothese stünde, dass der entscheidende Stimulus zur zielgerichteten Migration durch eine Reaktion der umliegenden Astrozyten bzw. Mikroglia hervorgerufen wird und nicht durch die Tumorzellen selber.

Desweiteren gingen wir davon aus, dass die Stammzellen nicht nur in ihrer Fähigkeit gefördert werden, auf das Tumorgewebe zuzuwandern, sondern auch dieses zu infiltrieren. Um dies zu zeigen, konfrontierten wir die Zellen direkt mit Tumorsphäroiden und verglichen das Ausmaß der Infiltration mit den Ergebnissen der Boydenassays.

# Einleitung

## ***Glioblastoma multiforme***

Aus der Gruppe der astrozytären Neoplasien ist das Glioblastoma multiforme der Tumor mit dem höchsten Malignitätsgrad. Es hat eine Inzidenz von 6-7 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohnern pro Jahr und kann in jeder Altersgruppe mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 45. und dem 70. Lebensjahr auftreten. Es repräsentiert 15-20 % aller intrakranieller Tumoren und 50 % aller zerebralen Gliome (Black 1991). Bevorzugt sind Glioblastome in der Konvexität der Großhirnhemisphären lokalisiert, im Kindesalter treten sie auch im Bereich des Hirnstamms auf.

Makroskopisch gibt das Glioblastoma multiforme ein buntes Bild ab. Neben vitalem Tumorgewebe kommt es zu zentralen Nekrosen, Einblutungen, zystischen Veränderungen und narbigen Reaktionen. Histologisch zeigt sich ein pleomorphes Bild mit Kernatypien, Gefäßproliferationen und strichförmigen oder flächigen Nekrosen. Meist ist der Tumor von einem perifokalem Ödem mit Massenverschiebung umgeben. Glioblastome können spontan auftreten oder auch im Rahmen eines hereditären Tumorsyndroms wie dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Turcot-Syndrom. Klinisch können sich Glioblastome abhängig von ihrer Lokalisation und Größe durch eine Vielzahl von Symptomen äußern. Mögliche Manifestationen sind Krampfanfälle, Zeichen erhöhten intrakraniellen Drucks mit Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen, fokale neurologische Symptome und Zeichen wie Hemiparese, Hemianopsie oder neuropsychologische Störungen wie Aphasie oder Apraxie.

Die Verdachtsdiagnose eines Glioblastoms kann anhand der Klinik und durch bildgebende Verfahren gestellt werden. In der Computertomographie (CT) zeigt sich typischerweise eine Kontrastmittel anreichernde ringförmige Läsion mit einem hypodensen zentralen Areal und einem fingerförmig sich ausbreitendem perifokalem Ödem im Marklager. In der Kernspintomographie (MRT) zeigt sich in der T1-Wichtung eine hyperintense Läsion, die Gadolinium aufnimmt, und ein ausgedehntes Ödem in der T2-Wichtung.

Die Ausbreitung von malignen Gliomen wurde bereits in frühen neurochirurgischen und neuropathologischen Veröffentlichungen geschildert. Sie erfolgt entlang von Blutgefäßen, Basalmembranstrukturen und myelinisierten Axonen, bevorzugt entlang der Sehstrahlung, durch das Corpus callosum oder die Commissura anterior, wodurch es häufig auch zu einer Ausbreitung auf die kontralaterale Seite kommt (Matsukado et al. 1961). Ein solches bifrontales Wachstum wird auch als Schmetterlingsgliom bezeichnet. Die Invasion der Tumorzellen wird zur Zeit als ein dreistufiger Prozess angesehen (Liotta und Rao 1986): Der erste Schritt benötigt eine Adhäsion an Matrix-Proteine, die durch vier größere Rezeptorfamilien ermöglicht wird. Danach kommt es zur Degradation der Matrix durch tumoreigene Metalloproteinasen (Ennis und Matrisian 1994), Serin Proteinasen, Cystein Proteinasen, Aspartat Proteinasen und Endoglykosidasen (Romanic und Madri 1994) und letztlich zur aktiven Bewegung der Zelle in den nun frei gewordenen intrazellulären Platz.

Durch ihre hohe Proliferationsrate und ihr diffus-infiltrierendes Wachstum in das umliegende Parenchym entziehen sich Glioblastome derzeit jeder kurativen Therapie. Therapie der Wahl ist die Resektion, soweit dies ohne Risiko operationsbedingter Morbidität möglich ist, gefolgt von einer Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion mit einer Dosis von 54-60 Gy, appliziert in Einzelfractionen von 1,8-2 Gy. Nach neuen Ergebnissen einer Phase III Studie der EORTC konnte eine signifikante Verbesserung der 2 Jahresüberlebensrate mit einer zusätzlichen Gabe von Temozolomid (TMZ) in einer initialen Dosis von TMZ 75 mg/m<sup>2</sup>/d gefolgt von 6 Zyklen einer adjuvanten Therapie mit TMZ 150-200 mg/m<sup>2</sup>/d erreicht werden (Stupp et al. 2004; Stupp et al. 2005). Derzeit wird dieses Schema mit einer „one week on / one week off“- Therapie verglichen, bei der eine höhere Exposition mit diesem Medikament erreicht werden kann (Wick et al. 2004). Trotz multimodaler Therapiestrategien mit Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie beträgt die mittlere Überlebenszeit nicht mehr als 15-18 Monate. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind meist schon große Hirnareale infiltriert, wodurch eine radikale neurochirurgische Resektion unmöglich wird. Im Vordergrund neuer therapeutischer Ansätze müssen daher einerseits die Schonung des funktionell aktiven Parenchyms und andererseits die gezielte Suppression der Tumorprogression stehen.

## **Neurale Stammzellen**

Neurale Stammzellen (NSC) haben das Potential, sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in die verschiedene Zellsubtypen des zentralen Nervensystems wie Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass das Gehirn nach der Geburt diese Fähigkeit zur Regeneration neuer Neurone verliert und deswegen nach Verletzungen oder Krankheiten des Gehirnes einer schlechten Prognose ausgesetzt ist. Jedoch fanden sich innerhalb des letzten Jahrzehnts immer mehr Hinweise auf die Existenz neuraler Stammzellen und damit auch auf Neurogenese im postnatalen Hirn, besonders im Bereich der subventrikulären Zone und des Hippocampus. (Dirks 2001)

Das Gehirn entwickelt sich aus primitiven neuroepithelialen Zellen der Ventrikelzone und entlang des Neuralrohrs, die sich sowohl zu neuronalen als auch zu glialen Zellen entwickeln können. Diese Zellen können durch ihre Expression von Nestin identifiziert werden, das besonders stark zum Zeitpunkt der stärksten neuroepithelialen Proliferation, am embryonalen Tag 10,5 der Maus, exprimiert wird. Die terminale Differenzierung in Neurone und Astrozyten führt zu einer Herunterregulation von Nestin und zur Expression der entsprechenden zelltypischen Marker. Aber auch nach der Geburt findet sich noch eine geringe Anzahl Nestin exprimierender Zellen. Besonders im Stratum granulosum des Kleinhirns, sowie in den Zellen entlang der Ventrikel persistiert diese Expression. Von dort migrieren die Zellen zum Beispiel entlang des „rostral migratory streams“ in den Bulbus olfactorius, um sich dort in Neurone zu differenzieren (Dirks 2001).

Neurale Stammzellen sind in den vergangenen Jahren vor allem auf Grund ihrer Fähigkeit, verletztes oder fehlerhaftes Hirngewebe zu reparieren, in das Interesse der Wissenschaft gerückt (Park et al. 2002). Dabei wandern sie auf pathologisch verändertes Hirngewebe zu, beispielsweise Ischämieareale, Gewebe nach traumatischer Schädigung, Entzündungsherde oder Tumore.

Die Fähigkeit, zu soliden und infiltrierenden Tumoren zu migrieren, ist für die Neuroonkologie von besonderem Interesse. Im Maus-Gliom Modell konnte gezeigt werden, dass neurale Stammzellen die Eigenschaft haben, *in vivo* zu einzelnen

Tumorzellkolonien zu migrieren und sich dort um den Tumor zu verteilen (Aboody et al. 2000). Auch kleine Kolonien, die bisher operativ nicht zu rezidieren waren und von denen häufig ein Tumorrezidiv ausgehen konnte, konnten von den Stammzellen erreicht werden. Dieses Phänomen macht die Zellen attraktiv als spezifisches Transportvehikel für therapeutisch wirksame Genprodukte in die unmittelbare Umgebung der Tumorzellen, wo sie spezifisch die Proliferation, Migration und Angiogenese der disseminierten Gliom-Einzelzellen hemmen könnten. Beispielsweise sind genetisch modifizierte Stammzellen in der Lage, genetische metabolische Defekte in Neuronen und Glia zu korrigieren und sogar die defizienten Zellen zu ersetzen (Flax et al. 1998).

Die Forschung über die Möglichkeit zur ZNS-Reparatur stützt sich derzeit auf 3 Strategien (Ourednik et al. 1999):

- 1.) Transplantation fetaler Zellen als Ersatz für betroffene Zellpopulationen oder Ausbildung von fehlenden Strukturkomponenten wie Myelin, um Gewebebrücken für die axonale Regeneration von Empfängerzellen auszubilden, bzw. deren weitere Degeneration zu verhindern. Die Spenderzellen haben zusätzlich ein hohes Potential, im Empfängerhirn restorative Mechanismen zu fördern.
- 2.) Anwendung von Neurotrophinen und/oder Cytokinen zur Verminderung oder Verhinderung progressiver Neurodegeneration, Stimulation von Neuritenwachstum, Führung wachsender Axone an ihr Ziel und Förderung der Ausbildung von Synapsen.
- 3.) Ersatz fehlender neuroaktiver Moleküle wie Enzyme und Neurotransmitter. Als Vehikel für Gentherapieprodukte bieten sich besonders Stammzellen als ideale Kandidaten an, da diese einfach durch die meisten viralen und non-viralen Gentransfer-Methoden modifiziert werden können und die Genproduktion beibehalten, selbst die Transfektion multipler Gene wäre möglich. Sie könnten in das Gehirn implantiert werden, ohne dass es dabei einer Konditionierung wie zum Beispiel der Bestrahlung bei einer Knochenmarkstransplantation bedarf. Nach der Transplantation können die Zellen im Gehirn an den Ort der Läsion migrieren, wo sie sich durch ihre hohe Plastizität in den dort benötigten Zelltyp differenzieren und sich in die Zytoarchitektur integrieren können. Auf diese Weise wäre es möglich, Nebenwirkungen zu minimieren, da Stammzellen in unmittelbarer Nachbarschaft des betroffenen Hirnareals wirken würden und eine systemische Wirkung der exprimierten Faktoren durch die Blut-Hirn-Schranke ausgeschlossen werden könnte. Da es weiterhin nicht zu Abstoßungsreaktionen käme, ließe sich auf eine Immunsuppression verzichten.

In einer Reihe von Experimenten konnte die Fähigkeit von NSC, fehlende Zellen im degenerierenden Gehirn zu ersetzen, gezeigt werden. In der „meander tail“ (mea) Maus, die in bestimmten Regionen des Kleinhirns nicht genügend Körnerzellen ausbildet, ersetzen bei Geburt implantierte Stammzellen große Teile der fehlenden Zellen (Rosario et al. 1997). Die „reeler“ (rl) Maus, die sich durch die Mutation eines Gens für das extrazelluläres Matrixmolekül Reelin auszeichnet und eine abnorme laminäre Anordnung von Neuronen aufweist, wurde bei Geburt mit NSC transplantiert. Diese ersetzen nicht nur fehlende Neurone, sondern erzeugten auch eine dem Wildtyp entsprechende laminäre Zytoarchitektur, vermutlich indem sie für die Histogenese wichtige Moleküle inklusive Reelin erzeugten (Park et al. 2002). Die „shiverer“ (shi) Maus zeichnet sich durch dysmyelinisierte Oligodendroglia auf Grund von fehlendem „myelin basic protein“ aus, wodurch es zu dem charakteristischen Zittern der Maus kommt. Auch hier kam es nach Transplantation zu einer globalen Verbesserung der Myelinisierung und zu einem Sistieren des Zitterns (Yandava et al. 1999). Diese Fähigkeit zur Remyelinisierung spielt eine wichtige Rolle in vielen genetischen (z.B. Leukodystrophien und angeborenen metabolischen Störungen) und erworbenen (z.B. traumatisch, entzündlich oder hypoxisch-ischämisch bedingt) neurodegenerativen Prozessen. In vorläufigen Studien fand sich in Mäusen, deren dopaminerge Zellen mit systemischen MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) selektiv zerstört wurden und die unilateral mit NSC transplantiert wurden, eine aus Spender- und Empfängerzellen zusammengesetzte dopaminerge Zellpopulation. Dies läßt vermuten, dass NSC nicht nur fehlende Zellen ersetzen, sondern auch die regenerierenden Fähigkeiten des Gehirn reaktivieren.

Die Kombination von Zellersatz und Gentherapie zeigte schon einige Erfolge. Mäusen wurden nach Zufügung einer ischämischen Läsion entweder nicht-modifizierte Stammzellen transplantiert oder Stammzellen, die Neurotrophin-3 überexprimieren, das eine Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt. Beide Gruppen zeichneten sich durch eine teilweise Regeneration des ischämischen Gewebes aus, in der zweiten Gruppe fand sich jedoch eine höhere Anzahl von diesen Stammzellen abstammender Neuronen (Park et al. 1999). Als Fortführung der Experimente mit Parkinson-Mäusen wie oben beschrieben, wurden den Mäusen NSC transplantiert, die das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 überexprimieren, das Zellmigration und Neuritenwachstum

fördert. Auch bei diesen Mäusen fand man eine höhere Zahl von dopaminergen Zellen. Auch therapeutische Gene wurden bereits bei Erkrankungen wie der Mucopolysaccharidose Typ VII angewendet, bei der es durch eine frameshift Mutation im Gen für  $\beta$ -Glucuronidase zu einer Anhäufung von Glycosaminoglycanen in Lysosomen und damit zu einer progressiven Degeneration im Gehirn kommt. Durch intraventrikuläre Implantation von modifizierten Stammzellen konnte das fehlende Enzym lebenslang ersetzt werden (Snyder et al. 1995). Ähnliche Erfolge konnten bei Mäusen mit Tay-Sachs-Erkrankung erzielt werden, denen NSC mit dem Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit für  $\beta$ -Hexosaminidase transplantiert wurde (Lacorazza et al. 1996).

### ***In vitro Migrationsassays***

Da durch histologische Schnitte von chirurgischen Biopsien und von Autopsiegewebe die dynamischen Aspekte der Tumorzellmigration nicht beurteilt werden können, wurde eine Reihe von *in vivo* und *in vitro* Tests entwickelt. Im Tiermodell zeigen chemisch induzierte Hirntumore eine geringe Inzidenz und eine lange Latenz, so dass diese neben einem höheren Arbeitsaufwand im Labor wenig geeignet für Migrationsanalysen sind. Transplantierte Tumore wachsen dagegen bedingt durch ihre hohe Proliferationsrate meist expansiv und nicht wie menschliche Hirntumore durch diffuse lokale Invasion (Pilkington et al. 1997).

Aus diesem Grunde wurden eine Reihe von *in vitro* Techniken etabliert, diese beginnen mit einfachen Monolayer-Kulturen und führen zu komplexeren dreidimensionalen Kulturmodellen. Im Monolayer-Modell kann die zufällige nicht-richtungsgebundene Bewegung individueller Zellen und die richtungsgebundene Bewegung von einer Zellmasse weg mit Hilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie oder durch tägliche Messung einer migrierenden Zellpopulation beobachtet werden (Corcoran et al. 2003). Für eine einfachere Beobachtung haben sich zwei Methoden als sinnvoll erwiesen. So kann einer konfluente Monolayer-Kultur entweder ein Kratzer zugefügt werden, innerhalb dessen die Migration beobachtet werden kann („scratch“-Technik), oder man sät Zellen innerhalb eines Ringes, den man nach einiger Zeit entfernt und nun eine Migration von diesem Zentrum aus beobachten kann („fence migration assay“).

Ein weiterer Test zur Quantifizierung der Migration von Zellen ist der Boydenassay, mit dessen Hilfe der mitogene Effekt verschiedener Substanzen auf Zellen gemessen kann. Ursprünglich wurde dieser Test für Leukozyten entwickelt (Boyden 1962), mittlerweile existiert jedoch auch eine modifizierte Form für andere Zellen, wie zum Beispiel Gliomzellen oder Stammzellen. Hierfür werden Zellen von der zu testenden Substanz durch eine semipermeable Membran getrennt und können diese in Abhängigkeit von der „Attraktivität“ der Testsubstanz für die Zellen in unterschiedlichem Maße durchwandern. Zur Auswertung können die Zellen, die die Membran durchwandert und sich auf der Gegenseite angeheftet haben, nach einer bestimmten Inkubationszeit angefärbt, fixiert und ausgezählt werden.

Bei diesen Modellen handelt es sich jedoch um stark vereinfachte, zweidimensionale Modelle, bei denen wichtige Aspekte außer Acht gelassen werden. Um die spezifischen biochemischen und morphologischen Eigenschaften von Hirngewebe *in vivo* besser zu bewahren, werden häufig dreidimensionale Sphäroidmodelle gewählt. Sphäroide ähneln in ihrem Aufbau dem Mikromilieu kleiner avaskulärer Tumore mit einer äußeren Zone proliferativer Zellen, einer intermediären Zone hypoxischer Zellen und einer zentralen Nekrosezone, bedingt durch einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen mit einer Anreicherung von Abbauprodukten und einem niedrigen pH-Wert. Dieser Aufbau mit zentraler Nekrose findet sich meist ab einer kritischen Größe von 500  $\mu\text{m}$  (Kunz-Schughart et al. 1998). Derartige Sphäroide bilden sich von den meisten Zellen spontan in sich drehenden Kulturflaschen, in Zellsuspensionen auf nicht adhäsiven Substraten wie Agar oder im hängenden Tropfen. Da sich in den Sphäroiden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden, lassen sie sich besonders gut im Konfrontationsmodell mit anderen Zellen zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit verwenden.

## ***Wachstumsfaktoren***

Während der letzten 30 Jahre sind viele verschiedene Wachstumsfaktoren entdeckt worden. Die meisten wurden ursprünglich als Mitogene identifiziert, doch weiterführende Studien haben gezeigt, dass sie außer der Proliferation auch die Migration und/oder Invasion von Tumorzellen beeinflussen können. Viele der bekannten Wachstumsfaktoren werden in Gliomzellen exprimiert, so zum Beispiel Scatter factor/Hepatocyte growth factor, Fibroblast growth factor, Platelet-derived growth factor, Insulin-like growth factor, Transforming growth factor, Pleiotrophin, Midkine und Vascular endothelial growth factor. Für viele dieser Faktoren konnte ein Zusammenhang zwischen der mRNA- und Proteinexpression und dem Malignitätsgrad des Glioms gezeigt werden (Hermanson et al. 1992; Mishima et al. 1997; Schlegel et al. 1990; Schmidt et al. 1999). Ebenso konnten die entsprechenden Rezeptoren auf den Gliomzellen nachgewiesen werden, was zahlreiche autokrine und parakrine Regelkreise für die Stimulation der Gliome vermuten läßt. Die Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen können entweder lösliche Liganden von der selben (autokrin) oder von nahegelegenen Zellen (parakrin) binden. Durch alternatives Spleißen können Isoformen von membrangebundenen Faktoren entstehen, die an die korrespondierenden Rezeptoren der selben (juxtakrin) oder benachbarten Zelle (parakrin) binden. Auch kann es zu einer intrazellulären Interaktion zwischen Rezeptor und ihrem Ligand kommen (intrakrin) (Hamel und Westphal 2000).

### **Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)**

SF/HGF war in vergleichenden Studien der Wachstumsfaktor mit der stärksten chemotaktischen Wirkung auf Gliomzellen (Brockmann et al. 2003). Es besteht aus einer 60 kD großen alpha-Kette und einer 30 kD großen beta-Kette, die durch eine Disulphidkette miteinander verbunden sind, und bindet an den Tyrosinkinase Rezeptor MET, der von dem Proto-Onkogen c-met kodiert und von bisher allen untersuchten Glioblastomzelllinien exprimiert wird (Lamszus et al. 1999). Im Nagermodell konnte das Wachstum von Gliomen durch Überexpression von SF/HGF gesteigert (Lattera et al. 1997) und durch Antagonisierung mit Ribozymen vermindert werden (Abounader et al. 2002).

## **Epidermal growth factor (EGF)**

EGF stellt ein aus 53 Aminosäuren bestehendes hitzestabiles Peptid mit einem Molekulargewicht von 6000 Dalton dar, das drei intramolekulare Disulphidbrücken enthält. Sein Rezeptor (EGFR) ist eine Tyrosinkinase, an das auch das strukturell ähnliche TGF- $\alpha$  bindet. *In vitro* hält EGF neurale Stammzellen im Zellzyklus und fördert so ihre Proliferation und verzögert die Differenzierung. *In vivo* Experimente zeigten, dass EGF stimulierend auf die Proliferation und Genese von Glia, jedoch hemmend auf die Generation von Neuronen wirkt (Kuhn et al. 1997). Erhöhte Level von EGFR in Glioblastomen sind in 40 – 50 % auf eine Amplifikation des erbB-1 Gens zurückzuführen, dabei wird meist eine Mutante, jedoch auch der Wildtyp von EGFR, sowie die Liganden EGF und TGF- $\alpha$  exprimiert (Collins 1995).

## **Fibroblast growth factor (FGF-1 und FGF-2)**

FGF gehört zu der Gruppe der heparinbindenden Wachstumsfaktoren. Es kommt in 19 unterschiedlichen Formen vor, die beiden wichtigsten und bisher am besten untersuchten sind das saure FGF (aFGF oder FGF-1) und das basische FGF (bFGF oder FGF-2). Beide stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 52 % überein und binden als Dimer an einen oder mehr ihrer vier Rezeptoren (FGFR 1-4). Nach Bindung ihres Liganden dimerisieren und autophosphorylieren diese Tyrosinkinasen und starten so eine intrazelluläre Signalkaskade (Dunn et al. 2000). FGF-2 kann wie EGF die Proliferation von neuronalen Stammzellen fördern und deren Differenzierung hemmen, indem es sie im Zellzyklus hält. Diese beiden Wachstumsfaktoren sind in der *in vitro* Kultur für Proliferation und Langzeitüberleben notwendig. Im Gegensatz zu EGF wird durch FGF-2 jedoch vornehmlich die Neurogenese gefördert (Kuhn et al. 1997). FGF-2 wird bereits von niedriggradigen Gliomen exprimiert und korreliert nicht mit dem Malignitätsgrad. Es besitzt selbst nur schwache angiogenetische Wirkung, hat jedoch als Kofaktor mit VEGF und HGF/SF eine große Bedeutung (Schmidt et al. 1999). Möglicherweise ist auch FGF-4 an der Angiogenese in Gliomen beteiligt.

## **Platelet-derived growth factor (PDGF-AA, PDGF-BB)**

PDGF wurde ursprünglich als Mitogen für Fibroblasten im menschlichen Serum und in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten entdeckt. Dabei handelt es sich um Dimere, deren beide Teile durch 3 Disulphidbrücken verbunden sind. PDGF kommt dabei in den 3 Isoformen PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB vor. Die A- und B-Kette sind

hinsichtlich ihrer Aminosäurestruktur zu 60 % homolog. Die Bindung des Ligandendimers führt zu einer Dimerisation seines Tyrosinkinase-Rezeptors, wobei PDGF-A nur an den Rezeptor PDGFR- $\alpha$ , PDGF-B an beide Rezeptoren, jedoch mit höherer Affinität an PDGFR- $\beta$  bindet. Der alpha-Rezeptor scheint dabei der Hauptrezeptor in Gliomzellen zu sein, während der beta-Rezeptor hauptsächlich in Tumorendothel zu finden ist (Hermanson et al. 1992). Dem Faktor wird eine Rolle in der Proliferation und Migration glialer Zellen zugeschrieben. PDGF-BB, jedoch nicht PDGF-AA spielt auch eine indirekte Rolle in der Angiogenese einiger humaner Gliomzelllinien, indem es die Sekretion von VEGF induziert (Tsai et al. 1995).

### **Insulin-like growth factor (IGF-1 und IGF-2)**

Im Gegensatz zu den meisten anderen Wachstumsfaktoren zirkulieren IGFs mit dem Blut und haben so auch endokrine Funktionen mit insulinähnlicher Wirkung. Während IGF-1 ein basisches Polypeptid aus 70 Aminosäuren darstellt, handelt es sich bei IGF-2 um ein saures Polypeptid aus 67 Aminosäuren, das zu 60 % mit denen des IGF-1 übereinstimmt. Beide Faktoren ähneln in ihrer Struktur dem Proinsulin. IGF-1 bindet mit höherer Affinität als IGF-2 an Typ 1 IGF-Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Nicht glykosyliertes IGF-2 bindet dagegen an den Typ 2 IGF-Rezeptor, einem Mannose-6-Phosphat Rezeptor (Bräulke 1999). Zusätzlich können sie an mindestens 9 IGF binding proteins (IGFBP) binden. Die Faktoren spielen eine wichtige Rolle während der ZNS-Entwicklung und werden lebenslang im ZNS exprimiert (Baskin et al. 1988). Eine Korrelation von IGF/IGFR und Proliferation konnte bisher nicht aufgestellt werden, jedoch scheint IGF-1 ein wichtiger „survival factor“ für Tumorzellen zu sein und Zelltransformation zu ermöglichen (Resnicoff und Baserga 1998).

### **Transforming growth factor (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ und TGF- $\beta_2$ )**

TGF- $\alpha$  stellt eine Polypeptidkette aus 50 Aminosäuren mit drei Disulphidbrücken dar und ist sowohl bezüglich seiner biochemischen Struktur, als auch seiner biologischen Aktivität mit EGF, jedoch nicht mit TGF- $\beta$  vergleichbar. Es konkurriert mit ihm um den gleichen Rezeptor (EGFR) auf aequimolarer Basis, für einen eigenen Rezeptor gibt es derzeit keinen Hinweis.

TGF- $\beta$  kommt in zwei molekularen Formen vor: TGF- $\beta_1$  und TGF- $\beta_2$ . Beides sind Homodimere mit 112 Aminosäuren pro Kette, die eine 70 prozentige Sequenzhomologie aufweisen. Zusätzlich besteht eine heterodimere Kombination der beiden Untereinheiten TGF- $\beta_{1,2}$ . In den meisten Zellen entspricht die biologische Aktivität beider Dimere einander. Glioblastomzellen bilden jedoch eine Variante von TGF- $\beta_2$  mit starker immunsupprimierender Wirkung. In Glioblastomen wird es hauptsächlich in neovaskularisierten Arealen um Nekrosen herum und in Tumorrändern exprimiert. Es bindet an Serin/Threoninkinasen und fördert Migration, Proliferation und Invasion von Gliomzellen (Merzak et al. 1994). Seine Hauptfunktion liegt jedoch wahrscheinlich in der immunsupprimierenden Wirkung, indem es die IL-2 abhängige Proliferation von T-Zellen und die Genese zytotoxischer T-Lymphozyten unterdrückt (Fontana et al. 1991).

### **Midkine und Pleiotrophin (MK und PTN)**

MK und PTN gehören zu den heparinbindenden Wachstumsfaktoren. Sie haben eine zu 50 % identische Aminosäuresequenz und eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur mit zwei durch eine flexible Binderegion verbundene Domänen mit je drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Sie scheinen an die gleichen Rezeptoren (PTP- $\zeta$  und ALK) zu binden. Beide sind an der Entwicklung des ZNS beteiligt und spielen eine Rolle bei der Neurogenese und Neuritenmigration. In ähnlicher Weise haben sie biologische Aktivität als Mitogen, bei der Transformation, Fibrinolyse, Chemotaxis und Angiogenese (Kadomatsu und Muramatsu 2004). Die MK-Expression nimmt mit Zunahme des Malignitätsgrads von Astrozytomen zu und ist signifikant mit der Prognose verknüpft (Mishima et al. 1997). Auch PTN wird von Hirntumoren in erhöhtem Maße exprimiert (Kurtz et al. 1995).

### ***Problemstellung***

Über die spezifischen Mechanismen, die für die Migration von neuronalen Stammzellen verantwortlich sind, ist bisher wenig bekannt. Der zielgerichteten Stimulation von Stammzellen, auf maligne Gliome zuzuwandern, können zwei Theorien zu Grunde liegen. Wir nehmen an, dass die Diffusion von Wachstumsfaktoren eine entscheidende

Rolle spielt, da typischerweise deren Konzentration in der Umgebung von Glioblastomen erhöht ist (Lamszus et al. 1998). Zum einen könnte nun der entscheidende Stimulus eine direkte Reaktion auf die von den Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren sein. Andererseits könnte es sich aber auch um eine indirekte Reaktion durch das umgebende Hirngewebe, zum Beispiel durch reaktive Astrozyten oder aktivierte Mikroglia sein, die unspezifisch mit verschiedenen pathologischen Läsionen assoziiert sind. Um erstere These zu untermauern, untersuchten wir in dieser Studie den Effekt von konditionierten Medien, die von Kulturen zehn verschiedener Gliomzelllinien gewonnen wurden auf die Migration von murinen neuralen Stammzellen.

Weiterhin analysierten wir die Fähigkeit von 13 tumorassoziierten Wachstumsfaktoren, einzeln die Migration der Stammzellen zu stimulieren und korrelierten dies mit dem Rezeptorstatus der untersuchten neuralen Stammzelllinie mit Hilfe der RT-PCR.

Darüber hinaus untersuchten wir die Invasion von Stammzellen in dreidimensionale Tumorsphäroide im Sphäroid-Kokultursystem und stellten diesem System die Ergebnisse des zweidimensionalen Boydenassays gegenüber, dessen Testziel die Quantifizierung der Migrationsfähigkeit ist.

## **Material und Methoden**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank unter keimarmen Bedingungen ausgeführt. Die Werkbank wurde zu Beginn, sowie nach Beendigung der Arbeit mit 70 % Ethanol ausgewischt. Alle Behältnisöffnungen wurden unter der Werkbank nach Öffnen und vor Verschließen am Bunsenbrenner erhitzt. Es wurden ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen verwendet.

### ***Zelllinien***

Die murine neurale Stammzelllinie C17.2 wurde uns freundlicherweise von Dr. Evan Snyder, M.D. (Burnham Institute, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt. Diese wurde ursprünglich aus dem externen Stratum granulosum des Kleinhirns vier Tage alter Mäuse isoliert und mit dem c-myc Onkogen durch retrovirale Transfektion immortalisiert. Weiterhin wurden sie mit dem lacZ-Gen transfiziert, das für die E. coli  $\beta$ -Galactosidase kodiert, um eine bessere Identifizierung zu ermöglichen (Snyder et al. 1992; Villa et al. 2000). Obwohl die C17.2 Zellen *in vitro* immortalisiert sind, zeigen sie *in vivo* einen Proliferationsstopp innerhalb von 48 Stunden, sind nicht tumorigen und antworten regelrecht auf differenzierende Reize. Diese murinen neuronalen Stammzellen wurden in neuro-regenerativen Experimenten verwendet und konnten nach Transplantation eine hohe migratorische und regenerative Antwort in verschiedenen neuropathologischen Läsionen auslösen (Flax et al. 1998).

Die humane Gliom-Zelllinie U87 erhielten wir von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Die humanen NCE- (Neurochirurgie Eppendorf) Glioblastomzelllinien G28, G44, G63, G96, G112, G123, G130, G169 und G350 wurden von Glioblastomen von Patienten, die in der Abteilung Neurochirurgie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf behandelt wurden, gewonnen und nach bekanntem Protokoll kultiviert (Westphal et al. 1994). Diese 10 Kulturen wurden auf Grund ihrer Fähigkeit ausgewählt, in einem Agar-beschichteten Kultursystem dreidimensionale Sphäroide zu bilden.

## **Medien und Zellkultur**

Für die Zelllinien wurden folgende Medien verwendet.

### C17.2

- Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) (Gibco)
- 10 % fetal-bovines Serum (FBS)
- 5 % Pferdeserum
- 1 % L-Glutamin
- 1 % Natrium-Pyruvat

Alle Gliomzelllinien mit Ausnahme von U87

- Modified Eagle´s Medium (MEM)
- 10 % fetal-bovines Serum
- 1 % L-Glutamat
- 1 % Natrium-Pyruvat

### U87

- Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)
- 10 % fetal-bovines Serum
- 1 % L-Glutamat
- 1 % Natrium-Pyruvat

Die Medien wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und vor Gebrauch einige Minuten bei 37 °C erwärmt. Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) unter Zugabe ihres Mediums ausgesät und im Inkubator bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Bevor die Zellen konfluent ausgewachsen waren, wurde das Medium durch 1 ml 0,25 % Trypsin ersetzt, um die Haftung der Zellen vom Flaschenboden aufzuheben. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und in geringerer Dichte neu ausgesät.

## ***Gewinnung von konditioniertem Medium***

Um konditioniertes Medium zu gewinnen, wurden zu 95% konfluente Kulturen für 5 Tage mit serumfreien Medium inkubiert. Dieses stellten wir folgendermaßen her:

- zu gleichen Teilen Ham´s F12 (Biochrom, Berlin, Deutschland) und
- Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)
- 2 % Insulin Transferrin
- 1 % L-Glutamin
- 1 % Natrium-Pyruvat
- 1 % Linolic acid Albumin (alle von Sigma, St. Louis, MO)

Die gewonnenen Medien wurden zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend bestimmten wir die Proteingehamtkonzentration mit einem Bicinchoninsäure-Assay (Pierce, Rockford, IL). Nach Abgleich der Proteingehamtkonzentration wurden von den konditionierten Medien Verdünnungsreihen in unverdünnter, in 50 % und in 10 % Konzentration hergestellt.

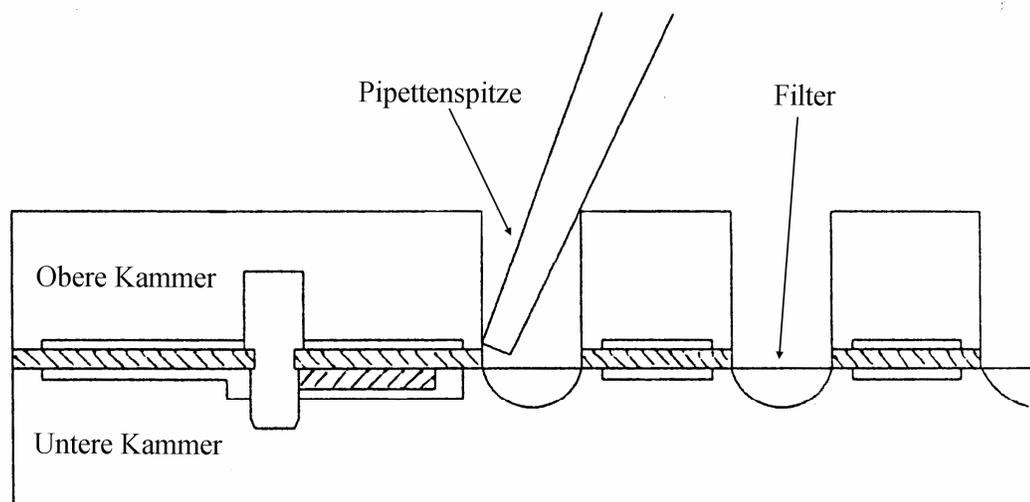
## ***Modifizierter Boydenkammer-Migrationsassay***

Der Boydenassay dient zur Testung des Migrationsverhaltens von Zelllinien. Dabei werden auf eine Seite eines Filters Zellen aufgebracht, während sich auf der anderen Seite verschiedene Substanzen befinden, deren migrationshemmende oder -fördernde Eigenschaften abgeklärt werden sollen. (siehe Abbildung 1) Wir untersuchten die chemotaktische Wirkung von konditionierten Medien 10 verschiedener humaner Gliomzelllinien und 13 humaner rekombinanter Wachstumsfaktoren auf C17.2 Zellen.

Die folgenden rekombinanten Wachstumsfaktoren wurden in Konzentrationen von 1 pM bis zu 50 nM verwendet: Scatter factor (SF/HGF) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ralph Schwall, Genentech Inc., San Francisco, CA, USA), Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Pleiotrophin (PTN) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA),

Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor-1 (FGF-1), Insulin-like growth factor I und II (IGF-I, IGF-II), Midkine (MK), Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA, PDGF-BB), Transforming growth factor- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ ) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Für Blockierungsexperimente wurde ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen SF/HGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) dem konditioniertem Medium von U87, G28 und G44 Zellen in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  hinzugefügt.

Am Vortag des Experiments wurde ein Nucleopore Filter (Porengröße 8  $\mu\text{m}$ ) (Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD, USA) in 3,5 ml Vitrogen 100 (Collagen Corp., Fremont, CA, USA) und 96,5 ml 0,1 % Essigsäure eingelegt und über Nacht im Inkubator bei 37 °C belassen. Am nächsten Tag wurde der Filter mit einer Lösung aus 100 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 100 ml bovinem Serumalbumin (BSA) mehrmals gewaschen und anschließend getrocknet.



**Abbildung 1:** Schematische Zeichnung der Boydenkammer. Obere und untere Kammer sind durch einen semipermeablen Filter getrennt. Die Vertiefungen der unteren Kammer enthalten die zu testenden Medien bzw. Wachstumsfaktoren. In die Vertiefungen der oberen Kammer werden die neuronalen Stammzellen pipettiert.

Je 30  $\mu\text{l}$  der konditionierte Medien bzw. Wachstumsfaktoren wurden zügig und blasenfrei in Triplikaten in die unteren Vertiefungen der 96er- Boydenkammer (Neuroprobe, Cabin John, Gaithersburg, MD, USA) gefüllt. Als Positivkontrolle diente 10 % fetales bovines Serum (FBS), als Negativkontrolle serumfreies Medium.

Anschließend wurden Filter, Dichtung und Oberkammer so darauf gesetzt, dass der Filter den unteren vom oberen Teil der Kammer trennte. Die C17.2 Zellen wurden nun trypsiniert und zweimal mit Vollmedium und FBS gewaschen, wobei die Zellen jeweils für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert wurden. Anschließend folgten noch zwei Waschgänge mit Boydenassay-Medium, bestehend aus 100 ml DMEM, 1 ml L-Glutamin und 100 mg BSA. Vor dem vierten Zentrifugieren wurden die Zellen gezählt, um sie danach auf eine Konzentration von 300000 Zellen/ml zu resuspendieren. In die Vertiefungen der Oberkammer erfolgt nun das randomisierte Auftragen von je 50 µl des Boydenassay-Mediums entsprechend 15000 Zellen pro well, wobei die Zellen nach jeweils ca. 20 wells erneut gemischt wurden. Nach fünfständiger Inkubationszeit bei 37 °C mit CO<sub>2</sub> wurde die Kammer auseinander gebaut und der Filter an der Oberseite vorsichtig mit destilliertem Wasser abgewischt, um nicht migrierte Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgt die Fixierung und Färbung mit Diff Quick (Dade, München, Deutschland). Die Zellkerne der migrierten Zellen wurden unter einem 40x Objektiv mit kalibriertem Okularraster in zehn „high-power fields“ ausgezählt.

### ***Sphäroid-Kokultur-Assay***

Als Basis für die Sphäroidgewinnung dienten Kulturflaschen, deren Boden mit einer Agarschicht bedeckt war, um eine Adhäsion der Zellen an der Oberfläche der Kulturflaschen zu verhindern (Yugas et al. 1977). Um diese herzustellen, vermischten wir 1 g Agar mit 30 ml sterilem H<sub>2</sub>O und erhitzen es in der Mikrowelle, anschließend gaben wir 70 ml vorgewärmtes Medium DMEM dazu und füllten je 3 ml im noch heißen Zustand in 25 ml Kulturflaschen. Nach Erkalten des Agars wurden jeweils 2 x 10<sup>6</sup> Zellen der zehn oben erwähnten Gliomzelllinien in diese Kulturflaschen mit 5 ml Medium pipettiert. Nach zwei bis drei Tagen in Kultur bildeten sich dreidimensionale Sphäroide unterschiedlicher Größe. Bei Bedarf wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem das Medium mit den Sphäroiden abpipettiert und in ein 15 ml Röhrchen gegeben wurde. Wir ließen die Zellen für 5-10 Minuten sedimentieren und saugten das überständige Medium ab. Nach erneuter Resuspension mit 5 ml Medium wurden die Sphäroide in eine neue beschichtete Flasche gegeben. Für die folgenden Experimente wurden Sphäroide mit einem Durchmesser von 300µm ausgewählt und in

eine neue agarbeschichtete Kulturflasche übertragen, da sich bei dieser Größe noch keine zentrale Nekrose zeigte, sondern ruhende, nicht proliferierende Zellen im Zentrum der Sphäroide zu finden waren.

Jeder Flasche wurden  $5 \times 10^6$  C17.2 Zellen hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden die Kokulturen mit 1 % Formalin/0,125 % Glutaraldehyd Lösung für 20 Minuten fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Stammzellen, die stabil  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) exprimieren, wurden mit 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-Galaktosidase (X-gal) gefärbt. C17.2 Zellen enthaltende Sphäroide wurden auf eine unbeschichtete 2,5 cm Petrischale übertragen und für 12 Stunden in 2 ml X-gal Lösung (2,2 ml ferri-ferro + 50  $\mu$ l X-gal) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Sphäroide in Tissue-Tec (Sekura, Zoeterwonde, Niederlande) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80$  °C konserviert. Cryostat Schnitte mit einer Dicke von 13  $\mu$ m wurden angefertigt, auf Objektträger gezogen und mit 0,1 % Eosin gegengefärbt.

### ***RT-PCR Analyse***

Der Wachstumsfaktor-Rezeptorstatus der murinen Stammzelllinie C17.2 wurde mit RT-PCR analysiert. Die Gesamt-RNA der C17.2 Zelllinie und der Kontrollzelllinien NIH/3T3 und PC12 wurde mit TriStar<sup>TM</sup> (Hybaid GmbH, Heidelberg, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers extrahiert, dazu wurden die Zellen mit 1 ml TriStar etwa 30 mal gemörsert und in einem Eppendorf-Tube 5 Minuten stehen gelassen. Um die Proteine zu denaturieren, wurde die Suspension vorsichtig mit 200  $\mu$ l Chloroform gemischt, wieder für 5 Minuten stehen gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der RNA konnte nun abpipettiert und mit 500  $\mu$ l Isopropanol durchmischt werden. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol durchmischt und für weitere 5 Minuten bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet getrocknet und in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die DNA zu verdauen, wurden dem Ansatz 2  $\mu$ l DNase, 2  $\mu$ l RNase Inhibitor und 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt und für 3

Stunden bei 37 °C belassen. Anschließend wurde die DNase bei 95 °C für 10 min deaktiviert.

3 µg RNA wurden nun mit 27 µl H<sub>2</sub>O gemischt, für 10 Minuten ins Wasserbad bei 65 °C und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt. Mit Hilfe von You-prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) wurde die RNA in cDNA transkribiert. PCR Amplifikation wurde mit 1 µl cDNA in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Die verwendeten Primer Paare (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) werden in Tabelle 1 aufgeführt. Die PCR Reaktionen beinhalteten 0,5 U Taq Polymerase, 0,5 mM dNTPs und 20 pmol jedes Primers in 1x Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% w/v Gelatine). Die Reaktionen wurden zuerst bei 94 °C für drei Minuten denaturiert, gefolgt von 35 Zyklen von einer Minute bei 94 °C, einer Minute bei der entsprechenden annealing Temperatur (siehe Tabelle 1) und einer Minute bei 72 °C im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland). 9 µl der PCR Produkte wurden mit Hilfe von Elektrophorese auf 2 % Agarose Gel mit Ethidiumbromid analysiert.

## Oligonukleotid primer für die RT-PCR Analyse der Rezeptorexpression in C17.2

### Zellen

Ziel			Produkt	
Rezeptor	Sense	Antisense	Größe	(bp)
Temp.				
FGFR-1	AGAAGCCTGAGACGCCGCCA	CCAGCACAGCCCAGAAGAGG	443	55°
FGFR-2	AAATACCAAATCTCCAACC	GCCGCTTCTCCATCTTCT	373	59°
FGFR-3	ACTGTACTCAAGACTGCAGG	GTCCTTGTGTCAGTCGCATCAT	635	55°
FGFR-4	CTGTTGAGCATCTTTCAGGG	CGTGGAAGGCCTGTCCATCC	550	53°
IGFR-1	GACATCCGCAACGACTATCAG	GTAGTTATTGGACACCCGCATC	395	55°
IGFR-2	CTGGAGGTGATGAGTGTAGCTCTGGC	GAGTGACGAGCCAACACAGACAG	235	67°
TβR-1	ATCCATCACTAGATCGCCCT	CGATGGATCAGAAGGTACAAGA	824	55°
TβR-2	CGTGTGGAGGAAGAACAACA	TCTCAAAGTCTGAGGTTG	560	55°
PDGFR-α	AAGAGACCCTCCTTCTACCACC	GTCGATGTCCTCGATGGTCT	400	59°
PDGFR-β	AGCTACATGGCCCTTATGA	GGATCCCAAAGACCAGACA	380	59°
MET	GAATGTCGTCCTACACGCC	CAGGGGCATTCCATGTAGG	727	59°
ALK	CCACAACGAAGCTGGAAGAGA	GTCCATTCCAACAAGTGAAGGA	319	59°
EGF-R	CTGTTGAGCATCTTTCAGGG	GTAGTTATTGGACACCCGCATC	454	53°
PTP-ζ intern	GGGAGAACGGGGACATACATT	CCTGTTACACTGCTTCAGGGC	335	57°
PTP-ζ extern	ACCAGCCTTCTGGTCACATGG	CCAGGATTCAAGCCAGTGTCTTC	361	57°

**Tabelle 1:** Abkürzungen: ALK: Anaplastische Lymphomkinase, bp: Basenpaare, EGF: Epidermal growth factor, FGF: Fibroblast growth factor, IGF: Insulin-like growth factor, PDGF: Platelet-derived growth factor, PTP-ζ: Protein-Tyrosin Phosphatase, R: Rezeptor, TβR: Transforming growth factor Rezeptor -β.

### Statistische Analyse

Von allen in den biologischen Assays gewonnenen Werten wurde jeweils der Mittelwert mit den Standardabweichungen berechnet. Statistische Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentgruppe wurden mit dem ungepaarten t-Test verglichen. Wahrscheinlichkeitswerte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Hierfür verwendeten wir folgende Formeln:

Kovarianz:

$$s_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{n-1}$$

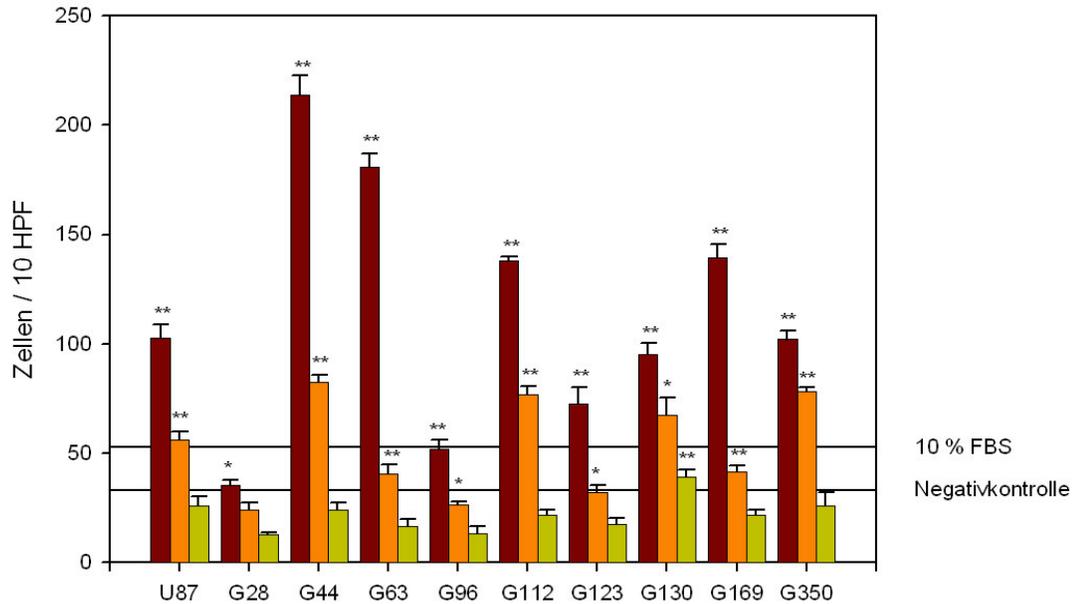
Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

## Ergebnisse

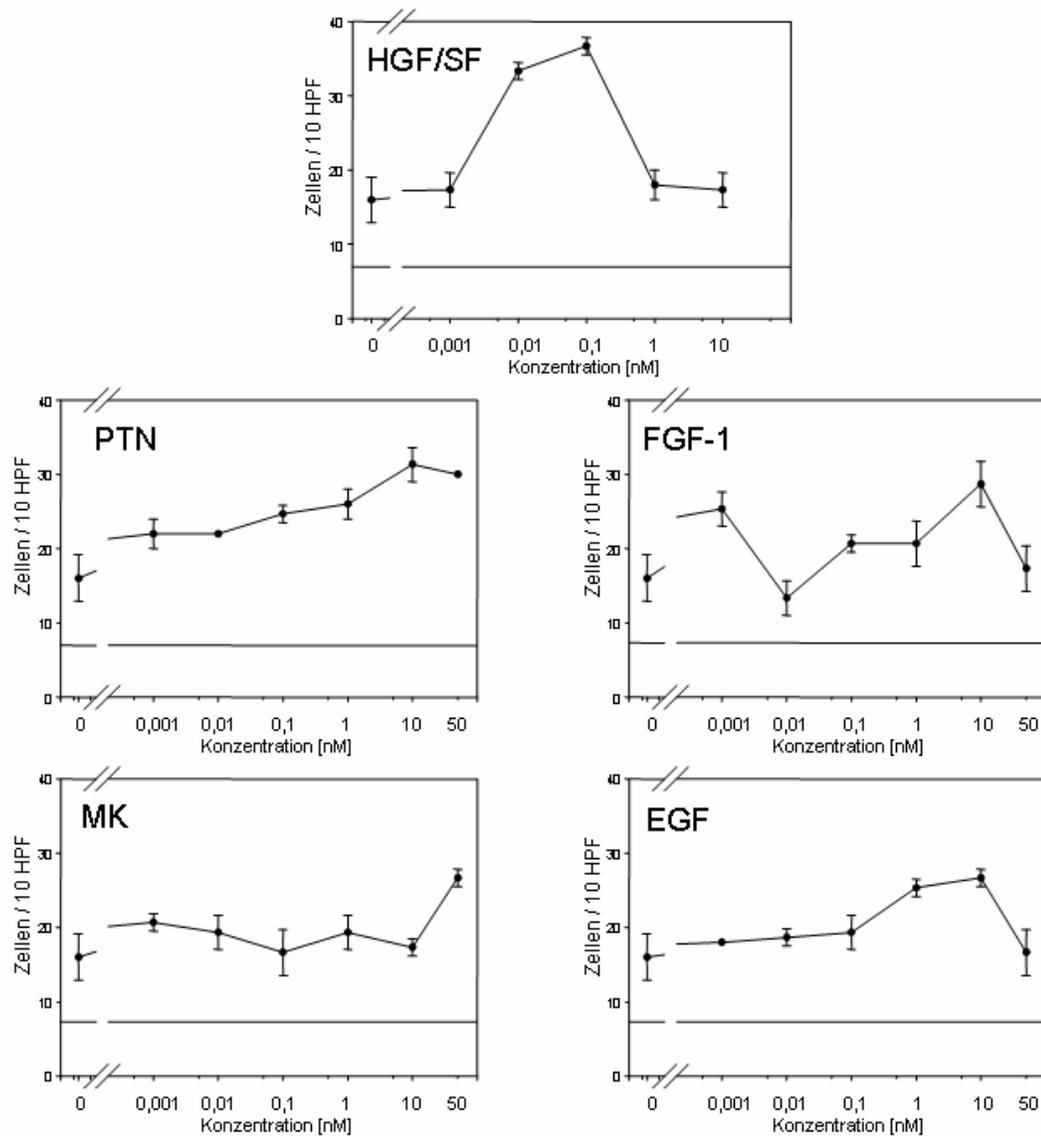
### ***Chemotaktische Stimulation der neuralen Stammzellmigration***

Für die Untersuchung des chemotaktischen Effekts auf die Migration der Stammzelllinie C17.2 testeten wir konditionierte Medien von 10 unterschiedlichen Glioblastomzelllinien in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe des modifizierten Boydenkammer-Migrationsassays. Als Negativkontrolle verwendeten wir serumfreies Medium, als Positivkontrolle 10 % FBS. Für alle Proben konnte dabei in der unverdünnten Konzentration eine signifikante chemotaktische Stimulation gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden (siehe Abbildung 2). Bei fast allen Medien außer denen von G28 und G96 übertraf der chemotaktische Effekt sogar noch den Effekt der Positivkontrolle. Die Werte zeigten dabei eine Signifikanz mit einem Wahrscheinlichkeitswert  $p < 0,001$ , nur bei der Zelllinie G28 lag der Wahrscheinlichkeitswert bei  $p < 0,05$ . Es wurde dabei eine Stimulation um das 2,5-fache (Zelllinie G28) bis zum 14,8-fachen (Zelllinie G44) beobachtet. Die Effekte waren von der Konzentration abhängig, wobei die stärkste motogene Antwort durchgehend von der höchsten Proteinkonzentration ausgelöst wurde. Bei der 50 % Konzentration zeigte sich in 9 von 10 Fällen mit Ausnahme von G28 ein signifikanter Effekt auf die Migration der Stammzellen. U87, G44, G63, G112, G169 und G350 zeigten dabei eine Signifikanz mit einem Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,001$ , G96, G123 und G130 dagegen nur mit einem Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$ . Bei der zehnfachen Verdünnung kam es dagegen in keinem Falle zu einer signifikanten Stimulation.

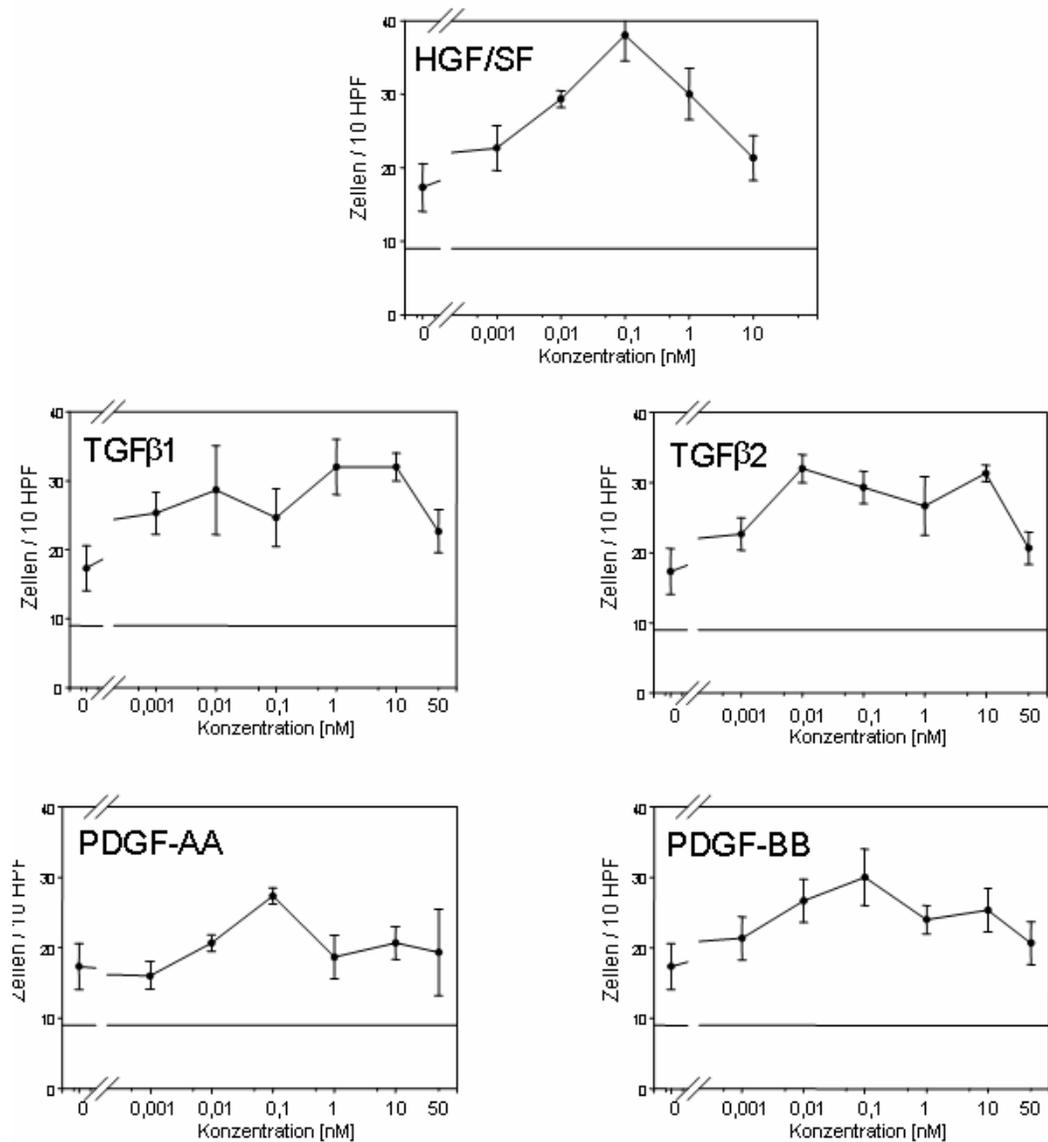


**Abbildung 2:** Chemotaktische Migration von C17.2 Zellen, induziert durch konditionierte Medien von 10 humanen Gliomzelllinien in drei Konzentrationen (unverdünnt rote Säule, 50 % - Verdünnung orange Säule, 10 % - Verdünnung grüne Säule) im modifiziertem Boydenkammer-Migrationsassay. Negativkontrolle: serumfreies Medium, Positivkontrolle 10 % FBS (Horizontale Linien). Ein doppelter Stern zeigt eine signifikante Stimulation der Migration im Vergleich zu serumfreiem Medium im ungepaarten t-Test mit einem Wahrscheinlichkeitswert  $< 0,001$ , ein einfacher Stern Signifikanz mit einem Wahrscheinlichkeitswert  $< 0,05$  im t-Test.

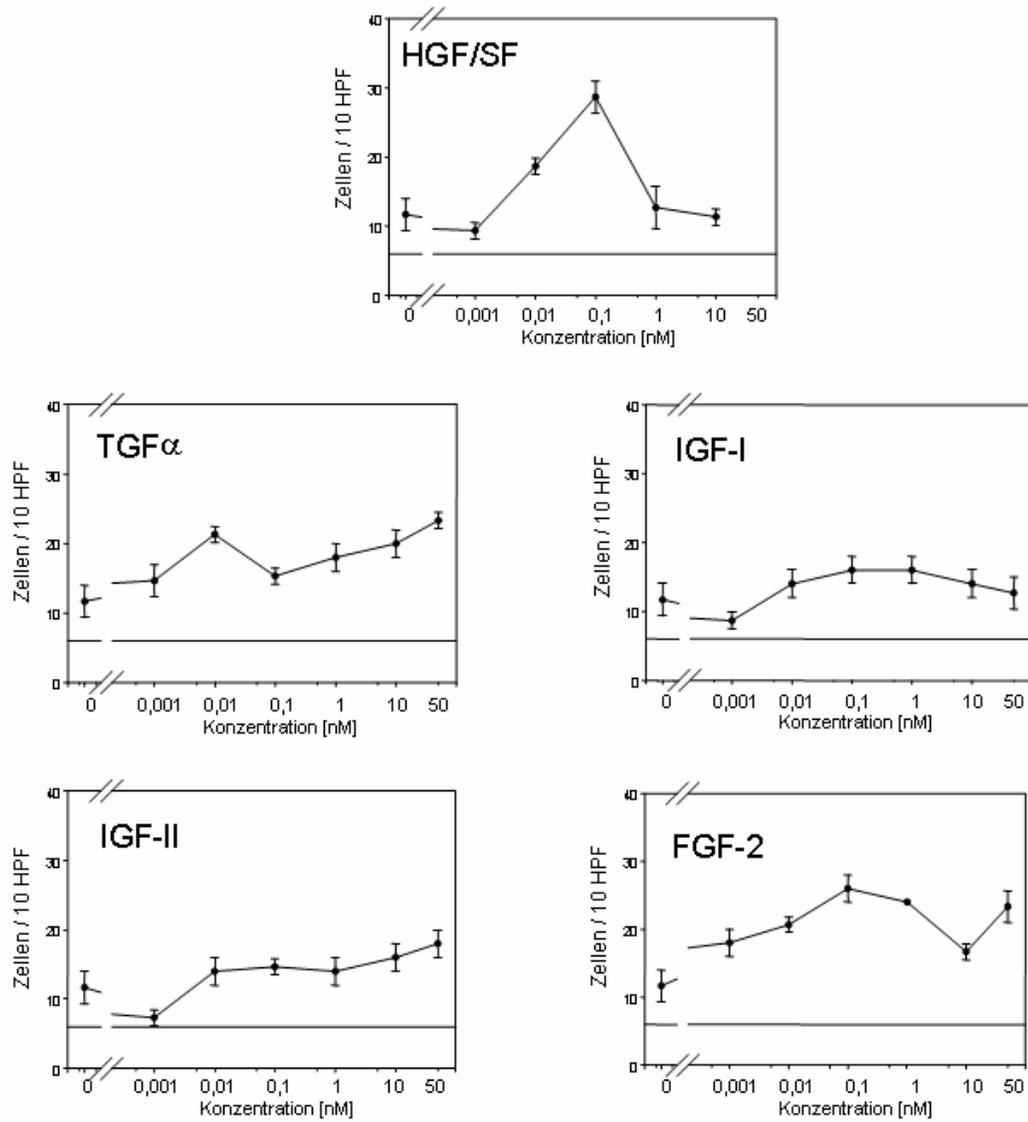
Um die für die chemotaktische Stimulation verantwortlichen Faktoren zu identifizieren, analysierten wir die Migration von C17.2 Zellen als Antwort auf 14 verschiedene rekombinante Wachstumsfaktoren. Mit Hilfe des modifizierten Boydenkammer-Migrationsassays wurden alle Faktoren in Konzentrationen von 1 pM bis 50 nM untersucht. Da wir bereits in vorangegangenen Pilotexperimenten feststellten, dass SF/HGF eine stärkere migratorische Antwort als die anderen Wachstumsfaktoren bewirkte, benutzten wir dieses in jedem individuellem Assay als Referenz. In den einzelnen Assays beobachteten wir durchgehend eine signifikante Stimulation durch SF/HGF mit einer glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Kurve und einem maximal 2,5-fachen Effekt bei einer Konzentration von 0,1 nM SF/HGF (siehe Abbildung 3 A-C und Tabelle 2).



**Abbildung 3 A:** Chemotaktische Migration von C17.2 Zellen, induziert durch verschiedene Wachstumsfaktoren in Konzentrationen von 1 pM bis 50 nM in einem modifizierten Boydenkammer-Migrationsassay, in dem SF/HGF, PTN, FGF-1, MK und EGF parallel zueinander analysiert wurden. A bis C repräsentieren verschiedene Boyden-Experimente.



**Abbildung 3 B:** Chemotaktische Migration von C17.2 Zellen, induziert durch verschiedene Wachstumsfaktoren in Konzentrationen von 1 pM bis 50 nM in einem modifizierten Boydenkammer-Migrationsassay, in dem SF/HGF, TGF-β1, TGF-β2, PDGF-AA und PDGF-BB parallel zueinander analysiert wurden. A bis C repräsentieren verschiedene Boyden-Experimente.



**Abbildung 3 C:** Chemotaktische Migration von C17.2 Zellen, induziert durch verschiedene Wachstumsfaktoren in Konzentrationen von 1 pM bis 50 nM in einem modifizierten Boydenkammer-Migrationsassay, in dem SF/HGF, TGF- $\alpha$ , IGF-I, IGF-II und FGF-2 parallel zueinander analysiert wurden. A bis C repräsentieren verschiedene Boyden-Experimente.

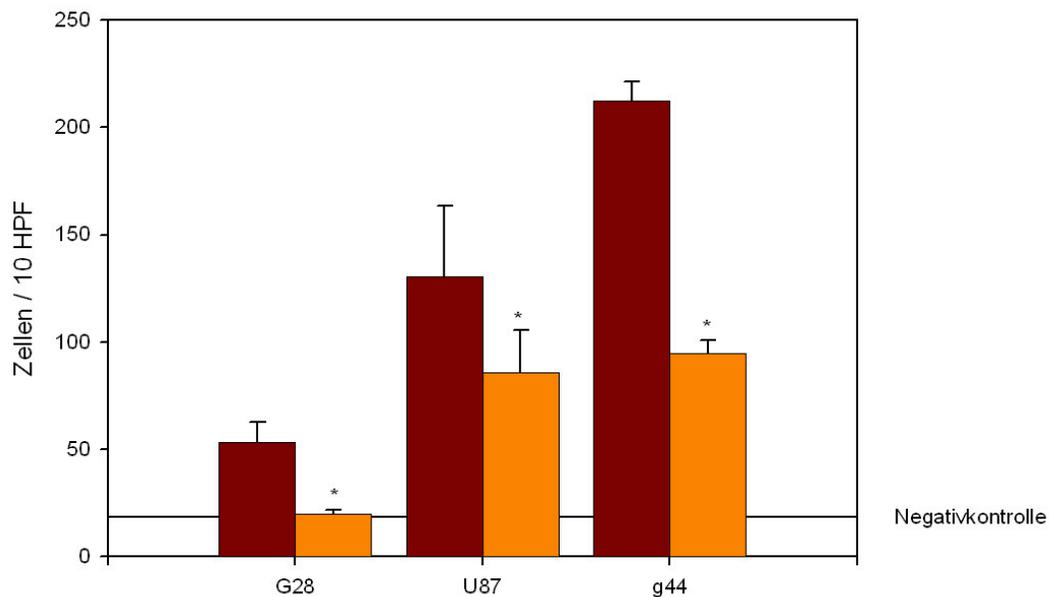
Außer SF/HGF übten nur drei andere Wachstumsfaktoren einen signifikanten Effekt auf die Migration von C17.2 aus. FGF-2 erreichte einen maximal 2,2-fachen Effekt bei einer Konzentration von 0,1 nM, TGF- $\alpha$  und PTN beide eine maximal 2,0-fache Stimulation bei 50nM TGF- $\alpha$ , bzw. 10nM PTN (siehe Abbildung 3 A-C und Tabelle 2). Der Effekt der anderen Wachstumsfaktoren war schwächer und erreichte in wiederholten Versuchen nicht regelmäßig Signifikanz; die relative Stimulation reichte dabei von 1,4-fach bis 1,8-fach.

### Stimulation der C17.2 Zellmigration durch Wachstumsfaktoren

C17.2 Zellen		
	relative Stimulation	Konzentration (nM)
SF/HGF	2,5*	0,1
FGF-2	2,2*	0,1
TGF- $\alpha$	2,0*	50,0
PTN	2,0*	10,0
TGF- $\beta_1$	1,8	1,0
TGF- $\beta_2$	1,8	0,01
FGF-1	1,8	10,0
PDGF-BB	1,7	0,1
EGF	1,7	10,0
MK	1,7	50,0
PDGF-AA	1,6	0,1
IGF-II	1,5	50,0
IGF-I	1,4	0,1

**Tabelle 2:** Die Stimulation der Zellmigration durch Wachstumsfaktoren wurde mit Hilfe des modifizierten Boydenkammer-Migrationsassays analysiert. Die Werte zeigen die relative Stimulation bei der effektivsten Wachstumsfaktorkonzentration im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Ein Stern zeigt Signifikanz an (ungepaarter t-Test, Wahrscheinlichkeitswert < 0.05).

Da sich SF/HGF als stärkster motogener Faktor erwies, führten wir Blockierungsexperimente mit unverdünnten konditionierten Medien von drei verschiedenen Glioblastomzelllinien durch, die die C17.2 Migration stimulierten. Die Zugabe von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen SF/HGF blockierte den stimulierenden Effekt des konditionierten Mediums von G28 beinahe vollständig (97 %), den des Überstandes von U87 zu 48 % und den des Mediums von G44 zu 63 % (siehe Abbildung 4).



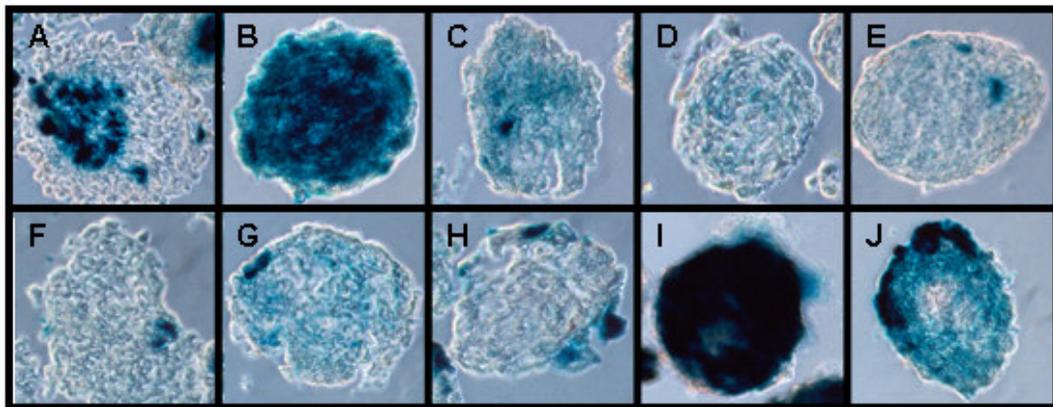
**Abbildung 4:** Chemotaktische Migration von C17.2 Zellen, induziert durch unverdünnte konditionierte Medien von G28, U87 und G44 (rote Säule). Reduktion der C17.2 Zellmigration durch Zugabe von anti-SF/HGF Antikörpern in das konditionierte Medium (orange Säule). Negativkontrolle: serumfreies Medium (horizontale Linie). Ein Stern zeigt Signifikanz im ungepaarten t-Test mit einem Wahrscheinlichkeitswert  $< 0,05$ .

### ***Stimulation der Stammzellinvasion***

Zehn verschiedene Glioblastomzelllinien wurden als Sphäroide kultiviert, um die Bedingungen der *in vivo* Situation wie Dreidimensionalität, enger Zellkontakt und

interzelluläre Signalwege nachzuahmen. Sphäroide bis zu einem Durchmesser von 300 µm entsprechen *in vivo* Mikrotumoren in einem Stadium, bevor Angiogenese eintritt. Diese Sphäroide wurden für 24 Stunden mit C17.2 Zellen kokultiviert, danach wurde das Migrationsmuster der Stammzellen in den Tumorsphäroiden analysiert. Von den Kokulturen wurden 15 µm Gefrierschnitte angefertigt und die C17.2 Zellen mit X-Gal gefärbt, um sie von den Gliomzellen unterscheiden zu können.

Das Invasionsmuster der Stammzellen wurde in 4 Gruppen eingeteilt. Beinahe komplett mit X-gal gefärbte Sphäroide als Zeichen maximaler Invasion durch C17.2 wurde bei den Gliomzelllinien G28 und G169 beobachtet (siehe Abbildung 5). Moderate Invasion zeigte sich in Sphäroiden von U87, G44 und G350. Kaum Invasion fand sich in G96, G112, G123 und G130 Sphäroiden, während sich in G63 Sphäroiden keine Invasion zeigte.



**Abbildung 5:** Sphäroid-Kokultur-Assay von C17.2 Zellen und Sphäroiden von 10 humanen Gliomzelllinien. 15 µm dicke Gefrierschnitte nach X-gal-Färbung der lac-z positiven C17.2 Zellen (blau). Die Zellen zeigen ein heterogenes Invasionsverhalten. A: U87, B: G28, C: G44, D: G63, E: G96, F: G112, G: G123, H: G130, I: G169, J: G350.

### ***Stammzellinvasion versus Stammzellmigration***

Gewebeinvasion ist von verschiedenen Faktoren abhängig, von denen Zellmigration ein wichtiger Bestandteil ist. Daher verglichen wir das Ausmaß der Invasion, gemessen im Sphäroid-Kokultur-Assay, mit dem Ausmaß der motogenen Stimulation im

modifizierten Boydenkammer-Migrationsassay (siehe Tabelle 3). Wir erhielten keine signifikante Korrelation zwischen der Stimulation der Migration und der Invasion. Konkordante Ergebnisse in beiden Assays konnten für konditionierte Medien und Sphäroide einiger Zelllinien wie U87, G96, G169 und G350 gezeigt werden, für einige andere Zelllinien zeigten sich jedoch diskordante Ergebnisse, ganz besonders für die Zelllinie G63, deren konditioniertes Medium stark die Stammzellmigration stimulierte, wohingegen ihre Sphäroide keine Invasion von Stammzellen erlaubten.

**Vergleich der C17.2 Zellmigration im Boydenassay und der Invasion im Kokultur-Assay**

Zelllinie	Kokultur	Boydenassay
U87	++	++
G28	+++	+
G44	++	++++
G63	-	++++
G96	+	+
G112	+	+++
G123	+	++
G130	+	++
G169	+++	+++
G350	++	++

**Tabelle 3:** Kokultur: Keine Invasion (-), kaum Invasion (+), moderate Invasion (++) ,starke Invasion (+++); Boydenassay: 2-fache Stimulation (+), 3-fache Stimulation (++) ,4-fache Stimulation (+++), 5-fache Stimulation (++++)

***Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren***

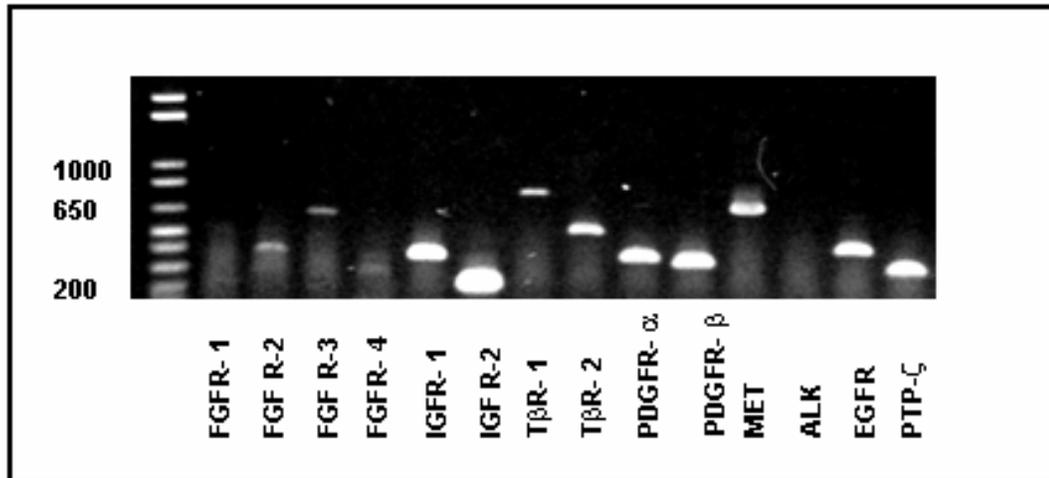
Die Expression von 14 verschiedenen Rezeptoren der auf ihre motogene Aktivität untersuchten rekombinanten Wachstumsfaktoren wurde in C17.2 Zellen mit Hilfe von RT-PCR untersucht. Parallel dazu wurden als Positivkontrolle die murinen Zelllinien NIH/3T3 und PC12 analysiert. Die Mehrzahl der Rezeptoren wurde von der neuronalen

Stammzelllinie C17.2 exprimiert. Nur zwei Rezeptoren wurden nicht exprimiert, Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) und anaplastische Lymphomkinase (ALK) (siehe Tabelle 4 und Abbildung 6).

**Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren von C17.2 Zellen**

Rezeptor	Ligand	C17.2	NIH3T3	PC12
FGFR-1	FGF-1	-	-	+
FGFR-2	FGF-2	(+)	+	-
FGFR-3	FGF-3	+	-	+
FGFR-4	FGF-4	(+)	(+)	(+)
IGFR-1	IGF-1	+	+	+
IGFR-2	IGF-2	+	+	+
TβR-1	TGF-β1	+	+	+
TβR-2	TGF-β2	+	+	+
PDGFR-α	PDGF-AA, -BB	+	+	+
PDGFR-β	PDGF-BB	+	+	-
MET	SF/HGF	+	+	-
ALK	PTN, MK	-	+	+
EGFR	EGF, TGF-α	+	+	+
PTPζ-intern	PTN, MK	+	+	-
PTPζ-extern	PTN, MK	+	+	+

**Tabelle 4:** RT-PCR Analyse: (+) bedeutet Nachweis eines PCR Produkts, (-) Fehlen eines PCR Produkts.



**Abbildung 6:** Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren in C17.2 Zellen, dargestellt durch RT-PCR. Bandgrößen sind in Tabelle 1 aufgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

## Diskussion

Bei der Behandlung maligner Gliome greift man zur Zeit auf eine Kombination von drei Modalitäten zurück. Diese sind die chirurgische Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung. Leider können jedoch alle diese Therapieformen selbst eine Verletzung des Gehirns hervorrufen. Durch die Operation kommt es zu einer Zerstörung von nicht-pathologischem Gewebe. Eine Resektion im Gesunden ist durch das invasive Wachstum nicht möglich. Der verbleibende Resttumor, darunter auch verstreut liegende, invasiv gewachsene Gliomzellen werden durch postoperative, adjuvante Strategien behandelt. Als solche kommen Chemotherapie und/oder Bestrahlung in Frage, die jedoch häufig mit einer signifikanten kognitiven Dysfunktion, Ataxie oder Demenz als Folge einer Leukenzephalopathie oder Hirnatrophie assoziiert sind (Schlegel et al. 1999; Vigliani et al. 1999). Ein wesentliches Ziel der neuroonkologischen Forschung ist daher, therapeutische Strategien zu entwickeln, die gegen die infiltrierenden Gliomzellen gerichtet sind und deren Wachstum und Expansion gezielt aufhalten, wohingegen das umgebende Hirngewebe geschont wird.

Als neue Therapieform zur Behandlung infiltrierender Gliomzellen könnte sich womöglich die Transplantation von genetisch modifizierten Stammzellen eignen. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass transplantierte neurale Stammzellen in der Lage sind, durch das adulte zentrale Nervensystem zu migrieren und sich in die normale Zytoarchitektur des Empfängers einzugliedern (Hurelbrink et al. 2002; Snyder et al. 1995). Stammzellen wandern dabei gezielt durch gesundes Hirngewebe auf eine pathologische Läsion wie zum Beispiel ein Glioblastom zu. Es spielt dabei keine Rolle, ob der Implantationsort im gesunden Gewebe der ipsilateralen oder der kontralateralen Hemisphäre, in den Ventrikeln oder sogar intravaskulär außerhalb des ZNS liegt (Aboody et al. 2000). Es ist bereits gelungen, neurale Stammzellen genetisch so zu modifizieren, dass sie bioaktive Moleküle direkt an ihrem gewünschten Wirkungsort produzieren können (Castellanos et al. 2002; Ehtesham et al. 2002; Park et al. 2002). Auf diese Weise könnten systemische Nebenwirkungen gering gehalten werden, da sich die Expression der therapeutischen Moleküle hauptsächlich direkt am Ort der Pathologie befände. Bisher ist jedoch unbekannt, auf welche Signale diese Zellen mit einer Migration durch das adulte ZNS reagieren.

Eventuell lassen sich Parallelen zur Migration normaler Vorläuferzellen im embryonalen Gehirn ziehen, über die bereits einiges bekannt ist. Diese läuft im Wesentlichen auf zwei verschiedene Arten ab. Zu 80 % handelt es sich dabei um radiäre Zellwanderung. Die Zellen migrieren dabei vom proliferierenden Neuroepithelium aus an einem Gerüst von spezialisierten Gliazellen entlang in die äußeren Schichten des Gehirns. Diese Gerüstzellen sind nur in der Embryonalzeit präsent, man vermutet, dass aus ihnen später Astrozyten entstehen. Besonders gut läßt sich dies an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns sehen. Auf molekularer Ebene spielen dabei unter anderem Oberflächenrezeptoren und Liganden wie zum Beispiel Astrotactin, Neuregulin, Laminin und  $\alpha 3$ -Integrin eine Rolle. Neben dieser radiären Wanderung gibt es noch eine tangentielle Wanderung. Die Zellen wandern dabei orthogonal zu den oben beschriebenen Gerüstzellen. Eine solche Migration ist zum Beispiel im „rostral migratory stream“ von der subventrikulären Zone in den Bulbus olfactorius beschrieben, die selbst im adulten Gehirn noch beobachtet werden kann. Die Zellen bilden dabei Kettenaggregate und bedürfen dabei nicht der Führung durch Gliazellen. Auch hierbei scheinen Integrine eine Rolle zu spielen, wie Versuche mit  $\beta 1$ -Integrin-Antikörpern zeigten. Mäuse, die das Molekül PSA-NCAM nicht exprimierten, zeigten eine verminderte Größe des Bulbus olfactorius, dem lag eine verminderte, jedoch nicht aufgehobene Migration im „rostral migratory stream“ zu Grunde. Auch Slit und Netrin 1 konnten bisher als wichtige Faktoren für die tangentielle Migration identifiziert werden. Besonders die Ergebnisse aus diesem Forschungsbereich könnten sich zum Verständnis der Migration von Stammzellen heranziehen lassen. Demnach ließe sich vermuten, dass das Gewebe im erwachsenen Gehirn um den Tumor herum die Eigenschaften der embryonalen Umgebung nachahmt und so eine Migration von Stammzellen ermöglichen könnte (Dirks 2001).

Vermutlich reagieren neurale Stammzellen auf eine komplexe Mischung aus Chemokinen und Substratmolekülen (Romanic und Madri 1994). Craig et al. konnten zeigen, dass Vorläuferzellen der subventrikulären Zone von Mäusen auf die Infusion von EGF in die Seitenventrikel mit einer starken Proliferation reagierten und die Bewegung in das normale Hirnparenchym gefördert wurde (Craig et al. 1996). Ähnliche Versuche führten Kuhn et al. mit EGF und FGF-2 durch. Auch hier führte die intraventrikuläre Infusion dieser Wachstumsfaktoren zu einer Änderung im

Proliferations-, Migrations- und Differentiationsverhalten der Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone (Kuhn et al. 1997).

Wir nahmen daher als Hypothese an, dass auch transplantierte Stammzellen auf Änderungen in der Konzentration von Wachstumsfaktoren und Substratmolekülen mit einer Änderung ihres Migrationsverhaltens reagieren würden. Um die Mechanismen der Stammzellmigration zu analysieren, untersuchten wir die migratorischen und invasiven Eigenschaften von C17.2 Zellen als Antwort auf lösliche Faktoren von Tumorzellen und in direkter Konfrontation mit Glioblastomsphäroiden *in vitro*.

Um zu zeigen, dass es sich bei der Migration der Stammzellen um eine direkte Reaktion auf die von den Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren handelt und nicht etwa lediglich um eine indirekt vermittelte Reaktion durch die umliegenden Astrozyten oder Mikroglia, kultivierten wir 10 verschiedene Glioblastomzelllinien und gewannen nach einigen Tagen deren Medium. Da menschliche Glioblastome *in vivo* in ihrem Profil ihrer Wachstumsfaktorexpression, in ihrer Genetik, und in ihrer biologischen Aktivität heterogen sind, gingen wir davon aus, dass sich auch *in vitro* die konditionierten Medien in den einzelnen Konzentration der von den Gliomzellen sezernierten Produkten unterscheiden würden. Sollten diese sezernierten Produkte wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren der ausschlaggebende Faktor für die Migration sein, so würden wir eine unterschiedlich starke Migration der Stammzellen auf die verschiedenen konditionierten Medien erkennen können. Wie erwartet konnten die Medien aller Zelllinien eine signifikante Stimulation hervorrufen. Der Grad der maximalen Stimulation variierte dabei zwischen den einzelnen Zelllinien vom 2,5-fachen im Falle von G28 bis zum 14-fachen bei G44. Da die Medien einander nur in ihrer Gesamtproteinkonzentration, nicht jedoch in den Teilkonzentrationen der einzelnen Faktoren angeglichen wurden, können wir annehmen, dass sich das unterschiedliche Ausmaß der Stimulation auf die unterschiedliche Zusammensetzung der konditionierten Medien zurückführen läßt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von den Glioblastomzellen sezernierten Faktoren mögliche Induktoren der Stammzellmigration sein könnten, diese jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß von der verschiedenen Zelllinien produziert werden.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, testeten wir die selben Medien sowohl in unverdünnter Konzentration, als auch in 50 % und 10 % Konzentration. Das Ausmaß der Stimulation zeigte eine ausgeprägte Korrelation mit der Konzentration des konditionierten Mediums. Diese Beobachtung läßt es wahrscheinlich erscheinen, dass die Migration tatsächlich direkt von Faktoren, die von den Tumorzellen in ihr Medium sezerniert worden sind, abhängig ist. Es handelt sich demnach nicht um ein Phänomen, das indirekt, z.B. über eine Aktivierung von Mikroglia oder reaktiven Veränderungen der Astrozyten vermittelt ist.

In Experimenten anderer Arbeitsgruppen wurde ein chemotaktische Effekt einiger Wachstumsfaktoren auf Glioblastomzellen nachgewiesen. Besonders effektiv erwies sich dabei SF/HGF, gefolgt von TGF- $\alpha$  (Brockmann et al. 2003). Auch EGF konnte als starker Induktor für Glioblastomzellen identifiziert werden (Chicoine und Silbergeld 1997). Da in der embryonalen Entwicklung des menschlichen Gehirns ebenfalls Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für die Migration der neuralen Stammzellen spielen (Sobeih und Corfas 2002), nahmen wir an, dass dies auch für die Migration von Stammzellen im adulten Gehirn zutreffen könnte. Wir untersuchten daher eine Reihe von Wachstumsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie von Glioblastomen exprimiert werden. Diese waren FGF-1 und -2, PDGF-AA und -BB, SF/HGF, IGF-1 und -2, TGF- $\alpha$ , - $\beta_1$  und - $\beta_2$ , EGF, VEGF, PTN und MK. Um festzustellen, ob diese Faktoren auch als Chemokine für neurale Stammzellen dienen, wurden rekombinante Wachstumsfaktoren in chemotaktischen Assays mit C17.2 Zellen analysiert. Von den 13 untersuchten Wachstumsfaktoren hatten nur vier einen durchweg signifikanten motogenen Effekt, nämlich SF/HGF, FGF-2, TGF- $\alpha$  und PTN. Der Effekt anderer Wachstumsfaktoren war in wiederholten Versuchen, sofern überhaupt vorhanden, weniger stark ausgeprägt und oft nicht reproduzierbar. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass sich nicht nur die Rezeptorkonzentration unterschiedlicher Zelllinien unterscheidet, sondern diese auch innerhalb einer Zelllinie in unterschiedlichen Passagen variieren kann.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen die Ergebnisse von Imitola et al., die als hauptverantwortlichen Stimulus für die Stammzellmigration eine inflammatorische Reaktion sehen. Im Mäusegehirn konnten sie in ischämischem Gewebe eine erhöhte Konzentration von SDF-1 $\alpha$  (stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ ) feststellen, das von

aktivierten Astrozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Sowohl im Boydenassay als auch im direkten Konfrontationsversuch mit ischämischen Gewebe konnte eine erhöhte Migration von neuronalen Stammzellen sowie die Bildung von Ketten, wie sie für die tangentielle Zellwanderung beschrieben ist, gezeigt werden. Weiterhin konnte auf den Stammzellen der Rezeptor CXCR4 für SDF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden (Imitola et al. 2004). Man kann daher davon ausgehen, dass Stammzellen auf eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli reagieren, die je nach Art der zugrunde liegenden Pathologie unterschiedlich ins Gewicht fallen. Dies kann also entweder wie im Falle von Glioblastomen eine direkte Reaktion durch von dem Tumor direkt ins umliegende Hirngewebe abgegebene Wachstumsfaktoren sein, oder aber eine indirekte Reaktion durch aktivierte Astrozyten, wie eben im Falle einer inflammatorischen Reaktion nach ischämischer Hirnschädigung beschrieben.

Wachstumsfaktoren wirken, indem sie an Rezeptoren in den Membranen der umliegenden Zellen binden. In den meisten Fällen handelt es sich bei diesen Rezeptoren um spezifische Tyrosinkinasen, die nach Bindung ihrer Liganden dimerisieren und gegenseitig ihre intrazelluläre Tyrosindomäne phosphorylieren. Dies führt zu einer Aktivierung einer Kinasekaskade, an deren Ende die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steht, die unter anderem für die Expression von Genen für die Proliferation und Migration der Zelle verantwortlich sind. Um zu zeigen, dass die Stammzellen analog zu den biologischen Effekten die entsprechenden Rezeptoren exprimierten, führten wir eine RT-PCR-Analyse durch. Sämtliche Rezeptoren für die getesteten Wachstumsfaktoren bis auf FGFR-1 und ALK konnten für Stammzellen nachgewiesen werden. FGFR-1 gehört zu einer Gruppe von mindestens 4 Rezeptoren, an die FGF bindet, der Hauptligand ist dabei FGF-1. An ALK bindet sowohl PTN als auch MK, diese binden jedoch auch an die Protein-Tyrosin-Phosphatase- $\zeta$  (PTP- $\zeta$ ). Die Rezeptoren für die vier Wachstumsfaktoren, die im vorangegangenen Experiment eine Migration der Stammzellen auslösten, sind für SF/HGF der Rezeptor MET, für FGF-2 FGFR-2, -3 und -4, für TGF- $\alpha$  EGFR und für PTN PTP- $\zeta$ . Für die übrigen Wachstumsfaktoren finden sich auf den Stammzellen zwar Rezeptoren, jedoch konnte in den Boydenassays keine signifikante Stimulation festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass diese Faktoren nicht im kausalen Zusammenhang mit der Migration stehen und möglicherweise für andere Reaktionen, beispielsweise Proliferation zuständig sind.

Da sich SF/HGF als stärkstes Motogen erwies, führten wir Blockierexperimente mit den Medien von Zelllinien durch, die SF/HGF exprimierten. Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen SF/HGF hemmte die Stimulation der C17.2 Zellen, die normalerweise bei allen drei getesteten Medien induziert wurde. Dies läßt die Vermutung zu, dass die Anwesenheit von SF/HGF für einen signifikanten Teil der chemotaktischen Fähigkeit der konditionierten Medien verantwortlich ist. Interessanterweise korreliert bei menschlichen Gliomen der Expressionsgrad von SF/HGF und seinem Rezeptor MET mit steigendem Malignitätsgrad (Lamszus et al. 1999; Schmidt et al. 1999). Möglicherweise haben maligne Gliome demnach auch *in vivo* einen stärkeren chemotaktischen Effekt auf neurale Stammzellen als niedriggradige Gliome.

Interessanterweise ähnelt das wachstumsfaktorabhängige Motilitätsprofil neuraler Stammzellen dem von Gliomzellen selbst, unterscheidet sich jedoch deutlich von dem Profil normaler menschlicher cerebraler, mikrovaskulärer Endothelzellen (CMEC) (Brockmann et al. 2003). Für Glioblastomzelllinien war SF/HGF der Wachstumsfaktor mit der stärksten chemokinetischen Wirkung, gefolgt von TGF- $\alpha$  und dem schwächer wirksamen FGF-2. Auch auf C17.2 Zellen hatten in unseren Experimenten diese Wachstumsfaktoren den stärksten stimulierenden Effekt, jedoch war FGF-2 stärker wirksam als TGF- $\alpha$ . Zusätzlich konnte auch PTN als einer der Hauptstimulantien identifiziert werden. Im Gegensatz dazu erwiesen sich PDGF-AA und -BB, die keinen signifikanten motogenen Effekt auf Gliomzellen oder C17.2 Zellen hatten, als stärkste chemoattraktiven Substanzen für CMEC *in vitro*. Die vergleichbare Antwort auf migrationsanregende Stimuli aus der Umgebung läßt sich möglicherweise mit dem gemeinsamen neuroektodermalen Ursprung von Gliomzellen und neuralen Stammzellen erklären. Endothelzellen besitzen dagegen einen mesodermalen Ursprung und damit auch ein anderes Antwortmuster. Bemerkenswerterweise gilt SF/HGF eher als epithelialer denn als mesenchymaler Zellstimulus (Rosen et al. 1997). Das ähnliche Motilitätsverhalten von Gliomzellen und neuralen Stammzellen läßt weiterhin vermuten, dass gliale Tumorzellen für Stammzellen charakteristische Eigenschaften wiedererlangen, die zu Tumorzell dissemination und Wachstum beitragen.

In mehreren Untersuchungen von verschiedenen Glioblastomen fanden sich sogenannte Tumorstammzellen, die in ihren Eigenschaften wie Multipotenz, Klonigenität und Antigenexpression stark den neuronalen Stammzellen entsprechen (Galli et al. 2004). Es stellt sich die Frage, ob diese Zellen als Ursprung des Tumors angesehen werden können, so wie dies schon in ähnlicher Weise für die akute myeloische Leukämie und Brustkrebs entdeckt wurde, oder ob es sich bei diesen Zellen lediglich um ein Nebenprodukt einer unkontrollierten Proliferation der eigentlichen tumorigenen Zellen handelt. Sollten sich Glioblastome tatsächlich aus derartigen Stammzellen entwickeln, so ließe ich damit gut die Ähnlichkeit im Motilitätsprofil der Stammzellen mit dem der Glioblastomzellen erklären.

Gliome, die im menschlichen Gehirn wachsen, bestehen gewöhnlich aus einer soliden Komponente, die von Gebieten mit diffuser Infiltration unterschieden werden kann. Nachdem wir gezeigt haben, dass lösliche Faktoren von Gliomzellen NSCs anlocken können, untersuchten wir, ob Stammzellen auch solide Tumormassen infiltrieren können. Dafür kultivierten wir dreidimensionale Tumorsphäroide, die wir mit C17.2 Zellen konfrontierten. Sphäroide von 2 unterschiedlichen Gliomzelllinien wurden beinahe komplett von den Stammzellen infiltriert, während die meisten (7 von 10) moderat oder nur wenig infiltriert wurden. Sphäroide von einer Gliomzelllinie wurden zu unserer Überraschung überhaupt nicht infiltriert. Die Sekretion löslicher Chemokine, die konsequent bei allen Gliomzelllinien beobachtet werden konnte, steht daher einer variablen Permissivität für NSC Infiltration gegenüber. Dieser unerwarteten Diskordanz können mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Im Sphäroid-Kokultur-Assay werden im Gegensatz zum Boydenassay die Tumorzellen und Stammzellen direkt miteinander konfrontiert, wodurch Zell-Zell-Kontakte und interzelluläre Signale eine zusätzliche Rolle spielen und die Degradierung der Matrix durch neurale Stammzellen nötig wird. Der fehlenden oder geringfügigen Stammzellinvasion kann daher entweder die Sekretion von abstoßenden Faktoren durch die Tumorzellen zu Grunde liegen, eine besonders dichte Adhäsion der Tumorzellen, eine Undurchlässigkeit der extrazellulären Matrix oder eine Kombination aus diesen Faktoren.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Zellen verschiedener Glioblastome trotz ihrer bekannten Heterogenität ausnahmslos lösliche Faktoren sezernieren, die neurale Stammzellen anlocken können. Stammzellen können demnach Signale aus einem

breiten Spektrum von Tumoren als Migrationsstimulus erkennen, so dass ihr potentieller Nutzen als therapeutisches Genvehikel nicht auf einen spezifischen genetischen Hintergrund beschränkt bleibt. Es scheint jedoch, dass das Ausmaß der Attraktion sich bei Tumoren verschiedener Patienten - vermutlich in Abhängigkeit von der relativen Menge sezernierter Wachstumsfaktoren - stark unterscheiden kann. Die extrazelluläre Matrix des normalen Hirngewebes wird in ihrer Zusammensetzung bei verschiedenen Patienten relativ konstant sein, so dass das Verhalten der neuralen Stammzellen, die durch diese hindurch migrieren müssen, um zu den jeweiligen Tumorzellen zu gelangen, relativ vorhersagbar sein wird. Das Ausmaß der Infiltration der Stammzellen in die Tumore scheint jedoch sehr variabel zu sein, weil die extrazelluläre Matrix des Tumors eine andere und hoch variable Zusammensetzung hat. Übertragen auf ein potentielles therapeutisches Szenario folgt daraus, dass Stammzellen zwar die diffus infiltrierten Tumorzellen erreichen, in einigen Fällen jedoch nicht in die Haupttumormasse eindringen können. Es kann daher nicht Ziel einer Stammzelltherapie sein, den Tumor selbst anzugreifen, vielmehr könnte sie als adjuvante Therapie verwendet werden, um die versprengten Tumoranteile anzugreifen, die sich einer chirurgischen Therapie entziehen, ohne dabei die Nebenwirkungen von Bestrahlung und Chemotherapie in Kauf nehmen zu müssen.

Abschließend können nur *in vivo* Experimente zeigen, inwieweit sich die *in vitro* Ergebnisse auch auf die *in vivo* Situation übertragen lassen, in der eine Menge zusätzlicher Parameter wie die Diffusionskapazität, Stabilität und Clearance der tumorsezernierten Wachstumsfaktoren, sowie die Reaktion des Empfängergewebes die Motilität der Stammzellen beeinflusst.

Die lokale Therapie von verstreuten Glioblastomzellen mit neuralen Stammzellen ist nur eine von vielen möglichen neuen Therapiestrategien, die sich zur Zeit in Erforschung befinden. Welche davon die größte Effektivität und Effizienz mit der geringsten Toxizität und der größten Flexibilität in der Therapie aufweist, wird sich hoffentlich in den nächsten Jahren zeigen. Vielleicht wird eine oder eine Kombination aus diesen Therapieformen helfen, die derzeitige Lücke zwischen den diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zu schließen.

## Zusammenfassung

Die Migrationsfähigkeit neuraler Stammzellen zu Glioblastomen konnten bereits in mehreren *in vivo*-Studien gezeigt werden. Dies macht diese Zellen zu einem geeigneten Träger therapeutischer Gene für disseminierte Gliomzellen, die mit herkömmlichen Methoden nicht oder nur unter Inkaufnahme von Nebenwirkungen behandelt werden können.

Wir untersuchten in unserer Studie, durch welche Faktoren die Migration und Invasion neuraler Stammzellen *in vitro* bestimmt werden. Konditionierte Medien von zehn verschiedenen menschlichen Gliomzelllinien, sowie dreizehn verschiedene, tumor-assoziierte Wachstumsfaktoren wurden auf ihren chemotaktischen Effekt auf murine C17.2 Zellen getestet. Im Anschluss analysierten wir den Rezeptorstatus für diese Wachstumsfaktoren mit Hilfe der RT-PCR. Durch konditionierte Medien konnte ein fünfacher chemotaktische Effekt im Vergleich zu Negativ-Kontrollen beobachtet werden. Unter den dreizehn getesteten Wachstumsfaktoren hatte SF/HGF den stärksten chemotaktischen Effekt mit einer 2,5-fachen Stimulation. Antikörper gegen SF/HGF verminderten den stimulatorischen Effekt von konditioniertem Medium.

Die Invasion der Stammzellen in Sphäroide von zehn Gliomzelllinien wurde mit Hilfe des Sphäroid-Kokultur-Assays quantifiziert. Neurale Stammzellen zeigten ein heterogenes Migrationsmuster zu Gliomsphäroiden sowie zu konditioniertem Medium. Im Kokultur-Assay unterschied sich das Invasionsverhalten von kompletter Durchsetzung durch Stammzellen bis zu geringgradiger Invasion.

NSC können in ihrer Migration ähnlich wie Glioblastomzellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert werden. In welchem Ausmaß Stammzellen jedoch dreidimensionale Gliome infiltrieren, scheint von zusätzlichen Faktoren abzuhängen. Hierbei spielen vermutlich Zell-Zell-Kontakte und die Interaktion mit extrazellulären Matrix-Proteinen eine entscheidende Rolle.

## Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastische Lymphomkinase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CMEC	Cerebrale, mikrovaskuläre Endothelzellen
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	Epidermal growth factor
FCS / FBS	Fetales Kälberserum / fetal-bovines Serum
FGF	Fibroblast growth factor
HPF	High-power field
IGF	Insulin-like growth factor
MK	Midkine
MRT	Kernspintomographie
NSC	Neurale Stammzelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTN	Pleiotrophin
PTP- $\zeta$	Protein-Tyrosin Phosphatase
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion
SCF	Stem cell factor
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$
SF/HGF	Scatter factor/hepatocyte growth factor
T $\beta$ R	Transforming growth factor Rezeptor - $\beta$
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Statistische Daten

Kond. Medien		Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.	T-Test
<u>U87</u>	100%	96	104	108	102,6666	6,110100927	1,28966E-05
	50%	52	56	60	56	4	2,41066E-05
	10%	22	26	30	26	4	0,061102159
<u>G28</u>	100%	34	38	34	35,33333	2,309401077	0,001055396
	50%	22	22	28	24	3,464101615	0,115149943
	10%	12	14	12	12,66666	1,154700538	0,147720854
<u>G44</u>	100%	210	208	224	214	8,717797887	2,06565E-05
	50%	82	86	80	82,66666	3,055050463	2,64276E-07
	10%	26	26	20	24	3,464101615	0,115149943
<u>G63</u>	100%	182	186	174	180,6666	6,110100927	6,00895E-07
	50%	42	44	36	40,66666	4,163331999	6,37781E-04
	10%	14	16	20	16,66666	3,055050463	0,776540958
<u>G96</u>	100%	52	48	56	52	4	4,81079E-05
	50%	26	26	28	26,66666	1,154700538	0,02572624
	10%	16	14	10	13,33333	3,055050463	0,241887902
<u>G112</u>	100%	138	140	136	138	2	9,62248E-09
	50%	80	78	72	76,66666	4,163331999	2,02056E-06
	10%	20	22	24	22	2	0,211367508
<u>G123</u>	100%	78	76	64	72,66666	7,571877794	5,73808E-04
	50%	30	30	36	32	3,464101615	0,004794006
	10%	14	20	18	17,33333	3,055050463	0,924420356
<u>G130</u>	100%	90	96	100	95,33333	5,033222957	2,31984E-06
	50%	60	76	66	67,33333	8,082903769	0,001299766
	10%	36	40	42	39,33333	3,055050463	3,71677E-04
<u>G169</u>	100%	132	142	144	139,3333	6,429100507	4,51536E-06
	50%	42	44	38	41,33333	3,055050463	2,15995E-04
	10%	20	24	22	22	2	0,211367508
<u>G350</u>	100%	106	102	98	102	4	1,46187E-07
	50%	80	78	76	78	2	7,28707E-07
	10%	26	32	20	26	6	0,126273377

	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.
<u>Neg. Kontrolle</u>	24	6	12	14	9,16515139
	20	22	22		
<u>Pos. Kontrolle</u>	50	52	56	52,66666	3,055050463

A	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.	T-Test	rel. Stimulation
<u>HGF</u>							
0,001 nM	16	20	16	17,33333	2,309401077	0,378153914	2,291666667
0,01 nM	34	32	34	33,33333	1,154700538	0,002334719	
0,1 nM	38	36	36	36,66666	1,154700538	0,001212817	
1 nM	18	16	20	18	2	0,286090502	
10 nM	16	16	20	17,33333	2,309401077	0,378153914	
<u>PTN</u>							
0,001 nM	20	22	24	22	2	0,056993504	1,958333333
0,01 nM	22	22	22	22	0	0,057990878	
0,1 nM	24	24	26	24,66666	1,154700538	0,022441755	
1 nM	28	24	26	26	2	0,013423474	
10 nM	30	34	30	31,33333	2,309401077	0,00264931	
50 nM	30	30	30	30	0	0,005922221	
<u>FGF-1</u>							
0,001 nM	28	24	24	25,33333	2,309401077	0,016765285	1,791666667
0,01 nM	12	12	16	13,33333	2,309401077	0,794766547	
0,1 nM	20	22	20	20,66666	1,154700538	0,094184016	
1 nM	24	20	18	20,66666	3,055050463	0,111236125	
10 nM	28	32	26	28,66666	3,055050463	0,005982831	
50 nM	14	18	20	17,33333	3,055050463	0,401170794	
<u>MK</u>							
0,001 nM	20	20	22	20,66666	1,154700538	0,094184016	1,666666667
0,01 nM	18	18	22	19,33333	2,309401077	0,17168613	
0,1 nM	20	14	16	16,66666	3,055050463	0,504289163	
1 nM	18	22	18	19,33333	2,309401077	0,17168613	
10 nM	18	18	16	17,33333	1,154700538	0,357181615	
50 nM	26	28	26	26,66666	1,154700538	0,012142684	
<u>EGF</u>							
0,001 nM	18	18	18	18	0	0,269919176	1,666666667
0,01 nM	18	20	18	18,66666	1,154700538	0,209746333	
0,1 nM	22	18	18	19,33333	2,309401077	0,17168613	
1 nM	24	26	26	25,33333	1,154700538	0,018153422	
10 nM	28	26	26	26,66666	1,154700538	0,012142684	
50 nM	20	14	16	16,66666	3,055050463	0,504289163	

	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.
<u>Neg. Kontrolle</u>	18	20	14	16	3,098386677

<b>B</b>	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.	T-Test	rel. Stimulation
<u>HGF</u>							
0,001 nM	26	20	22	22,66666	3,055050463	0,068014573	2,192307692
0,01 nM	28	30	30	29,33333	1,154700538	1,05925E-04	
0,1 nM	40	40	34	38	3,464101615	0,001167282	
1 nM	28	34	28	30	3,464101615	0,006821263	
10 nM	22	24	18	21,33333	3,055050463	0,138637457	
<u>TGF-b2</u>							
0,001 nM	20	24	24	22,66666	2,309401077	0,031665417	1,846153846
0,01 nM	34	30	32	32	2	1,20052E-04	
0,1 nM	28	32	28	29,33333	2,309401077	8,54621E-04	
1 nM	28	30	22	26,66666	4,163331999	0,036936014	
10 nM	30	32	32	31,33333	1,154700538	4,03358E-05	
50 nM	18	22	22	20,66666	2,309401077	0,129984971	
<u>PDGF-AA</u>							
0,001 nM	14	16	18	16	2	0,476733785	1,576923077
0,01 nM	20	20	22	20,66666	1,154700538	0,061778087	
0,1 nM	28	26	28	27,33333	1,154700538	3,21341E-04	
1 nM	18	16	22	18,66666	3,055050463	0,576414078	
10 nM	18	22	22	20,66666	2,309401077	0,129984971	
50 nM	26	18	14	19,33333	6,110100927	0,637915014	
<u>PDGF-BB</u>							
0,001 nM	18	22	24	21,33333	3,055050463	0,138637457	1,730769231
0,01 nM	30	26	24	26,66666	3,055050463	0,011157287	
0,1 nM	30	26	34	30	4	0,013226021	
1 nM	22	24	26	24	2	0,008230986	
10 nM	26	28	22	25,33333	3,055050463	0,019255079	
50 nM	18	24	20	20,66666	3,055050463	0,200249192	
<u>TGF-B1</u>							
0,001 nM	22	26	28	25,33333	3,055050463	0,019255079	1,846153846
0,01 nM	36	26	24	28,66666	6,429100507	0,078092956	
0,1 nM	28	26	20	24,66666	4,163331999	0,06861598	
1 nM	32	28	36	32	4	0,008418283	
10 nM	30	34	32	32	2	1,20052E-04	
50 nM	22	26	20	22,66666	3,055050463	0,068014573	

	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.
<u>Neg.</u>	18	20	14	17,33333	3,265986324
<u>Kontrolle</u>	14	22	16		

C	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.	T-Test	rel. Stimulation
<b>HGF</b>							
0,001 nM	10	10	8	9,333333	1,154700538	0,08545911	2,457142857
0,01 nM	20	18	18	18,66666	1,154700538	5,53685E-04	
0,1 nM	26	30	30	28,66666	2,309401077	4,08470E-04	
1 nM	16	10	12	12,66666	3,055050463	0,650024733	
10 nM	12	12	10	11,33333	1,154700538	0,783007202	
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>							
0,001 nM	16	12	16	14,66666	2,309401077	0,138876864	2
0,01 nM	20	22	22	21,33333	1,154700538	7,54129E-05	
0,1 nM	16	14	16	15,33333	1,154700538	0,016352445	
1 nM	20	18	16	18	2	0,009145418	
10 nM	20	18	22	20	2	0,00298569	
50 nM	22	24	24	23,33333	1,154700538	2,23711E-05	
<b>IGF-I</b>							
0,001 nM	8	10	8	8,666666	1,154700538	0,03692165	1,371428571
0,01 nM	12	16	14	14	2	0,182804714	
0,1 nM	14	18	16	16	2	0,035986514	
1 nM	18	16	14	16	2	0,035986514	
10 nM	14	16	12	14	2	0,182804714	
50 nM	14	14	10	12,66666	2,309401077	0,573857829	
<b>IGF-II</b>							
0,001 nM	8	8	6	7,333333	1,154700538	0,007554709	1,542857143
0,01 nM	14	12	16	14	2	0,182804714	
0,1 nM	14	14	16	14,66666	1,154700538	0,03692165	
1 nM	12	14	16	14	2	0,182804714	
10 nM	14	16	18	16	2	0,035986514	
50 nM	16	18	20	18	2	0,009145418	
<b>FGF-2</b>							
0,001 nM	18	16	20	18	2	0,009145418	2,228571429
0,01 nM	22	20	20	20,66666	1,154700538	1,18603E-04	
0,1 nM	24	26	28	26	2	2,70713E-04	
1 nM	24	24	24	24	0	4,94715E-05	
10 nM	16	16	18	16,66666	1,154700538	0,003663602	
50 nM	22	26	22	23,33333	2,309401077	0,001808489	

	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.
<u>Neg. Kontrolle</u>	10	12	12	11,66666	2,338090389
	8	14	14		

<b>Anti-SF/HGF-AK</b>	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.	T-Test
g28	61	56	43	53,33333	9,291573243	0,0217417
g44	205	210	222	212,3333	8,736894948	5,60124E-04
U87	106	118	168	130,6666	32,88363321	0,027426914
g28+AK	20	18	22	20	2	0,386808754
g44+AK	100	88	96	94,66666	6,110100927	0,001583568
U87 +AK	64	100	94	86	19,28730152	0,025923274

	Zellen / 10 HPF			Mittelwert	Standardabw.
<u>Neg. Kontrolle</u>	18	18	20	18,66666	1,154700538

## Literaturverzeichnis

- Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12846-12851.
- Abounader R, Lal B, Luddy C, Koe G, Davidson B, Rosen EM, Lattera J (2002) In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *Faseb J* 16(1): 108-110.
- Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM (1988) Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11(3): 107-111.
- Black PM (1991) Brain tumors. Part 1. *N Engl J Med* 324(21): 1471-1476.
- Boyden S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115: 453-466.
- Braulke T (1999) Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 31(2-3): 242-246.
- Brockmann MA, Ulbricht U, Gruner K, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K (2003) Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* 52(6): 1391-1399; discussion 1399.
- Castellanos DA, Tsoulfas P, Frydel BR, Gajavelli S, Bes JC, Sagen J (2002) TrkC overexpression enhances survival and migration of neural stem cell transplants in the rat spinal cord. *Cell Transplant* 11(3): 297-307.
- Chicoine MR, Silbergeld DL (1997) Mitogens as motogens. *J Neurooncol* 35(3): 249-257.
- Collins VP (1995) Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15(3): 289-296.
- Corcoran A, De Ridder LI, Del Duca D, Kalala OJ, Lah T, Pilkington GJ, Del Maestro RF (2003) Evolution of the brain tumour spheroid model: transcending current model limitations. *Acta Neurochir (Wien)* 145(9): 819-824.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16(8): 2649-2658.

- Dirks PB (2001) Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration. *J Neurooncol* 53(2): 203-212.
- Dunn IF, Heese O, Black PM (2000) Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J Neurooncol* 50(1-2): 121-137.
- Ehtesham M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS (2002) The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res* 62(20): 5657-5663.
- Ennis BW, Matrisian LM (1994) Matrix degrading metalloproteinases. *J Neurooncol* 18(2): 105-109.
- Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY (1998) Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 16(11): 1033-1039.
- Fontana A, Bodmer S, Frei K, Malipiero U, Siepl C (1991) Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: a role in resistance to immune rejection? *Ciba Found Symp* 157: 232-238; discussion 238-241.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64(19): 7011-7021.
- Hamel W, Westphal M (2000) Growth factors in gliomas revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 142(2): 113-137; discussion 137-118.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M (1992) Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52(11): 3213-3219.
- Hurelbrink CB, Armstrong RJ, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2002) Neural cells from primary human striatal xenografts migrate extensively in the adult rat CNS. *Eur J Neurosci* 15(7): 1255-1266.
- Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ (2004) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52): 18117-18122.

- Kadomatsu K, Muramatsu T (2004) Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 204(2): 127-143.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17(15): 5820-5829.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol* 79(1): 1-23.
- Kurtz A, Schulte AM, Wellstein A (1995) Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog* 6(2): 151-177.
- Lacorazza HD, Flax JD, Snyder EY, Jendoubi M (1996) Expression of human beta-hexosaminidase alpha-subunit gene (the gene defect of Tay-Sachs disease) in mouse brains upon engraftment of transduced progenitor cells. *Nat Med* 2(4): 424-429.
- Lamszus K, Schmidt NO, Jin L, Lattera J, Zagzag D, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID, Westphal M, Rosen EM (1998) Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int J Cancer* 75(1): 19-28.
- Lamszus K, Lattera J, Westphal M, Rosen EM (1999) Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) content and function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 17(5-6): 517-530.
- Lattera J, Nam M, Rosen E, Rao JS, Lamszus K, Goldberg ID, Johnston P (1997) Scatter factor/hepatocyte growth factor gene transfer enhances glioma growth and angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 76(4): 565-577.
- Liotta LA, Rao CN (1986) Tumor invasion and metastasis. *Monogr Pathol*(27): 183-192.
- Matsukado Y, Maccarty CS, Kernohan JW (1961) The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg* 18: 636-644.
- Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkington GJ (1994) Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br J Cancer* 70(2): 199-203.

- Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, Ino Y, Nomura K, Narita Y, Muramatsu T, Kirino T (1997) Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett* 233(1): 29-32.
- Ourednik V, Ourednik J, Park KI, Snyder EY (1999) Neural stem cells -- a versatile tool for cell replacement and gene therapy in the central nervous system. *Clin Genet* 56(4): 267-278.
- Park KI, Liu S, Flax JD, Nissim S, Stieg PE, Snyder EY (1999) Transplantation of neural progenitor and stem cells: developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction. *J Neurotrauma* 16(8): 675-687.
- Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Auguste KI, Lachyankar MB, Redmond DE, Snyder EY (2002) Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther* 9(10): 613-624.
- Pilkington GJ, Bjerkvig R, De Ridder L, Kaaijk P (1997) In vitro and in vivo models for the study of brain tumour invasion. *Anticancer Res* 17(6B): 4107-4109.
- Resnicoff M, Baserga R (1998) The role of the insulin-like growth factor I receptor in transformation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 842: 76-81.
- Romanic AM, Madri JA (1994) Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol* 4(2): 145-156.
- Rosario CM, Yandava BD, Kosaras B, Zurakowski D, Sidman RL, Snyder EY (1997) Differentiation of engrafted multipotent neural progenitors towards replacement of missing granule neurons in meander tail cerebellum may help determine the locus of mutant gene action. *Development* 124(21): 4213-4224.
- Rosen EM, Lamszus K, Laterra J, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID (1997) HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp* 212: 215-226; discussion 227-219.
- Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, Furneaux HM (1990) Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene* 5(12): 1839-1842.
- Schlegel U, Pels H, Oehring R, Blumcke I (1999) Neurologic sequelae of treatment of primary CNS lymphomas. *J Neurooncol* 43(3): 277-286.
- Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergun S, Stavrou D, Rosen EM, Lamszus K (1999) Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer* 84(1): 10-18.

- Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweg EA, Cepko CL (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68(1): 33-51.
- Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH (1995) Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 374(6520): 367-370.
- Sobeih MM, Corfas G (2002) Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *Int J Dev Neurosci* 20(3-5): 349-357.
- Stupp R, Mason WP, Bent MJVD, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Brandes AA, Cairncross G, Lacombe D, Mirimanoff RO (2004) Concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). Conclusive results of a randomized phase III trial by the EORTC Brain & RT Groups and NCIC Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 22.
- Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME (2005) Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5(3): 198-206.
- Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY (1995) Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 82(5): 864-873.
- Vigliani MC, Duyckaerts C, Hauw JJ, Poisson M, Magdelenat H, Delattre JY (1999) Dementia following treatment of brain tumors with radiotherapy administered alone or in combination with nitrosourea-based chemotherapy: a clinical and pathological study. *J Neurooncol* 41(2): 137-149.
- Villa A, Snyder EY, Vescovi A, Martinez-Serrano A (2000) Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol* 161(1): 67-84.
- Westphal M, Hansel M, Hamel W, Kunzmann R, Holzel F (1994) Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)* 126(1): 17-26.
- Wick W, Steinbach JP, Kuker WM, Dichgans J, Bamberg M, Weller M (2004) One week on/one week off: a novel active regimen of temozolomide for recurrent glioblastoma. *Neurology* 62(11): 2113-2115.
- Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY (1999) "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 7029-7034.

Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37(10): 3639-3643.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Evan Snyder für die freundliche Überlassung der murinen Stammzelllinie C17.2 und Herrn Ralph Schwall für den Wachstumsfaktor SF/HGF.

Weiterhin danke ich Frau PD Dr. K. Lamszus, Herrn Prof. Dr. med. M. Westphal und Herrn Dr. med. O. Heese für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie dem Team im Labor, insbesondere D. Zirkel, R. Fillbrandt und M. Brockmann, die mir mit viel Geduld, Rat und Tat bei meinen Laborarbeiten zur Seite standen.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Adresse	Andreas Disko Bächlerstr. 54 CH-8802 Kilchberg SCHWEIZ
Geburtsdatum, -ort	24.11.1976 in Barcelona, Spanien
Nationalität	deutsch

## AUSBILDUNG

1983 - 1987	Grundschule Nußdorf am Inn
1987 - 1996	Ignaz-Günther-Gymnasium, Rosenheim
1993 - 1994	St. Mark´s School, Southborough, MA, USA
1996-1997	Zivildienst im Haupt-OP der Poliklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München
WS 1997/98 – SS 2000	Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
WS 2000/01 – WS 2003/04	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Oktober – Dezember 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der DELIGHT-Studie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Diabetes-Früherkennung
Januar 2005 – Juni 2006	Assistenzarzt im Krankenhaus Hohe Warte, Neurologie, Bayreuth
Seit Juli 2006	Assistenzarzt im Sanatorium Kilchberg, Psychiatrie, Kilchberg, Schweiz