

Entwicklung einer PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen humane und murine Hirntumore mit migratorischen murinen Stammzellen

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Markus Messing**  
aus St. Ingbert

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von PD Dr. Katrin Lamszus  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. Konrad Wiese  
Tag der Disputation: 29. August 2008

Hamburg, den 23. Juli 2008



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Gliome</b>	<b>1</b>
1.2.	<b>Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme)</b>	<b>3</b>
1.2.1.	Molekulargenetische Ursachen der Glioblastomentstehung	4
1.2.2.	Invasive Gliomzellen	6
1.2.3.	Therapieoptionen bei Glioblastomen	9
1.3.	<b>Stammzellen</b>	<b>11</b>
1.3.1.	Adulte Stammzellen	12
1.3.2.	Tumortropismus adulter Stammzellen	13
1.3.3.	Neurale Stammzellen - NSC	14
1.3.4.	Mesenchymale Stammzellen/Stromazellen - MSC	15
1.4.	<b>Das Konzept der Enzym/Prodrug-Gentherapie</b>	<b>16</b>
1.4.1.	Das Carboxylesterase/CPT-11-Enzym/Prodrug-System	18
1.4.2.	Das <i>E. coli</i> -Purin-Nukleosid-Phosphorylase/Prodrug-System	19
1.5.	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>24</b>
2.1.	<b>Zellkultur</b>	<b>24</b>
2.1.1.	Zelllinien	24
2.1.2.	Kultivieren und Passagieren von Zellen	24
2.1.3.	Kryokonservierung von Zellen	25
2.1.4.	Auftauen von Zellen	26
2.1.5.	Beschichtung von Kulturgefäßen mit Fibronectin	26
2.1.6.	Untersuchung des Zellüberlebens mit AlamarBlue	26
2.1.7.	Färbung von Zellen mit Kristallviolett	27
2.1.8.	Färbung von Zellen mit DiI	27
2.1.9.	Färbung von Fettvakuolen mit Oil Red O	27
2.1.10.	Neurale Differenzierung von mNSC	28
2.1.11.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	28
2.1.12.	Retrovirale Transduktion	29
2.1.12.1.	Herstellung retroviraler Partikel	30
2.1.12.2.	Retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC	31
2.1.12.3.	Testung retroviral transduzierter Zellen auf Produktion infektiöser Partikel	31
2.2.	<b>Mikrobiologische Arbeiten</b>	<b>32</b>
2.2.1.	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
2.2.2.	Lagerung von Bakterien ( <i>E. coli</i> )	33
2.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i> XL-10 Gold	33
2.3.	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>33</b>
2.3.1.	Klonierung von Expressionsvektoren	33
2.3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Insert-Sequenzen	35
2.3.3.	Restriktion von Plasmiden und PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen	35
2.3.4.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
2.3.5.	Ligation von DNA Fragmenten	36
2.3.6.	Ortsspezifische <i>in vitro</i> -Mutagenese	37
2.3.6.1.	<i>In vitro</i> -Mutagenese PCR	37
2.3.7.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.3.8.	Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen	39
2.3.9.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen	39
2.3.10.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39

2.3.11. Reverse Transkription (RT-PCR) und Nachweis von Transkripten in cDNA mittels PCR.....	39
2.3.12. Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	41
<b>2.4. Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>43</b>
2.4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.4.2. Western-Blot-Analyse .....	44
2.4.3. Immunochemische Färbung von Western-Blots.....	44
2.4.4. Bestimmung der PNP-Aktivität im Lysat retroviral transduzierter Stammzellen.....	45
2.4.5. Bestimmung der CE-Aktivität im Lysat und konditioniertem Medium retroviral transduzierter Stammzellen .....	46
<b>2.5. Histologie .....</b>	<b>47</b>
2.5.1. Anfertigung von Kryoschnitten .....	47
<b>2.6. Arbeit mit Versuchstieren (C57Bl/6-Mäuse).....</b>	<b>47</b>
2.6.1. Intrakranielle Injektion von Zellen in Versuchstiere .....	47
<b>2.7. Auswertung und Statistik.....</b>	<b>48</b>
<b>2.8. Kitsysteme, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien.....</b>	<b>48</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Charakterisierung muriner Stammzellen aus neuralem Gewebe und Knochenmark.....</b>	<b>52</b>
3.1.1. Charakterisierung muriner neuraler Stammzellen (mNSC).....	52
3.1.2. Charakterisierung muriner mesenchymaler Stromazellen (mBMSC).....	55
<b>3.2. Retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3. Untersuchung des rCE/CPT-11 Enzym/Prodrug-Systems in mNSC .....</b>	<b>59</b>
3.3.1. Konstruktion von rCE-Vektoren zur retroviralen Transduktion .....	59
3.3.2. CE-Aktivität im konditionierten Medium retroviral transduzierter mNSC .....	60
3.3.3. Untersuchung des „Bystander“-Effektes rCEsec-produzierender mNSC auf GL261.....	62
3.3.4. Quantifizierung der CE-Aktivität transduzierter mNSC.....	64
<b>3.4. Untersuchung des PNP-Enzym/Prodrug-Systems in mNSC und mBMSC.....</b>	<b>67</b>
3.4.1. Konstruktion eines PNP-Expressionsplasmids und Produktion der PNP in retroviral transduzierten mNSC und mBMSC .....	68
3.4.2. Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-produzierende mNSC und mBMSC .....	70
3.4.2.1. Wirkung der Prodrugs auf PNP-produzierende mNSC .....	71
3.4.2.2. Wirkung der Prodrugs auf PNP-produzierende mBMSC .....	72
3.4.3. „Bystander“-Effekt von PNP-produzierenden mNSC und mBMSC auf Tumorzellen .....	74
3.4.3.1. „Bystander“-Effekt von mNSC mit PNP-Aktivität .....	75
3.4.3.2. „Bystander“-Effekt von mBMSC mit PNP-Aktivität .....	77
3.4.4. Quantifizierung des „Bystander“-Effektes mit PNP-produzierenden murinen neuralen Stammzellen (mNSC) und FdAdo als Prodrug an den Gliomzelllinien U87 und G55 .....	78
3.4.4.1. „Bystander“-Effekt in Abhängigkeit der FdAdo-Konzentration.....	79
3.4.4.2. „Bystander“-Effekt in Abhängigkeit der mNSC-Zellzahl .....	82
<b>3.5. Migration von mNSC und mBMSC zu experimentellen Hirntumoren in C57Bl/6-Mäusen.....</b>	<b>86</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>4.1. Isolierung und Charakterisierung muriner neuraler Stammzellen und muriner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmark.....</b>	<b>90</b>
4.1.1. Murine neurale Stammzellen.....	90
4.1.2. Murine mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark .....	91
<b>4.2. Die retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC .....</b>	<b>92</b>

---

<b>4.3.</b>	<b>Migration von mNSC und mBMSC zu experimentellen Hirntumoren in vivo .....</b>	<b>94</b>
<b>4.4.</b>	<b>Das rCE/CPT-11-Systems in mNSC .....</b>	<b>95</b>
4.4.1.	Konstruktion verschiedener rCE-Expressionsvektoren und Aktivitätstest .....	95
4.4.2.	„Bystander“-Effekt rCEsec-produzierender mNSC und Quantifizierung der rCE-Aktivität .....	96
<b>4.5.</b>	<b>Das <i>E. coli</i>-PNP/Prodrug-Systems in mNSC und mBMSC .....</b>	<b>98</b>
4.5.1.	Konstruktion eines PNP-Expressionsvektors und PNP-Expression in mNSC und mBMSC .....	98
4.5.2.	Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-produzierende mNSC und mBMSC .....	99
4.5.3.	„Bystander“-Effekte PNP-produzierender mNSC und mBMSC auf Tumorzellen.....	100
4.5.4.	Quantifizierung der „Bystander“-Effekte PNP-produzierender mNSC in Kombination mit FdAdo auf die Gliomzelllinien U87 und G55 .....	102
<b>4.6.</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>108</b>
<b>6.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Gliome

Mit ca. 8000 Neuerkrankungen pro Jahr gehören Hirntumoren zu den selteneren Krebserkrankungen in Deutschland. Neue Fälle von primären intrakraniellen Tumoren werden in den westlichen Industrienationen mit einer Häufigkeit von 6-11 für Männer und 4-11 für Frauen pro 100.000 Einwohner angegeben. (Ferlay *et al.*, 2000, Parkin *et al.*, 2002).

Über 40 % der hirneigenen Neoplasien sind dabei glialen Ursprungs. Sie zeigen morphologische, histologische und immunhistochemischen Differenzierungsmerkmale von Glia-Zellen und werden daher als Gliome bezeichnet (Ohgaki und Kleihues, 2005). Je nach astrozytärer, oligodendroglialer oder ependymaler Morphologie ergibt sich die Einteilung der Gliome in Astrozytome, Oligodendrogliome oder Ependymome.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert die Gliome nach histologischen Merkmalen und unterscheidet dabei vier Malignitätsgrade (WHO-Grade I-IV). Dabei wird dem Glioblastom als dem bösartigsten Gliom der WHO-Grad IV zugewiesen (Kleihues und Cavenee, 2000). Tabelle 1.1 zeigt nach der WHO-Klassifikation eingeteilte Gliome und deren Inzidenzen im Überblick.

**Tabelle 1.1:** WHO-Klassifikation astrozytärer, oligodendroglialer und ependymaler Tumoren und deren Inzidenz (Tabelle nach Westphal und Herrmann, 1999 und Radner *et al.*, 2002).

<i>Tumorfamilie</i>	<i>Tumorentität</i>	<i>WHO-Grad</i>	<i>Inzidenz</i>
Astrozytome	Pilozytisches Astrozytom	I	20-30 % der Gliome
	Diffuses Astrozytom	II	
	Anaplastisches Astrozytom	III	
	Glioblastom	IV	50 % der Gliome
Oligodendrogliome	Oligodendrogliom	II	3-8 % der Gliome
	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	
Mischgliome	Oligoastrozytom	II	
	Anaplastisches Oligoastrozytom	III	
Ependymome	Myopapilläres Ependymom	I	2-6 % der Gliome
	Subependymom	I	
	Ependymom	II	
	Anaplastisches Ependymom	III	

Alle Gliome ab dem WHO-Grad II infiltrieren diffus das umgebende Hirnparenchym. Sie sind daher durch chirurgische Eingriffe kaum vollständig resizierbar. Somit bilden sich nach

chirurgischer Entfernung regelhaft Rezidive. Damit einhergehend zeigen Gliome des WHO-Grades II eine Potenz zur Steigerung des Malignitätsgrades (maligne Progression).

Wie aus Tabelle 1.1 hervorgeht, gehören Ependymome und Oligodendrogliome zu den seltenen Gliomen. Bei Ependymomen handelt es sich zumeist um langsam wachsende Tumore, deren Ursprung in den auskleidenden Ependymzellen der Ventrikel vermutet wird. Sie zeigen intra- oder periventrikuläres Wachstum und treten bevorzugt im Kindes- bzw. Jugendalter auf. Oligodendrogliome gehören zu den diffus wachsenden Gliomen und treten hauptsächlich bei Erwachsenen im mittleren Lebensalter auf (35-50 Jahre). Diese Tumoren werden als WHO-Grad II eingestuft. Anaplastische Oligodendrogliome (WHO-Grad III) können *de novo* entstehen oder aus Oligodendrogliomen WHO-Grad II hervorgehen. Dabei ist die Prognose für Oligodendrogliome WHO-Grad III in der Regel günstiger, als für Astrozytome des WHO-Grades III. Die mediane Überlebenszeit unter Behandlung beträgt beim anaplastischen Astrozytom 2-3 Jahre, beim anaplastischen Oligodendrogliom ca. 5 Jahre. Mischgliome sind Tumoren mit Anteilen eines Astrozytoms und eines Oligodendroglioms. Sie werden nach der WHO-Klassifikation in Oligoastrozytome (WHO-Grad II) und anaplastische Oligoastrozytome (WHO-Grad III) eingeteilt. Insgesamt liegt die Prognose von Oligoastrozytomen zwischen der von Oligodendrogliomen und Astrozytomen.

Mit 70-80 % machen die Astrozytome den größten Anteil der Gliome aus. Die WHO-Klassifikation unterscheidet dabei die Gruppe der diffus infiltrativ wachsenden Astrozytome (diffuses Astrozytom, anaplastisches Astrozytom und Glioblastom) von Astrozytomen, die zumeist scharf abgrenzbare Tumoren bilden (pilozytisches Astrozytom). Tumore der letzten Gruppe sind selten und treten zumeist bei Kindern und jungen Erwachsenen auf. Sie wachsen langsam, haben ein geringes Potential zur malignen Progression und können häufig durch Resektion erfolgreich therapiert werden. Dagegen zeigen sich diffus infiltrierende Astrozytome präferentiell in erwachsenen Patienten. Diese Tumoren haben eine ausgeprägte Tendenz sowohl zur Rezidivbildung als auch zur malignen Progression. Üblicherweise sind sie durch die Standardtherapieverfahren aus Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie nicht kurativ behandelbar.

Diffuse Astrozytome, WHO-Grad II, treten hauptsächlich in den zerebralen Hemisphären junger Erwachsener auf (30-40 Jahre). Sie zeigen eine geringe oder moderate Zellularität mit diffuser Infiltration des umgebenden Parenchyms, sowie eine malignes Progressionspotential zu anaplastischen Astrozytomen oder sekundären Glioblastomen. Die mittlere Lebenserwartung beträgt 6-8 Jahre. Diffuse Astrozytome werden auch niedriggradige Astrozytome genannt. In ähnlichen Hirnregionen treten anaplastische Astrozytome, WHO-Grad III, hauptsächlich in der Gruppe der 40-45 Jährigen in Erscheinung. Sie weisen sich durch eine erhöhte Zellularität sowie mitotische Aktivität aus. Zudem ist die Tendenz zur Progression in Richtung sekundärer Glioblastome zu beobachten. Mit einer durchschnittlichen



Lebenserwartung von ca. 3 Jahren werden anaplastische Astrozytome als hochgradig maligne Astrozytome eingestuft. Glioblastome, mit der Einstufung als Grad-IV Astrozytome, sind die am häufigsten auftretenden und zugleich aggressivsten Tumore. (Kleihues und Cavenee, 2000). Diese Form der Astrozytome wird separat im folgenden Kapitel näher beschrieben. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die relativen Überlebensraten bei verschiedenen Hirntumoren.

**Tabelle 1.2:** Relative Zweijahres- und Fünfjahres-Überlebensraten bei malignen Hirntumoren (Tabelle modifiziert nach Davis *et al.*, 1999).

<i>Histologischer Befund</i>	<i>Relative Überlebensrate [%] 2 Jahre</i>	<i>Relative Überlebensrate [%] 5 Jahre</i>
Pilozytisches Astrozytom	90,5	87,2
Diffuses Astrozytom	66,6	48,8
Anaplastisches Astrozytom	45,7	31,0
Glioblastom	8,8	3,2
Oligodendrogliom	79,8	63,1
Anaplastisches Oligodendrogliom	61,1	38,4
Mischgliom	74,2	58,7
Ependymom	79,3	66,7

### **1.2. Das Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*)**

Die durchschnittliche Lebenserwartung für Patienten mit Glioblastom, WHO-Grad IV, beträgt weniger als ein Jahr ab Diagnosestellung. Weniger als 3 % der Patienten überleben trotz intensiver Therapie mehr als 5 Jahre (Ohgaki und Kleihues, 2005). Somit ist das am häufigsten vorkommende Astrozytom zugleich das gefährlichste. Wie andere diffus wachsende Astrozytome entstehen Glioblastome präferentiell im Cerebrum. Mehrheitlich treten sie bei adulten Patienten zwischen 50 und 70 Jahren auf. Für die histologische Diagnose essentiell sind nekrotische Anteile, hohe mitotische Aktivität sowie mikrovaskuläre Proliferation (Kleihues und Cavenee, 2000).

Glioblastome entstehen entweder *de novo* oder in Folge von maligner Progression niedriggradiger Astrozytome. Dementsprechend unterscheidet man primäre und sekundäre Glioblastome (Kleihues und Ohgaki, 1999). Sekundäre Glioblastome treten gehäuft in einer Altersgruppe ab ca. 45 Jahren auf. Die durchschnittliche Dauer der Progression von einem anaplastischen Astrozytom zu einem Glioblastom beträgt ca. 2 Jahre, die Progressionszeit vom diffusen Astrozytom zum Glioblastom ca. 5 Jahre (Ohgaki und Kleihues (b), 2005).

Auf morphologischer Ebene sind primäre und sekundäre Glioblastome nicht zu unterscheiden. Hinsichtlich ihrer molekularen Pathologie lassen sich die beiden Gruppen

jedoch relativ klar definieren. Zudem kann die maligne Progression zu sekundären Glioblastomen anhand bestimmter genetischer und chromosomaler Veränderungen nachvollzogen werden. Diese molekularen Unterscheidungsmerkmale werden im nächsten Kapitel detaillierter erörtert.

### 1.2.1. Molekulargenetische Ursachen der Glioblastomentstehung

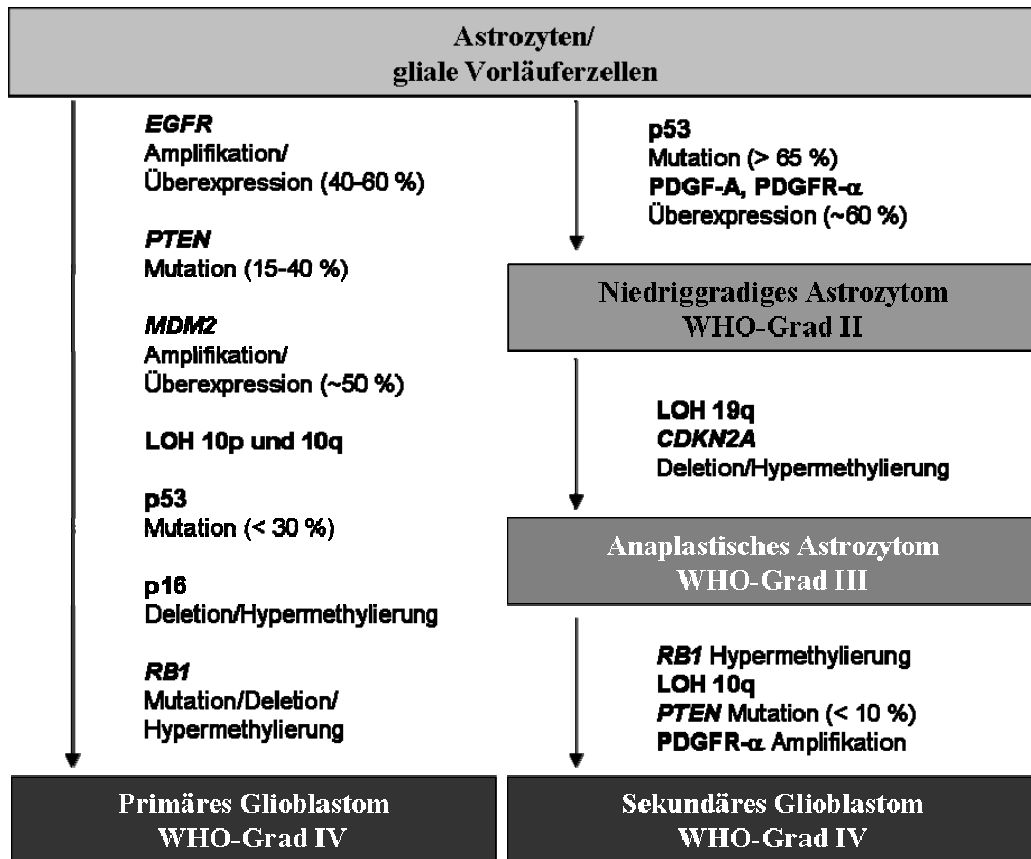
Wie bereits erwähnt, sind primäre und sekundäre Glioblastome anhand ihres Phänotyps nicht unterscheidbar. Jedoch sind auf molekularer Ebene unterschiedliche Subtypen zu beobachten. Bei primären Glioblastomen finden sich häufig Mutationen, welche den EGF-Rezeptor-vermittelten (*epidermal growth factor receptor*) Signalweg betreffen (Kita *et al.*, 2007). Die Aktivierung des EGFR durch ein extrinsisches Signal führt über die Kinase PI3K zur Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3). Dieses wirkt über weitere Effektoren stimulierend auf die Zellproliferation und begünstigt das Überleben der Zelle durch Blockierung der Apoptose. Das Signalmolekül PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) inhibiert PIP3 und somit die Zellproliferation (Mellinghoff *et al.*, 2005). Daneben reguliert PTEN außerdem die Zellmigration und Invasion durch Dephosphorylierung der „*focal adhesion kinase*“ (FAK) (Tamura *et al.*, 1998).

In 40-60 % aller primären Glioblastome liegt entweder eine Amplifikation oder eine Überexpression des *EGFR*-Gens vor (Liebermann *et al.*, 1985). Zudem weisen *EGFR*-Amplikons eine erhöhte Mutationsrate auf, was im Falle der Genvariante *EGFRvIII* einen konstitutiv aktiven EGF-Rezeptor zur Folge hat (Huang *et al.*, 1997). In 15-40% der Glioblastome sind Mutationen des PTEN-Gens zu finden, wobei davon fast ausschließlich primäre Glioblastome betroffen sind (Knobbe *et al.*, 2002). Der vollständige Verlust des Chromosoms 10 (*loss of heterozygosity*, LOH 10), der sich ebenfalls überwiegend bei primären Glioblastomen findet, betrifft neben einigen anderen Tumorsuppressorgenen wiederum das PTEN-Gen, dessen regulatorische Eigenschaft somit verloren geht (Fujisawa *et al.*, 2000).

Für die Entstehung sekundärer Glioblastome sind Mutationen des p53-Transkriptionsfaktors charakteristisch. In gesunden Zellen wird p53 nach DNA-Schäden aktiviert und ruft über die Induktion des Cyclin-Kinase-Inhibitors p21 einen Zellzyklusarrest hervor (Sherr *et al.*, 1999). Als direkter Repressor von p53 fungiert MDM2 (Momand *et al.*, 1992).

In zwei Drittel aller niedriggradigen Astrozytomen sind p53-Mutationen die ersten detektierbaren genetischen Veränderungen. In anaplastischen Astrozytomen sowie in sekundären Glioblastomen treten sie ähnlich häufig auf (Watanabe *et al.*, 1996). In geringerem Umfang (< 30 %) sind p53-Mutationen auch in primären Glioblastomen

vorhanden. Die unspezifische Verteilung der Mutationen im Gen lassen hier jedoch eher auf sekundäre Ereignisse aufgrund genomischer Instabilität des Tumors schließen. So betreffen ca. 60 % aller p53-Mutationen in sekundären Glioblastomen die Codons 248 und 273, wohingegen die p53-Mutationen primärer Glioblastome gleichmäßiger verteilt sind (Ohgaki *et al.*, 2004). Zudem wird der p53-Repressor MDM2 in ca. 50 % der primären Glioblastomen überexprimiert, wodurch die Zellzykluskontrolle durch p53 eingeschränkt wird (Biernat *et al.*, 1997).



**Abbildung 1.1:** Chromosomale und genetische Veränderungen diffus infiltrierender Astrozytome (Modifiziert nach Keihues *et al.*, 2000).

Änderungen im p16<sup>INK4a</sup>/RB1-Signalweg sind für die Entstehung beider Glioblastom-Gruppen gleichermaßen wichtig. Normalerweise kontrolliert das RB1-Protein die G<sub>1</sub>-S-Transition im Zellzyklus durch Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors. RB1 wird vom CDK4/CyclinD1-Komplex aktiviert, dessen Bildung durch Bindung von p16<sup>INK4a</sup> an CDK4 gehemmt werden kann (Sherr *et al.*, 1999). In primären und sekundären Glioblastomen sind Deletionen des p16<sup>INK4a</sup>-Gens sowie Methylierungen des p16<sup>INK4a</sup>-Promotors zu finden. Dabei treten p16<sup>INK4a</sup>-Deletionen häufiger in primären Glioblastomen auf (Nakamura *et al.*, 2001). Ca. 43 % der sekundären Glioblastome weisen ein Methylierung des RB1-Promotors auf, welche mit einem Rückgang der RB1-Expression korreliert. Dieselbe Methylierung ist in nur

ca. 14 % der primären Glioblastome festzustellen. Die *RB1*-Promotor-Methylierung tritt nicht in niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytomen auf und wird daher als ein spätes Ereignis der malignen Progression eingestuft (Nakamura *et al.*, 2001b). Ein Überblick über die typischen genetischen und chromosomalen Aberrationen in Astrozytomen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

### 1.2.2. Invasive Gliomzellen

Die Fähigkeit, gesundes Hirngewebe diffus zu infiltrieren, ist kennzeichnend für Gliome ab WHO-Grad II, wobei die Tendenz zu invasivem Wachstum mit dem Malignitätsgrad steigt. Das infiltrative Wachstum ist ein Hauptgrund für die überaus schlechte Prognose bei Gliomen, da zum Zeitpunkt einer chirurgischen Entfernung der Haupttumormasse stets bereits Tumorzellen in das umgebende Gewebe eingewandert sind. Diese invasiven Zellen bilden die Ausgangsbasis für einen rezidivierenden Tumor, der in 96 % der Fälle in unmittelbarer Umgebung der Resektionshöhle auftritt (Burger *et al.*, 1983; Gaspar *et al.*, 1992). Die diffuse Gewebsinfiltration der Tumorzellen reicht dabei allerdings weit über die Umgebung des Haupttumors hinaus. In frühen Studien wurde bereits festgestellt, dass die Tumorzellen in über 50 % der Fälle unbehandelter Glioblastome die kontralaterale Hemisphäre erreichen (Matsukado *et al.*, 1961). So konnten selbst radikale Eingriffe, wie die Entfernung ganzer Hirnhälften das Auftreten von Glioblastom-Rezidiven in der gegenüberliegenden Hemisphäre nicht verhindern (Bell, 1949).

Die Migration der Tumorzellen folgt distinkten anatomischen Strukturen. So können einzelne invasive Zellen entlang myelinisierter Axone identifiziert werden. Wandernde Tumorzellen folgen außerdem dem Perivaskularraum bzw. der Basallamina von Blutgefäßen (Scherer, 1940). Zu einer Penetration der endothelialen Basallamina kommt es dabei allerdings nicht (Rutka *et al.*, 1988).

Die Invasion setzt komplexe Vorgänge in der Tumorzelle voraus. Obligatorisch sind dafür die Interaktion und der Kontakt mit der umgebenden extrazellulären Matrix (ECM), die sowohl eine mechanische Barriere als auch ein permissives Substrat für die Zelle darstellt. Durch Degradation der Matrix mittels Metalloproteinasen schafft die Tumorzelle einen Raum, in den sie sich aktiv fortbewegen kann. Dieser Prozess beinhaltet das Ablösen der Zelle aus dem eigentlichen Zellverband sowie die Polarisierung der Zellen durch Ausbildung von Pseudopodien. Auf molekularer Ebene müssen dazu Elemente des Zytoskelettes und verschiedene Struktur- und Signalproteine, die in Zusammenhang mit dem ECM-Kontakt stehen, neu angeordnet werden (Liotta, 1986; Webb *et al.*, 2002).

Verschiedene Komponenten der ECM des Hirns stimulieren die Migration von Gliomzellen. So wurden Fibronectin, Kollagen IV, Tenascin-C, Vitronectin und Laminin als

migrationsinduzierende Substrate *in vitro* identifiziert (Ohnishi *et al.*, 1997; Berens *et al.*, 1994). Die Interaktion der Tumorzellen mit der ECM wird dabei hauptsächlich von Integrinen vermittelt. Diese Transmembran-Glykoproteine bestehen aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) und interagieren sowohl mit Matrix-Molekülen, als auch mit interzellulären Adhäsionsmolekülen. Der Einfluss der Integrine auf die migratorischen Fähigkeiten von Zellen ist eingehend untersucht. So können Zellen ihre adhäsiven Eigenschaften durch selektive Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten individuell ändern (Kumar, 1998). Interessanterweise findet sich in neoplastischen Astrozyten im Gegensatz zu normalen Astrozyten ein verändertes Spektrum an Integrin-Untereinheiten, was auf eine unterschiedliche Zell-Matrix-Interaktion schließen lässt (Paulus *et al.*, 1993). *In vivo* konnte eine gesteigerte Expression der Untereinheiten  $\alpha 3$  und  $\beta 1$  im invadierenden Bereich des Tumors festgestellt werden (Mahesparan *et al.*, 2003).

Neben den Integrinen haben auch andere zelluläre Adäsionsmoleküle wie Cadherine, NCAM oder die Connexine der *Gap Junctions* Einfluss auf das infiltrative Wachstum von Gliomen. So wird die Ausbreitung astrozytärer Tumoren mit einer verringerten Expression von N-Cadherin in Verbindung gebracht (Asano *et al.*, 2000). Eine Überexpression von NCAM führt hingegen zu einer verringerten Motilität *in vitro* (Prag *et al.*, 2002). Im Zusammenhang mit einer reduzierten NCAM-Expression in Gliomzellen wurde gleichzeitig eine erhöhte Integrin-Expression festgestellt (Hikawa *et al.*, 2000). Die verminderte Bildung von *Gap Junctions* (interzellulären Verbindungen, welche die Zell-Zell-Kommunikation ermöglichen) korreliert mit einer gesteigerten *in vitro*-Motilität von Gliomzellen (McDonough *et al.*, 1999). Damit einhergehen wurde eine erhöhte Malignität von Gliomen mit gleichzeitiger Abnahme der *Gap Junctions* sowie der reduzierten Expression des *Gap-Junctions*-Molekül Connexin 43 beobachtet (Soroceanu *et al.*, 2001).

Von herausragender Bedeutung für die unzureichende Therapierbarkeit invasiver Gliome ist eine weitere Eigenschaft invadierender Tumorzellen. Im Zusammenhang mit ihren migratorischen Eigenschaften zeigen diese Tumorzellen eine stark eingeschränkte Proliferation sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose.

Gliomzellen, welche auf einem permissiven Substrat *in vitro* migrierten, zeigten eine geringere Proliferationsrate als die nichtmigrierenden Anteile der Zellkolonie. Damit einhergehend wurde beobachtet, dass ECM-Komponenten, welche die Migration stimulierten, die Proliferation der Zellen herabsetzten (Giese *et al.*, 1996). Ein ähnlicher Effekt der Migrationsstimulation bei gleichzeitiger Reduktion der Proliferation wurde von dem Signalmolekül TGF- $\beta 1$  (*Transforming Growth Factor  $\beta 1$* ) hervorgerufen (Merzak *et al.*, 1994). In eine Kollagenmatrix invadierende Tumorzellen zeigten *in vitro* zudem eine reduzierte Apoptoserate (Cho und Klemke, 2000). Bei invadierenden Gliomzellen *in vivo* wurde die Überexpression von Dap-3 (*Death-associated Protein 3*) festgestellt, einem Protein, welches

im Zusammenhang mit gesteigerter Apoptose-Resistenz steht. Gleichzeitig führte eine Verringerung der Dap-3 Expression zu erhöhter Apoptose-Sensibilität und reduzierter Motilität (Mariani *et al.*, 2001).

Der Zusammenhang zwischen gesteigerter Motilität einerseits und verminderter Proliferation/Apoptose andererseits konnte in der Untersuchung des Expressionsmusters von migrierenden Gliomzellen *in vitro* gezeigt werden. So zeigten Gliomzellen, welche auf verschiedenen migrationsinduzierenden Matrices wuchsen, eine Überexpression von Genen der Zellmotilität, wohingegen die Expression von Schlüsselgenen des Zellzyklus herunterreguliert war. Die differentielle Expression von Genen der apoptotischen Kaskade zeigte eine globale Herunterregulierung proapoptotischer Komponenten bei migrationsinduzierten Gliomzellen (Mariani *et al.*, 2001b).

Die Koordination dieser molekularen Mechanismen, die gleichzeitig eine gesteigerte Motilität und eine verminderter Proliferation/Apoptose erzeugen, wird durch intrazelluläre Signalkaskaden bewerkstelligt. Bei der Interaktion der Zelle mit der ECM werden Integrine von extrazellulären Signalen (Matrixproteine oder Wachstumsfaktoren) aktiviert. Diese vermitteln die Signale über die Tyrosin-Kinase FAK (*focal adhesion kinase*) oder das monomere G-Protein Ras auf Schlüsselkomponenten der Signaltransduktion, CAS/Crk und ERK (Cho und Klemke, 2000). Die Aktivierung von Rac durch CAS/Crk ist assoziiert mit Aktin-Polimerisierung und einer für die Invasion notwendigen Umgestaltung der Zellform (Ridely *et al.*, 1992; Kiyokawa *et al.*, 1998). Rac nimmt über die Signalmoleküle JNK und NF- $\kappa$ B ebenfalls Einfluss auf den Zellzyklus (Perona *et al.*, 1997), sowie über PI-3K Einfluss auf apoptotische Regulatoren (Keely *et al.*, 1997).

Das Signalmolekül ERK steuert im Nukleus transkriptionale Vorgänge, welche die Progression im Zellzyklus betreffen (Aplin *et al.*, 1998). ERK wird ebenfalls mit der Regulation des apoptotischen Signalmoleküls BAD in Verbindung gebracht (Scheid *et al.*, 1999). Darüber hinaus reguliert ERK die Myosin-Phosphorylierung, welche für die Aktin-Myosin-Interaktion und die Zellkontraktion, somit für Zellmigration relevant ist (Nguyen *et al.*, 1999).

Durch ihre invasive Neigung, sowie durch ihr verändertes Proliferationsverhalten und ihre Apoptose-Resistenz stellen invasive Gliomzellen somit zwei Anforderungen an ein mögliches Therapiekonzept. Zum einen gilt es, die invadierenden Zellen einer lokalen Therapie überhaupt zugänglich zu machen, da ihre chirurgische Entfernung nicht möglich ist. Zum anderen müssen Therapiekonzepte der niedrigen Proliferations- und Apoptoserate Rechnung tragen, da die gängigen chemotherapeutischen Verfahren hier versagen. Diese basieren zumeist auf einer Störung der DNA-Synthese, wodurch sie eher an hochproliferative Tumorzellen adressiert sind. Die S-Phasen-spezifische Wirkweise führt jedoch nicht zum Absterben nicht-proliferierender Tumorzellen.

### 1.2.3. Therapieoptionen bei Glioblastomen

Die standardmäßig angewandte Therapie bei Glioblastomen besteht aus der Resektion des Tumors, gefolgt von Strahlentherapie und Chemotherapie. Bei der operativen Behandlung wird dabei die möglichst vollständige Entfernung des Tumors innerhalb seiner makroskopisch sichtbaren Grenzen angestrebt. Die darauf folgende Bestrahlung und die systemische Verabreichung von Chemotherapeutika sollen bei verbleibenden Tumorzellen DNA-Schäden hervorrufen bzw. die DNA-Replikation inhibieren (Castro *et al.*, 2003).

Im Vergleich zu der alleinigen Resektion hat sich die mittlere Überlebenszeit von Glioblastompatienten durch Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie innerhalb der letzten Jahrzehnte von einigen Monaten auf etwa ein Jahr verlängert (Jelsma und Bucy, 1967; Steward, 2002). Als wirksame Chemotherapeutika haben sich dabei Nitrosoharnstoffe und Temozolomid erwiesen. Beide zählen zu den DNA-alkylierenden bzw. -methylierenden Substanzen, welche in ihrer hauptsächlichen Wirkung die Bildung von O<sup>6</sup>-Methyl-Guanin verursachen. Dieses bindet komplementär zu Thymidin statt Cytidin, wodurch während der DNA-Replikation Fehler in der Basenpaarung verursacht werden. Der therapeutische Effekt beider Substanzen resultiert in einer verlängerten medianen Überlebenszeit sowie einer Erhöhung der Rate der Langzeitüberlebenden (Patienten mit längerem Überleben als 1 Jahr) (Fine *et al.*, 1993; Dehdashti *et al.*, 2006).

Vor dem Hintergrund der dennoch relativ geringen Erfolge von Standardtherapieverfahren bei Glioblastomen werden neue Therapieansätze entwickelt, welche auch auf die neoplastischen Zellen abseits des Haupttumors ausgerichtet sind. Verschiedene Konzepte, welche bereits klinisch geprüft werden, befassen sich unter anderem mit immunologischer Stimulation, der zielgerichteten Verabreichung von Toxinen, dem Einsatz onkolytischer Viren oder dem Transfer von Tumorsuppressorgenen bzw. letalen Genen auf Tumorzellen.

So wurde eine am Tumor lokalisierte Immunantwort in Patienten hervorgerufen, welche mit autologen dendritischen Zellen behandelt worden waren. Diese Antigen-präsentierenden Zellen wurden zuvor mit Peptiden aus autologem Tumormaterial inkubiert (Yu *et al.*, 2001). Eine intradermale Verabreichung von IL-4 produzierenden Fibroblasten und bestrahlten autologen Gliomzellen führte ebenfalls zu einer Immunantwort in den behandelten Patienten (Okada *et al.*, 2007).

Der zielgerichtete Einsatz von Toxinen wird durch das exklusive Vorkommen bestimmter Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Gliomzellen ermöglicht. Die Toxine werden dabei an die jeweiligen rezeptorspezifischen Liganden gekoppelt und dadurch der Tumorzelle vermittelt. So wird das an IL-13 gekoppelte Pseudomonas-Endotoxin (PE) über Interaktion

mit dem Rezeptor IL13 $\alpha$ 2R von der Zelle internalisiert (Pastan *et al.*, 1992). In klinischen Studien führte die Toxinvermittlung mittels IL-13 zu reduzierter Tumorbelastung und einem verlängertem Überleben der Patienten (Kunwar *et al.*, 2003). Kombinationen von PE mit IL-4 oder TGF $\alpha$ , einem Liganden des Rezeptors EGFR wurden ebenfalls erfolgreich klinisch getestet (Rand *et al.*, 2000; Sampson *et al.* 2003). Der Einsatz des Diphtherie-Toxins (DT), kombiniert mit Transferrin, führte ebenfalls zu einem längeren Überleben der Patienten (Laske *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2003).

Durch die Verabreichung onkolytischer Viren, welche im Tumor repliziert werden, soll die Lyse der Tumorzellen und die Zerstörung der Tumormasse erreicht werden. Neben zahlreichen anderen Viren, die hinsichtlich einer klinischen Verwendbarkeit getestet wurden, werden der Herpes-Simplex-Virus (HSV) und Adenoviren in klinischen Studien eingesetzt (Sah *et al.*, 2003). So steigerte der genetisch veränderte Herpes-Simplex-Virus HSV1716 nach Injektion in die Tumor-Resektionshöhle das Langzeitüberleben von Patienten auf 15-22 Monate nach Operation (Harkow *et al.*, 2004). Der Einsatz des Adenovirus ONYX-015 resultierte ebenfalls in gesteigertem Langzeitüberleben (Chiocca *et al.*, 2004).

Replikations-inkompetente Adenoviren hingegen wurden zur Verabreichung des Tumorsuppressorgens p53 verwendet. Die mit den p53-vermittelnden Viren behandelten Gliomzellen zeigten inhibiertes Wachstum und eine gesteigerte Apoptoserate (Vecil *et al.*, 2003). Transduzierte Gliomzellen wurden nach Injektion der p53-Adenoviren in das Hirnparenchym jedoch nur einige Millimeter entfernt von der Injektionsstelle gefunden, was den therapeutischen Effekt insgesamt nicht steigerte (Lang *et al.*, 2003).

Die spezifische Zerstörung von Tumorzellen, ohne dabei gesundes Gewebe zu beeinträchtigen, wird durch die Vermittlung konditionell letaler Gene angestrebt. In diesem „Enzym/Prodrug-Gentherapie“-genannten Konzept wird den Tumorzellen ein Gen verabreicht, welches für ein therapeutisches, nicht-toxisches Enzym kodiert. Dieses ist in der Lage, einen nicht-toxischen Medikamenten-Vorläufer (Prodrug) zu einem toxischen Metaboliten umzusetzen und somit die produzierende Zelle zu töten. Die am besten charakterisierten Enzym/Prodrug-Modelle sind das Herpes-Simplex-Virus-Typ1-Thymidinkinase (HSV1-TK)/Ganciclovir (GCV)-System und das Cytosin-Deaminase (CD)/ 5-Fluorocytosin (5-FC)-System. Die HSV1-Thymidinkinase phosphoryliert die Prodrug Ganciclovir, ein 2-Desoxiguanosin-Analogon, und wandelt sie somit in ein toxisches DNA-Element um (Moolten, 1986). Das Enzym Cytosin-Deaminase wandelt die Prodrug 5-Fluorocytosin (5-FC) zu 5-Fluorouracil (5-FU) um. Diese fördert den Zelltod durch Inhibierung der Thymidilat-Synthase (Greco *et al.*, 2001). Die genaue Wirkweise von Enzym/Prodrug-Systemen wird in Kapitel 1.4 näher beschrieben.

Die Behandlung von Gliomen durch das HSC1-TK/Ganciclovir-System wird derzeit in zahlreichen klinischen Studien eingehend untersucht. Zur Einbringung des Gens in



Tumorzellen bedient man sich dabei Liposomen oder replikations-inkompetenten Retro- bzw. Adenoviren. Die dabei erzielten Erhöhungen der mittleren Überlebensraten sowie eine beobachtete Tumorregression lassen auf die Effektivität des Systems schließen (Immonen *et al.*, 2004; Voges *et al.*, 2003). Dennoch schmälert die unzureichende Vermittlung des Gens auf die Tumorzellen durch die verwendeten Vektoren bisher den therapeutischen Erfolg (Rainov *et al.*, 2000). Neue Vektoren, die insbesondere auch infiltrierende Tumorzellen erreichen, sind daher für einen Therapieerfolg erforderlich. Mit der Entdeckung migratorischer tumortropher Stammzellen aus adultem Gewebe wurden neue potentielle Vehikel gefunden, um therapierelevante Enzyme am Tumor zu produzieren. Auf diese Zellen soll im nächsten Kapitel eingegangen werden.

### **1.3. Stammzellen**

Trotz der sehr dynamischen Entwicklung auf dem Gebiet der Stammzellenforschung wird der Begriff „Stammzelle“ üblicherweise mit zwei definierenden Eigenschaften verbunden: Der Fähigkeit einer Zelle zur Selbsterneuerung, sowie der Fähigkeit, sich zu spezialisierten Zelltypen zu differenzieren. Die Selbsterneuerung bezeichnet dabei die Eigenschaft, durch Teilung eine mit der Mutterzelle identische Tochterzelle hervorzubringen. Das Differenzierungspotential beschreibt die Fähigkeit der Zelle, verschiedene funktionale Zelltypen eines multizellulären Organismus zu bilden. Anhand letzterer Eigenschaft, der Differenzierung zu funktionalen Zellen, ist eine Klassifizierung der Stammzellen möglich.

Die Stammzelle mit dem größten Differenzierungspotential ist dabei die befruchtete Eizelle, die Zygote. Sie bildet die Quelle aller Zelltypen des Embryos, sowie der Zellen der extraembryonalen Membranen und wird daher als „totipotent“ bezeichnet. Die „pluripotenten“ Stammzellen der inneren Zellmasse des Embryos (Epiblast, Hypoblast) hingegen besitzen bereits ein eingeschränktes Differenzierungspotential. Sie können sich während der Embryonalentwicklung zu den Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entwickeln. Die weitere Differenzierung der Zellen kann nun nur noch innerhalb der jeweiligen ektodermalen, mesodermalen oder endodermalen Grenze erfolgen, weshalb die Stammzellen der Keimblätter nun als „multipotent“ bezeichnet werden. In den folgenden Entwicklungsstadien nimmt mit zunehmender Spezifizierung die Plastizität der Zellen weiter ab. „Tri-, bi- und unipotente“ Stammzellen gehen nun der endgültig differenzierten Zelle voraus (Young und Black, 2004). Das zunehmend eingeschränkte Entwicklungspotential der Stammzellen wird ausgehend von der totipotenten Zygote wahrscheinlich durch fortwährende asymmetrische Zellteilung der Stammzellen erzeugt. Die dadurch verursachte Ungleichverteilung von zellulären Regulationsfaktoren führt dabei einerseits zum Erhalt der

Stammzelle (Selbsterneuerung) und andererseits zu einer zweiten, stärker differenzierten Tochterzelle (Betschinger und Knoblich, 2004).

### 1.3.1. Adulte Stammzellen

Die kontinuierliche Bereitstellung spezialisierter Zellen im adulten Organismus bedarf eines regenerativen Zellreservoirs in den verschiedenen Geweben und Organen. Dieses Zellreservoir wird im Organismus durch adulte Stammzellen gebildet. Adulte Stammzellen besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können darüber hinaus zu verschiedenen funktionalen Zellen differenzieren. Es wird angenommen, dass jedes Gewebe und/oder Organ des adulten Organismus seine spezifische Stammzell-Quelle besitzt. In der Tat wurden Stammzellen unter anderem in Muskel (Mauro *et al.*, 1961), Bindegewebe (Cruess, 1982), Knochenmark (Owen und Friedstein, 1988), Fettgewebe (Ailhaud *et al.*, 1992), neuralem Gewebe (Gage *et al.*, 1995) und epidermale Gewebe (Janes *et al.*, 2002) gefunden.

Aufgrund ihres unterschiedlichen Differenzierungspotentials können adulte Stammzellen dabei in drei Kategorien eingeteilt werden (Young *et al.*, 2005). Pluripotente adulte Stammzellen können zu Zelltypen aus allen drei Keimblättern differenzieren. Sie werden daher als Epiblast-ähnliche Stammzellen bezeichnet (*Epiblast-like stem cells*, ELSC). Epiblast-ähnliche Stammzellen finden sich bei höheren Säugern unter anderem in Muskelgewebe, Hirn, Knochenmark und Bindegewebe (Jiang *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2004). Adulte Stammzellen der zweiten Kategorie, sogenannte multipotente Keimblatt-Stammzellen, haben ein eingeschränktes Differenzierungspotential innerhalb eines spezifischen embryonalen Keimblattes. Sie differenzieren nicht zu Zelltypen außerhalb ihres ursprünglichen Keimblattes und werden dementsprechend in endodermale, mesodermale und ektodermale Keimblatt-Stammzellen eingeteilt. Diese können anhand spezifischer Marker-Proteine unterschieden werden (Nestin für ektodermale Stammzellen, Desmin für mesodermale Stammzellen und  $\alpha$ -Fetoprotein für endodermale Stammzellen) (Vourc'h *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004). Die dritte Kategorie adulter Stammzellen umfasst die sogenannten Vorläuferzellen. Diese sind in ihrem Differenzierungspotential auf ein bestimmtes Gewebe festgelegt und bilden nur die Zelltypen des jeweiligen Gewebes. Dementsprechend gibt es multi-, tri-, bi-, und unipotente Vorläuferzellen, je nach Anzahl differenzierter Zelltypen, die gebildet werden können. Vorläuferzellen finden sich in nahezu jedem Gewebe des adulten Organismus. Sie können anhand spezifischer Oberflächenmarker (*cluster of differentiation*, CD) unterschieden werden. So lassen sich beispielsweise die beiden Stammzelltypen des Knochenmarks, hämatopoetische Stammzellen und mesenchymale Stammzellen, durch ihr

unterschiedliches Expressionsmusters der Marker CD34, CD43, CD73, CD90 und CD105 identifizieren (Dominici *et al.*, 2006).

Bezüglich des Differenzierungspotentials von Vorläuferzellen wird die Theorie der Transdifferenzierung kontrovers diskutiert. Nach dieser Theorie können gewebspezifische Vorläuferzellen *in vitro* dedifferenzieren und, bei entsprechender Induktion, gewebspezifische Zellen anderer Keimblätter hervorbringen. So wurde beispielsweise von der Bildung neural-spezifischer Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks berichtet (Woodbury *et al.*, 2002) oder von der Bildung von Muskelzellen aus Vorläuferzellen neuralen Gewebes (Clarke *et al.*, 2000). Diese Phänomene müssen jedoch nicht zwangsläufig auf ein „Umprogrammieren“ der Vorläuferzelle zurückzuführen sein, sie könnten vielmehr durch die Kontamination mit pluripotenten oder multipotenten adulten Stammzellen oder mit Vorläuferzellen anderer Gewebe verursacht worden sein. Diese Kontamination könnte schon bei der Isolierung der Zielzellen aus dem entsprechenden Gewebe stattgefunden haben (Young und Black, 2004).

### 1.3.2. Tumortropismus adulter Stammzellen

Die Beobachtung tumorgerichteter Zellmigration *in vivo* hat verschiedene Typen adulter Stammzellen in den Fokus neuer therapeutischer Ansätze gerückt. Diese betrifft vor allem neurale Stammzellen (NSC) und mesenchymale Stamm- oder Stromazellen (MSC). So wurde gezeigt, dass neurale Stammzellen nach intrakranieller oder intravaskulärer Verabreichung zielgerichtet zu experimentellen Hirntumoren wandern. Die Tumoren wurden von den Zellen umgeben und einzelne, infiltrierende Tumorzellen von den Stammzellen erreicht (Aboody *et al.*, 2000). Ähnlich wie NSC konnten auch MSC nach intravaskulärer Verabreichung zu experimentellen Hirntumoren wandern (Nakamizo *et al.*, 2005). Tumortrophe Eigenschaften bezüglich Hirntumoren wurden darüber hinaus für hämatopoetische Stammzellen und epitheliale Stammzellen berichtet (Tabatabai *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2004).

Als stimulierende Faktoren für eine tumorgerichtete Migration der Zellen wurden verschiedene Wachstumsfaktoren und Chemokine identifiziert. Die Migration neuraler Stammzellen *in vitro* konnte durch das Signalmolekül *scatter factor/hepatocyte growth factor* (SF/HGF) stimuliert werden (Heese *et al.*, 2005). Dieser Wachstumsfaktor wurde in Gliomen nachgewiesen (Lamszus *et al.*, 2004). *In vivo* konnte die Migration von NSC durch den *vaskular endothelial growth factor* (VEGF) stimuliert werden (Schmidt *et al.*, 2005). VEGF wird im Kontext der Vaskularisation ebenfalls in Gliomen produziert. Als weiterer migrationsstimulierender Faktor für NSC wurde der *stromal cell derived factor 1* (SDF-1) identifiziert (Imitola *et al.*, 2004). Die Blockierung des von NSC exprimierten SDF1-Rezeptors, CXCR4, führte zur Inhibition tumorgerichteter Migration der NSC bei experimentellen Hirntumoren *in vivo* (Ehtesham *et al.*, 2004). Daneben wurde der Einfluss des *monocyte*

*chemoattractant protein-1* (MCP-1) auf die NSC-Migration nachgewiesen. Die Expression dieses Chemokins wird in Tumorzellen durch den *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) induziert (Widera *et al.*, 2004).

Faktoren, welche die Migration neuraler Stammzellen stimulierten, konnten auch die Migration mesenchymaler Stammzellen induzieren. So wurde VEGF als migrationsstimulierender Faktor für MSC *in vitro* identifiziert (Schichor *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden die Faktoren SDF-1 und MCP-1 ebenfalls mit einem gesteigerten Tumortropismus von MSC *in vitro* in Zusammenhang gebracht (Menon *et al.*, 2007).

Da die vorliegende Arbeit auf der Verwendung neuraler Stammzellen und mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark beruht, werde diese Zelltypen, sowie ihr potentieller therapeutischer Nutzen, im Folgenden näher beschrieben.

### 1.3.3. Neurale Stammzellen - NSC

Neurale Stammzellen (*neural stem cells*, NSC) wurden 1992 erstmals von Reynolds und Weiss aus der Subventrikularzone adulter Mäuse isoliert. In serumfreiem Medium und in Anwesenheit des *epidermal growth factor* (EGF) wuchsen Sphären undifferenzierter Zellen, welche ein Intermediärfilament neuroepithelialer Stammzellen, Nestin, exprimierten. Diese Sphären wurden als Neurosphären bezeichnet, die Zellen der Neurosphären hatten proliferative Eigenschaften und konnten zu Neuronen und Astrozyten differenzieren (Reynolds und Weiss, 1992). Die Isolation ähnlich proliferativer Zellen aus dem Nager-ZNS, welche sich zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren konnten, wurde im Folgenden auch von anderen beschrieben (Gage *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1997; Gritti *et al.*, 1999). Mittlerweile wurden neurale Stammzellen auch aus dem Hippocampus und dem Rückenmark isoliert (Palmer *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1996).

Aboody und andere konnten erstmals das migratoische Potential der NSC zu experimentellen Hirntumoren nachweisen (Aboody *et al.*, 2000). Besonders bemerkenswert war dabei die Feststellung, dass NSC einzelnen invadierenden Tumorzellen „folgen“ können. Der therapeutische Nutzen dieses ausgeprägten Tumortropismus wurde durch den Transfer verschiedener therapeutischer Gene auf NSC nachgewiesen. So konnte durch migratorische NSC das Prodrug-aktivierende Enzym Cytosindeaminase zu experimentellen Hirntumoren transportiert werden. Die folgende Aktivierung der Prodrug 5-Fluoro-Cytosin durch die am Tumor exprimierte Carboxylesterase resultierte in einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens (Brown *et al.*, 2003; Barresi *et al.*, 2003). Durch ähnliche Verwendung des HSVtk/Ganciclovir-Enzym/Prodrug-Systems konnte das Überleben tumortragender Mäuse

gesteigert werden. Hierbei wurden NSC eingesetzt, welche die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase exprimierten. Diese kann die Prodrug Ganciclovir aktivieren (Li *et al.*, 2005)

Ein ebenfalls gesteigertes Überleben hirntumortragender Mäuse konnte durch NSC nach Behandlung mit der Prodrug CPT-11 erreicht werden. Die verabreichten neuralen Stammzellen enthielten hierbei die kodierende Sequenz für das CPT-11-aktivierende Enzym, die *rabbit*-Carboxylesterase (rCE) (Danks *et al.*, 2007).

Cytokin-exprimierende NSC wurden ebenfalls zur Behandlung experimenteller Hirntumoren in Tierversuchen erfolgreich eingesetzt. So konnte die Verwendung Interleukin-4-exprimierender NSC, zu einem gesteigerten Überleben führen. Bei Interleukin-4 handelt es sich um ein immunstimulierendes Cytokin (Benedetti *et al.*, 2000). Interleukin-12 produzierende NSC erzielten einen ähnlichen Effekt. Die lokale Expression dieses Cytokins führte zu T-Zell-Aggregationen in der Haupttumormasse und an Tumorsatelliten (Ehtesam *et al.*, 2002). Die Vermittlung des *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) durch entsprechend modifizierte NSC resultierte ebenfalls in reduziertem Tumorwachstum (Ehtesam *et al.*, 2002b; Shah *et al.*, 2004). Genetisch modifizierte neurale Stammzellen können also als Vehikel benutzt werden, um therapeutisch aktive Moleküle an Hirntumoren umzusetzen bzw. um therapeutisch wirksame Proteine am Tumor zu produzieren.

#### **1.3.4. Mesenchymale Stammzellen/Stromazellen - MSC**

Nicht-hämatopoetische Stromazellen wurden von Friedenstein und anderen erstmals aus murinem Knochenmark isoliert. Diese spindelförmigen Zellen adhärten auf der Plastikoberfläche von Kulturgefäßen und proliferierten zu distinkten Kolonien, weshalb sie als *colony forming unit-fibroblasts* (CFU-F) bezeichnet wurden. Ferner differenzierten die Zellen *in vitro* zu Osteoblasten und Chondrozyten (Friedenstein *et al.*, 1974; 1976). Die Differenzierung koloniebildender Zellen des humanen adulten Knochenmarks zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten unter bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* konnte 1999 von Pittenger und anderen gezeigt werden (Pittenger *et al.*, 1999). Von einem Differenzierungspotential dieser Zellen zu nicht-mesenchymalen Zelltypen, z.B. Kardiomyozyten oder Neuronen-ähnlichen Zellen, wurde ebenfalls berichtet (Makino *et al.*, 1999; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000).

In der Literatur werden zur Beschreibung differenzierbarer mesenchymaler Zellen aus Knochenmark sowohl die Begriffe „mesenchymale Stammzellen“ als auch „mesenchymale Stromazellen“ verwendet. Beide Begriffe werden mit dem Akronym „MSC“ abgekürzt. Die uneinheitliche Definition der Zellen, sowie die Beschreibung weiterer Subtypen von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark (Colter *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002),

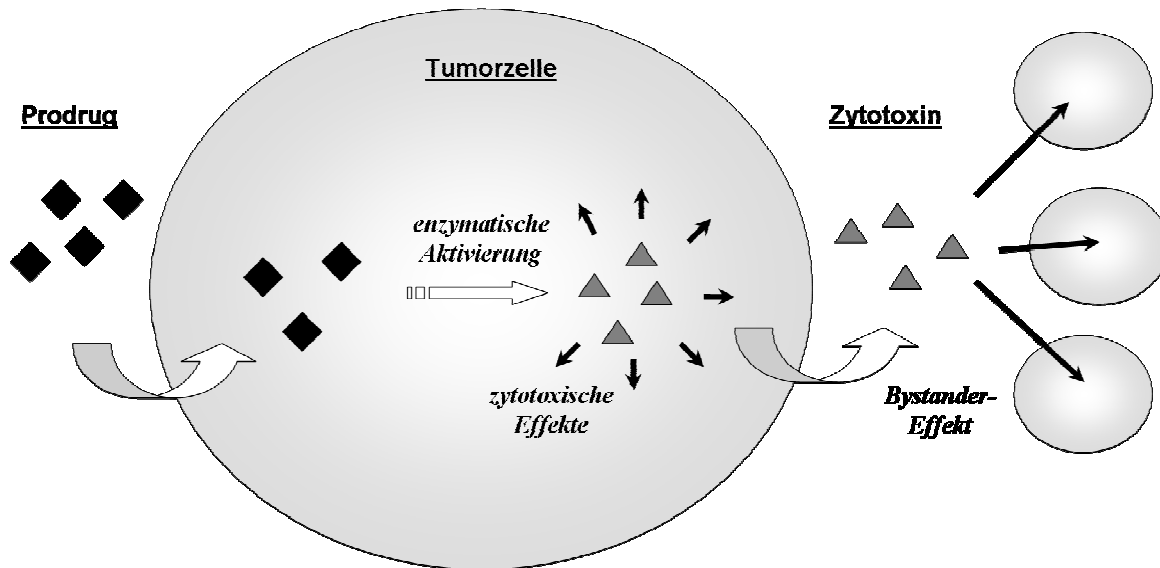
machten die Notwendigkeit einer klaren Nomenklatur deutlich. In einem Positionspapier der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) wurden „multipotente mesenchymale Stromazellen“ mit der Abkürzung MSC nach folgenden Kriterien definiert: Die Zellen müssen unter Standardzellkulturbedingungen plastikadhärent sein; sie müssen die Marker CD105, CD73 und CD90 exprimieren, hingegen dürfen die Marker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR nicht vorhanden sein; die Zellen müssen *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren (Dominici *et al.*, 2006). Ferner wurde bei der Nomenklatur der Tatsache Rechnung getragen, dass MSC auch aus anderem Gewebe als Knochenmark, z.B. Fettgewebe (Zuk *et al.*, 2002), isoliert werden können. Die in dieser Arbeit verwendete Abkürzung BMSC beschreibt demnach mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*).

Die migratorischen Eigenschaften humaner BMSC zu experimentellen Hirntumoren *in vivo* konnte 2005 von Nakamizo und anderen gezeigt werden. In diesem Zusammenhang gelang auch die Vermittlung des rekombinanten therapeutischen Proteins Interferon- $\beta$  durch entsprechend modifizierte Zellen. Dadurch konnte ein gesteigertes Überleben der Versuchstiere beobachtet werden (Nakamizo *et al.*, 2005). Eine Immunantwort gegen experimentelle Hirntumoren wurde des Weiteren von IL23-exprimierenden migratorischen Knochenmarkszellen hervorgerufen (Yuan *et al.*, 2006). Interleukin-2 produzierende migratorische Nager-MSCs konnten das Überleben von hirntumortragenden Versuchstieren ebenfalls verlängern (Nakamura *et al.*, 2004). Die mögliche Verwendung von MSC zur Vermittlung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Tumoren wurde ebenfalls gezeigt. MSC mit der kodierenden Sequenz für die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase konnten in Kombination mit der Prodrug Ganciclovir *in vitro* Tumorzellen aus Ovarien abtöten (Pereboeva *et al.*, 2003). Wie migratorische NSCs können BMSC also zur Vermittlung therapierelevanter Proteine genutzt werden.

#### **1.4. Das Konzept der Enzym/Prodrug-Gentherapie**

In der Behandlung von Tumoren wird eine möglichst vollständige Entfernung der Tumorzellen angestrebt, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören. Eine Möglichkeit, die Wirkung zytotoxischer Agenzien lokal auf den Tumor zu beschränken, bietet das Konzept der Enzym/Prodrug-Gentherapie. Dabei wird in die Tumorzellen die kodierende Sequenz eines Enzyms eingebracht, welches ein inaktives Vorläuferzytotoxin (Prodrug) in die aktive zytotoxische Form überführen kann. Das somit von der Tumorzelle selbst aktivierte Therapeutikum führt zur Zerstörung der Zelle. Darüber hinaus kann das aktive Zytotoxin auch die Tumorzelle verlassen und auf benachbarte Tumorzellen wirken, die selbst nicht das aktivierende Enzym produzieren. Dieser für die Enzym/Prodrug-Gentherapie wichtige

Vorgang wird als „Bystander“-Effekt bezeichnet (Abbildung 1.2). Da die zytotoxischen Effekte auf die Umgebung der Prodrug-aktivierenden Zellen beschränkt bleiben und die verwendeten Toxine zudem tumorzellenspezifisch wirken, wird der zytotoxische Einfluss auf gesundes Gewebe minimiert.



**Abbildung 1.1:** Schema einer Enzym/Prodrug-Gentherapie. Die systemisch verabreichte Prodrug wird in den genetisch modifizierten Tumorzellen enzymatisch aktiviert. Sie entfaltet ihre zytotoxische Wirkung sowohl auf die produzierende Tumorzelle selbst, als auch, durch den „Bystander“-Effekt, auf benachbarte Tumorzellen.

Das klinisch am Besten charakterisierte Enzym/Prodrug-System ist das Herpes-Simplex-Virus-Typ1-Thymidinkinase/Ganciclovir-System (HSV1-TK/GCV). Diese Therapieform wurde und wird bereits in klinischen Studien der Phase 3 gegen Glioblastome untersucht ([www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical](http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical)). Bei der verwendeten Prodrug Ganciclovir handelt es sich um ein Analogon von 2-Desoxyguanosin. Die HSV1-Thymidinkinase phosphoryliert diese azyklische Form des Nukleotids, welche dann in der Zelle von endogenen Kinasen zu dem entsprechenden Triphosphat weiter phosphoryliert wird. Somit konkurriert es mit zelleigenem Guanosin-Triphosphat während der DNA-Elongation in der S-Phase des Zellzyklus. Dies führt zur Inhibition der DNA-Polymerase und Einzelstrangbrüchen (Moolten, 1986). Von dem zytotoxischen Effekt sind nicht nur Zellen mit aktiver Thymidinkinase betroffen, sondern auch Zellen ohne das aktivierende Enzym, wodurch ein „Bystander“-Effekt gegeben ist (Freeman *et al.*, 1993). Da die Wirkung jedoch S-Phasen spezifisch ist, können nur sich aktiv teilende Zellen angegangen werden. Somit werden z.B. invadierende Gliomzellen mit reduzierter Proliferation nicht erreicht. In der Tat zeigte eine bereits abgeschlossene klinische Studie mit diesem System ernüchternde Resultate. Die Behandlung von Glioblastompatienten mit HSV1-

TK/GCV zusätzlich zu der Standardtherapie (Resektion, Bestrahlung) führte zu keinem zusätzlichen therapeutischen Erfolg. Als Ursachen wurden unter anderem der mangelhafte Gentransfer auf die Tumorzellen durch retrovirale Vektoren und der Einsatz nichtmigratorische Fibroblasten als Lieferanten retroviraler Partikel in Betracht gezogen (Rainov, 2000).

Ein weiteres, bereits klinisch untersuchtes Enzym/Prodrug-System ist das Cytosin-Deaminase/5-Fluorocytosin-System (CD/5-FC). Hierbei wird die nichttoxische Prodrug 5-Fluorocytosin von der *E. coli*-Cytosin-Deaminase zu dem zytotoxischen 5-Fluorouracil umgesetzt (Mullen *et al.*, 1992). 5-Fluorouracil wird dann intrazellulär entweder zu 5-Fluorouracil-Triphosphat oder 5-Fluoro-2-Desoxyuridin-5-Monophosphat weiter prozessiert. 5-Fluorouracil-Triphosphat verhindert nach Einbau in die DNA die korrekte Produktion von ribosomaler RNA und mRNA. 5-Fluoro-2-Desoxyuridin-5-Monophosphat inhibiert die zelleigenen Thymidilat-Synthase irreversibel, wodurch die DNA-Synthese gestört wird (Greco *et al.*, 2001). Ein „Bystander“-Effekt des Systems wird dadurch ermöglicht, dass 5-Fluorouracil die Zellmembran passieren und in umgebende Zellen eindringen kann (Lawrence *et al.*, 1998). Die Sicherheit des CD/5-FC-Systems konnte in klinischen Studien bereits gezeigt werden, wobei allerdings kein therapeutischer Effekt beobachtet wurde (Freytag *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2001).

Inzwischen sind eine Reihe weiterer wirksamer Enzym/Prodrug-Kombinationen bekannt und werden untersucht. Zwei davon, welche in dieser Arbeit verwendet werden, das Carboxylesterase/CPT-11-System und das *E. coli*-Purin-Nukleosid-Phosphorylase/Prodrug-System, werden im Folgenden näher beschrieben.

#### **1.4.1. Das Carboxylesterase/CPT-11-Enzym/Prodrug-System**

Eine klinisch eingesetzte Prodrug zur Behandlung verschiedener Krebsarten (u.a. Zervixkarzinom, kolorektales Adenokarzinom und Bronchalkarzinom) ist CPT-11 (Irinotecan, 7-Ethyl-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) (Slichenmyer *et al.*, 1993). CPT-11 wird von körpereigenen Carboxylesterasen zu SN-38 (7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin) umgesetzt, einem wirksamen Topoisomerasehemmer (Rivory *et al.*, 1995). Die Interaktion von SN38 mit dem kovalenten DNA-Topoisomerase I Komplex in der S-Phase des Zellzyklus, führt zu einer Arretierung der Replikationsgabel. Durch die dadurch induzierte Unterbrechung der DNA-Synthese kommt es zur Akkumulation unvollständig synthetisierter DNA-Doppelstränge und zu Doppelstrangbrüchen, was schließlich zum Zelltod führt (Tanizawa *et al.*, 1994).

Die Umsetzung von CPT-11 zu SN-38 erfolgt im Menschen jedoch nur unvollständig. Obwohl bereits Minuten nach CPT-11-Gabe SN-38 im Plasma von Patienten detektiert



werden kann, werden effektiv nur ca. 10 % des verabreichten CPT-11 zu SN-38 prozessiert (Gupta *et al.*, 1997; Rivory *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu humanen Carboxylesterasen hat die Carboxylesterase aus Kaninchen (*rabbit* Carboxylesterase, rCE) eine etwa 100- bis 1000-fach höhere katalytische Aktivität bezüglich der Umsetzung von CPT-11 (Potter *et al.*, 1998). Zudem reagierten rCE-transfizierte humane Tumorzellen 12- bis 55-fach sensitiver auf CPT-11 als Leervektor-transfizierte Tumorzellen (Danks *et al.*, 1998). Weiter Untersuchungen *in vivo* zeigten ein gesteigertes Überleben von Mäusen mit experimentellen Hirntumoren, die von rCE-transfizierten Tumorzellen hervorgingen, im Vergleich zu Tumorzellen mit zusätzlich überexprimierter humaner CE nach CPT-11 Behandlung (Danks *et al.*, 1999).

In einer aktuellen Studie wurde das CE/CPT-11-System gegen in verschiedenen Organen lokalisierte experimentelle Tumoren aus Neuroblastomzellen unter Einbeziehung migratorischer Stammzellen untersucht. Dabei exprimierten immortalisierte humane embryonale Stammzellen aus dem Telencephalon eine modifizierte Form der rCE. Dem Enzym fehlten die sechs carboxyterminalen Aminosäuren, welche ein zytoplasmatisches Retentionssignal darstellen (Potter *et al.*, 1998). Die von den tumortropen Stammzellen exprimierte Carboxylesterase konnte die Prodrug CPT-11 an den Tumoren aktivieren, was in einem signifikant gesteigerten Langzeitüberleben von 90 % der Versuchstiere resultierte (Danks *et al.*, 2007). Somit kann dieses Enzym/Prodrug-System, auch unter Verwendung migratorischer Stammzellen als Enzym-Transporter, therapeutisch genutzt werden.

#### 1.4.2. Das *E. coli*-Purin-Nukleosid-Phosphorylase/Prodrug-System

Purin-Nukleosid-Phosphorylasen (EC 2.4.2.1; PNP) katalysieren die reversible phosphorolytische Spaltung der glykosidischen Bindung von Purin-Nukleosiden zu Ribose-1-Phosphat und der freien Purin-Base:



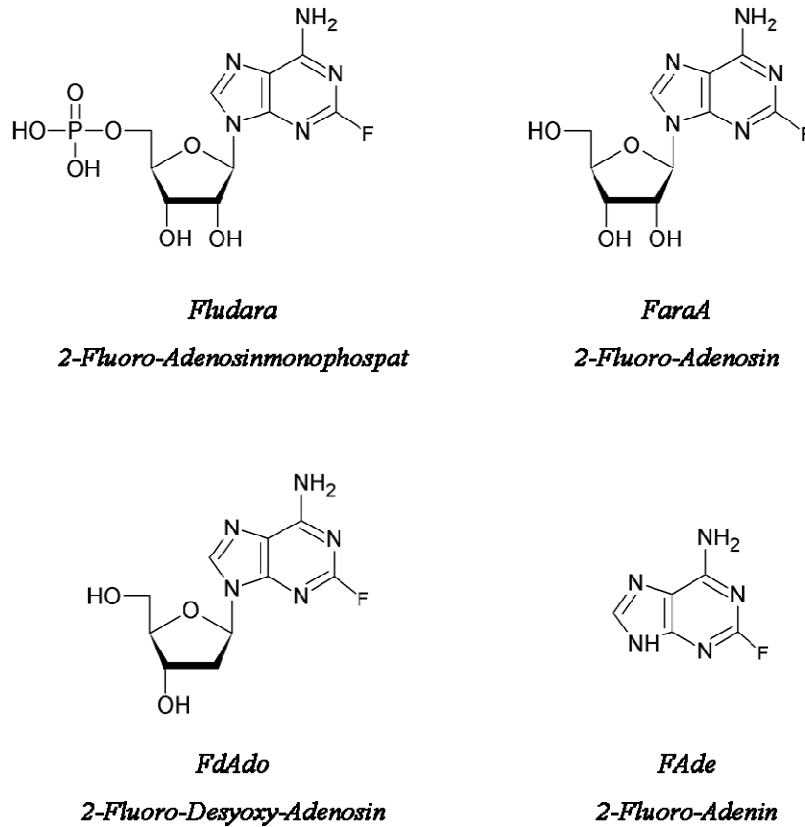
Während die trimeren Enzyme höherer Säuger präferentiell 6-Oxopurin-Nukleoside (also Guanosin-Analoga) als Substrate nutzen, katalysieren die hexameren PNPs niedriger Organismen, also auch die *E. coli*-PNP, ebenfalls 6-Aminopurin-Nukleoside (Adenosin-Analoga) (Mao, 1995; Mao *et al.*, 1997). Durch diese Unterschiede in der Substratspezifität können modifizierte Adenosin-Analoga als Prodrugs in Kombination mit der *E. coli*-Purin-Nukleosid-Phosphorylase für eine Enzym/Prodrug-Gentherapie genutzt werden. Die Prodrugs werden nur von der *E. coli*-PNP umgesetzt, nicht jedoch von der, ebenfalls in den Zellen vorhandenen, Säuger-PNP.

In ersten Versuchen wurde als Prodrug 6-Methylpurin-Desoxyribosid (MEP) verwendet, welches von der *E. coli*-PNP zu 6-Methylpurin umgesetzt wird. Die Expression der *E. coli*-PNP in Tumorzellen erhöhte deren Sensitivität gegenüber MEP. Darüber hinaus wurde ein äußerst hoher „Bystander“-Effekt beobachtet. So führte die Expression von PNP in weniger als 1 % der Zellen einer Kultur zum Tod fast aller übrigen Zellen nach MEP-Behandlung (Sorscher *et al.*, 1993). Ein fluoriertes Adenosin-Analogon, Fludara (Arabinofuranosyl-2-Fluoroadenin-Monophosphat), welches bereits bei Leukämie-Erkrankungen klinisch eingesetzt wird (Elliott *et al.*, 1999), konnte ebenfalls als Prodrug verwendet werden. In Experimenten mit subkutanen, PNP-exprimierenden Tumoren aus einer humanen Gliomzelllinie zeigte sowohl MEP als auch Fludara signifikante Wirkung (Parker *et al.*, 1997). Fludara wird von der PNP zu Fluoro-Adenin (FAde) umgesetzt.

Nach der Umsetzung durch PNP werden die Purin-Basen 6-Methylpurin und Fade auf die gleiche Weise intrazellulär prozessiert. Beide werden von der zelleigenen Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) zu den entsprechenden Adenin-Nukleotiden aktiviert und in die zelluläre RNA und DNA eingebaut. Die Modifikationen der Basen stören dabei die RNA-Synthese und somit auch die Proteinsynthese, was nach einigen Tagen zum Zelltod führt (Parker *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu anderen Enzym/Prodrug-Systemen beruht der Mechanismus des PNP/Prodrug-Systems also nicht auf der Störung der DNA-Replikation, vielmehr wird die zelluläre Stoffwechselaktivität durch Inhibition der Proteinsynthese angegriffen. Somit werden sowohl proliferierende Zellen, als auch nicht-proliferierende Zellen erreicht. Entsprechend konnte die Wirksamkeit des Systems explizit gegen langsam wachsende Tumorzellen (Verdopplungszeit > 15 Tage) nachgewiesen werden (Gadi *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigten *in vivo* Experimente mit einer humanen Glioblastomzelllinie die bessere Wirksamkeit des PNP/MEP-Systems gegenüber der gleichen Therapie mit HSV-1-TK und Ganciclovir (Heinkelein *et al.*, 2005).

Der „Bystander“-Effekt des PNP/Prodrug-Systems beruht auf der Membrangängigkeit der von PNP produzierten Basen. Während die Prodrugs über Nukleosidtransporter in die Zellen transportiert werden (Makey *et al.*, 1998), diffundieren die in der Zelle produzierten Purin-Basen entlang eines Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran nach außen. Direkter Zell-Zell-Kontakt ist für den Austausch zytotoxischer Metaboliten, im Gegensatz zum HSV-1-TK/GCV-System nicht erforderlich (Huges *et al.*, 1998). Die Effektivität dieses „Bystander“-Effektes konnte anhand experimenteller subkutaner Tumore aus Glioblastomzelllinien *in vivo* gezeigt werden. So reichte die PNP-Expression in 2,5 bis 5 % der injizierten Tumorzellen aus, um das Tumorwachstum signifikant zu hemmen. 10 % PNP-exprimierender Tumorzellen führten zu einer vollständigen Reduktion der Tumoren in einem Drittel der behandelten Tiere (Hong *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird die Durchführbarkeit einer PNP/Prodrug-Gentherapie mit verschiedenen fluorierten Adenosinanaloga untersucht. Dabei handelt es sich um Fludarabin, FaraA und FdAdo (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.2:** Strukturformel der PNP-Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo. Fludara wird im Serum zu FaraA dephosphoryliert. FdAdo unterscheidet sich zu FaraA im Fehlen einer Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose. FaraA und FdAdo werden von der *E. coli*-PNP zu FAde umgesetzt.

Wie schon erwähnt, wird Fludara bereits klinisch eingesetzt (Elliott *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist Fludara als Prodrug für PNP identifiziert und konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgreich gegen Tumorzellen verwendet werden (Parker *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2004). Fludara wird im Serum zu FaraA dephosphoryliert und intrazellulär durch die zelleigene Desoxycytidin-Kinase zum aktiven Triphosphat 2-Fluoro-ATP phosphoryliert. Dieser Metabolit inhibiert die DNA-Synthese (Produktinformation Fludara, Bayer-HealthCare, 2007). In Zellen mit aktiver *E. coli*-PNP wird FaraA jedoch zu 2-Fluoro-Adenin (FAde) umgesetzt, welches, entsprechend weiter prozessiert, die RNA- und Protein-Synthese stört. In dieser Arbeit werden sowohl Fludara als auch FaraA eingesetzt, da die Dephosphorylierung von Fludara zu FaraA *in vitro* nicht gewährleistet ist.

Im Gegensatz zu FaraA handelt es sich bei FdAdo um das entsprechende Desoxy-Adenosin. Wie FaraA wird es von der *E. coli*-PNP zu FAde umgesetzt. Allerdings ist FdAdo im Gegensatz zu FaraA ein viel besseres Substrat für die *E. coli*-PNP. Der  $K_m$ -Wert für FaraA beträgt 960  $\mu\text{M}$  gegenüber 22  $\mu\text{M}$  für FdAdo (Parker *et al.*, 2003). Im Rahmen von *in vivo*-Studien wurde FdAdo bereits als Prodrug gegen Tumoren aus Glioblastomzellen erfolgreich getestet. Allerdings wurde von einer sehr geringen Plasma-Halbwertszeit von FdAdo gegenüber FaraA berichtet (ca. 7 min (FdAdo) bzw. ca. 50 min (FaraA)) (Parker *et al.*, 2003). Dennoch kommen sowohl Fludara bzw. FaraA und FdAdo als potentielle Prodrugs für eine PNP/Prodrug-Gentherapie in Frage.

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Vermittlung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Hirntumoren durch migratorische murine neurale Stammzellen (mNSC) und murine mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark (mBMSC). In diesem Zusammenhang sollten verschiedene Fragestellungen behandelt werden:

- Aus neuralem Gewebe bzw. Knochenmark isolierte mNSC und mBMSC sollten anhand ihrer definierenden Eigenschaften charakterisiert werden. Dies geschah mit mNSC anhand ihres Differenzierungsverhaltens, mit mBMSC anhand ihres spezifischen Expressionsprofils bestimmter Marker.
- Sowohl mNSC als auch mBMSC sollten zur Expression von Transgenen retroviral transduziert werden. Die retrovirale Transduktion der Zellen wurde mit einem in dieser Arbeit hergestellten EGFP-Expressionsvektor etabliert.
- Zur Untersuchung des rCE/CPT-11 Enzym/Prodrug-Systems sollten verschiedene rCE-Expressionsvektoren zur retroviralen Transduktion hergestellt werden. Das rCE/CPT-11-System sollte zunächst mit mNSC etabliert werden. Dazu wurde die rCE-Expression, von verschiedenen Transgen-Sequenzen ausgehend, mittels Aktivitätstest bestätigt und die Effektivität des CPT-11 Umsatzes in einem Kokultur-Experiment untersucht. Da in diesem Experiment kein CPT-11 Umsatz zu beobachten war, sollte die Expression der rCE in mNSC näher quantifiziert werden.
- Zur Untersuchung des *E. coli*-PNP/Prodrug-Systems sollte ein Expressionsvektor mit der kodierenden Sequenz *deoD* konstruiert werden. Mit diesem waren mNSC und mBMSC retroviral zu transduzieren. Die Integration der Sequenz in das Wirtsgenom wurde mittels PCR mit genomischer DNA als Matrize nachgewiesen. Die Expression des Gens wurde durch den Nachweis des Transkriptes mittels RT-PCR, die PNP-Aktivität im Zelllysate mittels Aktivitätstest festgestellt.

- 
- Vor der Verwendung im Zusammenhang mit Tumorzellen sollte die dosisabhängige Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-produzierende mNSC und mBMSC untersucht werden.
  - Die Vermittlung von „Bystander“-Effekten auf verschiedene Tumorzelllinien sollte initial durch die Verwendung von mNSC- bzw. mBMSC-konditioniertem Medium untersucht werden. Die in diesem Medium vorhandenen Prodrugs wurden von den PNP-produzierenden Zellen umgesetzt. Dieses Medium wurde dann zur Abtötung von Tumorzellen durch einen „Bystander“-Effekt verwendet.
  - Die bei der Verwendung des konditionierten Mediums beobachteten „Bystander“-Effekte sollten in Kokultur-Versuchen näher charakterisiert werden. Dabei wurde zunächst die Abhängigkeit des Effektes von der Prodrug-Konzentration ermittelt. Dann war die Abhängigkeit von der Zahl der Prodrug umsetzenden Zellen zu untersuchen, was eine quantitative Einordnung des „Bystander“-Effektes ermöglichte.
  - Schließlich sollte die zielgerichtete Migration von mNSC und mBMSC zu experimentellen Hirntumoren anhand eines syngenen Tumormodells in Mäusen nachgewiesen werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden murine Stammzellen aus neuralem Gewebe und Knochenmark (mNSC und mBMSC) verwendet. Diese wurden im Labor für Hirntumorbiologie isoliert, kultiviert und charakterisiert.

Zur Herstellung retroviraler Partikel wurden BD RetroPack™ PT67-Zellen von BD Biosciences (Heidelberg) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Modifikation der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3. Im Genom von PT67-Zellen sind die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* integriert. In Kombination mit dem Vektor pMSCV (BD Biosciences, Heidelberg) produzierten diese Zellen retrovirale Partikel (siehe Kapitel 2.1.12). Retroviral transduzierte Zellen wurden mittels der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 (Labor für Hirntumorbiologie) auf die Produktion infektiöser Partikel getestet.

In dieser Arbeit verwendete Tumorzelllinien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Tumorzelllinien.

<i>Zelllinie</i>	<i>Spezies</i>	<i>Histologische Herkunft</i>	<i>Quelle</i>
GL261	Maus	Gliom	Nils-Ole Schmidt
U87-MG	Mensch	Glioblastom	Nils-Ole Schmidt
U251-MG	Mensch	Glioblastom	Wolfgang Hamel
G55T2	Mensch	Glioblastom	Neurochirurgie, UKE

#### 2.1.2. Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien ist im Folgenden angegeben. Alle Kulturmedien enthielten 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B. Sämtliche Medien und Zellkulturzusätze wurden von Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Die bei der Kultivierung von mNSC eingesetzten Wachstumsfaktoren h-bFGF und h-EGF wurden rekombinant hergestellt (Preprotech, Hamburg).

<u>Gliomzelllinien, PT67, NIH3T3:</u>	10 % FCS 1 mM Natriumpyruvat in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
<u>Murine neurale Stammzellen (mNSC):</u>	2 % B-27 Supplement 2 mM L-Glutaminsäure 20 ng/ml h-bFGF 25 ng/ml h-EGF 50 I.E. /ml Heparin in Neurobasal™-A Medium
<u>Murine mesenchymale Stromazellen (mBMSC):</u>	20 % FCS 1 mM Natriumpyruvat in DMEM/F12 (1:1)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Adhärente Zellen wurden mit Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die trypsininduzierte Proteolyse wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen wurden im Verhältnis 1/10 bis 1/20 in neue Kulturflaschen überführt.

Nicht-adhärente Zellen mit sphärischem Wachstum (mNSC) wurden einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die Sphären bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in 200 µl Kulturmedium zu Einzelzellen dissoziiert. Die Einzelzellen wurden im Verhältnis 1/20 in neue Kulturflaschen eingesät.

### 2.1.3. Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden adhärente Zellen in der subkonfluenten Wachstumsphase bzw. mittelgroße Sphären (Durchmesser ca. 100 µm) von nicht-adhären Zellen verwendet. Adhärente Zellen wurden zu Einzelzellen trypsinisiert und mit serumhaltigem Medium gewaschen. Sphären wurden durch Auf- und Abpipettieren zu Einzelzellen dissoziiert. Nach

der Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten wurden die Zellen in FCS mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen und in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem Thermobehälter langsam auf - 80°C gefroren, die dauerhafte Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

#### **2.1.4. Auftauen von Zellen**

Als Kryokonserven gelagerte Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und zur Entfernung von DMSO-Resten bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Zur anschließenden Kultivierung wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt.

#### **2.1.5. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Fibronektin**

Um nichtadhärente Zellen unter adhärennten Bedingungen zu kultivieren wurden entsprechende Kulturgefäße mit Fibronektin beschichtet. Dabei handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül der extrazellulären Matrix, welches den Zellen die Anheftung an den Boden des Kulturgefäßes ermöglicht. Zur Beschichtung wurden 10 µg/ml bovines Fibronektin (Biochrom AG, Berlin) in PBS verdünnt und bei 37°C im zu beschichtenden Kulturgefäß inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Fibronektin-Lösung abgenommen und der Gefäßboden wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Lagerung beschichteter Kulturgefäße erfolgte bei 4°C, wobei die beschichtete Oberfläche stets mit PBS bedeckt war.

#### **2.1.6. Untersuchung des Zellüberlebens mit AlamarBlue**

Zur Untersuchung des Zellüberlebens sowie der Cytotoxizität bestimmter Substanzen wurden Messungen mit AlamarBlue<sup>TM</sup> (AbD Serotec, Düsseldorf) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der als Reduktions-Oxidations-Indikator von stoffwechselaktiven Zellen umgesetzt wird. Der Farbumschlag von Blau nach Rot kann photometrisch erfasst werden und korreliert linear mit der Zahl der umsetzenden Zellen (AlamarBlue Technical Datasheet, Serotec, 2007). Zur Detektion überlebender Zelle wurde AlamarBlue<sup>TM</sup>-Lösung mit dem entsprechenden Kulturmedium 1/10 verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach 3 - 5 h Inkubation bei Standard-Zellkultur-Bedingungen wurde die Fluoreszenzintensität des Kulturmediums bei 595 nm mittels Fluoreszenzphotometer



gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 535 nm. Alle Messungen wurden als Mehrfachmessungen (mindestes Triplikate) durchgeführt.

### **2.1.7. Färbung von Zellen mit Kristallviolett**

Zur Quantifizierung überlebender Tumorzellen in Zytotoxizitätstests wurden tote Zellen durch mehrmaliges Spülen des Kulturgefäßes mit PBS entfernt, und lebende, adhärente Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Die Kulturgefäße wurden mit der Kristallviolett-Arbeitslösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol in ddH<sub>2</sub>O) für ca. 20 min überschichtet. Anschließend erfolgt dreimaliges Waschen mit destilliertem H<sub>2</sub>O und das Trocknen für 30 Minuten. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch das Zählen gefärbter Zellen. Dabei wurden pro Kavität einer 24-Lochplatte die Zellen in drei Gesichtsfeldern bei 20facher Vergrößerung gezählt.

### **2.1.8. Färbung von Zellen mit Dil**

Zum Nachweis der Migration von mNSC und mBMSC *in vivo* wurden die Zellen vor der Injektion in das Hirn von Mäusen mit dem lipophilen Farbstoff Dil markiert. Der Farbstoff interkaliert in die Zellmembran und emittiert bei 565 nm ein rotes Fluoreszenzsignal. Zur Färbung wurden die vereinzelt Zellen in einer Arbeitslösung von 2 µg/ml Dil in PBS für 10 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Die fluoreszierenden Zellen konnten später nach der histologischen Aufarbeitung des Gewebes in Kryoschnitten mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

### **2.1.9. Färbung von Fettvakuolen mit Oil Red O**

Zum Nachweis von Fettvakuolen in adipozytär differenzierten mBMSC wurden die im Phasenkontrast erkennbaren Lipidakkumulationen mit Oil Red O angefärbt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 0,5 g Oil Red O in 100 ml Isoporpanol gelöst und mit ddH<sub>2</sub>O auf 60 % (v/v) verdünnt. mBMSC wurden mit 10 % Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernung des Paraformaldehyd wurde der Zellrasen mit der Oil Red O Arbeitslösung für ca. 1 h überschichtet und dann vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O mehrmals gewaschen, um unspezifische Färbung zu entfernen. Die rote Färbung der Fettvakuolen wurde lichtmikroskopisch erfasst.

### 2.1.10. Neurale Differenzierung von mNSC

Zur Induktion neuraler Differenzierung wurden mNSC entweder auf fibronectinbeschichtete Glasplättchen im 24-Lochplatten-Format oder in unbeschichtete Kavitäten von 6-Loch-Platten gesät. Die Differenzierung wurde durch Zugabe von Neurobasalmedium ohne Wachstumsfaktoren mit fötalem Kälberserum (5 %), cAMP (20  $\mu$ M) und Retinsäure (100 nM) eingeleitet. Zur Auswertung wurden die Zellen auf den fibronectinbeschichteten Glasplättchen mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert, die Zellen der 6-Loch-Platte mittels quantitativer *real-time* PCR.

### 2.1.11. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die zur Immunfluoreszenzfärbung verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.2:** Verwendete primäre Antikörper.

<i>Antigen</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Quelle</i>
GFAP	Maus	1:40	Kaninchen	Dako
GalC	Maus	1:50	Maus	Chemicon
Map2	Maus	1:50	Maus	Chemicon
$\beta$ 3-Tubulin	Ratte	1:10	Maus	Sigma
Nestin	Maus	1:500	Maus	Chemikon

Sigma-Aldrich, München; Chemicon, Schwalbach; Dako, Hamburg

**Tabelle 2.3:** Verwendete sekundäre Antikörper.

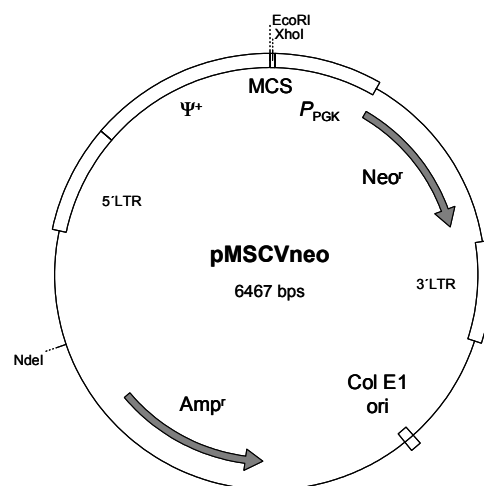
<i>Spezifität/ Bezeichnung</i>	<i>gekoppelte Substanz</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Fluoreszenz</i>	<i>Quelle</i>
$\alpha$ -Kaninchen IgG	Alexa Fluor 546	Ziege	1:500	Rot	Invitrogen
$\alpha$ -Maus IgG	Alexa Fluor 555	Ziege	1:500	Rot	Invitrogen
$\alpha$ -Maus IgG	Alexa Fluor 488	Esel	1:500	Grün	Invitrogen

Zum Nachweis bestimmter Proteine an der Oberfläche oder im Inneren von Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Dazu wurden 10 000 – 15 000 der jeweiligen Zellen auf fibronectinbeschichtete Glasplättchen in einer 24well Platte ausgesät. Unmittelbar vor der Färbung wurden die auf den Glasplättchen angehefteten Zellen entnommen und mit 1,5 % Pferdeserum in PBS (v/v) gewaschen.

Zum Nachweis membranständiger Proteine wurden die Zellen mit dem proteinspezifischen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1,5 % Pferdeserum in PBS (v/v) wurde der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper aufgebracht und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Ethanol/Eisessig (1:1; v/v) bei -20°C für 15 min fixiert. Beim Nachweis intrazellulärer Proteine wurden die Zellen vor der Färbung mit 4% Formaldehyd fixiert und nach einem Waschschrift mit 3 % Triton X-100 in PBS (v/v) permeabilisiert. Dann folgte die Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper wie oben beschrieben. Zellkerne wurden durch eine Inkubation mit DAPI-Lösung vor dem Eindeckeln der Zellen sichtbar gemacht.

### 2.1.12. Retrovirale Transduktion

Zur stabilen Integration von Transgenen in die Genome muriner neuraler Stammzellen (mNSC) und muriner mesenchymaler Stromazellen (mBMSC) wurde der Gentransfer über retrovirale Transduktion gewählt. Die dazu nötigen Komponenten, die Verpackungszelllinie PT67 und der Expressionsvektor pMSCV, stammten von BD Biosciences (Heidelberg).



**Abbildung 2.1:** Vektorkarte des Expressionsplasmids pMSCVneo. MCS: *multiple cloning site* mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI*. 5'LTR, 3'LTR: *long terminal repeats* (Signalsequenzen zu Genexpression). P<sub>PGK</sub>: PGK-Promotor. ψ<sup>+</sup>: retrovirales Verpackungssignal *psi*. Col E1 ori: Replikationsursprung. Amp<sup>r</sup>: β-Lactamase-Resistenzgen. Neo<sup>r</sup>: Neomycinresistenzgen.

Der Expressionsvektor pMSCV enthält neben dem Transgen das retrovirale Verpackungssignal  $\psi^+$ , ein Resistenzgen als Selektionsmarker, sowie zwei flankierende DNA-Wiederholungseinheiten, so genannte *long terminal repeats* (LTR). Diese werden nach ihren Positionen als 5'-LTR bzw. 3'-LTR bezeichnen und beinhalten Signalsequenzen zur Genexpression wie Promotor, Sequenzen zur Transkriptionsinitiation und -termination sowie Polyadenylierungssignale (Abbildung 2.1).

Die Verpackungszelllinie PT67 enthält die kodierenden viralen Sequenzen *gag*, *env* und *pol*. *gag* kodiert Matrix- und Kapsidproteine, *env* kodiert Proteine der Hülle und *pol* die virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase.

Mit dem Expressionsplasmid pMSCV transduzierte PT67-Zellen verpacken das virale genomische Transkript (Transgen, Selektionsmarkergen und LTRs) in infektiöse, retrovirale Partikel. Diese sind selbst replikations-inkompetent und können zur retroviralen Transduktion von Zielzellen verwendet werden.

### 2.1.12.1. Herstellung retroviraler Partikel

#### *Liposomale Transfektion von PT67*

Zur Herstellung retroviraler Partikel wurde zunächst die Verpackungszelllinie PT67 mit den jeweiligen Expressionsvektoren liposomal transfiziert. Dazu wurden 24 h vor der Transfektion jeweils  $5 \times 10^5$  PT67-Zellen in 10 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen ausgesät. Zur liposomalen Transfektion wurden 490  $\mu$ l OptiMEM-Medium mit 10  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) gemischt und zur Bildung liposomaler Vesikel 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 8  $\mu$ l einer Plasmidpreparation (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in 492  $\mu$ l OptiMEM aufgenommen und dem OptiMEM/Lipofectamine-Gemisch zugefügt. Dieses wurde zur Bildung von DNA/Lipofectamin-Komplexen bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Zur liposomalen Transfektion wurde das Kulturmedium von PT67 gegen Medium ohne Zusätze ausgetauscht. Jeweils 1 ml der DNA/Lipofectamine Suspension wurde tropfenweise zu den PT67-Zellen gegeben und mit dem Medium gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei Standard-Zellkultur-Bedingungen wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und Vollmedium wurde hinzugefügt.

#### *Konditionierung von Medium mit retroviralen Partikeln.*

24 h nach der liposomalen Transfektion von PT67 mit dem Expressionsplasmid wurde das Vollmedium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde das entsprechende Kulturmedium für die Zielzellen zugefügt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Ernte des nun mit retroviralen Partikeln durchsetzten Kulturmediums. Erneut wurde Kulturmedium zu den PT67-Zellen gegeben und nach weiteren 24 h wiederum geerntet. Das

konditionierte Medium wurde nach der Ernte zur Entfernung von PT67-Zellen durch einen 0,45 µM CA-Filter gefiltert und bei -80°C eingelagert.

### **2.1.12.2. Retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC**

Zur retroviralen Transduktion von Stammzellen wurden  $5 \times 10^5$  mNSC bzw. mBMSC in 10 cm<sup>2</sup> Kulturschalen ausgesät. Für die Aussaat von mNSC wurden mit Fibronectin beschichtete Kulturschalen verwendet. 24 h nach Aussaat wurde das Kulturmedium abgenommen und 10 ml Medium mit retroviralen Partikeln zugegeben. Um eine optimale Interaktion der viralen Partikel mit den Zielzellen zu erreichen, wurde dem Medium 4 µg/ml Polybrene, ein Polykation, zugegeben. Dieses neutralisiert die Ladungen der Zelloberfläche und der Virenpartikel. Nach 24stündiger Inkubation wurde das virenhaltige Medium erneuert und weiter 24 h mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS dreimal gewaschen und auf Vollmedium gesetzt. Nach 24 h wurde die Selektion retroviral transduzierter Zellen durch Zugabe von G418 eingeleitet, 200 µg/ml für mNSC bzw. 1,2 mg/ml G418 für mBMSC.

### **2.1.12.3. Testung retroviral transduzierter Zellen auf Produktion infektiöser Partikel**

Die zur retroviralen Transduktion eingesetzten Partikel sollten in den Zielzellen replikationsinkompetent sein, da in den Zielzellen die für die Herstellung infektiöser Partikel nötigen Sequenzen *gag*, *env* und *pol* fehlen. Um die Produktion infektiöser Partikel durch retroviral transduzierte Zellen auszuschließen, wurde der Medienüberstand dieser Zellen in einem sogenannten Helferviren-Assay untersucht. Dazu wurden  $10^5$  NIH3T3-Zellen in jede Kavität einer 6-Loch-Platte gesät und für 24 h mit konditioniertem Medium retroviral transduzierter Zellen unter Zugabe von 4 µg/ml Polybrene kultiviert. Nach weiteren 24 h wurde die Selektion potentiell transduzierter Zellen durch G418-haltiges Medium (1 mg/ml) gestartet. Innerhalb der folgenden 14 Tage wurde die Selektion fortgesetzt und das Medium alle 3-4 Tage erneuert. Bildeten sich in dieser Zeit keine Kolonien überlebender NIH3T3-Zellen, wurde davon ausgegangen, dass von den retroviral transduzierten Zellen keine replikationskompetenten retroviralen Partikel gebildet wurden. Die Arbeiten mit den retroviral transduzierten Zellen konnten somit unter S1-Bedingungen fortgeführt werden.

## 2.2. Mikrobiologische Arbeiten

Alle Arbeiten zu Klonierung und zur Herstellung von Expressionsvektoren wurden in *E. coli* durchgeführt. Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

**Tabelle 2.4: Verwendete *E. coli*-Stämme. Nomenklatur nach Bachmann *et al.*, 1990.**

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Herkunft</i>
<i>E. coli</i> XL-10 Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R$ <i>F'[proAB lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene, Amsterdam
<i>E. coli</i> DH $\alpha$	<i>endA1 hsdR17 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44. thil, recA1,</i> <i>gyrA(Na<sup>r</sup>), relA111, <math>\Delta(lacZYA-argF)U169,</math></i> <i><math>\Phi 80lacZ, \Delta M15</math></i>	Stratagene, Amsterdam

### 2.2.1. Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Alle Medien wurden, falls nicht anders vermerkt, 20 min bei 121 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Feste Nährböden enthielten 1,5% Agar-Agar, der gemeinsam mit den Medien autoklaviert wurde.

<u>LB-Medium</u>	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
pH 7,2	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
<u>TY-Glycerin</u>	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
pH 7,2	Glycerin (98%)	510 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
<u>NZY-Medium</u>	NZY Broth	21 g
pH 7,2	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

LB-Medium wurde zur Kultivierung der Zellen verwendet, TY-Medium zur Herstellung von Glycerinkulturen zum Einfrieren und NZY-Medium zur Transformation.

### 2.2.2. Lagerung von Bakterien (*E. coli*)

Die *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum entsprechender Konzentration kultiviert. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4°C. Für die langfristige Lagerung der Kulturen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Mit einer Einzelkolonie wurden dazu 5 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttler. Die Übernachtskultur wurde bei 4°C und 5000 x g 10 min zentrifugiert. Die sedimentierte Biomasse wurde in 3 ml TY-Glycerin resuspendiert. Je 1,5 ml der Suspension wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.3. Transformation von *E. coli* XL-10 Gold

Kompetente *E. coli* XL-10 Gold Zellen (Stratagene, Amsterdam) wurden mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 50 µl *E. coli* Suspension mit 2 µl β-Mercaptoethanol für 10 min auf Eis inkubiert. Etwa 1 µg des jeweiligen Plasmids wurde zu den Zellen gegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde für 30 sec in einem auf 42°C vorgewärmten Wasserbad durchgeführt. Unmittelbar danach wurden die Zellen für 2 min in einem Eisbad gekühlt und in 900 µl vorgewärmtem NYZ<sup>+</sup>-Medium (NYZ; 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 12,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glukose) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 37°C unter ständigem Schütteln 1 h inkubiert. Danach wurden die Transformanden auf ampicillinhaltigen Nährböden (100 µg/ml) zu Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.3. Molekularbiologische Arbeiten

### 2.3.1. Klonierung von Expressionsvektoren

Die in dieser Arbeit hergestellten Vektoren zur retroviralen Transduktion von mNSC und mBMSC basieren auf dem Plasmid pMSCV (siehe Kapitel 2.1.12). Die jeweiligen Insert-Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Sequenzmodifikationen wie Restriktionsschnittstellen und Konsensussequenzen wurden über entsprechend konstruierte PCR-Primer (Klonierungs-Primer; K-Primer) angefügt. Alle Insert-Sequenzen wurden nach Restriktionsverdau über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor ligiert. Punktmutationen wurden durch ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese-PCR unter Verwendung

spezifischer Mutagenese-Primer (*In vitro*-Mutagenese-Primer; IVM-Primer) korrigiert. Tabelle 2.5 gibt eine Übersicht über in dieser Arbeit konstruierten Plasmide.

**Tabelle 2.5:** Konstruierte Plasmide mit Angabe des Inserts, der Matrizen-DNA der zur Herstellung verwendeten Primer.

<i>Name</i>	<i>Insert</i>	<i>Matrize; Primer</i>	<i>Kozak-Sequenz</i>
pMSCV-EGFP	EGFP	pEGFP-N1; K01/K02	+
pMSCV rCEsec Δ	rCEsec ΔC-T304	pCI-rCEsec; K04/K05	-
pMSCV rCEsec Δ k	rCEsec ΔC-T304	pCI-rCEsec; K03/K05	+
pMSCV rCEsec	rCEsec	pMSCV rCEsec Δ; IVM01/IVM02	-
pMSCV rCEsec k	rCEsec	pMSCV rCEsec Δ k; IVM01/IVM02	+
pMSCV-deoD	<i>E. coli deoD</i>	<i>E. coli</i> DNA; K06/K07	+

Die verwendeten Klonierungsprimer sowie die Primer für die *in vitro*-Mutagenese sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

**Tabelle 2.6:** Primer in 5'-3'-Orientierung. Klonierungs-Primer K01-K07: Kursiv: Start- bzw. Stopp-Codons; Fett: hybridisierende Bereiche; Unterstrichen: Kozak-Sequenz; Klein: Restriktions-schnittstellen. *In vitro*-Mutagenese-Primer IVM01 und IVM02: Fett: Zur Matrizensequenz abweichende Base.

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Schnittstelle</i>
K01	AAAAAgaattc <u>GCCACCATGGT</u> GAGC	<i>EcoRI</i>
K02	AAAAActcgag <b>TTACTTGTACAGCTCGTCC</b>	<i>XhoI</i>
K03	AAAAAgaattc <u>GCCACCATGGG</u> ATGGCTCTGTGCATTGGC	<i>EcoRI</i>
K04	AAAAAgaattc <b>ATGTGGCTCTGTGCATTGGC</b>	<i>EcoRI</i>
K05	AAAAActcgag <b>TCACTCACGTGGCCTTG</b>	<i>XhoI</i>
K06	AAAAAgaattc <u>GCCACCATGG</u> CTACCCACACATTA	<i>EcoRI</i>
K07	AAAAActcgag <b>TTACTCTTTATCGCC</b> CAGC	<i>XhoI</i>
IVM01	GCTCTCGGAGCTCTTCACCAACAGAAAAG	
IVM02	CTTTTCTGTTGGTGAAGAGCTCCGAGAGC	



### 2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Insert-Sequenzen

Insert-Sequenzen zur Herstellung von Expressionsvektoren wurden mittels oben genannter Primer über die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zur Vermeidung von Mutationen wurde die thermostabile *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt (Stratagene, Amsterdam). Diese besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Korrekturlese-Funktion).

#### PCR-Ansatz:

Matrizen DNA	5-30 ng
Primer 1	50 µM
Primer 2	50 µM
dNTP Mix	200 µM
10x Reaktionspuffer	5 µl
DNA Polymerase	2,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### Reaktionsbedingungen für die PCR:

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
I	1	Denaturierung	5 min	95°C
II	25-35	Denaturierung	30 sec	95°C
		Hybridisierung	1 min	50-65°C
		Synthese	1-4 min	72°C
III	1	Endsynthese	10 min	72°C

### 2.3.3. Restriktion von Plasmiden und PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* wurden von der Firma New England Biolabs, Frankfurt, bezogen. Tabelle 2.7. beschreibt die Eigenschaften der dieser Restriktionsenzyme.

**Tabelle 2.7:** Zur Klonierung verwendete Restriktionsendonukleasen. Die Schnittstellen sind mit „\*“ gekennzeichnet.

<i>Name</i>	<i>Erkennungssequenz (5'-3')</i>	<i>Reaktionstemperatur</i>
<i>EcoRI</i>	G*AATTC	37°C
<i>XhoI</i>	C*TCGAG	37°C

Plasmid-DNA und PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller der Enzyme empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen geschnitten. Gleichzeitiges Schneiden mit beiden Enzymen wurde unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen laut Hersteller die Endonukleasen mindestens 50 bis 100% Spaltaktivität besaßen. Für die Restriktionsanalyse wurde ca. 0,2–1 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden von der Herstellerfirma mitgelieferten 10 x-Restriktionspuffer versetzt und 1 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Nach der Restriktion wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5% (w/v) Agarose in 0,5 x TAE-Puffer, 100 V, 30 min) analysiert.

#### 2.3.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von doppelsträngiger DNA aus Agarosegelen wurde das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) verwendet. Das DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einer dem Agarosestück entsprechenden Volumeneinheit „capture buffer“ (GE Healthcare) aufgenommen. In diesem Puffer wurde das Gel bei 60°C gelöst. Die Reinigung der DNA mittels Affinitätsäule erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet.

#### 2.3.5. Ligation von DNA Fragmenten

Um DNA-Fragmente in Plasmide einzufügen, wurden das Plasmid und das gewünschte Insert-Fragment mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Ligation wurde anschließend mit dem Enzym T4-Ligase (10 U) in Adenosintriphosphat-haltigem Ligase-Puffer (1 mM ATP, 10 mM DTT) durchgeführt, so dass aus den Fragmenten und dem Plasmid wieder ringförmige Konstrukte entstanden. In einem 10 µl-Ansatz wurden linearisierte Plasmid-DNA und zu insertierende DNA im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.3.6. Ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese

Zur Korrigierung von Punktmutationen in verschiedenen Expressionsplasmiden wurde eine ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese mittels Mutagenese-PCR mit dem QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam) durchgeführt. Bei diesem Verfahren dienen zirkuläre DNA-Moleküle als Matrize, welche die zu korrigierende Sequenz tragen. Die gewünschte Sequenzänderung wird über entsprechend gestaltete Mutagenese-Primer eingeführt, die mit der betroffenen Sequenz im Gen hybridisieren. Das PCR-Produkt ist wiederum ein Plasmid, diesmal mit der korrigierten Gensequenz. Die Trennung von nicht mutierter Matrizen-DNA und mutiertem PCR-Produkt erfolgt durch *DpnI*-Restriktion. Die *DpnI*-Endonuklease erkennt dabei methylierte und hemimethylierte DNA und hydrolysiert somit spezifisch die methylierte nicht mutierte Matrizen-DNA. Zum Nachweis positiv mutierter Plasmide werden *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem Restriktionsansatz transformiert und über Nacht kultiviert. Mit einzelnen Kolonien wird eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Auslese positiv mutierter Klone kann, falls von der Mutation eine Restriktionsschnittstelle betroffen ist, über den entsprechenden Restriktionsverdau erfolgen. Der direkte Nachweis einer erfolgreichen Mutagenese wird jedoch in jedem Fall über eine Sequenzierung geführt.

#### 2.3.6.1. *In vitro*-Mutagenese PCR

Die Primer für die *in vitro*-Mutagenese PCR (IVM01 und IVM02) enthielten die gewünschte Mutation und hybridisierten mit den gleichen Sequenzen auf den entgegengesetzten Strängen des Plasmids. Wie vom Hersteller des Kits gefordert, hatten die Primer eine Länge zwischen 25 und 45 Basenpaaren und eine Schmelztemperatur von  $T_m \geq 78^\circ\text{C}$ . Die Schmelztemperatur wurde nach folgender Formel kalkuliert:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N$$

- N ist die Primerlänge in Basenpaaren, das zu korrigierende Nukleotid nicht eingeschlossen.
- % GC wird in ganzen Zahlen angegeben

Die gewünschte Mutation lag in der Mitte der Primer, flankiert von jeweils ca. 10-15 Nukleotiden. Die Primer hatten einen GC-Gehalt von mindestens 40% und wurden am 3'-Ende von wenigstens einem Cytosin oder Guanin-Nukleotiden abgeschlossen.

PCR-Ansatz für *in vitro*-Mutagenese PCR:

Matrizen DNA	15 ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
dNTP Mix	200 mM
10x Reaktionspuffer	5 µl
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	2,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen bei der *in vitro*-Mutagenese PCR:

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
I	1	Denaturierung	5 min	95°C
II	18	Denaturierung	50 sec	95°C
		Hybridisierung	50 sec	60-70°C
		Synthese	1 min/kb	68°C
II	1	Endsynthese	10 min	68°C

Nach dem Durchlaufen der Zyklen wurden zum PCR-Ansatz 10 U *DpnI* Endonuklease (New England Biolabs, Frankfurt) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Die Sequenzierreaktionen zur Auslese positiv mutierter Klone wurde von der Firma GATC-Biotech, Konstanz, ausgeführt.

**2.3.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmid-DNA wurde in Mini- oder Maxi-Präparationen mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) bzw. Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) aus *E. coli*-Suspension hergestellt. Beide Präparationen wurden mit Übernachtskulturen entsprechender Zellklone durchgeführt. Die Biofeuchtmasse wurde bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Mit dem Sediment wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **2.3.8. Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen**

Genomische DNA aus Zellkultur wurde mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Zur Isolation wurden adhärenente Zellen in der subkonfluenten Wachstumsphase bzw. mittelgroße Sphären nicht-adhärenenter Zellen verwendet. Die Präparation folgte den Angaben des Herstellers zur Reinigung von DNA aus Zellen.

### **2.3.9. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen**

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkultur erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Wie zur Isolierung von DNA wurden adhärenente Zellen in der subkonfluenten Wachstumsphase bzw. mittelgroße Sphären nicht-adhärenenter Zellen verwendet. Die Präparation folgte den Angaben des Herstellers. Um die Verschleppung von DNA zu Vermeiden wurde während der Präparation ein DNase-Verdau durchgeführt. Die hergestellte RNA-Lösung wurde mittels PCR auf DNA-Kontamination untersucht.

### **2.3.10. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine  $OD_{260}$  (OD = optische Dichte) einer 1 cm Küvette entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  bei RNA und 30  $\mu\text{g/ml}$  bei Oligonukleotiden. Zur Detektion von Proteinverunreinigungen wurde die OD bei 280 nm gemessen. Hier liegen die Absorptionsmaxima der aromatischen Aminosäuren. Aus dem Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ergibt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 für DNA und 1,8 bis 2,2 für RNA gilt das Präparat als proteinfrei.

### **2.3.11. Reverse Transkription (RT-PCR) und Nachweis von Transkripten in cDNA mittels PCR**

Zur Analyse von Gen-Transkripten wurde mittels Reverser Transkription (RT) komplementäre DNA (cDNA) unter Verwendung präparierter Gesamt-RNA als Matrize hergestellt. Zur Reversen Transkription wurde die Reverse Transkriptase SuperScript™ II (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Für einen 100 µl Reaktionsansatz wurden zunächst 15 µg RNA, 100 µM dNTP Mix (bezogen auf 100 µl) und 500 ng p(dN)6 Random-Primer in einem Gesamt-Volumen von 60 µl für 5 min bei 65°C inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 20 µl 5x Reaktionspuffer, 10 µl DTT (0,1 M) und 200 U des Ribonuklease-Inhibitors RNase-Out™ (Invitrogen, Karlsruhe). Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei 25°C wurden dem Reaktionsansatz 1000 U Reverse Transkriptase SuperScript™ II zugegeben und für weiter 10 min bei 25°C inkubiert. Die Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch Hitze-Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min gestoppt.

Zur Amplifikation von Transkripten wurde eine PCR mit den jeweiligen transkriptspezifischen Primern und cDNA als Matrize durchgeführt. Im Gegensatz zur PCR-Reaktion zur Klonierung von Expressionsplasmiden wurde hierbei die thermostabile *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* verwendet (Stratagene, Amsterdam).

#### PCR-Ansatz:

Matrizen DNA	15 µl aus cDNA-Suspension
Primer 1	50 µM
Primer 2	50 µM
dNTP Mix	200 µM
10x Reaktionspuffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
DNA Polymerase	1 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

#### Reaktionsbedingungen für die PCR:

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
I	1	Denaturierung	5 min	95°C
II	25-35	Denaturierung	30 sec	95°C
		Hybridisierung	1 min	50-65°C
		Synthese	1-4 min	72°C
III	1	Endsynthese	10 min	72°C

Die für die Amplifikation verwendeten transkriptspezifischen Primer sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

**Tabelle 2.8:** Primer zur Amplifikation von Transkriptsequenzen aus cDNA.

<i>Transkript</i>	<i>Hin-Primer (5'-3')</i>	<i>Rück-Primer (5'-3')</i>	<i>Größe Amplikon [bp]</i>
CD105	CAATCAGGTCATGACTCTGG	GAGCTAAGTTGCAACTGAGG	558
CD150	TTACAGCTGGAGTGATGAGG	TCTGTACAGAGAACTTGGG	608
CD45	TCAGGACCTCAAACAGAAGC	CCTTTCCTATGAACTCTGGG	507
CD73	GGAAACCTGATCTGTGATGC	TGCTGCAGAGAACTTGATCC	581
CD90	CTGGTGAACCAAAACCTTCG	TCCAGGATGTGTTCTCAACC	351
GalC	TTGTTGTGTGCGCTGCTAGT	GAACGATAGGGCTCTGGGTA	145
GFAP	AGATGAAACCAACCTGAGGC	TCTCCACAGTCTTACCACG	779
Nestin	AGTTCCCAGGCTTCTCTTGG	TCCTGTGTCTTCAGAAAGGC	172
β3-Tubulin	GGAACCATGGACAGTGTTTCG	AACGGCACCATGTTCCACAGC	577
β-Aktin	ACGTTGACATCCGTAAAGACC	ATCCACACAGAGTACTTGCG	167

### 2.3.12. Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Um die Transkripte verschiedener Gene quantifizieren zu können, wurden entsprechende cDNA-Ansätze einer quantitativen *real-time* PCR (qPCR) unterzogen. Hierbei läuft die PCR in Gegenwart eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) ab, welcher bei Bindung an doppelsträngige DNA ein Fluoreszenz-Signal emittiert. Dieses kann während des PCR-Verlaufes ständig detektiert werden. Somit lässt sich bei jedem Temperaturzyklus der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen. Zur Auswertung wurde ein Schwellenwert (Threshold Cycle, Ct) festgelegt, der die Fluoreszenzintensität bei einem bestimmten Reaktionszyklus definiert. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden die Ct-Werte der Zielgene mit den Werten von konstant exprimierten Haushaltsgenen verrechnet ( $\Delta$ Ct). Die relative Quantität (RQ) von gleichen Transkripten in verschiedenen Zellpopulationen ergibt sich aus dem Vergleich der verschiedenen  $\Delta$ Ct-Werte für das jeweilige Transkript in den Zellen.

Die qPCR wurde mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt und analysiert. Zur qPCR wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieser vorgefertigte Reaktionsansatz enthält neben einer DNA-Polymerase und Reaktionspuffer den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Als

PCR-Primer wurden die in Tabelle 2.8 genannten Primer verwendet. Alle Ansätze wurden in Triplikaten ausgeführt.

PCR-Ansatz für die qPCR:

cDNA	≤ 500 ng
Primer 1	50 µM
Primer 2	50 µM
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Reaktionsbedingungen für die qPCR:

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
I	1	Denaturierung/Aktivierung der DNA-Polymerase	15 min	95°C
II	30	Denaturierung	1 min	95°C
		Hybridisierung	1 min	54-56°C
		Synthese	2 min	72°C



## 2.4. Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE in einem 10%igem Polyacrylamid-Gel, welches selbst angefertigt wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.9 dargestellt.

**Tabelle 2.9:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die diskontinuierliche SDS-PAGE.

<i>Komponente</i>	<i>Trenngel 10%</i>	<i>Sammelgel 4%</i>
30 % Acrylamidlösung	8,33 ml	1,33 ml
Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS)	5 ml	-
Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8 ; 0,1% (w/v) SDS)	-	5 ml
ddH <sub>2</sub> O	11,37 ml	3,55 ml
TEMED	50 µl	20 µl
10 % APDS	250 µl	100 µl

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 1:1 mit Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Marker BenchMark™ (Invitrogen) mit einer Bandbreite von 20 – 200 kDa verwendet. Die Elektrophorese wurde für 3-4 h bei 80 V durchgeführt. In Tabelle 2.10 sind die verwendeten Auftragspuffer und Elektrodenpuffer beschrieben.

**Tabelle 2.10:** Auftragspuffer und Elektrodenpuffer für die SDS-PAGE.

Auftragspuffer (2x)	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 2,5 (w/v) % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Elektrodenpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8.5, 192 mM Glycin, 0,1 (w/v) % SDS

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele entweder zum Proteintransfer mittels Western-Blot-Analyse verwendet, oder zur Sichtbarmachung der Proteine für 30 min mit einer Coomassie-Färbelösung und für ca. 15 min mit der entsprechenden Entfärbelösung geschüttelt. Die Zusammensetzung von Färbe- und Entfärbelösung sind in Tabelle 2.11 angegeben.

**Tabelle 2.11:** Coomassie-Färbelösung und Entfärbelösung für SDS-Gele.

<i>Komponente</i>	<i>Färbelösung</i>	<i>Entfärbelösung</i>
Isopropanol (v/v)	25 %	25 %
Essigsäure (v/v)	10 %	10 %
Coomassie-R250 (w/v)	0,05 %	-

### 2.4.2. Western-Blot-Analyse

Polyacrylamid-Gele (PA-Gel) wurde nach den Anweisungen des Herstellers des Systems „Mini Trans-Blot Cell“ (BioRad) auf Nitrozellulose-Membranen (Millipore, USA) geblottet. Gel und Membran wurde dazu zwischen zwei Glasfasermatten und je zwei in Puffer getränkten Filtern (3MM, Whatman, USA) fixiert und in eisgekühltem Transferpuffer geblottet. Die Transfereffizienz wurde durch kurze Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung (Ponceau S in Essigsäure) überprüft, welche danach mit ddH<sub>2</sub>O wieder entfernt wurde. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran etwa 1 Stunde lang in 1x Roti-Block (Roth, Karlsruhe) als Blockierungslösung inkubiert und wurde anschließend immunochemisch gefärbt. Tabelle 2.12 gibt eine Übersicht über die verwendeten Transferpuffer und Transferbedingungen.

**Tabelle 2.12:** Puffer und Transferbedingungen im Western-Blot.

Gel	10 % PAA
Transferpuffer	50 mM Tris, 200 mM Glycin
Transferbedingungen	1h, 100 V

Als Positiv-Kontrolle für den Western-Blot wurde kommerziell erhältliche *rabbit-liver*-Carboxylesterase (Sigma-Aldrich, München) eingesetzt.

### 2.4.3. Immunochemische Färbung von Western-Blots

Die für die immunochemische Färbung von Western-Blots verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.13 beschrieben.

**Tabelle 2.13:** Für die immunochemische Färbung verwendete Erst- und Zweitantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Quelle</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Nachweissystem</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-Esterase ( <i>porcine liver</i> ) (Erstantikörper)	Kaninchen	1:2000		Rockland, USA
Anti-Kaninchen IgG (Zweitantikörper)	Ziege	1:80000	Peroxidase	Sigma-Aldrich, München

Antikörperlösungen wurden mit TNT-Puffer (*Tris-buffered saline with tween*) angesetzt (10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 0,05 (v/v) % Tween-20). Zur Färbung wurden 2-5 ml primärer Antikörperlösung (Antikörper verdünnt in TNT mit 0,5 % bis 5 % Magermilchpulverlösung) für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch Waschen mit TNT (3x für 10-15 min bei RT) abgelöst. Die Membran wurde dann mit dem sekundären Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung in TNT mit 5 % Magermilchpulverlösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals dreimal mit TNT gewaschen, schließlich mit ddH<sub>2</sub>O nochmals kurz gewaschen und mit dem Entwicklungsreagenz für genau 1 min inkubiert. Zur Entwicklung wurden die Chemilumineszenz-Reagenzien Luminol/Enhancer und stabile Wasserstoffperoxidlösung (SuperSignal West Pico, Pierce) verwendet. Die Membran wurde luftblasenfrei in Klarsichtfolie verpackt und Filme in variablen Expositionszeiten aufgelegt und entwickelt (ca. 30 s – 10 min).

#### **2.4.4. Bestimmung der PNP-Aktivität im Lysat retroviral transduzierter Stammzellen**

Zum Nachweis einer gesteigerten PNP-Aktivität in mit dem Vektor pMSCV-*deoD* transduzierten Zellen, wurde das Zelllysate mit dem von Le Tissier und anderen entwickelten Aktivitätstest untersucht (Le Tissier *et al.*, 1994). Dieser Aktivitätstest beruht auf dem Purinkatabolismus in Säugern. Dabei katalysiert die Purin-Nukleosid Phosphorylase die Umsetzung von Inosin zu Hypoxanthin. Dieses wird von dem Enzym Xanthin-Oxidase zu Xanthin und schließlich zu Harnsäure oxidiert. Bei dieser Reaktion wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freigesetzt. In dem von Le Tissier *et al.* etablierten Aktivitätstest werden mittels Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Substrate 2,4,6-Tribromo-3-Hydroxybenzoesäure (TBHB) und 4-Amino-Antipyrin (4AAP) zu einem Farbstoff umgesetzt, welcher bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch zu detektieren ist.

<u>Substratlösung:</u>	0,5 mM Inosin
	0,02 U/ml Xanthin-Oxidase
pH 7,4 in ddH <sub>2</sub> O	8 U/ml Peroxidase
	1 mM TBHB
	0,1 mM 4AAP
	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Zur Analyse wurden jeweils  $10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l kaltem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zur Lyse etwa 20mal durch eine 26GA-Kanüle passagiert und die Zelltrümmer wurden bei 13 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Überstände erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers (Perbio Science, Bonn). Zu vergleichende Proben wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. 5  $\mu$ g des Zelllysates wurden in einer Kavität einer 96-well Platte vorgelegt und mit 200  $\mu$ l kalter Substratlösung aufgefüllt. Jede Proteinsuspension wurde in Triplikaten analysiert. Die Messung des Farbumschlages erfolgte photometrisch. Dazu wurden die Proben für 25 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 492 nm in Intervallen von 120 sec gemessen.

#### **2.4.5. Bestimmung der CE-Aktivität im Lysat und konditioniertem Medium retroviral transduzierter Stammzellen**

Eine Erhöhung der Carboxylesterase-Aktivität wurde bei Zellen untersucht, welche mit rCEsec-tragenden Vektoren retroviral transduziert worden waren. Im Assay wurde der Umsatz von ortho-Nitrophenyl-Acetat (o-NPA) zu Nitrophenol durch Carboxylesterasen photometrisch als Absorptionswert bei 405 nm erfasst. Zur Herstellung der NPA-Substratlösung wurden 175  $\mu$ l NPA-Stammlösung (180 mM in Methanol) in 10 ml kaltem HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) verdünnt und in fünffachem Überschuss zur zu untersuchenden Suspension im Assay eingesetzt. Die photometrische Messung erfolgte im 96-Lochplatten-Format bei einer Inkubationstemperatur von 25°C über ca. 20 min bei Intervallen von 2 bzw. 3 Minuten.

Zur Analyse des Zelllysates wurden jeweils  $10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l kaltem EBC-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 120 mM NaCl, 0,5 % NP40) lysiert und bei 13 000 x g in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay Kit im Aktivitätstest untersucht.

Konditioniertes Medium rCEsec produzierender Zellen wurde vor der Untersuchung durch Einengung des Volumens 10 – 20fach aufkonzentriert. Dazu wurde das Medium mit YM-3-

Zentrifugensfiltern (Millipore, Schwalbach) in zwei Schritten zu 90 und 30 Minuten bei 3000 x g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Vor dem Einsatz des Mediums im Aktivitätstest wurde wiederum die Proteinkonzentration bestimmt.

## **2.5. Histologie**

### **2.5.1. Anfertigung von Kryoschnitten**

Zur Anfertigung von Kryoschnitten aus Mäusehirnen wurden die entsprechenden Gewebeproben direkt nach Entnahme in Tissue-Tek (Sakura, Niederlande) eingebettet und bei -80°C gelagert. Nach der Durchfrostung wurden die Blöcke in frontal-occipitaler Orientierung im Kryotom (Leica) fixiert und von frontal aus geschnitten. Die 10 µM starken Gewebsschnitte wurden auf Objektträger gebracht und vor dem Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine mittels einer DAPI-Lösung gefärbt.

## **2.6. Arbeit mit Versuchstieren (C57Bl/6-Mäuse)**

### **2.6.1. Intrakranielle Injektion von Zellen in Versuchstiere**

Für *in vivo*-Experimente wurden immunkompetente C57Bl/6-Mäuse verwendet (Charles River Laboratories, USA). Zur intrakranielle Injektion von Zellen wurden C57Bl/6-Mäuse nach intraperitoneal applizierter Vollnarkose (Ketamin, 100 mg/kg; Xylazin 5 mg/kg) mit dem Kopf in der Stereotaxievorrichtung fixiert und lokal desinfiziert. Nach Eröffnung der Kopfschwarte wurde das Bregma identifiziert und eine Kraniotomie 2 mm links lateral und 1 mm vor dem Bregma mittels Bohrloch vorgenommen. Über eine im Stereotaxiearm befestigte Hamilton-Spritze wurde die Nadel ca. 2,5 mm in das Caudatum/Putamen vorgeschoben. Die Injektion von nicht mehr als 5 µl Zellsuspension erfolgte langsam über einen Zeitraum von ca. 5 min mit Hilfe der Microinjektion Unit. Das Bohrloch wurde mit Knochenwachs und die Kopfwunde mit Histoacryl-Gewebekleber (Braun, Melsungen) verschlossen. Zur Linderung postoperativer Schmerzen bekamen die Tiere unmittelbar nach dem Eingriff 50 mg/kg Novalgin subkutan sowie darauffolgend über 3 Tage 25 mg Novalgin in jeweils 20 ml Trinkwasser verabreicht.

## 2.7. Auswertung und Statistik

Die Datenaufarbeitung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation). Die Vergleichende Statistik wurde mittels SigmaStat durchgeführt. Zum Vergleich zweier Gruppen, unabhängiger oder abhängiger Stichproben wurde der t-Test benutzt. In allen Fällen wurde eine Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels des Programms SigmaPlot.

## 2.8. Kitsysteme, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Kitsysteme, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien tabellarisch aufgelistet. Die in Tabelle 2.17 aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham, BioRad, BMA Rockland, Calbiochem, DakoCytomation, Difco, ICN, Invitrogen, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega und Sigma (alle USA); Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Bayer Schering Pharma AG (Berlin) und Serva (Heidelberg).

**Tabelle 2.14:** Zur Nukleinsäure-Präparation verwendete Kitsysteme.

<i>Kitsystem</i>	<i>Hersteller</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, England

**Tabelle 2.15:** Verbrauchsmaterialien.

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Eppendorf Reagiergefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Cellstar-Gefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filtermembran Polycarbonat	Neuro Probe, MD, USA
Kryoröhrchen "Nunc CryoTube Vials"	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Neubauer Zellzählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
sterile Spritzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Transwell-Einsätze 24-well	Millipore GmbH, Schwalbach
Zellkulturflaschen T-25	Becton Dickinson Labware, NJ, USA

Zellkulturflaschen T-75	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (96-well, 24-well, 6-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-well Platte für qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Glasgeräte (Kolben etc.)	Schott-Duran, Mainz

**Tabelle 2.16:** Geräte.

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Begasungs-Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Elektrophoresekammer	Cosmo Bio Co Ltd, CA, USA
Fluoreszenzlampe "HBO 50"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop "Axioskop 2 plus"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kamera "AxioCam MRc5"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kühltruhe, -80°C	Kryotec GmbH, Hamburg
Mikroskop "DM IRB"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom "SM 2000R"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Hofheim
Photometer mit Quarzküvette	
"GeneQuant pro"	Amersham plc, Little Chalfont, England
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Thermocycler "7500 Fast Real-Time PCR System"	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler "Personal Cycler"	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge "Biofuge fresco"	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH Eberhardzell
Waage KERN "440-33"	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad	Klöttermann GmbH, Uetze
Zentrifuge "Centrifuge 5810"	Eppendorf AG, Hamburg

**Tabelle 2.17:** Chemikalien.

2,4,6-Tribromo-3-Hydroxybenzoesäure (TBHB)	Glycin
2-Chloro-2'-deoxyadenosin (Cladribine)	Hefeextrakt
2-Fluoro-2'-deoxyadenosin (FdAdo)	HEPES
2-Fluoroadenin-9-β-D-arabinofuranosid (FaraA)	Inosin
2-Mercaptoethanol	Isopropanol
4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Kaliumchlorid
4-Amino-Antipyrin (4AAP)	Kaliumdihydrogenphosphat
Aceton	L-Glutamin
Agar, Bacto-Agar	Magnesiumchlorid

---

Agarose, DNA typing grade	Magnesiumsulfat
All-trans Retinsäure (1mM)	Methanol
Ampicillin, Natrium Salz, lyophilisiert	Natriumacetat
BSA (Rinderserumalbumin)	Natriumchlorid
cAMP (30 mM)	Natriumhydroxid
Dimethylsulfoxid (DMSO)	NZY <sup>+</sup> -Broth
DNA-Längenstandard 1 Kb Plus	Oil Red O
dNTP Mix	PBS
DTT (Dithiothreitol)	Penicillin
EosinG, gelblich	RNaseA
Essigsäure 100%	Salzsäure
Ethanol abs	β-D-Glucose
Ethidiumbromid 1%	Streptomycin
Fetales Kälberserum (FCS)	TAE 10x
Fludara (FAMP)	Tris
Formaldehyd 37% Ammoniumchlorid	Trypsin-EDTA-Lösung
Formaldehyd 4% (Formalin)	Trypton
G418	

---



### 3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Applikation einer Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Hirntumoren durch Stammzellen, welche die Eigenschaft haben, *in vivo* zu experimentellen Hirntumoren zu migrieren. Das Therapieprinzip sah vor, Stammzellen aus murinem neuralem Gewebe und Knochenmark zur Herstellung eines therapeutischen Enzyms durch Vermittlung eines Transgens zu nutzen. Am Tumor produziert, könnte dieses Enzym ein Chemotherapeutikum aktivieren und somit Tumorzellen lokal begrenzt abtöten.

Die verwendeten Enzym/Prodrug-Systeme, das rCE/CPT-11-System und das PNP-Enzym/Prodrug-System, wurden in der Einleitung bereits beschreiben (siehe Kapitel 1.4). Ursprünglich war nur die Arbeit mit dem rCE/CPT-11-System vorgesehen. Die dazu verwendete Gensequenz der Carboxylesterase aus Kaninchen (*rabbit*-Carboxylesterase) wurde von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt, welche das System bereits erfolgreich eingesetzt haben (Danks *et al.*, 2007). Während der Konstruktion von Expressionsvektoren zur retroviralen Transduktion der Stammzellen wurde eine Punktmutation im rCE-Gen festgestellt, welche durch ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese behoben werden konnte. Die Stammzellen, die schließlich mit verschiedenen Vektoren transduziert worden waren, zeigten eine nur sehr geringe Carboxylesterase-Aktivität. Einen Umsatz der Prodrug CPT-11 durch die Zellen konnte nicht detektiert werden, ein gesteigerter zytotoxischer Einfluss auf Tumorzellen in Kombination mit rCE-produzierenden Stammzellen und CPT-11 war ebenfalls nicht festzustellen. Quantitative Analysen ergaben, dass die von den Stammzellen produzierte Menge an rCE nicht ausreichte, um mit dem rCE/CPT-11-System Tumorzellen erfolgreich abzutöten.

Daher wurde noch ein zweites Enzym/Prodrug-System auf Basis der *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) und fluorierter Adenosinanaloga untersucht. Die kodierende Sequenz, *deoD*, wurde aus *E. coli* isoliert und zur Klonierung eines Expressionsvektors verwendet. Die retrovirale Transduktion von Stammzellen mit diesem Vektor führte zu einer deutlich gesteigerten PNP-Aktivität der Zellen. Durch die Kombination der Stammzellen mit verschiedenen Prodrugs konnte ein massives Absterben von Tumorzellen *in vitro* erzielt werden.

Im Folgenden werden zunächst die hier verwendeten murinen migratorischen Stammzellen aus neuralem Gewebe und Knochenmark charakterisiert, sowie ihre retrovirale Transduktion beschreiben. Kapitel 3.3 gibt einen Einblick in die Arbeiten mit dem rCE/CPT-11-System und zeigt die quantitativen Analysen bezüglich der rCE-Expression in mNSC. Die Arbeiten mit dem PNP-Enzym/Prodrug-System sowie die Abtötung von Tumorzellen *in vitro* sind darauffolgend ausführlich beschrieben. Schließlich werden die tumortropen

Eigenschaften der verwendeten Stammzellen *in vivo* in einem intrakraniellen Hirntumormodell dargestellt.

### **3.1. Charakterisierung muriner Stammzellen aus neuralem Gewebe und Knochenmark**

Hinsichtlich der verwendeten Stammzellen fiel die Wahl zum einen auf neurale Stammzellen (NSC), da deren migratorische und tumortrophe Eigenschaften sehr gut charakterisiert sind (Aboody *et al.*, 2000). Zudem wurden NSC bereits im Rahmen von Enzym/Prodrug-Therapien gegen Hirntumoren im Tierversuch erfolgreich eingesetzt (Barresi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Im Hinblick auf eine Enzym/Prodrug-Gentherapie am Menschen stellt sich jedoch das Problem der Verfügbarkeit autologer NSC. Die Zellen müssten mittels Biopsie aus der Subventrikularzone des Patienten entnommen werden, was einen nicht unerheblichen chirurgischen Eingriff bedeuten würde.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden in dieser Arbeit ebenfalls mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark (BMSC) zur Vermittlung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie untersucht. Die Entnahme von BMSC mittels Knochenmarksbiopsie stellt einen vergleichsweise einfachen Eingriff mit geringer Belastung für den Patienten dar. Ähnlich wie NSC zeigen BMSC einen ausgeprägten Tumortropismus *in vivo*. Zudem wurden BMSC bereits im Tierversuch zur gezielten Vermittlung therapeutischer wirksamer Peptide gegen Hirntumore eingesetzt (Nakamizo *et al.*, 2005).

Im Hinblick auf eine spätere Testung des Therapiesystems am Mausmodell, wurde in dieser Arbeit mit murinen NSC und BMSC gearbeitet (dementsprechend die Bezeichnung mNSC bzw. mBMSC). Die Zellen wurden im Labor für Hirntumorbiologie isoliert und, wie im Folgenden beschrieben, anhand ihrer morphologischen, proliferativen und molekularen Eigenschaften charakterisiert.

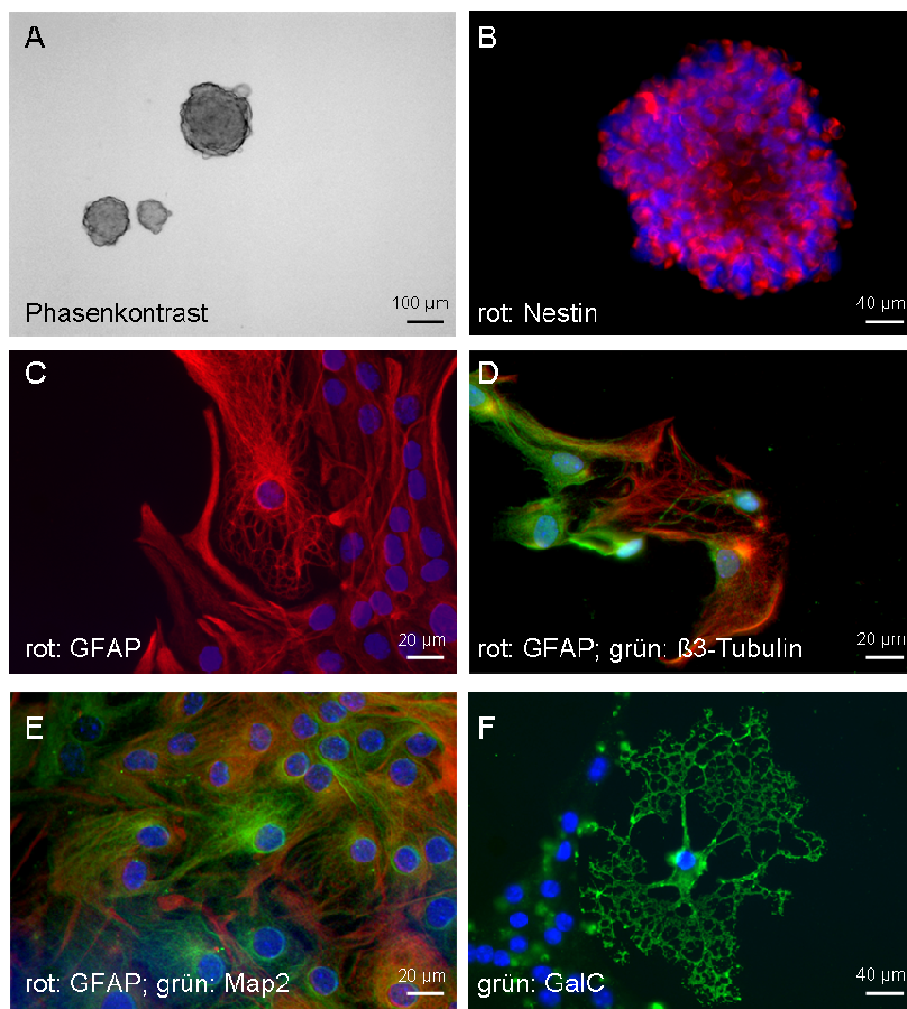
#### **3.1.1. Charakterisierung muriner neuraler Stammzellen (mNSC)**

Murine neurale Stammzellen (mNSC) wurden aus der Subventrikularzone 3 - 6 Wochen alter Mäuse (C57Bl/6) isoliert. In serumfreiem Kulturmedium unter Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factor (EGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)) und der Medienergänzung B27 bildeten diese Zellen frei im Medium schwimmende Sphären, welche nach Immunfluoreszenzfärbung ein positives Expressionsprofil für Nestin zeigten (Abbildung 3.1). Ähnliche Nestin-positive Zellsphären aus der periventrikulären

Region des murinen ZNS wurden erstmals 1992 von Reynolds und Weiss beschrieben und als „Neurosphären“ bezeichnet (Reynolds und Weiss, 1992).

Die Zellen der hier isolierten Neurosphären konnten über mindestens 50 Passagen kultiviert werden, was auf ein ausgedehntes Proliferationsverhalten hindeutet. Damit einhergehend konnte die Fähigkeit zur Selbsterneuerung festgestellt werden, da einzelne Zellen nach klonaler Vereinzlung neue Neurosphären hervorbrachten, deren Zellen wiederum sekundäre Neurosphären bildeten.

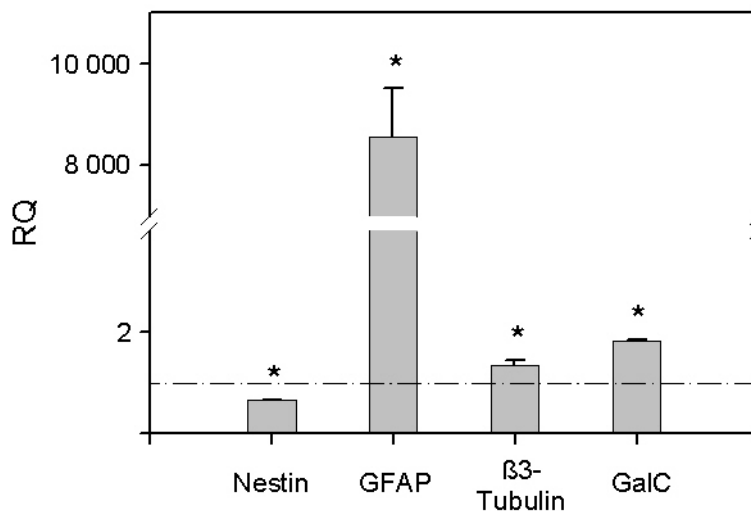
Die Differenzierung der Zellen in die drei Haupt-Zelltypen des ZNS (Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten) konnte durch die Änderung der Kulturbedingungen mittels Zugabe von fötalem Kälberserum, cAMP und Retinsäure induziert werden.



**Abbildung 3.1:** Aus der Subventrikularzone adulter Mäuse isolierte Zellen bilden Neurosphären (A), welche Nestin exprimieren (B). Nach Differenzierung wurden GFAP sowie  $\beta$ 3-Tubulin und Map2 in unterschiedlichen Zellen exprimiert (C, D und E). GalC wurde ebenfalls exprimiert (F). Zellkerne sind in blau dargestellt. Bilder: Fluoreszenzaufnahmen, Maßstabsbalken mit zugehörigen Größen sind unten rechts dargestellt.

Nach Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich ein spezifisches Expressionsmuster für die neuronalen Marker Map2 und  $\beta$ 3-Tubulin einerseits und die glialen Marker GFAP für Astrozyten und GalC für Oligodendrozyten andererseits (Abbildung 3.1). Derartige Fluoreszenzsignale waren bei undifferenzierten Neurosphären nicht detektierbar.

Zur Validierung der Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung wurden die Transkripte verschiedener Zellmarker mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) untersucht. Diese PCR-basierte Methode liefert zum einen objektivere Ergebnisse als die Immunfluoreszenzfärbung. Sie bietet zudem die Möglichkeit einer quantitativen Analyse hinsichtlich der Differenzierung der Zellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Ein quantitativer Vergleich verschiedener Marker von differenzierten und undifferenzierten mNSC durch quantitative *real-time* PCR zeigte eine eindrucksvolle Zunahme des GFAP-Transkripts (> 8000-fach) bei differenzierten Zellen. Demgegenüber wurde eine deutlich geringere Zunahme der Transkripte für  $\beta$ 3-Tubulin (1,3-fach) und GalC (1,8-fach) und sowie eine geringe Abnahme des Transkripts für Nestin (0,8-fach) verzeichnet. Gleichwohl waren alle Änderungen signifikant (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.1:** Relative Quantität (RQ) verschiedener Transkripte von differenzierten mNSC gegenüber undifferenzierten mNSC. Die relative Quantität bezieht sich für jedes Transkript auf seine Quantität in undifferenzierten Zellen. Dieser wird per Definition der Wert „1“ zugewiesen (im Diagramm als gestrichelte Linie eingezeichnet). Jede Messung wurde in mindestens vier Replikaten durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sternchen markieren eine signifikante Änderung der Quantität ( $p < 0,05$ ).

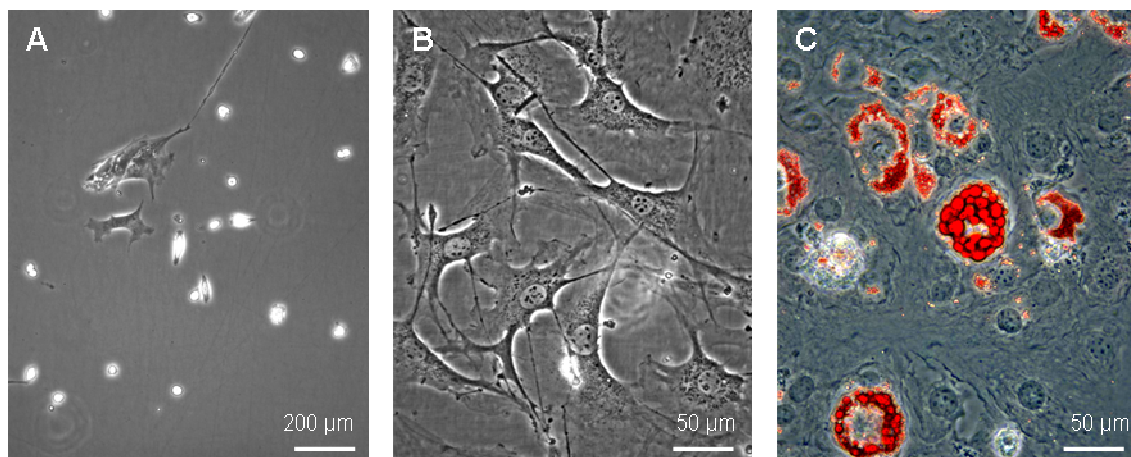
Unter den hier gewählten Differenzierungsbedingungen mit fötalem Kälberserum, cAMP und Retinsäure differenzierten die Zellen also hauptsächlich in astrozytärer Richtung. Dagegen war die Differenzierung zu Neuronen und Oligodendrozyten nur in geringem Maße

festzustellen. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass die hier verwendeten Neurosphären hauptsächlich aus glialen Vorläuferzellen bestehen.

Insgesamt lassen die hier gezeigten Eigenschaften hinsichtlich der Proliferation und Selbsterneuerung, sowie das Differenzierungspotential *in vitro* die Einordnung der verwendeten Zellen aus murinen Neurosphären als murine neurale Stammzellen (*murine Neural Stem Cells*, mNSC) zu.

### 3.1.2. Charakterisierung muriner mesenchymaler Stromazellen (mBMSC)

Der zweite verwendete Zelltyp, die murinen mesenchymalen Stromazellen (mBMSC) wurden aus dem Knochenmark (Tibia und Femur) 3 - 6 Wochen alter Mäuse (C57Bl/6) isoliert. Das Primär-Isolat aus Gesamt-Knochenmark wurde in serumhaltigem Medium (DMEM/F12 (1:1), 20 % FCS) aufgenommen. Bei diesem Isolat handelte es sich um ein Gemisch aus mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stammzellen. Zur Trennung dieser beiden Zelltypen, wurden die adhärenenten Eigenschaften mesenchymaler Stromazellen ausgenutzt. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen heften sich diese an der Plastikoberfläche der Kulturgefäße an. Nicht-adhärenente hämatopoetische Zellen konnten so durch wiederholtes Austauschen des Kulturmediums entfernt werden.

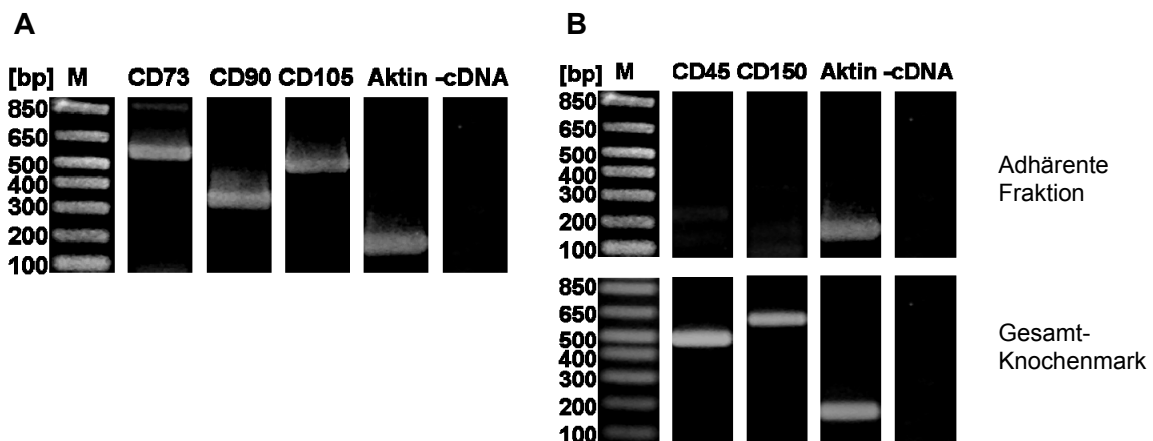


**Abbildung 3.2:** A: Zellen der adhärenenten Fraktion des Knochenmarks zeigen in Primärkultur unterschiedliche Morphologien (rund, spindelförmig, flach ausgedehnt). B: Nach einigen Passagen zeigen die Zellen einen flach ausgedehnten Phänotyp. C: Bei Erreichen der Konfluenz differenzieren die Zellen in adipozytäre Richtung (Färbung von Fettvakuolen mit Oil Red O). Bilder: Phasekontrast, Maßstabsbalken mit zugehörigen Größen sind unten rechts dargestellt.

Die Zellen der adhärennten Fraktion zeigten in Primärkultur unterschiedliche Morphologien. So waren neben kleinen spindelförmigen und runden Zellen auch große flach ausgedehnte Zellen zu beobachten (Abbildung 3.3 A). Der Anteil der flach ausgedehnten Zellen erhöhte sich nach wenigen Zellpassagen, so dass ab Passage 6 die Kultur uniform diesen Phänotyp zeigte (Abbildung 3.3 B). Die Zellen blieben während der folgenden Kultivierung über mittlerweile 100 Passagen morphologisch stabil und zeigten ausgeprägte Proliferationseigenschaften. Somit war der morphologische Wechsel nicht auf die Seneszenz der Zellen zurückzuführen.

Beim Erreichen der Konfluenz stellte sich eine spontane adipozytäre Differenzierung ein (Abbildung 3.3 C), was für murine mesenchymale Stromazellen bereits beschrieben wurde (da Silva Meirelles und Beyer Nardi, 2003). Zur Vermeidung der adipozytären Differenzierung wurde daher ein konfluenten Zustand durch rechtzeitiges Passagieren der Zellen vermieden.

Zur näheren Charakterisierung der Zellen, sowie um eine Verunreinigung der Kultur mit hämatopoetischen Stammzellen auszuschließen, wurde das Expressionsprofil der Zellen mittels RT-PCR untersucht. Die Auswahl der untersuchten Transkripte richtete sich hauptsächlich nach den Kriterien der „*International Society for Cellular Therapie*“ (ISCT) für die Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen (Dominici *et al.*, 2006). Danach müssen mesenchymale Stromazellen CD73, CD90 und CD105 exprimieren und dürfen CD45, als Marker für hämatopoetische Stammzellen, nicht exprimieren. Zusätzlich wurde die Expression von CD150, einem weiteren Marker hämatopoetischer Stammzellen, untersucht. Als Positivkontrolle für obligatorisch-negative Marker wurde cDNA von Gesamt-Knochenmark verwendet.



**Abbildung 3.3:** Die Zellen der adhärennten Fraktion des Knochenmarks exprimieren die Marker CD73, CD90 und CD105 (A) und sind negativ für die Marker CD45 und CD150 (B, oben). Zellen des Gesamt-Knochenmarks exprimieren hingegen CD45 und CD150 (B, unten). Aktin: PCR-Kontrolle. -cDNA: Matrizen-Kontrolle mit den Primern für Aktin. Banden: Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Färbung

Die untersuchten Zellen der adhärennten Fraktion des Knochenmarks exprimierten CD73, CD90 und CD105, wohingegen keine Expression von CD45 und CD150 beobachtet wurde. Die in der adhärennten Fraktion abwesenden Marker konnten jedoch im Gesamt-Knochenmark nachgewiesen werden (Abbildung 3.4).

Die beobachteten morphologischen und proliferativen Eigenschaften, die adipozytäre Differenzierung sowie das Expressionsprofil mesenchymaler Marker lassen den Schluss zu, dass es sich bei den vorhandenen Zellen um mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark handelt (mBMSC).

### **3.2. Retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC**

Zur Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie mit tumortropen Stammzellen ist die stabile Transfektion der Zellen mit dem therapeutischen Transgen wichtig. Eine transiente Transfektion mit epigenetischen DNA-Molekülen birgt die Gefahr, dass Zellen bei nicht ausreichendem Selektionsdruck das Transgen verlieren. Bei einer Behandlung *in vivo* lässt sich ein solcher Selektionsdruck im Organismus aber nicht erzeugen. Daher ist es sinnvoll, das Transgen beispielsweise durch retrovirale Transduktion in das Genom der Wirtszelle zu integrieren.

Die grundsätzliche Machbarkeit der retroviralen Transduktion bei mNSC und mBMSC wurde mit dem Expressionsplasmid pMSCV-EGFP getestet. Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz für das *enhanced green fluorescent protein*, ein Protein, welches nach Anregung ein grünes Fluoreszenzsignal emittiert. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid pMSCV-EGFP zusätzlich eine resistenzvermittelnde kodierende Sequenz gegen Neomycin.

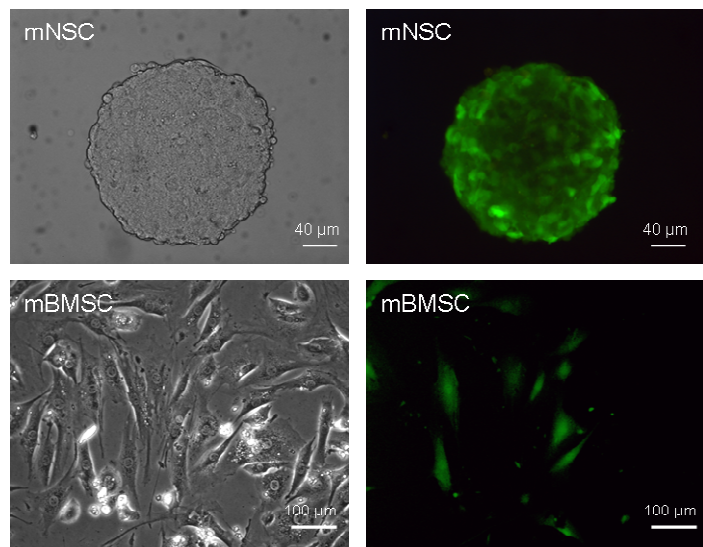
Mittels der Verpackungszelllinie PT67 und des Plasmids pMSCV-EGFP wurden die zur Transduktion verwendeten retroviralen Partikel hergestellt und mit jeweils  $10^5$  mNSC bzw. mBMSC inkubiert (siehe Kapitel 2.1.12). Um eine optimale Interaktion der retroviralen Partikel mit den als Sphären wachsenden mNSC zu gewährleisten, sowie um deren Transduktionseffizienz bestimmen zu können, wurden mNSC im Versuch auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen unter adhärennten Bedingungen kultiviert. Nach dem Ablösen von der Oberfläche durch Trypsin reaggregierten die mNSC rasch wieder zu Neurosphären.

Zur Selektion retroviral transduzierter Zellen wurde dem Kulturmedium nach der retroviralen Transduktion Neomycin zugefügt. Die jeweiligen Neomycin-Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt. Sie betragen  $200 \mu\text{g/ml}$  für mNSC und  $1200 \mu\text{g/ml}$  für mBMSC. Nach etwa 4-6 Tagen setzte ein massives Zellsterben ein, wobei sich im Verlauf weiterer 5-10 Tage einzelne Kolonien neomycin-resistenter Zellen bildeten. Die Effizienz des Gentransfers war dabei für mNSC und mBMSC unterschiedlich. So fanden sich bei mNSC ca. 20-30 Kolonien pro  $10^5$  eingesetzter Zellen. Die Zahl der mBMSC-Kolonien betrug ca. 70-80

pro  $10^5$  initial ausgesäeter Zellen, also mehr als doppelt so viele wie bei mNSC. Unter den gewählten Bedingungen ließen sich mBMSC also erfolgreicher retroviral transduzieren.

Sowohl bei mNSC als auch bei mBMSC war nach der retroviralen Transduktion mit dem Plasmid pMSCV-EGFP eine grüne Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 3.5). Die Intensität der Fluoreszenz variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Zellen des gleichen Zelltyps. So zeigten aus transduzierten mNSC reaggregierte Neurosphären Zonen stärkerer und schwächerer Fluoreszenz. Die Fluoreszenzstärke einzelner mBMSC war ebenfalls sehr heterogen. Dies ist möglicherweise ein Indiz für eine unterschiedliche Kopienzahl des Transgens in verschiedenen Wirtszellen.

**Abbildung 3.5:** mNSC (oben) und mBMSC (unten) zeigen nach retroviraler Transduktion mit dem Plasmid pMSCV-EGFP ein grünes Fluoreszenzsignal. Rechts: Phasenkontrastaufnahme, links: gleiches Gesichtsfeld unter Fluoreszenzlicht. Maßstabsbalken mit entsprechenden Größen sind im Bild unten rechts angegeben.



Grundsätzlich konnten mNSC und mBMSC zur Expression von Transgenen also retroviral transduziert werden, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz. Wie die grüne Fluoreszenz außerdem zeigt, war das hier produzierte Protein funktional. Die Menge der anhand der Transgene produzierten Proteine variierte jedoch von Zelle zu Zelle, was hier in einer unterschiedlichen Signalintensität von Zellen des gleichen Zelltyps resultierte. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die im Versuch verwendeten Selektionsbedingungen und die Ausbeute an retroviral transduzierten Zellklonen.

**Tabelle 3.1:** Selektionsbedingungen und Ausbeute bei der retroviralen Transduktion von mNSC und mBMSC.

Zellen	Selektion Neomycin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Kolonien pro $5 \times 10^5$ eingesetzte Zellen
mNSC	200	20-30
mBMSC	1200	70-80



### 3.3. Untersuchung des rCE/CPT-11 Enzym/Prodrug-Systems in mNSC

Die rCE/CPT-11-Gentherapie sollte zunächst mit mNSC durchgeführt werden, da ihre migratorischen Eigenschaften besser charakterisiert sind und bereits verschiedene Enzym/Prodrug-Modelle in diesen Zellen untersucht sind (Barresi *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005;). Bei erfolgreicher Testung sollte das System dann auf mBMSVC übertragen werden. Das Therapiekonzept sah die Expression einer sekretorischen Form der *rabbit*-Carboxylesterase in mNSC vor. Nach dem Export des Enzyms sollte die rCE im extrazellulären Raum die Prodrug CPT-11 zu dem Topoisomerasehemmer SN38 umsetzen. Dieser sollte dann in proliferierenden Tumorzellen DNA-Strangbrüche verursachen und somit den Zelltod induzieren.

#### 3.3.1. Konstruktion von rCE-Vektoren zur retroviralen Transduktion

Zur Integration des rCE-Gens in das Genom der mNSC mittels retroviraler Transduktion wurden verschiedene Vektoren auf Basis des Plasmids pMSCV konstruiert. Gene, welche in dieses Plasmid eingefügt werden, werden von zwei *long-terminal-repeat*-Sequenzen flankiert (5'-LTR, 3'-LTR). Diese gewähren eine konstitutive Genexpression in Säugerzellen (Produktinformation BD-Biosciences). Die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellte Sequenz der rCE unterschied sich von der Originalsequenz durch die Deletion der letzten 18 Nukleotide vor dem Stopp-Codon. Der von dieser Sequenz aus produzierten Carboxylesterase fehlt somit ein carboxyterminales Signalpeptid. Dieses ist für die Retention des Enzyms in der Zelle verantwortlich. Bei fehlender Signalsequenz wird das Protein in den Extrazellulärraum exportiert. Dieser Export ist gewünscht, um die Prodrug CPT-11 außerhalb der rCE-produzierenden Zellen zu aktivieren und somit diese nicht dem zytotoxischen Einfluss der umgesetzten Prodrug auszusetzen. Zur Kennzeichnung dieser Sequenzmodifikation wird die kodierende Sequenz im Folgenden als *rCEsec* und das modifizierte Protein als *rCEsec* bezeichnet.

Zur Konstruktion der Vektoren wurde die kodierende Sequenz der *rCEsec* mittels PCR amplifiziert und durch die von den PCR-Primern vermittelten Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in das Plasmid pMSCV eingefügt.

Neben einem Vektor mit der unveränderten *rCEsec*-Sequenz wurde nach demselben Prinzip ein weiterer Vektor mit einer sogenannten Kozak-Sequenz am 5'-Ende der kodierenden *rCEsec*-Sequenz hergestellt. Die Kozak-Sequenz ist ein Konsensus-Motiv für die eukaryotische Translationsinitiation. Für eine Steigerung der Translationsinitiation scheint dabei neben einer Purin-Base an der -3 Position bezüglich des AUG-Startcodons eine

Guanin-Base unmittelbar nach dem Startcodon wichtig zu sein (Kozak, 1989). Die Kozak-Sequenz wurde über einen entsprechenden Hin-Primer an die *rCEsec*-Sequenz mittels PCR angefügt. Die nötige Guanin-Base an der Position +4 wurde dabei mit einem zusätzlichen Glycin-Codon integriert. Das nach dieser Sequenz produzierte *rCEsec*-Protein wies somit die Aminosäure Glycin statt Tryptophan am N-Terminus auf.

Ein Sequenzvergleich der konstruierten Plasmide mit der Referenzsequenz für die *rabbit*-Carboxylesterase AF036930 (Genbank) zeigte eine Transitionsmutation der Base 304. Entgegen der Referenzsequenz lag bei den hier hergestellten Plasmiden eine Cytosin-Base statt einer Thymin-Base vor. Die T-C-Transition war ebenfalls in dem von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Plasmid zu finden. Von der Mutation ist die Aminosäure 101 des *rCE*-Proteins betroffen, an deren Position statt Phenylalanin die Aminosäure Serin in die katalytische Domäne des Enzyms eingebaut wird. Zur Behebung der Mutation wurde mit den konstruierten Plasmiden eine ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese durchgeführt. Dabei wurde die Thymin-Base durch eine Cytosin-Base ausgetauscht und somit die Originalsequenz wieder hergestellt. Einen Überblick über die konstruierten Plasmide mit ihren verschiedenen Insert-Sequenzen gibt Tabelle 3.2.

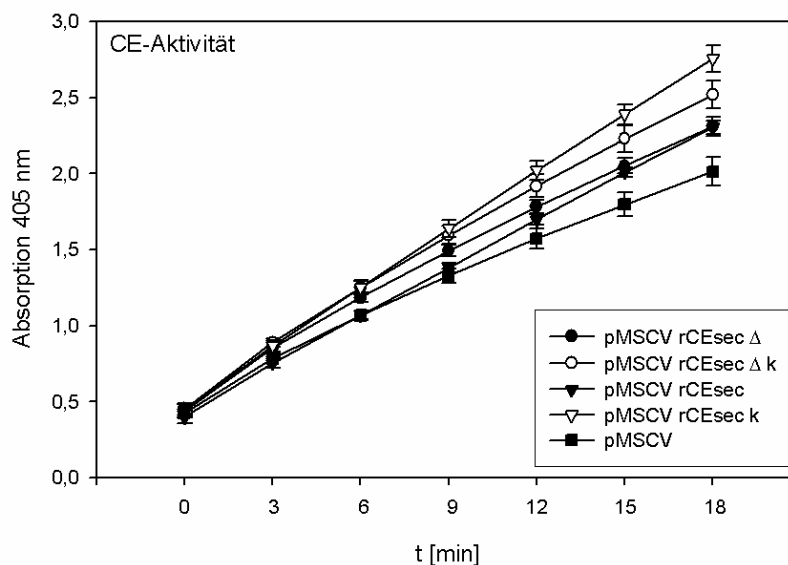
**Tabelle 3.2:** Auf dem Vektor pMSCV basierende Expressionsplasmide mit *rCEsec*-Insert.

<i>Vektor</i>	<i>rCEsec-Insert</i>	<i>T – C Transition</i>	<i>Kozak-Sequenz</i>
pMSCV	-		
pMSCV <i>rCEsec</i> Δ	+	+	-
pMSCV <i>rCEsec</i> Δ k	+	+	+
pMSCV <i>rCEsec</i>	+	-	-
pMSCV <i>rCEsec</i> k	+	-	+

### 3.3.2. CE-Aktivität im konditionierten Medium retroviral transduzierter mNSC

Die von den oben genannten Plasmiden mit *rCEsec*-Insert produzierte Carboxylesterase soll durch das Fehlen einer Retentions-Signalsequenz aus den produzierenden Zellen ins Medium ausgeschleust werden. Daher sollte im konditionierten Medium transduzierter Zellen eine Erhöhte CE-Aktivität festzustellen sein. Zur Ermittlung dieser Aktivität im konditionierten Medium wurde ein Aktivitätstest mit ortho-Nitrophenyl-Acetat (o-NPA) durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.5). Nitrophenyl-Acetat wird von Carboxylesterasen zu Nitrophenol umgesetzt. Die Produktentstehung kann photometrisch durch die Erhöhung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden.

Für den Aktivitätstest wurden mNSC, welche mit den verschiedenen Plasmiden transduziert worden waren, in einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 10 ml Neurobasalmedium inkubiert. Das so konditionierte Medium wurde nach 48 h entnommen und auf CE-Aktivität untersucht. Sowohl zwischen den verschiedenen *rCEsec*-tragenden mNSC als auch im Vergleich zu mNSC mit dem Leervektor pMSCV konnte initial kein Unterschied in den CE-Aktivitäten des Mediums festgestellt werden. Erst nach zehnfacher Einengung des Mediums durch Zentrifugation von 10 ml auf 1 ml war eine ausreichende Proteinkonzentration erreicht, um im Assay eine differenzielle Aktivität zu beobachten (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Carboxylesterase-Aktivität im Medium unterschiedlich transduzierter mNSC. Die Umsetzung von *o*-NPA zu Nitrophenol wurde bei 405 nm photometrisch erfasst und gegen die Inkubationszeit graphisch dargestellt. Im Assay wurde zehnfach konzentriertes Medium untersucht, dessen Proteinkonzentrationen auf  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  normiert worden war. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen. Alle Unterschiede der CE-Aktivitäten bei Zeitwert 18 min sind signifikant ( $p < 0,05$ ), mit Ausnahme der Werte pMSCV *rCEsec* und pMSCV *rCEsec*  $\Delta$ . Hier wurden keine Unterschiede in der Aktivität festgestellt.

Im Vergleich zu Leervektor-transduzierten mNSC zeigte das konditionierte Medium von mit dem Plasmid *pMSCV rCEsec k* transduzierten mNSC die höchste Carboxylesterase-Aktivität. In der *rCEsec*-Sequenz dieses Plasmids wurde die T-C-Mutation an Position 304 behoben, zusätzlich wurde zur Erhöhung der Translationsinitiation eine Kozak-Sequenz eingefügt. Die Verwendung des gleichen Vektors mit Kozak-Sequenz, allerdings mit vorhandener T-C-Mutation, resultierte in einer geringeren Aktivität, die dennoch signifikant höher war, als die des Kontrollmediums. Die Carboxylesterase-Aktivitäten von Zellen, die mit Vektoren ohne Kozak-Sequenz transduziert worden waren, unterschied sich nicht signifikant voneinander, unabhängig davon, ob eine Mutation an Position 304 vorlag, oder nicht. Insgesamt war hier die Aktivität noch niedriger, wenngleich gegenüber dem Kontrollvektor pMSCV signifikant erhöht.

Die korrekte Sequenz an Position 304 scheint sich also in geringem Maße auf die Aktivität des rCEsec-Proteins auszuwirken. Sie betrifft, wie bereits erwähnt, die katalytische Domäne des Enzyms. Dennoch ist ein rCEsec-Protein mit einer vorhandenen Mutation enzymatisch aktiv. Der wesentliche Faktor für eine gesteigerte CE-Aktivität im Medium ist offensichtlich die Menge an exportierter Carboxylesterase. Diese lässt sich augenscheinlich durch die Verwendung einer Kozak-Sequenz steigern, welche eine verbesserte Translationsinitiation bewirkt.

Insgesamt ist die CE-Aktivität im Medium aller untersuchten mNSC sehr gering gegenüber den Kontrollzellen. Daher tritt die Basis-Aktivität des mit Kontrollzellen konditionierten Mediums im Assay überdeutlich hervor. Diese Basisaktivität könnte durch Enzyme im konditioniertem Medium oder Zerfall des Substrates während der Versuchsdauer verursacht worden sein. Vermutlich ist die von rCEsec-tragenden mNSC produzierte Enzymmenge zu gering, um eine deutlich stärkere Aktivität hervorzurufen. Dies zeigt auch der Umstand, dass erst bei zehnfacher Konzentrierung der konditionierten Medien unterschiedliche Aktivitäten festzustellen waren.

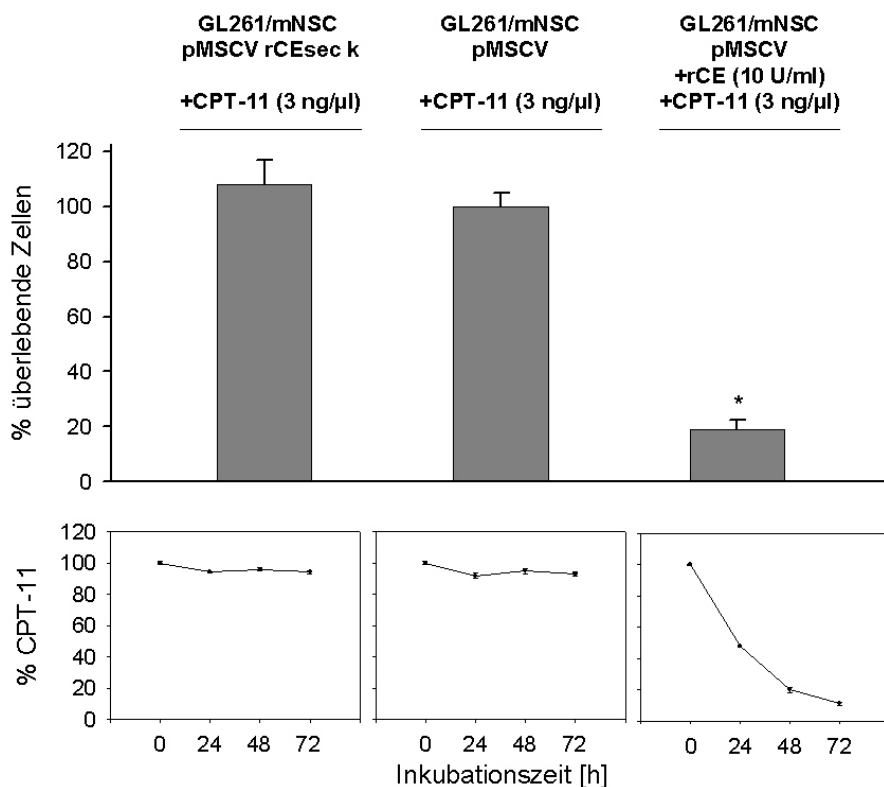
### **3.3.3. Untersuchung des „Bystander“-Effektes rCEsec-produzierender mNSC auf GL261**

In einer mNSC-vermittelten Enzym/Prodrug-Gentherapie mit dem Enzym rCEsec und der Prodrug CPT-11 sollen mNSC am/im Tumor lokalisieren und dort die rCEsec produzieren. Das exportierte Enzym soll dann im Extrazellularraum die Prodrug CPT-11 zu dem Topoisomerasehemmer SN38 umsetzen, wodurch DNA-Schäden in proliferierenden Tumorzellen induziert werden sollen. Die von transduzierten mNSC erzeugte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen, welche die Prodrug selbst nicht aktivieren, wird auch als „Bystander“-Effekt bezeichnet.

Um diesen Effekt *in vitro* zu testen, wurden mNSC mit der murinen Gliomzelllinie GL261 kokultiviert. Die verwendeten mNSC waren dabei mit dem Vektor *pMSCV rCEsec* transduziert, welcher im Vorversuch die höchste CE-Aktivität im konditionierten Medium hervorrief. Zur Kontrolle wurden Leervektor-transduzierte mNSC verwendet. Jeweils 1000 mNSC wurden mit 1000 GL261-Zellen in die Kavitäten einer 96-Loch-Platte gesät und mit 3 ng/µl CPT-11 für 72 h inkubiert. Die verwendete CPT-11-Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt, sie zeigte dabei keinen Effekt auf mNSC und nur einen geringen zytotoxischen Effekt auf GL261. Bei der Umsetzung zu SN38 sollte sich der zytotoxische Effekt also maßgeblich erhöhen. Als Positivkontrolle wurden mit dem Leervektor transduzierte mNSC mit GL261 unter Zugabe rekombinanter rCE (10 U/ml) inkubiert. Der Versuch wurde in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum durchgeführt. In Anwesenheit von Serum

gehen mNSC aus dem proliferativen Zustand zur Differenzierung über. Dieser Umstand spiegelt die Bedingungen *in vivo* wieder und ist für die Durchführung der Therapie wünschenswert, da von dem verwendeten Therapiesystem nur proliferierende Zellen angegangen werden.

Während der dreitägigen Inkubationsdauer wurde die CPT-11-Konzentration täglich photometrisch gemessen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden überlebende Zellen durch ihren Umsatz an AlamarBlue detektiert (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Kokulturassay mit GL261 und transduzierten mNSC in Anwesenheit von CPT-11. Nach dreitägiger Inkubationsdauer wurden lebende Zellen mittels AlamarBlue detektiert (oben). Der Signalstärke im Kontrollansatz GL262/mNSC pMSCV wurde zur Normierung der Wert 100 % zugewiesen. Signifikante Änderungen sind mit „\*“ gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). Die CPT-11 Konzentration wurde über den gesamten Versuchszeitraum gemessen und im Verhältnis zur Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt 0 h prozentual aufgetragen (unten). Die Unterschiede im Ansatz der Positivkontrolle mit zusätzlicher rekombinanter Carboxylesterase, GL261/mNSC pMSCV + rCE, sind signifikant ( $p < 0,05$ ). Alle Ansätze wurden in Quadruplikaten durchgeführt.

Weder in dem Ansatz der mit dem Leervektor transduzierten mNSC, noch bei rCEsec-produzierenden mNSC konnte ein vermindertes Zellüberleben der Tumorzellen festgestellt werden. Die nach Versuchsende vorhandene Menge an Zellen war in beiden Ansätzen gleich. Hingegen reduzierte sich die Zahl der überlebenden Zellen im Ansatz mit rekombinanter rCE deutlich auf ca. 20%. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit der Änderung der während des Versuchs gemessenen CPT-11-Menge. Bereits nach 24 h waren im Ansatz mit rekombinanter rCE ca. 50 % des initial eingesetzten CPT-11 umgesetzt, nach 72 h war ein fast vollständiger CPT-11-Umsatz zu beobachten. Hingegen konnte in den Ansätzen ohne rekombinante rCE kein signifikanter CPT-11-Umsatz detektiert werden.

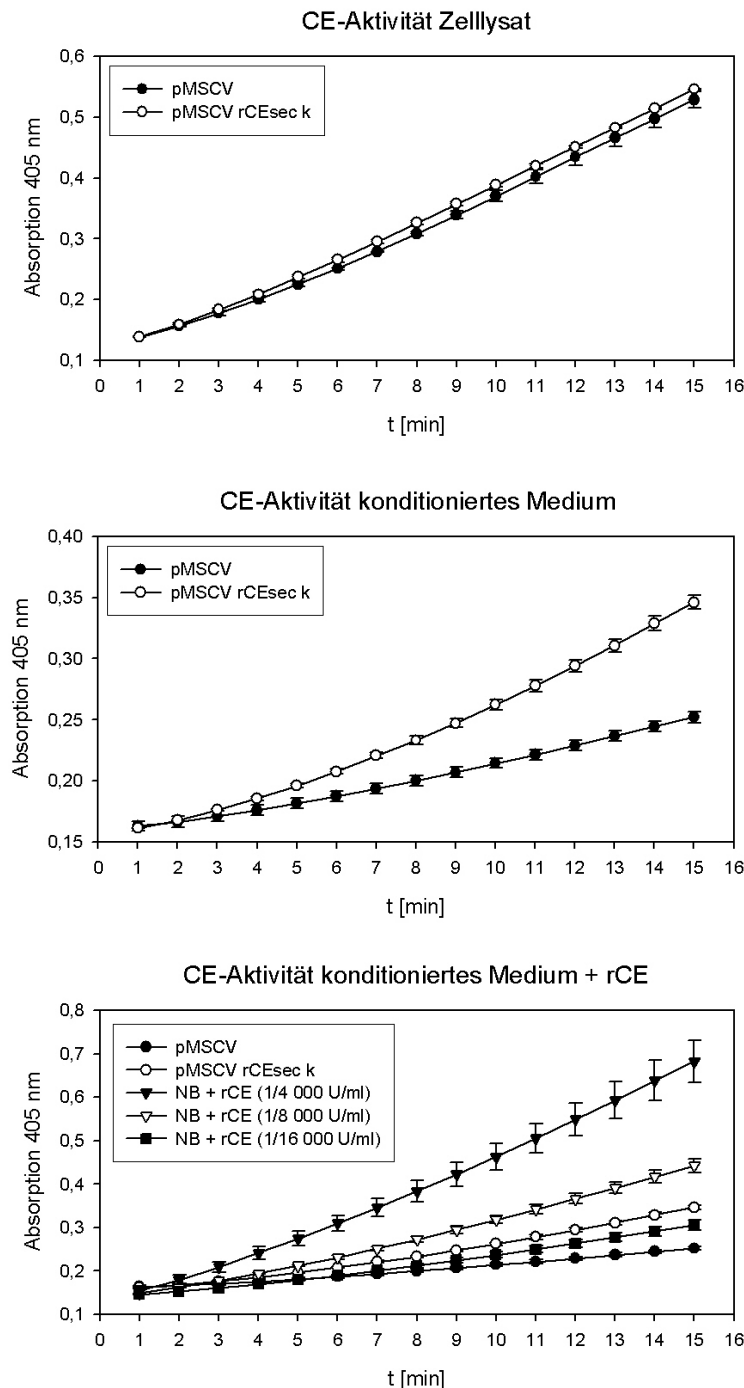
rCEsec produzierende mNSC konnten also in Kombination mit der Prodrug CPT-11 keinen gesteigerten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen GL261 hervorrufen, der zum Absterben der Zellen geführt hätte. Die von den mNSC gezeigte CE-Aktivität reichte des weiteren nicht aus, um CPT-11 messbar umzusetzen. Hingegen konnte durch die Verwendung rekombinanter rCE, wie in der Positivkontrolle des Versuchs gezeigt, durch den Umsatz von 3 ng/ $\mu$ l CPT-11 das Überleben der Tumorzellen massiv reduziert werden. Dies zeigt, dass der gewählte Experimentalansatz grundsätzlich funktioniert. Allerdings wurden mit 10 U/ml in der Positivkontrolle große Mengen des Enzyms eingesetzt, einer Menge, die von rCE-produzierenden mNSC wahrscheinlich nicht erreicht wird. Daher soll die von mNSC gezeigte CE-Aktivität im nächsten Versuch quantitativ untersucht werden.

### 3.3.4. Quantifizierung der CE-Aktivität transduzierter mNSC

In Vorversuchen zeigten mNSC, welche mit dem Vektor *pMSCV rCEsec k* transduziert worden waren, eine gesteigerte CE-Aktivität im konditionierten Medium (siehe Kapitel 3.3.2). Diese Aktivität war jedoch nicht ausreichend, um durch Umsetzung der Prodrug CPT-11 signifikante Mengen an Tumorzellen abzutöten (siehe Kapitel 3.3.3). Vermutlich war die von mNSC produzierte und exportierte Menge an rCEsec zu gering. Um die Aktivität daher quantitativ beurteilen zu können, wurde das Zelllysat und das konditionierte Medium transduzierter mNSC untersucht, wobei im Aktivitätstest auch unterschiedliche Mengen rekombinanter rCE als Positivkontrollen eingesetzt wurden.

Zur Konditionierung des Mediums wurden transduzierte mNSC in 20 ml serumfreiem Medium in einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium entnommen und in Konzentratoren auf ein Zwanzigstel des ursprünglichen Volumens eingengt. Die Zellen wurden in ECB-Puffer lysiert und bei  $13\,000 \times g$  für 10 min zentrifugiert, wobei das Sediment verworfen und der Überstand als zytosolische Fraktion gesammelt wurde. Die Proteinkonzentration aller Suspensionen wurde gemessen und auf 5  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt. Im CE-Aktivitätstest mit o-NPA wurden immer Suspensionen von mit dem

Leervektor transduzierten mNSC mit rCEsec-produzierenden mNSC verglichen. Diese waren mit dem Vektor *pMSCV rCEsec k* transduziert. Als Positivkontrolle wurde Neurobasalmedium eingesetzt, welches verschiedene Mengen rekombinanter rCE enthielt.

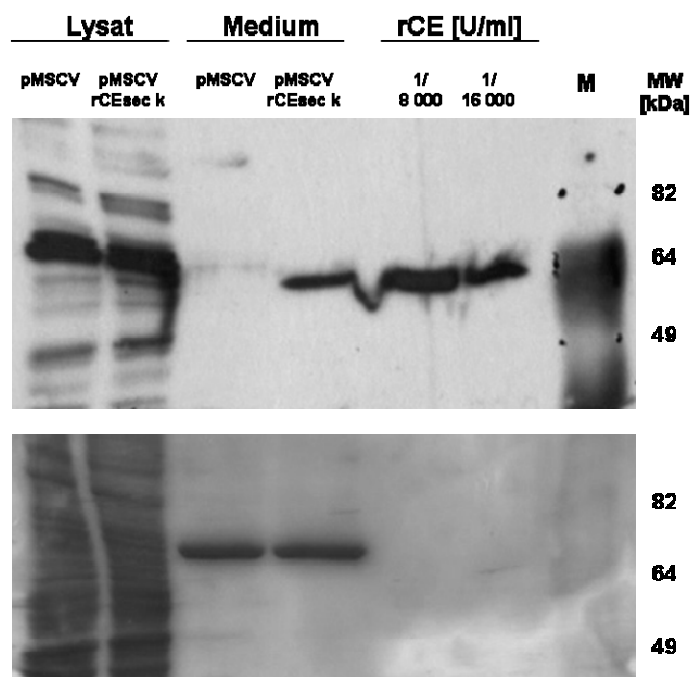


**Abbildung 3.8:** CE-Aktivität in Zelllysat und konditioniertem Medium transduzierter mNSC. Der Umsatz an o-NPA zu Nitrophenol wurde bei 405 nm photometrisch erfasst und gegen die Zeit aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen von Zelllysat (oben) und konditioniertem Medium (mitte, unten) waren auf 5 µg/µl eingestellt. Rekombinante rCE wurde dem unbehandelten Neurobasalmedium als Positivkontrolle hinzugefügt. Im Assay wurden jeweils 10 µl Proteinsuspension in 100 µl Substratlösung untersucht, alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Unterschiede in den CE-Aktivitäten der Medien bei dem Zeitwert 15 min sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

Wie schon im Vorversuch (siehe Kapitel 3.3.2) zeigten hier rCEsec-produzierende mNSC gegenüber mit dem Leervektor transduzierten Zellen eine gesteigerte CE-Aktivität im konditionierten Medium (Abbildung 3.8). Hingegen waren die CE-Aktivitäten in den zytosolischen Fraktionen der Zelllysate gleich. Dies deutet darauf hin, dass die zur zelleigenen CE zusätzlich produzierte rCEsec nicht in der Zelle verbleibt, sondern tatsächlich in das Medium exportiert wird. Ein Vergleich der CE-Aktivitäten des Mediums mit verschiedenen Mengen rekombinanter rCE zeigte jedoch, wie gering die zusätzliche CE-Aktivität des konditionierten Mediums tatsächlich ist. Die Aktivität des Mediums von mNSC mit dem Vektor *pMSCV rCEsec k* lag im Bereich der Signale der Kontrollmedien, welche zusätzlich 1/8 000 bzw. 1/16 000 U/ml rekombinanter rCE enthielt. Der Verlauf der Absorptionsänderung ließ dabei eine Konzentration von etwas mehr als 16 000 U/ml vermuten.

Um auszuschließen, dass die geringe gemessene Aktivität nicht durch weniger aktive rCEsec verursacht wurde, sondern tatsächlich mit einer zu geringen Proteinmenge korrelierte, wurden die im Aktivitätstest eingesetzten Suspensionen mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurde von jeder Proteinsuspension ein Volumen von 10 µl verwendet, was einer Proteinmenge von 50 µg entsprach. Von den Suspensionen mit rekombinanter rCE (1/ 8 000 und 1/16 000 U/ml) wurden ebenfalls 10 µl aufgetragen. Durch die Verwendung gleicher Volumina in den unterschiedlichen Ansätzen des Aktivitätstest sowie im Western-Blot ließen sich somit die Signalstärken des Blots mit den gemessenen Aktivitäten der Suspensionen vergleichen (Abbildung 3.9).

**Abbildung 3.9:** Western-Blot (oben) und SDS-PAGE (unten) der im Aktivitätstest untersuchten Proteinsuspensionen. Alle Proben wurden in einem Volumen von 10 µl aufgetragen (entspricht 50 µg Gesamtprotein für Lysat und Medium). Die Höhen der Banden des Molekulargewichtsmarkers (M) sind mit dem zugehörigen Molekulargewicht rechts angegeben. Die Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels bestätigt die Auftragung gleicher Proteinmengen von Lysat und Medium.





Im Western-Blot konnte eine deutliche Bande im konditionierten Medium von den mit *pMSCV rECsec k* transduzierten mNSC festgestellt werden. Diese befand sich im Bereich von 64 kDa und fehlte im Medium der pMSCV-Kontrollzellen. Banden auf gleicher Höhe bei den Medien mit zusätzlicher rekombinanter rCE ließen den Schluss zu, dass dieses Signal von der ca. 62 kDa schweren rCEsec verursacht wurde. Der Vergleich der Banden zeigte, dass die Signalintensität des rCEsec-konditionierten Mediums etwa der Intensität des Kontrollmediums mit 1/16 000 U/ml rCE entsprach. Das Bandenmuster des Zelllysates wurde vermutlich durch unspezifische Bindung des verwendete Erst- oder Zweitantikörpers verursacht. Die prominenten Banden auf einer Höhe von 64 kDa könnten dabei von der murinen CE verursacht worden sein.

Wie durch die Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, entsprach die CE-Aktivität von mNSC-konditioniertem Medium nach Transduktion mit dem Vektor *pMSCV rCEsec k* etwa der Aktivität einer Suspension mit 1/16 000 U/ml rekombinanter rCE. Dabei ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass das konditionierte Medium der mNSC zur Untersuchung von 20 ml auf 1 ml ca. 20fach aufkonzentriert wurde. Das bedeutet, dass sich in 20 ml Medium nur ca. 1/16 000 U rCEsec befand. Diese Ausbeute ist bei insgesamt  $10^7$  eingesetzten Zellen verschwindend gering und erklärt die ernüchternden Ergebnisse des Kokultur-Versuchs (siehe Kapitel 3.3.3). Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit den hier retroviral transduzierten mNSC keine rCE/CPT-11 Gentherapie durchgeführt werden konnte, da die dazu nötige Menge an rCE nicht ausreichte.

### **3.4. Untersuchung des PNP-Enzym/Prodrug-Systems in mNSC und mBMSC**

Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, war die Durchführung einer rCE/CPT-11 Gentherapie mit mNSC nicht möglich. Die von mNSC produzierte Menge an rCE war nicht ausreichend, um die Prodrug CPT-11 effektiv zu aktivieren. Auf eine Untersuchung des Systems mit mBMSC wurde aus diesen Gründen verzichtet. Stattdessen wurden sowohl mNSC als auch mBMSC bezüglich der Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie mit dem PNP-Enzym/Prodrug-System getestet.

Im Rahmen der PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie werden fluorierte Adenosin-Analoga als Prodrugs von der *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) zu toxischen Metaboliten umgesetzt. Das von PNP produzierte Intermediat 2-Fluoro-Adenin (FAde) wird dabei intrazellulär zu 2-Fluoro-Adenosin-triphosphat (FATP) und 2-Fluoro-Desoxyadenosin-triphosphat (FdATP) umgewandelt. Die zytotoxische Wirkung dieser Metaboliten beruht auf der Inhibition der DNA- und RNA-Synthese, wodurch letztendlich auch die Proteinsynthese der betroffenen Zellen zum Stillstand kommt.

Im hier untersuchten Therapiekonzept sollten transduzierte migratorische mNSC und mBMSC das Enzym PNP am Tumor herstellen und somit die Prodrugs lokal aktivieren. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Ansatz mit sekretorischer Carboxylesterase verbleibt die PNP als Prodrug-aktivierendes Enzym jedoch in der produzierenden Zelle und setzt dort die Prodrugs um. Ein „Bystander“-Effekt auf nicht-produzierende Tumorzellen ist dennoch gegeben, da der Metabolit FAd die Zellmembran passieren und somit in benachbarte Tumorzellen eindringen kann.

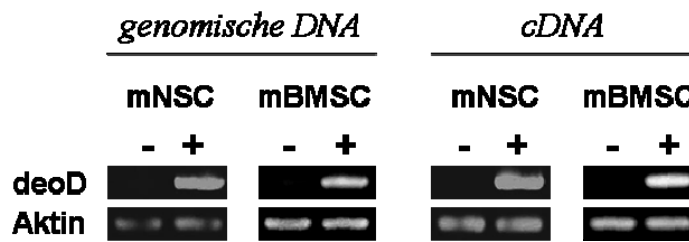
### **3.4.1. Konstruktion eines PNP-Expressionsplasmids und Produktion der PNP in retroviral transduzierten mNSC und mBMSC**

Da ein geeigneter Vektor mit der für die *E. coli*-PNP kodierenden Sequenz, *deoD*, nicht zur Verfügung stand, wurde dieser auf der Basis des in dieser Arbeit bereits verwendeten Vektors pMSCV neu konstruiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz *deoD* aus der Gesamt-DNA von *E. coli* mittels PCR amplifiziert. Wie bei der Konstruktion der *rCEsec*-Plasmide in Kapitel 3.3.1 wurden dem *deoD*-Gen durch die verwendeten Primer die flankierenden Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* sowie eine Kozak-Sequenz am 5'-Terminus vermittelt. Die Ligation dieses Amplikons erfolgte über die entsprechenden Schnittstellen wiederum in den Vektor pMSCV. Der im Folgenden für die retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC verwendete Vektor wurde als pMSCV-*deoD* bezeichnet.

Zur Produktion der *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase wurden mNSC und mBMSC mit dem Plasmid pMSCV-*deoD* retroviral transduziert. Von diesem Vektor soll das *deoD*-Gen konstitutiv exprimiert werden. Als Negativkontrolle diente der entsprechende Leervektor ohne *deoD*-Insert, pMSCV.

Zunächst wurde die Integration des Transgens *deoD* in das Genom der Wirtszellen mittels PCR nachgewiesen. In der genomischen DNA von mNSC und mBMSC, welche mit dem Plasmid pMSCV-*deoD* transduziert worden waren, fand sich die entsprechende *deoD*-Sequenz. Hingegen fehlt das Amplikon in den mit dem Leervektor pMSCV transduzierten Zellen (Abbildung 3.10).

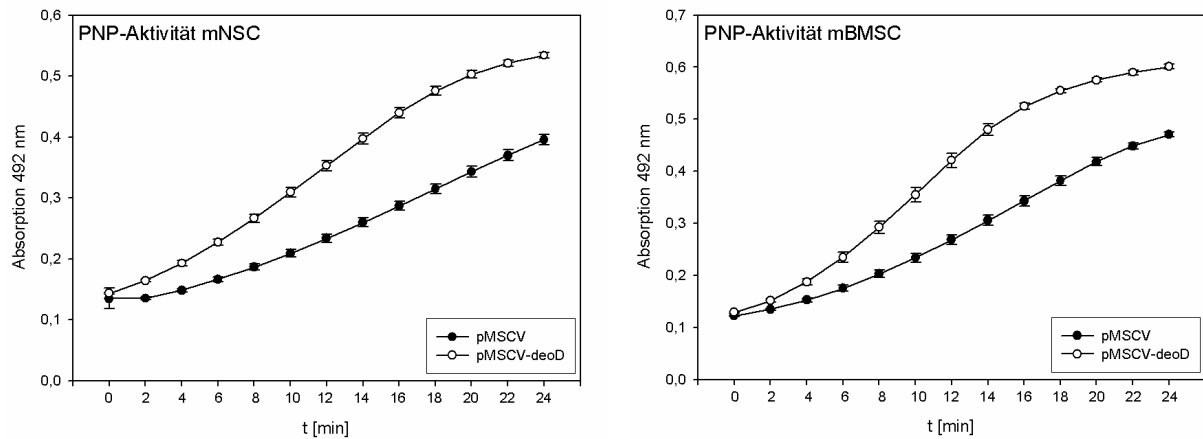
Die Expression des *deoD*-Gens konnte durch die Detektion des *deoD*-Transkriptes mittels RT-PCR festgestellt werden. Die PCR mit komplementärer DNA (cDNA) von mNSC und mBMSC als Matrize zeigte ein entsprechendes Amplikon für pMSCV-*deoD* transduzierte Zellen. Dieses war wiederum in den Kontrollzellen nicht zu finden (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** Mit dem Plasmid pMSCV-deoD transduzierte Zellen (mit „+“ gekennzeichnet) integrieren die *deoD*-Sequenz in das Genom (links) und zeigen das entsprechende Transkript (rechts), im Gegensatz zu den mit dem Leervektor pMSCV transduzierte Zellen (mit „-“ gekennzeichnet). Aktin: PCR-Kontrolle. Banden: Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Färbung

Da kommerziell produzierte Antikörper für einen Western-Blot gegen die *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase nicht erhältlich waren, wurde die Existenz des PNP-Proteins hier indirekt durch einen Aktivitätstest nachgewiesen. Der durchgeführte Test nach Le Tissier *et al.* (1994) misst dabei die gesamte PNP-Aktivität der Zellen, also auch die Aktivität der zelleigenen Säuger-PNP (siehe Kapitel 2.4.4). Zellen, die vom Plasmid pMSCV-deoD ausgehend zusätzlich die *E. coli*-PNP produzieren, sollten insgesamt eine erhöhte PNP-Aktivität zeigen. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Prodrugs der PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie nur von der *E. coli*-PNP umgesetzt werden. Aufgrund der geringen Substratspezifität der Säuger-PNP für diese Metaboliten ist der zelleigene Umsatz vernachlässigbar klein.

In dem nach Le Tissier *et al.* durchgeführten Aktivitätstest wird der Umsatz des Substrates Inosin durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase photometrisch als Absorptionswert erfasst und kann als Funktion der Zeit graphisch dargestellt werden. Der Aktivitätstest wurde mit dem Gesamt-Zellysate pMSCV-deoD transduzierter mNSC und mBMSC durchgeführt. Als Kontrolle dienten wiederum Zellen, welche mit dem Leervektor pMSCV transduziert worden waren. Sowohl bei mNSC als auch bei mBMSC konnte eine signifikante Erhöhung der PNP-Aktivität von pMSCV-deoD transduzierten Zellen festgestellt werden. Diese lag deutlich über der Basisaktivität der Kontrollzellen, welche von der zelleigenen Säuger-PNP verursacht wurde (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11:** PNP-Aktivität mit den Vektoren pMSCV und pMSCV-deoD transduzierter mNSC (links) und mBMSC (rechts). Im Diagramm ist die Absorption bei 492 nm als Funktion der Zeit dargestellt. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Zellysate betragen 1,1 µg/µl für mNSC und 1,5 µg/µl für mBMSC. Dies erklärt den schnelleren Substratumsatz bei mBMSC im Vergleich zu mNSC. Die Absorptionsänderung bei pMSCV transduzierten Zellen wird durch die zelleigene PNP verursacht. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, Fehlerbalken geben Standardabweichungen an. Ab dem Zeitwert t = 4 min sind alle Unterschiede in der Absorption signifikant ( $p < 0,05$ ).

Somit konnte gezeigt werden, dass mit dem Vektor pMSCV-deoD transduzierte mNSC und mBMSC das Gen der *E. coli*-PNP, *deoD*, exprimierten. Diese Expression führte zu einer aktiven *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase. Zudem war das *deoD*-Gen stabil in das Genom der Wirtszellen integriert und wurde konstitutiv exprimiert.

### 3.4.2. Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-produzierende mNSC und mBMSC

Wie bereits beschrieben, werden fluorierte Adenosin-Analoga als Prodrugs von der *E. coli* Purin-Nukleosid-Phosphorylase zu toxischen Metaboliten umgesetzt. Diese könne zwar die Zellmembran passieren und so mittels „Bystander“-Effekt auf umgebende Tumorzellen wirken. Allerdings sind die PNP-produzierenden Zellen, in welchen die Prodrugs umgesetzt werden, ebenfalls von dem zytotoxischen Effekt der Metaboliten betroffen. Im vorliegenden Versuch sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf das Überleben von PNP-produzierenden mNSC und mBMSC haben. Dabei sollten bei einer erfolgreichen Umsetzung der Prodrugs durch PNP die Zellen mit aktiver *E. coli*-PNP eher absterben, als die mit dem Leervektor transduzierten Zellen. Ein signifikanter Unterschied im Überleben der Zellen gäbe auch Hinweise darauf, dass für einen „Bystander“-Effekt ausreichende Mengen der Prodrugs umgesetzt werden könnten.

### 3.4.2.1. Wirkung der Prodrugs auf PNP-produzierende mNSC

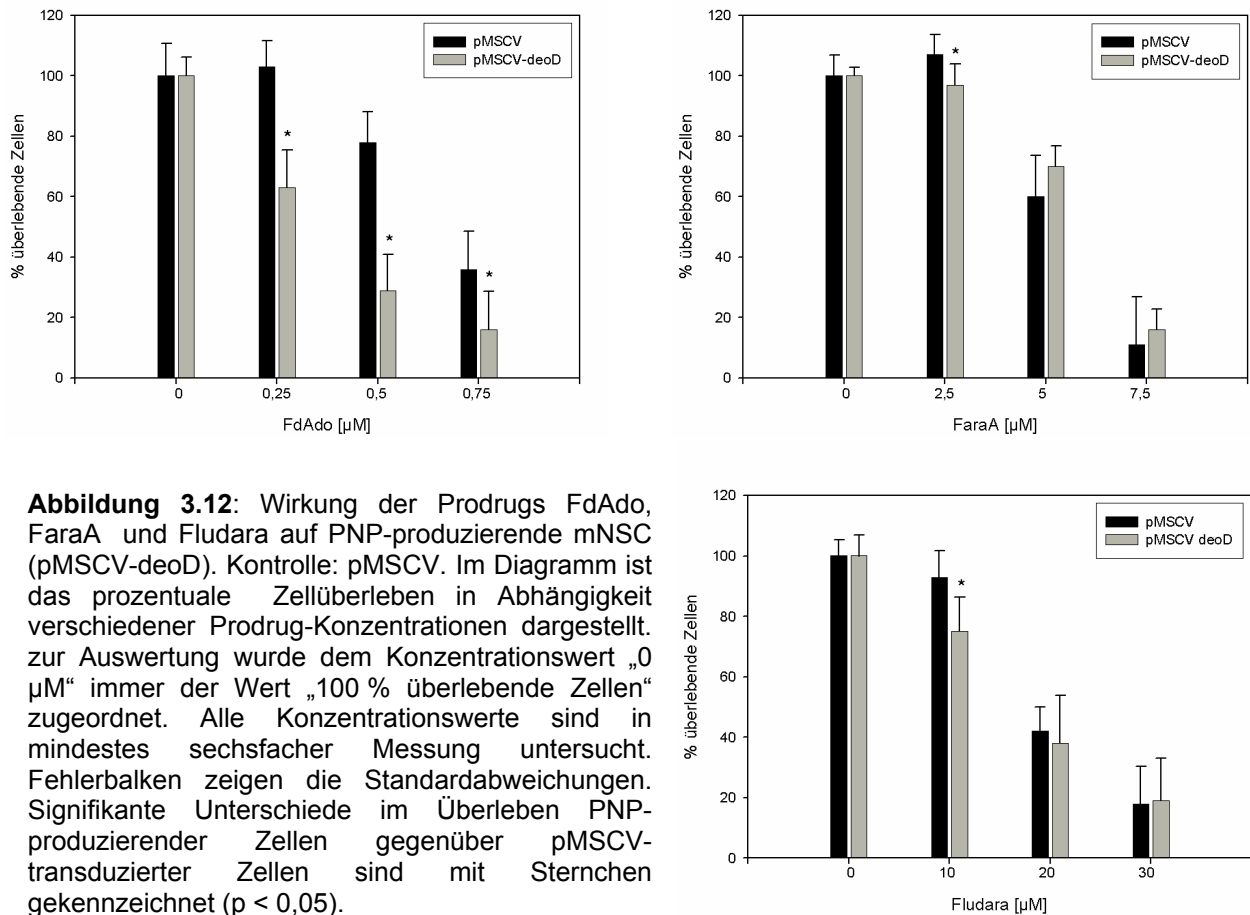
Die Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo wurden zunächst in ihrer Wirkung auf murine neurale Stammzellen (mNSC) untersucht. Diese waren entweder mit dem Plasmid pMSCV-deoD oder mit dem Kontrollplasmid pMSCV retroviral transduziert und zeigten dementsprechend PNP-Aktivität oder nicht (siehe Kapitel 3.4.1). Die Zellen wurden im 96-Lochplatten-Format ( $10^3$  Zellen pro Kavität) für 5 Tage unter Zugabe der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo inkubiert. Anschließend wurden überlebende Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes AlamarBlue detektiert und das Zellüberleben in Abhängigkeit der eingesetzten Prodrug-Konzentration dargestellt (Abbildung 3.12).

Im Vergleich der Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf mNSC mit und ohne PNP-Aktivität (pMSCV-deoD bzw. pMSCV) war bei der Prodrug FdAdo ein stark erhöhter zytotoxischer Effekt von Zellen mit PNP-Aktivität gegenüber Leervektor-transduzierten Zellen zu beobachten. Bereits bei einer FdAdo-Konzentration von  $0,25 \mu\text{M}$  reduzierte sich die Zahl der überlebenden Zellen von 100 % auf ca. 60 %. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf  $0,5 \mu\text{M}$  fanden sich nur noch etwa 30 % überlebende Zellen mit PNP-Aktivität. Die Anzahl der Kontrollzellen nahm dabei um 20 % auf ca. 80 % ab. Die fünftägige Inkubation unter  $0,75 \mu\text{M}$  FdAdo dezimierte die mNSC ohne und mit PNP-Aktivität auf etwa 40 % bzw. 20 %.

Hingegen konnten bei den Prodrugs Fludara und FaraA nur geringe Unterschiede im Zellüberleben beobachtet werden. Die Unterschiede in der Reduktion der PNP-produzierenden Zellen von 10 - 20 % im Vergleich zu den Kontrollzellen waren nur bei einzelnen Konzentrationswerten signifikant ( $10 \mu\text{M}$  Fludara bzw.  $2,5 \mu\text{M}$  FaraA) und konnten nicht über das gesamte Konzentrationsspektrum beobachtet werden. Daher ist fraglich, ob diese Prodrugs von den PNP-produzierenden Zellen generell besser umgesetzt werden.

Wie die eingesetzten Prodrug-Konzentrationen zeigten, wirkte FdAdo insgesamt toxischer auf Zellen als Fludara oder FaraA. Die stärkere zytotoxische Wirkung ist vermutlich dadurch zu erklären, dass es sich bei Fludara und FaraA um fluoridierte Adenosin-Analoga handelt, bei FdAdo hingegen um das entsprechende Desoxyadenosin. Dementsprechend unterschiedlich ist die intrazelluläre Wirkung der Substanzen.

Am deutlichsten unterschieden sich die Prodrugs aber in der viel höheren zytotoxischen Wirkung von FdAdo auf PNP-produzierende Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen ohne PNP-Aktivität. Dies lag vermutlich in der größeren Substratspezifität der PNP für FdAdo gegenüber Fludara und FaraA begründet (Parker *et al.*, 2003). Mit FdAdo als Substrat können PNP-exprimierende Zelle wahrscheinlich verhältnismäßig mehr FAde produzieren, welches dementsprechend zusätzlich zytotoxisch wirkt. Für eine Enzym/Prodrug-Gentherapie ist dieser Faktor von erheblicher Bedeutung, da der Überschuss an FAde letztendlich die Größe des „Bystander“-Effektes determiniert.



**Abbildung 3.12:** Wirkung der Prodrugs FdAdo, FaraA und Fludara auf PNP-produzierende mNSC (pMSCV-deoD). Kontrolle: pMSCV. Im Diagramm ist das prozentuale Zellüberleben in Abhängigkeit verschiedener Prodrug-Konzentrationen dargestellt. zur Auswertung wurde dem Konzentrationswert „0  $\mu\text{M}$ “ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“ zugeordnet. Alle Konzentrationswerte sind in mindestens sechsfacher Messung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Überleben PNP-produzierender Zellen gegenüber pMSCV-transduzierter Zellen sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

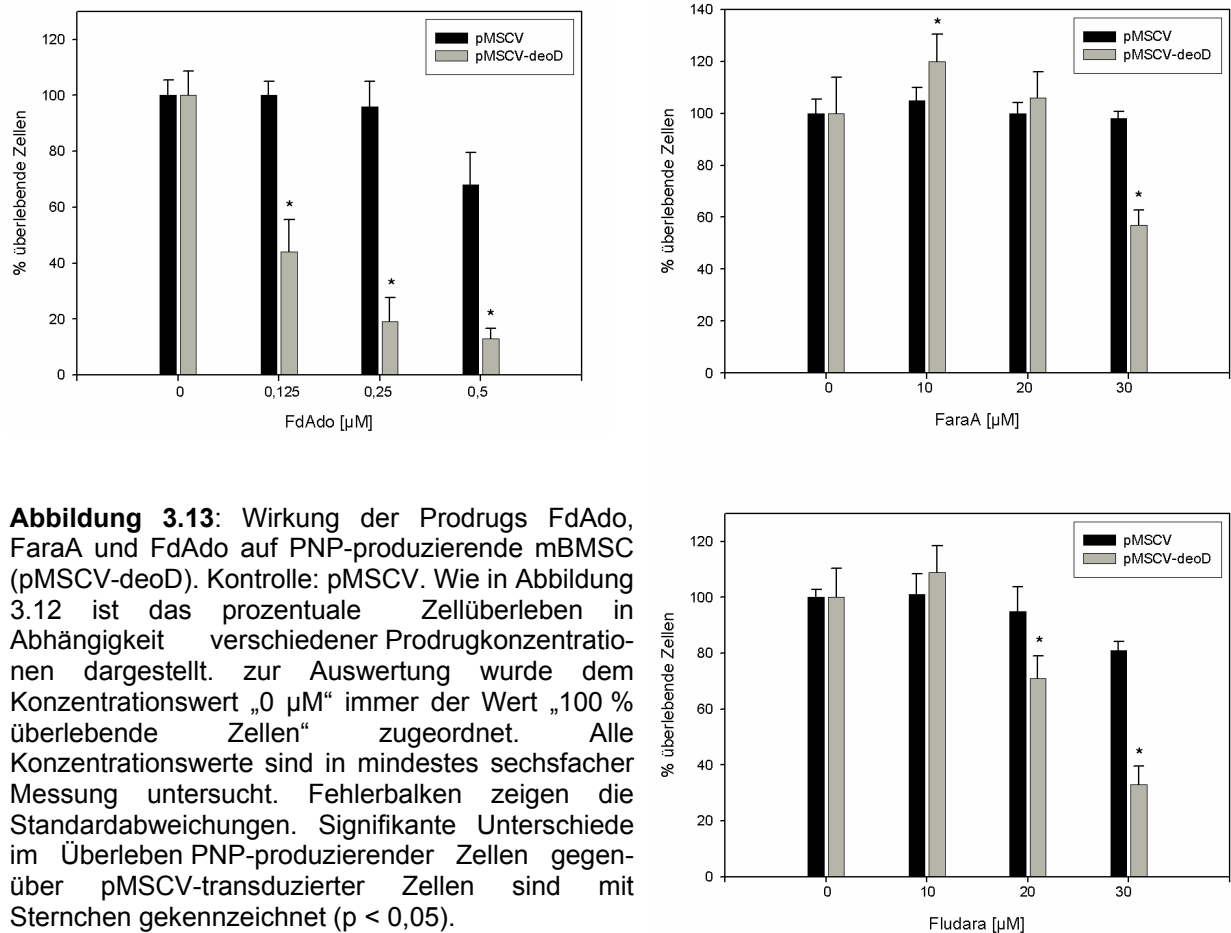
### 3.4.2.2. Wirkung der Prodrugs auf PNP-produzierende mBMSC

Analog des Versuches mit mNSC wurde die Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf mBMSC getestet (Abbildung 3.13). Wiederum wurden Zellen mit und ohne PNP-Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prodrugs über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert. Die Auswertung fand wie im vorhergehende Versuch durch die Detektion überlebender Zellen mittels AlamarBlue statt.

Wie bei mNSC war der zytotoxische Effekt von FdAdo auf PNP-produzierende Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen am Größten. Das Ergebnis des Vorversuches mit mNSC wurde von mBMSC sogar übertroffen, da bei einer FdAdo-Konzentration von bereits 0,125  $\mu\text{M}$  die Zahl überlebender Zellen mit aktiver PNP auf ca. 40 % abnahm, wobei die Kontrollzellen unbeeinflusst blieben. Erst bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  FdAdo reduzierte sich das Zellüberleben Leervektor-transduzierter Zellen auf ca. 80 %. Hingegen konnten nur noch weniger als 20 % PNP-produzierende Zellen detektiert werden.

Im Gegensatz zu dem vorhergehenden Versuch zeigten PNP-produzierende mBMSC auch eine deutlichere höhere Empfindlichkeit gegenüber Fludara und FaraA. Ein vermindertes

Zellüberleben PNP-produzierender Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen war für Fludara ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ , für FaraA bei 30  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Die Zahl der überlebenden mBMSC mit PNP-Aktivität reduzierte sich bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Fludara bzw. FaraA um 40-50 % gegenüber den Kontrollzellen.



**Abbildung 3.13:** Wirkung der Prodrugs FdAdo, FaraA und Fludara auf PNP-produzierende mBMSC (pMSCV-deoD). Kontrolle: pMSCV. Wie in Abbildung 3.12 ist das prozentuale Zellüberleben in Abhängigkeit verschiedener Prodrugkonzentrationen dargestellt. Zur Auswertung wurde dem Konzentrationswert „0  $\mu\text{M}$ “ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“ zugeordnet. Alle Konzentrationswerte sind in mindestens sechsfacher Messung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Überleben PNP-produzierender Zellen gegenüber pMSCV-transduzierter Zellen sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Beim Vergleich der untersuchten Konzentrationsspektren von Fludara und FaraA bei mNSC und mBMSC fällt auf, dass in mBMSC beide Prodrugs in ähnlichen Konzentrationen zytotoxisch wirken, bei mNSC jedoch viel höhere Konzentrationen Fludara nötig sind, um einen zu FaraA ähnlichen zytotoxischen Effekt hervorzurufen. Hierbei ist zu bedenken, dass es sich bei FaraA um das dephosphorylierte Fludara handelt. Im Körper wird Fludara normalerweise im Serum dephosphoryliert und als FaraA in die Zelle transportiert (Produktinformation Bayer-HealthCare, 2007). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass geringe Mengen Fludara die Zellmembran ebenfalls permeabilisieren können (Plunkett *et al.*, 1974). Die Versuche wurden bei mBMSC in serumhaltigem Medium durchgeführt. Um allerdings den proliferativen Zustand der mNSC aufrecht zu erhalten und deren Differenzierung zu vermeiden, mussten die Versuche hier in serumfreiem Medium durchgeführt werden. Dies

resultierte wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Dephosphorylierung von Fludara in beiden Ansätzen und somit auch in einer unterschiedlichen Aufnahme in die Zellen.

Insgesamt sind PNP-produzierende mBMSC in der Lage, die Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo signifikant umzusetzen. Ob dabei ausreichende Mengen des toxischen Metaboliten FAde aus den Zellen austreten können, um einen „Bystander“-Effekt bei Tumorzellen hervorzurufen, war im Folgenden zu klären.

### **3.4.3. „Bystander“-Effekt von PNP-produzierenden mNSC und mBMSC auf Tumorzellen**

Wie bereits beschrieben beruht der „Bystander“-Effekt des PNP-Enzym/Prodrug-Systems auf dem Metaboliten 2-Fluoro-Adenin, welcher aus der phosphorolytischen Spaltung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo durch PNP entsteht. FAde kann die Zellmembran passieren und somit auch einen zytotoxischen Effekt in denjenigen Zellen hervorrufen, welche selbst aktiv kein FAde produzieren (siehe Kapitel 1.4.2). Die Untersuchung des „Bystander“-Effektes von Prodrug-umsetzenden mNSC und mBMSC auf Tumorzellen fand anhand der murinen Gliomzelllinien GL261, U251 und U87 sowie der humanen Glioblastomzelllinie G55 statt.

Zur Herstellung des Metaboliten FAde wurden PNP-aktive mNSC und mBMSC mit verschiedenen Konzentrationen der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen mit dem entsprechenden Leervektor pMSCV. Der aus dieser Inkubation gewonnene Kulturüberstand wurde anschließend zur Inkubation der Tumorzelllinien verwendet. Um ein vollständiges Absterben der PNP-produzierenden Zellen, wie in Kapitel 3.4.2 beobachtet, zu vermeiden, wurde der Inkubationszeitraum zur Herstellung von FAde hier auf 48 h begrenzt. Zwar war auch bereits nach 48 h ein gesteigerter zytotoxischer Effekt auf PNP-produzierende Zellen sichtbar. Jedoch wurde davon ausgegangen, dass die Zellen in diesem Zeitraum genügend FAde herstellen könnten, um mit dem so konditionierten Medium einen „Bystander“-Effekt zu erreichen. Zudem wurde gezeigt, dass PNP, welche von sterbenden Zellen ins Medium freigesetzt wird, mehrere Tage aktiv ist und Prodrugs umsetzen kann (Huges *et al.*, 1998). Eine direkte Messung des Umsatzes der Prodrugs zu FAde war hier nicht möglich, da diese üblicherweise mittels HPLC durchgeführt wird. Dies lag allerdings nicht im Rahmen der zur Verfügung stehenden Mittel.



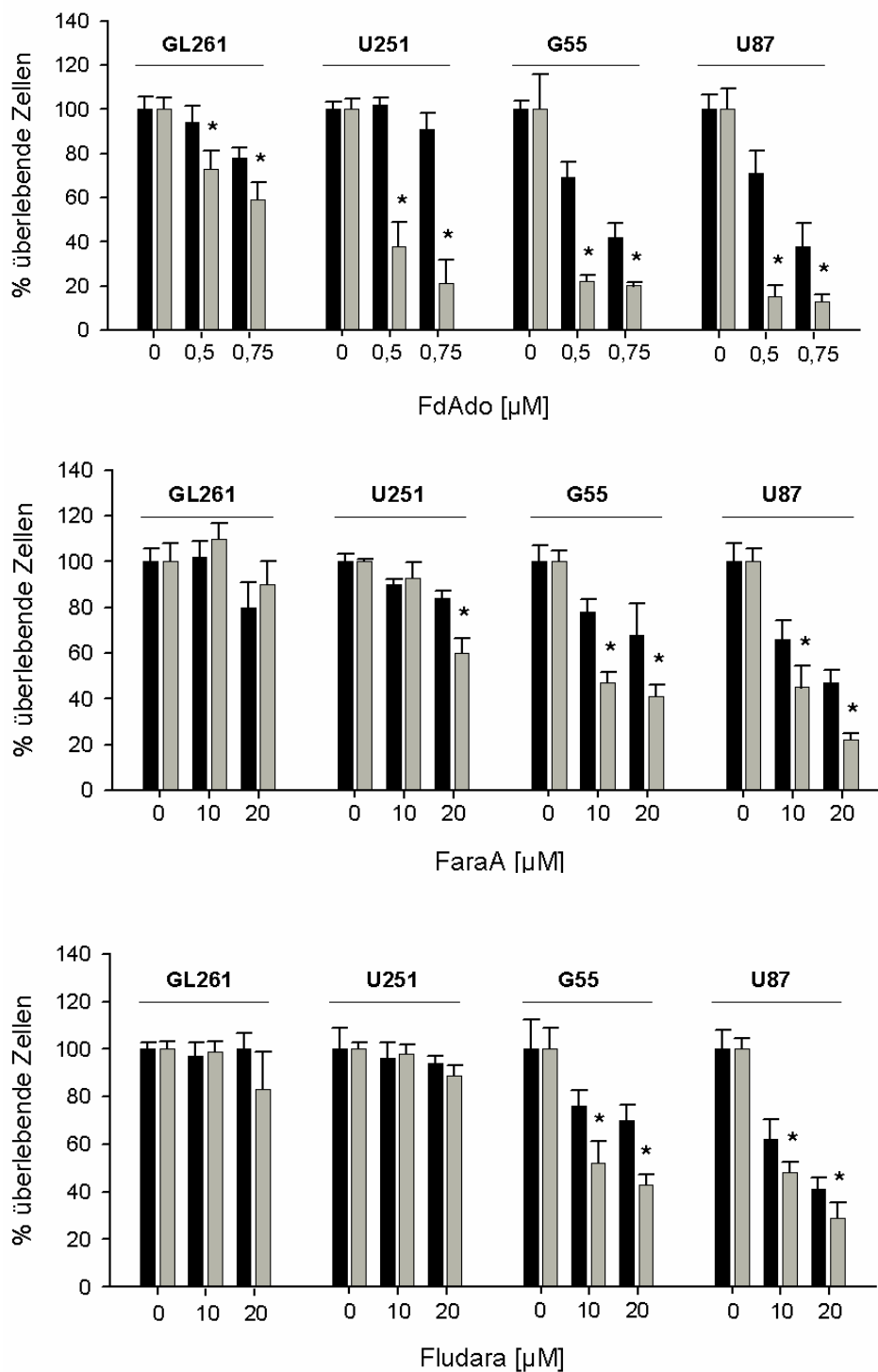
### 3.4.3.1. „Bystander“-Effekt von mNSC mit PNP-Aktivität

Im Versuch wurden zunächst PNP-produzierende mNSC eingesetzt. Mit dem produzierten zellfreien Kulturüberstand wurden die Tumorzelllinien GL261, U251, U87 und G55 für 72 h kultiviert (96-Loch-Platten-Format;  $10^3$  Zellen pro Kavität). Überlebende Tumorzellen wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffs AlamarBlue detektiert und in Abhängigkeit der eingesetzten Prodrug-Konzentration dargestellt (Abbildung 3.14). Um die Wirkung der Prodrugs Fludara und FaraA direkt vergleichen zu können, wurden diese trotz unterschiedlicher Ergebnisse hinsichtlich ihrer effektiven Konzentration auf mNSC (siehe Kapitel 3.4.2) hier in einem gleichen Konzentrationspektrum eingesetzt. Dies war aufgrund des kurzen Zeitraums möglich, in dem die neuronalen Stammzellen den Prodrugs ausgesetzt waren (48 h). Durch diese geringe Inkubationszeit wurden zytotoxische Effekte der Prodrugs auf die PNP-produzierenden Zellen somit minimiert.

Am deutlichsten trat der „Bystander“-Effekt bei Verwendung der Prodrug FdAdo in Erscheinung. Dieser konnte bei allen behandelten Tumorzellen in unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden. Am größten war der Effekt für die Zelllinie U251, wo bei einer Konzentration von  $0,75 \mu\text{M}$  FdAdo die Stoffwechselaktivität der Tumorzellen auf ca. 20 % sank, während die Kontrollgruppe eine Stoffwechselaktivität von 90 % zeigte. Besonders bemerkenswert war ein Rückgang der Stoffwechselaktivitäten von G55 und U87 auf ca. 20 % bei einer Konzentration von nur  $0,5 \mu\text{M}$  FdAdo. Dies ist im Hinblick auf eine Kokultivierung von mNSC und Tumorzellen von großer Bedeutung, da eine möglichst hohe Stoffwechselreduktion von Tumorzellen bei einer möglichst geringen Prodrug-Konzentration gewünscht ist, um die Prodrug-umsetzenden Zellen nicht zu schädigen.

Für die Prodrugs Fludara und FaraA konnten ebenfalls signifikante Unterschiede im Überleben von Tumorzellen, also „Bystander“-Effekte, nach Inkubation mit Medium von PNP-produzierenden Zellen bzw. Kontrollmedium beobachtet werden. Diese blieben allerdings deutlich hinter den mit FdAdo erzielten Ergebnissen zurück. Die „Bystander“-Effekte beschränkten sich bei Fludara auf die Tumorzelllinien G55 und U87 und traten darüber hinaus für FaraA noch bei der Zelllinie U251 auf. Insgesamt waren die Effekte mit FaraA ausgeprägter als mit Fludara, was möglicherweise ein weiteres Indiz für die unterschiedliche Aufnahme in die umsetzenden Zellen im - hier serumfreien - Medium ist.

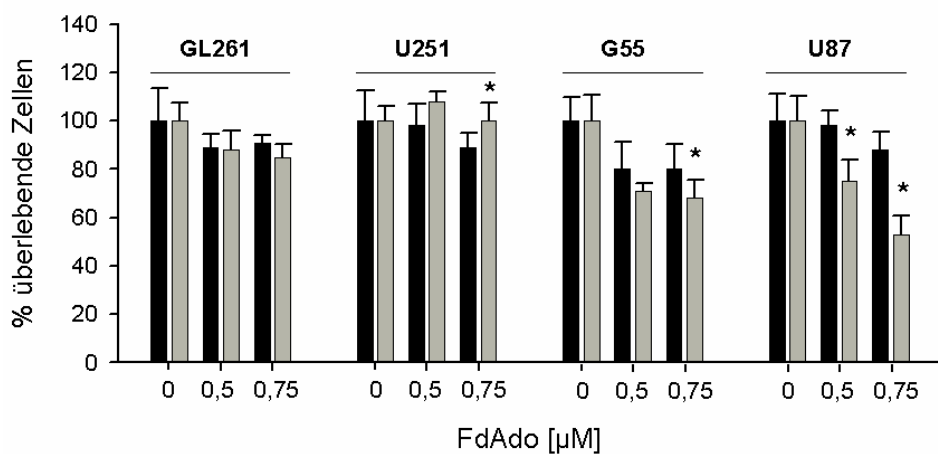
Bei allen verwendeten Prodrugs ist zu erkennen, dass sie bereits nach Inkubation mit Kontrollzellen ohne PNP-Aktivität einen zytotoxischen Einfluss auf die Tumorzellen haben. Dieser Effekt war erwartet und konnte schon im Vorversuch bei Leervektor transduzierten mNSC und mBMSC beobachtet werden. Durch den Umsatz der Prodrugs zu FAdo in PNP-exprimierenden Zellen ließ sich der Effekt jedoch signifikant steigern.



**Abbildung 3.14:** „Bystander“-Effekt aus dem Prodrug-Umsatz PNP-produzierender mNSC (mNSC pMSCV-deoD) auf verschiedene Tumorzelllinien. Das Medium wurde von mNSC für 48 h konditioniert ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml) und anschließend für 72 h zur Inkubation der Tumorzellen verwendet. Kontrolle: Konditioniertes Medium von Leervektor-transduzierten mNSC (mNSC pMSCV). Im Diagramm ist das prozentuale Zellüberleben der Tumorzellen in Abhängigkeit verschiedener Prodrug-Konzentrationen des konditionierten Mediums dargestellt. Zur Auswertung wurde dem Konzentrationswert „0  $\mu\text{M}$ “ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“ zugeordnet. Alle Konzentrationswerte sind in mindestens sechsfacher Messung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen Gruppen mit PNP/Prodrug-Behandlung und Kontrollgruppen sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.3.2. „Bystander“-Effekt von mBMSC mit PNP-Aktivität

Entsprechend des Versuches mit mNSC wurden PNP-produzierenden mBMSC zur Umsetzung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo eingesetzt, wobei Leervektor-transduzierte Zellen zur Kontrolle verwendet wurden. Der Kulturüberstand der mBMSC wurden wiederum zu Kultivierung der Tumorzelllinien verwendet (96-Loch-Platten-Format;  $10^3$  Zellen pro Kavität). Analog zum vorherigen Versuch wurde das Überleben der Tumorzellen mittels AlamarBlue untersucht und in Abhängigkeit der eingesetzten Prodrug-Konzentrationen dargestellt (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15:** „Bystander“-Effekt aus dem Prodrug-Umsatz PNP-produzierender mBMSC (mBMSC pMSCV-deoD) auf verschiedene Tumorzelllinien. Das Medium wurde von mBMSC für 48 h konditioniert ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml) und anschließend für 72 h zur Inkubation der Tumorzellen verwendet. Kontrolle: Konditioniertes Medium von Leervektor-transduzierten mBMSC (mBMSC pMSCV). Im Diagramm ist das prozentuale Zellüberleben der Tumorzellen in Abhängigkeit verschiedener Prodrug-Konzentrationen des konditionierten Mediums dargestellt. Zur Auswertung wurde dem Konzentrationswert „0 µM“ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“ zugeordnet. Alle Konzentrationswerte sind in mindestens sechsfacher Messung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen Gruppen mit PNP/Prodrug-Behandlung und Kontrollgruppen sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Obwohl beide Versuche hinsichtlich Zellzahlen und Inkubationszeiten übereinstimmten, konnte für Fludara und FaraA kein „Bystander“-Effekt mit mBMSC beobachtet werden. Lediglich der Ansatz mit FdAdo zeigte bei den Tumorzelllinien G55 und U87 signifikante Abnahmen des Zellüberlebens gegenüber der Kontrolle. Diese blieb jedoch deutlich hinter den Effekten mit mNSC zurück. Möglicherweise führte das von PNP umgesetzte FdAdo in mBMSC rascher zum Absterben der produzierenden Zelle, als dass es exportiert wurde und somit für einen „Bystander“-Effekt zu Verfügung stehen konnte. In Kapitel 3.4.2 wurden bereits unterschiedliche Reaktionen von PNP-produzierenden mNSC und mBMSC auf Prodrugs festgestellt. So regieren PNP-produzierende mBMSC im Vergleich zu nicht-

produzierenden mBMSC viel sensibler auf die verschiedenen Prodrugs als vergleichbare mNSC. Dieser Unterschied schlägt sich hier offensichtlich in unterschiedlichen „Bystander“-Effekten nieder. Beim Vergleich beider Versuche fällt zudem auf, dass die mit Kontrollzellen inkubierte Prodrug FdAdo hier einen geringeren zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen hat. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Kulturmedien für mNSC (serumfrei) und mBMSC (20 % Serum) zurückzuführen. Möglicherweise wird das Tumorzellwachstum dadurch unterschiedlich beeinflusst, was in einem Proliferationsassay mit unterschiedlichen serumfreien und serumhaltigen Medien geklärt werden könnte.

Generell ist im Vergleich zu PNP-produzierenden mBMSC bei PNP-produzierenden mNSC ein größere „Bystander“-Effekt auf die untersuchten Tumorzellen festzustellen, wobei der Effekt mit FdAdo am ausgeprägtesten ist. Der Effekt von mNSC in Kombination mit FdAdo auf die Tumorzelllinien U87 und G55 wird daher im folgenden Kapitel näher quantifiziert.

#### **3.4.4. Quantifizierung des „Bystander“-Effektes mit PNP-produzierenden murinen neuralen Stammzellen (mNSC) und FdAdo als Prodrug an den Gliomzelllinien U87 und G55**

Für eine Enzym/Prodrug-Gentherapie ist es sinnvoll, die Prodrug-umsetzenden Zellen möglichst lange zu erhalten. Daher ist eine hohe Reduktion der Tumorzellen bei möglichst niedriger Prodrug-Konzentration wünschenswert. Wie die Versuche zum „Bystander“-Effekt mit konditioniertem Medium in Kapitel 3.4.3 verdeutlichen, sind die Effekte je nach Kombination aus Prodrug, Tumorzelllinie und Prodrug-umsetzender Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Kombination der Tumorzelllinien U87 und G55 mit FdAdo und PNP-produzierender mNSC führte hinsichtlich der geforderten Parameter zu den besten Ergebnissen. Bei Tierversuchen in Mäusen wurde nach intraperitonealer Verabreichung von FdAdo eine Plasmakonzentration von ca. 10  $\mu\text{M}$  erzielt. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang auch von einer sehr geringen Halbwertszeit der Substanz von nur ca. 7 min berichtet (Parker *et al.*, 2003). Zudem gibt es keine Daten zur Blut-Hirnschranken-Gängigkeit von FdAdo. Somit muss davon ausgegangen werden, dass FdAdo nur in limitierten Mengen am (intrakraniellen) Tumor zur Verfügung steht.

Zur Durchführung einer Enzym/Prodrug-Therapie *in vivo* ist daher eine quantitative Einordnung der im Vorversuch erzielten „Bystander“-Effekte *in vitro* nötig. Zum einen ist zu klären, bei welchen FdAdo-Konzentrationen hohe „Bystander“-Effekte erzielt werden können. Dann sollten diese Effekte hinsichtlich der dafür nötigen Zahl an PNP-produzierenden mNSC untersucht werden.

Um die beobachteten „Bystander“-Effekte auf U87 und G55 bezüglich der Prodrug-Konzentrationen und der nötigen mNSC-Zellzahl quantifizieren zu können, wurde ein Kokultur-Assay mit Transwell-Zellkultureinsätzen im 24-Lochplatten-Format etabliert. Die dabei verwendeten Transwell-Einsätze bestehen aus einer permeablen Membran, welche den Stoffaustausch zwischen zwei getrennten Kompartimenten gewährleistet. Dadurch können Zellen im selben Kulturmedium räumlich getrennt voneinander kultiviert werden.

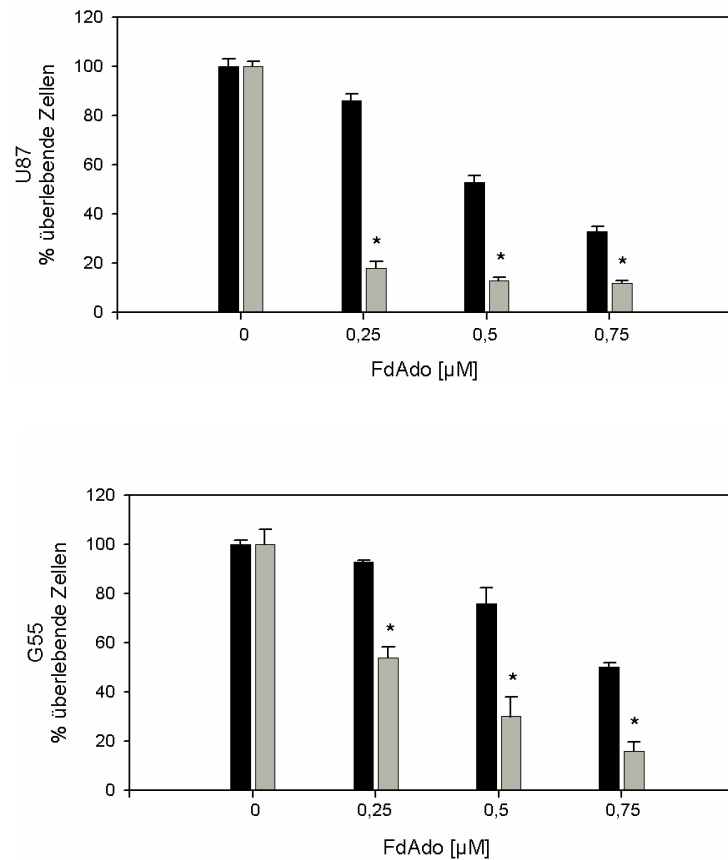
Im hier beschriebenen Versuch wurden die Tumorzelllinien U87 und G55 als Zielzellen für die PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie im 24-Lochplatten-Format kultiviert. Die zur Umsetzung der Prodrug verwendeten mNSC, retroviral transduziert mit dem Vektor pMSCV-deoD, befanden sich in den Transwell-Einsätzen in den jeweiligen Kavitäten der 24-Lochplatte. Als Kontrolle dienten wiederum mit dem Leevektor pMSCV transduzierte mNSC. Zur Inkubation wurde ein 1/1-Medien-Gemisch aus Tumorzell- und mNSC-Medium verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Durch das darin enthaltene fötale Kälberserum gehen die mNSC aus der proliferativen Phase zur Differenzierung über. Dieser Effekt ist jedoch auch nach Administration der Zellen in Hirntumore *in vivo* festzustellen (Ehtesham *et al.*, 2004). Somit ähnelt die hier gewählte Versuchsanordnung den Bedingungen *in vivo*.

#### **3.4.4.1. „Bystander“-Effekt in Abhängigkeit der FdAdo-Konzentration**

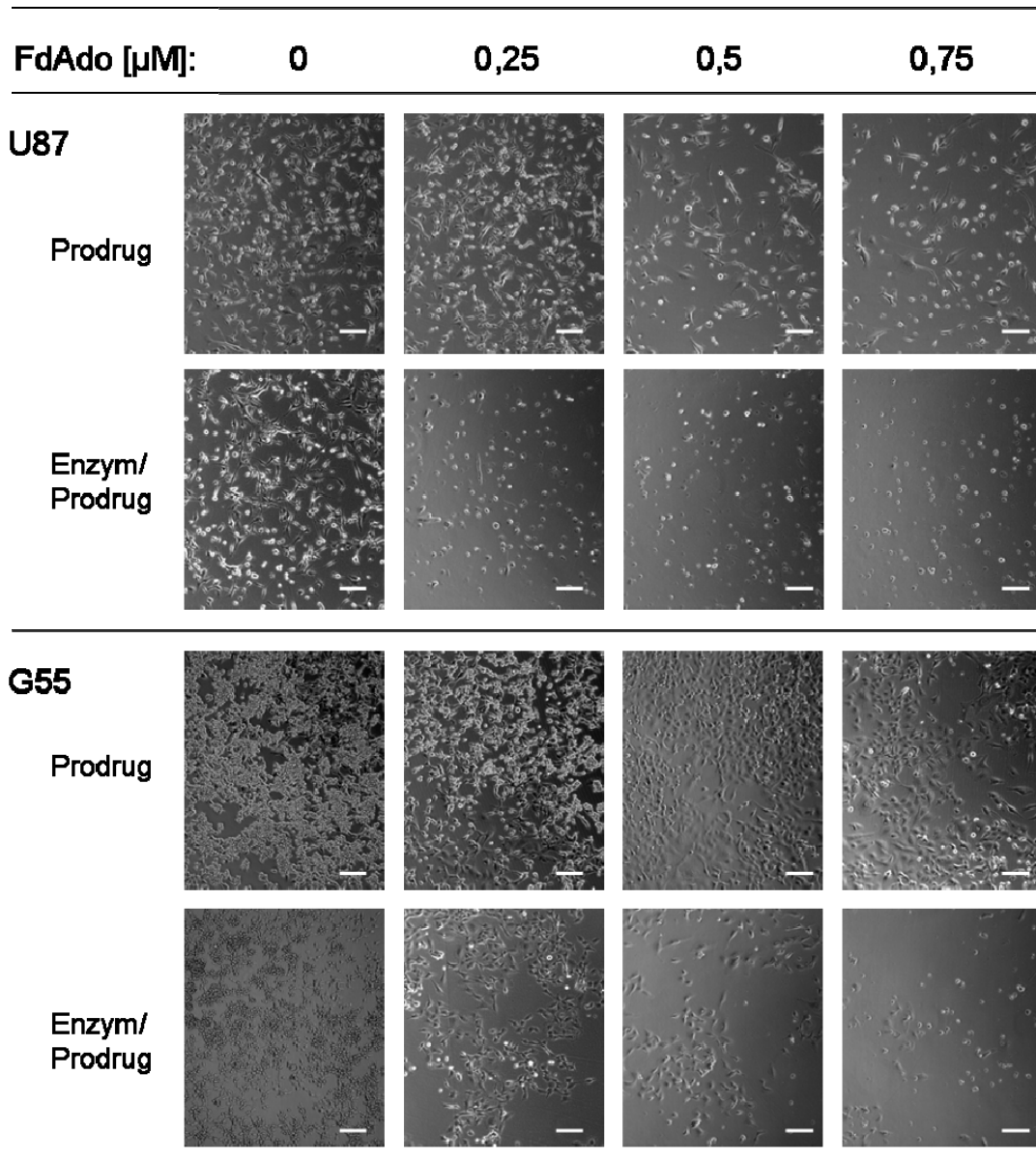
Um den „Bystander“-Effekt zunächst in Abhängigkeit der FdAdo-Konzentration zu untersuchen, wurden jeweils  $10^4$  Tumorzellen in der Kavität, sowie die gleiche Anzahl an mNSC im Transwell-Einsatz bei unterschiedlichen FdAdo-Konzentrationen kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte der Nachweis überlebender Tumorzellen mittels AlamarBlue (Abbildung 3.16), sowie die Auswertung durch lichtmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 3.17).

Wie bereits im Vorversuch zeigt sich eine deutliche Reduktion überlebender Tumorzellen nach Kokultivierung mit PNP-produzierenden mNSC im Vergleich zur Kontrolle. Im Fall der Tumorzelllinie U87 konnte bereits bei einer FdAdo-Konzentration von  $0,25 \mu\text{M}$  ein Rückgang der Tumorzellen auf unter 20 % verzeichnet werden. Bei höheren Konzentrationen stagnierte dieser Wert bei 12 % -13 %. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Tumorzelllinie G55 beobachtet werden. Eine mit U87 vergleichbare Reduktion auf unter 20 % stellte sich hier jedoch erst ab einer FdAdo-Konzentration von  $0,75 \mu\text{M}$  ein. Dies zeigt erneut, dass die Wirkung des Therapiesystems erheblich von dem Stoffumsatz der Zielzellen abhängt.

Wie aus vorherigen Versuchen bekannt, wirkt die Prodrug FdAdo bereits ohne Umsatz durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase zytotoxisch. Dies konnte auch im hier durchgeführten Versuch anhand der mit den Kontrollzellen kokultivierten Tumorzellen beobachtet werden.



**Abbildung 3.16:** „Bystander“-Effekt auf Tumorzellen nach PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie mit PNP-produzierenden mNSC und FdAdo. Im Diagramm ist das Überleben der Tumorzelllinien U87 (oben) und G55 (unten) prozentual gegen verschiedene FdAdo-Konzentrationen nach fünftägiger Kokultivierung mit mNSC dargestellt. Zur Kokultur wurden PNP-produzierende mNSC (mNSC pMSCV-deoD) bzw. die entsprechenden Kontrollzellen (mNSC pMSCV) eingesetzt. Tumorzellen und mNSC wurden in der gleichen Zellzahl eingesät ( $10^4$  Zellen). Zur Auswertung wurde dem Konzentrationswert „0 µM“ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“ zugeordnet. Alle Konzentrationswerte sind in mindestens Vierfachmessung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen mit PNP/Prodrug-Behandlung und Kontrollgruppen sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.17:** Lichtmikroskopische Kontrolle des „Bystander“-Effektes auf U87 und G55. Initial wurden  $10^4$  Tumorzellen ausgesät und mit PNP-produzierenden mNSC (Enzym/Prodrug) bzw. mit mNSC ohne PNP-Aktivität (Prodrug) im Kokultur-Assay für 5 Tage inkubiert. Der Versuch wurde mit verschiedenen FdAdo-Konzentrationen durchgeführt (0; 0,25; 0,5 und 0,75  $\mu\text{M}$  FdAdo). Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen, Maßstabsbalken im Bild unten rechts entsprechen 100  $\mu\text{M}$ .

Zur Quantifizierung des „Bystander“-Effektes wurden die Tumorzellen in den Kavitäten der 24-Lochplatte mittels Kristallviolett gefärbt und gezählt. Die Relative Quantität der Zellen wurde im Bezug auf den FdAdo-Konzentrationswert „0  $\mu\text{M}$ “ (entspricht 100 %) für jeden Ansatz ermittelt. Als Maß für den „Bystander“-Effekt wurde die Differenz zwischen den relativen Quantitäten der Tumorzellen mit Enzym/Prodrug-Behandlung (mNSC pMSCV-deoD) und mit reiner Prodrug-Behandlung (mNSC pMSCV) kalkuliert. Der erreichte „Bystander“-

Effekt zeigt sich für U87 bei 0,25  $\mu\text{M}$  FdAdo am eindrucksvollsten. Hier ist ein Rückgang der Zellzahlen von 87 % (Kontrolle) auf 20 % (Behandlung) zu verzeichnen. Für G55 konnte der maximale „Bystander“-Effekt bei 0,5  $\mu\text{M}$  FdAdo in einer Abnahme der Zellzahlen von 76 % auf 25 % beobachtet werden. Insgesamt ergeben sich durch die Auszählung der Zellen ähnliche Verhältnisse der Zellzahlen wie durch die Detektion überlebender Zellen mittels AlamarBlue. Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 3.3.

**Tabelle 3.3:** Quantifizierung des „Bystander“-Effekt auf U87 und G55 in Abhängigkeit der Prodrug-Konzentration. Die prozentualen Tumorzellzahlen sind für die jeweiligen FdAdo-Konzentrationen mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Pro Kavität wurden die Zellen in 3 Gesichtsfeldern bei 20facher Vergrößerung gezählt. Der Wert für den „Bystander“-Effekt wurde aus der Differenz der Werte der Kontrollgruppe (Prodrug) und der Behandlungsgruppe (Enzym/Prodrug) ermittelt.

Zelllinie	FdAdo [ $\mu\text{M}$ ]	Prodrug	Enzym/Prodrug	„Bystander“-Effekt
U87	0	100 $\pm$ 8	100 $\pm$ 5	/
	0,25	87 $\pm$ 5	20 $\pm$ 6	67 $\pm$ 6
	0,5	52 $\pm$ 6	14 $\pm$ 4	38 $\pm$ 5
	0,75	32 $\pm$ 4	9 $\pm$ 7	23 $\pm$ 6
G55	0	100 $\pm$ 2	100 $\pm$ 1	/
	0,25	93 $\pm$ 2	55 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3
	0,5	76 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	51 $\pm$ 3
	0,75	48 $\pm$ 5	10 $\pm$ 6	38 $\pm$ 6

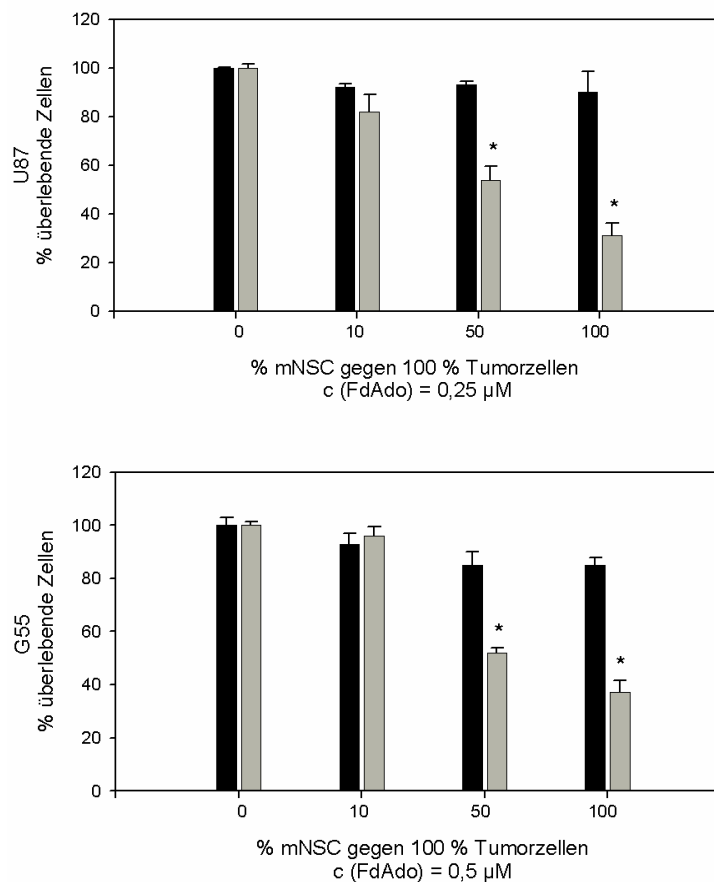
#### 3.4.4.2. „Bystander“-Effekt in Abhängigkeit der mNSC-Zellzahl

Im Hinblick auf die Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie *in vivo* ist die Effektivität der Therapie hinsichtlich der Menge der Prodrug-umsetzenden Zellen von großer Bedeutung. Bis dato ist nichts über die quantitative Verteilung migratorischer mNSC und mBMSC in experimentellen Hirntumoren bekannt. Studien an einem subkutanen Modell der humanen Gliomzelllinie D54MG zeigen jedoch einen signifikanten Rückgang des Tumolvolumens nach Fludara-Behandlung, wenn nur 2,5 % der Tumorzellen selbst PNP produzieren (Hong *et al.*, 2004).

Die Abhängigkeit des „Bystander“-Effektes von der Zahl der Prodrug-umsetzenden mNSC wurde mit der Kokultivierung von mNSC und Tumorzellen in verschiedenen Zellzahlverhältnissen untersucht. Wie im vorhergehenden Versuch wurden  $10^4$  Tumorzellen



(U87 und G55) in die Kavitäten einer 24-Lochplatte gesät, in die Transwell-Einsätze jedoch verschiedene Mengen an mNSC gegeben (0, 10<sup>3</sup>, 5 x 10<sup>3</sup> und 10<sup>4</sup> Zellen; entsprechend 0, 10, 50 und 100 % mNSC gegenüber 100 % Tumorzellen). Die FdAdo-Konzentrationen blieben jeweils konstant und richteten sich für U87 und G55 nach den jeweiligen, im Vorversuch ermittelten, besten „Bystander“-Werten (0,25 µM für U87; 0,5 µM für G55). Nach 5 Tagen Inkubation wurden überlebenden Tumorzellen mittels AlamarBlue detektiert (Abbildung 3.18). Der lichtmikroskopischen Kontrolle (Abbildung 3.19) folgte wie schon im Vorversuch die Quantifizierung der Zellen durch Färbung mit Kristallviolett und Auszählung (Tabelle 3.4).



**Abbildung 3.18:** „Bystander“-Effekt auf Tumorzellen nach PNP-Enzym/Prodrug-Gentherapie mit variablen mNSC-Zahlen und konstanter FdAdo-Konzentration. Im Diagramm ist das Überleben der Tumorzelllinien U87 (oben) und G55 (unten) prozentual gegen verschiedene FdAdo-Konzentrationen nach fünftägiger Kokultivierung mit mNSC dargestellt. Zur Kokultur wurden PNP-produzierende mNSC (mNSC pMSCV-deoD) bzw. die entsprechenden Kontrollzellen (mNSC pMSCV) eingesetzt. Tumorzellen und mNSC wurden in konstanter FdAdo-Konzentration inkubiert (0,25 µM für U87; 0,5 µM für G55). Zur Auswertung wurde dem Zellzahlverhältnis „0 % mNSC“ immer der Wert „100 % überlebende Zellen“. Alle Werte sind in mindestens Vierfachmessung untersucht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen Gruppen mit PNP/Prodrug-Behandlung und Kontrollgruppen sind mit Sternchen gekennzeichnet (p < 0,05).

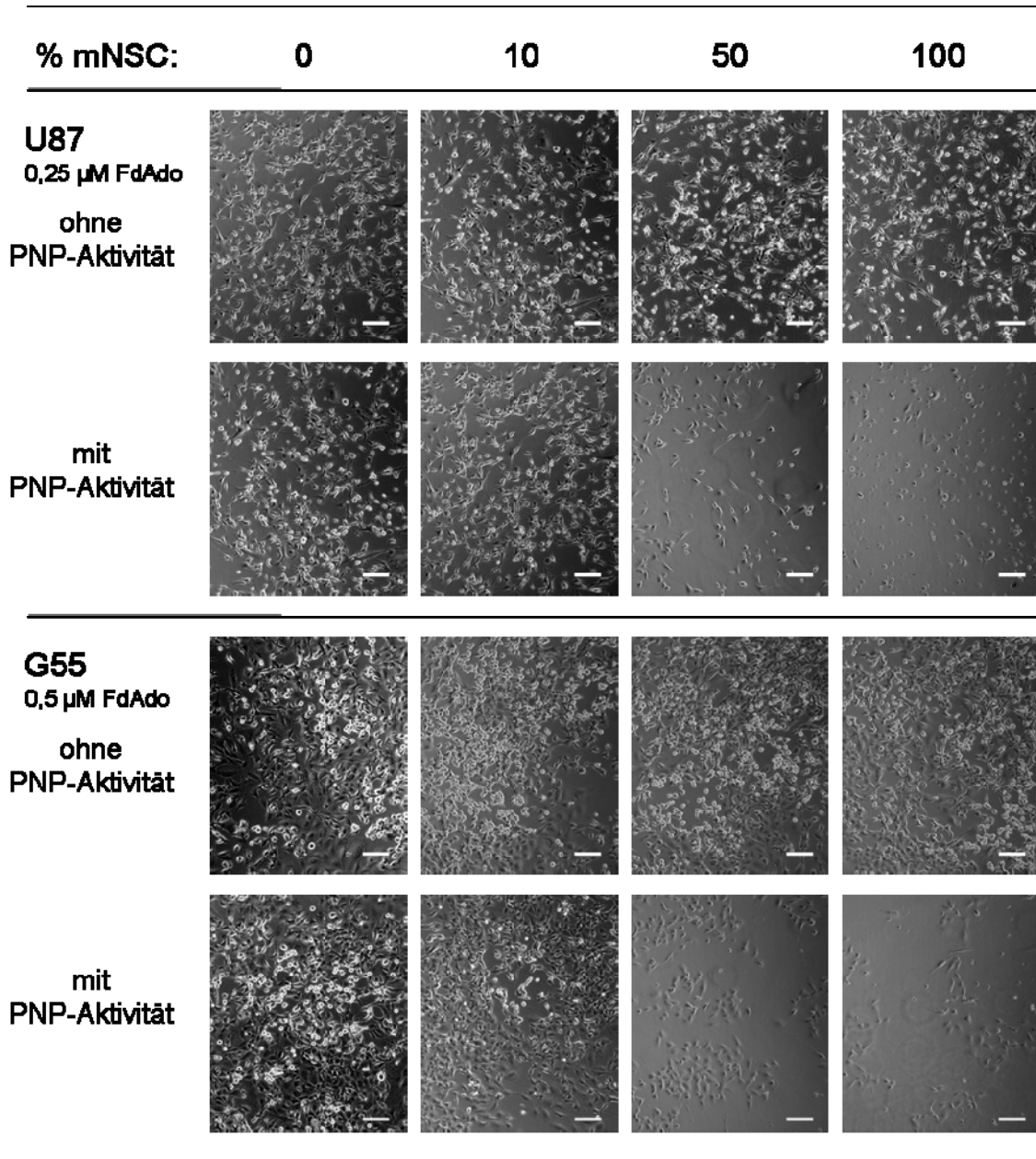
Sowohl für U87 als auch für G55 konnte Reduktion der Tumorzellen im Zusammenhang mit PNP-produzierenden mNSC beobachtet werden. Diese Reduktion nahm in Abhängigkeit der mNSC-Zellzahl zu und war ab Werten von 50 % mNSC signifikant gegenüber der Kontrollgruppe mit Leervektor-transduzierten mNSC (Abbildung 3.18). Der beobachtete „Bystander“ Effekt war nach Kokultivierung mit 100 % mNSC am größten, die Stoffwechselaktivitäten reduzierten hier sich für U87 von 96 % auf 34 % und für G55 von 86 % auf 37 % (Tabelle 3.4). Die Kultivierung mit 50 % mNSC zeigte immerhin eine Abnahme der Tumorzellen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. In den Kontrollansätzen mit Leervektor-transduzierten mNSC war eine geringfügige Abnahme der Tumorzellen bei zunehmender mNSC Zellzahl zu verzeichnen. Diese wird vermutlich durch die Konkurrenz beider Zelllinien um Nährstoffressourcen im Medium verursacht.

**Tabelle 3.4:** Quantifizierung des „Bystander“-Effekt auf U87 und G55 in Abhängigkeit der Prodrug-Konzentration. Die prozentualen Tumorzellzahlen sind für die jeweiligen mNSC-Mengen mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Pro Kavität wurden die Zellen in 3 Gesichtsfeldern bei 20facher Vergrößerung gezählt. Der Wert für den „Bystander“-Effekt wurde aus der Differenz der Werte der Kontrollgruppe (Prodrug) und der Behandlungsgruppe (Enzym/Prodrug) ermittelt.

<i>Zelllinie</i>	<i>% mNSC</i>	<i>- PNP-Aktivität</i>	<i>+ PNP-Aktivität</i>	<i>Bystander Effekt</i>
U87 0,25 µM FdAdo	0	100 ± 4	100 ± 7	/
	10	98 ± 6	90 ± 3	/
	50	96 ± 4	56 ± 6	40 ± 6
	100	96 ± 9	34 ± 5	62 ± 7
G55 0,5 µM FdAdo	0	100 ± 6	100 ± 3	/
	10	100 ± 4	97 ± 5	/
	50	95 ± 4	58 ± 7	37 ± 6
	100	86 ± 2	37 ± 7	49 ± 5

Wie die quantitative Auswertung erkennen lässt, können PNP-produzierende mNSC in Kombination mit FdAdo das Tumorzellwachstum erheblich verringern. Diese ist sowohl von der Konzentration der Prodrug als auch von der Zahl der Prodrug-umsetzenden Zellen abhängig, wobei eine größere Anzahl PNP-produzierender Zellen den Effekt entsprechend steigert. Eine vollständige Abtötung der Tumorzellen könnte sicherlich mit höheren FdAdo-Konzentrationen erreicht werden. Jedoch würde dies wiederum zum schnelleren Absterben der PNP-produzierenden Stammzellen führen, sowie unerwünschte zytotoxische Effekte auf gesunde Zellen verursachen. Im Hinblick auf die Testung des Verfahrens *in vivo* gilt es,

entsprechende Prodrug-Konzentrationen zu finden, welche bei geringem Einfluss auf die Prodrug-umsetzende Zellen den größten Effekt auf das Tumorzellwachstum haben.

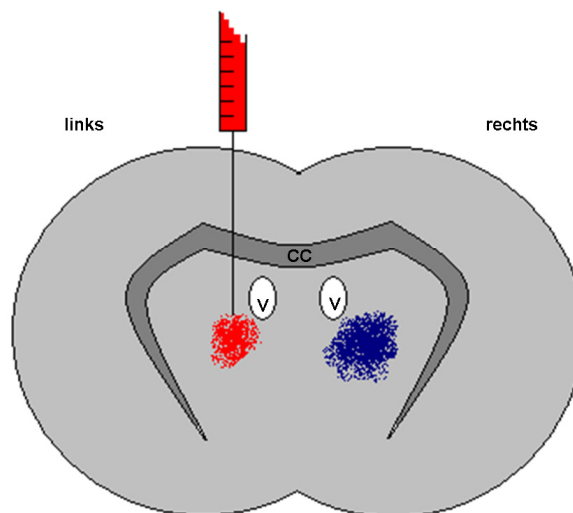


**Abbildung 3.19:** Lichtmikroskopische Kontrolle des „Bystander“-Effektes auf U87 und G55. Initial wurden  $10^4$  Tumorzellen ausgesät und mit PNP-produzierenden mNSC (Enzym/Prodrug) bzw. mit mNSC ohne PNP-Aktivität (Prodrug) im Kokultur-Assay für 5 Tage inkubiert. Der Versuch wurde bei konstanten FdAdo-Konzentrationen mit unterschiedlichen mNSC-Anteilen durchgeführt (0, 10, 50 und 100 %). Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen, Maßstabsbalken im Bild unten rechts entsprechen 100  $\mu$ M.

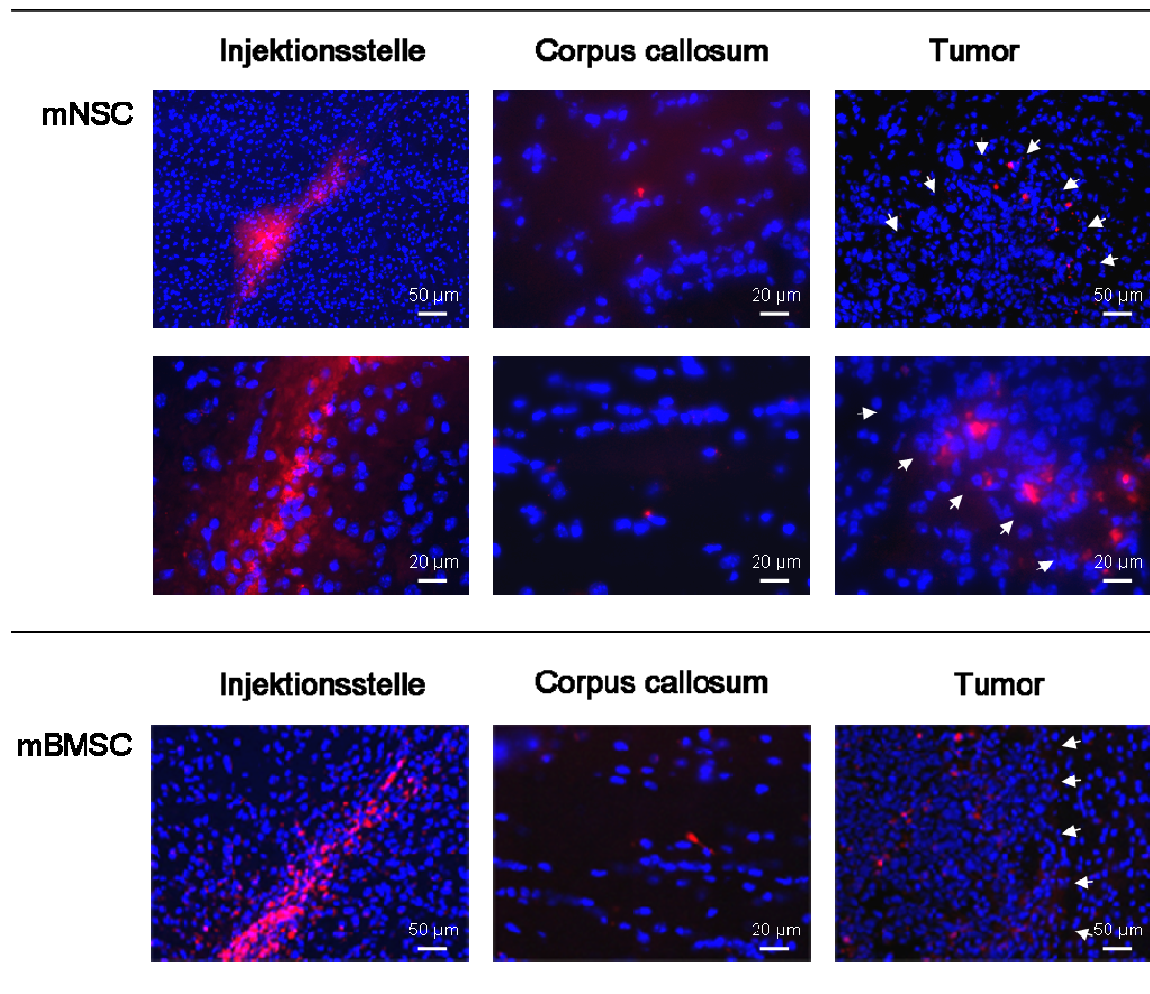
### 3.5. Migration von mNSC und mBMSC zu experimentellen Hirntumoren in C57Bl/6-Mäusen

In dieser Arbeit wurden murine neurale Stammzellen und mesenchymale Stromazellen isoliert und zur Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie mit therapeutischen Transgenen retroviral transduziert. Beide Zelllinien konnten mit dem PNP-Enzym/Prodrug-System *in vitro* toxische „Bystander“-Effekte auf verschiedene Tumorzelllinien vermitteln (siehe Kapitel 3.4). Die migratorischen Eigenschaften neuronaler Stammzellen und mesenchymaler Stromazellen zu experimentellen Hirntumoren *in vivo* sind bereits beschrieben (Aboody *et al.*, 2000; Nakamizo *et al.*, 2005). Zur Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie war das migratorische Verhalten der hier verwendeten mNSC und mBMSC zu untersuchen.

Dazu wurden Zellen der Gliomzelllinie GL261 in die Subventrikularzone der rechten Hemisphäre von C57Bl/6-Mäusen injiziert. Diese Zelllinie wird in unserem Labor standardmäßig zur Herstellung experimenteller Hirntumore verwendet. Sie ist murinen Ursprungs und stellt somit ein sygenes Tumormodell dar. Nach fünf Tagen, in denen sich ein experimenteller Hirntumor etablieren konnte, wurden Dil-fluoreszenzmarkierte mNSC bzw. mBMSC in die gegenüberliegende linke Hemisphäre injiziert (Abbildung 3.20). Drei Tage nach der Injektion von mNSC und mBMSC wurden die Hirne entnommen und histologisch aufgearbeitet.



**Abbildung 3.20:** Graphische Darstellung der Versuchsanordnung: GL261-Zellen wurden in die Subventrikularzone der rechten Hemisphäre injiziert und bildeten einen experimentellen Hirntumor (blau). Fluoreszenzmarkierte mNSC bzw. mBMSC (rot) wurden in die linke Subventrikularzone injiziert und migrierten durch das Corpus callosum (CC) zu dem Hirntumor. V: Ventrikel.



**Abbildung 3.21:** Migration Dil-fluoreszenzmarkierter mNSC (oben) und mBMSC (unten) zu kontralateralen, experimentellen Hirntumoren. Fluoreszenzmarkierte Zellen sind in rot dargestellt, Zellkerne mit DAPI gegengefärbt (blau). Das Tumorgewebe ist von normalem Hirnparenchym durch eine höhere Dichte an Zellkernen zu unterscheiden. Die Tumorränder sind durch Pfeile gekennzeichnet. (Tumor in Pfeilrichtung) Bilder: Fluoreszenzaufnahmen, Maßstabsbalken sind mit entsprechenden Größen im Bild unten rechts angegeben.

Unter Fluoreszenzlicht konnten Dil-markierte Zellen in der rechten Hemisphäre detektiert werden. Diese fanden sich hauptsächlich in der Tumormasse wieder bzw. in direkter Umgebung des Tumors. Dil-markierte mNSC waren dabei eher an den Rändern des Tumors lokalisiert, mBMSC hingegen schienen die Tumormasse gleichmäßig zu durchsetzen. Einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen waren in der Kommissur (*Corpus callosum*) zwischen beiden Hirnhemisphären zu finden, ein Indiz für die Migration der Zellen von der linken zur rechten Hemisphäre durch dieses Hirnareal (Abbildung 3.20). Der Versuch wurde pro Zelllinie an drei Mäusen durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse jeweils ähnelten. Eine genaue Quantifizierung war aufgrund der stark schwankenden Signalstärken der Dil-Fluoreszenz nicht möglich, jedoch war die Verteilung der mBMSC in der Tumormasse ausgeprägter. Da diese jedoch die geringeren „Bystander“-Effekte im PNP-Enzym/Prodrug-System aufweist, sollte die Überprüfung des Systems *in vivo* zunächst mit mNSC stattfinden.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Enzym/Prodrug-Systeme zur Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Hirntumore untersucht: das rCE/CPT-11-System und das *E. coli*-PNP/Prodrug-System. Die Verabreichung der Prodrug-aktivierenden Enzyme sollte dabei über migratorische adulte Stammzellen (mNSC und mBMSC) erfolgen. Beide Systeme stellen, im Gegensatz zu den bereits in klinischen Studien untersuchten HSV1-TK/GCV-System oder dem CD/5-FC-System, neue, näher zu charakterisierende Enzym/Prodrug-Modelle dar.

Die Wirksamkeit des rCE/CPT-11-Systems gegen experimentelle Tumore wurde bereits *in vivo* belegt. So konnten subkutane Tumoren einer Rhabdomyosarkom-Zelllinie durch CPT-11-Gabe vollständig entfernt werden, wenn die Tumorzellen eine zusätzliche kodierende Sequenz für rCE enthielten (Danks *et al.*, 1999). Ferner konnte die rCE-Sequenz mittels eines onkolytischen Adenovirus in einen experimentellen subkutanen Tumor humaner Zervixkarzinomzellen eingebracht werden, was nach CPT-11-Gabe zu einem gesteigerten Überleben der Versuchstiere führte (Stubdal *et al.*, 2003). Zudem wurde das rCE-Enzym bereits erfolgreich durch migratorische humane embryonale Stammzellen zu disseminierten experimentellen Tumoren aus Neuroblastomzellen *in vivo* transportiert. Die folgende Behandlung mit CPT-11 resultierte in einem Langzeitüberleben tumorfreier Versuchstiere (Danks *et al.*, 2007). Der Transport des rCE-Enzyms zu experimentellen Tumoren durch migratorische Stammzellen war auch in dieser Arbeit vorgesehen. Um ethische Vorbehalte zu umgehen, sowie um die Gefahr der Teratombildung durch embryonale Stammzellen auszuschließen, sollten hier adulte Stammzellen eingesetzt werden. Dabei wurden Stammzellen murinen Ursprungs gewählt, um Immunreaktionen in einem immunkompetenten Mausmodell auszuschließen. Schließlich sollte das System an einem intrakraniellen Tumormodell untersucht werden, da sich bisherige *in vivo*-Versuche lediglich auf subkutane Tumoren bzw. experimentelle Tumoren in anderen Organen beschränkten. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, konnten mittels des hier verwendeten Versuchsansatzes jedoch keine ausreichenden Mengen rCE produziert werden. Daher wurde ein zweites Enzym/Prodrug-Modell untersucht, das *E. coli*-PNP/Prodrug-System. Dessen Wirkmechanismus basiert auf der Inhibition der RNA- und Protein-Synthese, wodurch letztendlich der gesamte zelluläre Stoffwechsel zum Erliegen kommt. (Parker *et al.*, 1998). Somit können auch nicht-proliferierende Tumorzellen abgetötet werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber dem rCE/CPT-11-System, dessen Wirkmechanismus, wie bereits beschrieben, S-Phasen spezifisch ist (Rivory *et al.*, 1995). Ein unerwünschter zytotoxischer Effekt auf nicht-proliferierende gesunde Zellen würde dabei durch die Verwendung tumortropher Stammzellen minimiert, welche das PNP-Enzym lokal am Tumor applizieren, nicht jedoch in gesundem Hirnparenchym.

Von besonderem Interesse hinsichtlich der Therapierbarkeit von Glioblastomen ist die Wirksamkeit des PNP/Prodrug-Systems auf nicht proliferative Tumorzellen, wie sie in der Infiltrationszone von Glioblastomen zu finden sind. So wurde die Wirksamkeit explizit gegen langsam wachsende Gliomzellen der Linie D54 nachgewiesen, deren Verdopplungszeit über 15 Tagen lag (Parker *et al.*, 1997, Gadi *et al.*, 2003). Im Zusammenhang mit infiltrativen, nicht-proliferativen Gliomzellen wurde das PNP/Prodrug-System bisher jedoch noch nicht untersucht.

Ebenfalls von Vorteil für die Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie mit migratorischen Stammzellen, sind die hohen „Bystander“-Effekte des PNP/Prodrug-Systems. So ist für die Vermittlung eines zytotoxischen Effektes auf PNP-defiziente Tumorzellen kein direkter Zell-Zell-Kontakt nötig (Huges *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde von Therapieerfolgen *in vivo* berichtet, wenn nur 2,5 % der Zellen eines experimentellen Tumors PNP exprimierten (Hong *et al.*, 2004). Dies ist für die Durchführung der Therapie mit migratorische Stammzellen von essentieller Bedeutung, da die Tumorzellen das Enzym nicht selbst produzieren. Der therapeutische Effekt beruht somit alleine auf dem von den Stammzellen erzielten „Bystander“-Effekt. Ferner sind für das *E. coli*-PNP/Prodrug-System mehrere wirksame Prodrugs bekannt, welche sich in Substratspezifität, Zytotoxizität und Plasma-Halbwertszeit unterscheiden (Sorscher *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 2003). Dies vervielfacht die therapeutischen Möglichkeiten.

Das „traditionelle“ Konzept der Enzym/Prodrug-Gentherapie sieht die Einschleusung des Prodrug-aktivierenden Enzyms in die Tumorzellen selbst vor (siehe Kapitel 1.4). Diese erfolgt üblicherweise durch Liposomen oder replikations-inkompetenten Retro- bzw. Adenoviren (Immonen *et al.*, 2004; Voges *et al.*, 2003). Wie klinische Studien belegen, wird ein wirksamer Einsatz dieser Therapieform jedoch durch die unzureichende Übertragung des Gens *in vivo* erschwert (Rainov *et al.*, 2000). Um dieses Problem zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit migratorische adulte Stammzellen aus murinem neuralem Gewebe und Knochenmark verwendet. Die ausgeprägten tumortropen Eigenschaften dieser Zellen *in vivo* sind bereits beschrieben (Aboody *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2004). Zudem wurden migratorische Stammzellen bereits zur Vermittlung verschiedener therapeutischer Proteine gegen Hirntumore verwendet, wie z.B. Interferon- $\beta$  und Interleukin-23 (Nakamizo *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

Das rCE/CPT-11-System wurde zunächst mit murinen neuronalen Stammzellen getestet. Dazu wurden verschiedene rCE-Expressionssequenzen verwendet. Da jedoch keine für eine Therapie ausreichende rCE-Aktivität detektiert werden konnte, wurde auf die Durchführung des Ansatzes mit murinen mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark verzichtet. Das *E. coli*-PNP/Prodrug-System wurde gleichzeitig mit mNSC und mBMSC in Kombination

verschiedener humaner und muriner Gliomzelllinien untersucht. Beide Stammzelllinien wurden im Labor für Hirntumorbiologie isoliert und charakterisiert.

#### **4.1. Isolierung und Charakterisierung muriner neuraler Stammzellen und muriner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmark**

##### **4.1.1. Murine neurale Stammzellen**

Die erstmals 1992 von Reynolds und Weiss isolierten neuronalen Stammzellen aus der murinen Subventrikularzone proliferierten unter Zugabe von bFGF zu sphärischen Aggregaten (Neurosphären) und exprimierten Nestin (Reynolds und Weiss, 1992). Nestin wird durch seine Funktion als Intermediärfilament in primitivem neuralem Gewebe als Zellmarker für neurale Stammzellen betrachtet (Lendahl *et al.*, 1990). Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen aus der Subventrikularzone adulter Mäuse zeigten ebenfalls die von Reynolds und Weiss beschriebenen Eigenschaften.

Zum Nachweis der Multipotenz wurde die Differenzierung der Zellen zu den drei Hauptzelltypen des ZNS (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) durch die Zugabe von cAMP, Retinsäure und fötalem Kälberserum induziert. Nach Behandlung exprimierten die hier verwendeten Zellen die neuronalen Marker Map2 und  $\beta$ 3-Tubulin sowie den glialen Marker GFAP und den oligodendrozytären Marker GalC. Die verschiedenen Markerproteine wurden mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Ein positives GalC-Signal konnte dabei ausschließlich bei Zellen mit distinkter oligodendrozytärer Morphologie beobachtet werden. Zudem war der gliale Marker GFAP in Zellen abwesend, welche ein positives Signal für die neuronalen Marker Map2 und  $\beta$ 3-Tubulin zeigten. Umgekehrt waren GFAP-positive Zellen negativ für Map2 und  $\beta$ 3-Tubulin. Somit konnte die unterschiedliche Differenzierung der Zellen in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten gezeigt werden.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A gilt als Regulator neuronaler oder glialer Differenzierung im sich entwickelnden Hirn. *In vitro* konnte durch cAMP-Gabe ein neuronaler Phänotyp neuraler Progenitorzellen induziert werden (Kim *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wurde von einer gesteigerten Aktivität der Proteinkinase A berichtet. Gleichzeitig kam es hierbei zu einer Reduktion der Expression des Stammzellmarkers Nestin und des astrozytären Markers GFAP. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP präferentiell eine neuronale Differenzierung einleitet.

Retinsäure, ein Stoffwechseleivat des Vitamin A, ist während der Embryogenese an der Musterbildung des Neuroektoderms beteiligt. In einer aktuellen Studie wurde der



Zusammenhang Retinsäure-induzierter neuraler Differenzierung embryonaler Stammzellen mit dem Wnt-Signalweg hergestellt. Die verwendeten murinen Stammzellen differenzierten dabei nach Retinsäure-Gabe entlang der neuralen Linie, wobei eine gesteigerte dynamische Regulation der Wnt-Gene zu beobachten war (Nordin *et al.*, 2008). Die Neurogenese im adulten Organismus wird ebenfalls über den Wnt-Signalweg reguliert, was die in dieser Arbeit beobachtete neurale Differenzierung adulter neuraler Stammzellen erklärt (Lie *et al.*, 2005).

Fötales Kälberserum wird standardmäßig bei der Differenzierung neuraler Stammzellen eingesetzt (Rieze und Reynolds, 2006). Der positive Einfluss des Serums auf die Differenzierung wurde empirisch festgestellt, der Wirkmechanismus ist hier jedoch unklar. Im Serum sind eine Vielzahl unterschiedlicher Signalmoleküle, wie Wachstumsfaktoren und Hormone in nicht definierten Konzentrationen enthalten. So wurde beispielsweise auch Retinsäure im Serum von Säugern nachgewiesen, welche, wie bereits erwähnt, eine neurale Differenzierung einleiten kann (Tang und Russel, 1990).

Die in dieser Arbeit weiterhin durchgeführte quantitative Untersuchung der Transkripte von Nestin, GFAP,  $\beta$ 3-Tubulin und GalC mittels quantitativer *real-time* PCR zeigte nur einen geringen Unterschied in der Expression von Nestin,  $\beta$ 3-Tubulin und GalC vor und nach Differenzierung. Hingegen erhöhte sich die Menge der GFAP-Transkripte nach Differenzierung um das 8000fache. Dies deutet darauf hin, dass die hier verwendeten mNSC hauptsächlich in astrozytäre Richtung differenzieren. Interessanterweise wurde bei der Untersuchung der Migration muriner NSC zu experimentellen Hirntumoren festgestellt, dass die tumortrophen Stammzellen nach Differenzierung *in vivo* hauptsächlich zu Astrozyten differenzierten, da sie den Marker GFAP exprimierten. Ein geringer Teil der verabreichten Zellen zeigte jedoch keine tumortrophen Eigenschaften, sondern verblieb an der Injektionsstelle. Dort differenzierten die Zellen ebenfalls und zeigten neben GFAP-Expression auch die Marker  $\beta$ 3-Tubulin für Neuronen und GalC für Oligodendrozyten (Ehtesham *et al.*, 2004). Die überwiegend migratorische, tumortrophe Fraktion der mNSC besteht also wahrscheinlich zum Großteil aus astrozytären Vorläuferzellen, was durch die Ergebnisse der hier durchgeführten quantitativen PCR unterstützt wird.

#### **4.1.2. Murine mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark**

Die in der Arbeit untersuchten mesenchymalen Stromazellen wurden aus dem Knochenmark adulter Mäuse isoliert. Bei der Isolierung wurde die Tatsache genutzt, dass es sich bei MSC um plastikadhärente Zellen handelt. Hämatopoetische Stammzellen, welche ebenfalls im Knochenmark vorkommen, zeigen diese Plastikadhärenz nicht. Somit konnten diese von den MSC separiert werden. Plastikadhärenz wird laut der *International Society for*

*Cellular Therapy* als eine definierende Eigenschaft mesenchymaler Stromazellen angesehen (Dominici *et al.*, 2006).

In dem besagten Positionspapier wird zur Definierung von MSC ebenfalls die Expression der Marker CD73, CD90 und CD105 sowie die Abwesenheit des Markers CD45 gefordert. Dieses Expressionsprofil konnte für die hier isolierten Zellen mittels RT-PCR gezeigt werden, wodurch sich Identität der Zellen als mesenchymale Stromazellen bestätigte. Zusätzlich wurde die Expression von CD150 untersucht, einem Marker hämatopoetischer Stammzellen (Kiel *et al.*, 2005). Wie der Marker war CD150 in der plastikadhärenten Zellfraktion des Knochenmarks nicht vorhanden, zeigte sich jedoch in der nichtadhärenten Fraktion aus hämatopoetischen Stammzellen.

Bezüglich der Isolierung von murinen BMSC wurde von einer spontanen adipozytären Differenzierung der Zellen beim Erreichen der Konfluenz berichtet (da Silva Meirelles und Beyer Nardi, 2003). Dies wurde auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen beobachtet. Die sich unter Konfluenz bildenden zellulären Einschlüsse konnten durch die Färbung mit Oil Red O zweifelsfrei als Fettvakuolen identifiziert werden.

Ferner zeigten die hier isolierten Zellen während der ersten Passagen deutlich unterscheidbare morphologische Strukturen. So wurden neben einem flach ausgedehnten Phänotyp auch kleine spindelförmige und runde Zellen beobachtet. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls bei der Isolierung humaner BMSC gemacht (Colter *et al.*, 2001). Die festgestellten Unterschiede der Zellen hinsichtlich Morphologie, Proliferation, Differenzierung und Expression von Markerproteinen deuteten dabei auf das Vorkommen verschiedener Subtypen von MSC im Knochenmark hin. So zeigten die isolierten runden und spindelförmigen Zellen ein extensiveres Differenzierungsverhalten zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten, als die flach ausgedehnten Zellen. In der von Colter *et al.* beschriebenen Kultur reduzierte sich ferner kontinuierlich die Zahl der runden und spindelförmigen Zellen, wohingegen sich der Anteil der Zellen mit flach ausgedehntem Phänotyp erhöhte. Dasselbe Phänomen konnte auch bei der Isolierung von murinen MSC in dieser Arbeit beobachtet werden. Eine vergleichende Analyse der Differenzierbarkeit der hier erhaltenen, morphologisch unterschiedlichen BMSC, könnte Aufschluss über die Existenz von Subtypen muriner BMSC geben. Da dies jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wurden bisher noch keine Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt.

#### **4.2. Die retrovirale Transduktion von mNSC und mBMSC**

Um therapeutische Transgene stabil in das Genom der mNSC und mBMSC zu integrieren, wurde der Gentransfer mittels retroviraler Transduktion gewählt. Zur Herstellung retroviraler Partikel wurde der Vektor pMSCV in Kombination mit der Verpackungszelllinie PT67

verwendet. Die von den PT67-Zellen produzierten retroviralen Partikel enthielten das polytrophische Hüllprotein 10A1, welches mit den retroviralen Rezeptoren RAM1 und GALV der Zielzellen interagieren kann. Die Viren waren somit für ein breites Spektrum von Säugerzellen infektiös (Miller, 1996). Sowohl mNSC als auch mBMSC konnten mit dem verwendeten Transfersystem retroviral transduziert werden, wobei die Ausbeute an Transfektanden für mBMSC höher war als für mNSC. Die Bedingungen während der retroviralen Transduktion waren allerdings für beide Zelllinien unterschiedlich. Um den Stammzellcharakter der mNSC aufrecht zu erhalten, mussten diese unter serumfreien Bedingungen transduziert werden. Dieser Umstand wirkte sich möglicherweise auf die Virusproduktion der Verpackungszelllinie PT67 aus. Die vom Hersteller der Zellen empfohlene Zusammensetzung des PT67-Kulturmediums beinhaltet die Zugabe von 10% FCS. Zur Produktion retroviraler Partikel für die retrovirale Transduktion der mNSC wurde allerdings Medium ohne Serum verwendet. Somit fand die Virusproduktion hier unter für die Verpackungszelllinie suboptimalen Bedingungen statt. Im Gegensatz dazu wurden virale Partikel zur Transduktion von mBMSC in serumhaltigem Medium hergestellt, also unter für die Verpackungszelllinie günstigeren Bedingungen.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Transduktionseffizienz könnte im Mechanismus des retroviralen Gentransfers selbst zu finden sein. Retroviren können nur sich teilende Zellen infizieren, da zur Vermittlung des Präintegrationskomplexes in den Zellkern die Auflösung der Kernmembran nötig ist (Miller *et al.*, 1990). Sowohl mNSC als auch mBMSC wurden in gleicher Zelldichte 24 h vor der Zugabe retroviraler Partikel ausgesät. Möglicherweise befanden sich nach dieser Inkubationszeit mehr mBMSC als mNSC in der mitotischen Phase des Zellzyklus. In der Tat wurde bei der Handhabung von mNSC in dieser Arbeit festgestellt, dass die Zellen nach der Aussaat auf fibronektinbeschichtete Oberflächen eine gewisse Zeit zum Anheften an das Substrat benötigten und dementsprechend später proliferierten. mBMSC hingegen adhärirten unmittelbar nach der Aussaat und teilten sich früher. Möglicherweise könnte sich die Transduktionseffizienz von mNSC also durch eine längere Inkubationszeit der Zellen vor der retroviralen Transduktion steigern lassen.

Das zur Kontrolle verwendete Transgen EGFP wurde von beiden Zielzellen konstitutiv exprimiert. Die im Vektor vorhandene Promotor-Sequenz stellt dabei eine Variation der LTR-Sequenz des *moloney murine leukemia virus* (MMLV) dar, welche zur konstitutiven Expression von Transgenen in Stammzellen und anderen Säugerzellen entwickelt wurde (Hawley *et al.*, 1994). Die Expressionsleistung dieses Promotors ist mit anderen gängigen viralen Promotoren, z.B. dem Promotor des Zytomegalie-Virus (CMV), vergleichbar (Hawley *et al.*, 1994). Obwohl der Gentransfer über retrovirale Transduktion zu homogenen Transfektanden führen sollte (eine integrierte Sequenz pro Zelle), waren nach Transfektion mit der EGFP-Sequenz Signalunterschiede in der grünen Fluoreszenz von mNSC und

mBMSC zu beobachten. Dieses Phänomen wurde von der retroviralen Transduktion von Knochenmarkszellen bereits beschrieben und mit der unvollständigen Integration des viralen Vektors in das Wirtszell-Genom vor der ersten Zellteilung erklärt (Mikkola *et al.*, 2000).

### **4.3. Migration von mNSC und mBMSC zu experimentellen Hirntumoren *in vivo***

Die *in vivo*-Migration von mNSC und mBMSC wurde an einem syngenem Hirntumormodell mit der murinen Gliomzelllinie GL261 nachgewiesen. Nach Etablierung eines experimentellen Hirntumors wurden fluoreszenzmarkierte mNSC und mBMSC in die kontralaterale Hirnhemisphäre der Versuchstiere injiziert. Wie im Versuch gezeigt, wanderten die Zellen durch das Corpus callosum in die andere Hemisphäre und sammelten sich am Hirntumor an. mNSC waren dabei eher an den Tumorrändern lokalisiert, wohingegen mBMSC die Tumormasse stärker durchsetzten. Der Grund hierfür ist unklar, jedoch ist anzunehmen, dass die vom Tumor produzierten migrationsstimulierenden Substanzen unterschiedlich auf mNSC und mBMSC wirken. Wie in Kapitel 1.3.2 bereits verdeutlicht, sind erst wenige stimulierende Faktoren im Zusammenhang mit dem Tumortropismus von mNSC und mBMSC identifiziert. Zudem sind die Mechanismen der Stimulation weitgehend unklar. Ein Faktor, der sowohl bei NSC als auch bei BMSC migrationsinduzierend wirkt, ist VEGF (Schmidt *et al.*, 2005; Schichor *et al.*, 2006). SDF-1 und MCP-1 stehen ebenfalls im Zusammenhang mit der Migration beider Zelltypen (Ethesam *et al.*, 2004; Widera *et al.*, 2004; Menon *et al.*, 2007). Bei den beschriebenen Beobachtungen handelt es sich jedoch die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Sie resultieren aus jeweils individuellen Versuchsanordnungen *in vivo* und *in vitro*. Somit ist ein direkter Vergleich zwischen NSC und BMSC aus diesen Ergebnissen nicht möglich. Die in dieser Arbeit beobachteten Migrationsphänomene stehen im Einklang mit der bereits beschriebene Migration von NSC und BMSC zu experimentellen Hirntumoren *in vivo*. So zeigte Aboody für NSC und Nakamizo für BMSC, dass diese Zellen zu Tumoren der kontralateralen Hemisphäre migrieren können und die Tumormasse durchsetzen (Aboody *et al.*, 2000, Nakamizo *et al.*, 2005). Zudem wurde von Aboody ebenfalls das Phänomen beobachtet, dass NSC die Tumormasse an ihren Rändern umgeben. Da in beiden Arbeiten jedoch mit unterschiedlichen Gliomzelllinien und unterschiedlichen Versuchstieren gearbeitet wurde, sind auch diese Ergebnisse nicht direkt vergleichbar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Migrationsexperimente *in vivo* stellen erstmals einen direkten Vergleich der Migrationseigenschaften von mNSC und mBMSC dar. Die Versuchsanordnungen für mNSC und mBMSC waren hinsichtlich des Tumormodells, der Versuchstiere und der Zeiträume gleich. Aus den unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich mNSC und mBMSC wird deutlich, dass sich die Verwendung unterschiedlicher Stammzelltypen als Transporter therapeutischer

Proteine auf den Erfolg einer Therapie auswirken könnte. Je nach Ausprägung des Tumortropismus der verwendeten Zellen könnten die Ergebnisse variieren, in Abhängigkeit davon, in welchem Maße der Tumor von den Zellen durchsetzt würde bzw. infiltrierende Tumorzellen erreicht würden.

#### **4.4. Das rCE/CPT-11-Systems in mNSC**

##### **4.4.1. Konstruktion verschiedener rCE-Expressionsvektoren und Aktivitätstest**

Die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellte rCE-Sequenz enthielt im Vergleich zur Referenzsequenz (Genbank-Eintrag: AF036930) eine T-C-Mutation der Base 304. Diese Mutation betraf die Aminosäure 101, wobei statt der hydrophoben Aminosäure Phenylalanin die polare Aminosäure Serin eingebaut wurde. Laut persönlicher Mitteilung wurde bei den Arbeiten des Kooperationspartners die Sequenz mit T-C-Mutation verwendet. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein Vektor mit der korrekten rCE-Sequenz hergestellt. Die Mutation wurde dabei durch ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese behoben.

Zur Erhöhung der Expressionsleistung wurde des weiteren eine Kozak-Sequenz zur Steigerung der Translationsinitiation (Kozak, 1989) am 5-Terminus der rCE-Sequenz angefügt. Zur korrekten Vermittlung der Sequenz musste ein zusätzliches Glycin-Codon direkt nach dem Start-Codon eingefügt werden. Diese Änderung sollte keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben, dennoch wurde sowohl für die rCE-Sequenz mit Mutation als auch ohne Mutation ein Expressionsplasmid mit und ohne Kozak-Sequenz konstruiert.

Wie ein Vergleich der CE-Aktivitäten im Serum transduzierter mNSC zeigte, führte die Verwendung des Vektors mit behobener Mutation und zusätzlicher Kozak-Sequenz zu den besten Ergebnissen. Die vorhandene Mutation bei ebenfalls vorhandener Kozak-Sequenz reduzierte dabei die Aktivität. Bei Verwendung der Vektoren ohne Kozak-Sequenz war die rCE-Aktivität am geringsten. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen und bestätigt die Funktionalität der Kozak-Konsensus-Sequenz zur Steigerung der Expression von Transgenen in Säugerzellen. Aus den unterschiedlichen Aktivitäten der Enzyme mit und ohne Mutation wird deutlich, dass der Austausch von Phenylalanin durch Serin an der Position 101 die Enzymaktivität negativ beeinflusst. Wie sich aus Strukturanalysen ableiten lässt, betrifft die Mutation der Position 101 die Helix- $\alpha$ 1 der rCE (Bencharit *et al.*, 2002). Diese  $\alpha$ -Helix ist Bestandteil der katalytischen Domäne des Enzyms. Ferner befindet sich der Rest der Aminosäure 101 an der dem aktiven Zentrum zugewandten Helix-Seite. Wenngleich die Aminosäure 101 auch nicht katalytischer Bestandteil des aktiven Zentrums ist, so könnten

sich durch den Austausch einer hydrophoben Aminosäure durch eine polare Aminosäure strukturelle Veränderungen ergeben bzw. die Affinität der Substratbindung könnte sich geändert haben. Beide Ereignisse würden die unterschiedlichen Aktivitäten der untersuchten Sequenzvarianten erklären.

#### **4.4.2. „Bystander“-Effekt rCEsec-produzierender mNSC und Quantifizierung der rCE-Aktivität**

Der „Bystander“-Effekt rCEsec-produzierender mNSC in Kombination mit CPT-11 auf Tumorzellen wurde in einem Kokultur-Assay untersucht. Dabei konnte kein gesteigerter zytotoxischer Effekt im Vergleich zu Leervektor-transduzierten mNSC festgestellt werden. Ein erhöhter Umsatz an CPT-11 war ebenfalls nicht zu beobachten. Dagegen führte die Verwendung rekombinanter rCE im Versuch zu einer deutlichen Reduktion der Prodrug CPT-11 und zum massiven Absterben der Tumorzellen (siehe Kapitel 3.3.3). Da als Grund für die unzureichende Vermittlung eines „Bystander“-Effektes eine zu geringe Menge an produzierter rCE vermutete wurde, wurden weitere quantitative Untersuchungen bezüglich der rCE-Expression durchgeführt.

Die initiale Kontrolle der CE-Aktivität in Zelllysat und konditioniertem Medium von Zellen mit und ohne zusätzliche rCEsec-Sequenz zeigte eine gesteigerte Aktivität im Medium rCEsec-produzierender Zellen, wohingegen die Aktivitäten im Zelllysat gleich waren. Da eine modifizierte rCE-Sequenz ohne intrazelluläres Retentionssignal verwendet wurde, war dieses Ergebnis erwartet und gewünscht. Der Export der rCE durch Deletion des entsprechenden carboxyterminalen Signalpeptids wurde bereits beschrieben (Potter *et al.*, 1998). Bei der Sequenz handelt es sich um die sechs carboxyterminalen Aminosäuren vor dem Stopp-Codon, welche bei dem hier verwendeten Enzym ebenfalls deletiert waren. Diese Sequenzmodifikation führte hier offensichtlich auch zum Export des aktiven Enzyms.

Ein quantitativer Vergleich der Aktivität mit rekombinanter Carboxylesterase mittels Aktivitätstest und Western Blot ergab, dass die Menge an rCE im Medium transduzierter mNSC vergleichsweise gering war. So konnten  $10^7$  eingesetzte mNSC über einen Zeitraum von 48 h nur ca. 1/16 000 U rCE produzieren (siehe Kapitel 3.3.4). Im Kokulturassay wurde als Positivkontrolle jedoch eine rCE-Konzentration von 10 U/ml eingesetzt. Diese Konzentration konnte von rCE-produzierenden mNSC augenscheinlich nicht annähernd erreicht werden.

Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen wurde unlängst von der erfolgreichen Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie *in vivo* mit rCEsec-produzierenden Stammzellen und CPT-11 berichtet (Danks *et al.*, 2007). Von dieser Arbeitsgruppe wurde

auch die in dieser Arbeit zur Klonierung von Expressionsvektoren verwendete rCEsec-Sequenz Verfügung gestellt. Bei den von Danks *et al.* verwendeten Zellen handelte es sich um immortalisierte embryonale Stammzellen aus dem humanen Telencephalon. Diese wurden unter Verwendung eines adenoviralen Vektors transduziert. Die rCE-Aktivität im konditionierten Medium wurde mit 500-800 U/ml, gemessen 3 bis 10 Tage nach adenoviraler Transduktion, angegeben. Darüber hinaus konnten Neuroblastom-Zellen durch die Kombination aus konditioniertem Medium und CPT-11 *in vitro* abgetötet werden.

Die von Danks *et al.* gewählte Form des adenoviralen Gentransfers unterschied sich grundlegend von dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gentransfer mittels retroviraler Transduktion. Beim retroviralen Gentransfer wird eine Kopie des Transgens in das Genom der Wirtszelle integriert. Während der Zellteilung wird das Transgen durch die semikonservative DNA-Replikation auf beide Tochterzellen übertragen. Dadurch handelt es sich bei der retroviralen Transduktion um einen stabilen Gentransfer (Ausubel *et al.*, 1995; Coffin *et al.*, 1996). Die adenovirale Transduktion hingegen ist eine transiente Form des Gentransfers, da die adenovirale DNA nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern episomal vorliegt (Romano *et al.*, 1999). Es können zudem mehrere Kopien des Transgens gleichzeitig in einer Zelle existieren, wodurch die Expression des Transgens initial vergleichsweise hoch ist. Mit voranschreitenden Zellteilungen reduziert sich die Kopienzahl jedoch wieder, da das episomale Virusgenom entsprechend auf die Tochterzellen verteilt wird (Buttgereit *et al.*, 2000). Augenscheinlich kann durch die Verwendung adenoviraler Vektoren, zumindest kurzfristig, eine therapeutisch ausreichende Menge rCE produziert werden. Vergleichende Untersuchungen zur Expression von Transgenen nach adenoviraler bzw. retroviraler Transduktion verdeutlichen die initial hohe, aber nicht dauerhafte Expression durch Verwendung adenoviraler Vektoren (Bertran *et al.*, 1996). Bertran *et al.* verglichen die Expression von Reportergenen in HeLa-Zellen nach entweder retroviralem oder adenoviralem Gentransfer. So wurde 36 h nach Transduktion in dem überwiegenden Teil adenoviral transduzierter Zellen ein ca. 1000fach erhöhtes Reportersignal detektiert. Ein ähnlich starkes Signal konnte zu diesem Zeitpunkt nur von einem geringen Teil der retroviral transduzierten Zellen erreicht werden. 17 Tage später wurden die Reportersignale erneut verglichen. Die Signalintensität adenoviral transduzierter Zellen ging dabei auf die Basisintensität vor der Transduktion zurück, wohingegen sich der Anteil der retroviral transduzierten Zellen mit 100-1000fach verstärktem Reportersignal sogar erhöht hatte. Die Tatsache, dass adenoviral transduzierte Zellen also das Transgen nicht konstant exprimieren können, muss bei einem therapeutischen Einsatz berücksichtigt werden. Die kontinuierliche Bereitstellung therapeutischer Proteine kann letztendlich wahrscheinlich nur durch retroviral transduzierte Zellen gewährleistet werden.

Ein weiterer Unterschied zu der Arbeit von Danks *et al.* lag in der Verwendung unterschiedlicher Promotorsequenzen. Die Expression sollte allerdings bei dem in dieser Arbeit verwendeten modifizierten MMLV-Promotor ähnlich hoch sein, wie bei dem von Danks *et al.* verwendeten CMV-Promotor (Hawley *et al.*, 1994). Allerdings wurden neben unterschiedlichen Transfersystemen und Promotoren auch unterschiedliche Zelllinien verwendet. Deren differenzielle Interaktion mit den verwendeten Promotoren ist unklar und könnte auch wesentlich zu einer unterschiedlich starken Expression der rCE geführt haben.

Zusammenfassend ist für das rCE/CPT-11-System festzuhalten, dass auf der Basis retroviral transduzierter mNSC keine ausreichenden Mengen des Enzyms hergestellt werden konnten, um die Prodrug CPT-11 therapeutisch wirksam zu aktivieren. Daher wurde ein weiteres Enzym/Prodrug-System untersucht, das *E. coli*-PNP/Prodrug-System.

## **4.5. Das *E. coli*-PNP/Prodrug-Systems in mNSC und mBMSC**

### **4.5.1. Konstruktion eines PNP-Expressionsvektors und PNP-Expression in mNSC und mBMSC**

Die für die *E. coli*-PNP-kodierende Sequenz, *deoD*, wurde zur Herstellung eines Expressionsvektors ohne weitere Modifikationen in das Plasmid pMSCV inseriert. Wiederrum wurde unmittelbar vor dem Start-Codon eine Kozak-Sequenz zur Steigerung der Translationsinitiation eingebracht. Die *deoD*-Sequenz blieb davon jedoch unbeeinflusst, da ein für die Kozak-Sequenz wichtiges Element, eine Guanin-Base an der Position +4, bereits in der Originalsequenz enthalten war.

Mit diesem Vektor retroviral transduzierte mNSC und mBMSC integrierten die *deoD*-Sequenz in ihr Genom und produzierten ein entsprechendes Transkript. Dies konnte durch PCR mit genomischer DNA bzw. cDNA als Matrize nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5.1).

Der Aktivitätstest nach Le Tissier *et al.* (1994) zeigte eine gesteigerte PNP-Aktivität im Lysat transduzierter mNSC und mBMSC. Diese war für beide Zelltypen etwa gleich. Im Assay war auch eine hohe PNP-Basisaktivität Leervektor-transduzierter Zellen zu beobachten. Dies spiegelt die Tatsache wieder, dass das im Versuch als Substrat eingesetzte Inosin sowohl von zelleigener PNP als auch von *E. coli*-PNP umgesetzt wird. Die bei dem *E. coli*-PNP/Prodrug-System eingesetzten Prodrugs werden allerdings ausschließlich von der *E. coli*-PNP, nicht aber von der zelleigenen Säuger-PNP katalysiert (Mao *et al.*, 1997). Bei den von Mao *et al.* verglichenen Kristallstrukturen der *E. coli*-PNP und der humanen und bovinen PNP zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Basen- und Nukleosidbindestellen. So lagen



diese Bindestellen bei der *E. coli*-PNP in einer weiter geöffneten Konformation vor, als die der humanen und bovinen PNP. Diese Änderung wurde als hauptsächliche Ursache für die breitere Substratspezifität der *E. coli*-PNP in Erwägung gezogen. Die strukturellen Unterschiede, sowie die Tatsache, dass alle verfügbaren PNP-Sequenzen entweder Ähnlichkeiten zur humanen oder zur *E. coli*-PNP zeigten, wurde dabei als definierendes Merkmal zweier distinkter PNP-Klassen gewertet. Für die Durchführung einer *E. coli*-PNP/Prodrug-Gentherapie bedeutet dies, dass durch die lokale Applikation der *E. coli*-PNP der Umsatz der Prodrugs auf den Zielort beschränkt werden kann, und Gewebe ohne *E. coli*-PNP-Aktivität von zytotoxischen Effekten nicht betroffen sind.

#### **4.5.2. Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-produzierende mNSC und mBMSC**

Die Wirkung der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf Zellen mit und ohne *E. coli*-PNP-Aktivität wurde für mNSC und mBMSC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Prodrugs untersucht. Die Inkubation mit FdAdo führte dabei sowohl bei mNSC als auch bei mBMSC zu einem signifikant höheren Absterben von Zellen mit PNP-Aktivität im Gegensatz zu Leervektor-transduzierten Zellen. Ähnliche Effekte konnten für die Prodrugs Fludara und FaraA bei mBMSC, nicht jedoch bei mNSC beobachtet werden.

In Zellen ohne *E. coli*-PNP-Aktivität werden die Prodrugs FdAdo und FaraA (die dephosphorylierte Form von Fludara) von der zelleigenen Desoxycytidin-Kinase (dCK) phosphoryliert und zu den entsprechenden Triphosphaten weiter prozessiert (Arner *et al.*, 1995). Während der DNA-Synthese konkurrieren diese mit dATP um den Einbau in den DNA-Strang. Der Einbau der fluorierten Adenosinanaloga führt dabei zur Termination der DNA-Elongation (Huang *et al.*, 1990). Ebenso wurde gezeigt, dass diese Prodrugs auch die RNA-Synthese inhibieren können (Huang *et al.*, 2000)

Im Gegensatz dazu, werden in Zellen mit *E. coli*-PNP-Aktivität FaraA und FdAdo durch die PNP zu FAde katalysiert, welches von der zelleigenen Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) und zellulären Kinasen zu den entsprechenden Adenin-Nukleotiden umgesetzt wird. Diese werden hauptsächlich in die zelluläre RNA eingebaut, was durch Störung der RNA- und Proteinsynthese zum Zelltod führt (Parker *et al.*, 1998).

Wie ein gesteigertes Absterben von PNP-produzierenden mNSC mit FdAdo und PNP-produzierenden mBMSC mit Fludara, FaraA und FdAdo vermuten lässt, werden die Prodrugs in diesen Fällen eher entlang des Stoffwechselweges PNP-APRT zu zytotoxischen Metaboliten verarbeitet. Der „reguläre“ Umsatz mittels Desoxycytidin-Kinase spielt dabei augenscheinlich eine untergeordnete Rolle. In Kombination PNP-produzierender mNSC mit

Fludara und FaraA wurde nur ein geringer Effekt vereinzelt beobachtet. Dies indiziert, dass sich beide Wege des Prodrug-Umsatzes (PNP-APRT und dCK) hier die Waage halten.

Wie bereits beschrieben, war der zusätzliche zytotoxische Effekt der Prodrug FdAdo am höchsten. Dies ist vermutlich durch die deutlich höhere Substratspezifität der *E. coli*-PNP zu FdAdo im Gegensatz zu FaraA zu erklären. Der  $K_m$ -Wert für FaraA beträgt 960  $\mu\text{M}$  gegenüber 22  $\mu\text{M}$  für FdAdo (Parker *et al.*, 2003). Die Prodrug FdAdo wird also dementsprechend schneller durch die *E. coli*-PNP katalysiert.

Bei der Betrachtung der dosisabhängigen Wirksamkeit von Fludara und FaraA in Kombination mit mNSC fällt auf, dass eine weitaus geringere Konzentration an FaraA nötig war, um einen mit Fludara vergleichbaren Effekt zu erzielen. Üblicherweise wird Fludara im Serum zu FaraA dephosphoryliert und dann über Nukleosid-spezifischen Membrantransporter in die Zelle aufgenommen. Diese Membranproteine transportieren dabei präferentiell die dephosphorylierte Form (Danhauser *et al.*, 1986). Die Versuche mit mNSC fanden in serumfreiem Medium statt, wodurch es wahrscheinlich nicht im vergleichbaren Maße zur Dephosphorylierung und zellulären Aufnahme von Fludara kam. Ein vergleichbarer Effekt konnte bei mBMSC nicht festgestellt werden. Hier wurden die Versuche in serumhaltigem Medium durchgeführt.

#### **4.5.3. „Bystander“-Effekte PNP-produzierender mNSC und mBMSC auf Tumorzellen**

Zum Nachweis eines gesteigerten zytotoxischen Effektes auf Tumorzellen wurden PNP-produzierende mNSC und mBMSC mit verschiedenen Konzentrationen der Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo inkubiert. Das daraus gewonnen konditionierte Medium, sowie konditioniertes Medium Leervektor-transduzierter Zellen, wurde dann zur Inkubation der Tumorzelllinien GL261, U251, G55 und U87 verwendet. Aus dem unterschiedlichen Überleben der Tumorzellen ließen sich Rückschlüsse auf die Vermittlung eines „Bystander“-Effektes durch PNP-produzierende mNSC und mBMSC ziehen.

Die „Bystander“-Effekte waren sowohl bei mNSC als auch bei mBMSC in Kombination mit FdAdo am höchsten und führte stellenweise zu einem Absterben der Tumorzelllinien U251, U87 und G55 auf unter 20 % des Kontrollwertes. Wie bereits erwähnt ist FdAdo im Vergleich zu FaraA das deutlich bessere Substrat für die *E. coli*-PNP (Parker *et al.*, 2003). Dementsprechend mehr FdAdo wird in PNP-aktiven Zellen aus dem Substrat FdAdo umgesetzt. Der Metabolit FdAdo muss zur Entfaltung seiner Toxizität in der produzierenden Zelle durch die Adenin-Phosphoribosyltransferase umgesetzt werden. Gleichzeitig ist FdAdo im PNP/Prodrug-System für den „Bystander“-Effekt verantwortlich, da es die Membran passieren kann, und somit in Tumorzellen eindringen kann (Huges *et al.*, 1998). Wenn das

von der *E. coli*-PNP produzierte FAdo vollständig von der zelleigenen APRT umgesetzt wird, stirbt nur die FAdo-produzierende Zelle. Ein „Bystander“-Effekt kann nur durch einen FAdo-Überschuss entstehen, wenn mehr FAdo produziert wird, als von der zelleigenen APRT umgesetzt werden kann. Dieses überschüssige FAdo kann dann die Zelle verlassen und in Tumorzellen eindringen. Durch die unterschiedliche Substratspezifität der PNP war der erzielte FAdo-Überschuss bei FdAdo offensichtlich höher als bei Fludara und FaraA, was in unterschiedlich hohen „Bystander“-Effekten resultierte.

Insgesamt waren die beobachteten „Bystander“-Effekte bei mNSC höher als bei mBMSC, wo für die Prodrugs Fludara und FaraA keine „Bystander“-Effekte detektiert werden konnten. Möglicherweise ist die Balance zwischen FAdo-produzierender PNP und FAdo-umsetzender APRT in mNSC für einen „Bystander“-Effekt günstiger als in mBMSC. Bei einer weniger aktiven APRT in mNSC wäre der für den „Bystander“-Effekt bereitstehende FAdo-Überschuss entsprechend höher.

In einem im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten präliminären Versuch wurde beobachtet, dass PNP-produzierende mNSC nach Behandlung mit siRNA gegen APRT höhere Mengen der Prodrug FdAdo tolerierten. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass die zelleigenen APRT tatsächlich der kritische Punkt bei der Vermittlung der Therapie über „Bystander“-Effekte ist. Je weniger FAdo von der zelleigenen APRT umgesetzt wird, desto länger lebt die produzierende Zelle, desto mehr Prodrug kann von ihr umgesetzt werden und desto mehr FAdo steht im Überschuss für den „Bystander“-Effekt zur Verfügung. Zur Verifizierung dieses Ansatzes müsste dieses initiale Experiment zunächst mit einem breiten Prodrug-Spektrum wiederholt werden. Dabei sollte auch die Abnahme des APRT-Proteins oder des APRT-Transkriptes quantitativ belegt werden. Schließlich wäre zu klären, ob sich der „Bystander“-Effekt durch APRT-silencing tatsächlich erhöhen lässt.

Die beobachteten „Bystander“-Effekte waren hinsichtlich der Zielzellen GL261, U251, G55 und U87 unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies zeigt, dass die zytotoxischen Effekte dieses Systems hinsichtlich der betroffenen Zellen stark variieren und möglicherweise von der unterschiedlichen Ausprägung des individuellen zellulären Nukleinsäure-Metabolismus abhängen. Hieraus ergeben sich unmittelbare Konsequenzen bezüglich der Durchführung einer *E. coli*-PNP/Prodrug-Gentherapie. So ist anzunehmen, dass sich der Therapieerfolg von Patient zu Patient unterschiedlich darstellt, je nach individueller biologischer Eigenschaften der Tumorzellen. Dieser Sachverhalt würde zu dem Konzept einer „maßgeschneiderten“ Therapie führen, wobei vor der gentherapeutischen Behandlung zu klären wäre, inwiefern die Tumorzellen auf die Behandlung ansprechen. Solch eine Voranalyse bedürfte dann der Biopsie von Tumormaterial sowie der Inkulturnahme der Tumorzellen, wobei eine mögliche biologische Veränderung durch die Inkulturnahme berücksichtigt werden müsste. In diesem Zusammenhang wäre auch eine genauere Kenntnis der an der zytotoxischen Wirkung

beteiligten Enzyme hilfreich. Insbesondere die Korrelation der Zytotoxizität mit der Regulation der am Wirkmechanismus beteiligten Proteine, könnte zu einer Entscheidungsfindung pro oder contra PNP-Gentherapie maßgeblich beitragen. Eine Expressionsanalyse der Gene des Nukleinsäure-Metabolismus der Tumorzellen, wie z.B. APRT, würde dabei objektive Daten bezüglich der Erfolgsaussichten des Therapiekonzeptes liefern. Das dafür erforderliche Tumorgewebe könnte unmittelbar nach der Entnahme mit geringem Zeitaufwand analysiert werden. Durch die direkte Analyse des Materials würden darüber hinaus möglich metabolische Veränderungen der Zellen bei Inkulturnahme vermieden.

#### **4.5.4. Quantifizierung der „Bystander“-Effekte PNP-produzierender mNSC in Kombination mit FdAdo auf die Gliomzelllinien U87 und G55**

Der „Bystander“-Effekt PNP-produzierender mNSC mit FdAdo wurde in einem Kokultur-Assay mit den Tumorzelllinien U87 und G55 näher untersucht. Die Quantifizierung des Effektes erfolgte zunächst in Abhängigkeit der FdAdo-Konzentration, dann in Abhängigkeit der mNSC-Zahl bei gleichbleibender FdAdo-Konzentration. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine FdAdo-Konzentration von nur 0,75  $\mu\text{M}$  zu einem fast vollständigen Absterben der Tumorzellen führte. Diese Konzentration befindet sich in einem physiologischen Spektrum, da bei *in vivo*-Experimenten Plasmakonzentrationen für FdAdo von über 10  $\mu\text{M}$  erreicht wurden (Parker *et al.*, 2003).

Insgesamt konnte bezüglich der Zelllinie U87 ein größerer „Bystander“-Effekt erzielt werden, als bei der Zelllinie G55. Die unterschiedliche Wirksamkeit hinsichtlich der Zielzellen wurde auch schon im Vorversuch beobachtet und zeigt wiederum die spezifische Wirkweise im Bezug auf individuell unterschiedliche Tumorzellen.

Die zellzahlabhängige Untersuchung des „Bystander“-Effektes bei festen FdAdo-Konzentrationen ergab bei einem ausgeglichenen Verhältnis PNP-produzierender Zellen und Tumorzellen eine Reduktion der Tumorzellen um 50 – 60 %, bei der halben Menge PNP-produzierender mNSC konnte noch ein Rückgang der Tumorzellen um ca. 40 % beobachtet werden. Ein mNSC/Tumorzellen-Verhältnis von 1:10 zeigte keine signifikante Änderung hinsichtlich des Überlebens der Tumorzellen. Allerdings wurden die Versuche nicht bei der bisher maximal eingesetzten FdAdo-Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Vielmehr wurden Konzentrationen gewählt, welche im Vorversuch die höchsten „Bystander“-Werte ergaben (0,25 bzw. 0,5  $\mu\text{M}$ ). Durch eine geringere FdAdo-Konzentration sollte ein möglichst langes Überleben der PNP-produzierenden mNSC gewährleistet werden. Es ist anzunehmen, dass der Einsatz höherer FdAdo-Konzentrationen zu einer größeren Reduktion der absoluten

Tumorzellzahl geführt hätte. In diesem Versuch sollte jedoch ein „Bystander“-Effekt bei einer möglichst geringen FdAdo-Konzentration untersucht werden.

Bezüglich des „Bystander“-Effektes des *E. coli*-PNP/Prodrug-Systems wurde bisher lediglich vom Effekt PNP-produzierender Tumorzellen auf dieselben, nicht-produzierenden Tumorzellen berichtet. Die bisher beschriebenen Ansätze dieses Systems basieren alle auf dem „klassischen“ Modell einer Enzym/Prodrug-Gentherapie, wonach die Tumorzellen selbst das therapeutische Enzym produzieren sollen. Vergleichbare Daten mit PNP-produzierenden migratorischer Stammzellen und ihrem „Bystander“-Effekt auf Tumorzellen liegen bisher nicht vor.

Mohr *et al.* haben die Wirksamkeit des PNP/Prodrug-Systems an unterschiedlichen humanen hepatozellulären Karzinomzelllinien (HCC) getestet. Diese waren zur PNP-Produktion adenoviral transduziert und zeigten nach Fludara-Behandlung „Bystander“-Effekte *in vitro* auf nicht-transduzierte Zellen. Diese waren je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt. So führte bereits 1 % transduzierter Zellen einer bestimmten HCC-Linie nach Fludara-Behandlung zu einem Absterben der Tumorzellen um 40 %, wohingegen bei einer anderen HCC-Linie kein „Bystander“-Effekt zu verzeichnen war (Mohr *et al.*, 2000). Dies zeigt wiederum, wie sehr der Erfolg dieses Systems von dem Metabolismus der jeweiligen Zielzellen abhängt, und verdeutlicht zugleich die Notwendigkeit von Voranalysen zur Durchführung „maßgeschneiderter“ Therapien. Wie Mohr *et al.* weiterhin zeigen konnten, gilt die Abhängigkeit des Therapieerfolges von den jeweiligen Zielzellen nicht nur für das *E. coli*-PNP/Prodrug-System. In derselben Studie wurde auch die Wirksamkeit des HSV1-TK/GCV-System auf verschiedene HCC-Linien untersucht. Hier zeigten sich ebenfalls gravierende Unterschiede im Behandlungserfolg verschiedener Zelllinien. So variierten die Werte überlebender Tumorzellen bei 10 % HSV1-TK-transduzierten Zellen nach Ganciclovir-Behandlung zwischen 40 und 80 %. Insgesamt wies das *E. coli*-PNP/Prodrug-System dabei bessere „Bystander“-Werte auf. Wie im *E. coli*-PNP/Prodrug-System werden auch im HSV1-TK/GCV-System modifizierte Nukleotide als Prodrugs eingesetzt. Mithin beeinflusst auch hier wahrscheinlich der individuelle zelluläre Nukleotidstoffwechsel den Therapieerfolg.

Bei ebenfalls adenoviral transduzierten Gliomzellen wurden „Bystander“-Effekt *in vivo* untersucht, indem unbehandelte Gliomzellen in bestimmten Verhältnissen zusammen mit PNP-produzierenden Gliomzellen zur Induktion subkutaner Tumoren injiziert wurden (Hong *et al.*, 2004). Nach Fludara-Behandlung konnten „Bystander“-Effekte bereits bei Tumoren mit einem Anteil von unter 10 % PNP-produzierender Tumorzellen beobachtet werden. Die Koinjektion von 2,5 % PNP-produzierender Zellen konnte dabei das Tumorstadium lediglich verlangsamen. Ein Anteil von 5 % führte bereits bei 2 von 9 Versuchstieren zur vollständigen Regression des Tumors. Bei 10 % PNP-produzierender Gliomzellen war auch nach 80 Tagen kein weiteres Tumorstadium festzustellen, 4 von 6 Versuchstieren waren tumorfrei. Bei dem

von Hong *et al.* untersuchten Tumormodell handelte es sich allerdings um die langsam wachsende Gliomzelllinie D54, mit einer Verdopplungszeit von über 15 Tagen. Wie bereits erwähnt, sind Zellen mit geringer Proliferation als Zielzellen für das *E. coli*-PNP/Prodrug-System besonders geeignet, da der Wirkmechanismus auf der Inhibition der RNA- und Proteinsynthese beruht und somit nicht Zellzyklus-abhängig ist. Die in diesem Fall erfolgte Einbringung des PNP-Gens mittels adenoviralen Gentransfers, ist bei langsam proliferierenden Zellen insofern sinnvoll, als dass eine Verteilung (und somit Verdünnung) der kodierenden Sequenzen auf die Tochterzellen entsprechend spät stattfindet. Die von Hong *et al.* durchgeführte Fludara-Behandlung am Tag 14, 15 und 16 nach Tumorzellinjektion lag im Bereich der ersten Zellteilung der D54-Zellen. Somit war das PNP-Gen noch in hoher Kopieenzahl vorhanden, entsprechend hoch war wahrscheinlich auch die Anzahl aktiver PNP-Enzyme. Augenscheinlich konnte somit von 10 % adenoviral transduzierter Tumorzellen genug PNP produziert werden, um nach Fludara-Behandlung das Wachstum eines langsam wachsenden Tumors zu verhindern.

*In vivo*-Versuche mit stattdessen retroviral transduzierten, PNP-produzierenden D54-Gliomzellen zeigten, dass sich das Tumorwachstum durch Behandlung mit FdAdo signifikant reduzieren ließ, wenn ca. 20 % der Tumorzellen PNP produzierten (Parker *et al.*, 2003). Das Wachstum der subkutanen Tumore konnte hierbei zwar nicht verhindert werden. Jedoch war eine dosisabhängige Verlangsamung des Wachstums festzustellen. So wurde Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors bei der maximal untersuchten Dosis FdAdo (20 mg/kg/Dosis bei 5 Dosen/Tag über 3 Tage) halbiert. Bei 13.3 mg/kg/Dosis verlangsamte sich das Wachstum um ca. 10 Tage. Der kurative Effekt des Behandlungsschemas 10 mg/kg/Dosis bei 5 Dosen/Tag über 7 Tage wurde bei 100 % PNP-produzierenden Tumorzellen nachgewiesen. Hierbei wurden jedoch keine „Bystander“-Effekte gemessen, da alle Tumorzellen das PNP-Enzym produzierten.

Die von Parker *et al.* erzielten „Bystander“-Ergebnisse *in vivo* liegen vom Effekt her in der Größenordnung der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen *in vitro*. Sie legen die Vermutung nahe, dass die hier retroviral transduzierten, PNP-produzierenden mNSC ein Tumorwachstum *in vivo* ebenfalls signifikant hemmen könnten. Der Therapieerfolg wird allerdings wohl davon abhängen, inwiefern die jeweiligen Tumorzellen auf die Enzym/Prodrug-Behandlung reagieren. Wie die hier vorliegende Arbeit und andere Arbeiten zeigen, ist der „Bystander“-Effekt darüber hinaus grundsätzlich von der Zahl der PNP-produzierenden Zellen abhängig. Je mehr Zellen die Prodrug umsetzen, desto größer der Effekt. Des weiteren wird, wie von Parker *et al.* gezeigt, der Behandlungserfolg auch hier von dem jeweiligen Behandlungsschema abhängen.

#### 4.6. Fazit und Ausblick

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer funktionalen Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Hirntumore durch migratorische Stammzellen *in vitro*. Mit beiden PNP-produzierenden Stammzelllinien lassen sich Tumorzellen *in vitro* signifikant abtöten. Die besten Ergebnisse wurden diesbezüglich mit neuronalen Stammzellen erzielt. Die Kombination mit der Prodrug FdAdo führte in Kokultur zu einem fast vollständigen Absterben der Tumorzellen. Zudem konnten bei verminderter Zahl PNP-produzierender Zellen immernoch hohe „Bystander“-Effekte erzielt werden. Die erfolgreiche Vermittlung von „Bystander“-Effekten durch mNSC mit der Prodrug Fludara unterstreicht dabei, dass ein klinischer Einsatz des Systems realistisch ist, da es sich bei Fludara um ein zugelassenes Medikament in standardmäßiger klinischer Anwendung handelt. Fludara wird zur Behandlung chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) intravenös verabreicht (Keating *et al.*, 1989). Die Möglichkeit zur erfolgreichen Behandlung von Tumoren im zentralen Nervensystem verdeutlichte die Fallstudie eines CCL-Patienten, bei welchem die symptomatische Infiltration des Hirns und des Rückenmarks festgestellt worden war. Nach Abschluss der systemischen Fludara-Behandlung in Standard-Dosierung konnte die vollständige Remission, auch nach weiteren 6 Monaten, festgestellt werden (Elliott *et al.*, 1999). Bei Überdosierung von Fludara können allerdings schwerwiegende neurologische Effekte, wie Blindheit, Koma und Tod auftreten (Produktinformation Fludara, Bayer-HealthCare, 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt, werden die zytotoxischen Effekte von Fludara durch die Umsetzung mittels PNP-produzierender mNSC verstärkt. Diese Verstärkung würde sich durch die tumortrophen Eigenschaften der Zellen lokal auf den Tumor beschränken lassen. Somit könnte Fludara in entsprechend geringeren Dosen gegeben werden, was systemische Nebeneffekte minimieren würde. Die Verringerung systemischer Nebenwirkungen ist ein Ziel der Enzym/Prodrug-Gentherapie. Weitere bekannte Nebenwirkungen von Fludara, welche sich durch die lokale Aktivierung verringern ließen, sind Knochenmarkssuppression, Knochenmarks-Hypoplasie oder -Aplasie und hämolytische Anämie.

Die Verwendung von mBMSC in Kombination mit PNP und FdAdo führte ebenfalls zu signifikanten Effekten hinsichtlich des Absterbens von Tumorzellen. Diese waren zwar weniger stark ausgeprägt, dennoch können auch diese Zellen wirksame „Bystander“-Effekte vermitteln. Über die klinische Verwendung von FdAdo liegen bisher keine Daten vor. Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt, ist seine zytotoxische Wirkung jedoch etwa zehnmal höher als die von FaraA, dem dephosphorylierten Fludara. Sein erfolgreicher Einsatz als Prodrug in dieser und anderen Arbeiten (Parker *et al.*, 2003), macht FdAdo zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Tumorbehandlung mit der PNP/Prodrug-Gentherapie.

Die Wirksamkeit des PNP/Prodrug-Systems ist gerade in der Behandlung von Gliomen von großer Bedeutung, da bisherige chemotherapeutische Ansätze nur proliferierende Zellen adressierten. Infiltrierende Gliomzellen zeichnen sich jedoch durch ein reduziertes Proliferationsverhalten aus (Mariani *et al.*, 2001b). Gleichzeitig bilden diese Zellen aber die Ausgangsbasis für einen rezidivierenden Tumor (Burger *et al.*, 1983; Gaspar *et al.*, 1992). Die Abtötung dieser infiltrierenden Gliomzellen ist durch Verwendung des PNP/Prodrug-Systems möglich, da es die Tumorzellen durch Inhibition der RNA- und Proteinsynthese, mithin durch Störung des zellulären Stoffwechsels schädigt (Parker *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde sowohl für mNSC als auch für mBMSC eine gerichtete Migration zu experimentellen Hirntumoren *in vivo* nachgewiesen. Die dabei gemachte Beobachtung, dass sich mNSC eher an der Tumorperipherie ansammeln, könnte sich für die Vermittlung der Therapie auf infiltrierende Gliomzellen als sehr nützlich erweisen, da es sich bei Ränder der Tumoren gleichzeitig um die Infiltrationszone handelt (Burger *et al.*, 1983). Wie in dieser Arbeit weiterhin gezeigt wurde, hängt der therapeutische Effekt maßgeblich von der Anzahl der Prodrug-umsetzenden Zellen ab. Da es sich bei der Infiltrationszone von Glioblastomen um einen Bereich geringerer Zellularität handelt, könnte mit präferentiell dort lokalisierenden migratorischen Stammzellen ein therapeutisch wirksames Stammzellen/Tumorzellen-Verhältnis erreicht werden. Somit könnte sich die PNP/Prodrug-Therapie durch den Einsatz von mNSC exakt auf die nichtproliferierenden infiltrierenden Zellen lokalisieren lassen.

Eine weitere Steigerung der „Bystander“-Effekte PNP-produzierender Zellen könnte zusätzlich durch die Hemmung der zelleigenen APRT erreicht werden. Präliminäre Versuche des APRT-*silencing* mit siRNA wurden von mir bereits unternommen. Dabei zeigte sich, dass mNSC mit siRNA-Behandlung höhere Mengen FdAdo tolerierten. Mit einer zielgerichteten Inhibition der APRT-Aktivität ließen sich sicher höhere „Bystander“-Effekte erzielen, welche im hier vorgestellten Konzept die alleinigen Determinanten des zytotoxischen Effektes auf die Tumorzellen sind.

Zunächst müssen jedoch die hier gemachten Therapieerfolge *in vitro* in Versuchen *in vivo* bestätigt werden. Da sich mit mNSC die höheren „Bystander“-Effekte erzielen ließen, empfiehlt sich deren initiale Verwendung. Ein erstes aussagekräftiges Ergebnis ließe sich durch die Verwendung der Zellen in einem subkutanen Tumormodell erzielen. Die Tumorzelllinien G55 und U87, welche in dieser Arbeit in Kombination mit PNP-produzierenden mNSC ausführlich charakterisiert wurden, bilden beide subkutane Tumoren in Nacktmäusen. Wie in einem Versuch im Labor für Hirntumorbiologie beobachtet wurde, wachsen Subkutane U87-Tumore im Vergleich zu G55-Tumoren sehr langsam, was sie als ideale Zielzellen eines PNP/Prodrug-basierten Therapieansatzes kennzeichnet. Mit der Verwendung eines langsam wachsenden subkutanen Tumormodells, ließen sich zudem Ergebnisse erzielen, welche auch



mit denen anderen Arbeitsgruppen vergleichbar sind (Parker *et al.*, 2003; Gadi *et al.*, 2003). Die Effektivität des Systems könnte so besser eingeschätzt werden.

Um jedoch konkrete präklinische Daten im Hinblick auf den Einsatz des Therapiekonzeptes bei Hirntumoren zu erhalten, ist die Untersuchung in intrakraniellen Tumormodellen unumgänglich. Hierbei sollte besonders der Einfluss der Therapie auf invadierende Gliomzellen untersucht werden. Wie bereits erwähnt, gelten diese Zellen als Quelle rezidivierender Tumoren und sind, aufgrund ihres eingeschränkten Proliferationsverhaltens die idealen Zielzellen einer PNP/Prodrug-Gentherapie. Unlängst wurden im Labor für Hirntumorbiologie mehrere Tumorstammzelllinien aus humanen Glioblastomen isoliert, welche *in vivo* hochinvasive intrakranielle Tumore bildeten (Günther *et al.*, 2007). Anhand dieser Zelllinien könnte die Wirksamkeit der PNP/Prodrug-Gentherapie auf invadierende Gliomzellen *in vivo* untersucht werden. Gleichzeitig könnte ein erster Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* bei unterschiedlichen Gliomzelllinien hergestellt werden. Dies würde die in dieser Arbeit festgestellte Abhängigkeit des Therapieerfolges von den Zielzellen näher beleuchten. Sollte sich dabei ein Zusammenhang bestätigen, könnte in Expressionsstudien versucht werden, die Determinanten im zellulären Stoffwechsel zu identifizieren. Dies würde konkret zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus des PNP/Prodrug-Systems beitragen, sowie, im Hinblick auf eine „maßgeschneiderte“ Therapie, ein weiteres Analysewerkzeug bereitstellen, um der Heterogenität bezüglich Subgruppen von Patienten effektiv zu begegnen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Vermittlung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie gegen Hirntumoren durch migratorische murine Stammzellen untersucht. Der Isolierung muriner neuraler Stammzellen (mNSC) und muriner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark (mBMSC) folgte dabei deren Charakterisierung anhand ihrer jeweils definierenden Merkmale. Mittels quantitativer *real-time* PCR konnte das Differenzierungsverhalten der mNSC zusätzlich näher quantifiziert werden. Zur Expression von Transgenen in den Stammzellen wurde der Gentransfer mittels retroviraler Transduktion gewählt und für beide Zelllinien mittels eines EGFP-tragenden Vektors etabliert. Die Durchführbarkeit von Enzym/Prodrug-Gentherapien mit migratorischen Stammzellen wurde anhand zweier Enzym/Prodrug-Systeme untersucht: dem rCE/CPT-11-System und dem *E. coli*-PNP/Prodrug-System. Das rCE/CPT-11-System wurde zunächst mit mNSC getestet. Die Zellen wurden initial mit vier rCE-tragenden Vektoren retroviral transduziert, welche in dieser Arbeit konstruiert worden waren. Diese unterschieden sich durch das Vorkommen einer Konsensus-Sequenz zur Translationsinitiation und einer Punktmutation im rCE-Gen. Die im Aktivitätstest erfolgreichsten Transduktanden wurden in Kombination mit der Prodrug CPT-11 im Kokulturassay gegen murine Tumorzellen eingesetzt, wobei jedoch keine gesteigerte Toxizität festgestellt werden konnte. Darauf folgende quantitative Analysen mittels Aktivitätstest und Western-Blot zeigte, dass die von mNSC hergestellte rCE-Menge zu gering war, um die Prodrug CPT-11 effektiv zu aktivieren. Zur Testung des *E. coli*-PNP/Prodrug-Systems wurden mNSC und mBMSC mit der für PNP kodierenden Sequenz, *deoD*, transduziert. Der entsprechende Vektor wurde ebenfalls in dieser Arbeit neu synthetisiert. Die Integration der Sequenz in das Genom der Zellen, sowie deren Transkription, wurde mittels PCR bzw. RT-PCR nachgewiesen. Eine gesteigerte PNP-Aktivität im Lysat transduzierter Zellen konnte durch einen Aktivitätstest festgestellt werden, die dosisabhängige Wirkung der PNP-spezifischen Prodrugs Fludara, FaraA und FdAdo auf PNP-exprimierende Stammzellen wurde daraufhin untersucht. Die unterschiedliche Aktivierung der Prodrugs durch die Stammzellen zu einem zytotoxischeren Metaboliten konnte durch die Kultivierung verschiedener Tumorzelllinien mit Stammzell-konditioniertem Medium nachgewiesen werden. Der dabei beobachtete „Bystander“-Effekt wurde durch die Kokultivierung von mNSC mit den Tumorzelllinien U87 und G55 in Gegenwart der Prodrug FdAdo näher charakterisiert. Der zytotoxische Einfluss des Systems auf die Tumorzellen wurde dabei in Abhängigkeit der FdAdo-Konzentration und in Abhängigkeit der mNSC-Zellzahl untersucht. Hinsichtlich der Durchführung einer Enzym/Prodrug-Gentherapie *in vivo* wurde schließlich das migratorische Verhalten der hier verwendeten Stammzellen zu experimentellen Hirntumoren in Mäusen nachgewiesen.

## 6. Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent (volumenbezogen)
µg	Mikrogramm
4AAP	4-Amino-Antipyrin
A	Adenin / Alanin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampizillin
APRT	Adeninphosphoribosyl-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	Gen der β-Lactamase
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
BMSC	Mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumkation
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CD	Cytosindeaminase / Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPT-11	Irinotecan
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
dCK	Desoxycytidin-Kinase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
<i>deoD</i>	Gen der <i>E. coli</i> Purin-Nukleosid-Phosphorylase
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growthfactor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FAde	2-Fluoro-Adenin
FaraA	2-Fluoro-Adenosin
FBS	Fötale Kälberserum
FdAdo	2-Fluoro-Desoxy-Adenosin
FGF	Fibriblast-Growthfactor
Fludara	2-Fluoro-Adenosinmonophosphat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> ) / Gramm

---

G	Guanin
G3PD	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
GalC	Galactosylceramidase
GCV	Ganciclovir
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSV	Herpes-Simplex-Virus
I.E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	Long Terminal Repeat
M	Einheit Stoffmengenkonzentration (Molarität)
Map	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Neo	Neomycin
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NPA	Nitrophenylacetat
NSC	Neurale Stammzellen
N-Terminus	Amino-Terminus
NTP	Nukleosidtriphosphate
NZY	Casein-Hydrolysat Hefextrakt
OD	Optische Dichte
p.a.	zur Analyse
p.M.	persönliche Mitteilung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

---

PLC	Phospholipase C
Primer	Oligonukleotid für die PCR
Rac	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate
RB	Retinoblastom
rCE	<i>rabbit</i> -Carboxylesterase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBHB	Tribromhydroxybenzoesäure
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Template	Matrize
TK	Thymidinkinase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tropomyosin Receptor Kinase
tRNA	Transfer RNA
TY	Trypton Yeast
U	Unit / Uracil
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel

## 7. Literaturverzeichnis

- Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G., Bower K.A., Liu S., Yang W., Small J.E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P.M., Breakefield X.O., Snyder E.Y. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *PNAS* **97**: 12846-51
- Ailhaud G., Grimaldi P., Négre R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* **12**: 207-33
- Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharm Rev* **50**: 197-263
- Arner E., Eriksson S. 1996. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* **67**: 155-86
- Asano K., Kubo O., Tajika Y., Takakura K., Suzuki S. 2000. Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. *Neurosurg Rev* **23**: 39-44
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.M., Seidmann J.G., Smith J.A., Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, NY*
- Barresi V., Belluardo N., Sipione S., Mudò G., Cattaneo E., Condorelli D.F. 2003. Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* **10**: 396-402.
- Bell E., 1949. Cerebral hemispherectomy: report of a case ten years after operation. *J Neurosurg* **6**: 285-93
- Bencharit S., Morton C.L., Howard-Williams E.L., Danks M.K., Potter P.M., Redinbo M.R. 2002. Structural insight into CPT-11 activation by mammalian carboxylesterases. *Nature Structural Biology* **9**: 337-42
- Benedetti S., Pirola B., Pollo B., Magrassi L., Bruzzone M.G., Rigamonti D., Galli R., Selleri S., Di Meco F., De Fraja C., Vescovi A., Cattaneo E., Finocchiaro G. 2000. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* **6**: 447-50
- Berens M.E., Rief M.D., Loo M.A., Giese A. 1994. The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. *Clin Exp Metastasis* **12**: 405-15
- Bertran J., Miller J.L., Yang Y., Fenimore-Justman A., Rueda F., Vanin E.F., Nienhuis A.W. 1996. Recombinant adeno-associated virus-mediated high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors. *J Virol* **70**: 6759-66
- Betschinger J., Knoblich J.A. 2004. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* **14**: R674-85

- Biernat W., Tohma Y., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. 1997. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* **94**: 303-9
- Block A., Milasinovic D., Müller J., Schäfer P., Schäfer H.J., Greten H. 2002. Amplified, muc1-specific gene expression in colon cancer cells utilizing a binary system in adenoviral vectors. *Anticancer Res* **22**: 3285-92
- Brown A.B., Yang W., Schmidt N.O., Carroll R., Leishear K.K., Rainov N.G., Black P.M., Breakefield X.O., Aboody K.S. 2003. Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin. *Hum Gene Ther* **14**:1777-85
- Burger P.C., Dubois P.J., Schold S.C. Jr, Smith K.R. Jr, Odom G.L., Crafts D.C., Giangaspero F. 1983. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* **58**: 159-69
- Buttgereit P., Weineck S., Ropke G., Marten A., Brand K., Heinicke T., Caselmann W. H., Huhn D., Schmidt-Wolf I. G. 2000. Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofection. *Cancer Gene Ther* **7**: 1145-55
- Castro M.G., Cowen R., Williamson I.K., David A., Jimenez-Dalmaroni M.J., Yuan X., Bigliari A., Williams J.C., Hu J., Lowenstein P.R. 2003. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* **98**: 71-108
- Chiocca E.A., Abbed K.M., Tatter S., Louis D.N., Hochberg F.H., Barker F., Kracher J., Grossman S.A., Fisher J.D., Carson K., Rosenblum M., Mikkelsen T., Olson J., Markert J., Rosenfeld S., Nabors L.B., Brem S., Phuphanich S., Freeman S., Kaplan R., Zwiebel J. 2004. A phase I open-label, dose-escalation, multiinstitutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther* **10**: 958-66
- Cho S.Y., Klemke R.L. 2000 Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* **149**: 223-36.
- Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U., Frisén J. 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**: 1660-3
- Coffin J.M., Varmus H.E. 1996. Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*
- Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PNAS* **98**, 14: 7841-5
- Cruss R.L. 1982. The muskuloskeletal system: embyrology, biochemistry and physiology. *New York: Churchill Livingston*. 1-33, 109-169, 255-287
- Cunningham C., Nemunaitis J. 2001. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. *Hum Gene Ther* **12**: 1594-6
- da Silva Meirelles L., Beyer Nardi N. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterisation. *British Journal of Haematology* **123**: 702-11

- Dachs G.U., Trupper J., Tozer G.M. 2005. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anti-Cancer Drugs* **16**: 349-59
- Danhauser L., Plunkett W., Liliemark J., Gandhi V., Iacoboni S., Keating M. 1986. Comparison between the plasma and intracellular pharmacology of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate in patients with relapsed leukemia. *Leukemia* **1**: 638-43
- Danks M.K., Morton C.L., Krull E.J., Cheshire P.J., Richmond L.B., Naeve C.W., Pawlik C.A., Houghton P.J., Potter P.M. 1999. Comparison of activation of CPT-11 by rabbit and human carboxylesterases for use in enzyme/prodrug therapy. *Clin Cancer Res* **5**: 917-24
- Danks M.K., Morton C.L., Pawlik C.A., Potter P.M. 1998. Overexpression of a rabbit liver carboxylesterase sensitizes human tumor cells to CPT-11. *Cancer Res* **58**: 20-2
- Danks M.K., Yoon K.J., Bush R.A., Remack J.S., Wierdl M., Tsurkan L., Kim S.U., Garcia E., Metz M.Z., Najbauer J., Potter P.M., Aboody K.S. 2007. Tumor-targeted enzyme/prodrug therapy mediates long-term disease-free survival of mice bearing disseminated neuroblastoma. *Cancer Res* **67**: 22-5
- Davis F.G., McCarthy B.J., Freels S., Kupelian V., Bondy M.L. 1999. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer* **85**: 485-91
- Dehdashti A.R., Hegi M.E., Regli L., Pica A., Stupp R. 2006 New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide chemotherapy. *Neurosurg Focus* **20**: E6
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-7
- Ehtesham M., Kabos P., Kabosova A., Neuman T., Black K.L., Yu J.S. 2002. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res* **62**: 5657-63
- Ehtesam M., Kabos P., Gutierrez M.A. 2002b. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* **62**: 7170-4
- Ehtesham M., Yuan X., Kabos P., Chung N.H., Liu G., Akasaki Y., Black K.L., Yu J.S. 2004. Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* **6**: 287-93
- Elliott M.A., Letendre L., Li C.Y., Hoyer J.D., Hammack J.E. 1999. Chronic lymphocytic leukaemia with symptomatic diffuse central nervous system infiltration responding to therapy with systemic fludarabine. *Br J Haematol* **104**: 689-94
- Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. 2000. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. *IARC Press*, Lyon
- Fine H.A., Dear K.B., Loeffler J.S., Black P.M., Canellos G.P. 1993. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* **71**: 2585-97



- Freeman S.M., Abboud C.N., Whartenby K.A., Packman C.H., Koeplin D.S., Moolten F.L., Abraham G.N. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* **53**: 5274-83
- Freytag S.O., Khil M., Stricker H., Peabody J., Menon M., DePeralta-Venturina M., Nafziger D., Pegg J., Paielli D., Brown S., Barton K., Lu M., Aguilar-Cordova E., Kim J.H. 2002. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* **62**: 4968-76
- Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luriá E.A., Ruadkow I.A. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**: 83-92
- Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**: 267-74
- Fujisawa H., Reis R.M., Nakamura M., Colella S., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* **80**: 65-72
- Gadi V.K., Alexander S.D., Waud W.R., Allan P.W., Parker W.B., Sorscher E.J. 2003. A long-acting suicide gene toxin, 6-methylpurine, inhibits slow growing tumors after a single administration. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 1280-4
- Gage F.H., Coates P.W., Palmer T.D., Kuhn H.G., Fisher L.J., Suhonen J.O., Peterson D.A., Suhr S.T., Ray J. 1995. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11879-83
- Gaspar L.E., Fisher B.J., Macdonald D.R., LeBer D.V., Halperin E.C., Schold S.C. Jr, Cairncross J.G. 1992. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **24**, 1:55-7
- Giese A., Loo M.A., Tran N., Haskett D., Coons S.W., Berens M.E. 1996 Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer* **67**: 275-82
- Greco O., Dachs G.U. 2001. Gene directed enzyme/prodrug therapie of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiology* **187**: 22-36
- Gritti A., Frölichsthal-Schoeller P., Galli R., Parati E.A., Cova L., Pagano S.F., Bjornson C.R., Vescovi A.L. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **19**: 3287-97
- Günther H.S., Schmidt N.O., Phillips H.S., Kemming D., Kharbanda S., Soriano R., Modrusan Z., Meissner H., Westphal M., Lamszus K. 2007. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* Nov 26
- Gupta E., Mick R., Ramirez J., Wang X., Lestingi T.M., Vokes E.E., Ratain M.J. 1997. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. *J Clin Oncol* **15**: 1502-10
- Harrow S., Papanastassiou V., Harland J., Mabbs R., Petty R., Fraser M., Hadley D., Patterson J., Brown S.M., Rampling R. 2004. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther* **11**: 1648-58

- Hawley R.G., Lieu F.H.L., Fong A.Z.C., Hawley T.S. 1994. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* **1**: 136-8
- Heese O., Disko A., Zirkel D., Westphal M., Lamszus K. 2005. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro-Oncology* **7**: 476-84
- Heinkelein M., Hoffmann U., Lücke M., Imrich H., Müller J.G., Meixensberger J., Westphahl M., Kretschmer A., Rethwilm A. 2005. Experimental therapy of allogeneic solid tumors induced in athymic mice with suicide gene-transducing replication-competent foamy virus vectors. *Cancer Gene Ther* **12**: 947-53
- Hikawa T., Mori T., Abe T., Hori S. 2000. The ability in adhesion and invasion of drugresistant human glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **19**: 357-362
- Hong J.S., Waud W.R., Levasseur D.N., Townes T.M., Wen H., McPherson S.A., Moore B.A., Bebok Z., Allan P.W., Secrist J.A. 3rd, Parker W.B., Sorscher E.J. 2004. Excellent in vivo bystander activity of fludarabine phosphate against human glioma xenografts that express the escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene. *Cancer Res* **64**: 6610-5
- Huang H.S., Nagane M., Klingbeil C.K., Lin H., Nishikawa R., Ji X.D., Huang C.M., Gill G.N., Wiley H.S., Cavenee W.K. 1997. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* **272**: 2927-35
- Huang P., Chubb S., Plunkett W. 1990. Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *J Biol Chem* **265**: 16617-25
- Huang P., Sandoval A., Van Den Neste E., Keating M.J., Plunkett W. 2000. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia* **14**:1405-13
- Hughes B.W., King S.A., Allan P.W., Parker W.B., Sorscher E.J. 1998. Cell to cell contact is not required for bystander cell killing by Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem* **273**: 2322-8
- Imitola J., Raddassi K., Park K.I., Mueller F.J., Nieto M., Teng Y.D., Frenkel D., Li J., Sidman R.L., Walsh C.A., Snyder E.Y., Khoury S.J. 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**: 18117-22
- Immonen A., Vapalahti M., Tynnela K., Hurskainen H., Sandmair A., Vanninen R., Langford G., Murray N., Yla-Herttuala S. 2004. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* **10**: 967-72
- Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**: 295-312
- Janes S.M., Lowell S., Hutter C.J. 2002. Epidermal stem cells. *Pathol* **197**: 479-91
- Jelsma R., Bucy P.C. 1967. The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *J Neurosurg* **27**: 388-400

- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**: 41–9
- Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* **238**: 265-72
- Keating M.J., Kantarjian H., Talpaz M., Redman J., Koller C., Barlogie B., Velasquez W., Plunkett W., Freireich E.J., McCredie K.B. 1989. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **74**: 19-25
- Keely P.J., Westwick J.K., Whitehead I.P., Der C.J., Parise L.V. 1997. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness via PI 3-kinase. *Nature* **390**: 632–66
- Kelly K.A., Gimble J.M. 1998. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology* **139**: 2622-8
- Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. 2005. SLAMfamily receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**: 1109-21
- Kim G., Choe Y., Park J., Cho S., Kim K. 2002. Activation of protein kinase A induces neuronal differentiation of HiB5 hippocampal progenitor cells. *Brain Res Mol Brain Res* **109**: 134-45
- Kita D., Yonekawa Y., Weller M., Ohgaki H. 2007. PI3KCA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* **113**: 295–302
- Kiyokawa E., Hashimoto Y., Kobayashi S., Sugimura H., Kurata T., Matsuda M. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3 DOCK180. *Genes Dev* **12**: 3331–6
- Kleihues P., Cavenee W.K. 2000. World health organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the nervous system. *IARC Press*, Lyon
- Kleihues P., Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol* **1**: 44–51
- Knobbe C.B., Merlo A., Reifenberger G. 2002. Pten signaling in gliomas. *Neuro-Oncology* **4**: 196–211
- Kozak M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **12**: 857-72
- Kozak M. 1989. The scanning model for translation: An update. *J cell biol* **108**: 229-41
- Kumar C.C. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**: 1365-73
- Kunwar S. 2003. Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir* **88**:105-11
- Lamszus K., Lattera J., Westphal M., Rosen E.M. 1999. Scatter factor/ hepatocyte growth factor (SF/HGF) content and function in humangliomas. *Int J Dev Neurosci* **17**: 517–530

- Lang F.F., Bruner J.M., Fuller G.N., Aldape K., Prados M.D., Chang S., Berger M.S., McDermott M.W., Kunwar S.M., Junck L.R., Chandler W., Zwiebel J.A., Kaplan R.S., Yung W.K. 2003. Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol* **21**: 2508–18
- Laske D.W., Youle R.J., Oldfield E.H. 1997. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TFCRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med* **3**:1362–8
- Lawrence T.S., Rehemtulla A., Ng E.Y., Wilson M., Trosko J.E., Stetson P.L. 1998. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res* **58**: 2588-93
- Lendahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**: 585-95
- Li S., Tokuyama T., Yamamoto J., Koide M., Yokota N., Namba H. 2005. Potent bystander effect in suicide gene therapy using neural stem cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncology* **69**: 503-8
- Libermann T.A., Nusbaum H.R., Razon N., Kris R., Lax I., Soreq H., Whittle N., Waterfield M.D., Ullrich A., Schlessinger J. 1985. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* **313**: 144-7
- Liotta L.A. 1986. Tumor invasion and Metastases: Role of extracellular matrix. *Cancer Research* **46**: 1-7
- Lumniczky K., Desaknai S., Mangel L., Szende B., Hamada H., Hidvegi E.J., Safrany G. 2002. Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther* **9**: 44-52
- Mackey J.R., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E. 1998. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist Updat* **1**: 310-24
- Mahesparan R., Read T.A., Lund-Johansen M., Skaftnesmo K.O., Bjerkvig R., Engebraaten O. 2003. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol (Berl)* **105**: 49–57
- Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**: 697-705
- Mao C. 1995. Structure Determination of Purine Nucleoside Phosphorylase from Bovine Spleen and Escherichia coli: Elucidation of Reaction Mechanism. *Ph.D thesis, Cornell University, Ithaca, NY*
- Mao C., Cook W.J., Zhou M., Koszalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E. 1997. The crystal structure of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the human enzyme reveals a conserved topology. *Structure* **5**: 1373-83
- Mariani L., Beaudry C., McDonough W.S., Hoelzinger D.B., Kaczmarek E., Ponce F., Coons S.W., Giese A., Seiler R.W., Berens M.E. 2001. Death-associated protein 3 (Dap-3) is overexpressed in invasive glioblastoma cells in vivo and in glioma cell lines with induced motility phenotype in vitro. *Clin Cancer Res* **7**: 2480-9

- Mariani L., Beaudry C., McDonough W.S., Hoelzinger D.B., Demuth T., Ross K.R., Berens T., Coons S.W., Watts G., Trent J.M., Wei J.S., Giese A., Berens M.E. 2001b. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol* **53**: 161-76
- Matsukado Y., Maccarty C.S., Kernohan J.W. 1961. The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg* **18**: 636-644
- Mauro A. 1961. Sattelite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-8
- Mellinghoff I.K., Wang M.Y., Vivanco I., Haas-Kogan D.A., Zhu S., Dia E.Q., Lu K.V., Yoshimoto K., Huang J.H., Chute D.J., Riggs B.L., Horvath S., Liau L.M., Cavenee W.K., Rao P.N., Beroukhir R., Peck T.C., Lee J.C., Sellers W.R., Stokoe D., Prados M., Cloughesy T.F., Sawyers C.L., Mischel P.S. 2005. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* **353**: 2012-24
- Menon L.G., Picinich S., Koneru R., Gao H., Lin S.Y., Koneru M., Mayer-Kuckuk P., Glod J., Banerjee D. 2007. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells* **25**: 520-8
- Merzak A., McCrean S., Koocheckpour S., Pilkington G.J. 1994 Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br J Cancer* **70**: 199-203.
- Mikkola H., N. B. Woods N.B., M. Sjogren H., Helgadottir I., Hamaguchi S. E., Jacobsen D., Tronto U., Karlsoon S. 2000. Lentivirus gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells is compromised by a delay in proviral integration and results in transduction mosaicism and heterogeneous gene expression in progeny cells. *J Virol* **74**: 11911-8
- Miller A.D. 1996. Cell-surface receptors for retroviruses and implication for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11407-13
- Miller D.G., Adam M.A., Miller A.D. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* **10**: 4239-42
- Mohr L., Shankara S., Yoon S.K., Krohne T.U., Geissler M., Roberts B., Blum H.E., Wands J.R. 2000. Gene therapy of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo in nude mice by adenoviral transfer of the Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene. *Hepatology* **31**: 606-14
- Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**: 1237-45
- Moolten F.L. 1986. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* **46**: 5276-81
- Moore X.L., Lu J., Sun L., Zhu C.J., Tan P., Wong M.C. 2004. Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors. *Gene Ther* **11**: 811-8
- Mullen C.A., Kilstrup M., Blaese R.M. 1992: Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 33-7
- Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F.F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* **65**: 3307-18

- Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H., Bizen A., Honmou O., Niitsu Y., Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* **11**: 1155-64
- Nakamura M., Watanabe T., Klangby U., Asker C.E., Wiman K.G., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. 2001. P14Arf deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **11**: 159-8
- Nakamura M., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. 2001b. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* **81**: 77-82
- Nordin N., Li M., Mason J.O. 2008. Expression Profiles of Wnt Genes during Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cloning and Stem Cells*. **10**: 37-48
- Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schuler D., Probst-Hensch N.M., Maiorka P.C., Baeza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M.G., Lutolf U.M., Kleihues P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**: 6892-99
- Ohgaki H., Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**: 93-108
- Ohgaki H., Kleihues P. 2005b. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 479-489
- Ohnishi T., Arita N., Hiraga S., Taki T., Izumoto S., Fukushima Y., Hayakawa T. 1997. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis* **15**: 538-46
- Okada H., Lieberman F.S., Walter K.A., Lunsford L.D., Kondziolka D.S., Bejjani G.K., Hamilton R.L., Torres-Trejo A., Kalinski P., Cai Q., Mabold J.L., Edington H.D., Butterfield L.H., Whiteside T.L., Potter D.M., Schold S.C. Jr, Pollack I.F. 2007. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med* **5**: 67
- Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F., Gage F.H. 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*. **19**: 8487-97
- Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**: 389-404
- Parker W.B., Allan P.W., Hassan A.E., Secrist J.A. 3rd, Sorscher E.J., Waud W.R. 2003. Antitumor activity of 2-fluoro-2'-deoxyadenosine against tumors that express *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase. *Cancer Gene Ther* **10**: 23-9
- Parker W.B., King S.A., Allan P.W., Bennett L.L. Jr, Secrist J.A. 3rd, Montgomery J.A., Gilbert K.S., Waud W.R., Wells A.H., Gillespie G.Y., Sorscher E.J. 1997. In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. *Hum Gene Ther* **8**: 1637-44
- Parker W.B., Allan P.W., Shaddix S.C., Rose L.M., Speegle H.F., Gillespie G.Y., Bennett L.L. 1998. Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells. *Biochem Pharmacol* **55**: 1673-81

- Parkin D.M., Whelan S.L.; Feraly J., Teppo L., Thomas D.B. 2002. Cancer incidence in five continents. *IARC Press*, Lyon
- Pastan I., Chaudhary V., FitzGerald D.J. 1992. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem* **61**: 331–54
- Paulus W., Baur I., and Schuppan D. 1993. Characterisation of Integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* **143**: 154-63
- Pereboeva L., Komarova S., Mikheeva G., Krasnykh V., Curiel D.T. 2003. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem Cells* **21**: 389-404
- Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Perez I., Bravo R., Lacal J.C. 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, cdc42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**: 463–75
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143-7
- Plunkett W., Lapi L., Ortiz P.J., Cohen S.S. 1974: Penetration of mouse fibroblasts by the 5'-phosphate of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine and incorporation of the nucleotide into DNA. *PNAS* **71**: 73-7
- Potter P.M., Pawlik C.A., Morton C.L., Naeve C.W., Danks M.K. 1998. Isolation and partial characterization of a cDNA encoding a rabbit liver carboxylesterase that activates the prodrug Irinotecan (CPT-11). *Cancer Res* **58**: 2646–51
- Potter P.M., Wolverton J.S., Morton C.L., Wierdl M., Danks M.K. 1998b. Cellular localization domains of a rabbit and a human carboxylesterase: influence on irinotecan (CPT-11) metabolism by the rabbit enzyme. *Cancer Res* **58**: 3627-32
- Prag S., Lepekhin E.A., Kolkova K., Hartmann-Petersen R., Kawa A., Walmod P.S., Belman V., Gallagher H.C., Berezin V., Bock E., Pedersen N. 2002. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci* **115**: 283–92
- Radner H., Blümcke I., Reifenberger G., Wiestler O.D. 2002. Die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems 2000. *Pathologie und Genetik Pathologe* **23**: 260–83
- Rainov N.G. 2000. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* **11**: 2389-401
- Rand R.W., Kreitman R.J., Patronas N., Varricchio F., Pastan I., Puri R.K. 2000. Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma. *Clin Cancer Res* **6**: 2157–65
- Reynolds B.A.; Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **27**: 1707-10
- Ridely A.J., Paterson H.F., Johnstone C.L., Diekmann D., Hall A.. 1992. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401–10
- Rieze R.L., Reynolds B.A. 2006. Neural stem cell isolation and charakterisation. *Methods in Enzymology* **419**: 3-23

- Rivory L.P., Haaz M.C., Canal P., Lokiec F., Armand J.P., Robert J. 1997. Pharmacokinetic interrelationships of irinotecan (CPT-11) and its three major plasma metabolites in patients enrolled in phase I/II trials. *Clin Cancer Res* **3**: 1261-6
- Rivory L.P., Robert J. 1995. Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S)camptothecin and its derivatives. *Pharmacol Ther* **68**: 269-96
- Romano G., Pacilio C., Giordano A. 1999. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* **17**: 191-202
- Rutka J.T., Apodaca G., Stern R., Rosenblum M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg* **69**: 155-70.
- Sampson J.H., Akabani G., Archer G.E., Bigner D.D., Berger M.S., Friedman A.H., Friedman H.S., Herndon J.E. 2nd, Kunwar S., Marcus S., McLendon R.E., Paolino A., Penne K., Provenzale J., Quinn J., Reardon D.A., Rich J., Stenzel T., Tourt-Uhlig S., Wikstrand C., Wong T., Williams R., Yuan F., Zalutsky M.R., Pastan I. 2003. Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor. (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38. (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol* **65**: 27-35
- Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R., Sanberg P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* **164**: 247-56
- Scheid, M.P., Schubert K.M., Duronio V. 1999. Regulation of Bad phosphorylation and association with Bcl-xL by the MAPK/ERK kinase. *J Biol Chem* **274**: 31108-13
- Scherer H.J. 1940. The forms of growth in glioma and their practical significance. *Brain* **63**: 1-35
- Schichor C., Birnbaum T., Etminan N., Schnell O., Grau S., Miebach S., Aboody K., Padovan C., Straube A., Tonn J.C., Goldbrunner R. 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* **199**: 301-10
- Schmidt O., Przylecki W., Yang W., Ziu M., Teng Y., Kimz S., Black P.M., Aboody K.S., Carroll R.S. 2005. Brain Tumor Tropism of Transplanted Human Neural Stem Cells Is Induced by Vascular Endothelial Growth Factor1. *Neoplasia* **7**: 623 - 9
- Shah A.C., Benos D., Gillespie G.Y., Markert J.M. 2003. Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* **65**: 203-26
- Shah K., Bureau E., Kim D.E., Yang K., Tang Y., Weissleder R., Breakefield X.O. 2004. Glioma therapy and real-time imaging of neural precursor cell migration and tumor regression. *Ann Neurol* **57**: 34-41
- Sherr C.J., Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-12
- Slichenmyer W.J., Rowinsky E.K., Donehower R.C., Kaufmann S.H. 1993. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* **85**: 271-91



- Sorscher E.J., Peng S., Bebok Z., Allan P.W., Bennett L.L. Jr, Parker W.B. 1994. Tumor cell bystander killing in colonic carcinoma utilizing the Escherichia coli DeoD gene to generate toxic purines. *Gene Ther* **1**: 233-8.
- Staflin K., Honeth G., Kalliomäki S., Kjellman C., Edvardsen K., Lindvall M. 2004. Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth in vivo. *Cancer Res* **64**: 5347-54
- Stewart L.A. 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**: 1011-8
- Stubdal H., Perin N., Lemmon M., Holman P., Bauzon M., Potter P.M., Danks M.K., Fattaey A., Dubensky T., Johnson L. 2003. A prodrug strategy using ONYX-015-based replicating adenoviruses to deliver rabbit carboxylesterase to tumor cells for conversion of CPT-11 to SN-38. *Cancer Res* **63**: 6900-8
- Tabatabai G., Bähr O., Möhle R., Eyüpoglu I.Y., Boehmler A.M., Wischhusen J., Rieger J., Blümcke I., Weller M., Wick W. 2005. Lessons from the bone marrow: how malignant glioma cells attract adult haematopoietic progenitor cells. *Brain* **128**: 2200-11
- Tamura M., Gu J., Matsumoto K., Aota S., Parsons R., Yamada K.M. 1998 Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**: 1614-7
- Tanizawa A., Fujimori A., Fujimori Y., Pommier Y. 1994. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* **86**: 836-42
- Tang G., Russel R.M. 1990. 13-cis-Retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res* **31**: 175-82
- Vecil G.G., Lang F.F. 2003. Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol* **65**: 237-46
- Vincenza B., Natale B., Simonetta S., Giuseppa M., Elena C., Daniele F.C. 2003. Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Therapy* **10**: 396-402
- Voges J., Reszka R., Gossmann A., Dittmar C., Richter R., Garlip G., Kracht L., Coenen H.H., Sturm V., Wienhard K., Heiss W.D., Jacobs A.H. 2003 Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol* **54**: 479-87
- Vourc'h P., Romero-Ramos M., Chivatakarn O., Young H.E., Lucas P.A., El-Kalay M., Chesselet M.F. 2004. Isolation and characterization with neurogenic potential from adult skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **317**: 893-901
- Watanabe K., Tachibana O., Sato K., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* **6**: 217-24
- Weaver M., Laske D.W. 2003. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate. (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol* **65**: 3-13
- Webb D.J., Parsons J.T., Horwitz A.F. 2002 Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nature Cell Biology* **4**: E97-100

- Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A.C., Reynolds B.R. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* **16**: 7599–609
- Westphal M., Herrmann H.-D. 1999. Hirntumoren. Stuttgart, New York
- Widera D., Holtkamp W., Entschladen F., Niggemann B., Zänker K., Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. 2004. MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* **83**: 381-7
- Woodbury D., Reynolds K., Black I.B. 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci* **69**: 908-17
- Young H.E., Black A.C. 2004. Adult stem cells. *The anatomical record part A* **276A**: 75-102
- Young H.E., Duplaa C., Katz R., Thompson T., Hawkins K.C., Boev A.N., Henson N.L., Heaton M., Sood R., Ashley D., Stout C., Morgan J.H. 3rd, Uchakin P.N., Rimando M., Long G.F., Thomas C., Yoon J.I., Park J.E., Hunt D.J., Walsh N.M., Davis J.C., Lightner J.E., Hutchings A.M., Murphy M.L., Boswell E., McAbee J.A., Gray B.M., Piskurich J., Blake L., Collins J.A., Moreau C., Hixson D., Bowyer F.P. 3rd, Black A.C. Jr. 2005. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med* **9**: 753-69
- Young H.E., Duplaa C., Yost M.J., Henson N.L., Floyd J.A., Detmer K., Thompson A.J., Powell S.W., Gamblin T.C., Kizziah K., Holland B.J., Boev A., Van De Water J.M., Godbee D.C., Jackson S., Rimando M., Edwards C.R., Wu E., Cawley C., Edwards P.D., Macgregor A., Bozof R., Thompson T.M., Petro G.J. Jr, Shelton H.M., McCampbell B.L., Mills J.C., Flynt F.L., Steele T.A., Kearney M., Kirincich-Greathead A., Hardy W., Young P.R., Amin A.V., Williams R.S., Horton M.M., McGuinn S., Hawkins K.C., Ericson K., Terracio L., Moreau C., Hixson D., Tobin B.W., Hudson J., Bowyer F.P. 3rd, Black A.C. Jr. 2004. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. II. Pluripotent epiblastic-like stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **277A**: 178-203
- Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., Ying H., Finger D.N., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thompson R.C., Riedinger M.S., Zhang W., Prins R.M., Black K.L. 2001. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* **61**: 842-7
- Yuan X., Hu J., Belladonna M.L., Black K.L., Yu J.S. 2006. Interleukin-23–Expressing Bone Marrow–Derived Neural Stem-Like Cells Exhibit Antitumor Activity against Intracranial Glioma. *Cancer Res* **66**: 2630-8
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**: 4279-95

## DANKSAGUNG

---

### Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Prof. Dr. Manfred Westphal danke ich für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung während meiner Arbeit.

PD Dr. Katrin Lamszus danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Besonders herzlich möchte ich mich bei ihr für die gewährte Unterstützung beim Abfassen der Dissertationsschrift bedanken.

Prof Dr. K. Wiese am Zoologischen Institut der Universität Hamburg danke ich für die weitere Begutachtung meiner Dissertation.

Dr. Nils-Ole Schmidt danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Hauke Günther möchte ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Hilfsbereitschaft und sein immer „offenes Ohr“ danken, was unsere dreijährige Zusammenarbeit sehr angenehm gestaltet hat.

Für die tatkräftige Unterstützung sowie die freundliche und überaus angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich bei Dr. Carmen Eckerich, Dr. Katharina Hansen, Sker Freist, Regina Peters, Dorothea Zirkel, Svenja Zapf und besonders bei Hildegard Meißner herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt allen Praktikanten für die motivierte Mitarbeit und sehr angenehme Zusammenarbeit: Daniela Dinger, Beate Korporal, Christian Stender und Anna Schöttler.

Dipl.-Inform. Francis Y. Amoah danke ich für die kompetente Unterstützung in IT-Sachfragen und für die immer unterhaltsamen Kaffeepausen.

Für die notwendigen Ablenkungen zur Beruhigung der Nerven möchte ich mich bei Dörthe Hagenguth herzlich bedanken.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich auf meinem Weg immer unterstützt hat. Danke

DANKSAGUNG

---