

**Die Rolle somatischer Stammzellen in  
Pathogenese und experimenteller Therapie  
von malignen Gliomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Ariane Trampe-Kieslich  
aus Salzkotten

April 2008

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der Abgabe: 08. April 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2008

Meiner Großmutter Gisela Kosler,  
die im Sommer 2006 an einem Glioblastom verstarb

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Das Glioblastom . . . . .	5
1.2	Tumorstammzellen . . . . .	6
1.3	Prominin-1/CD133 . . . . .	8
1.4	Stammzellbasierte Gliomtherapie . . . . .	10
1.5	Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC) . . . . .	11
1.6	Tumormodelle . . . . .	11
1.6.1	Gliomzelllinien . . . . .	11
1.6.2	Tiermodelle . . . . .	12
1.7	Fragestellung und Ziele der Arbeit . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Material . . . . .	14
2.1.1	Antikörper . . . . .	14
2.1.2	Zelllinien . . . . .	14
2.1.3	Humanes Tumormaterial . . . . .	14
2.1.4	Chemikalien, Puffer und Enzyme . . . . .	14
2.1.5	Kits und Assays . . . . .	18
2.1.6	Oligonukleotide . . . . .	18
2.1.7	Geräte . . . . .	20
2.2	Methoden . . . . .	20
2.2.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	20
2.2.2	Tierexperimentelle Methoden . . . . .	27
2.2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.2.4	Statistische Auswertung . . . . .	32
2.2.5	Immunologische Methoden . . . . .	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>

3.1	Expression und funktionelle Analyse des potentiellen Tumorstammzell- markers CD133/Prominin-1 in Gliomen . . . . .	37
3.1.1	<i>PROM1</i> -Expression in primären Gliomen . . . . .	37
3.1.2	Phänotypische Charakterisierung etablierter Gliomzelllinien . . . . .	39
3.1.3	Überexpression von CD133 in Gliomzellen . . . . .	43
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung von CD133-transfizierten Gliom- zelllinien . . . . .	50
3.1.5	Mikroarray-basierte Expressionsanalyse transfizierter Gliomzelllinien	56
3.2	Untersuchung der Migration von USSC zu Gliomzellen . . . . .	58
3.2.1	Analyse der Migration von USSC <i>in vitro</i> . . . . .	58
3.2.2	Analyse der Migration von USSC <i>in vivo</i> . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Untersuchung der Rolle des Tumorstammzellmarkers CD133/Prominin-1 in Gliomen . . . . .	71
4.1.1	Analyse der <i>PROM1</i> -Expression in Gliomen . . . . .	71
4.1.2	Phänotypische Charakterisierung etablierter Gliomzelllinien . . . . .	72
4.1.3	Untersuchung der funktionellen Auswirkungen einer CD133-Über- expression in Gliomzelllinien . . . . .	76
4.2	Analyse der zielgerichteten Migration von USSC zu Gliomzellen . . . . .	80
4.2.1	Untersuchung der Migration von USSC zu Gliomzelllinien <i>in vitro</i>	80
4.2.2	Mikroarray-basierte Expressionsanalyse von migrierten versus nicht migrierten USSC . . . . .	81
4.2.3	Untersuchung der Migration von USSC <i>in vivo</i> . . . . .	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>89</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>A</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>101</b>
<b>B</b>	<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>C</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>104</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Astrozytom
AA	Anaplastisches Astrozytom
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2´Desoxy-Uridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CT	Computertomographie
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco´s phosphate buffered saline</i> (Dulbecco´s Phosphat gepufferte Salzlösung)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GBM	Glioblastoma multiforme

---

GD2, GD3	Gangliosid 2, Gangliosid 3
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
h	Stunde
H	heterogene Population
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i> (Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor)
HLA-ABC	Humanes Leukozyten-Antigen
HSC	<i>hematopoietic stem cell(s)</i> (Hämatopoetische Stammzelle(n))
I. E.	Internationale Einheiten
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
<i>MET/HGFR</i>	<i>hepatocyte growth factor receptor</i> (Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i> (Neuronale Kerne)
NF	Neurofilament

---

ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal goat serum</i> (normales Ziegenserum)
No.	<i>number</i> (Nummer)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PET	Polyethylen
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
s. c.	subkutan
SCF	<i>stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SDF-1	<i>stromal-derived factor 1</i> (aus dem Stroma stammender Faktor 1)
SF	<i>Scatter Factor</i>
SSEA-1	<i>stage-specific embryonic antigen</i> Stadium-spezifisches embryonales Antigen
SP	Subpopulation
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i> (Trispuffer mit Tween 20)
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
USSC	<i>Unrestricted Somatic Stem Cell</i> (Unbeschränkte Somatische Stammzellen)
TSZ	Tumorstammzelle

V Volt  
vs. versus  
WHO *World Health Organisation*  
(Weltgesundheitsorganisation)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom

Der mit etwa 15 % häufigste und zugleich bösartigste primäre Hirntumor des Menschen ist das Glioblastom. Die jährliche Inzidenz liegt bei 2-3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner, wobei die Altersverteilung ein Maximum zwischen 45 und 70 Jahren aufweist und Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (1,5 : 1) (Parkin *et al.* 1999). Glioblastome werden wegen der Expression glialer Markerproteine, wie z. B. GFAP, den astrozytären Gliomen zugeordnet. Sie werden gemäß der WHO-Klassifikation in den höchsten Malignitätsgrad (WHO-Grad IV) eingestuft. Glioblastome können sekundär aus vorbestehenden WHO-Grad II- oder WHO-Grad III-Astrozytomen entstehen. Wesentlich häufiger als diese sogenannten sekundären Glioblastomen sind die primären Glioblastome, die sich ohne nachweisbare niedrigmalignere Vorstufen *de novo* manifestieren (Louis *et al.* 2007). Aufgrund seines stark invasiven Wachstums ist das Glioblastom nie vollständig resektabel. Dazu kommen häufig primäre und sekundäre Resistenzen gegen Strahlen- und Chemotherapie, so dass es momentan keine befriedigende Therapieoption für diese Tumorerkrankung gibt. Die mittlere Überlebenszeit beträgt trotz multimodaler Therapie weniger als 12 Monate (Ohgaki und Kleihues 2005). Radiologisch erkennt man typischerweise, bedingt durch eine zentrale Nekrose, eine Kontrastmittel anreichernde Ringstruktur in CT und MRT (siehe Abbildung 1). Die endgültige Diagnose wird dann anhand des histologischen Befundes von reseziertem Tumorgewebe gestellt. Dabei ist das Auftreten von strichförmigen Nekrosen und pathologischen Gefäßproliferaten charakteristisch für Glioblastome. Bisher ist sehr wenig über die Ursachen der Entstehung von Glioblastomen bekannt. Eine familiäre Häufung als Hinweis auf eine genetische Prädisposition ist außerordentlich selten. Exogene Noxen spielen beim Menschen ebenfalls keine wesentliche Rolle. Neuere Untersuchungen postulieren, dass diese Tumoren wahrscheinlich von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen ausgehen und dass sogenannte Tumorstammzellen für das Tumorwachstum von Glioblastomen und ihre Resistenz gegen Radio- und Chemotherapie eine wichtige Rolle spielen könnten (Singh *et al.* 2003, Wiesner *et al.* 2005, Diehn und Clarke 2006, Tang *et al.* 2007).

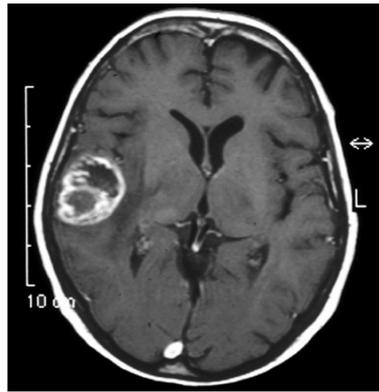


Abb. 1: Die Abbildung zeigt die Kernspintomographie eines Glioblastompatienten. Man erkennt die für Glioblastome charakteristische ringförmige Kontrastmittelanreicherung, wobei die dunklen Areale im Tumorzentrum durch eine Nekrose bedingt sind.

## 1.2 Tumorstammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit, durch asymmetrische Zellteilung sowohl neue Stammzellen, als auch Vorläuferzellen hervorzubringen, die dann zu spezialisierten Zellen ausdifferenzieren. Neben den totipotenten embryonalen Stammzellen, die in alle Gewebetypen ausdifferenzieren können, gibt es auch im adulten Organismus gewebespezifische pluripotente Stammzellen. Da Tumorzellen, ebenso wie Stammzellen, eine geringe Differenzierung aufweisen und sich nahezu unbegrenzt teilen können, entstand in den 90er Jahren die Tumorstammzellhypothese. Im Gegensatz zu früheren Tumormodellen, geht das Tumorstammzellmodell von einer Hierarchie innerhalb der Tumorzellpopulation aus. Das bedeutet, dass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen Stammzelleigenschaften besitzt und einen neuen Tumor hervorbringen kann, während der Großteil des Tumorgewebes aus höher differenzierten und in ihrer Proliferationskapazität limitierten Tumorzellen besteht (Reya *et al.* 2001). Desweiteren könnte die Existenz von Tumorstammzellen die Entstehung von Rezidiven und Resistenzen teilweise erklären, weil Tumorstammzellen einerseits das Potential besitzen, einen neuen Tumor zu initiieren, sich andererseits aber nur vergleichsweise langsam teilen. Außerdem wurde eine erhöhte Strahlentherapieresistenz von Tumorstammzellen beschrieben, die durch eine bessere Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden erklärt werden konnte (Bao *et al.* 2006). Da die Wirkung vieler der heute zur Verfügung stehenden Therapien vor allem von der hohen Teilungsrate der Tumorzellen abhängig ist, überleben also die Tumorstammzellen die Therapie und führen dann zum erneuten Auftreten der

Tumorerkrankung. Zudem wird der Effekt einer neuen Therapie in aktuellen Studien meistens auf der Basis der Reduktion des Tumolvolumens beurteilt. Geht man also von der Tumorstammzellhypothese aus, ist die gezielte Bekämpfung von Tumorstammzellen die Voraussetzung für die Entwicklung einer kurativen Therapie von Glioblastomen (siehe Abbildung 2 nach (Reya *et al.* 2001)). Die Existenz von Tumorstammzellen

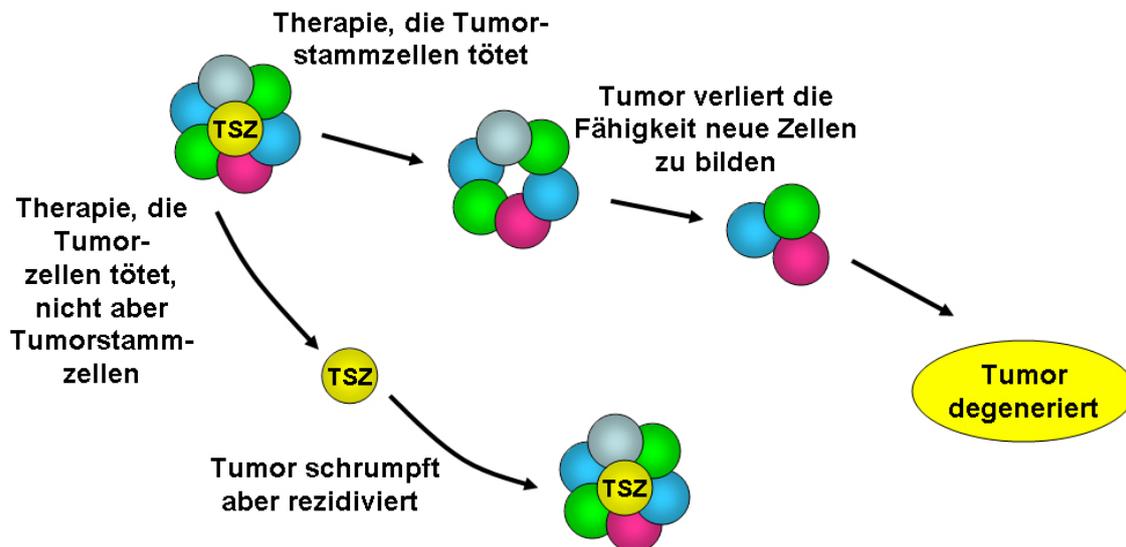


Abb. 2: Schematische Darstellung der Rolle von Tumorstammzellen (TSZ) bei der Entstehung von Rezidiven. Die Abbildung zeigt, dass die gezielte Vernichtung von Tumorstammzellen für eine kurative Behandlung ausreichend ist (obere Bildfolge), während die Persistenz von Tumorstammzellen trotz massiver Reduktion der Tumormasse zu einem Rezidiv der Erkrankung führt (untere Bildfolge).

konnte erstmals in Studien über Akute Myeloische Leukämien (AML) bewiesen werden (Bonnet und Dick 1997), die zeigte, dass eine Subpopulation der Tumorzellen einerseits Stammzellmarker exprimiert und andererseits in immundefizienten Mäusen AML auslösen kann. In soliden Tumoren konnte dann im Jahr 2003 die Tumorstammzellhypothese in Mammakarzinomen bestätigt werden, indem die Isolierung einer Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften gelang (Al-Hajj *et al.* 2003). In weiteren Arbeiten konnten Tumorstammzellen aus Glioblastomen und Medulloblastomen (Singh *et al.* 2004b), Prostatakarzinomen (Patrawala *et al.* 2006, Collins *et al.* 2005), Melanomen (Fang *et al.* 2005) und Leberzellkarzinomen (Yin *et al.* 2007) isoliert werden. Die Isolierung von Tumorstammzellen aus Medulloblastomen und Glioblastomen erfolgte mit Hilfe des Stammzellmarkers CD133. Aus Einzelzellsuspensionen von humanen Tumorsektaten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie CD133-positive und CD133-negative

Tumorzellen isoliert. Nur die CD133-positiven Zellen wiesen Stammzeleigenschaften auf, wie die Fähigkeit zur *in vitro*-Differenzierung, und führten bei Implantation in immundefiziente Mäuse zur Bildung von Tumoren. Demgegenüber konnte durch die Implantation der bis zu 1000fachen Menge CD133-negativer Tumorzellen bei keinem der Versuchstiere ein Tumorwachstum initiiert werden (100 vs. 100 000 Zellen) (Singh *et al.* 2004b).

### 1.3 Prominin-1/CD133

Ein potenzieller Marker für Tumorstammzellen in Gliomen, und damit ein mögliches Zielmolekül für die Therapie, ist Prominin-1 oder CD133 (Singh *et al.* 2004b). Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein, das an verschiedenen Aminosäuren extrazellulär glykosyliert ist (siehe Abbildung 3 (Corbeil *et al.* 2001)) und dessen biologische Funktion bisher weitgehend unbekannt ist. Das Protein wurde im Jahr 1997 von zwei

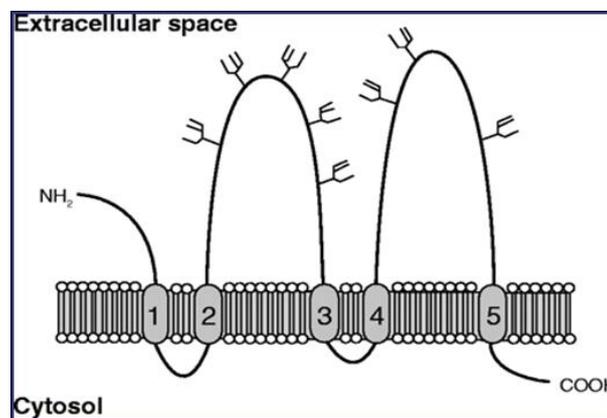


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Prominin-1.

Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erstmals beschrieben. Von der Arbeitsgruppe Buck wurde auf hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers ein neues Stammzellantigen isoliert und als AC133-Antigen oder CD133 bezeichnet (Miraglia *et al.* 1997, Yin *et al.* 1997). AC133 ist auf nicht aktivierten HSC ubiquitär im Bereich der Plasmamembran auf kleinen Zytoplasmamembranausläufern lokalisiert. Zeitgleich konnte die Arbeitsgruppe Huttner ein Protein identifizieren, das auf apikalen Ausläufern muriner embryonaler neuraler Zellen lokalisiert ist, und nannte es wegen seiner „prominenten“ Lokalisation auf der Zellmembran Prominin-1 (Weigmann *et al.* 1997). Die genauere Untersuchung ergab eine große Homologie zwischen dem humanen und dem murinen *PROM1*-Gen, wobei es sich bei dem AC133-Antigen um eine

bestimmte glykosylierte Form des humanen CD133/Prominin-1 handelt (Fargeas *et al.* 2003).

Murines und humanes Prominin-1 werden in verschiedenen adulten Epithelien exprimiert, während das AC133-Epitop nur in undifferenzierten Geweben exprimiert zu werden scheint (Corbeil *et al.* 2000, Florek *et al.* 2005). Neben der Fähigkeit zur Ausscheidung des Hoechst Farbstoffs 33342 (Wulf *et al.* 2001, Bhatt *et al.* 2003, Haraguchi *et al.* 2006) und der Expression von CD44 (Al-Hajj *et al.* 2003, Patrawala *et al.* 2006, Collins *et al.* 2005) ist das AC133-Epitop des Membranproteins CD133 ein wichtiger Marker zur Isolierung von Tumorstammzellen. In verschiedenen malignen hämatopoetischen Erkrankungen, insbesondere Leukämien, ist die Expression von AC133 erhöht und oftmals mit einer besonders stark proliferierenden Subpopulation der Tumorzellen assoziiert. Ebenso korreliert die Expression von AC133 in soliden Tumoren mit einem besonders malignen Phänotyp der Zellen, charakterisiert durch eine hohe Proliferationsrate und Tumorigenität (Fargeas *et al.* 2006).

Der homozygote Verlust eines Nukleotids des *PROM1* Gens führt beim Menschen zu einer autosomal-rezessiven Retinadegeneration (Maw *et al.* 2000). Desweiteren wurden Mutationen des *PROM1* Gens beschrieben, die zu autosomal-rezessiver Makuladystrophie führen (Michaelides *et al.* 2003). Die Prominin-1 Knockout-Maus hat, abgesehen von der erwarteten Retinadegeneration, keinen offensichtlichen Phänotyp (Fargeas *et al.* 2006). Möglicherweise wird hier die Funktion von Prominin-2 übernommen, welches in der Retina nicht exprimiert wird.

CD133 ist in der Zellmembran besonders in cholesterolreichen Arealen lokalisiert, die als *lipid rafts* bezeichnet werden. Außerdem wird das Protein vornehmlich in Membranausläufern exprimiert und reichert sich bei migrierenden hämatopoetischen Zellen am hinteren Pool, dem sogenannten Uropod an (Giebel *et al.* 2004). Auch in transfizierten Fibroblasten ist CD133 vor allem auf Membranfortsätzen lokalisiert (Weigmann *et al.* 1997).

In der Arbeit von Singh (Singh *et al.* 2004b) konnte gezeigt werden, dass nach der Auftrennung von reseziertem Gewebe von Glioblastomen und Medulloblastomen in CD133+ und CD133- Zellen nur die CD133-positive Zellfraktion bei der Implantation in das Gehirn von Nacktmäusen ein Tumorwachstum initiieren konnte. In einer weiteren Arbeit konnte *in vitro* und *in vivo* durch Bestrahlung die CD133+ Zellfraktion von Gliomzellen angereichert und somit ein Zusammenhang mit der Therapieresistenz der Tumoren hergestellt werden (Bao *et al.* 2006). Beide Arbeiten bestärken also die Tumorstammzellhypothese und geben Hinweise, dass CD133 für die Entstehung und das Wachstum

von Gliomen eine wichtige Rolle spielen könnte.

## 1.4 Stammzellbasierte Gliomtherapie

Stammzellen haben die Fähigkeit des sogenannten *homings*, d.h. sie können aus der Blutbahn in bestimmte Gewebe einwandern und dort die Regeneration von zerstörtem oder verletztem Gewebe initiieren. An dieser gerichteten Migration sind verschiedene Chemokine, wie z.B. *stromal-derived factor 1* (SDF-1) und *stem cell factor* (SCF) beteiligt (Lapidot *et al.* 2005).

Da Glioblastome, wie oben beschrieben, wegen ihres stark invasiven Wachstums immer nur unvollständig operativ entfernt werden können, gibt es zahlreiche Versuche, die verbleibenden Tumorzellen möglichst effektiv zu bekämpfen. Im Gegensatz zu der gängigen adjuvanten Therapie, in der postoperativ eine lokale Radiotherapie und systemisch eine orale Chemotherapie durchgeführt werden, bestehen neue Therapiestrategien z.B. in der lokalen Applikation eines Zytostatikums oder einer Immuntherapie mit dendritischen Zellen (de Vleeschouwer *et al.* 2006). Die Gentherapie zeigte bisher klinisch nur wenig Erfolg, da auch hier die invadierenden Tumorzellen nur schwer erreichbar waren. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die zellbasierte Gentherapie. Hier werden migrierende Zellen als Vehikel verwendet, um Suizidgene oder Immunstimulanzen gezielt in die Nähe der Tumorzellen zu bringen. Hierbei wird meist der sogenannte *bystander effect* ausgenutzt, d.h. durch die räumliche Nähe werden Tumorzellen transfiziert und somit eliminiert. Wegen des hohen migratorischen Potentials von Stammzellen eignen sich diese sehr gut für die Entwicklung solcher Therapien. Vor allem mit murinen neuronalen Stammzellen konnten im Tierversuch bereits gute Resultate erzielt werden (Aboody *et al.* 2000, Li *et al.* 2005). In der Arbeit von Aboody *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass murine neurale Stammzellen im Rattenhirn zu glialen Tumoren migrieren. Die Transfektion mit einem therapeutischen Gen führte zu einer Reduktion der Tumormasse um 80 %. Aufgrund einer zu erwartenden Abstoßungsreaktion erscheinen murine Zellen jedoch wenig geeignet für die Therapie beim Menschen und humane neurale Stammzellen stehen ebenfalls nur sehr eingeschränkt zur Verfügung. Deshalb gibt es starke Bestrebungen, alternative Stammzellressourcen für eine zellbasierte Gentherapie zu nutzen. Beispielsweise wurde bereits für Knochenmarkstammzellen ein ähnliches migratorisches Verhalten zu glialen Tumoren *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Tabatabai *et al.* 2005). Die Mechanismen der Migration von Stammzellen sind bislang noch unklar. Analog dem natürlichen *homing* wurde nachgewiesen, dass verschiedene Chemokine, wie z.B. HGF oder TGF- $\beta$

auch hier eine Schlüsselrolle zu spielen scheinen (Heese *et al.* 2005, Tabatabai *et al.* 2005).

## 1.5 Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC)

Da die oben beschriebenen Studien mit Stammzellen durchgeführt wurden, die aus Gründen der Ethik und der Verfügbarkeit (embryonale oder neurale Stammzellen) für die Therapie beim Menschen wenig geeignet erscheinen, wurden weitere Stammzelllinien auf ihre Eignung für solche Therapieansätze untersucht. Eine viel versprechende Alternative könnten sogenannte *Unrestricted Somatic Stem Cells* (USSC) darstellen. Hierbei handelt es sich um pluripotente CD45-negative Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut, die ein hohes intrinsisches Differenzierungspotential besitzen (Kögler *et al.* 2004). Sie lassen sich *in vitro* zu verschiedenen neuronalen Zellen ausdifferenzieren (Kögler *et al.* 2004) und kürzlich wurde außerdem die Pluripotenz auf klonaler Ebene beschrieben (Giebel *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Erste Implantationsexperimente zeigten, dass sich die Zellen nach intrazerebraler Implantation im Rattenhirn wiederfinden und nicht zu der Entstehung von Tumoren führen (Kögler *et al.* 2004), wie es bei der Implantation embryonaler Stammzellen berichtet wurde (Reubinoff *et al.* 2000). *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass USSC zu apoptotischen Neuronen migrieren und diese Migration durch *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)-neutralisierende Antikörper gehemmt wurde (Trapp *et al.*, unveröffentlichte Daten). HGF wurde auch als ein wichtiger Faktor bei der Migration neuronaler Stammzellen zu Gliomzellen beschrieben (Heese *et al.* 2005).

## 1.6 Tumormodelle

### 1.6.1 Gliomzelllinien

In der onkologischen Grundlagenforschung werden häufig etablierte Zelllinien verwendet, die kommerziell erhältlich und so für alle Arbeitsgruppen zugänglich sind. Diese Zelllinien haben den Vorteil, dass auf zahlreiche vergleichende Arbeiten zurückgegriffen werden kann und die Kultivierung nahezu unbegrenzt möglich ist. Hinzu kommt eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente und eine geringe Heterogenität innerhalb der Zellpopulation. Primärkulturen sind demgegenüber der ursprünglichen Tumorzellpopulation ähnlicher als die Zelllinien (Li *et al.* 2008). Nachteilig ist hier die aufwändigere

Gewinnung und die große interindividuelle Variabilität. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der Einfluss der CD133-Expression untersucht werden sollte, wurden hier etablierte Tumorzelllinien verwendet.

### 1.6.2 Tiermodelle

Im Gegensatz zum Zellkulturmodell ermöglicht die Verwendung von Tiermodellen die Untersuchung von biologischen Vorgängen *in vivo* in einem intakten Organismus. Das in dieser Arbeit verwendete F98-Gliommodell der Ratte wurde bereits in den 80er Jahren beschrieben (Vinores und Koestner 1981, Seitz *et al.* 1988, Reifenberger *et al.* 1989). F98-Zellen wurden aus Tumoren von Fisher-Ratten isoliert, welche durch eine intrauterine Applikation von Ethylnitrosoharnstoff induziert worden waren. Der Vorteil dieses Modells besteht darin, dass keine Immunsuppression erfolgen muss, da es sich wegen der Verwendung von genetisch identischen Fisher-Ratten um ein syngenes Modell handelt. Zudem ist das Modell gut etabliert und entsprechend einfach in der Durchführung. Nachteilig ist vor allem das scharf abgegrenzte Wachstum des Tumors, welches wenig Ähnlichkeit mit dem stark invasiven Wachstum von Gliomen hat. Desweiteren induziert die intrazerebrale Implantation der Zellen ein Trauma, das möglicherweise einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnte. Alternative Gliommodelle bestehen in der Implantation von aus humanen Tumorresektaten isolierten Zellen in immunsupprimierte Ratten oder Mäuse (Guillamo *et al.* 2001) oder in der Verwendung von Knock-out-Mäusen (Zhu *et al.* 2005). In beiden Fällen ähnelt das Tumorstadium dem von humanen Gliomen, jedoch ist dieser Gewinn mit einem größerem Aufwand und anderen Nachteilen, wie der komplexe Einfluss des Knock-outs und der Immunsuppression auf den gesamten Organismus der Versuchstiere, verbunden. Da in dieser Arbeit vornehmlich der Tropismus von Stammzellen zu Tumorzellen untersucht werden sollte, erschien das F98-Modell am besten geeignet.

## 1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle des potentiellen Tumorstammzellmarkers CD133 in Gliomen (I) und der Tropismus von *Unrestricted Somatic Stem Cells* (USSC) zu Gliomen (II) untersucht werden.

ad (I) Um die Rolle von CD133/Prominin-1 näher zu untersuchen, wurde zunächst eine mRNA-Expressionsanalyse in einer Serie von 95 Gliomen unterschiedlicher Malignität

sowie in Gliom-Zelllinien durchgeführt. In drei Zelllinien ohne nachweisbare CD133-mRNA wurde daraufhin CD133 mit einem lentiviralen Vektor reexprimiert. Mit diesen CD133-transfizierten Zellen wurden zusammen mit GFP-transfizierten Kontrollzellen verschiedene zellbiologische Untersuchungen zur Proliferation, Vitalität, Apoptose und Migration durchgeführt. Zudem sollte mit Hilfe von Affymetrix<sup>®</sup>-Expressionsarrays der Einfluss der CD133-Überexpression in den Gliomzellen auf das Expressionsmuster anderer Gene bestimmt werden.

ad (II) Im Detail sollte das Migrationsverhalten von USSC zu Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. *In vitro* wurde das Migrationsverhalten von USSC zu verschiedenen etablierten humanen und aus der Ratte stammenden Gliomzelllinien in einem Transwellassay untersucht. Um den Mechanismus der Migration näher zu charakterisieren, wurden dabei verschiedene potentiell migrationshemmende Antikörper eingesetzt. Des weiteren wurde ein RNA-Expressionsprofil aus migrierten und nicht migrierten USSC-Fractionen mittels Microarray-Hybridisierung erstellt und auf die differentielle Expression von verschiedenen, möglicherweise an der Migration beteiligten Genen hin untersucht. Zur *in vivo*-Analyse der USSC-Migration wurde in Fisher-Ratten durch Implantation von F98-Gliomzellen ein Gehirntumor induziert, um dann nach systemischer oder intrazerebraler Applikation von USSC deren Migration postmortem durch Immunfluoreszenznachweis in Hirn- und Gewebeschnitten zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1, die verwendeten Sekundärantikörper in Tabelle 2 aufgelistet.

#### 2.1.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in den Tabellen 3, 4 und 5 zusammengefasst.

#### 2.1.3 Humanes Tumormaterial

Für die Expressionsanalyse wurde reseziertes Tumorgewebe mit mindestens 80 % Tumorteil verwendet. Nach der Resektion wurden die Tumorproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Extraktion bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Bestimmung des Tumorgehaltes wurde ein Teil des Tumorgewebes in TissueTek<sup>®</sup> eingebettet und in Isopentan auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Von diesen Präparaten wurden daraufhin an einem Kryostaten  $6\ \mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt und der Gehalt an Tumorzellen nach der HE-Färbung am Mikroskop beurteilt. Für weitere Untersuchungen wurden die Gefrierpräparate ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.1.4 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die kommerziell erworbenen Chemikalien, Puffer und Enzyme sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Klon	Markierung	Spezies	Verdünnung	Firma/Quelle	Verwendung
473HD	473HD	keine	Ratte	1:200	RUB	DZ
487/LeX	487/LeX	keine	Ratte	1:200	RUB	DZ
CD10	ALB 1	PE	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD29	K20	FITC	Maus	1:20	Immunotech	DZ/IF
CD29	mAb13	keine	Ratte	1:20	BD Biosciences	IF
CD34	581	PE	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD44	J.173	FITC	Maus	1:20-1:100	Immunotech	DZ/IF
CD45, Mensch	HI30	FITC	Maus	1:20	ITZ	DZ
CD45, Ratte	MRC OX-1	keine	Maus	1:100	Serotec	IF
CD49b	AK-7	FITC	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD49e	SAM1	FITC	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD49f	GoH3	PE	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD56	N901	PE	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD58	AICD58	PE	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD59	p282(H19)	FITC	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD63	H5C6	FITC	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD71	YDJ1.2.2	FITC	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD73	AD 2	PE	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD90	F15.42-1-5	FITC	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD95	UB2	PE	Maus	1:20	Immunotech	DZ
CD109	B-E47	PE	Maus	1:20	Diaclone	DZ/IF
CD133/1	AC133	PE, keine	Maus	1:20	Miltenyi Biotech	DZ/IF
CD164	N6B6	FITC	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD166	3A6	PE	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
CD200	Ox104	FITC	Maus	1:20	Serotec	DZ
CXCR4	12G5	keine	Maus	10 $\mu$ g/ml	R&D Systems	TA
EGFR	EGFR1	keine	Maus	1:5	BD Biosciences	DZ
GD2	14.G2a	keine	Maus	1:100	BD Biosciences	DZ
GD3	MB 3.6	keine	Maus	1:100	BD Biosciences	DZ
GFAP	<i>pk</i>	keine	Kaninchen	1:1000	Dako	IF
HGFR/c-met	95309	keine	Maus	1-5 $\mu$ g/ml	R&D Systems	TA
HGF	24612	keine	Maus	1-5 $\mu$ g/ml	R&D Systems	TA
HLA-ABC	B9.12.1	FITC	Maus	1:20	Immunotech	DZ
Human Nuclei	MAB1281	keine	Maus	1:200	Chemicon	IF
IgG-Isotyp	MOPC-21	FITC, PE	Maus	1:20	BD Biosciences	DZ
MAP2	HM-1	keine	Maus	1:100	Sigma	IF
Nestin, Mensch	196908	keine	Maus	1:100	R&D Systems	IF
Nestin, Ratte	Rat401	keine	Maus	1:500	Chemicon	IF
HER2/neu	9G6	keine	Maus	1:25	BD Biosciences	DZ
NF	2F11	keine	Maus	1:25	Sanbio	IF
NeuN	MAB377	keine	Maus	1:100	Chemicon	IF
Oligodendrozyten- marker O4	O4	PE	Maus	1:20	R&D Systems	DZ
Olig2	<i>pk</i>	keine	Kaninchen	1:100	IBL	IF
SSEA-1	SSEA-1	keine	Ratte	1:200	RUB	DZ
Vimentin	V9	keine	Maus	1:100-1:500	BioGenex	IF

Abkürzungen: *pk* = polyklonal; RUB = Ruhruniversität Bochum, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Faissner; ITZ = Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; DZ = Durchflusszytometrie; IF = Immunfluoreszenz; TA = Transwell-Assay

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Markierung	Spezies	Verdünnung	Firma	Verwendung
Goat-Anti-Rabbit	Cy3	Ziege	1:100- 1:200	Jackson ImmunoResearch	IF
Goat-Anti-Rabbit	FITC	Ziege	1:100- 1:200	Jackson ImmunoResearch	IF
Goat-Anti-Mouse	Cy3	Ziege	1:100- 1:200	Jackson ImmunoResearch	IF
Goat-Anti-Mouse	FITC	Ziege	1:100- 1:200	Jackson ImmunoResearch	IF
Goat-Anti-Rat	Cy2	Ziege	1:100- 1:500	Jackson ImmunoResearch	DZ, IF
Goat-Anti-Mouse	PE	Ziege	1:100	Jackson ImmunoResearch	DZ

Abkürzungen: ITZ = Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; DZ = Durchflusszytometrie; IF = Immunfluoreszenz

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Tumorzelllinien

Bezeichnung	Spezies	Gewebe	Bezugsquelle
A172	Mensch	Glioblastom WHO-Grad IV	ATCC
CCF-STTG1	Mensch	Glioblastom WHO-Grad IV	ATCC
Hs683	Mensch	Gliom	ATCC
T98G	Mensch	Glioblastom WHO-Grad IV	ATCC
TP365MG	Mensch	Glioblastom WHO-Grad IV	V. P. Collins, University of Cambridge
U87MG	Mensch	Astrozytom WHO-Grad III	ATCC
U118MG	Mensch	Astrozytom WHO-Grad III	ATCC
U138MG	Mensch	Glioblastom WHO-Grad IV	ATCC
F98	Ratte	Gliom	ATCC
C6	Ratte	Gliom	ATCC

Abkürzungen: ATCC = American Tissue Culture Collection

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Kontrollzelllinien

Bezeichnung	Spezies	Gewebe	Bezugsquelle
DRF36-1	Ratte	Hautfibroblasten	selbst generiert
DRF36-2	Ratte	Hautfibroblasten	selbst generiert
DHF40	Mensch	Hautfibroblasten	NE
RAs	Ratte	Astrozyten	NE

Abkürzungen: NE = Neurologische Klinik der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hans-Werner Müller

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Stammzelllinien

Bezeichnung	Spezies	Gewebe	Bezugsquelle
SA5/03	Mensch	Nabelschnurblut	ITZ
SA5-18	Mensch	Nabelschnurblut	ITZ

Abkürzung: ITZ = Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Puffer und Enzyme

Bezeichnung	Firma
100 bp-DNA Leiter	PeqLab
1 kb-DNA-Leiter	PeqLab
DPBS	Gibco
Isopentan	Sigma
Isoton-Puffer	Beckman Coulter
ProLong <sup>®</sup> Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen
RNasin	Promega
Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen
Taq Polymerase	Sigma
TBST (10x Konzentrat)	DAKOCytomation
TissueTek <sup>®</sup> O.C.T. Compound	Sakura
Triton X-100	Fluka
TRIzol <sup>®</sup> -Reagent	Invitrogen

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Kits und Assays

Bezeichnung	Firma
Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay	Promega
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
GeneChip <sup>®</sup> Eucaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> Expression 3'-Amplification One-cycle cDNA synthesis kit	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> Sample Cleanup Module	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> 3' Amplification Reagents For IVT-Labeling	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> IVT cRNA Cleanup Kit	Affymetrix
RNeasy <sup>®</sup> Micro Kit	Qiagen

**Selbst hergestellte Puffer und Lösungen:**

PBS (unsteril, für Immunfluoreszenzfärbungen):

- 140 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

RNasin-Mix:

- 0,44 U/ $\mu\text{l}$  RNasin
- 2,7 mM Dithiothreitol gelöst in 10 mM Natriumacetat
- pH 5,2

**2.1.5 Kits und Assays**

Die verwendeten Kits und Assays sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**2.1.6 Oligonukleotide**

Die für die PCR und Realtime RT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Gen	Sequenz	Amplikonlänge	Accession No.
ARF1-F	<i>ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)</i>	gaccacgatcctctacaagc	111 bp	NM_001658
ARF1-R3		tcccacacagtgaagctgatg		
$\beta$ 2MG3 Taq F	<i><math>\beta</math>2-microglobulin, 3'-Region</i>	gttgctccacaggtagctctag	123 bp	NM_004048
$\beta$ 2MG3 Taq R		acaagctttgagtgaagagattg		
$\beta$ 2MG5 Taq F	<i><math>\beta</math>2-microglobulin, 5'-Region</i>	gtctcgctccgtggccttag	112 bp	NM_004048
$\beta$ 2MG5 Taq R		cattctctgctggatgacgtgag		
HGFR F	<i>MET/hepatocyte growth factor receptor</i>	gcactgctttaataggacact	215 bp	NM_000245
HGFR R		ccacaacctgcatgaagcg		
PROM1 TaqF1	<i>Prominin 1</i>	gattatgacaagattgtctactatgaag	104 bp	NM_006017
PROM1 TaqR		cttctgtcgctggtgcatttc		

Tab. 9: Modellbezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Firma
Kryostat	CM1900	Leica
Durchflusszytometer	EPICS-XL-MCL	Beckman-Coulter
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	BD Biosciences
Realtime PCR-Thermocycler	GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems
PCR Thermocycler	T3-Thermocycler	Biometra
PCR Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra
Photometer	Nanodrop ND1000	PeqLab
Zellinkubator	CB150	Binder
Sterilbank	BSB 6 und 4A	Gelaire
Tischzentrifuge	Modell 10	Costar
Tischzentrifuge	Rotifix 32	Hettich
Kühlzentrifuge	EBA 12R	Hettich
Geldokumentationssystem	GelDoc 1000 System	BioRad
Gelkammern für Agarosegele	Sub-Cell	BioRad
Netzgerät	PowerPAC 3000	BioRad
Vakuumpumpe	Labport	KMF
Stereotakt	Small animal adaptor	David Kopf Instruments
Fluoreszenz-Mikroskop	DM5000B	Leica
Fluoreszenz-Mikroskop	Axioplan 2	Carl Zeiss
Inverses Mikroskop	IX50	Olympus
Zählkular	WHN 10X	Olympus

### 2.1.7 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe der entsprechenden Hersteller sind in Tabelle 9 angegeben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 250 ml-Zellkulturflaschen adhärent kultiviert. Tumor- und Kontrollzelllinien wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom AG) mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/l D-Glukose und 1,028 g/l stabilem Glutamin unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, 30 min bei 56 °C) und 10.000 I.E./ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zellen wurden passagiert, sobald sie annähernd konfluent gewachsen waren, und dabei je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:3 (SA5-18) bis 1:50 (F98) geteilt. Dafür wurden die Tumor- und Kontrollzellen mit 3 ml Phosphate buffered Saline (PBS, Gibco) gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Sobald sich der Großteil der Zellen mit leichtem Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche löste, wurde die Reaktion mit 4 ml des Kulturmediums abgestoppt, die Zellen in Suspension gebracht und nach Bedarf für Experimente verwendet oder weiter kultiviert. Die Stammzellen wurden in DMEM (Cambrex) mit 1 g/l D-Glukose unter Zusatz von 30 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin und 10.000 I.E./ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für das Passagieren wurden sie mit 10 ml sterilem PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellen wurden vor der weiteren Verwendung oder Kultivierung 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm in einer Hettich-Tischzentrifuge abzentrifugiert.

#### Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für das Einfrieren wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 1000 rpm in einer Hettich-Tischzentrifuge 5 min pelletiert und der Überstand abgesaugt. Die Tumor- und Kontrollzellen wurden in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 32 % hitzeinaktiviertem FCS, 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 60 % Kulturmedium resuspendiert. Die Stammzellen wurden in 0,5 ml Kulturmedium resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension 1:1 mit

USSC-Einfriermedium, bestehend aus 20 % frisch aufgetautem DMSO, 40 % hitzeinaktiviertem FCS und 40 % Kulturmedium vermischt. Daraufhin wurden die Zellen in 1,8 ml Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  überführt. Für das Auftauen wurden die Tumor- und Kontrollzellen im Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt und dann in eine Zellkulturflasche mit 12 ml vorgewärmten Kulturmedium überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Stammzellen wurden nach dem Auftauen in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und bei Raumtemperatur und 1000 rpm 5 min abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche transferiert.

### Neurosphärenassay

Nach dem Ablösen wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in Neurosphärenmedium resuspendiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellzahl pro Milliliter wurde anhand der Wachstumsgeschwindigkeit so optimiert, dass das Medium erst nach etwa einer Woche erneuert werden musste.

Zusammensetzung des Neurosphärenmediums:

DMEM/F12	1:1	(beides Sigma)
L-Glutamin	0,2 mg/ml	(Sigma)
B27	1 ml/50 ml	(Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	10.000 I.E./ml	(Invitrogen)
EGF	20 ng/ml	(Calbiochem)
bFGF	20 ng/ml	(Preprotech)
Heparin	0,5 U/ml	(Sigma)

Nach einer Woche wurden die entstandenen Sphäroide bezüglich Größe und Zahl mikroskopisch beurteilt. Für Immunfärbungen wurde das Medium mit den enthaltenen Sphäroiden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und ohne Zentrifugation einige Minuten sedimentieren gelassen. Dann wurden die Zellen mit Hilfe einer 1000  $\mu\text{l}$ -Pipette und einer vorne abgeschnittenen Pipettenspitze in eine mit TissueTek<sup>®</sup> O.C.T. Compound gefüllte Silikonform übertragen und in Isopentan auf Flüssigstickstoff eingefroren. Die so entstandenen Präparate wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und für die nachfolgenden Färbungen am Kryostaten in 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten.

## Transwellversuch

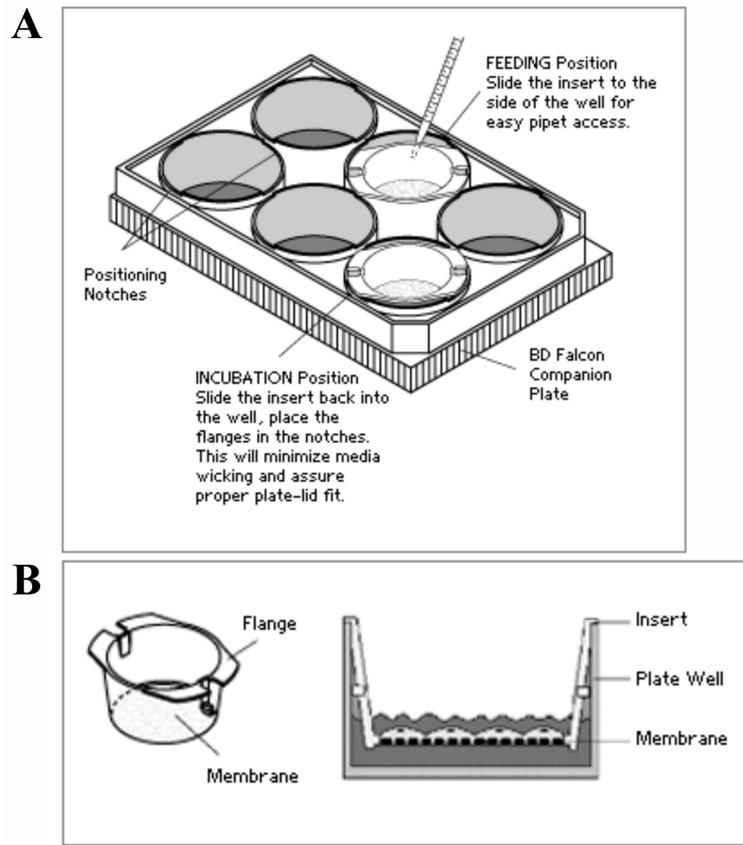


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Transwell-Assays. A: Darstellung von Inserts in einer 6-well Gewebekulturplatte. B: Detailabbildung eines Inserts mit semipermeabler Membran (Abbildung von BD Falcon)

Die Migration von USSC zu Tumorzellen wurde *in vitro* in einem Transwell-Assay (BD Falcon, siehe Abbildung 4) im 24-well Format wie folgt durchgeführt. Am Tag 1 wurden humane und aus der Ratte stammende Tumor- und Kontrollzellen nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA in Migrationsmedium suspendiert und in einem Hämazytometer gezählt. Als Migrationsmedium diente DMEM (Cambrex) mit 1 g/l D-Glukose unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin und 10.000 I.E./ml Penicillin/Streptomycin. Alternativ wurde außerdem USSC-Kulturmedium oder Gliomzell-Kulturmedium verwendet. Dann wurden die Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/well in 0,8 ml Migrationsmedium in einer 24-well Companion Plate (BD Falcon) ausgesät (Platte 1). Am Tag 2 wurden abends USSC in einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen/Insert in 0,3 ml Migrationsmedium in Einsätze (Inserts) in einer 24-well Companion Plate mit

0,8 ml Migrationsmedium/well ausgesät und über Nacht zum Absetzen der Zellen im Brutschrank inkubiert (Platte 2). Die verwendeten Einsätze hatten eine PET Membran mit einem Porendurchmesser von 8  $\mu\text{m}$ . Am Tag 3 wurden bei Bedarf zunächst die USSC in den Inserts mit Hilfe eines Gitterokulares an einem inversen Mikroskop (Olympus) gezählt und dann die Inserts von Platte 1 in Platte 2 umgesetzt. Sollte die hemmende Wirkung von neutralisierenden Antikörpern oder PI3-Kinase-Inhibitoren untersucht werden, wurden zunächst die Überstände von Platte 1 auf eine dritte Platte (Platte 3) überführt und dann jeweils mit 20  $\mu\text{M}$  LY294200, 100 nM Wortmannin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CXCR4-Antikörper oder 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  c-met oder HGF Antikörper (RnD Systems) bzw. Isotyp-Kontrolle 2 h vorinkubiert. Parallel dazu wurden die Inserts mit 0,3 ml Medium in eine 24-well Platte von Greiner (Platte 4) überführt und ebenfalls mit Antikörpern oder Enzyminhibitoren in der entsprechenden Konzentration 2 h vorinkubiert. Dann wurden die Inserts mit dem Inkubationsmedium von Platte 4 in Platte 3 umgesetzt. Nach 4 h bei 37 °C wurde die Migration abgestoppt. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde außerdem die Migration nach 2 h und 6 h bestimmt. Die Stammzellen migrierten in dieser Zeit durch die Poren der Membran zu der Unterseite der Inserts und blieben dort haften. Zum Abstoppen wurden die Inserts herausgenommen und kurz auf einem Kleenextuch abtropfen gelassen. Dann wurden mit Wattestäbchen die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite der Membran abgewischt die Inserts nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 1 min in Methanol 100 % RT (Fixierung der Zellen)
- 5 min trocknen der Inserts auf dem Deckel einer 24-well Platte
- 10 min Mayers Hämatoxylin (Kernfärbung)
- ca. 10 s Inkubation in einem Becherglas mit Leitungswasser („Bläuen“ der Zellkerne)
- abtropfen auf einem Kleenextuch
- > 2 min trocknen
- Inserts zur Auswertung und Aufbewahrung in neue 24-well Platte überführen

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der gefärbten USSC auf der Unterseite der Membran mit einem Gitterokular an einem inversen Mikroskop (Olympus) und durch

die Bestimmung der absoluten Zahl oder des prozentualen Anteils der migrierten Stammzellen. Die Experimente wurden dabei immer in Triplets durchgeführt und einmal reproduziert. Für weitere molekularbiologische Untersuchungen wurde der Transwellversuch in einem 6-well Format durchgeführt. Dazu wurden an Tag 1 F98-Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/well in 3 ml Migrationsmedium in einer 6-well Platte ausgesät. An Tag 2 wurden die USSC in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Insert in 1,3 ml Migrationsmedium in einer zweiten 6-well Platte ausgesät und über Nacht zum Absetzen der Zellen im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 wurde die Migration durch das Umsetzen der Inserts gestartet und bereits nach 1 h gestoppt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Membranoberseite und -unterseite abgetragen, in jeweils 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagent pro 6-well Platte aufgenommen und in mehrere 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Wegen der geringen mRNA-Ausbeute wurde bei der zweiten und dritten Extraktion der doppelte Ansatz verwendet und die Zellen von zwei 6-well Platten in 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagent suspendiert. Die Migration wurde bei der zweiten Extraktion nach 2 h und bei der dritten Extraktion nach 1,5 h gestoppt. Anschließend wurde wie unten beschrieben die mRNA isoliert.

### **Gewinnung von Fibroblasten aus der Haut von Fisher-Ratten**

Zunächst wurde unmittelbar nach der Tötung der Versuchstiere ein kleines Areal auf dem Rücken rasiert und mit Sterilium<sup>®</sup> (Bode) desinfiziert. Dann wurde mit einem sterilem Skalpell eine etwa 5 x 5 mm große Hautbiopsie genommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml sterilem PBS überführt. Auf diese Weise wurden bei jedem Tier zwei Biopsien genommen. Danach wurde je eine Hautprobe unter der Sterilbank in einer 10 cm Gewebekulturschale mit einem sterilen Skalpell zerteilt und mit 15 ml Kulturmedium bedeckt (s. o.). Bis zum Auswachsen der Fibroblasten wurde daraufhin einmal pro Woche das Medium gewechselt. Sobald sich ausreichend große Fibroblastenkolonien gebildet hatten, wurden die Gewebestückchen abgesaugt und die Zellen wie oben beschrieben weiter kultiviert oder eingefroren.

### **Nomenklatur der Fibroblasten**

Alle in dieser Arbeit verwendeten und aus der Haut von Ratten gewonnenen Fibroblasten tragen die Bezeichnung DRF für *D*ermale *R*atten *F*ibroblasten. Die nachstehende Ziffer bezeichnet das Tier, von dem die Biopsie stammt und daran angefügt die Nummer der Biopsie -1 oder -2. DRF 36-1 bezeichnet also Fibroblasten, die aus der ersten Biopsie des Tieres mit der Nummer 36 gewonnen wurden.

## Lentivirale Transfektion

Die Konstruktion der lentiviralen Vektoren und die lentivirale Transfektion der Gliomzellen mit CD133 und GFP wurden von Herrn Dipl. biol. Gregor von Levetzow im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) durchgeführt. Für die Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 35000 Zellen/well in einer 6-well Platte ausgesät und nach 24 h mit Virusüberstand versetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wie oben beschrieben weiter kultiviert. Der hierfür benötigte Virusüberstand wurde durch die Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonal kidney cells*, Linie HEK293) mit dem entsprechenden Gen, dem Hüllprotein und den lentiviralen Virusproteinen hergestellt. Als Positivkontrolle für die CD133-Immunfluoreszenzfärbung wurden von diesen Zellen entsprechend der Einbettung von Neurosphären Kryopräparate angefertigt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## Colony-forming-Assay

Für den Colony-forming-Assay wurde zunächst eine 0,6 %ige Agarlösung in sterilem Kulturmedium in 6-well Zellkulturschalen gegossen. Nach dem Erkalten wurden  $2 \times 10^4$  Zellen je Well in  $45^{\circ}\text{C}$  warmer 0,3 %iger Agarlösung suspendiert und in die vorbereiteten 6-well Platten gegossen. Nach 3-4 Wochen wurden die entstandenen Kolonien mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) angefärbt. Dazu wurden jeweils  $500 \mu\text{l}$  einer MTT-Lösung (1 mg/ml in PBS) auf den Agar gegeben und 1-2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Für die Auswertung wurden die Kolonien an einem inversen Mikroskop ausgezählt und fotografiert. Die Versuche wurden im 6-well Format in einem dreifachen Ansatz durchgeführt.

## Messung der mitochondrialen Aktivität/MTT-Assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von den Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien von Dehydrogenasen zu Formazan-Kristallen abgebaut, sodass die Menge an gebildetem Formazan als Maß für die Vitalität der Zellen betrachtet werden kann. Für den Versuch wurden zunächst 2500 Zellen in  $100 \mu\text{l}$  pro Well in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für 24-48 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden  $10 \mu\text{l}$  MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, Sigma) pro Well dazugegeben (Endkonzentration 0,5 mg/ml) und mindestens 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde das Medium abgegossen und die Zellen in  $150 \mu\text{l}$  DMSO 5-15 min lysiert. Die Messung

erfolgte in einem ELISA-Reader bei 570 nm (Formazan) und wurde gegen die Absorption bei 630 nm (Zelldebris) abgeglichen. Alle Experimente wurden im 96-well Format in einem sechsfachen Ansatz durchgeführt und einmal wiederholt.

### **BrdU-Assay**

Das Pyrimidinanalogon 5-Brom-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) wird anstelle des Thymins während der Proliferation der Zellen in die DNA eingebaut. Das in die Zellen eingebaute BrdU kann dann durch eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden und ist ein Maß für die Proliferationsaktivität der untersuchten Zellen. Der BrdU-Assay wurde mit Hilfe des kolorimetrischen Cell Proliferation ELISA-Kits (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden zunächst Zellen in 100  $\mu$ l Medium je well in einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und 24 h-48 h kultiviert. Dann wurden 10  $\mu$ l/well 1:100 verdünnte BrdU-Lösung dazugegeben und die Zellen weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgegossen und die Zellen mit 200  $\mu$ l/well FixDenat für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fixativ wurde daraufhin abgeschüttet, 100  $\mu$ l/well Peroxidase-konjugierter Anti-BrdU Antikörper (Anti-BrdU-POD) dazu pipettiert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abgießen des Antikörpers wurde dreimal mit 200  $\mu$ l Waschlösung gewaschen und dann 100  $\mu$ l/well Substrat-Lösung dazugegeben. Nach 5-30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption im Elisa-Reader bei 370 nm gemessen (Referenz 492 nm). Alle Experimente wurden im 96-well Format in einem sechsfachen Ansatz durchgeführt und einmal wiederholt.

### **Messung der Caspase-3/-7-Aktivität**

Da die Caspasen-3 und -7 nur in apoptotischen Zellen aktiviert werden, kann ihre Aktivität als Maß für die Apoptoserate in einer Zellpopulation angesehen werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten Apo-ONE<sup>®</sup> Homogenous Caspase-3/7 Assay wird die Caspase-3/7-Aktivität nach dem Umsatz des enzymspezifischen Rhodamine 110,bis-(N-CBZL-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110) Substrates zu einem fluoreszierenden Produkt fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 499 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm bestimmt. Alle Experimente wurden im 96-well Format in einem sechsfachen Ansatz durchgeführt und einmal wiederholt.

## 2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

### Versuchtiere

Alle Tierversuche wurden mit adulten männlichen Fischer-Ratten (Charles River) durchgeführt. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gemäß geltender Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Tiere täglich auf neurologische Auffälligkeiten hin untersucht.

### Stereotaktische Implantation von Zellen

Für die Implantationsexperimente wurde entweder das syngene Tumormodell von F98-Zellen in Fisher-Ratten verwendet oder es wurden zur Etablierung der Immunfluoreszenz USSC in das Gehirn gesunder Fisher-Ratten implantiert. Nach intraperitonealer Injektion der Narkosemischung (Ketamin in Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, 100 mg/kg Körpergewicht, und Xylazin in Rompun<sup>®</sup>, Bayer AG, Leverkusen, 10 mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere zum Einschlafen in einen abgedunkelten Käfig gelegt. Daraufhin wurde zum Schutz vor dem Austrocknen der Schleimhäute Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen) in beide Augen appliziert, dann die Haut auf dem Schädel rasiert und die Ratte in einen Stereotakten eingespannt (Small animal adaptor, David Kopf Instruments). Dabei wurde der Kopf durch Einhaken der oberen Schneidezähne in einen Bügel und das Einführen von zwei stumpfen Stäben in die Ohren fixiert. Dann wurde nach einem Hautschnitt die Kalotte freigelegt und mit Braunol<sup>®</sup> Desinfektionslösung (Braun) desinfiziert. Daraufhin wurden mit Hilfe des Stereotakten die Koordinaten der Implantationsstelle bestimmt (1 mm kaudal, 3 mm lateral des Bregma-Punktes) und mit einem Gravur-Bohrer ein Loch (Durchmesser ca. 1 mm) in die Kalotte gebohrt. Knochensplitter wurden mit steriler isotoner Kochsalzlösung (Braun) weggespült und die Kalotte mit einem sterilen Wattetupfer getrocknet. Danach wurde eine 5  $\mu$ l Hamiltonspritze in den Stereotakten eingespannt, die Zellsuspension aufgezogen und nach folgendem Zeitplan mit einer 22 oder 28 Gauge Kanüle implantiert:

- Kanüle mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/30 s 4,5-5 mm einsinken lassen
- 1 min warten
- Implantation der Zellsuspension (0,1  $\mu$ l/15s)

- 5 min warten
- Kanüle langsam herausziehen

Anschließend wurde der Stereotakt entfernt und der Hautschnitt mit sterilem resorbierbarem Nahtmaterial genäht. Zur postoperativen Analgesie wurde den Ratten 0,05 mg/kg Körpergewicht Temgesic<sup>®</sup> (Essex Pharma) subkutan verabreicht. Nach der Operation wurden die Tiere in Zellstoff eingewickelt und zum Aufwachen wieder in den Käfig gelegt. Die Versuche wurden anhand von vorgefertigten Protokollen dokumentiert und Auffälligkeiten wurden notiert.

### **Intravenöse Infusion von Zellen**

Alternativ zu der stereotaktischen Implantation wurden die USSC bei einigen Tieren intravenös appliziert. Dazu wurden die Tiere wie oben beschrieben in Narkose gelegt und auf dem Rücken liegend auf einer mit Zellstoff umwickelten Platte an allen vier Beinen mit Leukosilk<sup>®</sup> (BSN medical) Klebeband fixiert. Dann wurde die Innenseite des linken Oberschenkels rasiert, mit Braunol<sup>®</sup> Desinfektionslösung desinfiziert und die Haut mit einem Skalpell eröffnet. Daraufhin wurde unter einem Operationsmikroskop die Vena femoralis frei präpariert und abgeklemmt. Ein dünner Katheterschlauch wurde vorsichtig in das Gefäß eingeführt und mit einer weiteren Klemme fixiert. Danach wurde zunächst mit steriler isotoner Kochsalzlösung die Dichtigkeit des Zugangs überprüft und danach langsam 500  $\mu$ l Zellsuspension entsprechend  $1 \times 10^6$  Zellen mit einer 1 ml-Spritze infundiert. Anschließend wurde der Schlauch mit 1 ml steriler isotoner Kochsalzlösung gespült und der Katheter und die Klemmen vorsichtig entfernt. Bis zur Blutstillung wurde eine sterile Mullkomresse auf den Situs gepresst und daraufhin die Haut mit sterilem resorbierbarem Nahtmaterial genäht. Zum Aufwachen wurden die Tiere wie oben beschrieben wieder in den Käfig gelegt.

### **Immunsuppression**

Die Immunsuppression wurde jeweils einen Tag vor der Implantation humaner USSC mit einer subkutanen Bolusinjektion von 30 mg/kg Körpergewicht Ciclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup>, Novartis Pharma, Nürnberg) begonnen und danach mit 15 mg/kg Körpergewicht s. c. Erhaltungsdosis fortgeführt.

## Tötung der Tiere

Die Tiere wurden entweder nach Versuchsplan oder sobald sie zentralnervöse Symptome, wie z. B. eine Hemiparese, zeigten, durch Dekapitieren in tiefer Isofluran-Narkose getötet. Das Gehirn wurde entnommen und sofort in einer Aluminiumschale auf einer Isopentan/Trockeneismischung eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach intravenöser Applikation von USSC wurden außerdem Lunge und Leber entnommen und wie beschrieben eingefroren.

## Aufarbeitung der gefrorenen Gewebeproben

Für die Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die gefrorenen Gewebeproben zunächst etwa 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  temperiert. Daraufhin wurde jedes Gehirn von frontal nach caudal geschnitten, wobei die ersten 2-3 mm verworfen und die darauf folgenden Schnitte auf Objektträger aufgezogen wurden. Dabei wurde bis etwa 0,5 mm frontal der makroskopisch erkennbaren intrazerebralen Implantationsstelle bei einer Dicke von  $20\ \mu\text{m}$  geschnitten und dann die Dicke auf  $7\ \mu\text{m}$  reduziert. Jeder zehnte Schnitt wurde Hämalan/Eosin (HE) gefärbt und archiviert, während die restlichen Schnitte 10 min auf einer  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Heizplatte getrocknet und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Bei Lebern und Lungen wurden ebenfalls die ersten 2-3 mm verworfen und dann jeweils 3 Schnitte mit einer Dicke von  $7\ \mu\text{m}$  angefertigt und sofort gefärbt. Dabei wurde jeweils ein Schnitt HE gefärbt und zwei Schnitte für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### RNA Isolierung aus Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann in 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagent (Sigma) pro Zellkulturflasche lysiert und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach etwa 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zelleluat mit  $200\ \mu\text{l}$  Chloroform überschichtet und 15 s kräftig geschüttelt. Nach weiteren 2-3 min bei RT wurde die Mischung 15 min bei 14000 rpm in einer auf  $4^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Die mRNA enthaltende obere helle Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit  $500\ \mu\text{l}$  Isopropanol vermischt. Die RNA wurde daraufhin mindestens 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  gefällt und danach 15 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  pellettiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und erneut 15 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach dem Trock-

nen wurde das Pellet 5-10 min bei 55 °C in RNAsin-Mix gelöst und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch an einem Nanodrop Photometer (Peqlab).

### cDNA Synthese

Je 3 µg Gesamt-RNA aus Tumor- bzw. nicht-neoplastischem Kontroll-Hirngewebe oder Zellen wurden mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 3 µg RNA in 30,4 µl DEPC-behandeltem Wasser wurden 10 min bei 70 °C denaturiert und danach für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 19,6 µl einer Reaktionsmischung bestehend aus 0,4 µl DTT, 1 µl RNAsin, 1,7 µl BSA (1 mg/ml), 2,5 µl dNTPs (25 mM), 3 µl pd(N)<sub>6</sub> (1,5 µg/µl), 10 µl 5x First Strand Puffer und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) wurde die Mischung dann für die Synthese-Reaktion 50 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 10 min auf 80 °C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Abschließend wurde die Qualität der cDNA mittels einer PCR mit β2-Mikroglobulin Primerpaaren überprüft, die ein Amplikon sowohl im 5´ als auch im 3´-Bereich des Gens abdeckten. War die zur Verfügung stehende mRNA-Menge kleiner als 3 µg, wurde der Reaktionsansatz entsprechend angepasst. Für die Real-time RT-PCR wurden die cDNA-Lösungen 1:25 mit destilliertem Wasser verdünnt.

### Real-time Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (Real-time RT-PCR)

Die Real-time RT-PCR (Echtzeit-PCR nach reverser Transkription von RNA) basiert auf einer normalen PCR Reaktion und ermöglicht durch die Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), der in die doppelsträngige DNA interkaliert, eine Quantifizierung des gebildeten PCR-Produktes. Dazu wurde am Ende jedes PCR-Zyklus eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, deren Messergebnisse als R<sub>n</sub>-Werte (normalized reporter) gespeichert wurden. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zu der gebildeten DNA-Produktmenge und wurde für die Auswertung graphisch gegen die Zyklenzahl abgebildet. Daraufhin wurde ein konstanter R<sub>n</sub>-Wert (Schwellenwert, Threshold) festgelegt, der die Amplifikationskurven im logarithmischen Bereich schneidet. Aus den Schnittpunkten wurden bei der entsprechenden Zyklenzahl die C<sub>T</sub>-Werte (Threshold Cycle-Wert) ermittelt und tabellarisch zusammengefasst. Zur Kontrolle der Primerspezifität wurde zusätzlich eine Dissoziationskurve jedes Amplikons im Bereich 60-100 °C erstellt. Die Real-time RT-PCR wurde in allen Experimenten unter den gleichen Standardbedingungen mit dem ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Bio-

systems, Foster City, USA) durchgeführt. Zunächst wurde durch 10 min Inkubation bei 95 °C die Taq-Polymerase durch Denaturierung eines Inhibitorproteins aktiviert. Darauf folgten 40 Zyklen mit jeweils 15 s Inkubation zur Denaturierung der gebildeten DNA Doppelstränge bei 95 °C und 1 min Inkubation für das Annealing und die Elongation bei 60 °C. Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurde das optimale Primerverhältnis in einer sogenannten Primermatrix ermittelt, in der die Oligonukleotide jeweils in den Konzentrationen 50, 300 und 900  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. Daraufhin wurde für die weiteren Analysen das Verhältnis gewählt, bei dem die Dissoziationskurve ausschließlich einen Peak bei der berechneten Schmelztemperatur aufwies und der  $C_T$ -Wert am geringsten war. Die Untersuchung jeder Probe wurde für das Zielgen und das Kontrollgen *ARF1* (*ADP ribosylation factor 1*) jeweils in Triplets durchgeführt. Als Referenz diente aus kommerziell erhältlicher Human brain total RNA oder Human Universal RNA generierte cDNA. Für jeden Reaktionsansatz wurde 5  $\mu\text{l}$  cDNA Gebrauchslösung mit 12,5  $\mu\text{l}$  SYBR-Green Mastermix, darin enthalten Taq Polymerase und SYBR Green, und den Oligonukleotiden in den vorher ermittelten Konzentrationen versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  ergänzt. Für die Auswertung wurden zunächst von jedem Triplett der Mittelwert aus den  $C_T$ -Werten bestimmt und die Differenz von Ziel- und Referenzgen ermittelt ( $\Delta C_T$ ). Dann wurde der  $C_T$ -Wert der Referenz-cDNA von den  $C_T$ -Werten der Tumoren subtrahiert und somit die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelt. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), so dass Werte  $< 1$  einer erniedrigten Expression und Werte  $> 1$  einer Überexpression im Vergleich zur Referenz cDNA entsprechen.

### Mikroarray-basierte Expressionsanalyse

Für die Mikroarray-basierte Expressionsanalyse wurde mit TRIzol<sup>®</sup>-Reagent die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und mit dem RNeasy<sup>®</sup> MicroKit (Qiagen) aufgereinigt. Daraufhin wurden mit dem GeneChip<sup>®</sup> Eucaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix) die Poly-A Kontrollen entsprechend der eingesetzten RNA-Menge verdünnt und zu der zu untersuchenden RNA hinzugefügt. Das Umschreiben in doppelsträngige cDNA erfolgte mit Hilfe des GeneChip<sup>®</sup> Expression 3'-Amplification One-cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) gemäß der Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung mit dem GeneChip<sup>®</sup> Sample Cleanup Module (Affymetrix) wurde die cDNA mit den GeneChip<sup>®</sup> 3' Amplification Reagents For IVT-Labeling (Affymetrix) in cRNA transkribiert und mit Biotin markiert. Nach einer erneuten Aufreinigung mit dem GeneChip<sup>®</sup> IVT cRNA Cleanup Kit wurde die cRNA photometrisch quantifiziert und dann jeweils 16  $\mu\text{g}$  cRNA durch

35 min Inkubation bei 94 °C fragmentiert. Zur Kontrolle der Qualität wurden jeweils 2  $\mu$ l cRNA vor und nach der Aufreinigung und 1  $\mu$ g fragmentierte cRNA auf einem 1 % Agarose-Gel mit 0,005 % Ethidiumbromid aufgetrennt. Reichte die cRNA-Menge aus einer IVT-Reaktion nicht aus, so wurde die cRNA-Synthese wiederholt und die Produkte vereinigt. Es wurden insgesamt jeweils mindestens 10  $\mu$ g fragmentierte cRNA pro Chip eingesetzt und im Institut für Onkologische Chemie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Herrn Dr. Gernot Röder auf Affymetrix-Mikroarrays (HG U133A und HG U133A 2.0) hybridisiert.

Für eine erste Einschätzung der Daten wurden die Datensätze, die von der Affymetrix-Software generiert worden waren, mit Hilfe von Microsoft Excel sortiert. So konnte die Anzahl der Transkripte bestimmt werden, die eine differentielle Expression (Change = I (*increased* , erhöht) bzw. D (*decreased* , erniedrigt)) und eine Änderung der Expression mindestens um den Faktor 2 (Signal log Ratio  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$  ) aufwiesen. Außerdem wurden alle Datensätze ausgeschlossen, die bei erhöhter Expression bezogen auf die GFP-Kontrollzellen, kein positives Detektionssignal zeigten (Detection = A (*absent*, abwesend)). Die eigentliche Auswertung der Mikroarray-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Biol. Grisca Tödt, Herrn MSc Nicolas Delhomme und Herrn MSc Felix Engel am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

## 2.2.4 Statistische Auswertung

Der Vergleich von zwei Gruppen basierend auf den Expressionsdaten aus den Mikroarray-Analysen erfolgte mit Hilfe der ChipYard Software. Für die weitere Analyse dieser Daten wurde zum einen die *Comprehensive Gene Pathway analysis*-Software und für die Clusteranalyse das R-Software Package *pvclust* verwendet.

Für den Vergleich von Expressionsdaten aus der Realtime RT-PCR, ebenso wie für den Vergleich von Migrationsaktivität, Anzahl von Kolonien und ELISA-Messungen wurde ein T-Test mit Microsoft Excel durchgeführt.

## 2.2.5 Immunologische Methoden

### Immunfluoreszenzfärbungen

Nach diesen Protokollen wurden sowohl Kryo-Schnitte als auch adhärente Zellen in Chamberslides (BD Falcon) gefärbt. Die Gefrierschnitte wurden vor der Färbung 60 min im Kaltluftstrom getrocknet und die Zellen in den Chamberslides wurden nach der Aussaat mindestens einen Tag anwachsen gelassen. Für die Antikörper Human Nuclei und

CD133 wurde ein optimiertes Protokoll verwendet, während die Färbungen mit alle anderen Antikörper nach dem Standardprotokoll durchgeführt wurden.

### **Standardprotokoll Immunfluoreszenzfärbung**

- 5 min waschen in PBS
- 10 min fixieren mit Aceton (-20 °C)
- 15 min trocknen
- 15 min rehydrieren in PBS
- 10 min blocken mit 1 % Normalserum in PBS (bei intrazellulären Antigenen ggf. Tris buffered Saline mit Tween 20, TBST)  
Dabei wurde, sofern vorhanden, Normalserum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammte, verwendet.
- über Nacht Inkubation mit dem Primär-Antikörper in PBS mit 1 % Normalserum (4 °C)
- 1 x mit PBS spülen
- 3 x 5 min waschen in PBS
- 60 min Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper in PBS (z.B. Goat-Anti-Mouse-Cy3 1:200)
- 1 x mit PBS spülen
- 3 x 5 min waschen in PBS
- eindeckeln mit ProLong<sup>®</sup> Gold/DAPI Eindeckmedium

### **Immunfluoreszenz Human Nuclei-Antikörper (HuNu-Antikörper)**

- 5 min waschen in PBS
- 10 min fixieren mit Aceton/EtOH 1:1 (-20 °C)
- 15 min trocknen

- Schnitte mit Fettstift (DAKO-Pen) einkreisen um das Volumen der benötigten Antikörperlösung so gering wie möglich zu halten
- 15 min rehydrieren in PBS
- 10 min blocken und permeabilisieren mit 1 % normalem Ziegen Serum (*normal goat serum*, NGS) in TBST
- über Nacht Inkubation mit HuNu-Antikörper 1:200 in PBS mit 1 % NGS (4 °C)
- 2 min waschen in TBST
- 3 x 5 min waschen in PBS
- 60 min Inkubation mit Cy3-Anti-Maus-Antikörper 1:100 in PBS
- 2 min waschen in TBST
- 3 x 5 min waschen in PBS
- eindeckeln mit ProLong<sup>®</sup> Gold/DAPI Eindeckmedium

### **Immunfluoreszenz CD133, extrazelluläre Färbung**

- 5 min waschen in PBS
- 5 min vorfixieren mit 0,2 % Paraformaldehyd (PFA)
- 15 min Inkubation mit CD133/1-Antikörper 1:50 in PBS mit 5 % NGS
- 3 x 5 min waschen in PBS
- 20 min fixieren mit 4 % PFA
- 2 x 5 min waschen in PBS
- 30 min Inkubation mit Cy3-Ziege-Anti-Maus-Antikörper 1:100 in PBS
- 3 x 5 min waschen in PBS
- eindeckeln mit ProLong<sup>®</sup> Gold/DAPI Eindeckmedium

### Immunfluoreszenz CD133, intrazelluläre Färbung

- 5 min waschen in PBS
- 20 min fixieren mit 4 % PFA
- 30 min permeabilisieren mit 0,1 % Triton-X in PBS
- 30 min Inkubation mit CD133/1-Antikörper 1:50 in PBS mit 5 % NGS
- 2x 5 min waschen in PBS
- 30 min Inkubation mit Cy3-Ziege-Anti-Maus-Antikörper 1:100 in PBS
- 3x 5 min waschen in PBS
- eindeckeln mit ProLong<sup>®</sup> Gold/DAPI Eindeckmedium

### Durchflusszytometrie und Immunmarkierungen

Trypsinisierte Zellen wurden zunächst abzentrifugiert, dann in PBS resuspendiert und wieder bei 1700 rpm 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurden die pelletierten Zellen in der gewünschten Menge Isoton-Puffer (Beckman Coulter) mit 10 % Eserserum resuspendiert und mindestens 10 min vorinkubiert. Für die Immunfärbung wurden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte (FITC - Fluoreszeinisothiocyanat oder PE - Phycoerythrin, direkte Färbung) oder unmarkierte Primärantikörper (indirekte Färbung) verwendet. Dafür wurden jeweils 50  $\mu$ l Zellsuspension in 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen (BD Biosciences) überführt und mit dem entsprechenden Volumen Antikörperlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen mit Isoton-Puffer aufgefüllt und für 7 min bei 1700 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen bei der Färbung mit konjugierten Primärantikörpern an einem EPICS-XL-MCL (Beckman-Coulter, Krefeld) oder FACS-Calibur (BD Biosciences) Durchflusszytometer analysiert. Bei der Verwendung unkonjugierter Primärantikörper wurde der gebundene Antikörper nach dem Waschschrift durch 15 min Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (FITC- oder PE-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Ig Antikörper) detektiert. Für alle Färbungen dienten entsprechend konjugierte bzw. unkonjugierte Isotypkontrollen als Kontrollen.

Für die Auswertung wurde entweder der Anteil der positiven Zellen in der Dot-Plot-Grafik abgelesen oder die mittlere Fluoreszenzintensität durch das Fällen eines Lots

im Histogramm bestimmt und als negativ (Fluoreszenzintensität  $<1$ ; „-“), mittelstark (Fluoreszenzintensität  $>1, <10$ ; „+“) oder stark (Fluoreszenzintensität  $>10$ ; „++“) eingeordnet (siehe Abbildung 5). Zusätzlich wurde die Form des Fluoreszenz-Peaks im Histogramm bewertet. Zwei Maxima wurden dabei auf die Existenz einer Subpopulation (SP) zurückgeführt und eine besonders breite Verteilung als heterogen (H) bezeichnet.

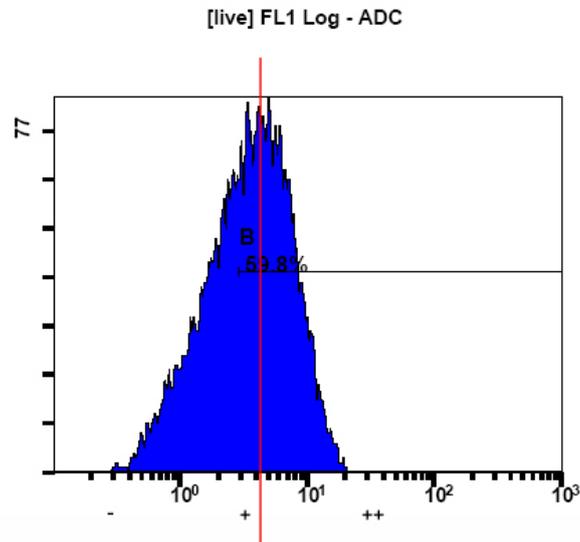


Abb. 5: Beispiel für die Auswertung eines Fluoreszenz-Histogramms. Das Lot ist in rot markiert und schneidet die Abzisse des Histogramms zwischen  $10^0$  (1) und  $10^1$  (10), somit ist die Fluoreszenzintensität als mittelstark („+“) zu bewerten.

### Subklonierung der Gliomzelllinien

Um eine höhere Homogenität der Zelllinien zu erzielen, wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers eine Subklonierung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 473HD-Primärantikörpern und Cy2-konjugierten Ziege-Anti-Ratte Sekundärantikörpern wie oben beschrieben gefärbt. Am Durchflusszytometer wurde dann von jeder Zelllinie jeweils eine 96-well Platte 473HD+ Zellen und 473HD- Zellen mit einer Dichte von einer Zelle pro well abgelegt. Die Platten wurden wie oben beschrieben kultiviert und sobald ein Klon in einem well konfluent gewachsen war, wurden die Zellen zunächst in eine 6-well Platte und dann in eine 250 ml-Zellkulturflasche überführt. Die Klone wurden dann erneut mit 473HD-Antikörpern gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Klone mit der größten Homogenität und dem schnellsten Wachstum wurden daraufhin für die lentivirale Transfektion ausgewählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression und funktionelle Analyse des potentiellen Tumorstammzellmarkers CD133/Prominin-1 in Gliomen

Im Folgenden bezeichnet *PROM1* das Gen, das für das Protein CD133 kodiert. Bei AC133 handelt es sich um ein Epitop von CD133, dass durch eine bestimmte Glykosylierung entsteht und vornehmlich in unreifen Geweben exprimiert wird. Dieses Epitop wird von dem CD133/1-Antikörper (Klon AC133) detektiert.

#### 3.1.1 *PROM1*-Expression in primären Gliomen

##### Untersuchung der *PROM1*/CD133 mRNA-Expression mittels Realtime Reverser Transkriptase-PCR

In einer Serie von 95 astrozytären Tumoren (9 Astrozytome WHO-Grad II, 16 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 70 Glioblastome WHO-Grad IV) wurde mittels Realtime RT-PCR die mRNA-Expression von *PROM1* in den Tumoren im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe untersucht. Als Kalibrator-Probe diente *Human Universal RNA* (Stratagene), deren Expression gleich 1 gesetzt wurde. In nicht-neoplastischem adultem Hirngewebe lag die relative Expression von *PROM1* mRNA bei 0,5 und in humanem fetalem Hirngewebe bei 6,0. Eine signifikant erhöhte Expression von *PROM1* konnte in Glioblastomen (Mittelwert:  $5,8 \pm 10,5$ ) im Vergleich zu diffusen Astrozytomen WHO-Grad II (Mittelwert:  $1,5 \pm 1,5$ ) nachgewiesen werden (Student's T-Test, p-Wert < 0,05; Abbildung 6). Dagegen zeigten anaplastische Astrozytome WHO-Grad III keinen signifikanten Unterschied in der Expression von *PROM1* im Vergleich zu Glioblastomen oder diffusen Astrozytomen. Interessanterweise zeigte die Untersuchung der Gliomzelllinien T98G, U118MG und U138MG keine *PROM1*-Expression.

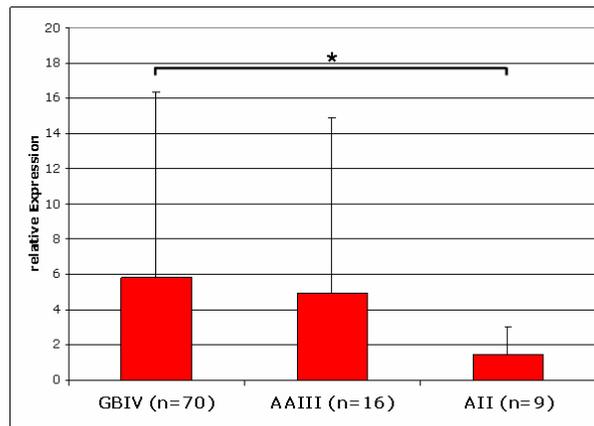


Abb. 6: Relative *PROM1* mRNA-Expression bezogen auf Human Universal RNA. GBIV: Glioblastome WHO-Grad IV, AAIII: anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, AII: Astrozytome WHO-Grad II. \* :  $p < 0,05$  (Student's T-Test)

### Untersuchung der CD133-Proteinexpression in Gliomen mittels Immunfluoreszenz (IF)

Exemplarisch wurden drei Tumoren, deren *PROM1* mRNA-Expression vorher bestimmt worden war, in der Immunfluoreszenz mit CD133/1-Antikörpern gegen das AC133 Epitop näher charakterisiert. Untersucht wurden ein Glioblastom WHO-Grad IV mit erhöhter *PROM1*-Expression (relative Expression = 6,8), ein Astrozytom WHO-Grad II mit erhöhter *PROM1*-Expression (relative Expression = 13,4) und ein anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III mit geringer *PROM1*-Expression (relative Expression = 0,4). Die Immunfluoreszenzfärbung an den Gefrierschnitten des Glioblastoms zeigte eine regional heterogene Immunfluoreszenz von Tumorzellen (Abbildung 7). Dabei gab es größere Cluster positiver Zellen und Areale, die keine Reaktivität zeigten. In den Gefrierschnitten des WHO-Grad II-Astrozytoms sowie des anaplastischen Oligoastrozytoms konnte dagegen kein AC133-Epitop detektiert werden. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung dienten mit CD133 transfizierte Gliomzellen, die entsprechend der Aufarbeitung des humanen Tumormaterials, in TissueTek<sup>®</sup> O.C.T. Compound eingebettet, in Isopentan über flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, und dann mit einem Kryostaten geschnitten wurden.

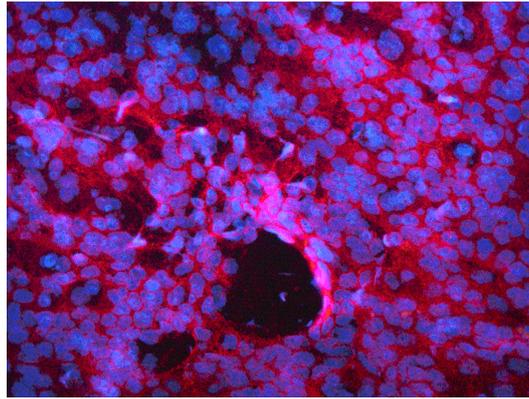


Abb. 7: Nachweis der CD133 Protein-Expression mittels Immunfluoreszenz in einem Glioblastom mit erhöhter *PROM1* mRNA-Expression. Gezeigt ist ein Cluster positiver Zellen um ein Gefäß. Rot: CD133, blau: Zellkerne (DAPI).

### 3.1.2 Phänotypische Charakterisierung etablierter Gliomzelllinien

#### Erstellung eines Expressionsprofils mittels Durchflusszytometrie

Zur genaueren Charakterisierung von 8 etablierten humanen Gliomzelllinien wurde ein Expressionsprofil verschiedener Oberflächenmarker von diesen Zelllinien erstellt. Das Ziel dabei war, zum einen unterschiedliche Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Zelllinien aufzudecken und zum anderen, vor allem im Hinblick auf die Tumorstammzell-Hypothese, die Expression von Stammzell-assoziierten Oberflächenantigenen in den Gliomzelllinien zu untersuchen. Insgesamt wiesen alle Zelllinien ein ähnliches Expressionsprofil auf, wobei, wie bereits in der Realtime RT-PCR gezeigt wurde, keine der Zelllinien CD133 exprimierte (Tabelle 10).

#### Neurosphären-Assay

**Kultivierung von Gliomzelllinien in Neurosphärenmedium** Die humanen Gliomzelllinien A172, CCF-STTG1, Hs683, TP365MG, T98G, U87MG, U118MG und U138MG, sowie die in Fischer-Ratten generierte Zelllinie F98, wurden auf die Fähigkeit zur Bildung sogenannter Neurosphären hin untersucht. Sieben von neun der oben genannten Zelllinien bildeten neurosphärenartige Zellcluster bei Kultivierung in Neurosphärenmedium, das aus serumfreiem DMEM mit den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF sowie Heparin bestand. Nach Zugabe von serumhaltigem Medium wuchsen alle Zellen wieder adhärent und dissoziierte Cluster bildeten sich nicht neu. Nur die Zelllinien CCF-STTG1 und

Tab. 10: Expressionsprofile verschiedener Gliomzelllinien

	U118MG	U87MG	U138MG	TP365MG	CCF-STTG1	Hs683	A172	T98G
HLA-ABC	+ H	++	++ H	++	++	++	++	++
CD10	+ H	+	++ H	++	+ H	+	++ H	+
CD29	+	+	++	++	+	++	++	+
CD49f	+	-	+	++	+ SP	+	++	+
CD44	++	++	++	++	++	++	++ SP	++
CD54	- H	-	+ H	+	+ SP	++	-	+
CD47	+	+	+	+	+	+	+	+
CD45	-	-	-	-	-	-	-	-
CD49b	+	+	+	+	+	++	+	+
CD56	-	- H	+ H	+	+ SP	+	+	-
CD49e	+	-	+	+	+	+	+	+
CD58	+	+	+	+	+	+	++	+
CD59	++	+	++	++	++	++	++	++
CD73	+	+	+	++	+ SP	++	++	-
CD63	+	+	+	+	+	+	+	+
CD95	+	+	+	+	+	+	+	+
CD71	+	+	+	+	+ H	+	-	+
CD109	++	+	++	++	++	+	+	++
CD90w	+ H	-	+ H	-	- H	-	+	+
CD133/1	-	-	-	-	-	-	-	-
CD164	-	-	+	+	-	-	+	+
CD166	-	+	+	++	+ SP	+	+	+
CD200	-	-	-	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-	-	-	-
GD2	+ SP	+ SP	+ SP	+ SP	+ SP	+ SP	-	+ SP
GD3	+ SP	-	-	-	-	-	-	-
O4	-	-	-	-	-	-	+ SP	-
EGFR	+	+	+	+	+	+	-	+
Neu	-	-	+	-	-	+	+	-
SSEA3	-	-	-	-	-	-	-	-
487/LeX	-	-	-	-	-	-	-	-
473HD	+	+ H	+ SP	+	+ SP	+ SP	+ SP	+ H

Zeichenerklärung: „-“: Fluoreszenzintensität <1; „+“: Fluoreszenzintensität >1 und < 10; „++“: Fluoreszenzintensität >10; „SP“: Subpopulation; „H“: heterogene Population

TP365MG bildeten keine Zellcluster, sondern blieben in Neurosphärenmedium adhärent und zeigten keine Veränderung in der Morphologie.

**Untersuchung der Neurosphären in der Durchflusszytometrie** Eine exemplarische FACS-Analyse von T98G-Neurosphären zeigte nur wenig offensichtliche Änderungen des Expressionsprofils im Vergleich zu adhärent wachsenden Zellen (Tabelle 11). CD10 wurde nur von den adhärent wachsenden Zellen T98G in normalem Kulturmedium (Kontrolle, T98G K) und T98G Neurosphären nach Zugabe von Serum (T98G NS Ser) exprimiert, während die T98G Neurosphären (T98G NS) und dissoziierten Neurosphären (T98G NS diss) keine Expression zeigten. Für HLA-ABC und CD49f zeigten T98G NS diss eine stärkere Heterogenität als die übrigen Zellen. CD56 und CD49e wurden nur in T98G NS diss exprimiert, bei CD58 war die Expression in T98G NS diss verstärkt im Vergleich zu den übrigen Zellen. Bei CD56, CD95 und CD166 konnte in T98G NS diss eine Subpopulation positiver Zellen identifiziert werden. CD59 und CD63 wurden in T98G NS Ser schwächer bzw. gar nicht exprimiert, während CD90w in T98G NS Ser stärker exprimiert wurde als in den anderen Zellen. CD73 und CD164 wurden nur in T98G NS exprimiert, wobei die Zellen für CD73 heterogen waren. CD71 wurde nur von T98G K nicht exprimiert. Insgesamt lässt sich kein einheitliches Muster der unterschiedlichen Expression erkennen. Mit einer leichten Tendenz scheinen die dissoziierten Neurosphären eine heterogenere Population darzustellen, was durch das Auftreten von Subpopulationen und heterogenen Expressionsmustern gekennzeichnet war.

**Charakterisierung der Neurosphären mittels Immunfluoreszenz** Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gefrierschnitten von Neurosphären zeigten eine starke GFAP- und Nestin-Expression in F98-Neurosphären nicht jedoch in T98G-Neurosphären. In serumhaltigem Zellkulturmedium ohne Wachstumsfaktoren, zeigten F98-Zellen ebenfalls eine Expression von Nestin und GFAP (Abbildungen 8 und 9). Die Färbungen von T98G Neurosphären mit Antikörpern gegen GFAP, NeuN, Olig2, NF, Nestin, MAP-2,  $\beta$ III-Tubulin zeigten keine Expression der entsprechenden Differenzierungsmarker.

**Charakterisierung von in Neurosphärenmedium adhärent wachsenden Zellen** Nach längerer Kultivierung in Neurosphärenmedium wurden alle Zellen teilweise wieder adhärent. Eine exemplarische Färbung von wieder adhärent gewordenen F98-Zellen mit den Stammzell- und Differenzierungsmarkern GFAP, NeuN, Olig2, NF, Nestin, MAP-2,  $\beta$ III-Tubulin zeigte jedoch keinen Unterschied in der Expression dieser Marker im Vergleich zu den normal kultivierten Kontrollzellen.

Tab. 11: Einfluss der Kultivierung von T98G-Zellen in Neurosphärenmedium auf das Expressionsprofil

	T98G K	T98G NS Ser	T98G NS	T98G NS diss
HLA-ABC	++	++	++	++ H
CD10	+	+	-	-
CD29	+	+	+	+
CD49f	+	+	+	+ H
CD44	++	++	++	++
CD54	-	-	-	-
CD47	+	+	+	+
CD45	-	-	-	-
CD49b	+	+	+	+
CD56	-	-	-	+ SP
CD49e	-	-	-	+
CD58	+	+	+	++
CD59	++	+	++	++
CD73	-	-	+ H	-
CD63	+	-	+	+
CD95	+	+	+	+ SP
CD71	-	+	+	+
CD109	+	+	+	+
CD90w	- H	+	-	-
CD133/1	-	-	-	-
CD164	-	-	+	-
CD166	+	+	+	+ SP
CD200	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-

Zeichenerklärung: „-“: Fluoreszenzintensität  $< 1$ ; „+“: Fluoreszenzintensität  $> 1$  und  $< 10$ ; „++“: Fluoreszenzintensität  $> 10$ ; „SP“: Subpopulation; „H“: heterogene Population; K: Kontrolle unter normalen Kulturbedingungen; NS: Neurosphären; NS ser: Neurosphären nach Zugabe von serumhaltigem Medium; NS diss: Neurosphären nach Dissoziation

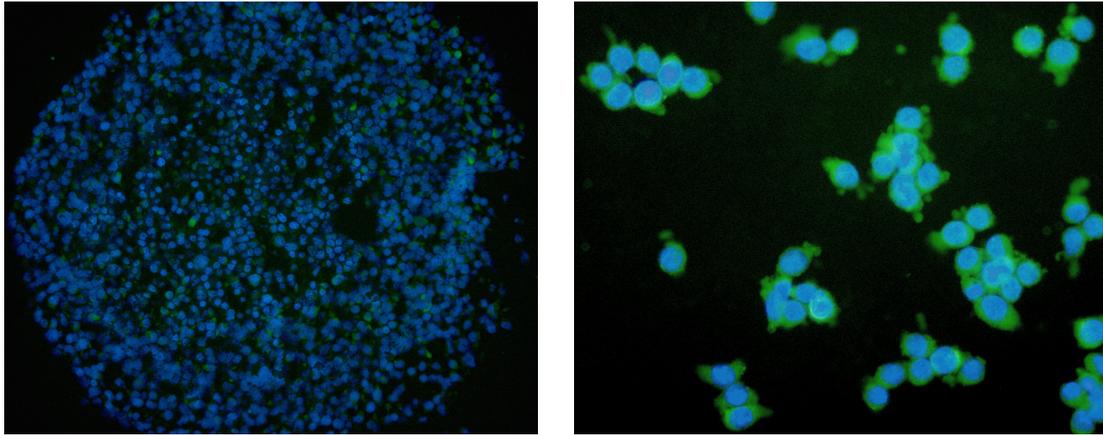


Abb. 8: GFAP Immunfluoreszenz an geschnittenen F98-Neurosphären (links) und an F98-Zellen in der Monolayer-Kultur (rechts). Grün: GFAP, blau: Zellkerne (DAPI).

### 3.1.3 Überexpression von CD133 in Gliomzellen

Zur Untersuchung des Effekts einer Überexpression von CD133 in CD133-negativen Gliomzellen wurden diese jeweils mit zwei verschiedenen CD133-Konstrukten (CD133GFP-Fusionsprotein und CD133IRESGFP-Konstrukt) bzw. mit einem GFP-Kontroll-Vektor lentiviral transfiziert. Hierfür wurde der Vektor pCL1 verwendet (Abbildung 10).

Die vorhandene IRES-Sequenz („*Internal Ribosome Entry Site*“) führt dazu, dass CD133 gleichzeitig mit GFP in der Zelle exprimiert wird, jedoch im Unterschied zu dem Fusionsprotein CD133GFP beide Proteine getrennt vorliegen. Als weitere Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Zur Erhöhung der Homogenität der Ausgangspopulation wurden die Zellen vor der Transfektion mit Hilfe eines Durchflusszytometers mit einer Dichte von einer Zelle pro Vertiefung in 96-well Zellkulturplatten abgelegt und die so generierten Klone wieder expandiert. Dabei wurden die Zellen zuvor mit 473HD-Antikörpern gefärbt und 473HD-positive und -negative Klone abgelegt. Das Chondroitinsulfat-Epitop 473HD ist ein Marker für neurale Stammzellen, das in allen Zelllinien zumindest in einer Subpopulation exprimiert wurde. Nach der Expandierung war jedoch kein Unterschied in der 473HD-Expression ursprünglich 473HD-positiver Klone im Vergleich zu ursprünglich 473HD-negativen Klonen festzustellen. In beiden Fällen wurde 473HD wie auch in der ursprünglichen Zellpopulation von einer Subpopulation der Zellen exprimiert. Auch konnten in beiden Fällen etwa gleich viele Klone von jeder Zelllinie generiert werden, sodass bei den weiteren Experimenten die Expression von 473HD nicht mehr berücksichtigt wurde. Dann wurden zwei Klone der Zelllinie

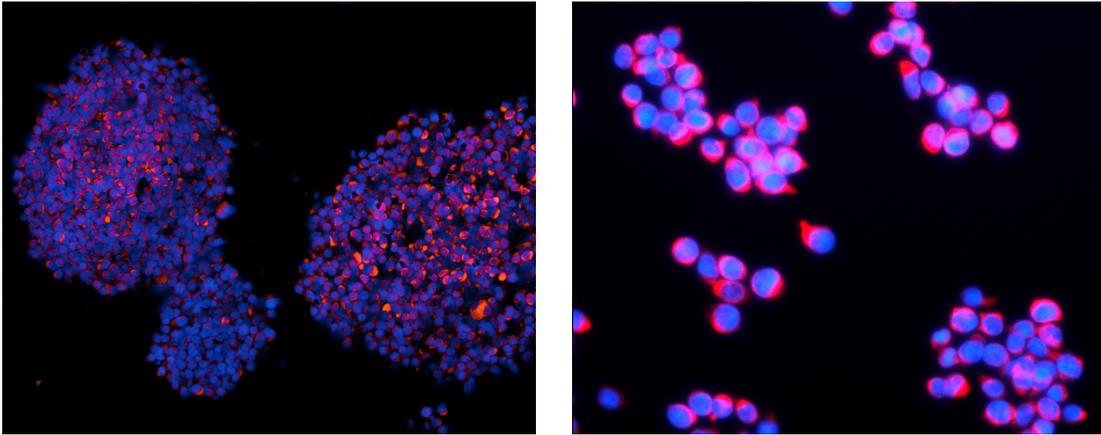


Abb. 9: Nestin Immunfluoreszenz an geschnittenen F98-Neurosphären (links) und an F98-Zellen in der Monolayer-Kultur (rechts). Rot: Nestin, blau: Zellkerne (DAPI).

T98G (T98G-B6 und T98G-C3) und je ein Klon der Zelllinien U138MG und U118MG (U138MG-C8 und U118MG-G2) jeweils mit einem der beiden CD133-Konstrukte bzw. dem GFP-Kontrollvektor transfiziert. Diese Zellen wurden dann in den im folgenden beschriebenen Experimenten näher charakterisiert (Tabelle 12).

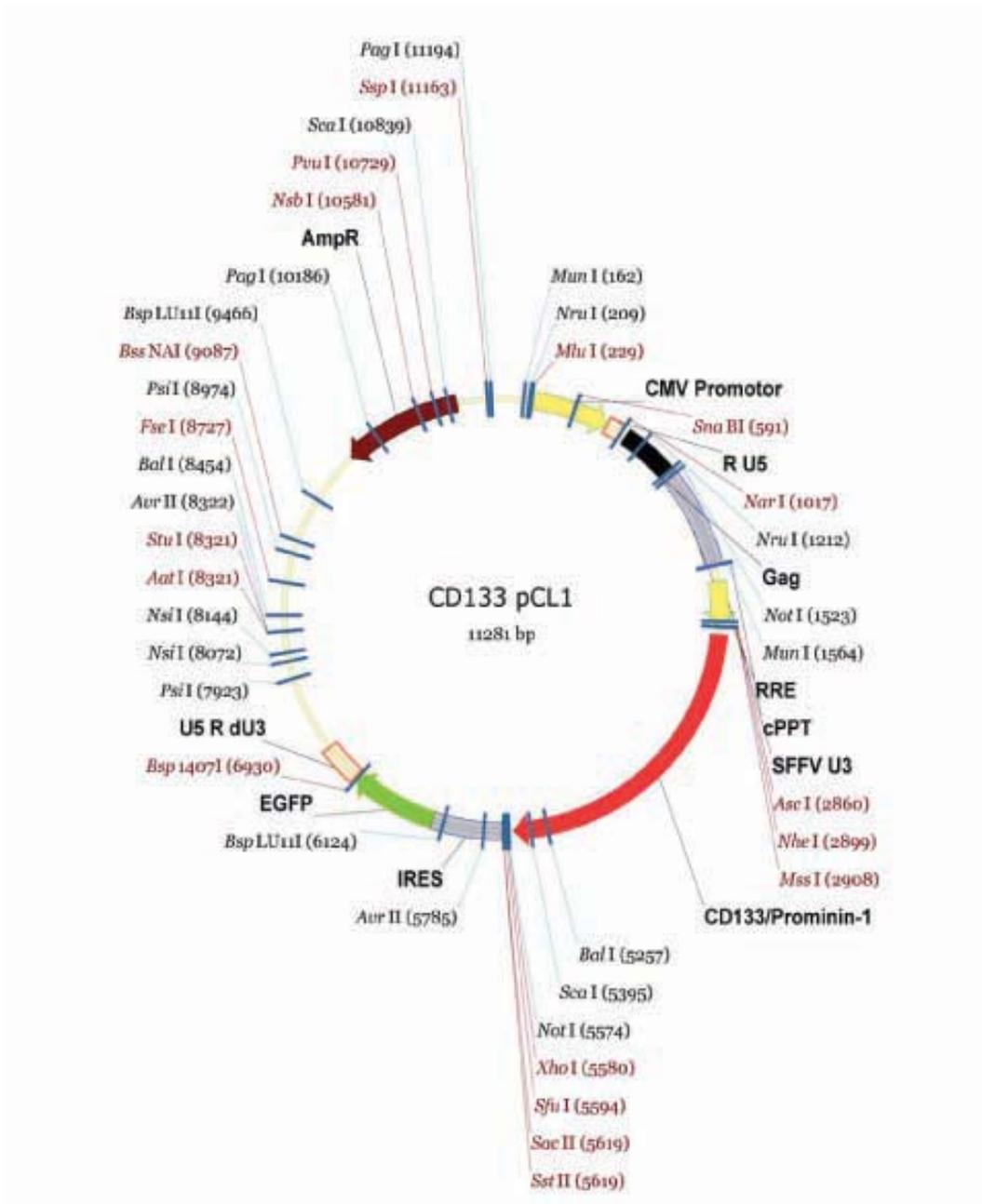


Abb. 10: Vektorkarte des verwendeten pCL1-Plasmids am Beispiel des CD133IRESGFP Konstruktes. Das eGFP-Konstrukt enthält weder die IRES-Site noch die CD133 Sequenz, während bei dem Fusionsprotein eGFP und CD133 direkt nacheinander lokalisiert sind. Diese Vektorkarte wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. biol. Gregor von Levetzow zur Verfügung gestellt.

Tab. 12: Übersicht über die untersuchten transfizierten Gliomzelllinien und Kontrollen

Zelllinie	Klon	Konstrukt
T98G	B6	CTRL
		GFP
		CD133GFP
	C3	CD133IRESGFP
		CTRL
		GFP
U118MG	G2	CD133GFP
		CD133IRESGFP
		CTRL
		GFP
U138MG	C8	CD133GFP
		CD133IRESGFP
		CTRL
		GFP

CTRL: untransfizierte Kontrolle

### Bestätigung der *PROM1*-Expression in transfizierten Gliomzellen mittels Realtime RT-PCR

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die *PROM1*-Expression in den transfizierten Gliomzelllinien mittels Realtime RT-PCR untersucht. Alle *PROM1* transfizierten Zelllinien zeigten eine erhöhte *PROM1* mRNA-Expression, während die mit GFP transfizierten bzw. die untransfizierten Zellen ein Expressionslevel an der Detektionsschwelle aufwiesen (Abbildung 11).

### Bestätigung der CD133-Überexpression in transfizierten Gliomzelllinien mittels Immunfluoreszenz

Die Expression von CD133 in den mit CD133 transfizierten Gliomzelllinien konnte in der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden. Die Färbung leicht fixierter (d. h. 5 Minuten Inkubation mit 0,2%iger Paraformaldehyd-Lösung) Zellen zeigte die physiologisch richtige Lokalisation des Proteins in der Zellmembran (Abbildung 12). Durch ein längere und stärkere Fixierung (20 Minuten Inkubation mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung) und zusätzliche Permeabilisierung mit Triton-X wurde dieses Signal zerstört und es wurden vesikuläre Strukturen im Zellinneren markiert (Abbildung 12).

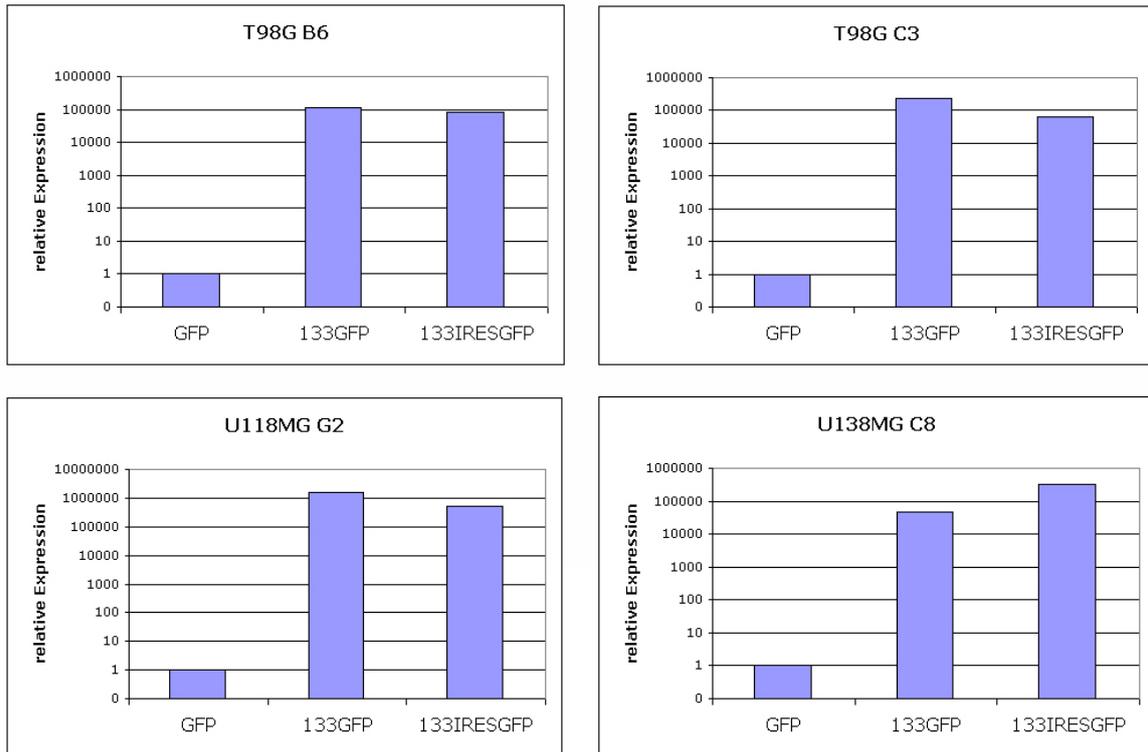


Abb. 11: *PROM1*-Expression in drei verschiedenen transfizierten Zelllinien.

### Bestätigung der CD133-Expression von transfizierten Gliomzelllinien in der Durchflusszytometrie

Nach der Transfektion mit CD133 wurden die Zelllinien nach Färbung mit einem PE-konjugierten CD133-Antikörper in einem Durchflusszytometer sortiert. Dabei wurden die stark rot gefärbten (CD133GFP und CD133IRESGFP) bzw. grün fluoreszierenden (GFP) Zellen isoliert und somit der Anteil der transfizierten Zellen in der Gesamtpopulation erhöht. Nach dem Sortieren wurden alle transfizierten Zelllinien wieder expandiert, erneut mit dem PE-konjugierten CD133-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 13). In den Klonen T98G-B6/CD133IRESGFP und U138MG-C8/CD133GFP-Fusionsprotein wurde ein Anteil von 70 % bzw. 80 % CD133-positiver Zellen ermittelt, während die restlichen Transfektanten der Klone T98G-C3, T98G-B6 und U138MG-C8 einen Anteil von mindestens 90 % CD133- bzw. GFP-positiver Zellen zeigten. Bei dem Klon U118MG-G2 konnten die GFP-transfizierten Kontrollzellen nicht über 10 % angereichert werden, wobei das CD133GFP-Fusionsprotein und das

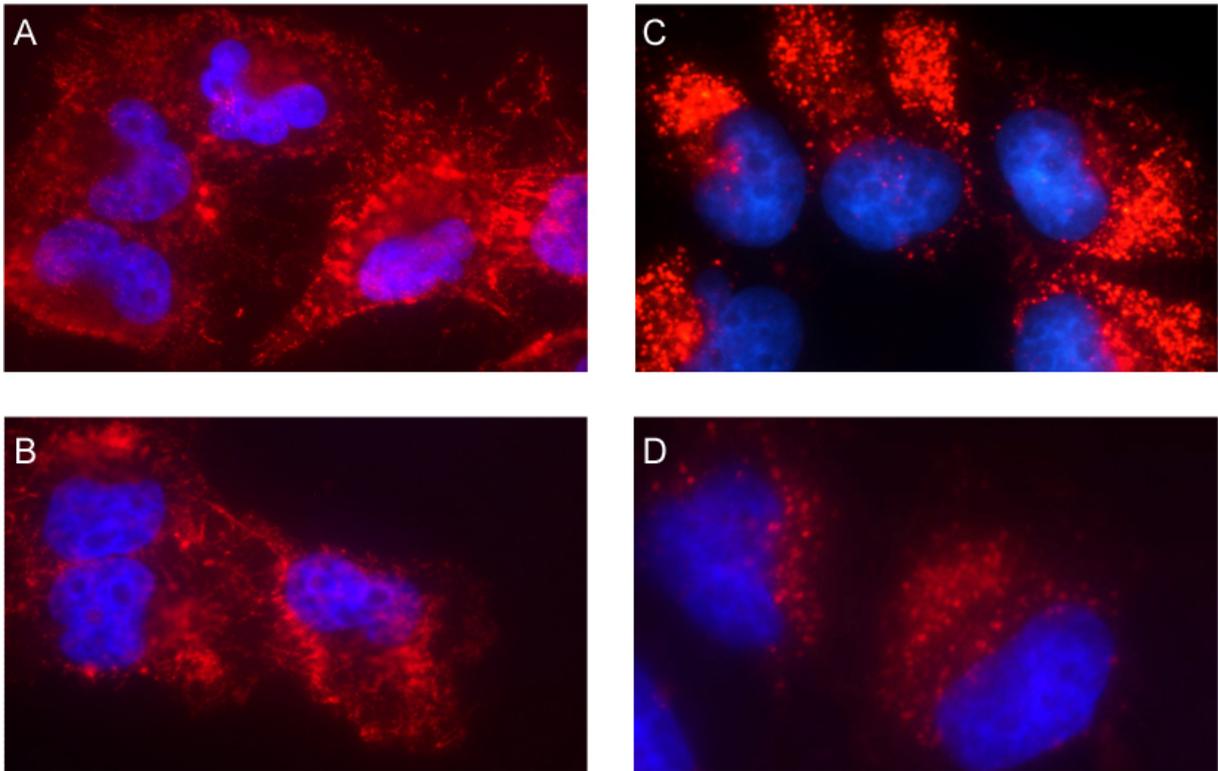


Abb. 12: CD133 Protein-Expression in CD133IRESGFP-transfizierten T98G-C3 Zellen. A, B: Nach leichter Fixierung mit 0,2 % PFA ist die CD133-Immunfluoreszenz überwiegend an der Zellmembran lokalisiert. C, D: Nach stärkerer Fixierung mit 4 % PFA und Permeabilisierung mit Triton-X werden vesikuläre Strukturen im Zellinneren angefärbt, während die Färbung der Zellmembran nur noch sehr schwach erkennbar ist. Rot: CD133, blau: Zellkerne (DAPI).

CD133IRESGFP-Konstrukt von mindestens 90 % der Zellen exprimiert wurde (Abbildung 13).

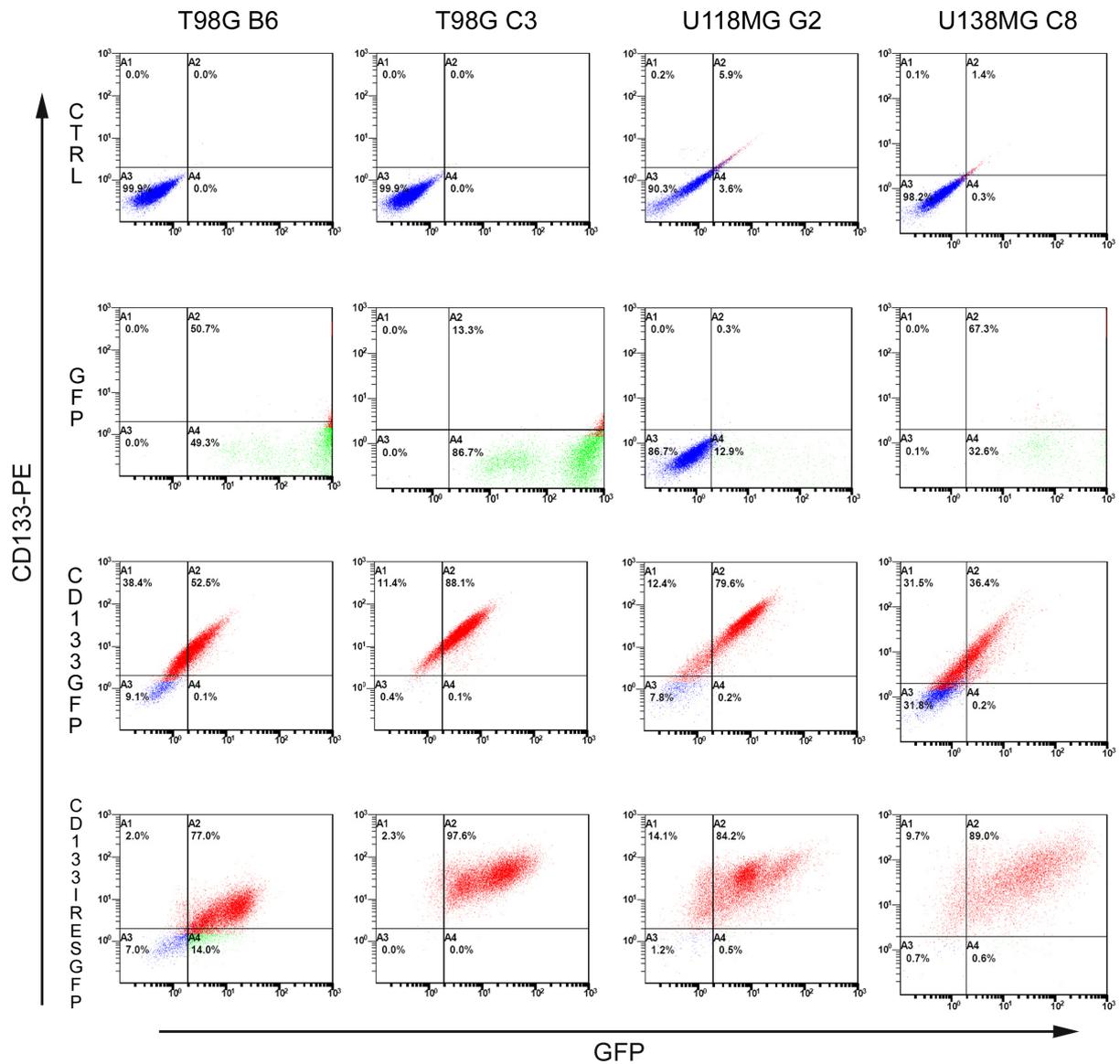


Abb. 13: CD133-Expression nach Färbung mit einem PE-konjugierten Antikörper in der Durchflusszytometrie. Dargestellt ist auf der Abzisse die GFP-Fluoreszenzintensität im Grün-Kanal und auf der Ordinate die PE-Fluoreszenzintensität im Rot-Kanal.

### 3.1.4 Funktionelle Charakterisierung von CD133-transfizierten Gliomzelllinien

#### Zellbiologische Tests

Für die Untersuchung des Einflusses der CD133-Überexpression auf die Zellbiologie wurden jeweils mit GFP transfizierte Kontrollen (=“GFP“), sowie mit CD133-GFP-Fusionsprotein (=“CD133GFP“) und CD133IRESGFP-Konstrukt (=“CD133IRES“) transfizierte Zellen von den vier ausgewählten Zellklonen T98G-B6, T98G-C3, U118MG-G2 und U138MG-C8 in verschiedenen Experimenten untersucht. Die zellbiologischen Untersuchungen zeigten teilweise signifikante Unterschiede zwischen CD133-transfizierten und GFP-transfizierten Zellen, es gab jedoch keinen Effekt, der sich in allen Zelllinien bestätigen ließ.

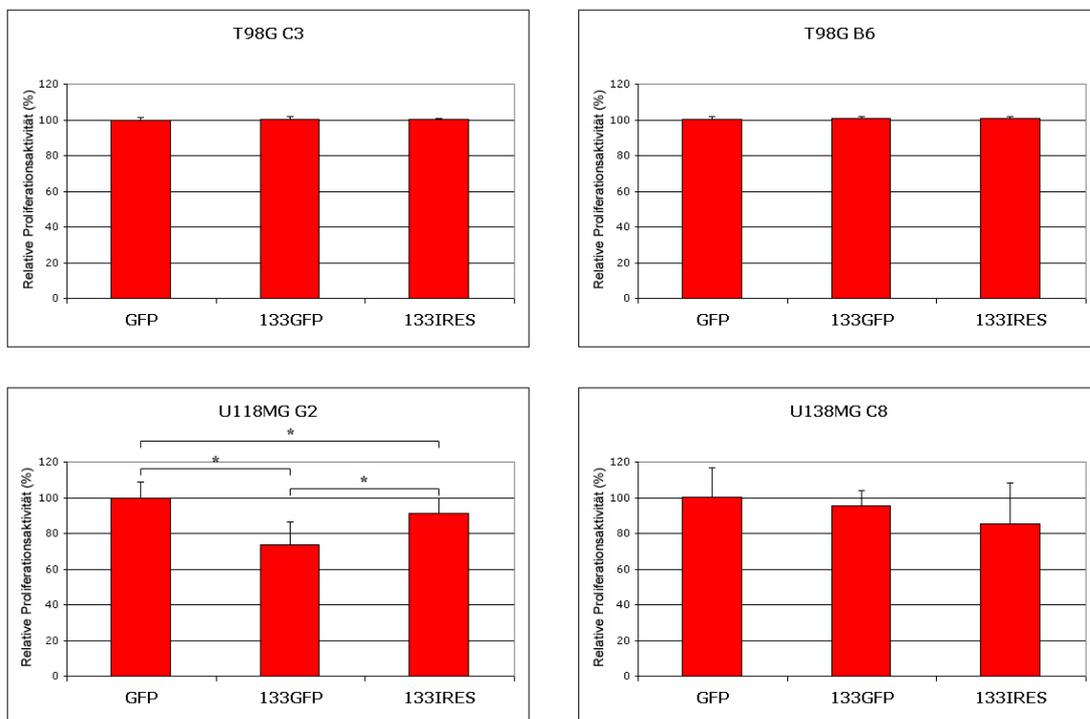


Abb. 14: Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der Proliferationsrate anhand des Einbaus von BrdU. GFP = mit GFP transfizierte Zellen, 133GFP = mit CD133-GFP-Fusionsprotein transfizierte Zellen, 133IRES = mit CD133IRESGFP-Konstrukt transfizierte Zellen. \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test).

**Untersuchung der Proliferation** Die Proliferationsrate der CD133-transfizierten Zellen und der Kontrollzellen wurde anhand der Inkorporation des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) bei der DNA-Neusynthese bestimmt. Die beiden T98G-Klone B6 und C3 sowie der Klon U138MG-C8 zeigten keinen Unterschied in der Proliferation zwischen CD133-positiven und CD133-negativen Zellen. Der Klon U118MG-G2 zeigte nach Transfektion mit der GFP-Kontrolle eine signifikant erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den CD133GFP-Transfektanten ( $p = 0,0022$ ; Student's T-Test). Überraschenderweise zeigten auch die CD133IRESGFP-transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zu den CD133GFP-transfizierten Zellen ( $p = 0,0281$ ; Student's T-Test) (Abbildung 14).

**Untersuchung der Zellvitalität** Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte anhand der Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Für die Messung der mitochondrialen Aktivität wurden die Zellen mit dem Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) inkubiert und dann die Menge des gebildeten Formazans photometrisch bestimmt. Die beiden T98G-Klone B6 und C3 zeigten eine signifikant erniedrigte Vitalität in den CD133IRESGFP-Transfektanten bezogen auf die GFP-transfizierten Zellen (B6:  $p = 0,0253$ ; C3:  $p < 0,0001$ ; Student's T-Test) als auch auf die 133GFP-Transfektanten (B6:  $p = 0,0050$ ; C3:  $p < 0,0123$ ; Student's T-Test). Die CD133-Transfektanten von Klon U118MG-G2 zeigten keine signifikant veränderte Vitalität im Vergleich zur GFP-Kontrolle, während der Klon U138MG-C8 eine signifikant erniedrigte Vitalität der mit dem CD133GFP-Fusionsprotein transfizierten Zellen im Vergleich zu den restlichen zwei Transfektanten (vs. GFP:  $p = 0,0049$  ; vs. CD133IRES:  $p = 0,0314$ ; Student's T-Test) zeigte (Abbildung 15).

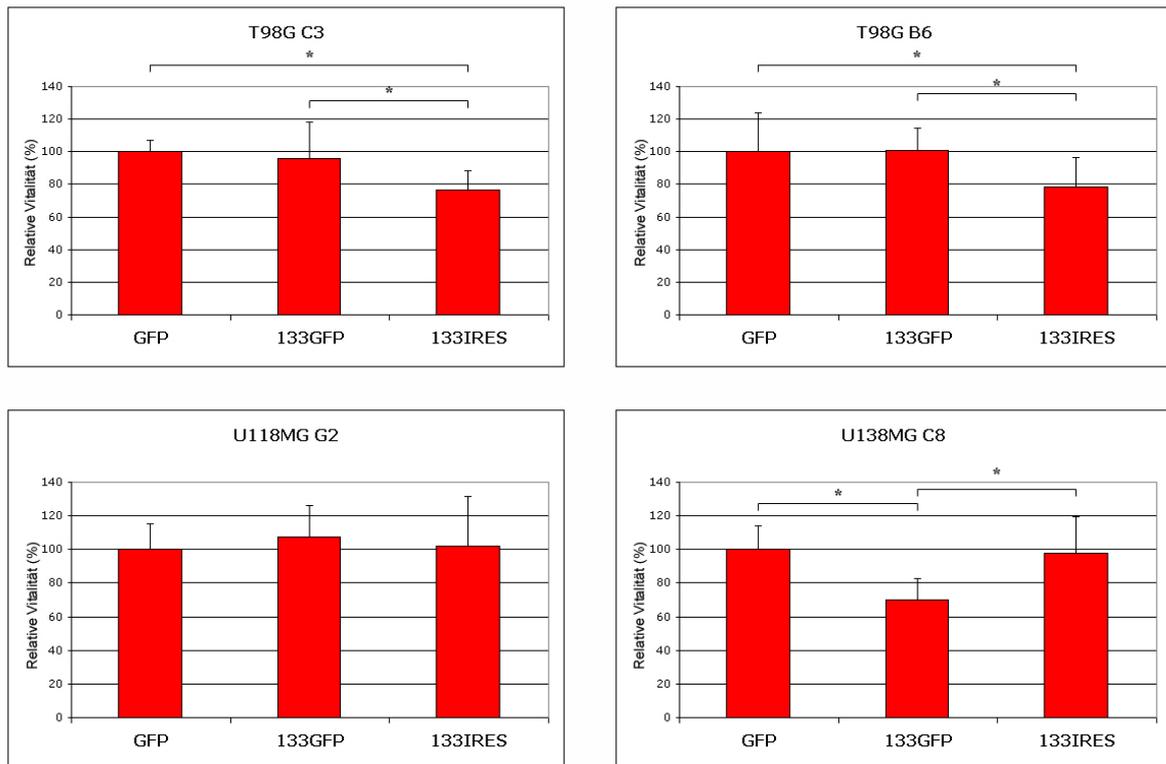


Abb. 15: Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der Zellvitalität anhand der Umsetzung von MTT zu Formazan. GFP = mit GFP transfizierte Zellen, 133GFP = mit CD133-GFP-Fusionsprotein transfizierte Zellen, 133IRES = mit CD133IRESGFP-Konstrukt transfizierte Zellen. \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test).

**Untersuchung der Apoptoseaktivität** Die Apoptoseaktivität wurde mit dem Apo-ONE<sup>®</sup> Homogenous Caspase-3/7 Assay bestimmt. Dabei wird die Aktivität der Caspasen 3 und 7 nach Spaltung eines enzymespezifischen nicht-fluoreszierenden Substrates in ein grün fluoreszierendes Produkt fluorometrisch bestimmt. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 ist ein Maß für die Apoptoserate einer Zellpopulation. Die Transfektanten des Klons T98G-B6 zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoseaktivität, während bei dem Klon T98G-C3 die CD133IRESGFP-transfizierte Zellen eine signifikant erhöhte Apoptoseaktivität bezogen auf GFP- ( $p < 0,0001$ ; Student's T-Test) und CD133GFP-Fusionsprotein- ( $p < 0,0001$ ; Student's T-Test) transfizierte Zellen zeigten und die Apoptoseaktivität der mit CD133GFP-Fusionsprotein transfizierten Zellen im Vergleich zu den GFP-Zellen ( $p = 0,0002$ ; Student's T-Test) erniedrigt war.

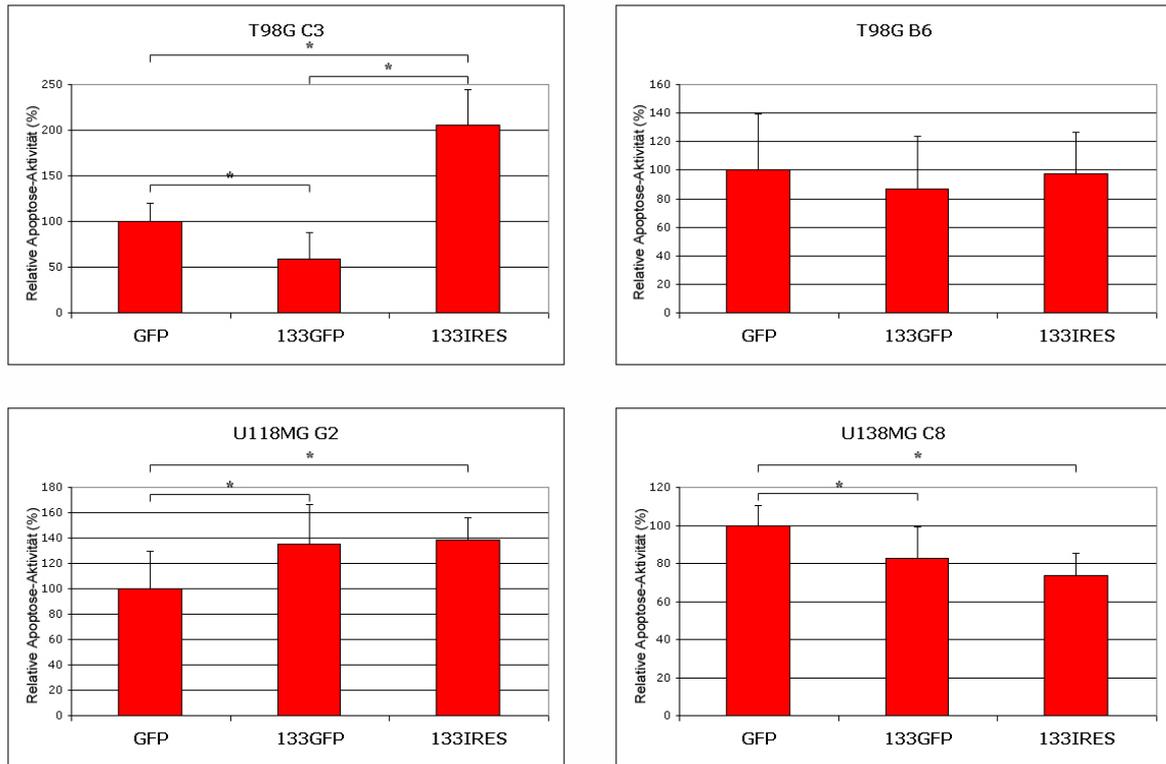


Abb. 16: Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der Apoptoseaktivität anhand der fluorometrischen Bestimmung der Caspase3/7-Aktivität. GFP = mit GFP transfizierte Zellen, 133GFP = mit CD133-GFP-Fusionsprotein transfizierte Zellen, 133IRES = mit CD133IRESGFP-Konstrukt transfizierte Zellen. \* =  $p < 0,05$ ; Student's T-Test

Bei dem Klon U118MG-G2 war die Apoptoseaktivität der CD133GFP-Fusionsprotein- und der mit CD133IRES-transfizierten Zellen bezogen auf die GFP-transfizierten Zellen (CD133GFP:  $p = 0,0283$ ; CD133IRES:  $p = 0,0043$ ; Student's T-Test) erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte der Klon U138MG-C8 eine erniedrigte Apoptoseaktivität in den beiden CD133-Transfektanten bezogen auf die GFP-Zellen (CD133GFP:  $p = 0,0044$ ; CD133IRES:  $p < 0,0001$ ; Student's T-Test) (Abbildung 16).

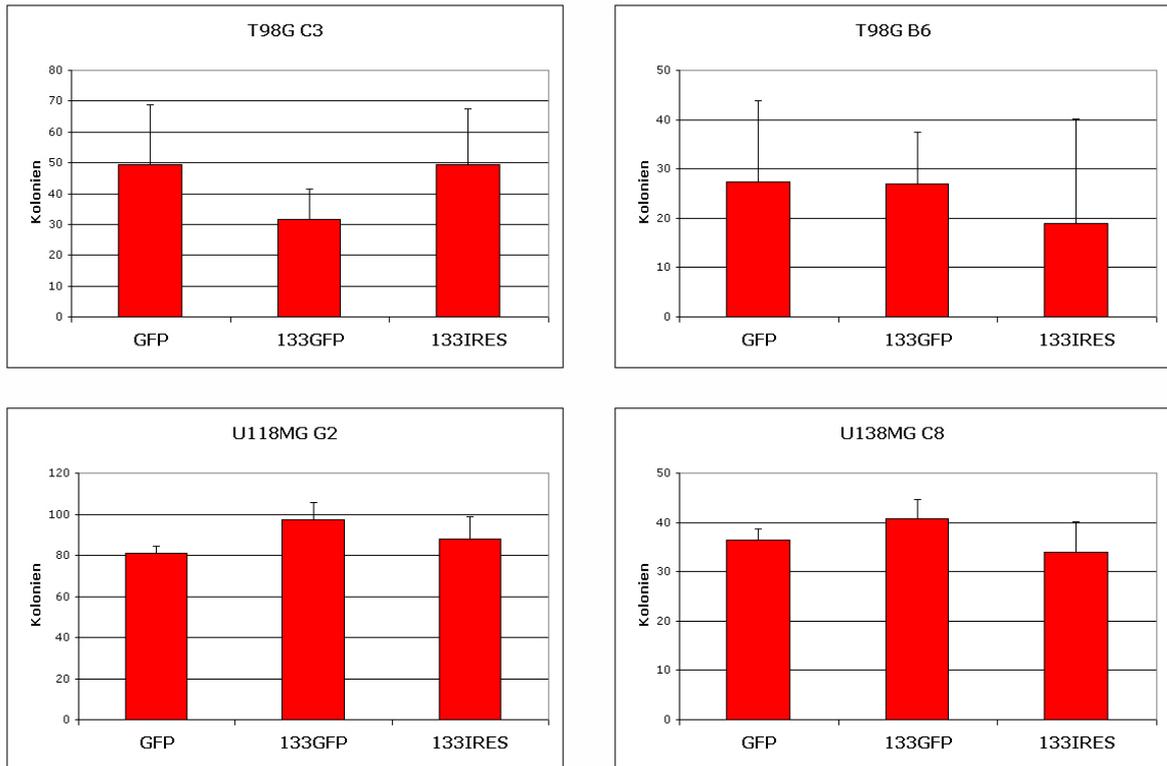


Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchung der Tumorigenität anhand der Bildung von Kolonien nach dreiwöchigem Wachstum in halbfestem Agar. GFP = mit GFP transfizierte Zellen, 133GFP = mit CD133-GFP-Fusionsprotein transfizierte Zellen, 133IRES = mit CD133IRESGFP-Konstrukt transfizierte Zellen.

**Untersuchung der Tumorigenität *in vitro*** Die Tumorigenität der Zellen wurde durch das Auszählen der nach zwei Wochen Inkubation gebildeten vitalen, d. h. mit MTT anfärbbaren Kolonien in einem Colony-forming-Assay bestimmt. Dabei zeigten alle vier untersuchten Klone T98G-B6, T98G-C3, U118MG-G2 und U138MG-C8 keine signifikanten Unterschiede zwischen CD133-transfizierten Zellen und GFP-Kontrollzellen (Abbildung 17).

**Untersuchung der Migration im Transwell-Versuch** Exemplarisch wurden die Migration der CD133IRESGFP- und GFP-transfizierten Zellen der Klone T98G-C3 und U138MG-C8 im Transwell-Assay untersucht, wobei DMEM mit 30 % FCS die Migration induzierte. Die Migrationsaktivität der GFP-transfizierten Zellen wurde dabei auf 1 festgelegt. Die Transfektanten des Klon T98G-C3 zeigten kein signifikant unterschiedliches Migrationsverhalten, während bei dem Klon U138MG-C8 die CD133IRES-transfizierten Zellen eine erniedrigte Migrationsaktivität im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen zeigten ( $p = 0,0018$ ; Student's T-Test)(Abbildung 18).

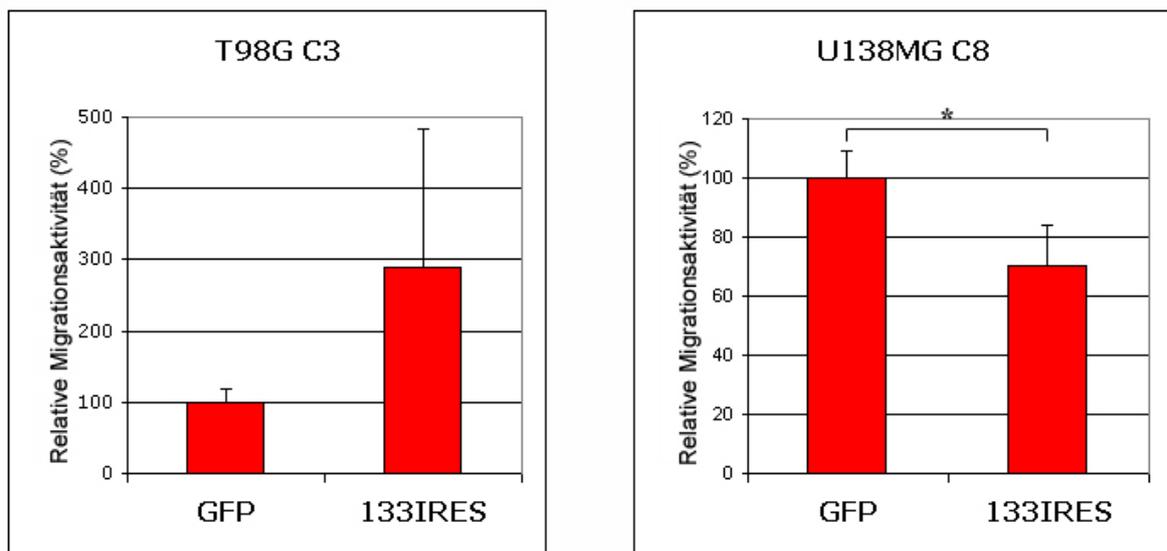


Abb. 18: Darstellung der Migration von CD133IRES-transfizierten Zellen im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen. Links: Klon T98G-C3; rechts: Klon U138MG-C8. \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test).

**Expressionsprofil einer transfizierten Zelllinie** Es wurde exemplarisch ein Expressionsprofil Stammzell-assoziiierter Oberflächenmarker an dem mit CD133 und GFP transfizierten Zellklon T98G-C3 erstellt. Die Expressionsprofile von transfizierten und untransfizierten bzw. GFP-transfizierten Zellen unterschieden sich nur in der Expression von CD133 (Tabelle 13).

Tab. 13: Expressionsprofil des Klons T98G-C3 vor und nach der Transfektion

	CTRL	GFP	133GFP	133IRES
CD10	+	+	+	+
CD29	++	++	++	++
CD44	++	++	++	++
CD49f	+	+	+	+
CD54	+	+	+	+
CD73	+	+	+	+
CD95	+	+	+	+
CD109	++	++	++	++
CD133/1	-	-	++	++
CD166	+	+	+	+

Zeichenerklärung: „-“: Fluoreszenzintensität < 1; „+“: Fluoreszenzintensität > 1 und < 10; „++“: Fluoreszenzintensität > 10; GFP = mit GFP transfizierte Zellen, 133GFP = mit CD133-GFP-Fusionsprotein transfizierte Zellen, 133IRES = mit CD133IRESGFP-Konstrukt transfizierte Zellen.

Tab. 14: Signifikant differentiell exprimierte Gene in CD133+ versus CD133- Gliomzellen

Gen-Symbol	Genbezeichnung	Accession No.	Log Fold Change	P-value
ALDH6A1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	NM 005589.2	0.8037	0.0147
MICAL3	microtubule associated monooxygenase, calponin	NM 015241	-0.7070	0.0308
CYP51P2	cytochrome P450, subfamily 51 pseudogene 2		0.7867	0.0328
ARG2	Arginase-2	NM 001172.3	0.8498	0.0416
PDE10A	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3	NM 006661.1	-0.4770	0.0461
MAGEL2	MAGE-like 2	NM 019066	-0.4808	0.0480

### 3.1.5 Mikroarray-basierte Expressionsanalyse transfizierter Gliomzelllinien

Mittels Oligonukleotid-Mikroarrays (Affymetrix, HG U133A-Chips) wurde ein Expressionsprofil von untransfizierten T98G-C3 (=“CTRL“) sowie den T98G-C3-Transfektanten (“GFP“, “CD133GFP“ und “CD133IRES“) erstellt. Nachfolgend wurde zur Bestätigung von Kandidatengenen aus dieser ersten Expressionsanalyse auch die RNA der mit GFP und CD133IRESGFP transfizierten Klone T98G-B6 und U138MG-C8 auf die Mikroarrays hybridisiert.

Um Gene zu ermitteln, die in allen drei untersuchten Klonen (T98G-C3, T98G-B6 und

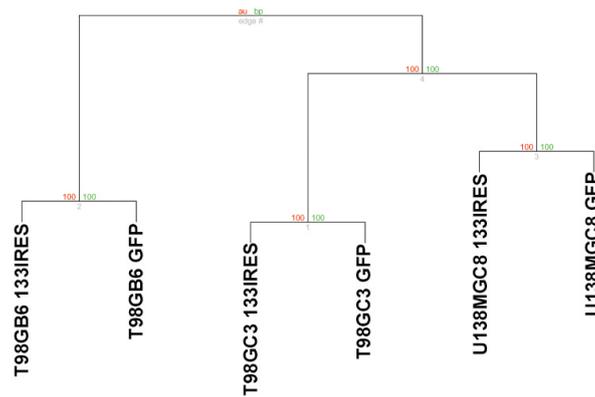


Abb. 19: Clusteranalyse der mit Hilfe von Mikroarrays ermittelten Expressionsdaten von GFP- und CD133IRESGFP-Transfektanten der Klone T98G-B6, T98G-C3 und U138MG-C8.

U138MG-C8) nach der CD133-Überexpression differentiell exprimiert werden, wurden die Expressionsprofile von GFP-transfizierten Zellen versus CD133IRES-transfizierten Zellen mit Hilfe der Chip Yard-Software analysiert. Insgesamt konnten 6 Gene ermittelt werden, die mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  in allen drei Klonen differentiell reguliert waren. Diese Gene sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Die Auswertung der von der Affymetrix-Software generierten Expressionsdaten der einzelnen Klone mit Microsoft Excel ergab für T98G-C3 211, für T98G-B6 860 und für U138MG-C8 3384 signifikant in CD133IRES- versus GFP-transfizierte Zellen differentiell exprimierte Transkripte. Dabei wurden eine differentielle Expression (Change = I (*increased*, erhöht) bzw. D (*decreased*, erniedrigt)) und eine Änderung der Expression mindestens um den Faktor 2 (Signal log Ratio  $\leq -1$  bzw.  $\geq 1$ ) als Signifikanzkriterien gewählt. Datensätze, die bei erhöhter Expression bezogen auf die GFP-Kontrollzellen, kein positives Detektionssignal zeigten (Detection = A (*absent*, abwesend)) wurden ausgeschlossen.

Die Analyse mit der R Software ergab, dass immer die jeweiligen Zelllinien miteinander clustern, unabhängig davon, ob sie CD133 positiv oder negativ sind (Abbildung 19).

## 3.2 Untersuchung der Migration von USSC zu Gliomzellen

### 3.2.1 Analyse der Migration von USSC *in vitro*

#### Optimierung der Versuchsbedingungen

Um die optimalen Migrationsbedingungen für USSC im Transwell-Assay zu ermitteln, wurden die FCS- und die Glukosekonzentration sowie die Migrationszeit variiert. Als Referenzzellen wurden F98-Zellen als Target und die Rattenfibroblastenlinie DRF 36-2 als Kontrolle verwendet. Die Motilität der USSC verhielt sich dabei umgekehrt proportional zur Serumkonzentration. Bei höheren FCS Konzentrationen migrierte ein insgesamt geringerer Prozentsatz der Zellen. Der Unterschied zwischen der Migration von USSC zu Kontroll- und Targetzellen war für beide verwendete FCS-Konzentrationen (10 % und 30 %) signifikant. Unter serumfreien Bedingungen lösten sich die Tumorzellen vom Boden der Vertiefungen ab, und es war kein Unterschied in der Migration zu F98-Gliomzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erkennen. Die Glukosekonzentration hatte hingegen einen Einfluss auf die ungerichtete Migration. Bei 4,5 g/l Glukose war der Anteil der zu den Kontrollzellen migrierten USSC deutlich höher, als bei 1 g/l Glukose, und der Unterschied zwischen der Migration zu Kontrollzellen und Gliomzellen war teilweise nicht mehr signifikant.

In fast allen Fällen war nach 4 h der Anteil der migrierten Zellen höher als nach 2 h. Nach 6 h nahm der Anteil der migrierten Zellen teilweise wieder ab, welches durch das Ablösen der Zellen von der Unterseite der Membran zu erklären ist. Für die weiteren Experimente wurde aufgrund dieser Ergebnisse standardisiert DMEM mit 10 % FCS und 1 g/l Glukose als Migrationsmedium verwendet und die Migration nach 4 h abgestoppt. Der Anteil der migrierenden Zellen hing zudem auch vom Alter gemessen an der Passagenzahl der verwendeten USSC ab. Dabei migrierten bei Zellen der Passagen  $\geq 12$  bei den oben ermittelten optimalen Bedingungen ein deutlich kleinerer Teil als bei Zellen der Passagen  $\leq 8$  (maximal etwa 100 % versus maximal etwa 60 %). Es war jedoch in beiden Fällen ein signifikanter Unterschied in der Migration zu Gliomzellen gegenüber den Kontrollzellen zu erkennen.

Es wurde die Migration von den USSC-Linien SA 5/03 und SA 5-18 untersucht, wobei die Zelllinie SA 5/03 einen größeren Unterschied in der Migration zu F98-Gliomzellen im Vergleich zu DRF 36-2 zeigte. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente die Zelllinie SA 5/03 verwendet.

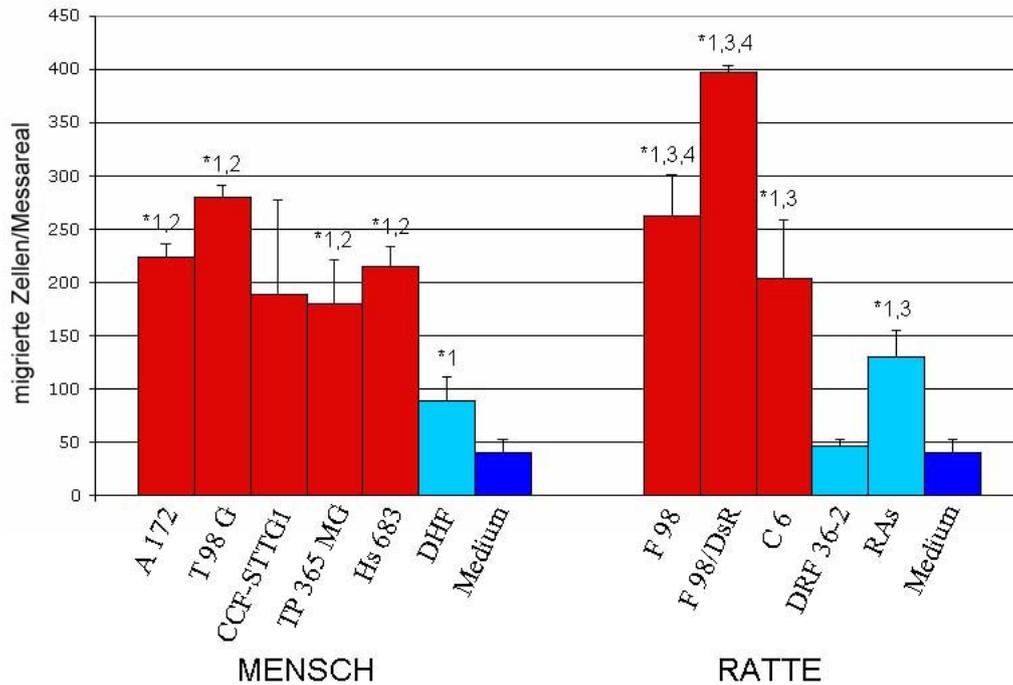


Abb. 20: Anzahl migrierter USSC (SA 5/03) pro mikroskopischen Messareal nach 4 h. Als Target dienen verschiedene humane und aus der Ratte stammende Gliom- und Kontrollzelllinien; \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test) bezogen auf 1 = Medium, 2 = DHF, 3 = DRF 36-2 oder 4 = RAs.

### Untersuchung der Migration zu verschiedenen Gliomzelllinien

In der Analyse von acht verschiedenen Gliomzelllinien (A172, T98G, CCF-STTG1, TP365MG, Hs683, F98, F98/DsRed, C6) konnte gezeigt werden, dass USSC signifikant stärker zu sieben der acht untersuchten Gliomzelllinien hin wandern als zu den Kontrollzellen oder Medium (Abbildung 20). Als Kontrollzellen (hellblaue Balken) dienten dabei schnell proliferierende Hautfibroblasten (dermale humane Fibroblasten (DHF), dermale Rattenfibroblasten (DRF 36-2) oder Astrozyten (Rattenastrozyten (RAs))), welche nur eine geringe Migration induzierten. Als weitere Kontrolle dienten Vertiefungen, die nur das Migrationsmedium enthielten (dunkelblaue Balken). Die Migration zu den unterschiedlichen Gliomzelllinien variierte und unterschied sich nicht in allen Fällen signifikant von der Migration zu den Kontrollzellen und dem Medium. So induzierten die Zelllinien A172, T98G, TP365MG und Hs683 eine signifikant stärkere Migration als DHF ( $p = 0,0024$ ,  $p = 0,0010$ ,  $p = 0,0451$  und  $p = 0,0019$ ; Student's T-Test) oder Medium ( $p = 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0227$  und  $p = 0,0004$ ; Student's T-Test) während sich die Mi-

gration zu der Zelllinie CCF-STTG1 nicht signifikant unterschied. DHF-Kontrollzellen induzierten ebenfalls ein schwache, aber dennoch signifikant stärkere Migration als das Migrationsmedium ( $p = 0,0455$ ; Student's T-Test). Die Ratten-Gliomzelllinien F98, F98/DsRed und C6 induzierten alle eine signifikant stärkere Migration als DRF 36-2 ( $p = 0,0089$ ,  $p < 0,0001$  und  $p = 0,0356$ ; Student's T-Test) und Medium ( $p = 0,0058$ ,  $p < 0,0001$  und  $p = 0,0298$ ; Student's T-Test), wobei sich nur die Migration zu F98 und F98/DsRed außerdem signifikant von der Migration zu RAs unterschied ( $p = 0,0110$  und  $p = 0,0016$ ; Student's T-Test). RAs induzierten selbst eine Migration, die signifikant stärker war als die zu Medium ( $p = 0,0121$ ; Student's T-Test) und DRF 36-2 ( $p = 0,0121$ ; Student's T-Test), während sich die Migration zu DRF 36-2 nicht von der zu Medium unterschied.

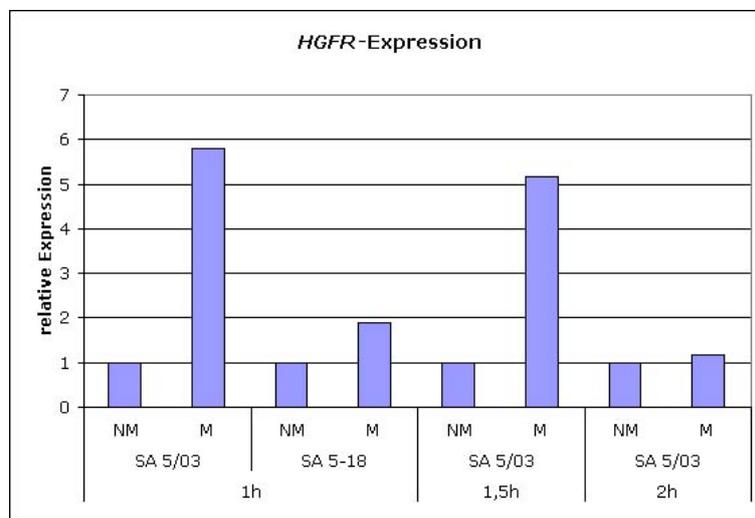


Abb. 21: *HGFR* mRNA-Expression von migrierten (M) und nicht migrierten (NM) USSC in der Realtime RT-PCR.

### Analyse der *HGFR*-Expression in migrierten und nicht migrierten USSC

In einem Transwell-Assay wurde die Migration von USSC (Zelllinien SA 5/03 und SA 5-18) durch eine poröse Membran untersucht. Nach 1 h, 1,5 h oder 2 h wurde die Migration gestoppt, die Zellen von der Oberseite (= nicht migrierte Zellen, „NM“) und von der Unterseite (= migrierte Zellen, „M“) abgeschabt und aus beiden Fraktionen getrennt RNA isoliert. Mittels Realtime RT-PCR konnte gezeigt werden, dass alle Proben aus migrierten Zellen im Vergleich zu den Proben aus nicht migrierten Zellen, deren Expres-

sion auf 1 festgelegt wurde, eine verstärkte *HGFR*-Expression aufwiesen (Abbildung 21). Dabei wies die schlechter migrierende Zelllinie SA 5-18 eine geringere Expression auf als die in den restlichen Migrationsexperimenten verwendete Zelllinie SA 5/03.

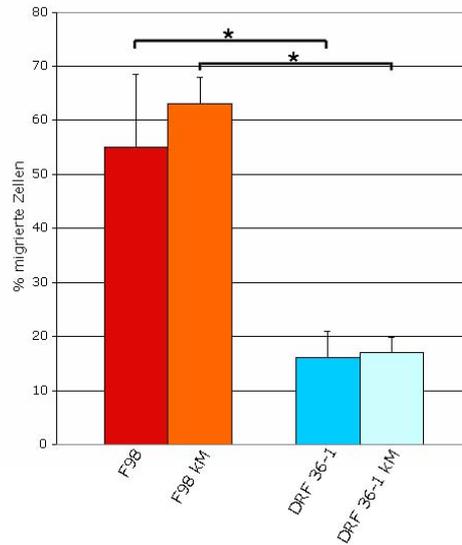


Abb. 22: Migration von SA 5/03 zu F98-Gliomzellen und DRF 36-1 Kontrollzellen und dem entsprechendem konditionierten Medium (DFR 36-1 kM); \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test); kM = konditioniertes Medium.

### Einfluss der Blockierung verschiedener Signalwege auf die Migration

Zellkultur-Überstände induzierten eine gleich starke Migration wie die Gliomzellen oder Fibroblasten selbst (Abbildung 22), wobei die Unterschiede zwischen F98-Gliomzellen bzw. deren Überstand und DRF 36-2 Kontrollzellen bzw. deren Überstand jeweils signifikant war.

Weder HGFR und HGF neutralisierende Antikörper noch CXCR4-Antikörper und PI3-Kinase Inhibitoren bewirkten eine signifikante Hemmung der Migration (Abbildungen 23, 24 und 25).

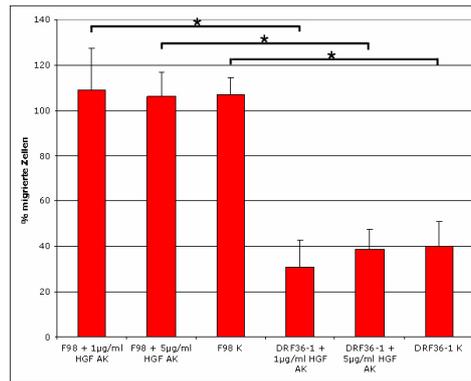


Abb. 23: Migration von SA 5/03 zu F98-Gliomzellen unter dem Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen HGF-neutralisierender Antikörper (1µg/ml bzw. 5µg/ml); \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test).

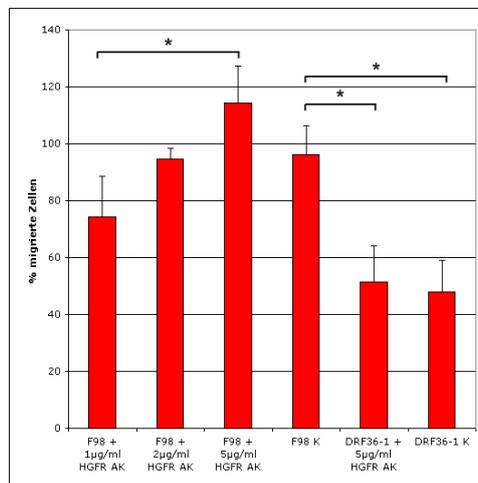


Abb. 24: Migration von SA 5/03 zu F98-Gliomzellen unter dem Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen HGFR-neutralisierender Antikörper (1µg/ml, 2µg/ml und 5µg/ml); \* =  $p < 0,05$  (Student's T-Test)

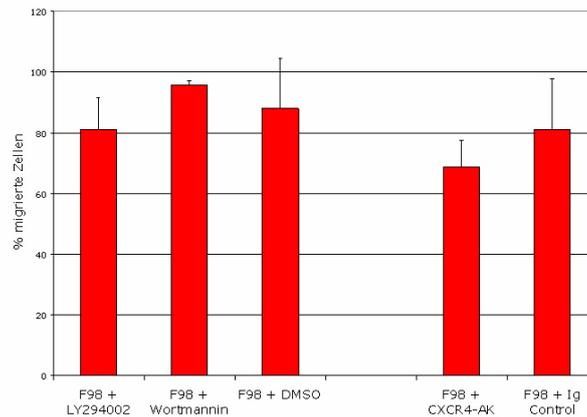


Abb. 25: Migration von SA 5/03 zu F98-Gliomzellen unter dem Einfluss von CXCR4-neutralisierenden Antikörpern und den PI3-Kinase Inhibitoren LY294002 und Wortmannin mit Isotyp-Antikörpern bzw. DMSO als Kontrollen.

### Vergleich der Expressionsprofile migrierter und nicht migrierter USSC

Um Gene zu ermitteln, die in den migrierten (SA 5/03 MII, SA 5/03 MIII) versus den nicht migrierten (SA 5/03 NMII, SA 5/03 NMIII) USSC differentiell exprimiert werden, wurden mit Hilfe von HG U133A 2.0 Affymetrix<sup>®</sup>-Expressionsarrays Expressionsprofile erstellt („M“ = migrierte Zellen; „NM“ = nicht migrierte Zellen; „II“ = 2 h Migration; „III“ = 1,5 h Migration). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Chip Yard-Software. Insgesamt konnten mit der ChipYard-Software 151 Transkripte ermittelt werden, die mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  differentiell reguliert waren. Davon zeigten 20 Gene eine Änderung der Expression von Log fold Change  $> 1$  bzw.  $< -1$ . Diese Gene sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Log fold Change steht hier für den Logarithmus zur Basis zwei des Änderungswertes. Ändert sich die Expression in der einen Gruppe (z. B. M) in Bezug auf die Vergleichsgruppe (NM) also um den Faktor 2, so ist der Log fold Change = 1.

Tab. 15: Signifikant differentiell exprimierte Gene in migrierten versus nicht migrierten USSC mit einer Expressionsänderung von Log fold Change  $> 1$  oder  $< -1$

Gen-Symbol	Genbezeichnung	Accession No.	Log Fold Change	P-value
CXCR7	chemokine orphan receptor 1	NM 020311	-1.3348	0.0150
CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	NM 001311	-1.1923	0.0051
MMP14	matrix metalloproteinase 14	NM 004995	-1.0797	0.0486
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM 006290	-1.0726	0.0094
FOXP1	forkhead box P1	NM 005249	1.0252	0.0156
ATP13A3	ATPase type 13A3	NM 024524	1.0445	0.0446
IPO7	importin 7	NM 006391	1.0503	0.0491
C1QDC1	C1QDC1 protein	NM 001002259	1.0573	0.0123
PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	NM 214458	1.0859	0.0294
KBTBD11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	NM 014867	1.0898	0.0276
ADD3	adducin 3 (gamma)	NM 016824	1.1068	0.0239
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	NM 008048	1.1121	0.0106
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	NM 003107	1.1216	0.0064
HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	NM 031157.2	1.1755	0.0160
HNRPA1			1.3823	0.0462
LOC440295	hypothetical protein LOC440295	NM 198181	1.2421	0.0061
AKAP12	A-kinase anchor protein 12 isoform 1	NM 005100	1.2427	0.0318
STK38L	serine/threonine kinase 38 like	NM 015000	1.2502	0.0225
STK38L			1.7400	0.0290
GOLGA8A	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	NM 181077	1.3424	0.0261
SLC19A2	solute carrier family 19, member 2	NM 006996	1.5917	0.0073
NET1	neuroepithelial cell transforming gene 1 isoform	NM 005863	1.7320	0.0163
NET1			1.9029	0.0145

Aus den in migrierten versus nicht migrierten USSC differentiell exprimierten Genen wurden mit Hilfe der *Comprehensive Gene Pathway analysis*-Software Signalwege ermittelt, die an mehreren Punkten von den Genen reguliert werden. In der Tabelle 16 sind von den 46 herunterregulierten und 18 hochregulierten Signalwegen (0,2 p-Limit) die jeweils 15 wichtigsten zusammengefasst.

Tab. 16: In migrierten versus nicht migrierten USSC differentiell regulierte Signalwege

	herunterregulierte Signalwege	hochregulierte Signalwege
1	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Glycan structures - biosynthesis
2	RNA polymerase	ECM-receptor interaction
3	Ubiquinone biosynthesis	Adherens junction
4	Oxidative phosphorylation	Focal adhesion
5	Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	Starch and sucrose metabolism
6	Pentose and glucuronate interconversions	Regulation of actin cytoskeleton
7	Glutathione metabolism	Pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection
8	Proteasome	Cell Communication
9	Apoptosis	Pyrimidine metabolism
10	Chronic myeloid leukemia	Fatty acid metabolism
11	Toll-like receptor signaling pathway	Tight junction
12	Cell adhesion molecules (CAMs)	TGF-beta signaling pathway
13	Colorectal cancer	Axon guidance
14	Huntington's disease	PPAR signaling pathway
15	Selenoamino acid metabolism	Adipocytokine signaling pathway

### 3.2.2 Analyse der Migration von USSC *in vivo*

#### Intrazerebrale Implantation von USSC in gesunde Versuchstiere

**Optimierung der Versuchsbedingungen** Die erste Tierversuchsserie mit insgesamt 16 Versuchstieren diente der Optimierung der Versuchsbedingungen und der Etablierung der Detektion von USSC mittels Immunfluoreszenz für das Human Nuclei-Antigen. In der Narkose verstarben 3 Tiere und konnten nicht ausgewertet werden. Bei den restlichen 13 Tieren wurde bei 7 die Implantation mit einer 28 Gauge (28 G)-Kanüle durchgeführt, wovon 4 eine Immunsuppression mit Ciclosporin A erhielten. Bei 6 Tieren wurde eine 22 Gauge (22 G)-Kanüle verwendet und davon 3 immunsupprimiert. 24 h nach der Implantation wurde ein Tier aus der 22 G-Gruppe und ein Tier aus der 28 G-Gruppe getötet, wobei beide immunsupprimiert waren. Nach 48 h wurde ein weiteres Tier aus der 22 G-Gruppe getötet, das ebenfalls immunsupprimiert war. Die restlichen Tiere wurden am 12. Tag nach der Implantation getötet. Für die Auswertung wurden die Gehirne entnommen, schockgefroren und am Kryostaten geschnitten. Dabei wurde jeder 10. Schnitt zur Begutachtung der Histologie mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die mikroskopische Auswertung ergab in allen Fällen eine vor allem durch Makrophageneinwanderung und Gliose gekennzeichnete Entzündungsreaktion an der Einstichstelle. Die systematische Analyse des Einflusses der verschiedenen Parameter ergab, dass bei der größeren Kanüle die Entzündungsreaktion im Durchschnitt stärker ausfiel, jedoch durch die geringere Biegsamkeit der Kanüle die Reproduzierbarkeit und die Größe der Implantationstiefe zunahm. Das Überleben der Stammzellen nach Passage durch Kanülen der Größe 22 G oder 28 G unterschied sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht. Die Immunsuppression mit Ciclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup>, Sandoz) hatte bei intrazerebraler Implantation weder Einfluss auf die Reaktion an der Implantationsstelle noch auf das Überleben der implantierten Zellen. Für die weiteren Experimente wurden Kanülen der Größe 22 G verwendet und bei der intrazerebralen Implantation auf eine Immunsuppression verzichtet.

**Detektion von USSC** USSC konnten *in vivo* und *in vitro* spezifisch mittels Immunfluoreszenz für das Human Nuclei Antigen detektiert werden (Abbildung 26). Dafür wurden zunächst bei den nach ein oder zwei Tagen getöteten Tieren anhand der HE-Färbungen Schnitte aus dem Bereich der Implantationsstelle für die Färbung mit Human Nuclei-Antikörper ausgewählt. Für eine bessere Darstellung der Gewebearchitektur in der Fluoreszenzmikroskopie wurden außerdem immer mit GFAP-Antikörpern die Gliazellen und mit DAPI die Zellkerne angefärbt. Nachdem sich bei den nach ein und zwei

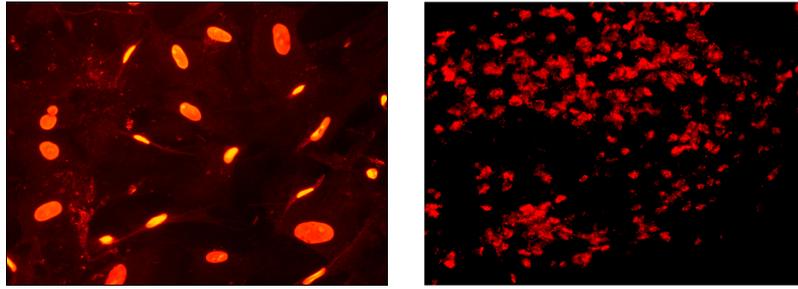


Abb. 26: Anti-Human Nuclei (HuNu) Immunfluoreszenzfärbung an USSC in der Zellkultur (links) und nach intrazerebraler Implantation (rechts). Durch die Detektion mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern sind die Zellkerne rot gefärbt.

Tagen getöteten Tieren in allen Fällen eine große Anzahl von Stammzellen an der Implantationsstelle detektieren ließ, wurden bei den restlichen Tieren ebenfalls Schnitte aus dem Bereich der Implantationsstelle mit dem Anti-Human Nuclei-Antikörper gefärbt. Hier konnten in 5 von 11 Fällen einzelne Zellen detektiert werden, die sich nicht mehr an der Implantationsstelle befanden (Abbildung 27). Einen Zusammenhang zwischen der Detektion von Stammzellen und den verschiedenen Versuchsparametern ließ sich nicht erkennen.

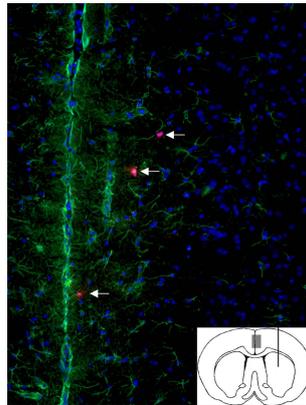


Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Anti-Human Nuclei-Antikörper (HuNu) 12 Tage nach der Implantation. Die Abbildung zeigt, einige Millimeter von der Implantationsstelle, entfernt einzelne USSC im zerebralen Kortex. Die Lage des Bildausschnittes ist in der Skizze markiert. Rot: Human Nuclei, grün: GFAP; blau: Zellkerne (DAPI).

**Reaktive Gliose an der Implantationsstelle** Da in den HE-Schnitten der Tiere, die nach 12 Tagen getötet worden waren, eine große Ansammlung von Zellen an der Implantationsstelle zu sehen war, die sich nicht mit dem Anti-Human Nuclei-Antikörper anfärben ließ, wurden die Schnitte außerdem mit Anti-Ratten CD45-Antikörper gefärbt. Zusammen mit dem histologischen Bild kann CD45 hier als ein Marker für Makrophagen angesehen werden. Die Analyse dieser Färbungen zeigte, dass sich an der Implantationsstelle eine massive reaktive Gliose mit einer Einwanderung von zahlreichen Makrophagen gebildet hat (Abbildung 28).

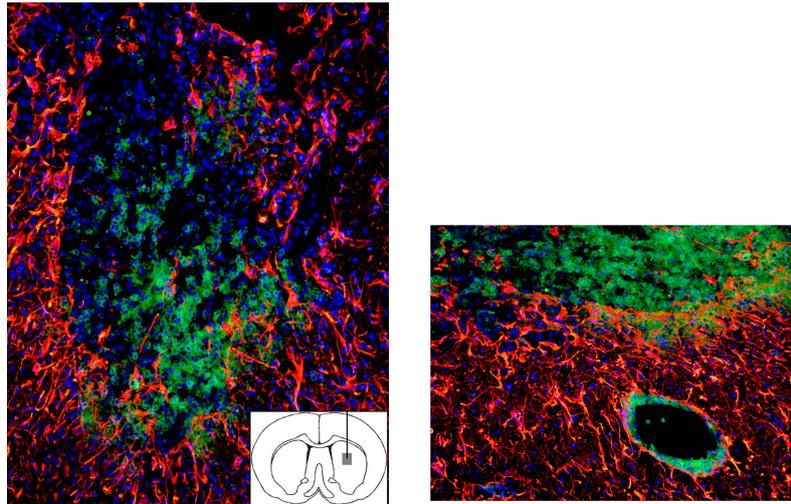


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbung an der Implantationsstelle 12 Tage nach der Implantation. Die Abbildung zeigt eine massive reaktive Gliose und eingewanderte Makrophagen. Die Lage des Bildausschnittes ist in der Skizze markiert. Rot: GFAP, grün: CD45; blau: Zellkerne (DAPI).

### Transplantationsexperiment von USSC im F98-Rattengliommodell

Die zweite Tierversuchsserie wurde an 8 Versuchstieren durchgeführt, wobei ein Tier in der Narkose verstarb und ein weiteres nicht auf die Narkose ansprach. Bei den restlichen 6 Tieren wurde zunächst durch die intrazerebrale Implantation von F98-Rattengliomzellen gliale Tumoren induziert (Abbildung 29). Nach einer Woche wurden dann bei 4 Tieren USSC intrazerebral in die zu dem Tumor kontralaterale Hemisphäre implantiert und bei 2 Tieren USSC in die Vena femoralis injiziert. Dabei wurden die Tiere mit systemischer Stammzellgabe wegen der zu erwartenden Abstoßungsreaktion mit Ciclosporin A immunsupprimiert. 48 Stunden nach der Stammzellimplantation wurde ein Tier getötet,

das eine intrazerebrale Implantation erhalten hatte. Alle restlichen Tiere wurden am Tag 4 nach der Implantation getötet. Für die Auswertung wurde bei allen Tieren das Gehirn entnommen und schockgefroren. Bei den Tieren, die eine systemische Stammzellimplantation erhalten hatten, wurden außerdem Leber und Lunge entnommen und ebenfalls eingefroren.

Keines der 6 Tiere entwickelte einen Tumor, bei einem Tier trat eine starke intrazerebrale Blutung auf. Bei beiden Tieren mit systemischer und bei 2 von 4 Tieren mit intrazerebraler Stammzellgabe konnten einzelne Stammzellen im Gehirn detektiert werden. Diese waren an der Implantationsstelle, im Ventrikel oder im Bereich des Kortex lokalisiert. In keinem Fall fand eine Anreicherung der USSC im Gehirn statt. Dagegen konnte eine HuNu-Immunreaktivität in Leber und Lunge der beiden Tiere mit systemischer Stammzellgabe festgestellt werden.

In einer weiteren Versuchsserie wurde bei 9 Tieren mit F98-Gliomzellen ein Tumor

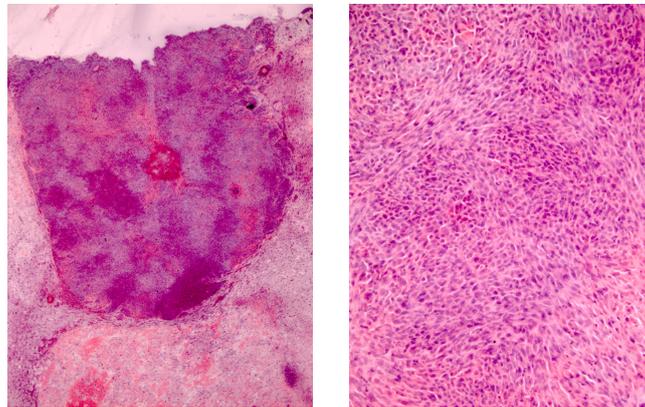


Abb. 29: HE-Färbung eines intrazerebralen F98-Glioms an einem koronaren Gefrierschnitt. Links: In der Übersicht erkennt man einen großen scharf abgegrenzten Tumor im Bereich der Rinde. Rechts: Die vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts aus dem Tumorzentrum zeigt die hohe Zelldichte des Tumors.

induziert. Nach einer Woche wurden bei allen Tieren USSC über die Vena Femoralis infundiert, wobei ein Tier vor Stammzellimplantation in der Narkose verstarb, und 2 Tiere innerhalb von 24 h nach der Stammzellimplantation verstarben. Hier konnte nur bei einem Tier Leber und Lunge entnommen werden. 3 Tiere wurden 48 h nach der Stammzellimplantation getötet und die restlichen 3 Tiere am Tag 4 nach der Stammzellimplantation. Bei allen Tieren wurde das Gehirn entnommen und bei 8 Tieren außerdem Leber und Lunge.

8 von 9 Tieren entwickelten einen intrazerebralen F98-Tumor. Es konnten jedoch in kei-

nem Fall HuNu-positive Zellen im Gehirn bzw. in den intrazerebralen F98-Tumoren der Tiere detektiert werden. In den Färbungen von Leber und Lunge der nach 24 h und 48 h getöteten Tiere wurden in allen Fällen zahlreiche USSC detektiert (Abbildung 30).

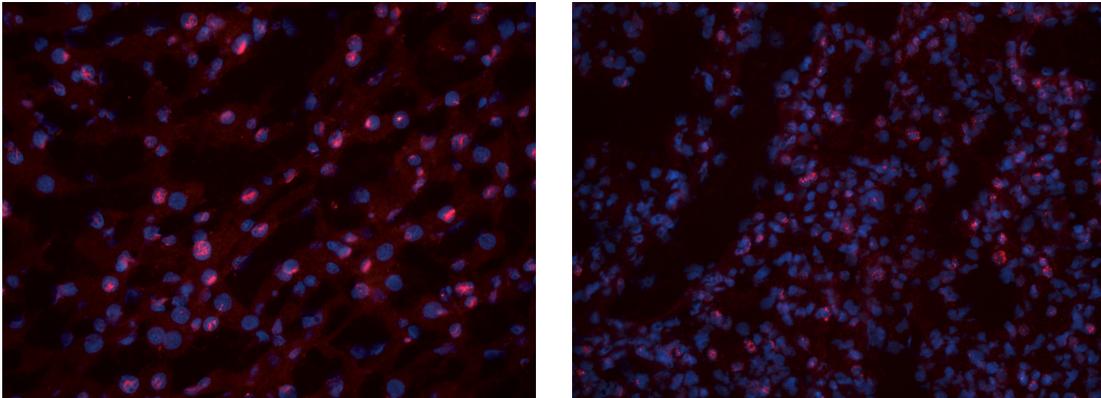


Abb. 30: Nachweis von USSC mittels Anti-Human Nuclei-Immunfluoreszenz in der Leber (links) und in der Lunge (rechts) von einem Versuchstier nach systemischer Applikation der USSC. Rot: Human Nuclei; blau: Zellkerne (DAPI).

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchung der Rolle des Tumorstammzellmarkers CD133/Prominin-1 in Gliomen

#### 4.1.1 Analyse der *PROM1*-Expression in Gliomen

Bislang ist über die physiologische Funktion des Proteins CD133 sehr wenig bekannt. Es wird vor allem in cholesterolreichen Regionen der Zellmembran und dort vornehmlich in Membranfortsätzen exprimiert (Röper *et al.* 2000, Corbeil *et al.* 2000). Eine asymmetrische Verteilung von CD133 in polarisierten hämatopoetischen Stammzellen wurde ebenso beschrieben (Giebel *et al.* 2004, Beckmann *et al.* 2007). Vor allem die glykosylierte Form des Proteins, welche das AC133-Epitop enthält, scheint ausschließlich in unreifen epithelialen Geweben exprimiert zu sein (Corbeil *et al.* 2000, Uchida *et al.* 2000). In verschiedenen soliden Tumoren, wie auch in Glioblastomen, konnte mit Hilfe des AC133-Epitops eine Subpopulation von Tumorzellen isoliert werden, die Stammzelleigenschaften aufweisen. Diese sogenannten Tumorstammzellen besitzen die Fähigkeit, differenzierte Zellen hervorzubringen sowie *in vivo* Tumoren zu bilden, die den Ursprungstumoren ähneln (Singh *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *PROM1*-mRNA, die für das Protein CD133/Prominin-1 kodiert, im Vergleich zu normalem Hirngewebe und zu WHO-Grad II-Astrozytomen in Glioblastomen des WHO-Grades IV verstärkt exprimiert wird. Wie erwartet ist außerdem die Expression in fetalem Hirngewebe gegenüber adultem Hirngewebe erhöht. Geht man von der Existenz von Tumorstammzellen aus, so könnte die Ursache für die erhöhte *PROM1*-mRNA Expression in Glioblastomen in einem größeren Anteil von Tumorstammzellen im Tumor begründet sein oder aber auch in einer erhöhten Expression von *PROM1*-mRNA in den Tumorstammzellen. Beides ist mit dem stark invasiven Wachstum und der großen Neigung zu Rezidiven von Glioblastomen gut vereinbar. Erstaunlicherweise zeigten alle vorhandenen etablierten Gliomzelllinien keine *PROM1*-Expression auf mRNA- und

Proteinebene. Eine Erklärung für die fehlende Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 könnten die Selektionsbedingungen in der Zellkultur sein. Möglicherweise wird hier die *PROM1*-mRNA Expression nach mehreren Passagen durch epigenetische Mechanismen in den Zellen herunterreguliert (Diehn und Clarke 2006).

In der Immunfluoreszenzfärbung von kryoasserviertem Tumorgewebe eines Glioblastoms mit im Vergleich zu normalem Hirngewebe erhöhter CD133-mRNA Expression wurde eine flächige AC133-Immunreaktivität in größeren Arealen gefunden, daneben Areale, die keine AC133-Expression zeigten. Das untersuchte WHO-Grad III-Oligoastrozytom mit geringer CD133-mRNA Expression war, wie erwartet, in der Immunfluoreszenzfärbung mit AC133 detektierenden CD133/1-Antikörpern negativ. Dagegen konnte in einem WHO-Grad II-Astrozytom mit erhöhter CD133-mRNA Expression kein AC133-Epitop detektiert werden. Da nur das AC133-Epitop als Marker für undifferenzierte Zellen und Tumorstammzellen angesehen wird, während CD133 in zahlreichen adulten Geweben exprimiert wird, ist dieser Befund gut mit dem niedrigen Malignitätsgrad des untersuchten Tumors zu vereinbaren. Eine erhöhte CD133-mRNA Expression kann also nicht immer zweifelsfrei auf die Existenz von Tumorstammzellen zurückgeführt werden, wodurch die hohe CD133 mRNA-Expression in einzelnen WHO-Grad II-Tumoren erklärt werden kann.

## 4.1.2 Phänotypische Charakterisierung etablierter Gliomzelllinien

### Expressionsprofile in der Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von acht etablierten humanen Gliomzelllinien wurde ein Expressionsprofil von 32 größtenteils Stammzell-assoziierten Oberflächenmarkern erstellt. Wie erwartet, wurde HLA-ABC als allgemeiner Marker für humane Zellen von allen Zelllinien exprimiert, während alle Zelllinien negativ für den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und das gemeinsame Leukozytenantigen CD45 waren. Demgegenüber waren alle Zelllinien stark positiv für CD44, welches als Marker für die Isolierung von Tumorstammzellen in Brustkrebs (Al-Hajj *et al.* 2003) und Prostatakrebs (Patrawala *et al.* 2006) beschrieben wurde. Die Expression von CD44 in Gliomen und Gliomzelllinien ist schon lange bekannt (Asher und Bignami 1992). Der Hyaluronsäurerezeptor CD44 spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und Migration von Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* und wurde bereits als mögliches Target für eine Gentherapie von Gliomen vorgeschlagen (Ge *et al.* 1995, Okada *et al.* 1996). Die starke Expression von CD44 in den untersuchten Gliomzelllinien bestätigt demzufolge die oben aufgeführten Untersuchungen. CD44 wur-

de in allen untersuchten Zelllinien gleichmäßig stark von der gesamten Zellpopulation exprimiert. Im Gegensatz dazu werden andere Marker, die zur Isolation von Stammzellen aus Tumoren verwendet wurden, wie beispielsweise CD133 (Singh *et al.* 2004a), nur von einer Subpopulation der Tumorzellen exprimiert. Neuerer Untersuchungen zufolge können Gliomzelllinien jedoch zu einem großen Anteil aus Tumorstammzellen bestehen (Zheng *et al.* 2007), sodass CD44 möglicherweise einen weiteren potentiellen Marker für die Isolation von Tumorstammzellen aus Gliomzelllinien darstellt. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen notwendig.

Das Glykoprotein CD109, welches bereits in Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen beschrieben wurde (Hashimoto *et al.* 2004), konnte ebenfalls auf allen untersuchten Zelllinien detektiert werden. CD109 wurde als Inhibitor des TGF- $\beta$  Rezeptorsystems beschrieben, das eine große Rolle bei der immunologischen Tumorabwehr spielt (Finnson *et al.* 2006). Über die Expression von CD109 in astrozytären Tumoren ist bisher wenig bekannt. Die Isolierung eines ubiquitären Markers für die Identifikation von Tumorzellen innerhalb einer Zellpopulation oder eines Organismus ist Ziel zahlreicher Forschungsvorhaben. Ein solcher Marker würde sowohl für das Verständnis der Tumorgenese als auch für die Entwicklung gezielter und somit nebenwirkungsarmer Therapien einen bedeutenden Fortschritt darstellen. Die Expression von CD109 in unterschiedlichen Tumorentitäten (Hashimoto *et al.* 2004) und die Verbindung zum TGF- $\beta$ -Signalweg machen CD109 somit zu einem interessanten Kandidaten für weiterführende Untersuchungen.

Desweiteren exprimierten alle Zelllinien mindestens in einer Subpopulation das Chondroitinsulfat-Epitop 473HD. Dieses wurde als Marker für die Isolierung neuraler Stammzellen aus den Gehirnen von Mausembryonen beschrieben (Faissner *et al.* 1994, von Holst *et al.* 2006). Vor allem die Existenz einer 473HD-positiven Subpopulation ist im Hinblick auf die mögliche Existenz von Tumorstammzellen innerhalb etablierter Zelllinien interessant. Die Expression eines Markers für neurale Stammzellen in Gliomzellen legt die Vermutung nahe, dass auch letztere Stammzeleigenschaften aufweisen und es sich möglicherweise um Tumorstammzellen handeln könnte. Aus diesem Grund wurde der Marker 473HD für eine Subklonierung der Gliomzellen ausgewählt, um die Eigenschaften von 473HD-positiven und 473HD-negativen Zellen zu vergleichen und somit weitere Hinweise auf einen Stammzellphänotyp finden zu können.

Das AC133-Epitop wurde, wie aufgrund der fehlenden *PROM1*-mRNA Expression erwartet, von keiner der Zelllinien exprimiert.

Die Expression von *Epidermal-Growth-Factor-Receptor* (EGFR) in Gliomzelllinien und seine Funktion bei der Migration von Gliomzellen wurde bereits in den 1980er Jahren

beschrieben (Westermarck *et al.* 1982, Steck *et al.* 1986). Interessanterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass EGFR bei der CD44-bedingten Invasion von Gliomen eine wichtige Rolle spielt (Monaghan *et al.* 2000). Bei EGFR handelt es sich um einen onkogenen Wachstumsfaktorrezeptor der typischerweise in primären Glioblastomen amplifiziert und überexprimiert wird (Ohgaki und Kleihues 2007). Die Expression von EGFR in den Gliomzelllinien bestätigt, dass diese aus WHO-Grad IV-Glioblastomen isoliert wurden, da man in niedriggradigeren Tumoren keine EGFR-Expression findet. Demgegenüber wurde die Tyrosinkinase HER2/neu, welche ebenfalls zu der EGF-Rezeptorfamilie gehört, nur in drei der acht Zelllinien exprimiert. HER2/neu spielt als Onkogen eine wichtige Rolle in Mammakarzinomen. Die Expression von HER2/neu ist hier mit einem besonders aggressiven Phänotyp der Tumorerkrankung assoziiert und dient als Target für die gezielte Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Ferretti *et al.* 2007). Die Angaben in der Literatur zur Expression von HER2/neu in Gliomen sind widersprüchlich. So wurde einerseits die Expression von HER2/neu in Glioblastomzelllinien beschrieben (Zhang *et al.* 2007), während in einer anderen Arbeit keine HER2/neu-Expression in 49 untersuchten Glioblastom-Resektaten gefunden wurde (Haynik *et al.* 2007).

Die Zelllinie A172 exprimiert als einzige den Oligodendrozytenmarker O4. Für diese Zelllinie wurden bereits genetische Veränderungen beschrieben, die typischerweise in Oligodendrogliomen vorkommen (Law *et al.* 2005). Diese Befunde legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Zelllinie A172 aus einem Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente isoliert wurde (Louis *et al.* 2007).

### Neurosphärenassay

Da neurale Stammzellen sich nur in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in serumfreiem Medium in Form sogenannter Neurosphären kultivieren lassen, wird im Umkehrschluss die Bildung von neurosphärenartigen Zellagglomeraten als Indiz für die Existenz von Stammzellen angesehen (Hemmati *et al.* 2003, Gal *et al.* 2007). Neurosphären sind kugelförmige Zellcluster, die aus neuronalen Stammzellen durch die Bildung differenzierender Zellen hervorgehen. Als Nachweis der Differenzierung können in Neurosphären durch Immunfluoreszenzfärbungen oligodendrogliale, gliale und neuronale Marker neben Stammzellmarkern detektiert werden. Von den hier untersuchten Gliomzelllinien bildeten sieben von neun bei Kultivierung in Neurosphärenmedium die oben beschriebenen Sphäroide. Im Unterschied zu Neurosphären aus neuronalen Stammzellen konnten in der Immunfluoreszenzfärbung in den Tumorsphäroiden keine Differenzierungsmarker detektiert werden, die nicht auch in der Monolayer-Kultur von den entsprechenden Zelllinien

exprimiert wurden. Zudem war der sphäroidale Phänotyp nach Zugabe von normalem Kulturmedium komplett reversibel, was ebenfalls gegen die Existenz von sich differenzierenden Gliomstammzellen innerhalb der Zellpopulation spricht. Es liegt also nahe, dass es sich bei den hier beobachteten Sphäroiden nur um ein verändertes Wachstumsverhalten der Gliomzellen handelt. Nach mehreren Wochen der Kultivierung wurden die Zellen auch im Neurosphärenmedium teilweise wieder adhärent, und es ließen sich komplett adhärent wachsende Zellen durch Abtrennung der Neurosphären gewinnen. Auch diese Zellen zeigten keine veränderte Expression der analysierten Differenzierungsmarker. Eine Erklärung für das veränderte Wachstumsmuster dieser Zellen in Neurosphärenmedium ist die Herunterregulation von Wachstumsfaktorrezeptoren.

Die Proliferation der Zellen in Neurosphärenmedium war im Vergleich zur Kultivierung in normalem, serumhaltigem Zellkulturmedium stark reduziert. Aus diesem Grund wurden nur exemplarisch Neurosphären aus der Zelllinie T98G in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Analyse verschiedener Marker zeigte wenig offensichtliche Veränderungen zwischen adhärent wachsenden und in Neurosphären wachsenden Zellen. Der einzige Marker, der nur in den Sphäroiden exprimiert wurde, war die Membran-Metallo-Endopeptidase CD10, ein diagnostischer Marker für Akute Lymphatische Leukämie. Zudem konnte in den dissoziierten sekundären Neurosphären teilweise eine Subpopulation bei der Färbung mit Antikörpern gegen die Zelladhäsionsmoleküle CD56 und CD166 und gegen den Marker CD95, welcher eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielt, identifiziert werden. Die veränderte Expression der Zelladhäsionsmoleküle deutet auf eine Funktion dieser Moleküle bei der Bildung der Zellcluster hin. Die Zunahme der Heterogenität ist möglicherweise ein Indiz für eine beginnende Differenzierung der Zellen, was sich jedoch in den übrigen Experimenten bisher nicht bestätigen ließ.

Der Neurosphärenassay basiert auf der Annahme, dass sich unreife Zellen unter serumfreien Bedingungen und in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren klonal teilen und dabei differenzierende Zellen hervorbringen. Theoretisch entsteht also jede Neurosphäre aus einer einzelnen Zelle. Aus diesem Grund gilt die Detektion von Differenzierungsmarkern innerhalb der Sphäroide als Beleg für die Anwesenheit von Stamm- oder Vorläuferzellen. In neueren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Neurosphären miteinander fusionieren können, wodurch die Aussagekraft des Assays in Frage gestellt wird (Singec *et al.* 2006, Zheng *et al.* 2007). Um die Differenzierungsfähigkeit von einzelnen Klonen zu untersuchen, ist es deshalb notwendig, Zellen in getrennten Kompartimenten, beispielsweise nach einer Einzelzellablage in einer 96-well Zellkulturplatte, in Neurosphärenmedium zu kultivieren. Eine weitere Möglichkeit der Isolation von Tumorzellen aus

Gliomzellen ist die Abtrennung der sogenannten *side population* mit Hilfe von Hoechst-Farbstoff. Hierbei wird der inkorporierte Farbstoff von den Zellen der *side population* mit dem ABC-Transporter (ABCG2) aus der Zelle ausgeschleust und die so entfärbten Zellen können in der Durchflusszytometrie isoliert werden (Setoguchi *et al.* 2004). Neben Stammzeleigenschaften wird der *side population* eine erhöhte Tumorigenität und die Fähigkeit zur Ausschleusung zytostatisch wirksamer Substanzen mit Hilfe des ABC-Transporters zugeschrieben. Allerdings wurde im Widerspruch dazu berichtet, dass sich ABCG2+ und ABCG2- Zellen nicht in ihrer Tumorigenität unterscheiden (Patrawala *et al.* 2005). Für C6-Rattentumorzellen konnte gezeigt werden, dass sie unabhängig von der Expression von CD133 und der Fähigkeit zur Ausscheidung von Hoechst-Farbstoff zur Bildung von Klonen und von Tumoren in Nacktmäusen fähig waren. Die Autoren schlussfolgern, dass es sich somit um eine reine Tumorstammzelllinie handelt (Zheng *et al.* 2007). Abschließend kann man sagen, dass es zwar Tumorstammzellen innerhalb von Gliomzelllinien zu geben scheint, es jedoch bisher noch nicht gelungen ist, einen spezifischen Marker für die Isolation dieser Zellen zu identifizieren.

### 4.1.3 Untersuchung der funktionellen Auswirkungen einer CD133-Überexpression in Gliomzelllinien

#### Subklonierung der Gliomzelllinien und lentivirale Transfektion

Um eine größere Homogenität innerhalb der Gliomzelllinien zu erreichen und um eine Selektion durch die lentivirale Transfektion zu verhindern, wurden die Zellen nach Färbung mit 473HD-Antikörpern an einem Durchflusszytometer mit einer Dichte von einer Zelle pro Well abgelegt und wieder expandiert. Bei 473HD handelt es sich um ein in Zusammenhang mit neuronalen Stammzellen beschriebenes Antigen (Faissner *et al.* 1994, von Holst *et al.* 2006), dessen Rolle bei der Gewinnung von Zellklonen auf diese Weise untersucht werden sollte. Die ursprünglich 473HD-positiven und -negativen Klone zeigten jedoch nach der Expandierung keinen Unterschied in der 473HD-Expression mehr. Wie auch in der ursprünglichen Zellpopulation wurde 473HD hier jeweils von einer Subpopulation der Zellen exprimiert. Des Weiteren konnte kein Einfluss von 473HD auf die Gewinnung von Klonen aus den Zelllinien festgestellt werden. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass 473HD möglicherweise in Gliomzelllinien Zellzyklus-abhängig exprimiert wird. Diese Hypothese bedarf allerdings weitergehender Analysen. Für die nachfolgende Transfektion von CD133 bzw. GFP wurden vier besonders gut proliferierende Klone von insgesamt drei verschiedenen Zelllinien (T98G, U138MG, U118MG)

ausgewählt. Dabei wurde ein lentivirales System ausgewählt, das ermöglichte, stabile Transfektanten zu erhalten, die sich ohne Verwendung von Selektionsmedium über lange Zeit kultivieren lassen. Für die Anreicherung der transfizierten Zellen wurde auf eine erneute Klonierung verzichtet, um eine Population zu erhalten, in der CD133 an unterschiedlichen Orten im Genom integriert ist. Deshalb wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers nach Färbung mit CD133-Antikörpern jeweils einige 1000 Zellen isoliert und expandiert. Die beiden verwendeten CD133-Vektoren (CD133GFP und CD133IRES) haben unterschiedliche Vor- und Nachteile. Die Expression eines Fusionsproteins ermöglicht einerseits eine einfache subzelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins, andererseits kann ein solches physiologisch nicht vorkommendes Protein innerhalb der Zelle Störungen verursachen und ist möglicherweise nicht funktional. Bei dem IRES-Konstrukt liegen beide Proteine getrennt voneinander vor, sodass die Funktionalität von CD133 hier gewährleistet ist.

### **Bestätigung der CD133-Expression in den transfizierten Gliomzellen**

**Durchflusszytometrie und Realtime RT-PCR** In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass alle transfizierten Zelllinien einen hohen Anteil AC133-positiver Zellen enthalten. Dieses wurde durch eine Anreicherung der Zellen an einem Durchflusszytometer noch gesteigert. Zudem konnte in wiederholten Analysen festgestellt werden, dass die Expression von CD133 stabil war und die Fraktion der CD133-positiven Zellen auch nach mehreren Wochen in der Kultur nicht kleiner wurde.

Auch in der Realtime RT-PCR konnte die Expression von CD133 in den transfizierten Zellen bestätigt werden. Im Vergleich zu den GFP-transfizierten Kontrollzellen, deren CD133-Expression an der Detektionsschwelle war, verstärkte sich die Expression von CD133-RNA in den transfizierten Zellen um das  $10^7$ -fache. Somit konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals stabil CD133-überexprimierende Gliomzelllinien durch Transfektion generiert werden.

**Immunfluoreszenz** Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem CD133/1-Antikörper von Miltenyi-Biotech durchgeführt, der spezifisch das glykosylierte AC133-Epitop detektiert. Da die Glykosylierung durch die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) zerstört wird, erfolgte die extrazelluläre CD133-Färbung an nur leicht fixierten Zellen. Die Fixierung mit 0,2% PFA ermöglichte den Erhalt der Zellmorphologie, ohne dabei die Glykosylierung des AC133-Epitops zu zerstören. In der extrazellulären Färbung fand sich eine membranständige Expression von CD133, die, wie beschrieben (Fargeas *et al.*

2006), vor allem in Membranausläufern konzentriert ist. Durch eine stärkere Fixierung mit 4% PFA wurde das membranständige Signal nahezu vollständig zerstört, und es wurden vesikuläre Strukturen in Zellinneren detektiert. Das Vorkommen von CD133 in intrazellulären Vesikeln ist bisher noch nicht beschrieben worden, lediglich das Vorkommen sogenannter Prominosomen in der Neuralrohrflüssigkeit ist bekannt (Dubreuil *et al.* 2007). Da CD133 in den transfizierten Gliomzelllinien möglicherweise in unphysiologisch hohen Konzentrationen exprimiert wird, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Vesikeln um ein Artefakt der ektopen Expression handelt. Weitergehende Untersuchungen zu den intrazellulären CD133-positiven Strukturen sind notwendig.

### **Funktionelle Untersuchungen**

Um die möglichen Auswirkungen der CD133-Expression auf die Zellbiologie näher zu charakterisieren, wurden verschiedene zellbiologische Assays durchgeführt. Hierbei wurde die Proliferation, die Vitalität, die Tumorigenität *in vitro*, die Apoptoserate und die Migration im Transwell-Assay untersucht. Aufgrund des Vorkommens von CD133 auf einer besonders malignen und tumorigenen Subpopulation von Tumorzellen in soliden und hämatopoetischen Tumoren würde man einen „maligneren“ Phänotyp der CD133-positiven Zellen erwarten. In diesem Fall sollte die Apoptoserate erniedrigt und die Proliferation und Vitalität ebenso wie Tumorigenität und migratorische Aktivität erhöht sein. Dies konnte jedoch bisher in keiner der durchgeführten Untersuchungen eindeutig bestätigt werden. Für ein besseres Verständnis sollen in Zukunft zudem *in vivo* Tumorigenitätsstudien in Nacktmäusen durchgeführt werden. Nach den bisherigen Ergebnissen ist zu vermuten, dass CD133 zwar ein phänotypischer Marker für eine Subpopulation von Gliomzellen mit Tumorstammzeleigenschaften ist, dessen funktionelle Bedeutung für den Stammzellphänotyp aber limitiert erscheint. Die Tatsache, dass die CD133-Knockout-Maus abgesehen von der Retinadegeneration keinen offensichtlichen Phänotyp hat, bestätigt diese Vermutung (Fargeas *et al.* 2006).

### **Durchflusszytometrische und Mikroarray-basierte Expressionsanalyse**

Zur näheren Charakterisierung der transfizierten Zellen wurden die GFP- und CD133-Transfektanten des Zellklons T98G-C3 neben den untransfizierten Zellen exemplarisch in der Durchflusszytometrie untersucht. Das Expressionsprofil der ausgewählten Antigene unterschied sich nur in der Expression von CD133. Die Expression aller anderen untersuchten Antigene war in CD133-positiven und CD133-negativen Zellen gleich. Aufgrund dieses Befundes wurde von der Analyse der übrigen Zellklone abgesehen. Dieser Befund

weist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen darauf hin, dass durch die Transfektion mit CD133 der Phänotyp der Zellen nicht wesentlich verändert wird. Zudem wurde in der Durchflusszytometrie mit zehn Antikörpern nur eine sehr geringe Anzahl von Markern untersucht. Zur umfassenderen Untersuchung wurden daraufhin Mikroarray-Experimente durchgeführt.

Der Vergleich der Mikroarray-Expressionsprofile ergab nur sechs in allen Experimenten in CD133-positiven versus CD133-negativen Gliomzellen differenziell exprimierte Gene. Diese lassen sich nicht mit den bisherigen Daten über die Funktion von CD133 in einen plausiblen Zusammenhang bringen. Die veränderte *PROM1*-Expression konnte mit den verwendeten Mikroarrays nicht detektiert werden, da die entsprechenden Oligonukleotide in der 3'-untranslatierten Region des Gens liegen, welche nicht in dem transfizierten Plasmids enthalten war. Wie bereits dargestellt, wurde die differentielle Expression von CD133 daher mittels Realtime RT-PCR und Immunfluoreszenzfärbungen verifiziert. Die Clusteranalyse der Mikroarraydaten zeigte, wie aufgrund der geringen Anzahl von gemeinsam in allen Zelllinien differentiell regulierten Genen zu erwarten, eine höhere Ähnlichkeit innerhalb der untersuchten Zellklone als zwischen CD133-positiven und negativen Zellen. Diese Vermutung deckt sich mit den Resultaten aus den zellbiologischen Untersuchungen.

In Anbetracht der geringen Zahl der in allen Zelllinien differentiell exprimierten Gene lässt sich schlussfolgern, dass die Expression CD133 in den verwendeten Gliomzellen Zelltyp-spezifische Effekte hat, die sich von Gliomzelllinie zu Gliomzelllinie deutlich unterscheiden. Hierfür könnte sprechen, dass beim Vergleich der einzelnen Zelllinien 211 (T98G-C3), 860 (T98G-B6) bzw. 3384 (U138MG-C8) signifikant in CD133IRES- versus GFP-transfizierten Zellen differentiell exprimierte Transkripte gefunden wurden, während sich die Gruppen von CD133 transfizierten Zellen versus GFP-transfizierten Zellen lediglich in sechs Genen signifikant unterschieden. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Schnittmenge der differentiell exprimierten Gene ist, dass das Protein in den Zellen nicht in allen Fällen seine Funktion erfüllen kann, weil z. B. essentielle Interaktionspartner fehlen. Gliomzellen haben bekanntlicherweise eine Vielzahl genetischer Veränderungen (Rasheed und Bigner 1991), wobei Gliomzelllinien eine noch größere Zahl von Veränderungen aufzuweisen scheinen als die Ursprungstumoren (Li *et al.* 2008). Es ist also denkbar, dass mögliche Interaktionspartner oder Zielgene von CD133 in den Gliomzelllinien mutiert, epigenetisch herunterreguliert oder deletiert sind, sodass CD133 nicht funktionell aktiv sein kann. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass aufgrund der künstlich erzeugten unphysiologisch hohen CD133-Expression das Protein nicht rich-

tig in den Zellen lokalisiert ist und in den oben beschriebenen vesikulären Strukturen akkumuliert. Auch in diesem Fall könnte die Funktion des Proteins gestört sein. Eine stark veränderte Struktur des Proteins erscheint aufgrund der Bindung des spezifischen CD133/1 Antikörpers an das AC133-Epitop unwahrscheinlich. Das gleiche gilt für Fehler in der Gensequenz, da die Konstrukte mittels Sequenzierung überprüft wurden.

In der Literatur wurden bisher keine Transfektion von CD133 in Gliomzelllinien beschrieben. Neueren Untersuchungen relativieren die Rolle von CD133 als Tumorstammzellmarker. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sowohl C6 Rattengliomzellen als auch Gliomzellen aus humanen Tumorsektaten ein tumorigenes Potential besitzen, das unabhängig von der Expression von CD133 ist (Zheng *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008) und dass es CD133-negative Gliomzellen gibt, die Stammzeleigenschaften aufweisen (Beier *et al.* 2007). Die hier gezeigten Ergebnisse sprechen ebenso wie die genannten Studien dafür, dass die Expression von CD133 weder einen spezifischen Marker für Gliomstammzellen darstellt, noch funktionell an dem Stammzellphänotyp von Gliomzell-Subpopulationen beteiligt ist. Zur genauen Charakterisierung der Funktion von CD133 sind weitere Untersuchungen notwendig.

## 4.2 Analyse der zielgerichteten Migration von USSC zu Gliomzellen

### 4.2.1 Untersuchung der Migration von USSC zu Gliomzelllinien *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass neurale Stammzellen für die Gentherapie von Hirntumoren ein geeignetes Vehikel sein könnten (Aboody *et al.* 2000), wurden auch andere Stammzelltypen, wie zum Beispiel Knochenmarkstammzellen (Tabatabai *et al.* 2005), auf dieses Potential hin untersucht. USSC scheinen aufgrund ihres unreifen Status (Kögler *et al.* 2004) und ihrer problemlosen Verfügbarkeit ebenfalls für einen solchen möglichen Therapieansatz geeignet zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass USSC *in vitro* von verschiedenen humanen und aus der Ratte stammenden Gliomzelllinien angelockt werden, nicht jedoch von nahezu ebenso schnell proliferierenden Fibroblasten. Der genaue Mechanismus der USSC-Migration ist bislang unklar, wobei vermutlich von den Gliomzellen sezernierte Faktoren die Migration auslösen. Diese Annahme wird durch den Befund untermauert, dass auch das von Gliomzellen konditionierte Medium eine Migration induzieren konnte, das von Fibroblasten konditionier-

te Medium oder Zellkulturmedium allein dagegen nicht. Bei Knochenmarkstammzellen wurde unter anderem CXCL12 als ein Faktor beschrieben, der eine Migration induzieren kann (Tabatabai *et al.* 2005). Da die Migration der USSC jedoch nicht durch CXCR4-Antikörper oder PI3-Kinase-Inhibitoren gehemmt werden konnte, scheint dieses Rezeptorsystem keine bedeutende Funktion bei der Migration von USSC zu spielen. Ein weiterer möglicher Faktor für die Migration von Stammzellen zu Gliomzellen ist der *Hepatocyte Growth Factor* oder *Scatter Factor* (HGF/SF) (Heese *et al.* 2005), der bereits im Zusammenhang mit der Migration von USSC beschrieben wurde. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein HGF-neutralisierender Antikörper die Migration von USSC zu apoptotischen Neuronen (Trapp *et al.* 2008) und zu F98-Rattengliomzellen um 90 % reduzieren konnte (Trapp *et al.*, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse wurden in einem sogenannten Under Agarose Assay erzielt, bei dem die Stammzellen in einer mit Agarose ausgegossenen 6-well Platte in den Bereich unter der Agarose einwandern. Im Transwell-Assay hatten jedoch weder der HGFR neutralisierende Antikörper noch der HGF-neutralisierende Antikörper einen Einfluss auf die Migration. Die Antikörper wurden in der gleichen Konzentration (1-5 µg/ml) und mit einer ebenso langen Vorinkubation (2h) eingesetzt, wie im Agarose-Assay. Dennoch deutet eine erhöhte HGFR Expression der migrierten Zellen auf eine Funktion des Rezeptors bei der Migration hin. Die mangelnde Hemmwirkung der HGF- bzw. HGFR-blockierenden Antikörper im Transwell- aber nicht im Agarose-Assay deutet möglicherweise auf unterschiedliche Mechanismen der Migration in den beiden Assays hin.

#### 4.2.2 Mikroarray-basierte Expressionsanalyse von migrierten versus nicht migrierten USSC

Für eine nähere molekularbiologische Charakterisierung der an der USSC-Migration beteiligten Signalwege wurde die RNA von im Transwell-Assay migrierten und nicht migrierten USSC aus zwei Experimenten mittels Affymetrix<sup>®</sup>-Expressionsarrays (HG U133A 2.0) untersucht. Dabei wurden mit Hilfe der Chip Yard-Software 151 differentiell exprimierte Gene identifiziert, von denen 20 einen Log fold change von  $> 1$  bzw.  $< -1$  zeigten. Drei dieser Gene sollen hier in Bezug auf ihre Funktion bei migratorischen Vorgängen näher betrachtet werden.

Hierzu gehört der *Chemokine orphan receptor 1* (CXCR7), welcher in der migrierten Zellfraktion herunterreguliert ist. CXCR7 ist wie CXCR4 ein Rezeptor für SDF-1 oder CXCL12 und bindet außerdem I-TAC (CXCL11) wofür bisher nur der Rezeptor CXCR3

bekannt war. Im Gegensatz zu CXCR4 führt die Bindung des Liganden an CXCR7 nicht zu einer Aktivierung der Migration, sondern zu einer verringerten Apoptoserate und einer erhöhten Adhäsionsfähigkeit (Burns *et al.* 2006). Es kann somit als Gegenspieler zu dem Rezeptor CXCR4 betrachtet werden. CXCL12 wird von zahlreichen Gliomzelllinien exprimiert und wurde wie oben erwähnt als chemotaktischer Reiz für Stammzellen beschrieben (Tabatabai *et al.* 2005). Da die Migration der Zellen durch CXCL12 über CXCR7 gehemmt wird, erscheint es logisch, dass der Rezeptor von den migrierenden USSC in einem geringeren Maße exprimiert wird als von den nicht migrierenden USSC. Die Matrix-Metalloprotease 14 (MMP14) oder Membran-Typ 1 Matrix-Metalloprotease (MT1-MMP) spielt eine Rolle bei der Migration durch eine extrazelluläre Proteinmatrix, welche durch die Protease durchlässig gemacht wird. So ist MT1-MMP am Mechanismus der Invasion und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten, wie Leberzellkarzinom (Ip *et al.* 2005), Prostatakarzinom (Cao *et al.* 2005), Melanom (Iida *et al.* 2004) und Gliom (Beliën *et al.* 1999, Deryugina *et al.* 2002) beteiligt. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass MT1-MMP außerdem für die Invasion mesenchymaler Stammzellen eine wichtige Rolle spielt (Ries *et al.* 2007). Bei der Untersuchung der Invasion in eine Matrix würde man eine Hochregulation von MT1-MMP in den invadierenden Zellen erwarten. In dem hier untersuchten System war jedoch keine matrixähnliche Struktur gegeben. Möglicherweise wird MT1-MMP bei der ungehinderten Migration, d. h. in Abwesenheit einer Matrix-Barriere, herunterreguliert.

Die Hochregulation des *insulin-like growth factor binding protein 7* (IGFBP7) oder *IGF-binding protein-related protein 1* (IGFBP-rP1) könnte auf eine Rolle des *Insulin-like growth factors* (IGF) bei der Migration hindeuten. IGF-bindende Proteine regulieren durch die Bindung an IGF dessen Verfügbarkeit und Rezeptorbindung (OMIM-Datenbank). Da das IGF-System in vielen Tumorerkrankungen eine Rolle spielt, wurden die IGF-bindenden Proteine IGFBP-1, -3 und -7 als potentielle Tumorsuppressorgene für Brustkrebs (Subramanian *et al.* 2007) und IGFBP7 für Kolonkarzinom (jing Ruan *et al.* 2006) beschrieben. IGF wurde zudem bereits mehrfach im Zusammenhang mit der Migration unreifer Zellen beschrieben. So spielt IGF eine wichtige Rolle bei der Migration mesenchymaler Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Fiedler *et al.* 2006), verbessert die *in vivo* Migration humaner Myoblasten (Lafreniere *et al.* 2004) und erhöht die migratorische Kapazität mesenchymaler Stammzellen (Li *et al.* 2007). Da IGFBP7 die Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors IGF reguliert, würde man unter Berücksichtigung der oben zitierten Studien eher einen negativen Effekt der IGFBP7-Expression auf die Migration erwarten. IGFBP7 wurde jedoch außerdem als Marker für die Qualitätskon-

trolle von Knochenmarksstammzellen vor der therapeutischen Implantation vorgeschlagen (Igarashi *et al.* 2007). Es hat also den Anschein, als ob IGFBP7 in Stammzellen einen positiver Modulator des IGF-Systems darstellen würde. Diese Hypothese wird durch die erhöhte Expression von IGFBP7 in den migrierenden USSC unterstützt.

Um die Mikroarraydaten funktionell besser einordnen zu können, wurden auf Basis der 151 differentiell exprimierten Gene mit Hilfe der *Comprehensive Gene Pathway analysis*-Software Signalwege bestimmt, die an mehreren Punkten reguliert waren. Basierend auf den p-Werten, der Expressionsänderungen und der Zahl der regulierten Gene wurden den Signalwegen eine Priorität zugeordnet. Insgesamt konnten 46 in den migrierten USSC herunterregulierte und 18 hochregulierte Signalwege ermittelt werden. Unter den Signalwegen, die in den migrierten Zellen weniger aktiv waren, finden sich vor allem solche, die die Apoptoseneigung (*Apoptosis*) und Stoffwechselvorgänge, wie RNA- oder Ubichinon-Synthese (*RNA-polymerase, Ubiquinone biosynthesis*) und den Proteinabbau (*Proteasome*) betreffen. Die Signalwege, die in den degenerativen Erkrankungen ALS und M. Huntington eine Rolle spielen, sind, ebenso wie die aufgeführten Tumorerkrankungen *Chronic myeloid leukemia* und *Colorectal cancer*, durch eine geänderte Apoptoserate gekennzeichnet. Hier spielt vor allem die Regulation des Onkogens TP53 eine große Rolle. Desweiteren ist die Zelladhäsion (*Cell adhesion molecules*) verringert. Man kann also sagen, dass alle Zellen, in denen Apoptose- oder Stoffwechselvorgänge aktiv sind, weniger stark migrieren. Demgegenüber sind vor allem Signalwege aktiviert, die bei der allgemeinen Motilität der Zellen eine Rolle spielen (*ECM-receptor interaction, Adherens junction, Focal adhesion, Regulation of actin cytoskeleton, Cell Communication*). Zudem sind Signalwege, die die Energieversorgung der Zellen gewährleisten, aktiviert (*Starch and sucrose metabolism, Fatty acid metabolism*). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Aktivierung des Zuckerstoffwechsels, da ja bei der Optimierung der Versuchsbedingungen festgestellt worden war, dass die Glukose-Konzentration im Medium einen Einfluss auf die Migrationsaktivität hat. Die verstärkte Aktivität des *TGF- $\beta$  signaling pathway* deutet auf eine wichtige Funktion von TGF- $\beta$  bei der USSC-Migration hin. Die Sekretion von TGF- $\beta$  durch Gliomzellen wurde bereits beschrieben (Bodmer *et al.* 1991), sodass der Schluss nahe liegt, dass die Migration von USSC durch TGF- $\beta$  induziert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit Hilfe des Transwellassays USSC für die RNA-Extraktion in die beiden unterschiedlichen Fraktionen migrierte und nicht migrierte Zellen aufgetrennt werden konnten. Als neuer Kandidat für die Induktion USSC-Migration konnte TGF- $\beta$  identifiziert werden. Die Rolle dieses Chemokines für den Tro-

pismus von USSC zu Gliomzellen soll in weiterführenden Experimenten näher charakterisiert werden.

### 4.2.3 Untersuchung der Migration von USSC *in vivo*

Nach der Implantation in das Striatum gesunder Fisher-Ratten konnte eine Migration einzelner Stammzellen in den zerebralen Kortex gezeigt werden. Da sich an der Implantationsstelle jedoch eine massive Reaktion, gekennzeichnet durch Astrogliose und Makrophageneinwanderung, entwickelte, scheint eine intrazerebrale Implantation nicht optimal für die Applikation von USSC zu sein. Die Stärke der Astrogliose und das Überleben der implantierten USSC wurde dabei nicht durch die Immunsuppression mit Ciclosporin A beeinflusst. Ein fehlender Effekt der Immunsuppression mit Ciclosporin A wurde auch für die Implantation humaner neuraler Progenitorzellen in ein Ratten-Parkinsonmodell beschrieben (Schwarz *et al.* 2006). Die Autoren beobachteten, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, eine Aktivierung von Astrozyten und Makrophagen an der Implantationsstelle, die sie allerdings als schwach bewerteten (Schwarz *et al.* 2006). Der Beobachtungszeitraum war mit vier Monaten deutlich länger als bei den hier vorgestellten Experimenten, bei denen die Tiere bereits maximal zwölf Tage nach der Implantation getötet worden waren. Möglicherweise war die von Schwarz *et al.* beschriebene Immunreaktion wegen des längeren Zeitraums bereits abgeklungen. Zudem wird in dem für diese Arbeit gewählten Modell zusätzlich zu dem durch den Eingriff verletzten Gewebe von den USSC selbst verschiedene Zytokine sezerniert, die die Einwanderung von Makrophagen verstärken können (Kögler *et al.* 2005). Demgegenüber wurde in einer anderen Studie bei der Transplantation muriner Knochenmarkstammzellen in einem Schlaganfallmodell ein positiver Effekt der Immunsuppression auf das Überleben der transplantierten Zellen und die Immunreaktion gefunden (Irons *et al.* 2004). In diesem Fall waren die Stammzellen bereits drei Tage vor der Läsionierung implantiert und die Tiere nach weiteren drei Tagen getötet worden. Obwohl der beschriebene Beobachtungszeitraum dem der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente in etwa entspricht, sind die Ergebnisse wegen der unterschiedlichen Herkunft der transplantierten Zellen (murin versus human) nicht ohne weiteres übertragbar. Es ist denkbar, dass durch die größere genetische Nähe des Spenderorganismus (Maus) zum Empfängerorganismus (Ratte), die Abstoßungsreaktion möglicherweise zum Teil auf anderen immunologischen Mechanismen beruht und folglich anders auf die Behandlung mit Ciclosporin A anspricht. Für die intrakranielle Implantation von USSC kann somit unter Umständen auf eine Immunsuppression verzichtet werden. Für eine fundierte Aussage ist jedoch die systematische Untersuchung der ver-

schiedenen Parameter in einer größeren Versuchsreihe notwendig. Bei der systemischen Implantation ist wegen der direkten Applikation der Zellen in die Blutbahn bei allen Versuchstieren eine Immunsuppression durchgeführt worden.

In der Arbeit von Tabatabai *et al.* (2005) wurden die Stammzellen systemisch über die Schwanzvene in Nacktmäuse injiziert, wodurch eine Läsionierung des Hirngewebes umgangen wurde. Bei Ratten birgt jedoch diese Form der Injektion eine mögliche Fehlerquelle, da diese Tiere nicht gut fixiert werden können und die Haut des Schwanzes stark verhornt ist. Eine Narkose kommt wegen der vasokonstriktorischen Wirkung nicht in Betracht. Deshalb fiel die Entscheidung, in den folgenden Experimenten die USSC unter Narkose über einen venösen Katheter in die Vena femoralis zu injizieren. In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass USSC nach systemischer Applikation in das Gehirn einwandern können. Dennoch zeigten weitere Experimente im F98-Tumormodell keine Anreicherung der Zellen im Tumor. Vereinzelt wurden Zellen in der Leber und der Lunge der Tiere gefunden. Ein möglicher Grund für die fehlende Einwanderung der USSC in den Tumor könnte ein zu knapp bemessener Beobachtungszeitraum sein. Im Gegensatz zu anderen Modellen, wie beispielsweise Modellen für Schlaganfall oder Morbus Parkinson, ist die Versuchsdauer bei einem Gliommodell durch die rapide Progression des Tumors eingeschränkt. Da in den erstgenannten Fällen die Behandlung mit Stammzellen auf einen klinischen Effekt durch die Regeneration des zerstörten Gewebes abzielt, werden meist Beobachtungszeiträume von mehreren Wochen bis Monaten gewählt (Shyu *et al.* 2006, Schwarz *et al.* 2006). In dem hier untersuchten Fall sollten die Tiere beim Auftreten der ersten durch die Tumorprogression bedingten Symptome, zumeist Paresen, Ataxien oder Gewichtsverlust, getötet werden. In der Regel war der Untersuchungszeitraum damit auf zwei bis drei Wochen begrenzt. In anderen Studien wurde ein ähnliches Protokoll gewählt: So wurden die murinen neuronalen Stammzellen in der Arbeit von Aboody *et al.* (Aboody *et al.* 2000) am Tag 6 nach der Tumorzellimplantation intrazerebral appliziert und die Tiere zu den Zeitpunkten Tag 12 und Tag 21 getötet. In der Arbeit von Tabatabai *et al.* (Tabatabai *et al.* 2005) erfolgte die intravenöse Gabe der Knochenmarkstammzellen je nach Tumormodell 15 bzw. 22 Tage nach der Tumorzellimplantation und die Tiere wurden 48 Stunden nach der Stammzellimplantation getötet. Da in beiden Studien eine Anreicherung der jeweiligen Stammzellen im Tumor gefunden wurde, erscheint der für diese Arbeit gewählte Zeitraum nach der Stammzellapplikation von 12 Tagen für die intrazerebrale Implantation und zwei bis vier Tagen für die systemische Stammzellgabe als sinnvoll.

Die Detektion einer Anti-Human Nuclei-Immunfluoreszenz in Leber und Lunge der Tiere

könnte ein Hinweis darauf sein, dass USSC möglicherweise in diesen Organen akkumulieren und aus diesem Grund nicht in das Gehirn der Tiere einwandern können. Ein Grund dafür könnten die Größe der USSC sein, welche mit etwa  $20\ \mu\text{m}$  Länge in der Monolayerkultur deutlich größer sind als beispielsweise hämatopoetische Stammzellen (Kögler *et al.* 2004). Für die genauere Untersuchung dieser Hypothese sind jedoch weitere Experimente notwendig.

Eine andere Ursache für die negativen Befunde der Migrationsexperimente *in vivo* könnte ein ungünstig gewähltes Tiermodell sein. F98-Tumoren wachsen im Gegensatz zu humanen Glioblastomen scharf abgegrenzt und wenig invasiv, sodass sie sich nicht für die Untersuchung jeder Fragestellung eignen. In dem hier betrachteten Fall war jedoch das Ziel der Studie, den Tropismus von USSC zu den Gliomzellen zu untersuchen, was ein invasives Wachstum des Tumors nicht zwingend erforderte. Da *in vitro* bereits eine Migration von USSC zu F98-Gliomzellen gezeigt werden konnte, erschien das Modell geeignet. In anderen Arbeiten konnte zudem ebenfalls eine Migration von neuronalen (Arnhold *et al.* 2003) und mesenchymalen (Wu *et al.* 2008) Stammzellen zu F98-Gliomzellen gezeigt werden.

Über die Untersuchung der Migration von Nabelschnurblutstammzellen zu Gliomzellen *in vivo* ist bisher wenig bekannt, jedoch wurde bereits über die intrazerebrale Migration von humanen Nabelschnurstammzellen in anderen Tiermodellen berichtet. Für USSC liegen bisher nur die Befunde für die Transplantation in das gesunde Rattengehirn vor. In diesem Fall konnten drei Monate nach der intrazerebralen Transplantation im Gehirn der Versuchstiere USSC nachgewiesen werden. Aufgrund der weiten Verteilung der Zellen im Gehirn, postulieren die Autoren ein hohes migratorisches Potential für USSC (Kögler *et al.* 2004). Daneben konnte sowohl für aus dem gallertigen Bindegewebe der Nabelschnur isolierte mesenchymale Stammzellen (Ding *et al.* 2007) als auch für die mononukleäre Zellfraktion aus Nabelschnurblut (Meier *et al.* 2006) gezeigt werden, dass diese Zellen in ischämische Bereiche des läsierten Rattengehirns einwandern können. Vermutlich werden USSC trotz Immunsuppression von dem Immunsystem der Tiere, zum Beispiel durch Makrophagen, geschädigt. Aufgrund der *in vitro* gezeigten USSC-Migration zu Gliomzellen, erscheint es deshalb sinnvoll, weitere Untersuchungen in immundefizienten Nacktmäusen durchzuführen.

## 5 Zusammenfassung

Der häufigste primäre Hirntumor des Menschen ist das Glioblastom. Wegen seines stark invasiven Wachstums ist dieser Tumor nie vollständig resektabel. Dazu kommen häufig primäre und sekundäre Resistenzen gegen Strahlen- und Chemotherapie, so dass es momentan keine befriedigende Therapieoption für diese Tumorerkrankung gibt. In dieser Arbeit soll die Rolle von Stammzellen bei der Entstehung (I) und Therapie (II) von Glioblastomen untersucht werden.

ad I) Neuere Theorien über die Tumorentstehung gehen davon aus, dass es sich bei soliden Tumoren um aberante Gewebe handelt, die aus differenzierteren und undifferenzierteren Zellen bestehen. Die letzteren Zellen, die sogenannten Tumorstammzellen, scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Rezidiven und Therapieresistenzen zu spielen. Deshalb ist es notwendig, Tumorstammzellen gezielt mit einer Therapie zu erreichen, um eine Heilung zu ermöglichen. Ein potenzieller Marker für Tumorstammzellen in Gliomen, und damit ein mögliches Zielmolekül für die Therapie, ist Prominin-1 oder CD133. Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein, dessen physiologische Funktion bislang unbekannt ist. In einer Expressionsanalyse an einer Serie von Gliomen mit verschiedenen Malignitätsgraden konnte gezeigt werden, dass Glioblastome eine erhöhte Expression von CD133 im Vergleich zu niedriggradigen Astrozytomen und zu Kontrollgewebe zeigen. Daraufhin wurde CD133 durch lentivirale Transfektion in ursprünglich CD133-negative humane Gliomzelllinien eingebracht, um die Funktion des Proteins näher zu charakterisieren. Die Überexpression von CD133 im Vergleich zu untransfizierten und GFP-transfizierten Kontrollzellen konnte in der Durchflusszytometrie, in der Immunfluoreszenz und in der Realtime RT-PCR nachgewiesen werden. Es konnte jedoch in funktionellen Untersuchungen kein konsistenter Einfluss der CD133-Expression auf Vitalität, Apoptoserate, Proliferation oder Migration von Gliomzellen nachgewiesen werden. Die Mikroarray-basierte Expressionsanalyse zeigte nur wenige Änderungen des Expressionsprofils.

II) Stammzellen haben die Fähigkeit des sogenannten „homing“, d. h. sie können aus der Blutbahn in bestimmte Gewebe einwandern und dort die Regeneration von zerstörtem oder verletztem Gewebe initiieren. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten,

dass einige Stammzellen auch in Tumoren einwandern und dort nach Transfektion mit einem Suizidgen therapeutisch wirksam sein können. In dieser Arbeit wurde die Eignung von Nabelschnurblutstammzellen oder Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) für einen solchen Therapieansatz untersucht. Im Transwell-Versuch konnte gezeigt werden, dass sowohl aus der Ratte stammende als auch humane Gliomzelllinien eine stärkere USSC-Migration induzieren als Medium oder Kontrollzelllinien. Der Mechanismus der Migration von USSC zu Gliomzellen ist bislang unklar, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass von den Gliomzellen sezernierte Faktoren die Migration auslösen. In der Literatur wurden unter anderem CXCL12 und HGF als Faktoren beschrieben, die eine Migration von Stammzellen induzieren können. Da sich die Migration der USSC jedoch nicht durch eine Hemmung des CXCR4/PI3-Kinase-Signalweges oder des HGF/HGFR-Signalweges beeinflussen ließ, scheinen diese Rezeptorsysteme hier keine entscheidene Rolle zu spielen. Die Mikroarray-basierte Expressionsanalyse von migrierten versus nicht migrierten USSC ergab eine Vielzahl von differenziell exprimierten Genen, die größtenteils am Energiestoffwechsel und der Motilität der Zellen beteiligt sind. Als neuer Kandidat für die Induktion USSC-Migration konnte TGF- $\beta$  identifiziert werden. Die Rolle dieses Chemokins für den Tropismus von USSC zu Gliomzellen soll in weiterführenden Experimenten näher charakterisiert werden. Nach der Implantation in das Striatum von gesunden Fisher-Ratten konnte eine Migration der Stammzellen in den zerebralen Kortex gezeigt werden. Da sich an der Implantationsstelle eine massive Reaktion, gekennzeichnet durch Astrogliose und Makrophageneinwanderung, entwickelte, wurden in weiteren Experimenten USSC unter Narkose in die Vena femoralis zu injiziert. Bei der histologischen Untersuchung konnten USSC in Leber und Lunge der Versuchstiere nachgewiesen werden, es fand jedoch keine Anreicherung der Stammzellen in intrazerebralen Gliomen statt. Das verwendete Tiermodell ist somit für die Untersuchung der Eignung von USSC für die Gliomtherapie nicht optimal geeignet.

Zusammengefasst zeigen die eigenen Resultate eine begrenzte funktionelle Aktivität von CD133 nach Expression in etablierten humanen Gliomzellen *in vitro*. Für humane USSC aus Nabelschnurblut wurde ein Tropismus für humane und experimentelle Gliome *in vitro* nachgewiesen. *In vivo* konnten diese Stammzellen allerdings nach intravenöser Gabe nicht innerhalb von intrazerebralen F98-Gliomen nachgewiesen werden, was vermutlich daran liegt, dass die USSC in der Lunge und der Leber abgefangen werden. Zur genaueren präklinischen Abklärung der potentiellen Rolle von USSC in Stammzell-basierten therapeutischen Ansätzen für Gliome bedarf es daher weitergehender Untersuchungen in anderen tierexperimentellen Gliommodellen.

## 6 Abstract

Glioblastomas are the most common and most malignant primary brain tumours. Despite intensive multimodal therapy, including operation, radiotherapy and chemotherapy, most glioblastoma patients can not be cured and have a poor prognosis as indicated by a mean survival of less than 12 months after diagnosis. This thesis is focussed on the role of stem cells in pathogenesis (I) and therapy (II) of glioblastomas.

ad I) In recent years, the tumour stem cell model of tumourigenesis has received increasing attention. This model proposes that solid tumours are aberrant tissues that consist of differentiated and undifferentiated cells. The latter are termed tumour stem cells and seem to play an important role in the development of therapy resistance and tumour recurrences. It would therefore be favourable to develop therapies that specifically target tumour stem cells. A possible marker for glioma stem cells is the transmembrane protein prominin-1 also known as CD133. Expression analysis of a series of gliomas with different malignancy grades showed the highest CD133 expression in glioblastomas compared to lower grade astrocytomas and non-neoplastic brain tissue. Surprisingly established glioma cell lines showed no expression of CD133 *in vitro* when grown in monolayer cultures. As the physiological function is still unknown, we investigated the effects of CD133 overexpression in established glioma cell lines using lentiviral transfection. CD133 expression in transfected cell lines was validated by flow cytometry, immunofluorescence staining and realtime RT-PCR. There were no consistent differences in CD133 transfected versus control cells regarding cell vitality, proliferation, apoptosis or migration. Microarray expression profiling showed only very few changes in CD133 transfected cells versus GFP transfected cells.

ad II) Stem cells have the ability to invade from blood vessels into diseased or injured tissue to initiate regeneration. This behaviour is called „homing“. Previous studies showed that stem cells also migrate towards tumours and may be used as vehicles for targeted gene therapy of gliomas. In this work the potential role of human cord blood derived stem cells, so-called unrestricted somatic stem cells (USSC) in experimental glioma therapy was investigated. Using a transwell migration assay it could be shown that both rodent and human glioma cell lines induce a stronger directed USSC migration

than medium or control cell lines. The mechanism of USSC attraction by glioma cells is still unknown but it is likely that glioma cells secrete migration-inducing factors into the medium. Examples of proteins that were proposed to induce stem cell migration are CXCL12 and HGF. As USSC migration could not be reduced by inhibition of the CXCR4/PI3-kinase pathway or the HGF/HGFR pathway, these systems do not seem to play a crucial role in this context. Microarray-based expression analysis revealed several differentially regulated genes in migrating versus non-migrating cells. Most of these genes are involved in energy metabolism or motility of cells. TGF- $\beta$  was identified as a new candidate for the tropism of USSC towards glioma cells. Thus, the role of TGF- $\beta$  in USSC migration should be further characterized in the future. After implantation into the striatum of healthy Fisher rats individual USSC were found at distant sites from the implantation site, such as the cerebral cortex. However, intracerebral transplantation of USSC was accompanied by a massive gliosis and invasion of macrophages at the implantation site. Therefore, USSC were applied systematically via the femoral vein. In histological analyses USSC were detected in the liver and the lung of the animals, but there was no enrichment of stem cells found intracerebral F98 gliomas.

Taken together, the present study shows limited functional activity of CD133 when expressed in established glioma cell lines *in vitro*. Human USSC were shown to demonstrate a tropism for human and rodent glioma cells *in vitro*. However, systematic application of USSC via the femoral vein did not result in intratumoural accumulation in intracerebral F98 rat gliomas, probably due to the fact that USSC are trapped in lung and liver. Thus, other *in vitro* models are necessary to further evaluate the potential of USSC in stem cell-based therapeutic approaches of gliomas.

# Literaturverzeichnis

- Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23):12846–12851.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7):3983–3988.
- Arnhold S, Hilgers M, Lenartz D, Semkova I, Kochanek S, Voges J, Andressen C, Addicks K. 2003. Neural precursor cells as carriers for a gene therapeutical approach in tumor therapy. *Cell Transplant*, 12(8):827–837.
- Asher R, Bignami A. 1992. Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes. *Exp Cell Res*, 203(1):80–90.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120):756–760.
- Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. 2007. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*, 109(12):5494–5501.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brwanski A, Bogdahn U, Beier CP. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, 67(9):4010–4015.
- Beliën AT, Paganetti PA, Schwab ME. 1999. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol*, 144(2):373–384.

- Bhatt RI, Brown MD, Hart CA, Gilmore P, Ramani VAC, George NJ, Clarke NW. 2003. Novel method for the isolation and characterisation of the putative prostatic stem cell. *Cytometry A*, 54(2):89–99.
- Bodmer S, Huber D, Heid I, Fontana A. 1991. Human glioblastoma cell derived transforming growth factor-beta 2: evidence for secretion of both high and low molecular weight biologically active forms. *J Neuroimmunol*, 34(1):33–42.
- Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7):730–737.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 203(9):2201–2213.
- Cao J, Chiarelli C, Kozarekar P, Adler HL. 2005. Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis. *Thromb Haemost*, 93(4):770–778.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 65(23):10946–10951.
- Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic*, 2(2):82–91.
- Corbeil D, Röper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB. 2000. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 275(8):5512–5520.
- Deryugina EI, Soroceanu L, Strongin AY. 2002. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res*, 62(2):580–588.
- Diehn M, Clarke MF. 2006. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*, 98(24):1755–1757.

- Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, Lin SZ, Chang YC, Wang HJ, Su CY, Li H. 2007. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiol Dis*, 27(3):339–353.
- Dubreuil V, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB, Wilsch-Bräuninger M. 2007. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol*, 176(4):483–495.
- Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M. 1994. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol*, 126(3):783–799.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Belle PAV, Xu X, Elder DE, Herlyn M. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 65(20):9328–9337.
- Fargeas CA, Corbeil D, Huttner WB. 2003. AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells*, 21(4):506–508.
- Fargeas CA, Fonseca AV, Huttner WB, Corbeil D. 2006. Prominin-1 (CD133): from progenitor cells to human diseases. *Future Lipidology*, 1(2):213–225.
- Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. 2007. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 19(1):56–62.
- Fiedler J, Brill C, Blum WF, Brenner RE. 2006. IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 345(3):1177–1183.
- Finnson KW, Tam BYY, Liu K, Marcoux A, Lepage P, Roy S, Bizet AA, Philip A. 2006. Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *FASEB J*, 20(9):1525–1527.
- Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. 2005. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res*, 319(1):15–26.

- Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D. 2007. A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(3):908–913.
- Ge L, Resnick NM, Ernst LK, Salvucci LA, Asman DC, Cooper DL. 1995. Gene therapeutic approaches to primary and metastatic brain tumors: II. ribozyme-mediated suppression of CD44 expression. *J Neurooncol*, 26(3):251–257.
- Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Höhn J, Freund D, Giesen K, Fischer J, Kögler G, Wernet P. 2004. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 104(8):2332–2338.
- Guillamo JS, Lisovoski F, Christov C, Guérinel CL, Defer GL, Peschanski M, Lefrançois T. 2001. Migration pathways of human glioblastoma cells xenografted into the immunosuppressed rat brain. *J Neurooncol*, 52(3):205–215.
- Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. 2006. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 24(3):506–513.
- Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, Kawai K, Koshikawa K, Yuasa N, Takahashi T, Yatabe Y, Murakumo Y, Zhang JM, Nimura Y, Takahashi M. 2004. Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene*, 23(20):3716–3720.
- Haynik DM, Roma AA, Prayson RA. 2007. HER-2/neu expression in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 15(1):56–58.
- Heese O, Disko A, Zirkel D, Westphal M, Lamszus K. 2005. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro Oncol*, 7(4):476–484.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):15178–15183.
- von Holst A, Sirko S, Faissner A. 2006. The unique 473HD-Chondroitinsulfate epitope is expressed by radial glia and involved in neural precursor cell proliferation. *J Neurosci*, 26(15):4082–4094.
- Igarashi A, Segoshi K, Sakai Y, Pan H, Kanawa M, Higashi Y, Sugiyama M, Nakamura K, Kurihara H, Yamaguchi S, Tsuji K, Kawamoto T, Kato Y. 2007. Selection of

- common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: effects of passage number and donor age. *Tissue Eng*, 13(10):2405–2417.
- Iida J, Wilhelmson KL, Price MA, Wilson CM, Pei D, Furcht LT, McCarthy JB. 2004. Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. *J Invest Dermatol*, 122(1):167–176.
- Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST. 2005. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11(40):6269–6276.
- Irons H, Lind JG, Wakade CG, Yu G, Hadman M, Carroll J, Hess DC, Borlongan CV. 2004. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. *Cell Transplant*, 13(3):283–294.
- Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P. 2005. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol*, 33(5):573–583.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*, 200(2):123–135.
- Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, Fahime EE. 2004. Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*, 77(11):1741–1747.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood*, 106(6):1901–1910.
- Law ME, Templeton KL, Kitange G, Smith J, Misra A, Feuerstein BG, Jenkins RB. 2005. Molecular cytogenetic analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 160(1):1–14.
- Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, Rosenblum M, Mikkelsen T, Zenklusen JC, Fine HA. 2008. Genomic changes and gene expression profiles

- reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res*, 6(1):21–30.
- 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(6):503–508.
- Li Y, Yu X, Lin S, Li X, Zhang S, Song YH. 2007. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(3):780–784.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*, 114(2):97–109.
- Maw MA, Corbeil D, Koch J, Hellwig A, Wilson-Wheeler JC, Bridges RJ, Kumaramanickavel G, John S, Nancarrow D, Röper K, Weigmann A, Huttner WB, Denton MJ. 2000. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet*, 9(1):27–34.
- Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A. 2006. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res*, 59(2):244–249.
- Michaelides M, Hunt DM, Moore AT. 2003. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet*, 40(9):641–650.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90(12):5013–5021.
- Monaghan M, Mulligan KA, Gillespie H, Trimble A, Winter P, Johnston PG, McCormick D. 2000. Epidermal growth factor up-regulates CD44-dependent astrocytoma invasion in vitro. *J Pathol*, 192(4):519–525.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(6):479–489.

- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170(5):1445–1453.
- Okada H, Yoshida J, Sokabe M, Wakabayashi T, Hagiwara M. 1996. Suppression of CD44 expression decreases migration and invasion of human glioma cells. *Int J Cancer*, 66(2):255–260.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49(1):33–64, 1.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. 2006. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 25(12):1696–1708.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. 2005. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, 65(14):6207–6219.
- Rasheed BK, Bigner SH. 1991. Genetic alterations in glioma and medulloblastoma. *Cancer Metastasis Rev*, 10(4):289–299.
- Reifenberger G, Bilzer T, Seitz RJ, Wechsler W. 1989. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in ethylnitrosourea-induced rat gliomas and glioma cell lines. *Acta Neuropathol (Berl)*, 78(3):270–282.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18(4):399–404.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859):105–111.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109(9):4055–4063.
- Röper K, Corbeil D, Huttner WB. 2000. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol*, 2(9):582–592.

- jing Ruan W, Lin J, ping Xu E, ying Xu F, Ma Y, Deng H, Huang Q, jian Lv B, Hu H, Cui J, juan Di M, kang Dong J, de Lai M. 2006. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role against colorectal carcinogenesis with its expression associated with DNA hypomethylation of exon 1. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7(11):929–932.
- Schwarz SC, Wittlinger J, Schober R, Storch A, Schwarz J. 2006. Transplantation of human neural precursor cells in the 6-OHDA lesioned rats: effect of immunosuppression with cyclosporine A. *Parkinsonism Relat Disord*, 12(5):302–308.
- Seitz RJ, Deckert M, Wechsler W. 1988. Vascularization of syngenic intracerebral RG2 and F98 rat transplantation tumors. A histochemical and morphometric study by use of ricinus communis agglutinin I. *Acta Neuropathol (Berl)*, 76(6):599–605.
- Setoguchi T, Taga T, Kondo T. 2004. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle*, 3(4):414–415.
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. 2006. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *J Neurosci*, 26(13):3444–3453.
- Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, Frotscher M, Snyder EY. 2006. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods*, 3(10):801–806.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. 2004a. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23(43):7267–7273.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18):5821–5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. 2004b. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015):396–401.
- Steck PA, Gallick GE, Maxwell SA, Kloetzer WS, Arlinghaus RB, Moser RP, Gutterman JU, Yung WK. 1986. Expression of epidermal growth factor receptor and associated glycoprotein on cultured human brain tumor cells. *J Cell Biochem*, 32(1):1–10.

- Subramanian A, Sharma AK, Banerjee D, Jiang WG, Mokbel K. 2007. Evidence for a tumour suppressive function of IGF1-binding proteins in human breast cancer. *Anticancer Res*, 27(5B):3513–3518.
- Tabatabai G, Bähr O, Möhle R, Eyüpoglu IY, Boehmler AM, 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(Pt 9):2200–2211.
- Tang C, Chua CLM, Ang BT. 2007. Insights into the cancer stem cell model of glioma tumorigenesis. *Ann Acad Med Singapore*, 36(5):352–357.
- Trapp T, Kögler G, El-Khattouti A, Sorg RV, Besselmann M, Föcking M, Wernet P. 2008. Hepatocyte growth factor/c-met-axis mediated tropism of human unrestricted somatic stem cells for neuronal injury in vitro. *Journal of Biological Chemistry* (Submitted).
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26):14720–14725.
- Vinore SA, Koestner A. 1981. Effect of nerve growth factor producing cells on anaplastic glioma and pheochromocytoma clones: involvement of other factors. *J Neurosci Res*, 6(3):389–401.
- de Vleeschouwer S, Rapp M, Sorg RV, Steiger HJ, Stummer W, van Gool S, Sabel M. 2006. Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery*, 59(5):988–99; discussion 999–1000.
- Wang J, Sakariassen P, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Røsland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger P. 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 122(4):761–768.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23):12425–12430.

- Westermarck B, Magnusson A, Heldin CH. 1982. Effect of epidermal growth factor on membrane motility and cell locomotion in cultures of human clonal glioma cells. *J Neurosci Res*, 8(2-3):491–507.
- Wiesner SM, Freese A, Ohlfest JR. 2005. Emerging concepts in glioma biology: implications for clinical protocols and rational treatment strategies. *Neurosurg Focus*, 19(4):E3.
- Wu X, Hu J, Zhou L, Mao Y, Yang B, Gao L, Xie R, Xu F, Zhang D, Liu J, Zhu J. 2008. In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging. *J Neurosurg*, 108(2):320–329.
- Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. 2001. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 98(4):1166–1173.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90(12):5002–5012.
- Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. 2007. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 120(7):1444–1450.
- Zhang JG, Eguchi J, Kruse CA, Gomez GG, Fakhrai H, Schroter S, Ma W, Hoa N, Minev B, Delgado C, Wepsic HT, Okada H, Jadus MR. 2007. Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin Cancer Res*, 13(2 Pt 1):566–575.
- Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. 2007. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*, 67(8):3691–3697.
- Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. 2005. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell*, 8(2):119–130.

# A Lebenslauf

Name, Vorname                   Trampe-Kieslich, Ariane  
Geburtsdatum und -ort       12.02.1979 in Salzkotten

## *Schulbildung*

1985 - 1988                   Katholische Grundschule Störmede, Geseke  
1988 - 1998                   Gymnasium Antonianum, Geseke  
06/1998                        Abitur

## *Studium*

1998 - 2002                   Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg  
11/2002 - 10/2003           Praktisches Jahr für Pharmazeuten  
12/2003                        Abschluss des Studiums mit dem Dritten Staatsexamen

## *Dissertation*

2004 - 2008                   Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger  
am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

01/2004 - 12/2006           Mitglied des Graduiertenkollegs „Vom Gen zum Verhalten“  
01/2007 - 01/2008           wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neuropathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 02/2008                 Angestellt als Apothekerin bei der  
Rodisma-Med Pharma GmbH in Köln

## B Danksagung

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Bereitsstellung des Themas und die Betreuung meiner Dissertation. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Michael Sabel für seine fachliche und persönliche Unterstützung. Trotz chronischen Zeitmangels hat er mich mit seiner freundschaftlichen und humorvollen Art immer wieder für unser gemeinsames Projekt begeistern können. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Marion Rapp für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Tierexperimenten.

Weiter möchte ich Herrn Dr. Bernd Giebel ganz herzlich für die Betreuung meiner Experimente im ITZ danken. Mit seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft hat er - auch, wenn wir nicht immer einer Meinung waren - die Untersuchungen zu CD133 vorangetrieben und einen großen Teil dieser Arbeit erst möglich gemacht. Ein ganz herzlicher Dank gilt außerdem den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Giebel, besonders Frau Dipl.-biol. Julia Beckmann und Herrn Dipl.-biol. Gregor von Levetzow, für die große Hilfsbereitschaft, die sie mir entgegengebracht haben.

Bei meinen Kooperationspartnern am DKFZ in Heidelberg, ganz besonders bei Herrn Dipl.-biol. Grisca Tödt, möchte ich für die Hilfe bei der Auswertung der Mikroarraydaten herzlich bedanken.

Weiter danke ich Herrn Dipl.-inf. Jan Kechel für seine bereitwillige und schnelle Hilfe bei allen Latex-Problemen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie möchte ich für die schöne Zeit, die ich hier verbracht habe, danken. Die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen nach Dienstschluss und die Freundschaften, die ich hier geschlossen habe, werde ich nie vergessen.

Insbesondere gilt mein Dank

...Herrn Dr. Peter Roerig, für die geduldige Einführung in die Welt der Computer, seinen Optimismus und seine stets gute Laune.

...Frau Dr. Christiane Knobbe für die Einführung in die Techniken der Zellkultur und Molekularbiologie.

...Frau Dr. Marietta Wolter für ihr großes Engagement, vor allem in der letzten Phase der Arbeit.

...Frau Christa Mähler für die vielen Tips für die Immunhistochemie.

...Christine Schulze, Ulla Bell, Heike Denck, Ingrid Prikulis und Britta Friedensdorf für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und die vielen gemeinsamen Frühstücksrunden.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an dieser Stelle auch an meine Eltern, ohne deren unbeirrbar Zuversicht und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluss möchte ich Stephanie Grubenbecher, Janine Muyrers und Barbara Klink dafür danken, dass sie immer da waren und mit mir die Höhen und Tiefen auf dem Weg zur Promotion durchlebt haben. Beinahe gleichzeitig haben wir nun alle dieses manchmal unerreichbar geglaubte Ziel erreicht.

Ich wünsche Euch alles Gute für die Zukunft!

## C Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift