

**Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeitsgruppe Klinische Biochemie
komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Gefäßbiologie maligner Hirntumore –
Entwicklung und Evaluation neuer therapeutischer Optionen**

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

vorgelegt von
Fabian Trillsch
aus Bielefeld
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Peter J. Nelson, PhD

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Eva M. Grasbon-Frodl

Mitberichtersteller: Priv.-Doz. Dr. Ennes A. Auerswald
Prof. Dr. Christiane J. Bruns

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. I. Teichert von Lüttichau

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11. 2009

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1. EINLEITUNG.....	4
1.1. Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS)	4
1.1.1. Historischer Überblick	4
1.1.2. WHO-Klassifikation der Hirntumore	5
1.1.2.1. Astrozytäre Tumoren	6
1.1.2.1.1. Diffuses Astrozytom (WHO-Grad II)	7
1.1.2.1.2. Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III)	7
1.1.2.1.3. Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV)	8
1.1.2.2. Oligodendrogiale Tumoren	10
1.1.3. Moderne Strategien für die Therapie maligner Hirntumoren	12
1.2. Mesenchymale Stammzellen	13
1.2.1. Isolierung und Charakterisierung	13
1.2.2. Differenzierungspotenzial.....	15
1.2.3. Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen	17
1.2.4. Therapeutische Anwendungen	18
1.2.5. Ansätze in der Therapie des Glioblastoma multiforme	19
1.3. Gefäßbiologie.....	21
1.3.1. Gefäßsystem des Glioblastoma multiforme	21
1.3.2. Hämangiogenese im adulten Organismus.....	21
1.3.3. Lymphangiogenese im adulten Organismus.....	22
1.3.3.1. Markerproteine der Lymphangiogenese.....	23
1.3.3.1.1. Podoplanin	23
1.3.3.1.2. Prox-1	24
1.3.3.1.3. LYVE-1.....	24
1.3.3.1.4. VEGFR-3	25
1.3.3.1.5. VEGF-C/D.....	26
1.3.3.1.6. CCL21.....	26
1.3.3.1.7. CCR7	27
1.3.4. Das Tie2-Promotor/Enhancer-Konstrukt.....	27
1.4. Podoplanin-Expression in malignen Neoplasien.....	28
1.5. Fragestellung und experimentelle Strategie	30
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1. Material	32
2.1.1. Zellkultur.....	32
2.1.1.1. Medien und Zusätze	32
2.1.1.2. Kultivierte Zellen	32
2.1.1.3. Eigenschaften der verwendeten Zellen und Zelllinien.....	33
2.1.2. Puffer.....	34
2.1.3. Lösungen.....	35
2.1.4. Chemikalien.....	36
2.1.5. Reagenzienpakete	36
2.1.6. Enzyme	36
2.1.7. Vektoren	37
2.1.8. Oligonukleotide.....	37
2.1.8.1. Einzelne Oligonukleotide (Primer und Sonden)	37
2.1.8.2. Fertig gemischte Oligonukleotide (AoD, PDAR).....	38
2.1.9. Antikörper	39
2.1.10. Zubehör	40
2.1.11. Geräte	40
2.1.12. Tierversuche.....	41
2.1.12.1. Versuchstiere	41
2.1.12.2. Zubehör	41
2.1.13. Software	42

Inhaltsverzeichnis

2.2. Methoden	43
2.2.1. Zellbiologische Methoden	43
2.2.1.1. Allgemeine Zellkultur	43
2.2.1.2. Ernten von Zellen	43
2.2.1.3. Einfrieren lebender Zellen	43
2.2.1.4. Bestimmung der Zellzahl	43
2.2.2. Tumorproben	44
2.2.3. Bestimmung der Genexpression auf mRNA-Ebene	44
2.2.3.1. Prinzip der Realtime-TaqMan® RT-PCR	44
2.2.3.2. Durchführung der Realtime-TaqMan® RT-PCR	46
2.2.4. Histopathologische Verfahren	49
2.2.4.1. Immunhistochemie	49
2.2.4.1.1. Prinzip der Immunhistochemie	49
2.2.4.1.2. Durchführung der Immunhistochemie	50
2.2.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	51
2.2.4.2.1. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	51
2.2.4.2.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	52
2.2.5. FACS (Fluorescence Analysing Cell Sorting)	52
2.2.5.1. Prinzip der FACS-Analyse	52
2.2.5.2. Durchführung der FACS-Analyse	53
2.2.6. Molekularbiologische Methoden	53
2.2.6.1. Elektrophorese im DNA-Agarose-Gel	53
2.2.6.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
2.2.6.3. Vektorkonstrukte	55
2.2.6.4. Enzymatische Modifikation der DNA	58
2.2.6.5. Mikrobiologische Methoden	59
2.2.6.6. Stabile Transfektion	60
2.2.6.7. Selektion stabil transfizierter Zellen	60
2.2.7. Tierversuche	61
2.2.7.1. Versuchsgruppen	61
2.2.7.2. Narkose	62
2.2.7.3. Tumorimplantation	62
2.2.7.4. Systemische Verabreichung mesenchymaler Stammzellen	63
2.2.7.5. Geplantes Zeitschema für die Applikation von Ganciclovir	63
2.2.7.6. Explantation	64
2.2.7.7. Neuropathologische Auswertung des Tumorgewebes	65
2.2.8. Statistische Auswertung	66
3. ERGEBNISSE	67
3.1. Mesenchymale Stammzellen im Rahmen der Neoangiogenese maligner Hirntumore	67
3.1.1. Rekrutierung primärer mesenchymaler Stammzellen in den Hirntumor nach systemischer Applikation	67
3.1.2. Chemokine als mögliche Mediatoren der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen	70
3.1.3. Integration mesenchymaler Stammzellen in die Gefäßwände der Tumorgefäße maligner Gliome	72
3.1.4. Etablierung einer stabilen MSC-Linie mit HSV-TK unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes	74
3.2. Gefäßbiologie maligner Hirntumoren im Hinblick auf Mechanismen der Lymphangiogenese	75
3.2.1. Expression lymphatischer Markerproteine in astrozytären Tumoren	75
3.2.1.1. Expression von Podoplanin und Prox-1	76
3.2.1.2. Expression von LYVE-1	81
3.2.1.3. Expression von VEGFR-3, VEGF-C und -D	82
3.2.1.4. Expression von CCL19, CCL21 und CCR7	86
3.2.2. Expression lymphatischer Markerproteine im anaplastischen Oligodendrogliom (WHO-Grad III)	89
3.3. Etablierung von zwei Tumorzelllinien mit stabiler Podoplanin-Überexpression	92

Inhaltsverzeichnis

4. DISKUSSION	95
4.1. Maligne Hirntumoren rekrutieren mesenchymale Stammzellen.....	95
4.2. Mesenchymale Stammzellen sind aktiv an der Neoangiogenese maligner Hirntumore beteiligt.....	97
4.3. Gentechnisch modifizierte mesenchymale Stammzellen für einen gefäßspezifischen Therapieansatz	99
4.4. Gefäßbiologie maligner Hirntumoren wird von Mechanismen der Lymphangiogenese beeinflusst	103
4.5. Rezeptor-Liganden-System VEGFR-3/VEGF-C,-D ist in malignen Hirntumoren aktiv exprimiert	104
4.6. Podoplanin-Expression in Astrozytomen korreliert mit dem Malignitätsgrad	106
4.7. Lymphatischer Phänotyp der Tumorgefäße des anaplastischen Oligodendroglioms ..	108
4.8. Strategien zur Untersuchung der noch ungeklärten Funktion des Podoplanins in Hirntumoren	110
4.9. Ausblick.....	112
5. ZUSAMMENFASSUNG	113
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
7. TABELLENVERZEICHNIS.....	116
8. LITERATURVERZEICHNIS	117
9. DANKSAGUNG.....	134
10. LEBENSLAUF	135

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	Anaplastisches Astrozytom
AO	Anaplastisches Oligodendrogliom
balb/c	Murine MSC-Linie
C6	Rattengliom-Zelllinie
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU-F	<i>colony forming unit fibroblast</i>
CT	<i>threshold cycle</i> oder Computertomographie
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Tyrosintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>EGF receptor</i>
F	Farad
FACS	<i>fluorescence analysing cell sorting</i>
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Gramm <i>und</i> Erdbeschleunigung (ca. 9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i> (Glioblastom)
GC-P	Ganciclovir-Triphosphat
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSF	GSF-Hämatologikum, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
h	human
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (Humanes Leukozytenantigen)
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> (hämatopoetische Stammzellen)
HSV	<i>Herpes simplex-Virus</i>
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IFN- β	Interferon beta
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
iv	intravenös
l	Liter
L87	Humane MSC-Linie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LYVE	<i>lymphatic vessel endothelial receptor</i>
m	<i>mouse</i> (Maus) oder Meter
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Kernspintomographie
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> (mesenchymale Stammzellen)
NNH	Nicht-neoplastisches Hirngewebe
NSC	<i>neural stem cells</i> (neurale Stammzellen)
NTC	<i>no template control</i>
OP	Operationssaal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Prox	<i>prospero related homeobox</i>
rb	<i>rabbit</i> (Kaninchen)
RFP	<i>red fluorescent protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	<i>Realtime</i> -PCR
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAMRA	Tetramethyl-Rhodamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TK	Thymidinkinase
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
U373	Humane Gliom-Zelllinie
U87	Humane Gliom-Zelllinie
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF <i>receptor</i>
VIC	VIC TM , Fluoreszenzfarbstoff (patentgeschützte Formel)
Vol	Volumen
vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS)

1.1.1. Historischer Überblick

In seiner Vorlesungsreihe des Wintersemesters 1862/ 1863 an der Universität zu Berlin stellte Rudolf Virchow (1821-1902, Abb. 1) im Februar 1863 erstmals die Idee vor, dass ein Teil der intrazerebralen Raumforderungen vom interstitiellen Hirngewebe abstammt und somit als Untergruppe der "Gliome" zusammengefasst werden sollte.

„Wenn es aber Geschwülste giebt, welche eine nähere, histologische und genetische Bedeutung zum Nervensystem haben, ohne doch nervös zu sein, so verdienen diese offenbar einen besonderen generischen Namen.

..., für welche ich den Namen des Glioms aufstelle.“ (Virchow 1863)

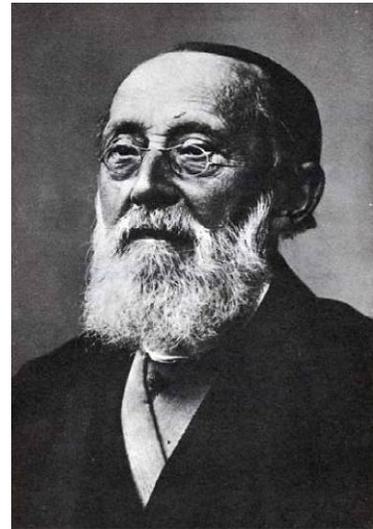


Abb. 1: Prof. Rudolf Virchow

Dieser Begriff wurde in der Folgezeit weit verbreitet, so dass gegen Ende des 19. Jahrhunderts der Großteil der Hirntumore als Gliome klassifiziert wurde (Ferguson and Lesniak 2005). Gleichzeitig begann die Neurochirurgie sich als eigene Fachdisziplin zu etablieren, die besonders durch die Fortschritte der Hirntumor-Chirurgie beeinflusst wurde.

Mit der ersten erfolgreichen Hirntumor-Operation, einer Menigeom-Resektion bei einem 15-jährigen Mädchen, legte William Macewen (1848-1924) im Jahr 1879 den Grundstein für die Weiterentwicklung neurochirurgischer Operationen (Gilles 1985). Allerdings blieb die Tumorchirurgie trotz erster Erfolge zunächst ethisch fragwürdig, da es durch die Lokalisation des Tumors, intraoperative Hämorrhagien und postoperative Infektionen zu ernststen Komplikationen für die Patienten kam (Rutka, Weyerbrock et al. 2006).

Mithilfe innovativer, technischer Hilfsmittel und der Integration moderner anästhesiologischer Methoden konnte Harvey Cushing (1869-1939, Abb. 2) Anfang des 20. Jahrhunderts die neurochirurgischen Methoden stark verbessern und bestehenden Problemen entgegen wirken (Preul 2005). Zusätzlich sammelte er kontinuierlich Informationen über die von ihm durchgeführten Operationen, so dass er im Jahr 1932 über eine Serie von 2000 Hirntumoren berichtete, die er im Zeitraum von 30 Jahren

(1901-1931) operiert hatte (Cushing 1932). Mithilfe dieser Sammlung entwickelte Cushing, zusammen mit dem Neuropathologen Percival Bailey (1892-1973), die Hirntumorklassifikation weiter.

Diese neue Einteilung beinhaltete erstmals eine systematische Subklassifizierung der Hirntumoren, die auf einem histologischen Schema basierte. Die Systematik dieser Klassifikation bildete den Grundstock der heutigen Tumorklassifikation und allgemein der modernen Neuro-Onkologie (Ferguson and Lesniak 2005), so dass Harvey Cushing auch als "Schöpfer der Neurochirurgie" bezeichnet wurde (Foerster 1934).

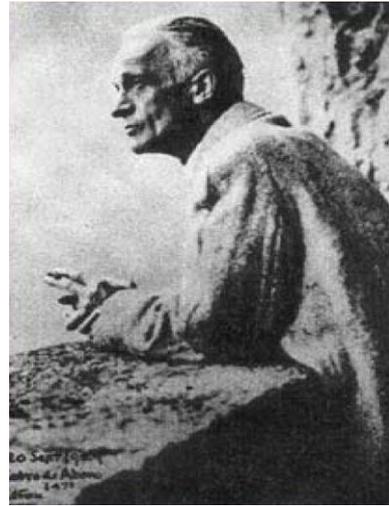


Abb. 2: Prof. Harvey Cushing

Trotz fortwährender Weiterentwicklung der therapeutischen Strategien sind Hirntumoren auch heute noch äußerst schwer zu behandelnde Neoplasien.

„Der Pessimist würde sagen, dass es in den vergangenen 30 Jahren nur wenige Verbesserungen in der Behandlung Maligner Gliome gegeben hat.“

(Rutka, Weyerbrock et al. 2006)

Die Prognose der Hirntumoren ist weiterhin ungünstig, aufgrund heterogener Tumorentitäten allerdings auch differenziert zu betrachten. Die Zahl der Neuerkrankungen wird in Deutschland für Männer auf 3500, für Frauen auf 2900 Fälle pro Jahr geschätzt (Becker and Wahrendorf 1997).

1.1.2. WHO-Klassifikation der Hirntumore

Mit dem Ziel eine einheitliche, weltweit angewandte Klassifikation zu etablieren, werden Hirntumore seit dem Ende der 70er Jahre von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) in vier Malignitätsgrade (WHO-Grade I-IV) eingeteilt. Diese Einteilung beruht auf der Annahme einer Entdifferenzierungsreihe und soll mit dem mittleren postoperativ-rezidivfreien Intervall korrelieren (Zülch 1979). In einer zweiten Auflage wurden im Jahr 1993 zusätzlich immunhistochemische Kenntnisse in die Kriterien zur Abgrenzung der einzelnen Tumorentitäten integriert und die Nomenklatur vereinheitlicht, was die klinische Diagnostik eindeutiger und zuverlässiger gemacht hat (Kleihues, Burger et al. 1993). In der dritten Auflage des Jahres 2000 wurde schließlich auch die Rolle der Tumorgenetik von der WHO-Arbeitsgruppe für die Klassifikation berücksichtigt (Kleihues, Cavenee et al. 2000) und somit neue Forschungserkenntnisse

integriert. Seit Juli 2007 existiert nun die vierte Auflage der WHO-Klassifikation (Louis, Ohgaki et al. 2007), die die unterschiedlichen Tumorentitäten sieben Hauptgruppen zuordnet:

1. Neuroepitheliale Tumoren (*Gliome*)
(u.a. Astrozytäre Tumoren, Oligodendrogliale Tumoren)
2. Tumoren der Hirnnerven und peripheren Nerven
3. Tumoren der Meningen
4. Lymphome und hämatopoetische Neoplasien
5. Keimzelltumoren
6. Tumoren der Sella-Region
7. Metastasen

Für die Gruppe der neuroepithelialen Tumoren wird auch heute noch der von Virchow vorgeschlagene Überbegriff "Gliome" verwendet. Alle Tumoren dieser Hauptgruppe sind dadurch charakterisiert, dass sie in den Zellen der Neuroglia ihren Ursprung haben.

In dieser Arbeit wird der Fokus im Folgenden auf die Untergruppen der astrozytären und der oligodendroglialen Tumoren gelegt.

1.1.2.1. Astrozytäre Tumoren

Die Astrozytären Tumoren gehören zu der Hauptgruppe der Neuroepithelialen Tumoren (Gliome) und zählen zu den häufigsten, primären Hirntumoren. Da sie von Astrozyten sowie von astrozytären Vorläuferzellen abstammen, sind sie durch die Expression des Markerproteins GFAP (glial fibrillary acidic protein) charakterisiert (Pietsch and Wiestler 1997).

Trotz der, zum Teil äußerst unterschiedlichen Histologie und Malignitätsgrade, zeichnen sich alle astrozytären Tumoren durch ein infiltratives Wachstum in das umgebende Hirngewebe aus, was für den unscharfen Übergang von Tumorgewebe zu Hirngewebe verantwortlich ist. Die exakte Tumorgrenze ist nur äußerst schwer abgrenzbar, so dass die komplette chirurgische Resektion mit vollständiger Heilung, bis auf wenige Ausnahmen, ausgeschlossen ist.

Generell werden die Hirntumoren vom WHO-Grad I und II zu den niedriggradigen Neoplasien gezählt, während die Tumoren vom WHO-Grad III und IV als hochgradig und somit als maligne, bzw. semi-maligne angesehen werden.

Von der WHO-Arbeitsgruppe wurde allerdings eine weitere klare Trennung zwischen den bei Kindern und Jugendlichen auftretenden Astrozytomen (WHO-Grad I; pilozytisches Astrozytom, subependymales Riesenzellastrozytom) und den diffus infiltrierenden Astrozytomen des Erwachsenen (WHO-Grad II-IV; z.B. diffuses Astrozytom, anaplastisches Astrozytom, Glioblastom) vorgenommen. Lediglich für die zweite Gruppe ist eine regelhafte Tendenz zur Tumorprogression beschrieben, bei der das Glioblastom als maligner Endpunkt angesehen wird (Kleihues, Cavenee et al. 2000).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Hirntumore des Erwachsenen, so dass im Folgenden für den Vergleich von niedrig- und hochgradigen Astrozytomen, dem Glioblastom (WHO-Grad IV) das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II) gegenübergestellt wird.

1.1.2.1.1. Diffuses Astrozytom (WHO-Grad II)

Dieser astrogliale, meist primär gutartige Tumor ist durch ein hohes Maß an zellulärer Differenzierung, langsamen Wachstum und ausgeprägter diffuser Infiltration in angrenzende Hirnstrukturen charakterisiert. Trotz dieser Eigenschaften zeigt er eine Tendenz zur malignen Progression und aufgrund des infiltrativen Wachstums sind Rezidive selbst nach vollständiger chirurgischer Resektion sehr häufig (Giese and Westphal 2001).

Betroffen sind typischerweise junge Erwachsene, die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 46,9% im Verhältnis zu anderen Hirntumoren relativ gut (Norden and Wen 2006).

1.1.2.1.2. Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III)

Fokale oder generalisierte Zeichen der Anaplasie sind kennzeichnend für diese Tumorgruppe. Erhöhte Zelldichte, vermehrte mitotische Aktivität, Kernpolymorphie und vereinzelte Gefäßproliferate gehören somit zu den morphologischen Kriterien und werden zur Abgrenzung von anderen Tumorgruppen genutzt. Einzelzellnekrosen sind zu detektieren, flächenhafte Nekrosen schließen dagegen die Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms (AA) aus und zeigen den Übergang zum Glioblastom an.

Die Prognose ist durch den geringen Differenzierungsgrad der Zellen und die häufigen Rezidive erheblich schlechter, als bei den niedriggradigen Astrozytomen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 29,4%, Erwachsene des mittleren und höheren Lebensalters sind primär betroffen.

Tab. 1: Klassifikation, Morphologie und Epidemiologie der Astrozytären Tumoren WHO-Grad II-IV (Norden and Wen 2006)

WHO-Grad	WHO-Bezeichnung	Morphologie	Häufigkeit (% der Gliome)	5-Jahres-Überleben (%)	Medianes Überleben
II	Diffuses Astrozytom	Hochdifferenziert, zellarm, geringe Polymorphie	1,7	46,9	3-8 Jahre
III	Anaplastisches Astrozytom	Anaplastische Zellen, Mitosen, Einzelzellnekrosen	7,9	29,4	2-3 Jahre
IV	Glioblastoma multiforme	Flächennekrosen, Gefäßproliferate, hohe Polymorphie, viele Mitosen	50,7	3,3	9-15 Monate

1.1.2.1.3. Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV)

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist mit einem Anteil von 24,4% der häufigste primäre Hirntumor (Hoffman, Propp et al. 2006) und weist zudem unter den glialen Tumoren die höchste Malignität auf. Insgesamt gehört es zu den am schnellsten proliferierenden malignen Neoplasien des Menschen (Pietsch and Wiestler 1997).

Die Tumorzellen sind morphologisch vollständig entdifferenziert, sehen embryonalen Zellen sehr ähnlich und weisen, wie diese, eine hohe Teilungsrate auf.

Das unkontrollierbare Wachstum ins benachbarte Hirngewebe macht das Glioblastoma multiforme zum gefährlichsten bekannten Hirntumor. Es führt unter anderem dazu, dass die Blutversorgung des Tumors nicht mehr sichergestellt ist und der Tumor versucht, über die Expression von angiogenen Faktoren die Neoangiogenese zu beschleunigen. Die daraus resultierenden Gefäße sind allerdings durch eine gestörte Blut-Hirnschranke gekennzeichnet (Vaquero, Zurita et al. 2000) und nicht in der Lage, den Tumor ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen. Die gleichzeitige Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen erhöht zusätzlich die Gefäßpermeabilität und führt so zu einem perifokalen Ödem, welches für die typisch gesteigerte Kontrastmittelaufnahme bei der Magnetresonanztomographie verantwortlich ist.

Bevorzugte Lokalisation des Glioblastoms sind die Großhirnhemisphären, zum Teil mit Infiltration des Balkens (Schmetterlingsgliom).

Für die Entstehung des Glioblastoma multiforme sind insgesamt zwei Mechanismen bekannt, die auf unterschiedliche Genotypen zurückzuführen sind (Henson 2006). Die primäre Form (80% der Fälle) entsteht *de novo* und betrifft vor allem ältere Patienten, die bereits bei Diagnosestellung einen höchst malignen Tumor aufweisen. Die Tumorzellen

weisen eine Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR, epidermal growth factor receptor) auf, der Zellteilung und Proliferation vermittelt (Wong, Bigner et al. 1987; Ekstrand, James et al. 1991). Der Status des Tumorsuppressor-Gens p53 ist dagegen normal. Bei der sekundären Form entsteht das Glioblastoma multiforme langsam aus einem, zunächst niedriggradigen Gliom, das mit der Zeit eine Entwicklung zum anaplastischen Erscheinungsbild vollzieht. Hier liegt p53 in inaktivierter Form bei normaler Aktivität des EGFR vor. Vor allem jüngere Patienten sind von dieser Form betroffen (Henson 2006).

Insgesamt ist das Glioblastom aber eine Erkrankung des höheren Lebensalters, die überwiegende Mehrheit der Patienten ist zwischen 40 und 60 Jahre alt (Norden and Wen 2006). Die 2-Jahres-Überlebensrate liegt bei lediglich 26,5%, nach 5 Jahren leben nur noch 3,3% der betroffenen Patienten. Das mediane Überleben der Patienten wird somit lediglich mit 9-15 Monaten nach Diagnosestellung angegeben (Wen, Kesari et al. 2006).

Pathologie:

Makroskopisch und histopathologisch fällt das Glioblastoma multiforme durch ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie mit strichförmigen und flächenhaften Tumorgewebsnekrosen auf. Das Tumorgewebe besteht aus kleinen, wenig differenzierten neoplastischen Zellen, die eine hohe mitotische Aktivität aufweisen und zum Teil proliferieren.

Diagnostische Kriterien sind neben erhöhter Zelldichte und Zellpolymorphie, der histopathologische Nachweis von Tumorgewebsnekrosen und Gefäßproliferaten. Fakultative Kriterien sind Einblutungen und Zysten sowie eine hohe Anzahl an Mitosen. Charakteristisch für das Glioblastom ist zudem ein abnormes, insuffizientes Gefäßsystem, welches Thrombenbildung begünstigt und zu Nekrosen in nachfolgenden Tumorarealen führen kann (Pietsch and Wiestler 1997). Die Infiltrationstendenz des Tumors zeigt sich durch Tumorzellnester, welche weit in das gesunde Nachbargewebe hineinreichen und die so genannte Infiltrationszone bilden (Burger, Heinz et al. 1988).

Therapie:

Bei der Therapie des biologisch aggressiven Glioblastoms steht der behandelnde Arzt vor verschiedenen Herausforderungen, die in den folgenden Eigenschaften begründet liegen (Chamberlain 2006):

- 1.) Lokalisation des Tumors im Gehirn
- 2.) Intrinsische Resistenz der Neoplasie gegenüber konventionellen Therapiemaßnahmen
- 3.) Eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Gehirns
- 4.) Weite Streuung der Tumorzellen ins Parenchym

- 5.) Variabel gestörte Blut-Hirn-Schranke, die den gezielten Einsatz von Medikamenten erschwert
- 6.) Undichtes Kapillarnetz, das zu Ödemen im Bereich des Tumors und darüber zu erhöhtem Hirndruck führt
- 7.) Bedingte Antwort auf therapeutische Maßnahmen
- 8.) Neurotoxizität der, gegen die Gliome gerichteten, Therapien

Die Standardtherapie des Glioblastoma multiforme besteht derzeit aus einer Kombination der radikalen Tumorresektion, Bestrahlung des betroffenen Areals und Chemotherapie mit Alkylantien (Henson 2006). Nach Operation und adjuvanter Bestrahlung liegt die mittlere Überlebenszeit bei etwa 12 Monaten (Taphoorn, Stupp et al. 2005). Seit 2005 wird im Rahmen der Standardtherapie der Einsatz des Alkylanziums Temozolomid zur Chemotherapie empfohlen (Stupp, Mason et al. 2005; Stupp, Hegi et al. 2007).

Trotz aller Fortschritte in der Therapie kann der Tumor bis heute aber nicht geheilt werden, die Überlebensraten sind weiter frustrierend. Es treten Rezidive auf, die noch schlechter zu behandeln sind, schließlich zu neurologischen Ausfällen und zwangsläufig zum Tod führen (Giese and Westphal 2001).

1.1.2.2. Oligodendrogliale Tumoren

Die Gruppe der Oligodendroglialen Tumoren stammt ebenfalls vom neuroepithelialen Gewebe (Oligodendrozyten, oligodendrogliale Vorläuferzellen) ab, stellt allerdings mit 5% aller primären Hirntumore (Baehring 2005) eine eher kleinere Gruppe innerhalb der Hirntumoren dar. Trotzdem haben diese Tumorentitäten in der Vergangenheit viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da ein Teil der Tumoren sehr gut auf Chemotherapie anspricht. Aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften konnten sie in prognostisch relevante Untergruppen eingeteilt werden, die auch klinisch von Bedeutung sind (Engelhard, Stelea et al. 2003). Es wurde bestätigt, dass bei Patienten mit Verlust des Chromosoms 1q, des Chromosoms 19q oder beider Chromosomen (-1q/-19q) der Tumor zwar mit dem oligodendroglialen Phänotyp korreliert, diese Patienten aber eine sehr viel bessere Prognose haben sowie fast vollständig auf Chemotherapie reagieren (Ino, Betensky et al. 2001). Der Verlust der Heterozygotie für diese beiden Chromosomen lässt sich für 50-70% der Patienten feststellen (Norden and Wen 2006).

Auch die Oligodendroglialen Tumoren sind eine Erkrankung des höheren Lebensalters, die höchste Inzidenz liegt zwischen 55 und 64 Jahren, bei einer Gesamtinzidenz von 0,69 pro 100.000 Einwohnern (Baehring 2005).

Oligodendrogliom (WHO-Grad II):

Beim Oligodendrogliom handelt es sich um einen langsam wachsenden, hochdifferenzierten und diffus infiltrierenden Tumor, der bevorzugt in den Großhirnhemisphären auftritt.

Das histologische Erscheinungsbild zeigt ein homogenes Muster mit isomorphen Tumorzellen und vielen Kapillaren. Als charakteristisch für diesen Tumor wird die so genannte „Honigwaben“-Architektur angesehen. Diese entsteht durch die regelmäßig konfigurierten, rundkernigen Tumorzellen, deren Zytoplasma im klassischen Bild optisch leer erscheint. Vor allem in der Infiltrationszone lassen sich regelmäßig Mikroverkalkungen feststellen (Engelhard, Stelea et al. 2002).

Die Prognose liegt bei einer 10-Jahres-Überlebensrate von 53,2% (Baehring 2005).

Anaplastisches Oligodendrogliom (WHO-Grad III):

Im Vergleich zum Oligodendrogliom zeigt das Anaplastische Oligodendrogliom (AO) bereits deutliche Zeichen der malignen Transformation.

Histopathologisch lassen sich Zeichen der Entdifferenzierung feststellen. Neben der erhöhten Zelldichte und der verstärkten Kernpolymorphologie, die auf Proliferation und erhöhte mitotische Aktivität hinweisen, lassen sich gelegentlich auch Kapillarproliferate und Einzelzellnekrosen finden. Die typische „Honigwaben“-Struktur kann verloren gehen (Engelhard, Stelea et al. 2003).

Aufgrund der deutlich höheren Malignität liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei nur noch 29,6% (Baehring 2005).

Die histopathologischen Kriterien des Anaplastischen Oligodendroglioms sind denen des Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) sehr ähnlich, so dass eine histopathologische Abgrenzung mitunter äußerst schwierig sein kann (Louis, Holland et al. 2001). In einigen Fällen kommt es im Rahmen des Tumorwachstums auch zum Übergang vom Anaplastischen Oligodendrogliom zum Glioblastom (Burton and Prados 2000; Tatter 2002).

1.1.3. Moderne Strategien für die Therapie maligner Hirntumoren

In den vergangenen Jahren konnten durch zunehmendes Verständnis der genetischen Veränderungen im Hirntumor molekulare Ansätze entwickelt werden, die gezielt auf bestimmte Moleküle ausgerichtet sind.

Ein vielversprechendes Ziel für die Therapie des *de novo*-entstandenen primären Glioblastoms stellt dabei EGFR (epidermal growth factor receptor) dar, für das eine Amplifikation und Überexpression in 40% der primären Glioblastoma multiforme nachgewiesen wurde. Die hohe Aktivität des EGFR-Transduktionsweges führt zu Zellproliferation, verstärkter Tumorinvasivität und Angiogenese sowie Inhibition der Apoptose. Mehrere Inhibitoren gegen EGFR wurden in verschiedenen Studien eingesetzt, die zwar ohne gravierende Nebenwirkungen abliefen, dafür aber auch nur eine geringe Antwort auf die Therapie erzielen konnten (0-25%) (Kleihues and Ohgaki 1999; Wen, Kesari et al. 2006).

Mit VEGF (vascular endothelial growth factor A) und dem dazu gehörigen VEGFR-2 (VEGF-Rezeptor 2) waren weitere Wachstumsfaktoren als molekulares Ziel einer Therapie unter Beobachtung. VEGF ist ein Stimulationsfaktor für die Tumorangiogenese und zum Teil verantwortlich für peritumorale Ödeme (Norden and Wen 2006). Die Expression wird unter anderem durch Gewebshypoxie induziert, für unterschiedliche Gewebsarten konnte der Einfluss auf die Gefäßentwicklung nachgewiesen werden (Ferrara 2000; Ng, Krilleke et al. 2006). *In vitro* führt die Aktivierung von VEGFR-2 durch VEGF zu Proliferation, Migration und vermehrter Bildung von Gefäßen (Frelin, Ladoux et al. 2000; Jia, Bagherzadeh et al. 2004). Mehrere klinische und präklinische Studien mit, gegen das VEGFR-2/VEGF-System gerichteten, Antikörpern (z.B. Bevacizumab) konnten zeigen, dass Neoangiogenese im Glioblastom unterdrückt wird und in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan zu einer Zunahme des progressionsfreien Überleben von 6 Monaten führt (30% für GBM, 56% für AA) (Vredenburgh, Desjardins et al. 2007). Allerdings wurde in Glioblastom-Tiermodellen nach einigen Tagen trotz kontinuierlicher Behandlung gegen das VEGFR-2/VEGF-System ein erneutes Auftreten der Angiogenese festgestellt (Tong, Boucher et al. 2004; Winkler, Kozin et al. 2004). Der Mechanismus für dieses Wiederauftreten der Gefäßneubildung ist bisher noch nicht geklärt und stellt somit den langfristigen Erfolg des Therapieansatzes in Frage.

Trotz optimal eingesetzter Therapien ist bislang noch kein Durchbruch in der Behandlung der malignen Hirntumoren erzielt worden, so dass das Interesse der Wissenschaft weiter auf innovative experimentelle Strategien außerhalb der klassischen Methoden (Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie) gerichtet ist.

1.2. Mesenchymale Stammzellen

Im adulten Knochenmark existiert neben den vollständig charakterisierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC), zuständig für die lebenslange Produktion von Blutzellen, mit den mesenchymalen Stammzellen (MSC) eine weitere Stammzell-Population (Devine 2002).

MSC, auch als mesenchymale Stromazellen bezeichnet, wurden zum ersten Mal von Friedenstein und Kollegen im Jahr 1970 (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970) als Kolonie-bildende Fibroblasten ("colony forming unit fibroblasts", CFU-Fs) sowie als möglicher Ursprung für osteoblastische, adipogene und chondrogene Zellen (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976) identifiziert. Die erste genauere Beschreibung ihres Differenzierungspotenzials in mesenchymales Gewebe erfolgte allerdings erst im Jahr 1999 durch Pittenger et al. (Pittenger, Mackay et al. 1999).

Auch wenn die MSC mit 0,001-0,01% lediglich einen sehr kleinen Anteil der Zellen des Knochenmarks stellen, sind sie einfach zu isolieren und mit hoher Effektivität zu expandieren (Pittenger and Martin 2004). In Kombination mit dem möglichen Differenzierungspotenzial haben sie deshalb großes Interesse der Wissenschaft im Bereich der Gentherapie, der regenerativen Medizin und der Gewebezücht (*Tissue Engineering*) auf sich gezogen.

1.2.1. Isolierung und Charakterisierung

Die am weitesten verbreitete Methode zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen ist die Isolation aus Knochenmarks-Aspirat, das mithilfe einer Knochenmarkspunktion aus dem Beckenkamm des adulten Menschen gewonnen wird (Abdallah and Kassem 2008).

Allerdings ist es trotz intensiver Bemühungen bislang noch nicht gelungen, einen spezifischen Marker für diese Zellpopulation zu identifizieren. Aus diesem Grund sind MSC in Bezug auf Morphologie, Physiologie und Expression von Oberflächenmolekülen eine heterogene Population. Baddoo und Kollegen haben im Jahr 2003 eine Kombination aus zwei Eigenschaften zur Selektion vorgeschlagen (Baddoo, Hill et al. 2003). Adhärentes Wachstum auf Plastikoberflächen gilt dabei als Voraussetzung, während HSC durch negative Selektion mit Antikörpern gegen CD45, CD34 und CD11b beseitigt werden. Verschiedene Arbeitsgruppen haben MSC in den vergangenen Jahren bezüglich der Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Für die aus dem Knochenmark isolierte Population wurde die Expression von CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, STRO-1 und Sca-1 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die, für die hämatopoetische Zellreihe charakteristischen, Oberflächenproteine CD11b, CD14,

CD31, CD33, CD34, CD133 und CD45 nicht exprimiert sind (Pittenger, Mackay et al. 1999). Die Zellen exprimieren ebenfalls kein HLA-Klasse II (MHC-II), während HLA-Klasse I (MHC-I) auf einem Teil der MSC nachzuweisen ist (Pittenger, Mackay et al. 1999).

Obligat ist bei allen Methoden der MSC-Isolierung der Nachweis des Differenzierungspotenzials in mesenchymales Gewebe wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten (Pittenger, Mackay et al. 1999; Baddoo, Hill et al. 2003).

Tab. 2: Tabellarische Zusammenstellung charakteristischer Oberflächenmoleküle auf MSC.

a) auf mesenchymalen Stammzellen exprimierte Oberflächenmoleküle		
Name	Alias	Funktion
CD29	β-1-Integrin	Zell-Zell-Adhäsionsmolekül
CD44	Pgp1	Matrix-Adhäsionsmolekül
CD73	SH3, SH4	Endotheladhäsion, Adenosinregulation
CD90	Thy-1	Zell-Matrix-Interaktionen
CD105	SH1, Endoglin	Regulatorische Komponente des TGF-β-Rezeptors
CD106	Neurolin, VCAM-1	Adhäsionsmolekül für CD6
CD166	ALCAM	Zelladhäsion
Sca-1	Ataxin-1	Unbekannt
STRO-1		Unbekannt
a) nicht auf mesenchymalen Stammzellen exprimierte Oberflächenmoleküle		
Name	Alias	Funktion
CD11b	AlphaM-beta2	bindet CD54, ECM, iC3b
CD14	LPSR	Endotoxinrezeptor
CD31	PECAM-1	Adhäsionsmolekül, CD38-Rezeptor
CD33	gp67	Adhäsionsmolekül
CD34	gp105-120	Zell-Zell Adhäsion
CD45	Leukocyte Common Antigen	T-und B-Zell-Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung
CD133	PROML1	Unbekannt
HLA-DR	MHC-II	Rezeptor für CD4+ T-Lymphozyten zur Immunabwehr

In einem Positionspapier aus dem Jahr 2006 hat die „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) folgende Mindestkriterien vorgeschlagen, um eine einheitliche Isolationsmethode zu etablieren (Dominici, Le Blanc et al. 2006):

- 1.) Adhärentes Wachstum auf Plastikoberflächen unter Standard-Kulturbedingungen
- 2.) Expression von CD105, CD73 und CD90,
fehlende Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19
und HLA-Klasse II
- 3.) *In vitro*-Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten

Zusätzlich zum Knochenmark konnten in mehreren Studien weitere Gewebetypen als Quellen für mesenchymale Stammzellen identifiziert werden (Bobis, Jarocha et al. 2006; Keating 2006). Zellen mit vergleichbaren Eigenschaften wurden in Fettgewebe (Gronthos, Franklin et al. 2001), in Nabelschnurblut und in Chorionzotten der Plazenta (Igura, Zhang et al. 2004), in Amnionflüssigkeit (Tsai, Lee et al. 2004), in peripheren Blut (Zvaifler, Marinova-Mutafchieva et al. 2000) sowie in der fetalen Leber (Campagnoli, Roberts et al. 2001) und Lunge (in 't Anker, Noort et al. 2003) nachgewiesen.

1.2.2. Differenzierungspotenzial

Neben der Fähigkeit sich selbst zu erneuern, sind MSC weiter multipotent (Jiang, Jahagirdar et al. 2002). Die Differenzierung in Gewebe mesodermalen Ursprungs wie Knochen, Knorpel und Fettgewebe wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Bruder, Kraus et al. 1998; Bruder, Kurth et al. 1998; Johnstone, Hering et al. 1998; Dennis, Merriam et al. 1999; Digirolamo, Stokes et al. 1999; Muraglia, Cancedda et al. 2000; Barry, Boynton et al. 2001; Dennis and Charbord 2002). Sie ist definitionsgemäß ein obligates Kennzeichen der MSC.

Infolge der zwei- bis dreiwöchigen Inkubation mit β -Glyzerolphosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason werden MSC zu osteoblastischen Zellen, die durch Expression der alkalischen Phosphatase charakterisiert sind. Chondrogene Differenzierung kann bei dreidimensionaler Kultivierung und Zugabe von TGF- β (transforming growth factor beta) erzielt werden. Diese Chondrozyten exprimieren verschiedene Knorpel-spezifische Komponenten der Extrazellulären Matrix, u.a. Glycosaminoglykan und Kollagen Typ II. Die Adipogenese wird durch einen hormonellen Cocktail, bestehend aus Dexamethason, Methyl-Isobutylxanthin, Insulin und Indomethazin induziert. Die so entstehenden

Adipozyten beginnen mit der Produktion von großen Lipid-gefüllten Vakuolen (Barry and Murphy 2004; Bobis, Jarocho et al. 2006).

Mittlerweile gibt es weitere Berichte von *in vitro*-Studien, die neben diesen drei Entwicklungsprozessen auch die Differenzierung in weitere Zelltypen beschreiben. Dabei konnte die Myogenese initiiert werden, so dass sich multinukleäre Zellen mit Eigenschaften von Muskelzellen entwickelten (Phinney, Kopen et al. 1999). Durch Kultivierung unter speziellen Kulturbedingungen begannen MSC zudem mit der Expression früher Marker der neurogenen Differenzierung (Sanchez-Ramos, Song et al. 2000; Deng, Obrocka et al. 2001) und zeigten später einen neuralen Phänotyp (Woodbury, Schwarz et al. 2000; Kohyama, Abe et al. 2001).

Von großer Bedeutung für die vorliegende Arbeit waren Studien, die sich mit der Rolle mesenchymaler Stammzellen im Rahmen der Gefäßentwicklung beschäftigt haben.

Die Zugabe von VEGF, EGF und Hydrokortison führte dazu, dass MSC *in vitro* mit der Expression spezifischer endothelialer Marker begannen und charakteristische Zytokine sezernierten (Gang, Jeong et al. 2006). Anschließend durchgeführte funktionelle Versuche haben dabei bestätigt, dass es sich bei den so differenzierten Zellen um Endothelzellen handelt (Oswald, Boxberger et al. 2004).

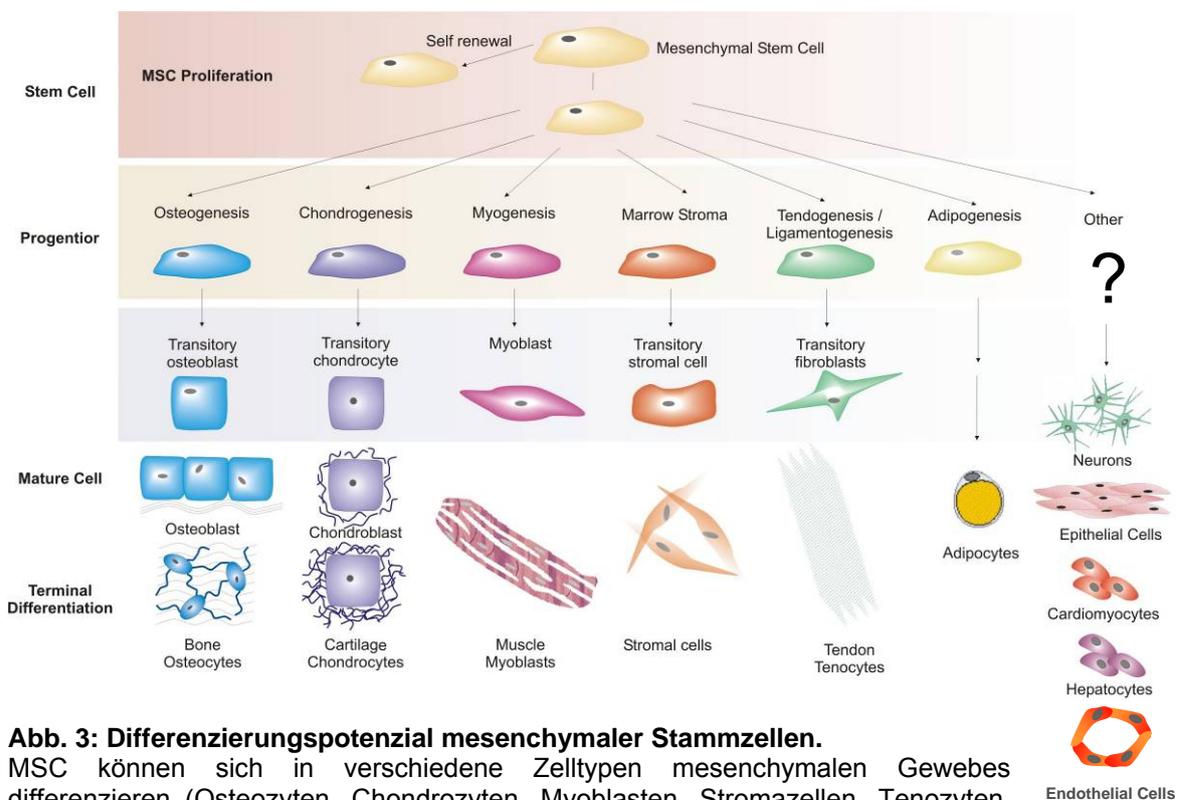


Abb. 3: Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen.

MSC können sich in verschiedene Zelltypen mesenchymalen Gewebes differenzieren (Osteozyten, Chondrozyten, Myoblasten, Stromazellen, Tenozyten, Adipozyten). Darüber hinaus wurde eine mögliche Differenzierung in weitere Zelltypen beschrieben (Neuronen, Epithelzellen, Kardiomyzten, Hepatozyten, Endothelzellen).

(Modifizierte Abbildung der Biomedical Tissue Research Group, University of York; <http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/MSC%20diff.jpg>)

Dieses endotheliale Differenzierungspotenzial war zuvor bereits im Mausmodell untersucht worden. Isolierte MSC sind hierbei sowohl ins Myokard als auch in die Skelettmuskulatur injiziert worden (Gojo, Gojo et al. 2003). Durch diese Injektion wurde nicht nur eine gesteigerte Gefäßdichte induziert, die Zellen konnten sogar direkt in neu gebildeten Endothel der Gefäße identifiziert werden. Die MSC hatten sich auch hier in Endothelzellen differenziert. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem Rattenmodell erzielt, bei dem MSC nach einem Myokardinfarkt in das betroffene Areal injiziert worden waren (Davani, Marandin et al. 2003).

1.2.3. Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen

Bevor sich MSC in die verschiedenen Zelltypen differenzieren können, müssen die Zellen allerdings aus dem Knochenmark mobilisiert und in das entsprechende Gewebe rekrutiert werden (Jiang, Jahagirdar et al. 2002; Lapidot and Petit 2002). Dieser Vorgang wird unter anderem durch Chemokine vermittelt, die von den Zellen des Gewebes sezerniert werden. Chemokine sind Zytokine, die spezifische Rezeptoren auf MSC aktivieren und über diesen Mechanismus eine chemotaktische Wirkung auf die Zellen ausüben (Lapidot and Petit 2002). Die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR4, CCR7, CCR10 und CXCR5 sind dabei auf MSC aktiv exprimiert (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005).

Der Vorgang der Rekrutierung von MSC als Reaktion auf Gewebestress und Gewebsschädigung wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen. In einem Mausmodell für den Schlaganfall wurden MSC lokal in das Striatum injiziert, was zu einer Wanderbewegung der Zellen führte und die MSC letztendlich fast vollständig im Bereich der Verletzung nachzuweisen waren (Li, Chopp et al. 2000). Für traumatische Hirnverletzungen wurde gezeigt, dass MSC auch nach intravenöser Applikation ins Gehirn wandern und sich dort selektiv im Bereich der Verletzung ansammeln (Mahmood, Lu et al. 2001). Die Rolle der mobilisierbaren Stammzellen wurde als Reservefunktion für solide Organe im Falle einer Verletzung interpretiert, so dass die Zellen notwendige Reparaturvorgänge möglicherweise unterstützen können (Korbling and Estrov 2003).

Darüber hinaus werden MSC auch im Rahmen des Tumorwachstums rekrutiert. Sowohl *in vitro* (Nakamura, Ito et al. 2004; Schichor, Birnbaum et al. 2006) als auch *in vivo* zeigen MSC einen deutlichen Tropismus zum malignen Hirntumor (Nakamura, Ito et al. 2004; Brower 2005; Hamada, Kobune et al. 2005; Nakamizo, Marini et al. 2005).

Selbst nach systemischer Applikation werden MSC aus der Peripherie in Tumorgewebe rekrutiert (Studený, Marini et al. 2002). Dieser Mechanismus konnte von Nakamizo und Kollegen kürzlich auch für das GBM nachgewiesen werden. Nach Injektion in die Karotiden sammelten sich die MSC ausschließlich im Hirntumor an, unabhängig davon ob

sie in die ipsi- oder kontralaterale Karotis injiziert worden waren (Nakamizo, Marini et al. 2005).

1.2.4. Therapeutische Anwendungen

Aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften des ausgeprägten proliferativen Potenzials und der Möglichkeit, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, sind MSC äußerst interessant für den Einsatz in der regenerativen Medizin. In den vergangenen Jahren sind sie zudem im Bereich der Zellbiologie und Gentherapie für zahlreiche therapeutische Ansätze erprobt worden.

MSC können hierfür autolog oder allogene eingesetzt und aufgrund der Rekrutierung sowohl lokal als auch systemisch appliziert werden. Gerade die autologe Anwendung ist dabei von großem Interesse. Dabei werden die Zellen dem Patienten vor der Therapie entnommen, außerhalb des Körpers vermehrt und gegebenenfalls modifiziert, um dann anschließend demselben Patienten wieder zugeführt zu werden.

Im Bereich der regenerativen Medizin konnte eine erste erfolgreiche Strategie für die Behandlung der Osteogenesis imperfecta etabliert werden. Bei dieser Krankheit kommt es aufgrund einer Kollagenmutation zu einer erhöhten Knochenbruchwahrscheinlichkeit. Die allogene MSC-Transplantation bewirkte hier eine Verbesserung der Knochenstruktur und der klinischen Entwicklung der Patienten (Horwitz, Prockop et al. 1999; Horwitz, Prockop et al. 2001). Durch genetische Modifikation der MSC wird nun versucht, einen kausalen Therapieansatz zu entwickeln, so dass der Kollagenstoffwechsel gezielt beeinflusst wird (Chamberlain, Schwarze et al. 2004).

Es gibt weitere, bereits klinisch erprobte Therapieansätze, bei denen MSC mit unterschiedlicher Zielsetzung eingesetzt wurden (Tab. 3). Wie bei der Osteogenesis imperfecta wurden MSC auch bei großen Knochendefekten und nach Myokardinfarkten zur verbesserten Regeneration des geschädigten Gewebes verabreicht.

Weitere mögliche Einsatzgebiete mesenchymaler Stammzellen werden zurzeit noch in experimentellen Studien in Tierversuchen getestet. So sollen die Zellen einen positiven Effekt auf die Regeneration von Knorpelgewebe ausüben (Wakitani, Goto et al. 1994; Caplan, Elyaderani et al. 1997), Lungengewebe gegen schädliche, exogene Einflüsse schützen (Ortiz, Gambelli et al. 2003), zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation sowie zur beschleunigten Gewebserneuerung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) führen (Khalil, Weiler et al. 2007) und die Regeneration lymphatischer Gefäße unterstützen (Conrad, Niess et al. 2009).

Tab. 3: Tabellarische Zusammenstellung von Beispielen der klinischen Therapie mit MSC.

Indikation	Einsatz der MSC	Ergebnis	Referenz
Osteogenesis imperfecta	Allogene KM-Transplantation	Knochenneubildung, Anwachsen der MSC (3/3)	(Horwitz, Prockop et al. 1999)
Große Knochendefekte	Autologe MSC auf einer Matrix	Verbesserter Wiederaufbau des Knochens (3/3)	(Quarto, Mastrogiacomo et al. 2001)
Myokardinfarkt	Lokale Injektion	Verbesserte Funktion (4/6) und Gewebsdurchblutung (5/6)	(Stamm, Westphal et al. 2003)
Schwere idiopathische aplastische Anämie	Allogene MSC-Infusion	Verbesserte Regeneration der Knochenmarkstromas (1/1)	(Fouillard, Bensidhoum et al. 2003)
Metachromatische Leukodystrophie (MLD) und Hurler-Syndrom	Allogene MSC-Infusion nach KM-Transplantation	Kein GvHD, verbesserte Nervenleitgeschwindigkeit (4/6)	(Koc, Day et al. 2002)

Zunehmende Beachtung finden MSC auch in der Gentherapie bei speziellen Erb- oder Tumorerkrankungen. Sie lassen sich gut durch Transduktionen mit viralen Vektoren oder Transfektionen mit bestimmten DNA-Fragmenten genetisch modifizieren, so dass in diesem Gebiet zurzeit zahlreiche Strategien zum Einsatz der MSC entwickelt werden (Hamada, Kobune et al. 2005; Bobis, Jarocho et al. 2006).

1.2.5. Ansätze in der Therapie des Glioblastoma multiforme

Im Jahr 2000 wurden die ersten Studien zum Einsatz der Stammzelltherapie bei malignen Hirntumoren veröffentlicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Tiermodell mit neuronalen Stammzellen (NSC) gearbeitet, die aus embryonalen Stammzellen generiert werden können oder dem fetalen Gehirn entnommen werden müssen.

Aboody et al. konnten zeigen, dass diese NSC ausgeprägte migratorische Eigenschaften besitzen und sich in der Peripherie von Hirntumoren ansiedeln. Sowohl nach Injektion in die kontralaterale Hemisphäre als auch nach systemischer Applikation zeigten die Stammzellen einen deutlichen Tropismus in Richtung des Tumors (Aboody, Brown et al. 2000). Diese gezielte Migration ließ sich in weiteren Untersuchungen auch therapeutisch nutzen. Hierbei wurde durch modifizierte Adeno- und Retroviren eine Überexpression der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) (Benedetti, Pirola et al. 2000), Interleukin-12 (IL-12) (Ehtesham, Kabos et al. 2002) und TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) (Ehtesham, Kabos et al. 2002) erreicht, was zu einer signifikanten Abschwächung des Tumorwachstums führte.

Allerdings ist eine Therapie mit NSC trotz dieser interessanten Ergebnisse als problematisch anzusehen. Neben offensichtlichen ethischen Problemen wäre es zudem äußerst schwierig, ausreichende Zellzahlen für eine autologe Stammzelltherapie bereitzustellen.

Aus diesem Grund hat sich das Interesse der Forschung in den vergangenen Jahren zunehmend von den embryonalen NSC zu den adulten MSC verlagert. Aufbauend auf der, unter Kap. 1.2.3 beschriebenen Rekrutierung der MSC wurden Strategien für die Gliomtherapie entwickelt.

MSC wurden hierzu mit modifizierten Adenoviren infiziert, um bestimmte Zytokine (IL-2, IFN- β) übermäßig zu exprimieren (Hamada, Kobune et al. 2005; Nakamizo, Marini et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass sowohl nach direkter Injektion der modifizierten Stammzellen in den Tumor als auch nach systemischer Applikation der Zellen in die Karotiden das Überleben der Versuchstiere signifikant verlängert wurde (Nakamizo, Marini et al. 2005).

Genmodifizierte Stammzellen wurden unter anderem mit dem, von den Griechen in der Schlacht um Troja eingesetzten, „Trojanischen Pferd“ verglichen (Arap and Pasqualini 2004). Die primär zur Unterstützung des Tumorwachstums angelockten Stammzellen entfalten dabei nach der Integration in den Tumor eine zytotoxische Wirkung und stören das Tumorwachstum (Arap and Pasqualini 2004).

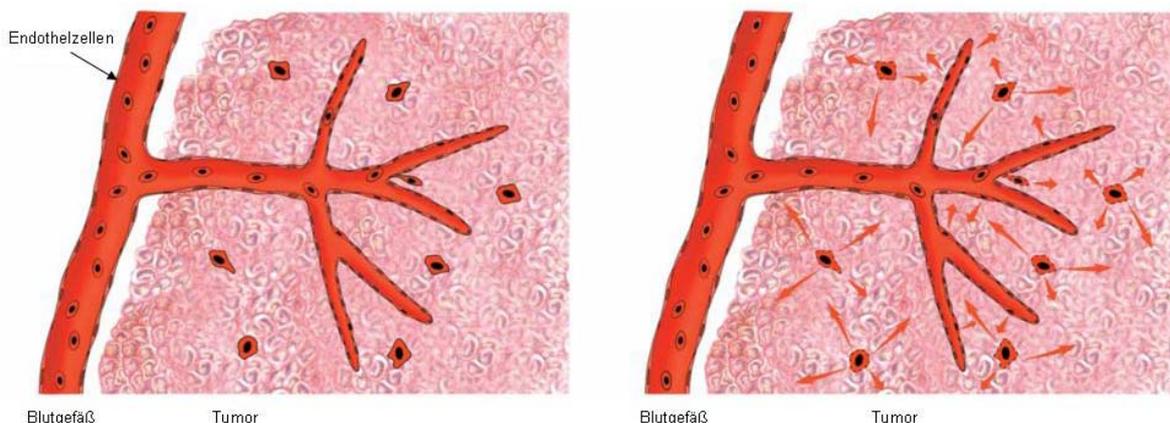


Abb. 4: Generelles Prinzip für den Einsatz von genmodifizierten Stammzellen als Vehikel für therapeutische Vektoren.

Genmodifizierten Stammzellen werden in das Tumorgewebe rekrutiert und integriert (*rote Zellen mit schwarzem Zellkern*). Durch Aktivierung des therapeutischen Vektors in den Zellen kann eine gezielte Schädigung des Tumorgewebes ausgelöst werden (*von den integrierten roten Zellen ausgehende Pfeile*).

Modifizierte Abbildung von (Arap and Pasqualini 2004), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

1.3. Gefäßbiologie

1.3.1. Gefäßsystem des Glioblastoma multiforme

Die starke Neangiogenese im Rahmen des Tumorwachstums ist dafür verantwortlich, dass das Glioblastom zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren des Menschen gezählt wird.

Das neu gebildete Gefäßsystem zeigt dabei allerdings keinen normalen Phänotyp auf, sondern erscheint als Netzwerk unregelmäßig geformter, dilatierter und gewundener Gefäße (Plate and Mennel 1995). Diese bizarren, aber charakteristischen Strukturen ähneln Glomeruli und werden von geschwollenen Gefäßzellen gebildet, die zum Teil mehrschichtig angeordnet sind und in das Gefäßlumen proliferieren (Wesseling, Ruitter et al. 1997). Im Vergleich zu normal konfigurierten Gefäßen ist die Basalmembran der entstehenden Gefäße des GBM unregelmäßig, der Gefäßwand fehlt eine kontinuierliche Ummantelung durch Perizyten (Lin and Sessa 2004; Fischer, Gagner et al. 2005).

Die funktionellen Eigenschaften der Gefäße sind schlecht, so dass das Gefäßsystem trotz der aktiven Angiogenese nicht in der Lage ist, den Tumor ausreichend zu oxygenieren und mit Nährstoffen zu versorgen (Preusser, Haberler et al. 2006). Deshalb treten flächenhafte Nekrosen auf, die wie die Gefäßproliferate zur histopathologischen Abgrenzung von anderen Tumorentitäten genutzt werden. Zudem ist die Blut-Hirn-Schranke sehr durchlässig, was unter anderem zum Tumor-assoziierten Ödem und der verstärkten Kontrastmittel-Aufnahme im MRT führt. Klinische Auswirkung hiervon ist das erhöhte Risiko intratumoraler Blutungen (Fischer, Gagner et al. 2005).

Die Entwicklung der neuen Gefäße wurde bisher über zwei Mechanismen erklärt. Auf der einen Seite spielt die klassische Angiogenese eine wichtige Rolle, bei der die neuen Kapillaren von bereits existierenden Gefäßen aussprossen. Auf der anderen Seite läuft aber auch die Vaskulogenese ab, bei der einzelne endotheliale Zellen bzw. Vorläuferzellen in den Tumor wandern und die extensive Gefäßneubildung unterstützen (Goldbrunner, Bernstein et al. 1999). Die genaue Herkunft dieser endothelialen Vorläuferzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass es sich um zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark handelt (Urbich and Dimmeler 2004; Adams and Alitalo 2007).

1.3.2. Hämangiogenese im adulten Organismus

Unter physiologischen Bedingungen werden Blutgefäße entweder während der Embryonalentwicklung gebildet, bei der Wundheilung oder in der Uterusschleimhaut im

Rahmen des weiblichen Menstruationszyklus. Darüber hinaus gibt es zahlreiche pathologische Prozesse, die eine Gefäßneubildung erfordern. Hierzu zählen Ischämien, chronisch-inflammatorische Krankheiten, aber auch Neoplasien (Fischer, Gagner et al. 2005). Bereits im Jahr 1971 stellte Folkman die Hypothese auf, dass Angiogenese Voraussetzung für kontinuierliches Wachstum solider Tumoren ist und die anti-angiogene Behandlung einen erfolgsversprechenden Therapieansatz darstellen könnte (Folkman 1971). Bei verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Mamma-, Prostatakarzinom) korreliert die erhöhte Gefäßdichte direkt mit der Metastasierung und negativ mit dem Überleben der Patienten (Wesseling, Ruiters et al. 1997).

1.3.3. Lymphangiogenese im adulten Organismus

Neben der Kornea des Auges und dem männlichen Hoden ist das Parenchym des Zentralen Nervensystems das einzige Gewebe, das unter normalen Bedingungen keine Lymphgefäße besitzt (Cursiefen, Chen et al. 2003; Johnston, Zakharov et al. 2004; Maruyama, Li et al. 2005). Im Gehirn übernimmt stattdessen die zirkulierende zerebrospinale Flüssigkeit die Funktionen des Lymphabflusses (Johnston and Papaiconomou 2002).

In anderen Organen hat das Lymphgefäßsystem dagegen eine große Bedeutung, und vor allem unter pathologischen Bedingungen spielt die Lymphangiogenese eine entscheidende Rolle. Neben der Rheumatoiden Arthritis, der Diabetischen Retinopathie und der Arteriosklerose ist vor allem das Wachstum von Tumoren und die anschließende Metastasierung eng mit der Lymphangiogenese verknüpft (Kato, Shimoda et al. 2006). Die lymphatischen Gefäße dienen dabei einer Vielzahl von Tumoren als primärer Ausbreitungsweg zur Metastasierung (He, Rajantie et al. 2004), so dass der Befall der Lymphknoten als einer der wichtigsten Indikatoren für die Aggressivität eines Tumors angesehen wird (Swartz and Skobe 2001). Über die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine können Tumoren die Bildung neuer Lymphgefäße induzieren und so aktiv zur Metastasierung in die Lymphknoten beitragen (Ji 2006). Beim Mamma-Karzinom, dem malignen Melanom und dem Plattenepithelkarzinom der Hals- und Nackenregion wurde die Lymphangiogenese als prognostischer Parameter für das Risiko der Lymphknoten-Metastasierung identifiziert, die somit einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Patienten hat (Beasley, Prevo et al. 2002; Dadras, Paul et al. 2003; Maula, Luukkaa et al. 2003; Nakamura, Yasuoka et al. 2005). Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Lymphgefäße und der Lymphgefäßdichte weiterhin ein wichtiger Bestandteil der gegenwärtigen Forschung.

Wie bei der Hämangiogenese wird auch bei der Lymphangiogenese zwischen den Mechanismen der klassischen Angiogenese mit Proliferation von Endothelzellen und der Integration endothelialer Vorläuferzellen im Rahmen der Vaskulogenese unterschieden (Kerjaschki 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen waren lange unbekannt, erst in den letzten Jahren haben Forschungsergebnisse zu einem besseren Verständnis geführt. Während der Embryonalphase beginnt die lymphatische Entwicklung mit der Expression des Homeobox-Gens Prox-1 (prospero related homeobox-1) in den Endothelzellen der Kardinalvene (Jain and Padera 2003). Diese Zellen exprimieren zusätzlich den VEGFR-3 (VEGF-Rezeptor 3) und reagieren über diesen Rezeptor auf das Signal der regulatorischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D. Die Zellen wandern in diese Richtung und bilden aussprossende Lymphgefäßstrukturen. Es entstehen lymphatische Plexi, die sich ausbreiten und ein stark verzweigtes Netzwerk lymphatischer Kapillare bilden (Stacker, Achen et al. 2002; Adams and Alitalo 2007). Das entstehende Gefäßsystem ist unidirektional und besteht aus hierarchisch angeordneten, blind-endenden Gefäßen, die Flüssigkeiten, Makromoleküle und Zellen vom Gewebe aufnehmen und dem venösen Blutsystem zuführen (Tammela, Petrova et al. 2005). Die Kapillaren und kleineren Gefäße bestehen aus einem dünnen einschichtigen Endothel, das von einer nicht kontinuierlichen, stark permeablen Basalmembran umgeben wird (Kato, Shimoda et al. 2006).

1.3.3.1. Markerproteine der Lymphangiogenese

Obwohl die Bedeutung des Lymphgefäßsystems schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt ist, fehlten lange Zeit spezifische Markerproteine für das Lymphendothel, die eine Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßen möglich gemacht hätten (Kato, Shimoda et al. 2006). Erst in den vergangenen Jahren konnten einige nützliche Markerproteine identifiziert werden (Breiteneder-Geleff, Soleiman et al. 1999; Sleeman, Krishnan et al. 2001; Kato, Shimoda et al. 2006), die zu deutlichen Fortschritten in der Erforschung der Funktion und Bedeutung des Lymphgefäßsystems geführt haben.

1.3.3.1.1. Podoplanin

Podoplanin (PDPN, D2-40, GP36, M2A, aggrus, T1alpha) ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, das erstmals auf Podozyten der Niere beschrieben wurde (Breiteneder-Geleff, Matsui et al. 1997). Weitere lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Podoplanin auch auf Lymphgefäßendothelien exprimiert wird, mit VEGFR-3 co-lokalisiert ist (Weninger,

Partanen et al. 1999) und zur Abgrenzung von Blutgefäßen genutzt werden kann (Breiteneder-Geleff, Soleiman et al. 1999; Al-Rawi, Mansel et al. 2005). Die genaue Funktion von Podoplanin ist allerdings noch nicht vollständig erforscht. Unter anderem induziert Podoplanin Thrombozyten-Aggregation (Kato, Fujita et al. 2003) und scheint zusätzlich die Form der Lymphendothelzellen sowie die Permeabilität der Lymphgefäße zu beeinflussen (Sleeman, Krishnan et al. 2001).

Der Knockout von Podoplanin führt während der Embryonalentwicklung zu einer lymphatischen Hypoplasie mit extremen Lymphödemen und einer respiratorischen Insuffizienz, die bereits perinatal letal ist (Ramirez, Millien et al. 2003; Schacht, Ramirez et al. 2003).

Abgesehen vom Lymphgefäßendothel kann Podoplanin auch in den Typ-1-Alveolarzellen der Lunge (Rishi, Joyce-Brady et al. 1995), in Osteoblasten (Wetterwald, Hoffstetter et al. 1996), im Skelettmuskel, in der Plazenta, in der Lunge, im Herzen (Martin-Villar, Scholl et al. 2005) und in den Zellen des Plexus choroideus nachgewiesen werden (Al-Rawi, Mansel et al. 2005). Weitere, aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Podoplanin zusätzlich in einigen malignen Tumoren exprimiert wird (siehe Kapitel 1.4).

1.3.3.1.2. Prox-1

Prospero related homeobox gene 1 (Prox-1) ist homolog zu der Gensequenz des *Drosophila*-Homeobox-Gens *prospero*. Während der frühen Embryonalentwicklung ist es ein Marker für lymphatische Endothelzellen, die von der Kardinalvene aussprossen. Der Prox-1-Knockout in Mäusen ist für die Tiere letal (Wigle, Harvey et al. 2002), die Regulationsmechanismen der Prox-1-Expression sind allerdings noch nicht bekannt.

Durch die Transfektion von Prox-1 in Endothelzellen von Blutgefäßen kommt es zur Expression charakteristischer lymphendothelialer Moleküle. Prox-1 kann somit den lymphatischen Phänotyp induzieren (Hong, Harvey et al. 2002; Petrova, Makinen et al. 2002) und wird als Schlüsselgen für die Transformation zu lymphatischen Endothelzellen angesehen, sowohl in der Fetalzeit (Wigle and Oliver 1999) als auch im adulten Gewebe (Wigle, Harvey et al. 2002). Unter normalen Bedingungen sowie im Tumorgewebe ist Prox-1 ausschließlich auf lymphatischen Endothelzellen nachzuweisen (Kato, Shimoda et al. 2006).

1.3.3.1.3. LYVE-1

Lymphatic vessel endothelial receptor 1 (LYVE-1) ist ein transmembranärer Hyaluronsäure-Rezeptor, der sowohl immobilisierte als auch gelöste Hyaluronsäure

bindet. Lediglich im Rahmen der frühen Embryonalperiode ist LYVE-1 auf Endothelzellen von Blutgefäßen zu detektieren (Wigle and Oliver 1999), später ist LYVE-1 spezifisch auf lymphatischen Gefäßen, mit Ausnahme der Sinusoide von Leber und Milz, exprimiert (Banerji, Ni et al. 1999). Auch in Tumoren und im Rahmen der Wundheilung bleibt die Expression von LYVE-1 auf Lymphgefäße beschränkt (Swartz and Skobe 2001; Yonemura, Fushida et al. 2001).

Es wird vermutet, dass LYVE-1 den Transport der Hyaluronsäure über die Gefäßwand der Lymphgefäße vermittelt, bzw. um die luminalen Seite der Gefäße durch Bindung von Hyaluronsäure abzudichten (Wigle and Oliver 1999; Jackson, Prevo et al. 2001). Der LYVE-1-Knockout in Mäusen ist nicht letal, die Lymphgefäßentwicklung zeigte hierbei keine Auffälligkeiten (Adams and Alitalo 2007).

1.3.3.1.4. VEGFR-3

Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3, Flt-4) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D bindet und auf Lymphendothelzellen exprimiert ist. Einzelne Untersuchungen zeigen, dass VEGFR-3 zusätzlich auf einer kleinen Untergruppe fenestrierter Blutgefäße zu detektieren ist und bei Tumorangiogenese und Wundheilung auch wieder im Rahmen der Hämangiogenese eine Rolle spielen kann (Valtola, Salven et al. 1999; Partanen, Arola et al. 2000). Trotzdem wird er als ein sehr spezifischer molekularer Marker zur Identifikation von lymphatischen Gefäßen angesehen (Kato, Shimoda et al. 2006). VEGFR-3 kontrolliert die Proliferation von Lymphendothelzellen sowie die Bildung neuer Lymphgefäße (Kato, Shimoda et al. 2006).

Bei adulten Tieren wird durch die spezifische Blockade des VEGFR-3/VEGF-C,-D-Systems die Aussprossung neuer Lymphgefäße blockiert und so die lymphatische Gefäßneubildung verhindert (Pytowski, Goldman et al. 2005). Bereits existierende Lymphgefäße werden aber weder in ihren morphologischen, noch in ihren funktionellen Eigenschaften beeinflusst. Daher wird vermutet, dass die systemische Blockade des VEGFR-3 zur Reduktion der Tumor-assoziierten Lymphangiogenese und der anschließenden Metastasierung führen kann, ohne den physiologischen Lymphstrom zu beeinträchtigen (He, Kozaki et al. 2002; He, Rajantie et al. 2004).

Kürzlich wurde erstmals beschrieben, dass VEGFR-3 auch in malignen Gliomen detektiert werden kann (Jenny, Harrison et al. 2006).

1.3.3.1.5. VEGF-C/-D

Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) bindet an den Rezeptor VEGFR-2, und mit deutlich höherer Affinität an den VEGFR-3. Die aktive Form stimuliert die Migration von Endothelzellen und erhöht die Permeabilität von Gefäßen (Stacker, Achen et al. 2002). Zusammen mit VEGF-D agiert VEGF-C als lymphangiogener Wachstumsfaktor, der zur Hyperplasie von Lymphgefäßen führen kann (Enholm, Karpanen et al. 2001; Veikkola, Jussila et al. 2001). Im Gegensatz zum angiogenen Wachstumsfaktor VEGF scheint VEGF-C nicht durch Hypoxie stimuliert zu werden, sondern auf bestimmte Zytokine zu reagieren, z.B. im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen (Ristimaki, Narko et al. 1998). Während der Embryonalentwicklung ist VEGF-C für die Migration der lymphatischen Endothelzellen essenziell, in VEGF-C-defizienten Mäusen führen Lymphödeme zum Tod der Tiere (Karkkainen, Haiko et al. 2004).

Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) ist der zweite lymphangiogene Wachstumsfaktor, der an die Rezeptoren VEGFR-2 und -3 bindet. Er teilt 61% der Aminosäuresequenz mit VEGF-C und wird auf die gleiche Art und Weise proteolytisch prozessiert (Stacker, Achen et al. 2002). Die Funktionen von VEGF-D stehen im engen Zusammenhang mit VEGF-C und spielen eine große Rolle im Rahmen der Lymphangiogenese. Allerdings ist der Verlust von VEGF-D im Rahmen der Embryonalentwicklung nicht letal (Baldwin, Halford et al. 2005).

Sowohl VEGF-C als auch VEGF-D haben Einfluss auf die lymphatische Metastasierung von Tumoren. Die Expression der beiden Wachstumsfaktoren führt in Tumor-Tiermodellen zur verstärkten Lymphangiogenese und korreliert mit der lymphatischen Metastasierung (Mandriota, Jussila et al. 2001; Skobe, Hawighorst et al. 2001; Stacker, Caesar et al. 2001; Yanai, Furuhashi et al. 2001; Nakamura, Yasuoka et al. 2003; Nakamura, Yasuoka et al. 2003). Beide Wachstumsfaktoren wurden bereits in malignen Gliomen nachgewiesen: VEGF-C auf mRNA-Ebene (Jenny, Harrison et al. 2006) sowie VEGF-D immunhistochemisch in Zelllinien maligner Gliome (Debinski, Slagle-Webb et al. 2001).

1.3.3.1.6. CCL21

CC chemokine ligand 21 (CCL21, SLC, EXODUS2, SCYA21) gehört zu der Familie der Chemokine und ist in differenzierten Lymphendothelzellen mit Podoplanin co-lokalisiert und wird von diesen Zellen sezerniert (Jain and Padera 2003; Kerjaschki, Regele et al. 2004). Es ist Ligand für die Chemokin-Rezeptoren CCR7 und CXCR3 und kann über diese Rezeptoren die Chemotaxis von Immunzellen in lymphoides Gewebe einleiten (Adams and Alitalo 2007).

Knockout-Mäuse für CCL21 zeigen unzureichende Lymphozyten-Rekrutierung und Fehler bei der Lokalisation von dendritischen Zellen (Gunn, Kyuwa et al. 1999), ohne direkten Einfluss auf die Entstehung des Lymphgefäßsystems zu haben.

1.3.3.1.7. CCR7

CC chemokine receptor 7 (CCR7, CD196) gehört zu der Familie G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren, die durch sieben membrandurchspannende helikale Domänen gekennzeichnet sind. CCR7 ist vor allem auf Lymphozyten und reifen dendritischen Zellen exprimiert (Ohl, Mohaupt et al. 2004). Der Rezeptor bindet die beiden Liganden CCL19 und CCL21 und vermittelt über diesen Signalweg die Rekrutierung verschiedener Immunzellen in sekundäre lymphatische Organe (Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008).

In einer Untersuchung des Chemokin-Rezeptorprofils mesenchymaler Stammzellen konnte gezeigt werden, dass CCR7 auch auf MSC aktiv exprimiert ist (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Es scheint somit möglich, dass CCR7-positive MSC von CCL21-sezernierenden Lymphendothelzellen im Rahmen der Lymphangiogenese angezogen werden.

1.3.4. Das Tie2-Promotor/Enhancer-Konstrukt

Das Tie2-Gen (auch Tek) kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der Signale der Angiopoetin-Familie vermittelt (Davis, Aldrich et al. 1996; Suri, Jones et al. 1996) und die Endothelzell-spezifische Transkription reguliert. Tie2 ist fast ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert (Dumont, Yamaguchi et al. 1992) und für den regelhaften Ablauf der embryonalen Gefäßentwicklung (Dumont, Fong et al. 1995; Sato, Tozawa et al. 1995) sowie der Tumorangio-genese essenziell (Lin, Buxton et al. 1998; Siemeister, Schirner et al. 1999). Neben den Endothelzellen wurden von De Palma et al. mit proangiogenen Monozyten der hämatopoetischen Zellreihe und Vorläuferzellen der Perizyten, die dem Tumor-Stroma entstammen, zwei weitere kleine Zellpopulationen identifiziert, die Tie2 exprimieren und ebenfalls für die Gefäßentwicklung benötigt werden (De Palma, Venneri et al. 2005).

Im Rahmen der Embryonalentwicklung wird Tie2 nachgewiesen sobald die erste Endothelzelle entstanden ist. Es bleibt während der gesamten Zeit hochreguliert und kann später auch in jedem adulten Gewebe auf den Gefäßen detektiert werden (Iwama, Hamaguchi et al. 1993; Maisonpierre, Goldfarb et al. 1993; Sato, Qin et al. 1993; Schnurch and Risau 1993; Dumont, Fong et al. 1995; Schlaeger, Bartunkova et al. 1997).

In Mäusen führt der Tie2-Knockout zu einer stark reduzierten Zahl der Endothelzellen und abnormen Gefäßstrukturen (Sato, Tozawa et al. 1995).

Der Tie2-Promotor zählt zu den effektivsten Promotoren, um eine selektive Expression exogener Genprodukte in Endothelzellen zu erzielen und wurde bereits in verschiedenen Studien mit transgenen Mäusen *in vivo* untersucht (Schlaeger, Qin et al. 1995; Fadel, Boutet et al. 1998). Probleme gab es allerdings dadurch, dass die Expression der exogenen Gene nur zu Beginn der Vaskulogenese nachweisbar war, später abnahm und im adulten Gewebe gar nicht mehr zu detektieren war (Schlaeger, Bartunkova et al. 1997). Dieses Problem besteht sogar bei Verwendung der gesamten posttranslationalen Exonsequenz, so dass die Intronsequenz auf Bereiche untersucht wurde, die außerhalb des 5'-Promotors liegen und trotzdem für die andauernde Endothel-spezifische Expression benötigt werden. Dieser so genannte Verstärker (Enhancer) konnte 1997 von Schläger et al. identifiziert werden und wurde auch in dieser Arbeit verwendet (Schlaeger, Bartunkova et al. 1997). Das Tie2-Promotor/Enhancer-Konstrukt bietet daher die ausgezeichnete Möglichkeit, die gefäßspezifische Expression ausgewählter Gene zu steuern und zu untersuchen.

1.4. Podoplanin-Expression in malignen Neoplasien

Mittlerweile wurden verschiedene Studien veröffentlicht, die die Podoplanin-Expression in unterschiedlichen humanen Karzinomen aufgedeckt haben.

Im Plattenepithelkarzinom der Haut zeigte sich eine, vom Tumorgrad abhängige Expression des Oberflächenmoleküls (Schacht, Dadras et al. 2005) und auch in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Martin-Villar, Scholl et al. 2005), der Lunge (Kato, Kaneko et al. 2005; Wicki, Lehembre et al. 2006) sowie der Kopf- und Nackenregion (Yuan, Temam et al. 2006) konnte Podoplanin nachgewiesen werden. Mesotheliome mit epitheloidem Wachstum waren in 93% der untersuchten Tumoren Podoplanin-positiv (Ordonez 2006). In Gewebe von Zervixtumoren zeigte der Großteil der untersuchten Proben eine fokal begrenzte, und auf die Invasionszone beschränkte Expression. Aufgrund der guten Korrelation der Podoplanin-Expression mit den klinischen Daten wurde Podoplanin für diese Tumorentität als prognostischer Marker vorgeschlagen (Dumoff, Chu et al. 2005; Dumoff, Chu et al. 2006).

Für das ZNS wurde im Jahr 2006 erstmals beschrieben, dass Podoplanin in den verschiedenen Hauptgruppen der Hirntumoren nachweisbar ist (Mishima, Kato et al. 2006; Shibahara, Kashima et al. 2006). Es zeigte sich vor allem bei astrozytären Tumoren eine Abhängigkeit der Expressionsstärke vom Malignitätsgrad des Gewebes. Während

sich beim Astrozytom (WHO-Grad II) nur 0 bis 15,8% der Tumorproben positiv darstellten und beim anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) 25,6 bis 47,1% der Tumoren ein Signal in der Immunhistochemie zeigten, waren beim Glioblastom mit 47 bis 82,9% die meisten Tumorproben positiv. Diese Tumorproben waren vor allem in der Umgebung nekrotischer Bereiche besonders intensiv angefärbt (Mishima, Kato et al. 2006; Shibahara, Kashima et al. 2006).

Ob es möglich ist, Podoplanin in Zukunft als immunhistochemischen Marker für die Diagnose- und Prognosestellung zu verwenden, ist weiterhin Gegenstand intensiver Diskussionen (Wicki and Christofori 2007) und wird am Beispiel des Glioblastoma multiforme auch in dieser Arbeit untersucht.

1.5. Fragestellung und experimentelle Strategie

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein hoch maligner Hirntumor mit einer infausten Prognose. Unabhängig von der Radikalität des therapeutischen Vorgehens verbleiben immer Tumorzellen, die das umliegende Hirnparenchym infiltriert haben und so innerhalb kürzester Zeit zum Rezidivwachstum führen.

Im Rahmen der Tumorprogression führt eine starke Neoangiogenese zu einem abnormen und insuffizienten Gefäßsystem, das entscheidend die Eigenschaften des GBM beeinflusst. Die Mechanismen hinter diesem unkontrollierten Gefäßwachstum sind bisher noch nicht verstanden. Es ist unklar, durch welche Faktoren die Gefäße diesen ungewöhnlichen Phänotyp annehmen und in wieweit sich diese Entwicklung von der physiologischen Gefäßneubildung unterscheidet.

Endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark sind an verschiedenen Stadien der Gefäßentwicklung beteiligt. Dabei stellen mesenchymale Stammzellen (MSC) eine multipotente Population des Knochenmarks dar, für die auch endotheliales Differenzierungspotenzial vermutet wird.

In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob MSC nach systemischer Applikation im Rahmen der Neoangiogenese des Glioblastoms in das Tumorgewebe rekrutiert werden und ob sie dort aktiv an der Gefäßentwicklung beteiligt sind. Dieser Mechanismus würde die Grundlage für einen therapeutischen Ansatz darstellen, bei dem gentechnisch modifizierte MSC als Vehikel für therapeutisch wirksame Gene dienen. Über eine gefäßspezifische Aktivierung dieser modifizierten MSC könnte das neu entstehende Gefäßsystem des GBM gezielt angegriffen werden.

Vor dem Hintergrund der noch völlig unverstandenen Pathophysiologie des abnormen Gefäßsystems und der Tatsache, dass Lymphangiogenese in zahlreichen Tumorentitäten des menschlichen Körpers ein entscheidendes Merkmal für die Aggressivität eines Tumors ist, soll zudem untersucht werden, ob bei Hirntumoren neben der klassischen Hämangiogenese auch Mechanismen der Lymphangiogenese Einfluss auf die Gefäßentwicklung haben. Es soll die Frage beantwortet werden, ob im Rahmen des Tumorwachstums ein funktionierendes Lymphgefäßsystem entsteht, obwohl das adulte Gehirn normalerweise frei von Lymphgefäßen ist.

Hierzu wird das Expressionsmuster lymphatischer Markerproteine analysiert und die Frage beantwortet, in wieweit sich dieses für diagnostische und therapeutische Zwecke nutzen lässt. Auf das Oberflächenprotein Podoplanin wird dabei besonders eingegangen und eine Perspektive zur Analyse der noch unbekanntenen Funktion geschaffen.

Experimentelle Strategie:

- Im Tierversuch systemische Applikation von primären humanen MSC nach der Implantation eines humanen Glioms in das Gehirn immundefizienter Ratten mit nachfolgender histopathologischer Untersuchung des Tumorgewebes
- Untersuchung von humanen Gliomen auf die Expression ausgewählter Chemokine, die als Mediatoren die Rekrutierung von MSC vermitteln könnten
- Stabile Transfektion von zwei MSC-Linien mit einem Vektor, der das Reportermolekül RFP unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes exprimiert;
Intravenöse Applikation dieser transfizierten Zellen in immundefiziente Ratten mit implantiertem Gliom und anschließender Untersuchung des Tumorgewebes auf aktive RFP-Expression
- Stabile Transfektion einer MSC-Linie mit einem Vektor, der ein Selbstmordgen unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes exprimiert, das bei Expression durch Zugabe einer chemischen Substanz aktiviert werden kann;
Entwicklung eines Therapieschemas zur weiterführenden Untersuchung der Effizienz dieser Therapiestrategie
- Analyse der Expression ausgewählter lymphatischer Markerproteine sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Gewebe von humanen Gliomen unterschiedlicher Dignität;
Untersuchung und statistische Evaluation dieser Expressionswerte auf eine, vom Malignitätsgrad abhängige, Expression
- Untersuchung von zwei Glioblastom-Zelllinien auf eine Podoplanin-Expression
- Stabile Transfektion dieser beiden Zelllinien mit einem Podoplanin-Überexpressionsvektor für weiterführende Versuche zur Analyse der noch unbekanntem Podoplanin-Funktion

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Medien und Zusätze

Dulbecco`s Modified Eagles`s Medium (DMEM)	Gibco (Invitrogen), Carlsbad
RPMI Medium 1640	Gibco (Invitrogen), Carlsbad
Dialysiertes fetales Kälberserum (dFCS)	Gibco (Invitrogen), Carlsbad
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Roche, Mannheim
Penizillin/ Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories, Pasching
Ampizillin	PAA Laboratories, Pasching
Blastizidin	Invitrogen, Carlsbad
Neomycin G418	Invitrogen, Carlsbad
Dulbecco`s PBS (1x)	PAA Laboratories, Pasching
EDTA	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.1.2. Kultivierte Zellen

Tab. 4: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelltypen.

Name	Beschreibung	Herkunft	Medium	Zusätze
balb/c	murine MSC-Linie	PD Dr. R. Huss, ehem. Pathologisches Institut der LMU	RPMI 1640	10% dFCS 1% P/S
L87	humane MSC-Linie	PD Dr. R. Huss, ehem. Pathologisches Institut der LMU	RPMI 1640	10% dFCS 1% P/S
pMSC	primäre humane MSC	Patientenspende über Dr. J. Mysliwietz, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München	DMEM	20% dFCS 1% P/S
C6	Rattengliom-Zelllinie	ATCC, Manassas	DMEM	10% dFCS 1% P/S
U87	humane Gliom-Zelllinie	ATCC, Manassas	DMEM	10% dFCS 1% P/S
U373	humane Gliom-Zelllinie	ATCC, Manassas	DMEM	10% dFCS 1% P/S
U373-GFP	humane Gliom-Zelllinie (stabil transfiziert mit GFP)	Transfektion durch das Tumorbiologische Labor PD Dr. R. Goldbrunner	DMEM	10% dFCS 1% P/S

2.1.1.3. Eigenschaften der verwendeten Zellen und Zelllinien

pMSC (Mysliwietz und Mitarbeiter):

Primäre humane mesenchymale Stammzellen (MSC), die aus dem Knochenmark erwachsener Patienten isoliert wurden.

Mittels FACS-Analyse (durchgeführt von Dr. Josef Mysliwietz, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München) wurde auf den adhärent wachsenden Zellen die Expression von CD105, CD90, CD166 and CD40 nachgewiesen, während typische hämatopoetische and endotheliale Marker auf der Zelloberfläche nicht exprimiert sind.

In Vorarbeiten wurde zudem das Differenzierungspotenzial der so isolierten Zellen nachgewiesen. Unter entsprechenden Kulturbedingungen haben sich sowohl Knorpel- und Knochen- als auch Muskelzellen aus den isolierten primären Zellen anzüchten lassen (nicht veröffentlichte Daten, durchgeführt von Dr. Josef Mysliwietz, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München).

L87 (Thalmeier und Mitarbeiter, 1994):

Diese Zelllinie ist eine *simian virus 40* (SV40)-transformierte humane MSC-Linie mit fibroblastoidem Aussehen in der Zellkultur.

Die adhärent wachsende Stromazellen wurden aus dem Knochenmark eines hämatologisch gesunden männlichen Patienten isoliert und über die Transformation des SV40 large T-Antigens (*simian virus 40 large T antigen*) immortalisiert (Thalmeier, Meissner et al. 2001). In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde mithilfe der Durchflusszytometrie gezeigt, dass die Zelllinie die mesenchymalen Markerproteine CD73 und CD105 exprimiert, jedoch negativ für die myelogenen Marker CD34, CD14, CD45 und MHC II ist und somit ebenfalls einen charakteristischen Phänotyp für MSC aufweist. Funktionale Versuche haben zudem das mesenchymale Differenzierungspotenzial der L87-Zelllinie nachgewiesen. Diese Zellen können nach letaler Bestrahlung das hämatopoetische System rekonstituieren (Thalmeier, Meissner et al. 2001), die Bildung von Muskelzellen in Dystrophin-defizienten Mäusen unterstützen (Huss et al., noch nicht veröffentlicht) und sich *in vitro* osteogen differenzieren (Thalmeier, Meissner et al. 2001; Moosmann, Hutter et al. 2005).

balb/c (Huss und Mitarbeiter)

Murine MSC-Linie, die über die Transformation des SV40 large T-Antigens immortalisiert wurde und sowohl den charakteristischen mesenchymalen Phänotyp aufweist als auch das mesenchymale Differenzierungspotenzial besitzt (nicht veröffentlichte Daten, R. Huss und Mitarbeiter).

C6 (Benda und Mitarbeiter, 1968):

Diese Zelllinie geht auf einen glialen Rattentumor zurück, der *in vivo* durch Injektion von N-Nitroso-N-Methylharnstoff induziert wurde. Die Tumoren weisen ein fibroblastenähnliches Wachstum auf, wobei das Tumorgewebe dem undifferenzierten Glioblastoma multiforme des Menschen gleicht.

U87 (Ponten und Mitarbeiter, 1968):

Diese humane Zelllinie wurde durch Ponten und Mitarbeiter zwischen 1966 und 1969 mit einer Reihe anderer Zelllinien aus humanen malignen Gliomen isoliert (Ponten and Macintyre 1968). Das entstehende Gliom zeigt ein epitelähnliches Wachstum mit einer sehr hohen Gefäßdichte.

U373 (Ponten und Mitarbeiter, 1968):

Diese humane Zelllinie wurde von Ponten und Mitarbeitern aus einem malignen Gliom eines 61-jährigen Patienten isoliert (Ponten and Macintyre 1968). Das entstehende Gliom zeigt ein epitelähnliches Wachstum mit einer hohen Gefäßdichte.

2.1.2. Puffer

TaqMan-PCR:

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
in H₂O

PCR:

TBE-Puffer: 90 mM Tris
2 mM Borsäure
20 mM EDTA, pH 8,0
in H₂O

FACS:

FACS-Puffer: 2% BSA
2 mM EDTA
in PBS

Immunhistochemie:

Zitratpuffer: 8,2 mM C₆H₅Na₃O₇ (Natriumzitat)
1,8 mM C₆H₈O₇ (Zitronensäure)
in H₂O, pH 6,0

Tris-Puffer (Waschpuffer): 50 mM Tris
0,3 M NaCl
0,1% Tween 20
in H₂O, pH 7,6

EDTA-Puffer: 1mM EDTA
in H₂O, pH 8,0

DAPI:	1 µg/ml DAPI in H ₂ O
<u>Mikrobiologie:</u> LB-Medium:	86 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt in H ₂ O
SOC-Medium:	0,5% Hefeextrakt 2% Bacto-Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose in H ₂ O, autoklavieren ohne Glukose
TSS-Lösung	30 mM MgCl ₂ 10% Polyethylenglykol 5% DMSO in LB-Medium, pH 6,5 bis 6,8; autoklavieren

2.1.3. Lösungen

TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City
First Strand Buffer (5x)	Invitrogen, Carlsbad
DTT	Invitrogen, Carlsbad
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison
Lineares Acrylamid	Ambion, Austin, Texas, USA
DNase- und RNase-freies Wasser	Gibco, Auckland
Ladepuffer für Agarosegele	New England Biolabs, Ipswich
1 kB-Leiter	New England Biolabs, Ipswich
SuRE/Cut Puffer H	Roche, Mannheim
SuRE/Cut Puffer M	Roche, Mannheim
Reaktionspuffer für Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich
Reaktionspuffer für T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich
Peroxidaseblock-Lösung	Dako, Glostrup
Biotinylated Link	Dako, Glostrup
Streptavidin-HRP	Dako, Glostrup
DAB-Chromogen	Dako, Glostrup
DAB-Substratpuffer	Dako, Glostrup
Antikörper-Verdünnungslösung	Dako, Glostrup
Hämotoxilin	Fluka Chemie AG, Buchs

2.1.4. Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Carlsbad
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
DAPI	Fluka Chemie AG, Buchs
Propidium-Iodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Tween 20	Dako, Glostrup
Xylol	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Apotheke Innenstadt, München
Ethanol, 96%	Apotheke Innenstadt, München
Ethanol, 70%	Apotheke Innenstadt, München
Methanol, absolut	Merck, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung 4%	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Wasserstoffperoxid 30% H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Desinfektionsmittel	Bode Chemie, Hamburg
Diethylether	Merck, Darmstadt
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden

2.1.5. Reagenzienpakete

QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree® Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
RNase-freies DNase Set	Qiagen, Hilden

2.1.6. Enzyme

SuperScript™ Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich
<i>Eco</i> R1	Roche, Mannheim
<i>Xba</i> I	Roche, Mannheim
<i>Sac</i> II	Roche, Mannheim
<i>Bgl</i> II	Roche, Mannheim
<i>Apa</i> I	Roche, Mannheim
<i>Not</i> I	Roche, Mannheim
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich

2.1.7. Vektoren

pCMV/Bsd	Invitrogen, Carlsbad
pcDNA3	Invitrogen, Carlsbad
E. coli-Stamm DH5α	Invitrogen, Carlsbad

2.1.8. Oligonukleotide

2.1.8.1. Einzelne Oligonukleotide (Primer und Sonden)

Tab. 5: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (Primer und Sonden).

Spezifität	Orientierung	Sequenz	cDNA Spezifität
CCL19	Vorwärts-Primer	5'-AGAGGACCTCAGCCAAGATGAA-3'	ja
	Rückwärts-Primer	5'-GACTCCGGGCTCCCTCTG-3'	
	Sonde	5'-CGCCGCAGCAGTTAACCTATGACCG-3'	
CCL21	Vorwärts-Primer	5'-CGCAGCTACCGGAAGCAG-3'	nein
	Rückwärts-Primer	5'-CTGCCTGAGAGCGCTTGC-3'	
	Sonde	5'-CTCCATCCCAGCTATCCTGTTCTTGCC-3'	
CCR7	Vorwärts-Primer	5'-GCTCCAGGCACGCAACTTT-3'	nein
	Rückwärts-Primer	5'-ACCACGACCACAGCGATGA-3'	
	Sonde	5'-AGCGCAACAAGGCCATCAAGGTG-3'	
CX3CL1	Vorwärts-Primer	5'-CCTGTAGCTTTGCTCATCCACTATC-3'	nein
	Rückwärts-Primer	5'-TCCAAGATGATTGCGCGTT-3'	
	Sonde	5'-ACAGAACCAGGCATCATGCGGCA-3'	
CXCL12	Vorwärts-Primer	5'-CATCAGTGACGGTAAACCAGTCA-3'	ja
	Rückwärts-Primer	5'-CAGCCGTGCAACAATCTGAA-3'	
	Sonde	5'-CCGATGCCCTGCCGTTCTT-3'	

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Applied Biosystems, Foster City, produziert. Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie die Sonden wurden für diese Gene einzeln geliefert und vor der Analyse gemischt.

Die Sonden sind mit 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) am 3'-Ende (Extinktion bei 490 nm, Emission bei 530 nm) und Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als Quencher am 5'-Ende markiert.

2.1.8.2. Fertig gemischte Oligonukleotide (AoD, PDAR)

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid/Sonden-Gemische (AoD, PDAR).

Spezifität	ID-Nummer	Art des Tests	cDNA Spezifität
CCL17	Hs00171074_m1	AoD	ja
CCL27	Hs00171157_m1	AoD	ja
CCL28	Hs00219797_m1	AoD	ja
CCL3	Hs00234142_m1	AoD	ja
CCL5	Hs00174575_m1	AoD	ja
CXCL13	Hs00757930_m1	AoD	ja
Lyve-1	Hs00272659_m1	AoD	ja
Podoplanin	Hs00366766_m1	AoD	ja
Prox-1	Hs00160463_m1	AoD	ja
VEGF-C	Hs00153458_m1	AoD	ja
VEGF-D	Hs00189521_m1	AoD	ja
VEGFR-3	Hs00176607_m1	AoD	ja
GAPDH	4310884E	PDAR	ja
18s rRNA	4310893E	PDAR	nein

Die sequenzspezifischen Oligonukleotide wurden von der Produktionsfirma Applied Biosystems, Foster City, bereits als fertig gemischte Präparate (AoD, Assay on Demand, oder PDAR, predeveloped assay reagents), bestehend aus je zwei Oligonukleotiden und einer Fluoreszenzsonde, in 20-facher Konzentration geliefert. AoD ist lediglich eine ältere Bezeichnung, es besteht sonst kein Unterschied zwischen den Mischformen AoD und PDAR. Im Folgenden wird statt den AoD und PDAR von kommerziellen Oligonukleotid/Sonden-Gemischen gesprochen. Die Sonden dieser Gene sind ebenfalls mit FAM am 3`-Ende (Extinktion bei 490 nm, Emission bei 530 nm) und TAMRA als Quencher am 5`-Ende markiert. Lediglich die Sonden der Gene 18S rRNA und GAPDH sind mit VICTM (Fluoreszenzfarbstoff, patentgeschützte Formel) am 5`-Ende (Extinktion bei 530 nm, Emission bei 575 nm) und TAMRA als Quencher am 3`-Ende markiert.

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (25 mM)

Qiagen, Hilden

Hexamernukleotide (10x)

Roche, Mannheim

2.1.9. Antikörper

Tab. 7: Primärantikörper.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primärantikörper mit der jeweils verwendeten Konzentration.

Spezifität (Konzentration)	Spezies	Klonalität	Verwendung	Firma
anti-h-Podoplanin (20 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC, IF, FACS	Acris Antibodies, Hiddenhausen
anti-h-Prox-1 (10 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IHC, IF	RELIATech, Braunschweig
anti-h-LYVE-1 (5 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IHC, IF	Acris Antibodies, Hiddenhausen
anti-h-VEGF-C (2 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IHC, IF	Zymed Laboratories, San Francisco
anti-h-VEGF-D (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC	R&D Systems, Minneapolis
anti-h-VEGFR-3 (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC, IF	R&D Systems, Minneapolis
anti-h-VEGFR-3 (2 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IF	Zymed Laboratories, San Francisco
anti-h-CCR7 (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC	BD Pharmingen, San Jose
anti-h-CCL21 (15 µg/ml)	Ziege	polyklonal	IHC	R&D Systems, Minneapolis
m-IgG1 (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	FACS	Dako, Glostrup
anti-h-GFAP (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC	Dako, Glostrup
anti-h-CD105 (6,7 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC	Chemicon (Millipore), Billerica
anti-SV40 large T Antigen (5 µg/ml)	Maus	monoklonal	IHC	Calbiochem, Darmstadt

Tab. 8: Sekundärantikörper.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper mit der jeweils verwendeten Konzentration.

Spezifität (Konzentration)	Spezies	Klonalität	Verwendung	Firma
anti-m-IgG ₁ /FITC (4 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IF, FACS	Dako, Glostrup
anti-m-IgG ₁ /TRITC (4 µg/ml)	Kaninchen	polyklonal	IF	Dako, Glostrup
anti-m-IgG ₁ /PE (1 µg/ml)	Ziege	polyklonal	FACS	Caltag, Burlingame
anti-rb-IgG ₁ /Texas-Red (6 µg/ml)	Ziege	polyklonal	IF	Vector, Burlingame
anti-rb-IgG ₁ /FITC (4 µg/ml)	Schwein	polyklonal	IF	Dako, Glostrup

2.1.10. Zubehör

Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen
6-Loch-Kulturplatte	Nunc A/S, Roskilde
24-Loch-Kulturplatte	Nunc A/S, Roskilde
Zellkulturschalen 100x 20mm	TPP, Trasadingen
Isopropanolbehälter "Mr. Frosty"	Nalgene, Hereford
Steriles Einmalskalpell	Feather, Köln
Cryoröhrchen mit Innengewinde	Peske Laborbedarf, Aindling
Elektroporationsküvette 4mm	PeqLab, Erlangen
Elektroporationsküvette 0,1cm	Bio Rad, Hercules
Polypropylen-Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City
Folie für die RT-PCR-Platte full plate cover	Applied Biosystems, Foster City
Mehrkanal Pipette Research®	Eppendorf, Hamburg
Eindeckmedium DPX-Moutant	Fluka Chemie AG, Buchs
Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen	Dako, Glostrup

2.1.11. Geräte

Zellkultur-Zentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Inkubator Modell 400	Janeschitz, Hammelburg
Inkubator Function Line	Heaeus, Hanau
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia
Schüttelfähiger Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal 16	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
4°C Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

Spectrophotometer DU 530	Beckmann Coulter, Fullerton
Robocycler Gradient 96	Stratagene, Cedar Creek
Netzgerät Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Bio-Rad, Hercules
RT-PCR-Gerät TaqMan® 7000	Applied Biosystems, Foster City
FACS-Gerät FACS Calibur	BD Biosciences, San Jose
Mikrotom Jung CM 300	Leica, Nussloch
Milli-Q Water Purification System	Millipore, Billerica
pH-Meter 526	WTW, Weilheim
Mikrowelle	Siemens, München
Inhalationsnarkosegerät Titus A	Dräger Medizintechnik, Lübeck
Verdunster Isofluran Vapor	Dräger Medizintechnik, Lübeck
Digitalkamera Powershot G2	Canon, Tokio
Mikroskop Axioskop 2 light	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena

2.1.12. Tierversuche

2.1.12.1. Versuchstiere

Nacktratten HSD:RH-rnu

Harlan Winkelmann, Borcheln

Im Rahmen der Tierversuche wurde mit immuninkompetenten Nacktratten gearbeitet, um eine Abstoßung der injizierten Zellen zu vermeiden. Die Immuninkompetenz dieser Ratten gründet sich auf einen autosomal-rezessiven Gendefekt, der 1953 als spontane Mutation am Rowett Research Institute in Aberdeen (Großbritannien) auftrat. Ratten mit dieser Mutation besitzen einen zystischen, nicht-funktionalen Thymus, so dass Fremdkörperreaktionen auf ein xenogenes Transplantat deutlich vermindert auftreten.

2.1.12.2. Zubehör

Käfig Typ IV, Polycarbonat	Ehret, Emmendingen
Edelstahldeckel mit Klemmrahmenverschluss	Ehret, Emmendingen
Tränkeflasche	Ehret, Emmendingen
Tränkekappe	Ehret, Emmendingen
Futter Zucht und Halteungsdiät für Nager 2018	Harlan Winkelmann, Borcheln
Kleintierstreu Jelu-Flock	Harlan Winkelmann, Borcheln
Einmalrasierer	Ampri, Stelle
Skalpell	Feather, Köln
Mikroliterspritze Microliter®	Hamilton, Bonaduz
Feindosierungsspritze Omnifix® 1ml	Braun, Melsungen
Zellsieb 40 µm BD Falcon	BD Biosciences, Bedford

UDS-Kanüle, Größe G 30, kurz	Hoechst, Frankfurt am Main
Nahtmaterial 5-0 Vicryl	Ethicon, Somerville
Isofluranmaske	Eigenbau des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München
Stereotaxiegerät	Eigenbau des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München
Mikromanipulator	Eigenbau des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München

2.1.13. Software

ABI Prism (RT-PCR)	Applied Biosystems, Foster City
SPSS Statistics (Statistik)	SPSS, Chicago
Software IHC (Immunhistochemie)	Zeiss, Jena
CellQuest (FACS)	BD Biosciences, Bedford
HUSAR sequence analysis tools (PCR)	DKFZ, Heidelberg

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Reagenzien durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Zugabe zu den Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt, um starke Temperaturschwankungen zu verhindern.

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die verwendeten Zelltypen wurden jeweils mit dem optimalen Zellmedium (s. Kap. 2.1.1.2) bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Dabei wurde das Zellmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt.

2.2.1.2. Ernten von Zellen

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die gezüchteten Zellen durch Zugabe von 1,5 mM EDTA in PBS schonend vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, um die exprimierten Oberflächenmoleküle bestmöglich zu erhalten.

Nach Zugabe von 1/5-Volumen Medium wurden die Zellen für drei Minuten bei 150x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellett im entsprechenden Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen in gewünschter Zellzahl verteilt.

2.2.1.3. Einfrieren lebender Zellen

Lebende Zellen wurden im jeweiligen Vollmedium nach Zugabe von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Isopropanolbehälter für 24 Stunden bei -80°C eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert.

2.2.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Es wurden nur Trypanblau-negative, lebendige Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{gezählte Zellzahl} : 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2. Tumorproben

Die Gewebeproben der Hirntumoren wurden direkt nach der Entnahme im Operationssaal in einen dafür geeigneten Behälter gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -180°C gelagert (Tumorbiologisches Labor PD Dr. Roland Goldbrunner, Neurochirurgische Klinik Großhadern der LMU München).

Insgesamt wurden Gewebeproben von 16 Glioblastomen (WHO-Grad IV) und 16 niedrigmalignen diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) für die Realtime-RT-PCR in tumorchirurgischen Operationen entnommen. Als bestmögliche Annäherung für Gewebe des Normalhirns wurde nicht-neoplastisches Hirngewebe (NNH) von 10 Patienten verwendet, das bei epilepsiechirurgischen Operationen gewonnen wurde.

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Gewebeproben von insgesamt 18 Glioblastomen (WHO-Grad IV), 8 niedrig-malignen Astrozytomen (WHO-Grad II) und 8 anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO-Grad III) vom Neuropathologischen Institut der LMU München (Leitung Prof. Dr. Jochen Herms) zur Verfügung gestellt.

Die Diagnosen aller Gewebeproben wurden vom Neuropathologischen Institut der LMU München unter Beachtung der WHO-Kriterien für Gliome (Kleihues and Cavenee 2000) gestellt.

2.2.3. Bestimmung der Genexpression auf mRNA-Ebene

2.2.3.1. Prinzip der Realtime-TaqMan® RT-PCR

Die Realtime-TaqMan® RT-PCR ermöglicht die quantitative Bestimmung von Amplifikationsprodukten der Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie ist eine homogene Reaktion, bei der die Amplifikation und der Nachweis des Produktes in einem Reaktionsgefäß möglich sind. In Abb. 5 ist das Prinzip der Realtime-TaqMan® RT-PCR dargestellt.

Insgesamt baut die Realtime-TaqMan® RT-PCR auf dem ursprünglichen 5'-Nuklease-Versuch auf (Holland, Abramson et al. 1991). Dabei dient die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der speziellen AmpliTaq-DNA-Polymerase der Detektion des sequenzspezifischen Amplifikationsproduktes (Lee, Connell et al. 1993).

Die TaqMan®-Sonde ist ein Oligonukleotid, das zwischen zwei spezifischen Primern (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) an die zu detektierende DNA bindet. Das 5'-Ende dieses Oligonukleotides ist mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert. Das 3'-Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat), der durch einen Phosphatrest blockiert ist. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum

Reporterfarbstoff wird bei intakter Sonde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Der Quencher fungiert hierbei als Akzeptor der abgegebenen Energie.

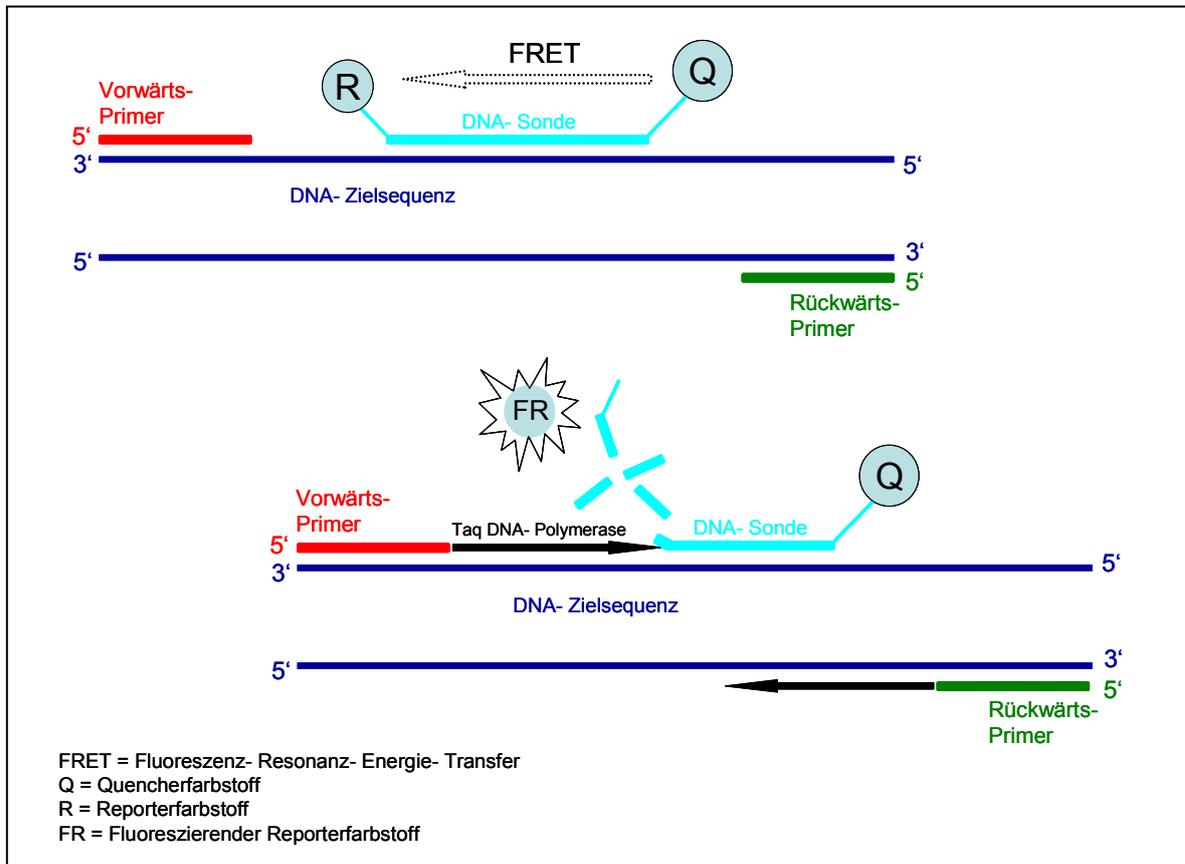


Abb. 5: Schematische Darstellung der Realtime-TaqMan® RT-PCR

Die sequenzspezifische TaqMan®-DNA-Sonde bindet die DNA-Zielsequenz. Sie hat am 5'-Ende das Reporter-Fluoreszenzmolekül (R) und am 3'-Ende das Quencher-molekül (Q) gebunden, welches durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) das Fluoreszenzsignal unterdrückt.

Bei der Neustrangsynthese wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase die TaqMan®-DNA-Sonde am 5'-Ende hydrolysiert. Es kommt zur Loslösung des Reporter-Fluoreszenzmoleküls vom Quencher, so dass die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird.

(eigene Darstellung)

Im Rahmen der DNA-Hybridisierung bindet die TaqMan®-Sonde an den Matrizen-Strang und wird in der Extensionsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq-Polymerase am 5'-Ende hydrolysiert. Es kommt somit zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher, so dass der FRET unterbrochen wird. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei in jedem PCR-Zyklus mit der Anzahl der zuvor akkumulierten PCR-Produkte.

Dieses Signal ist sequenzspezifisch, da nur vollständig gebundene Sondenmoleküle von der AmpliTaq-Polymerase hydrolysiert werden. Unspezifische Nebenprodukte werden somit nicht nachgewiesen. Die gesamte Reaktion kann für alle Zyklen in einem

geschlossenen Reaktionsgefäß ablaufen, die Fluoreszenzsignale der Reporterfarbstoffe werden mithilfe des ABI PRISM 7000 Sequence Detectors detektiert.

2.2.3.2. Durchführung der Realtime-TaqMan® RT-PCR

RNA-Isolierung:

Die Gesamt-RNA der Tumorzellen und des Kontrollgewebes wurde mithilfe des Reagenzienpakets der Firma Qiagen nach dem mitgelieferten Protokoll aufgearbeitet. Hierzu wurde auf Trockeneis von den Gewebeproben mit einem Skalpell Gewebe abgeschabt und umgehend im RLT-Puffer des Reagenzienpakets resuspendiert.

Wie im Protokoll des Herstellers vorgeschlagen, wurde ein Zwischenschritt eingefügt, um mit einem kompatiblen Reagenzienpaket mögliche genomische DNA zu entfernen. Abschließend wurde die isolierte RNA pro Säule mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration mithilfe des Photometers bestimmt.

Reverse Transkription:

Im Rahmen der reversen Transkription von RNA in cDNA wurden sowohl Ansätze hergestellt, die die Superscript™ Reverse Transkriptase enthalten (RT⁺) als auch Ansätze ohne dieses Enzym (RT⁻). Durch die RT⁻-Ansätze kann weiter bestehende Kontamination der Proben mit genomischer DNA erkannt und vermieden werden. Es wird somit ausgeschlossen, dass die Messung bei cDNA-unspezifischen Sonden verfälscht wird.

Für alle Ansätze wurden 2 µg der jeweiligen RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 27,27 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurde die folgende Reaktionslösung hergestellt.

Tab. 9: Zusammensetzung der Reaktionslösung für die reverse Transkription.

	1x
First Strand Buffer (5x)	60,4 %
DTT	13,4 mM
dNTP	1,5 mM
RNAsin	2,5 U/µl
Acrylamid	0,7 µM
Hexamernukleotide (10x)	3,4 %

Die Reaktion der reversen Transkription wurde ohne Änderungen nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Zu den RT⁺-Ansätzen wurden jeweils 11,87 µl der Reaktionslösung und 0,86 µl der Superscript™ Reverse Transkriptase (172 Units) pipettiert, die bei den RT⁻-Ansätzen durch H₂O ersetzt wurde. Das Reaktionsvolumen betrug somit 40 µl für alle Proben in beiden Ansätzen.

Alle Ansätze wurden anschließend für 60 Minuten bei 42°C und leichtem Rütteln im schüttelfähigen Heizblock inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20°C eingefroren.

Realtime-TaqMan® RT-PCR:

Die Realtime-RT-PCR wurde ohne Änderungen nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Proben wurden hierfür 1:10 in TE-Puffer verdünnt. Für jedes zu untersuchende Gen wurde eine Gebrauchslösung angesetzt.

Für die Gene *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGFR-3*, *Podoplanin*, *Prox-1*, *Lyve-1*, *CCL3*, *CCL5*, *CCL17*, *CCL27*, *CCL28*, *CXCL13*, *GAPDH* und *18s rRNA* waren gebrauchsfertige Oligonukleotid-/Sondengemische verfügbar, so dass sich deren Gebrauchslösung nach der Formel in Tab. 10 zusammensetzte.

Für die Gene *CCL19*, *CCL21*, *CCR7*, *CXCL12* und *CX3CL1* mussten Sonden und Oligonukleotide noch gemischt werden. Die Zusammensetzung der Gebrauchslösung ist in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 10: Zusammensetzung der Gebrauchslösung für die Realtime-RT-PCR mit bereits gebrauchsfertigen Oligonukleotid-/Sondengemischen.

	Volumen
TaqMan Universal Mastermix	10 µl
Gebrauchsfertiges Oligonukleotid-/Sondengemisch (20x)	1 µl
Wasser	7 µl

Tab. 11: Zusammensetzung der Gebrauchslösung für die RT-PCR ohne kommerzielles Oligonukleotid-/Sondengemisch.

	Volumen
TaqMan Universal Mastermix	10 µl
Vorwärts-Primer	300 nM
Rückwärts-Primer	300 nM
Sonde	100 nM
Wasser	aufgefüllt auf 18 µl

Zusätzlich zu den RT-Ansätzen für die cDNA-unspezifischen TaqMan®-Sonden der Gene *CCL21*, *CCR7*, *CX3CR1* und *18s rRNA* wurde für jedes einzelne Gen die Gebrauchslösung auch ohne cDNA angesetzt und gemessen (NTC = no template control), um eine generelle Kontamination der Sonden auszuschließen.

Die einzelnen Proben wurden somit wie in Tab. 12 aufgeführt angesetzt.

Tab. 12: Zusammensetzung der Ansätze für die Realtime-TaqMan® RT-PCR.

	RT ⁺ -Ansatz	RT ⁻ -Ansatz	NTC
Gebrauchslösung des jeweiligen Ansatzes	20 µl	20 µl	20 µl
cDNA-Proben	2,2 µl RT ⁺	2,2 µl RT ⁻	-

Zur Messung von Doppelwerten wurden von jedem Ansatz zweimal 20 µl in die Reaktionsvertiefungen der optischen TaqMan®-PCR-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit der entsprechenden Folie luftdicht verschlossen, kurz zentrifugiert und in das Messgerät TaqMan® 7000 eingesetzt. Am angeschlossenen Computer wurde das Programm gestartet und die Messung mit den Einstellungen aus Tab. 13 durchgeführt.

Tab. 13: Während der Analyse verwendete Einstellungen des Taqman® 7000.

Wiederholungen	1x	1x	40x	40x
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C
Dauer	2 min	10 min	15 sek	1 min

Auswertung:

Bei der Realtime-TaqMan® RT-PCR basiert die Quantifizierung der DNA auf der Kinetik der Reaktion und nicht auf den absoluten Mengen des PCR-Produktes. Es wird daher ein Fluoreszenz-Schwellenwert bestimmt, der so genannte *Threshold Cycle* oder *CT-Wert*. Hierzu erstellt das TaqMan®-Analysegerät Grafiken, aus denen die Stärke des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Zykluszahl hervorgeht.



Abb. 6: Darstellung der Expressionswerte durch das Programm ABI Prism. Durch Darstellung der Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen, wird für jede gemessene Probe die Kinetik der Reaktion aufgezeigt (Darstellung eigener Messdaten).

Es wird der Zyklus bestimmt, bei dem die Kurven einen exponentiellen Anstieg zeigen. Der Schwellenwert wird hierzu für jedes Gen manuell angepasst. Kein CT-Wert ("undetermined") konnte für Proben ermittelt werden, die bei Zyklus 40 noch kein Fluoreszenzsignal emittiert hatten. Diese Probe wurde somit als negativ gewertet und der dazugehörige CT-Wert in der Auswertung gleich 40 gesetzt.

Die Berechnung der Genexpression erfolgte aus diesen Resultaten mithilfe der Δ CT-Methode. Für jede Probe wurden die Mittelwerte der beiden gemessenen CT-Werte errechnet, wobei diese Doppelwerte nicht mehr als einen Zyklus voneinander abweichen durften. Mithilfe so genannter Haushaltsgene ("housekeeper" *GAPDH*, *18S rRNA*), die im untersuchten Gewebe konstante Expressionslevel zeigen, wurden die Expressionswerte der gemessenen Proben normalisiert. Der Expressionsunterschied zwischen dem untersuchten Gen (Zielgen) und dem Haushaltsgen (Referenzgen) wurde hierzu nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta CT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen})$$

Anschließend wurde dieser Δ CT-Wert als Potenz zur Basis 2 dargestellt und für die weitere Auswertung verwendet:

$$\text{Endwert} = 2^{\Delta CT}$$

Da sich in der Auswertung die Expressionswerte von *18S rRNA* stabiler und besser reproduzierbar zeigten als die von *GAPDH*, wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich *18S rRNA* als Referenzgen verwendet.

Eine generelle Kontamination der Proben konnte ausgeschlossen werden, da in keinem der NTC-Ansätze Expressionswerte gemessen wurden. Mithilfe des DNase-Verdau war zudem eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA vermieden worden. Für die cDNA-unspezifischen Oligonukleotid-/Sondengemische zeigten sich Differenzen von deutlich mehr als fünf Zyklen zwischen den CT-Werten der RT⁻- und der RT⁺-Proben.

2.2.4. Histopathologische Verfahren

2.2.4.1. Immunhistochemie

2.2.4.1.1. Prinzip der Immunhistochemie

Zur Detektion bestimmter Proteine in Paraffinschnitten wurde eine Immunhistochemie nach dem Prinzip des markierten Streptavidin-Biotin-Systems durchgeführt.

Dabei erkennt und bindet ein unkonjugierter Primärantikörper das Antigen im Gewebe und wird dann von einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gebunden. Aufgrund der

starken Affinität von Streptavidin zu Biotin reagiert das konjugierte Biotin des Antikörpers mit dem Streptavidin eines enzymmarkierten Streptavidinkomplexes. Durch Zugabe des Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP) werden Quervernetzungen verstärkt, so dass mithilfe eines Chromogens ein deutlicher, wasserunlöslicher Farbniederschlag entsteht.

2.2.4.1.2. Durchführung der Immunhistochemie

Tumorproben:

Das Gewebe der Tumorexzisionen wurde unmittelbar nach der Entnahme im Operationssaal für 24 Stunden in 10% Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss von der Pathologie in Paraffin eingebettet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Im Vorfeld der histologischen Studie wurden die Formaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben dann mit einem Mikrotom 4 µm dick geschnitten, anschließend auf einen Objektträger gebracht und bei 40°C für mindestens 2 Stunden inkubiert.

Deparaffinierung:

Das Paraffin der Gewebeschnitte wurde mithilfe einer Alkoholreihe, beginnend mit 100% Xylol für 2x 10 min, dem Gewebe entzogen. In einem Zwischenschritt (2x 1 min in 100% Ethanol, 10 min in Methanol mit 2% Wasserstoffperoxid) wurde die Aktivität der *Endogenen Peroxidase* blockiert. Anschließend erfolgte die eigentliche Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (2x 1 min 100% Ethanol, 2x 1 min 96% Ethanol, 1x 1 min Ethanol 70%), bevor die Gewebeschnitte in destilliertes Wasser überführt und für 3x 5 Minuten gewaschen wurden.

Antigendemaskierung:

Mit diesem Schritt werden die Antigene des Gewebes für die entsprechenden Antikörper zugänglich gemacht. Hierfür wurden die Gewebeschnitte in Natriumzitratpuffer für 20 Minuten bei 800 W in der Mikrowelle gekocht und anschließend für 30 Minuten auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Detektierung des Antigens:

Nach einer erneuten Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit einer Peroxidaseblockier-Lösung für 5 Minuten, wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Alle Antikörper waren zuvor in einer

speziellen Antikörper-Verdünnungslösung entsprechend den Angaben in Tab. 7 auf die optimale Konzentration gebracht worden.

Nach der Inkubation wurden ungebundene Primärantikörper durch gründliches Waschen im Waschpuffer (3x 5 min) entfernt und ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen (30 min). Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Streptavidin-Peroxidase-Komplex aufgetragen und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges, Streptavidin durch einen weiteren Waschschrift beseitigt. Eine Farbreaktion wurde durch die 3'3'-Diaminobenzidin-(DAB)-Chromogenlösung ausgelöst und nach Erreichen der gewünschten Signalintensität 1-2 Minuten später in destilliertem Wasser gestoppt. Zur besseren Zuordnung des Gewebekontextes wurde eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin durchgeführt, die zur Anfärbung der Zellkerne führt.

Nach einem letzten Waschschrift wurde die Alkoholreihe zur Dehydratation aufsteigend durchgeführt (1x 1 min Ethanol 70%, 2x 1 min 96% Ethanol, 2x 1 min 100% Ethanol). Die Präparate wurden mit Eindeckmedium eingedeckt und standen für die histologische Auswertung zur Verfügung.

Im Rahmen der Untersuchung lymphatischer Markerproteine wurde humanes Tonsillengewebe als Positivkontrolle verwendet, da dort die lymphatischen Zielantigene exprimiert sind. Um unspezifisches Bindungsverhalten der Testreagenzien zum Testgewebe auszuschließen, wurde der Primärantikörper in Negativkontrollen durch H₂O ersetzt.

Auswertung:

Zur Beurteilung des Expressionsverhaltens der lymphatischen Markerproteine erfolgte die histologische Auswertung unter dem Mikroskop durch zwei unabhängige Untersucher. Dabei wurden alle Gewebeschnitte einzeln ausgewertet und auf ein charakteristisches Expressionsmuster hin untersucht.

2.2.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

2.2.4.2.1. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Bei dieser Methode wird die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität immunologischer Verfahren verknüpft.

Zunächst wird das Antigen durch einen Primärantikörper im Gewebe gebunden, der dann durch einen Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper detektiert wird. Die spezifische Emission des Fluorochroms lässt sich mit einer dafür geeigneten Lichtquelle sichtbar machen.

2.2.4.2.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Gewebeproben:

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte zunächst wie bei der Immunhistochemie vorbereitet. Im Rahmen der Antigendemaskierung wurden sie allerdings, im Anschluss an das Aufkochen in Zitratpuffer, erneut in einem 1mM EDTA-Puffer erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden sie dann weiter bearbeitet. Die Zellen der Tumorzelllinien U87 und U373 wurden in 12-Loch-Kulturplatten so ausgesät, dass sie nach 6 Stunden adhärent und 80% konfluent gewachsen waren. Sie wurden in 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert und anschließend dreimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen.

Arbeitsschritte:

Sowohl die Gewebeschnitte als auch die fixierten Zellen wurden für eine Stunde mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dreimal für je fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen und der fluoreszierende Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration (s. Kap. 2.1.9) hinzugegeben. Um einen Intensitätsverlust des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden, wurde die einstündige Inkubation sowie alle weiteren Arbeitsschritte unter einer lichtundurchlässigen Haube durchgeführt.

Für Doppelfärbungen wurde nach Abschluss dieser Prozedur das Gewebe erneut in 4% Paraformaldehyd für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert, um eine Kreuzreaktion der beiden Primärantikörper zu verhindern. Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen dem zuvor beschriebenen Protokoll zur Färbung des ersten Primärantikörpers.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellkerne des Gewebes durch eine zweiminütige Inkubation in einer 1µg/ml DAPI-Lösung gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Gewebeschnitte mit einem speziellen Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen eingedeckt. Zur Versiegelung wurden die Glasplättchen mit Nagellack umrandet und bei 4°C gelagert. Die Detektion und Visualisierung der Färbungen wurde an einem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen, die Bilder mit einer Digitalkamera aufgenommen.

2.2.5. FACS (Fluorescence Analysing Cell Sorting)

2.2.5.1. Prinzip der FACS-Analyse

Die Abkürzung FACS steht für "Fluorescence Analysing Cell Sorting" und wird im Deutschen mit dem Begriff Durchflusszytometrie übersetzt.

Mithilfe dieser Methode kann die Expression bestimmter Proteine, sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche von Zellen, analysiert werden. Die Expression wird dabei durch Fluoreszenzsignale von gebundenen, Fluorochrom-markierten Antikörpern detektierbar. Im FACS-Messgerät werden hierzu die Zellen durch ein unter Druck stehendes Transportsystem an der Messeinheit vorbei transportiert und von einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die resultierende Emissionsstrahlung wird von den Messeinheiten aufgezeichnet und die gewonnenen Daten zum angeschlossenen Computer übertragen.

2.2.5.2. Durchführung der FACS-Analyse

Die adhärenz waschenden Zellen wurden durch Inkubation in 1,5 mM EDTA schonend gelöst und resuspendiert, um keine Oberflächenproteine zu zerstören. Für die Analyse wurden jeweils 200.000 Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein Polypropylen-Röhrchen überführt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bei 4°C.

Zu den Ansätzen für die Analyse der Podoplanin-Expression wurde der anti-h-Podoplanin-Antikörper und für die Isotypkontrollen der m-IgG1-Antikörper in der entsprechenden Konzentration gegeben. Alle Ansätze wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper anti-m-IgG₁/PE bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und in FACS-Messröhrchen überführt. Direkt vor Beginn der Messung wurde jedem Ansatz 1 µl Propidium-Iodid hinzugefügt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können.

Die Analyse erfolgte am Messgerät FACS Calibur, die Auswertung wurde mithilfe des Programms CellQuest durchgeführt.

2.2.6. Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1. Elektrophorese im DNA-Agarose-Gel

Nukleinsäuren liegen in wässrigen Lösungen bei pH 8 als Polyanionen vor, so dass sie sich im Agarose-Gel durch Anlegen eines konstanten elektrischen Feldes in Richtung der Anode bewegen. Die Geschwindigkeit und die sich daraus ergebende Laufstrecke ist proportional zur Größe der Nukleinsäuren und zur Konzentration des Agarose-Gels (Molekularsiebeffekt). Die so aufgetrennten DNA-Fragmente können mithilfe von Ethidiumbromid, das sich in DNA einlagert und im UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht werden.

Arbeitsschritte:

Je nach gewünschter Gelkonzentration (1 bis 2%) wurden 1,0 bis 2,0 g Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle in 100 ml 0,5x TBE-Puffer gelöst und 2 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach Abkühlen auf 50°C wurde die Lösung in ein Elektrophoreseschälchen mit befestigtem Gelkamm gegossen. Dieser Kamm wurde nach Erstarren des Gels vorsichtig entfernt.

Jeweils 10 µl der DNA wurden mit 2 µl Ladepuffer (6x) versetzt und in die Kammern des Gels pipettiert. In eine weitere Kammer wurde der DNA-Größenstandard (1kB-Leiter) pipettiert, um die Größe der DNA-Produkte abschätzen zu können. Die Elektrophorese wurde dann in 0,5x TBE-Puffer mit 100 V für 30 bis 45 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator mit einem Dokumentationssystem fotografiert und die Größe der Amplifikationsprodukte anhand des mitgelaufenen DNA-Standards bestimmt.

2.2.6.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung des Podoplanin-Expressionsvektors musste zunächst die für Podoplanin kodierende DNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden.

Dabei wird die kodierende DNA durch Anlagerung von zwei synthetischen, sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) sowie durch Wiederholung der Schritte Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung der Primer mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase vermehrt.

Primer-Design:

Die Primer sollten die gesamte kodierende Region (CDS, Basenpaare 50-766) der Transkriptvariante 1 des Podoplanins auf Chromosom 1 amplifizieren. Sie wurden mithilfe des Computerprogramms Husar entworfen. Für das Design galt eine Schmelztemperatur von 58°C als Anhaltspunkt, die optimale Primer-Länge sollte bei 18 Basenpaaren liegen. Da im Bereich um die kodierende Region keine verwendbaren Enzymschnittstellen zu finden waren, wurde die Sequenz der Primer durch die Sequenz der *EcoRI*-Schnittstellen (GAATTC) ergänzt. Die Synthese der Primer wurde dann von der Firma Metabion in Martinsried übernommen.

Vorwärts-Primer: 5'-CCT GAA TTC CGG GAG AGA TAA ATG CTG AC-3'

Rückwärts-Primer: 5'-GGC GTA ACC CTT CAG CTC GAA TTC TTT AG-3'

Durchführung der PCR:

Der Ansatz für die PCR setzte sich den unten stehenden Angaben entsprechend zusammen und wurde zur Amplifikation in das PCR-Reaktionsgerät gestellt (*Temperaturstufen: 61,64,67°C*).

100 ng	DNA
1,0 µl	Vorwärts-Primer (100 pmol/µl)
1,0 µl	Rückwärts-Primer (100 pmol/µl)
2,5 µl	Puffer
4,0 µl	1,25 mM dNTPs
0,2 µl	Taq Polymerase (1 Unit)
x µl	H2O
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

Die erfolgreiche Podoplanin-DNA-Amplifizierung wurde durch Elektrophorese in einem 1%-igen DNA-Agarose-Gel bestätigt und die resultierenden DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

Anschließend wurde die DNA mithilfe des kommerziellen Reagenzienpakts QIAquick® Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Agarose-Gel extrahiert und mit 30 µl H2O eluiert.

2.2.6.3. Vektorkonstrukte

Für die Versuche mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) zur gefäßspezifischen Aktivierung von bestimmten Genen wurden zunächst Vektoren hergestellt, die das Tie2-Promotor/Enhancer-Konstrukt enthalten.

Hierfür war im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe sowohl das Red Fluorescent Protein (*RFP*) als auch die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus (*TK*) in einen kommerziell verfügbaren Vektor (*pSPTg.T2FpAXK*, zur Verfügung gestellt von Thomas N. Sato PhD, Southwestern Medical School, Dallas) kloniert worden (*Vektoren Tie2-RFP und Tie2-TK*). Die Expression der Inserts (*RFP, TK*) steht in diesen beiden Vektoren somit unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden dann im Rahmen dieser Arbeit die Sequenzen der beiden Vektoren (*Tie2-RFP und Tie2-TK*) verwendet und in den kommerziell erhältlichen *pCMV/Bsd*-Vektor kloniert (s. Kap. 2.2.6.4).

Die daraus resultierenden Vektorkonstrukte (*pCMV/Bsd-Tie2-RFP und pCMV/Bsd-Tie2-TK*, s. Abb. 7, 8) wurden anschließend, wie unter Kap. 2.2.6.6 beschrieben, stabil in die beiden MSC-Linien, die murine *balb/c* und die humane L87, transfiziert (*balb/c-Tie2-RFP, L87-Tie2-RFP und L87-Tie2-TK*).

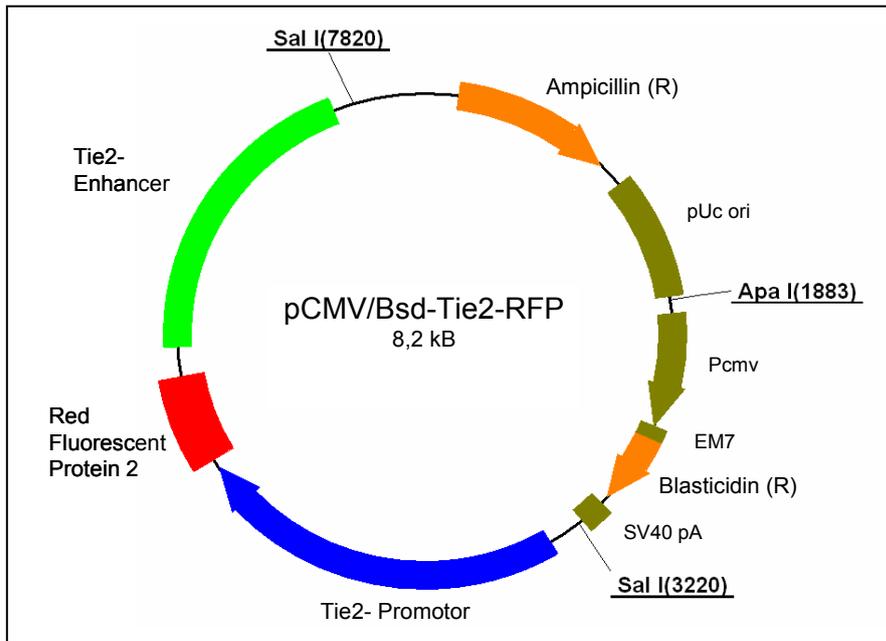


Abb. 7: Vektor pCMV/Bsd-Tie2-RFP.

Schematische Darstellung des Expressionsvektors, der RFP unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes exprimiert.

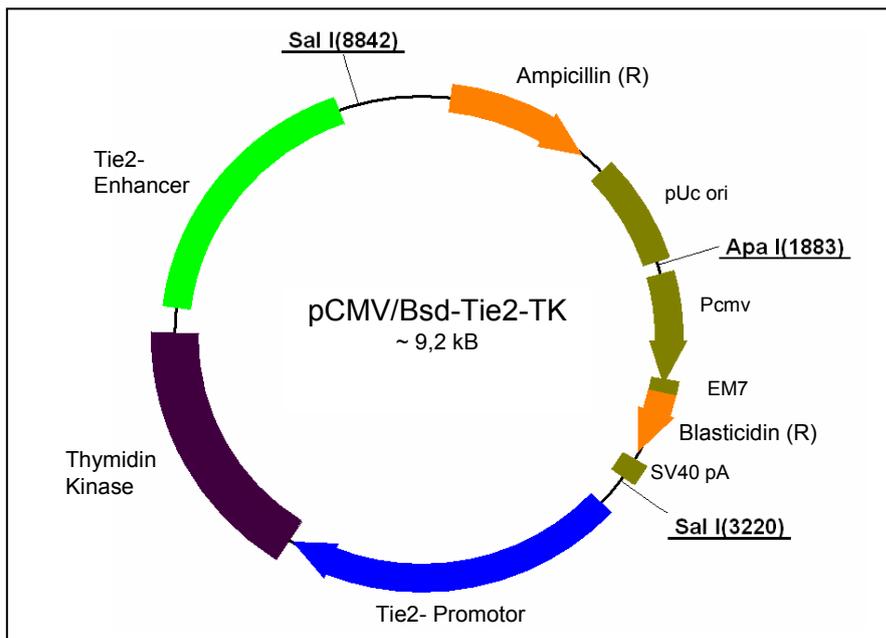


Abb. 8: Vektor pCMV/Bsd-Tie2-TK.

Schematische Darstellung des Expressionsvektors, der die HSV-TK unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes exprimiert.

Zusätzlich zu diesen Vektoren wurde zur weiteren Untersuchung der Podoplanin-Funktion im Rahmen des Hirntumor-Wachstums außerdem ein Podoplanin-Expressionsvektor hergestellt. Hierfür wurde zunächst die kodierende Podoplanin-Sequenz in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor *pcDNA3* geklont (s. Kap. 2.2.6.5).

Das daraus resultierende Podoplanin-Plasmid (*pcDNA3-Podoplanin*, s. Abb. 9) wurde im Anschluss daran stabil in die humanen Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 transfiziert (*U87-Podoplanin*, *U373-Podoplanin*), wie auch der unveränderte *pcDNA3*-Vektor zur Kontrolle des Expressionsverhaltens (*U87-Mock*, *U373-Mock*).

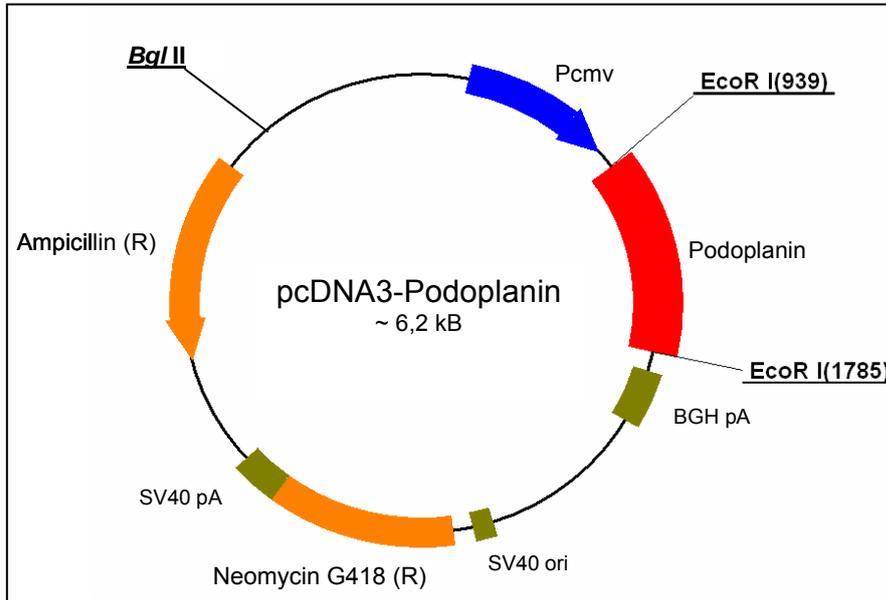


Abb. 9: Podoplanin-Überexpressionsvektor pcDNA3-Podoplanin.
Schematische Darstellung des Expressionsvektors, der Podoplanin durch Kontrolle des pCMV-Promotors konstitutiv exprimiert

Tab. 14: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit transfizierten Zelllinien.

Bezeichnung	Wirtszellen	Ursprungsvektor	DNA-Einsatzstück
balb/c-Tie2-RFP	balb/c	pCMV/Bsd	Tie2-RFP
L87-Tie2-RFP	L87	pCMV/Bsd	Tie2-RFP
L87-Tie2-TK	L87	pCMV/Bsd	Tie2-TK
U87-Podoplanin	U87	pcDNA3	Podoplanin-DNA
U87-Mock	U87	pcDNA3	---
U373-Podoplanin	U373	pcDNA3	Podoplanin-DNA
U373-Mock	U373	pcDNA3	---

2.2.6.4. Enzymatische Modifikation der DNA

Restriktion von DNA:

Die endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen nach den Empfehlungen der Herstellerfirmen durchgeführt.

Dabei wurde für analytische Zwecke 1 µg Plasmid-DNA mit 1,5 U Enzym für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, während zur Linearisierung von Vektoren 30 µg Plasmid-DNA mit 10 U Enzym für drei Stunden bei 37°C verdaut wurden.

Im Rahmen der stabilen Transfektion der Vektoren *pCMV/Bsd-Tie2-RFP* und *pCMV/Bsd-Tie2-TK* in die MSC-Linien balb/c und L87 wurde die Vektor-DNA direkt vor der Transfektion mit dem Enzym *Apal* linearisiert.

Im Rahmen der Klonierung der Podoplanin-Sequenz in den Vektor *pcDNA3* wurde vor der Ligation das Enzym *EcoR1* zur Linearisierung verwendet.

Direkt vor der Transfektion in die beiden Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 wurde der aus dieser Klonierung hervorgegangene Vektor *pcDNA3-Podoplanin* sowie der unveränderte Vektor *pcDNA3* mit dem Enzym *Bgl II* linearisiert.

Alle DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die Restriktion nach dem Protokoll des Reagenzienpaketes 'QIAquick® gel extraction kit' gereinigt und von den Säulchen mit 30 µl H₂O eluiert.

Dephosphorylierung von DNA:

Im Vorfeld der DNA-Ligation werden 5'-terminalen Phosphatgruppen der linearisierten Vektoren durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dadurch soll verhindert werden, dass sich zuvor linearisierte Vektoren wieder spontan an derselben Schnittstelle zusammenlagern.

Hierzu wurde 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA (*pcDNA3*) mit 1/10-Volumen CIP-Puffer (10x) und 5 U alkalischer Phosphatase versetzt. Nach Abschluss der 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 68°C inaktiviert und der Ansatz mit dem 'QIAquick® gel extraction kit' aufgereinigt.

Ligation von DNA:

Die Ligase des Phagen T4 katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Moleküls mit der 3'-OH-Gruppe eines anderen DNA-Moleküls. Dabei erfolgt die Ligation bei dreifach molarem Überschuss des DNA-Fragmentes gegenüber dem Vektor.

Etwa 60 ng des linearisierten Vektors (*pcDNA3*) und die entsprechende Menge des DNA-Fragments (*Podoplanin-Sequenz*), das in das Plasmid eingebracht werden sollte, wurden

mit H₂O auf ein Volumen von 17 µl gebracht. 2 µl des Ligasepuffers (10x) und 400 U der T4-Ligase wurden zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurden die ligierten DNA-Fragmente (*pcDNA3-Podoplanin*) zur Vermehrung in elektrokompente E.coli-Bakterien transformiert.

2.2.6.5. Mikrobiologische Methoden

Herstellung elektrokompenter E. coli-Bakterien:

Durch die Transformation wurde extrachromosomale DNA in E. coli-Stämmen integriert. Diese Bakterien waren zuvor mithilfe der TSS-Methode (Chung, Niemela et al. 1989) elektrokompent gemacht worden, um den ligierten Vektor (*pcDNA3-Podoplanin*) bei der Transformation aufzunehmen.

Der TSS- Methode folgend wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer E. coli-Glyzerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 40 ml LB-Medium mit 500 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,4 weiter geschüttelt. Diese Kultur wurde dann auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4°C).

Das Sediment wurde in 4 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und anschließend in sterilen Eppendorfgefäßen zu Portionen von 100 bis 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -180°C gelagert.

Transformation von E. coli:

Nach erfolgreicher Ligation wurden ca. 50 ng der ligierten Plasmid-DNA (*pcDNA3-Podoplanin*) zu 50 µl der kompetenten E. coli hinzugefügt, auf Eis gekühlt, vorsichtig gemischt und in die Elektroporationsküvetten gegeben. Der Transformation wurde dann im Elektroporationsgerät bei 1,8 V durchgeführt. Umgehend danach wurde das Gemisch in 1 ml SOC-Medium gegeben und bei 37°C für 45 min geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit Ampizillin-Zusatz ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch den Zusatz von Ampizillin konnten erfolgreich transformierte E. coli-Bakterien selektiert werden.

Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien:

Über Nacht gewachsene Kolonien wurden daraufhin analysiert, ob das Plasmid *pcDNA3-Podoplanin* aufgenommen wurde. Dieser Test erfolgte mithilfe der Minipräparationsmethode, bei der die Plasmide aus den Bakterien isoliert und nach einem Kontroll-Enzymverdau nachgewiesen werden.

Hierfür wurden 2 ml LB-Medium mit der zu untersuchenden Kolonie der Stammplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Präparation wurde ein kommerziell erhältliches Reagenzienpaket (QIAprep® spin Miniprep Kit) nach Protokoll des Herstellers verwendet und so das Plasmid aus den Bakterien gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde durch PCR amplifiziert und das klonierte Podoplanin-Gen nach einem Kontroll-Enzymverdau mit *EcoRI* im Agarose-Gel nachgewiesen.

Kolonien, die das Plasmid korrekt aufgenommen hatten, wurden über Nacht in 100 ml LB-Medium erneut kultiviert und vermehrt. Am darauf folgenden Tag wurde das LB-Medium abzentrifugiert und die Plasmide mithilfe des endotoxinfreien Reagenzienpakets (EndoFree® Maxi Kit) zellkultursteril isoliert, so dass sie für die Transfektion eukaryonter Zellen verwendet werden konnten.

2.2.6.6. Stabile Transfektion

Bei der Elektrotansfektion führen kurze elektrische Impulse in den Zellen dazu, dass nanometergroßer Poren in der Plasmamembran entstehen. DNA gelangt durch diese Poren in das Zytoplasma und kann sich dort in die DNA der Wirtszelle integrieren.

Zur Vorbereitung der Transfektionen wurde die linearisierte Plasmid-DNA (*pCMV/Bsd-Tie2-RFP*, *pCMV/Bsd-Tie2-TK*, *pcDNA3-Podoplanin*, *pcDNA3*) durch das Reagenzienpaket QIAquick® gel extraction kit isoliert und in 30 µl sterilem Wasser gelöst. Etwa 8×10^6 Wirtszellen wurden nach schonendem Ablösen zentrifugiert, in 400 ml PBS resuspendiert und mit 30 µl der linearisierten Plasmid-DNA gemischt.

Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis gekühlt bevor die Elektroporation in sterilen Küvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) bei 230-260 mV und 960 µF durchgeführt wurde. Nach erneuter Kühlung für 10 Minuten auf Eis wurden die transfizierten Zellen in das entsprechende Zellkultur-Medium überführt und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert.

2.2.6.7. Selektion stabil transfizierter Zellen

Die Blastizidin-Konzentration, die zur Selektion der stabil transfizierten MSC-Linien (*balb/c-Tie2-RFP*, *L87-Tie2-RFP*, *L87-Tie2-TK*) geeignet ist, wurde zuvor mit *balb/c*- und *L87*-Zellen ermittelt. Hierzu wurden nicht-modifizierte Zellen 80% konfluent in 2 ml Kulturmedium auf 6-Loch-Kulturplatten ausgesät und mit steigenden Konzentrationen des Blastizidins inkubiert (1 bis 10 µg/ml). Die geeignete Konzentration wurde bestimmt als die Konzentration, bei der die Zellen nach zehn bis vierzehn Tagen abgetötet sind. Für die *balb/c* lag diese Konzentration bei 1 µg/ml, für die *L87*-Zellen bei 3 µg/ml.

Nach erfolgreicher Transfektion wurde nach einem Tag zur Selektion Zellen das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit frischem Kulturmedium sowie der zuvor ermittelten Konzentration an Blastizidin inkubiert.

Auch die G418-Konzentration (Neomycin), mit der die stabil transfizierten Glioblastom-Zelllinien (*U87-Mock*, *U87-Podoplanin*, *U373-Mock*, *U373-Podoplanin*) selektiert werden, wurde auf die gleiche Art und Weise ausgetestet. Die ermittelte G418-Konzentration von 300 µg/ml wurde dem Zellkulturmedium der erfolgreich transfizierten Glioblastom-Zelllinien nach einem Tag zugefügt.

2.2.7. Tierversuche

Die Vorgehensweise bei den Tierversuchen wurde vom Ausschuss für Tierschutz der LMU München unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-35/03 genehmigt. Alle Eingriffe an den Versuchstieren wurden im Tier-OP der Neurochirurgischen Klinik Großhadern der LMU München in den Räumlichkeiten des Laserforschungs-Labors durchgeführt.

2.2.7.1. Versuchsgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde insgesamt mit 17 männlichen, T-Zell-defizienten Rh-/rnu-Nacktratten als Tumorwirten gearbeitet. Die Versuchstiere wiesen zum Zeitpunkt der Implantation ein Körpergewicht von 200 bis 300g auf. In Übereinstimmung mit den Institutsrichtlinien wurden sie unter regelmäßigem Tag/Nacht-Lichtrhythmus gehalten und erhielten spezielles Nagerfutter sowie Wasser *ad libidum*. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte eine neurologische Überwachung (Lähmungen, Störungen der Perzeptionsfähigkeit und motorische Koordination) sowie eine Kontrolle des Körpergewichtes.

Tab. 15 gibt eine Übersicht der Versuchsreihen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt sowie geplant wurden.

Tab. 15: Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte (1-3) und geplante (4-5) Tierversuchsstudien.

Studiennummer:	Versuchsaufbau:	Gruppengröße:	Ziel der Studie:
1)	humaner U373-GFP-Tumor + primäre humane MSC (<i>systemisch</i>)	n = 4	Rekrutierung von MSC in den Hirntumor
2)	muriner C6-Tumor + murine MSC-Tie2-RFP (<i>systemisch</i>)	n = 8	
3)	humaner U373-GFP-Tumor + humane MSC-Tie2-RFP (<i>systemisch</i>)	n = 5	
4)	a) humaner U373-GFP-Tumor + hMSC-Tie2-TK (<i>systemisch</i>) + Ganciclovir	n = 10	Therapeutische Beeinflussung des Tumorwachstums
	b) humaner U373-GFP-Tumor + hMSC-Tie2-TK (<i>systemisch</i>) (Kontrollgruppe ohne Ganciclovir)	n = 10	
	c) humaner U373-GFP-Tumor (Kontrollgruppe ohne MSC)	n = 10	
5)	a) humaner U373-Podoplanin-Tumor	n = 10	Untersuchung der Podoplanin-Funktion im Hinblick auf die Morphologie des Hirntumors
	b) humaner U373-Mock-Tumor (Kontrollgruppe)	n = 10	

2.2.7.2. Narkose

Sowohl die Tumorimplantation als auch die Injektion der MSC wurden unter Maskennarkose der Tiere mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch durchgeführt.

Die Narkoseeinleitung erfolgte dabei mit 4 Vol% Isofluran unter einer Plastikhaube. Anschließend wurde das Versuchstier auf einem Heizkissen platziert und die Isofluranmaske angelegt. Im Rahmen der chirurgischen Eingriffe wurde Isofluran in einer Konzentration von 2,5 Vol% appliziert, während der Injektionen dagegen in einer Konzentration von 1,5 Vol%. Die Flussrate betrug bei allen Experimenten 0,5 l/min.

2.2.7.3. Tumorimplantation

Im Anschluss an die Narkotisierung wurden die Köpfe der Tiere in den stereotaktischen Rahmen eingespannt. Nach Kopfrasur und Hautdesinfektion wurde ein ca. 2 cm langer, sagittaler Hautschnitt entlang der Mittellinie durchgeführt. Durch Abpräparieren des Bindegewebes einer Seite wurde die Schädeldecke über einem begrenzten Areal freigelegt. Etwa 3 mm lateral und 1 mm posterior des Bregmas (Treffpunkt von Sagittal-

und Koronarhaft) wurde unter ständiger Spülung mit Kochsalzlösung ein Loch bis auf die Dura gebohrt.

Für jedes Versuchstier wurden 1 Million Tumorzellen, suspendiert in 5µl PBS, in eine Mikroliterspritze aufgezogen. Die Spritze wurde in einen Mikromanipulator eingespannt und mit der Spitze unter Sicht auf die Dura aufgesetzt. Mittels des Mikromanipulators wurde die Nadel der Mikroliterspritze 3 mm tief eingestochen und dann 1 mm zurückgezogen, so dass die Tumorzellen in die rechten Striata injiziert wurden. Die manuelle Inokulation erfolgte dabei langsam und unter ständiger Sichtkontrolle.

Das Bohrloch wurde anschließend mit Knochenwachs bedeckt und die Haut nach Blutstillung durch eine Einzelknopf-Naht verschlossen. Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und bis zum Aufwachen überwacht.

2.2.7.4. Systemische Verabreichung mesenchymaler Stammzellen

Entsprechend des Zeitschemas der Tab. 16 wurde die systemische Verabreichung der MSC in die Schwanzvene der Tiere vorbereitet. MSC in 80%-iger Konfluenz wurden durch Inkubation mit 1,5 mM EDTA in PBS von den Zellkulturflaschen gelöst, vereinzelt und in PBS aufgenommen. Direkt vor der Injektion wurden die Zellen resuspendiert und durch einen Filter mit 40 µm-großen Poren filtriert, um die Verabreichung verklumpter Zellhaufen zu verhindern. Unter Narkose wurde die Schwanzvene mit einer UDS-Kanüle punktiert, die über einen Silikonschlauch flexibel mit einer Spritze verbunden war. Die Zellen wurden dann vorsichtig und unter Kontrolle der Vitalparameter injiziert.

Tab. 16: Zeitschema für die Applikation der MSC.

Tumor	Zellart	Anzahl der MSC (in 1,5 ml PBS)	Erste iv-Applikation	Weitere iv-Applikationen	Ende des Versuchs
U373-GFP	primäre hMSC	100.000	Tag 10	Tag 15, 20	Tag 25
C6	balb/c-Tie2-RFP	6,5 Mill.	Tag 10	Tag 15, 20	Tag 25
U373-GFP	L87-Tie2-RFP	6,5 Mill.	Tag 10	Tag 15, 20	Tag 25

2.2.7.5. Geplantes Zeitschema für die Applikation von Ganciclovir

Für den Einsatz der transfizierten Zellen L87-Tie2-TK, bei denen das Selbstmordgen Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes steht, wurde für weiterführende Versuchsreihen ein Therapieplan erstellt, der in Abb. 10 schematisch dargestellt ist.

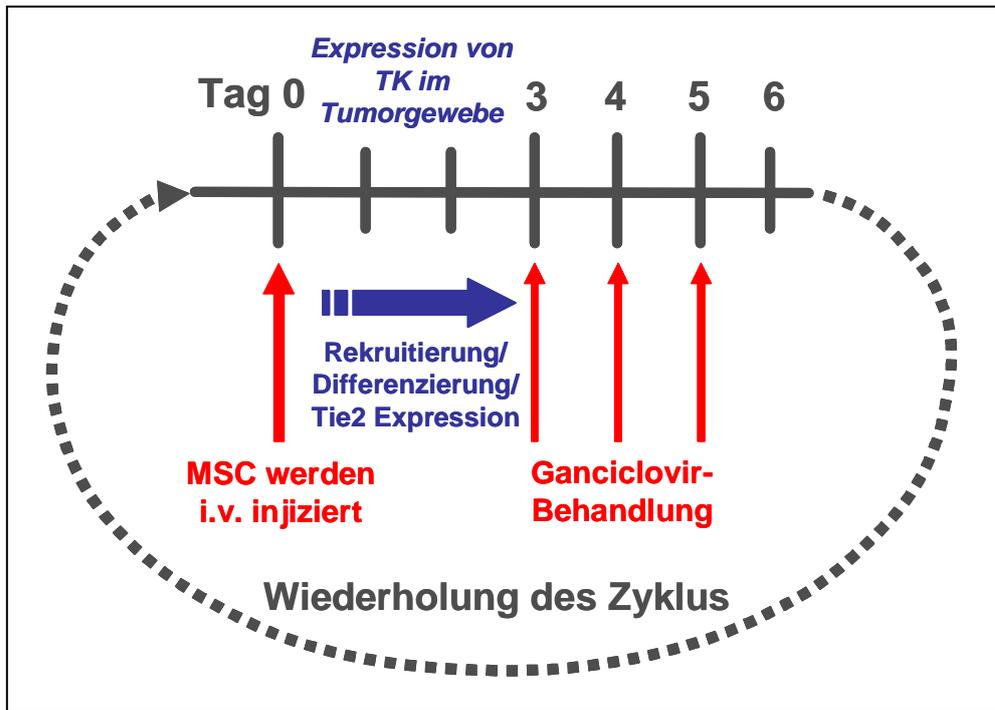


Abb. 10: Vorschlag eines Therapieschemas für die Applikation von Ganciclovir. Im Anschluss an die Implantation des Hirntumors beginnt bei diesem Applikationsschema nach 10 Tagen der erste Therapiezyklus. An diesem Tag (Tag 0) werden modifizierte MSC (L87-Tie2-TK) in eine der Schwanzvenen injiziert. Innerhalb von zwei Tagen sollen die Zellen dann in den Tumor rekrutiert werden, sich in die verschiedenen Zelltypen differenzieren und nach endothelialer Differenzierung Tie2-abhängig mit der Expression der Thymidinkinase beginnen. In den folgenden drei Tagen (Tag 3-5) werden jeweils 30 µg/g Körpergewicht Ganciclovir intravenös oder intraperitoneal injiziert. Nach einem Tag Pause beginnt der Zyklus dann von vorne. Insgesamt werden drei Zyklen durchgeführt, die Tiere werden nach 32 Tagen zum Abschluss der Versuchsreihe getötet und das Gewebe histopathologisch aufgearbeitet. Die Größenentwicklung des Tumors kann während der Versuchsreihe durch MRT-Untersuchungen verfolgt werden. (eigene Darstellung des Therapiezyklus)

2.2.7.6. Explantation

Soweit die Versuchstiere nicht zuvor aufgrund von neurologischen Auffälligkeiten getötet werden mussten, wurden die Tiere nach 25 Tagen zum Ende der Versuchsreihe durch Inhalation von Äther narkotisiert und das Gehirn nach Tötung der Tiere mittels Hohlmeisselzange und Skalpell entnommen. Auf Höhe der Tumorläsion wurde das Gewebe der rechten Gehirnhälfte in Frontalrichtung mit einem Skalpell geteilt. Eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff sofort nach der Entnahme schockgefroren und weiter verarbeitet, die andere Hälfte wurde zur späteren Verwendung in 4% Paraformaldehyd fixiert.

2.2.7.7. Neuropathologische Auswertung des Tumorgewebes

Die Auswertung des explantierten Rattenhirngewebes aus den Tierversuchen wurde in Kooperation mit Dr. Bjarne Krebs vom Neuropathologischen Institut der LMU München durchgeführt.

Für die Immunhistochemie wurde schockgefrorenes Hirngewebe 6 µm dick geschnitten und auf Objektträger gebracht (Superfrost plus; Menzel, Braunschweig). Im Anschluss wurden diese mit 4% Paraformaldehyd und Azeton fixiert.

Die immunhistochemische Färbung wurde mit einer automatisierten Färbemethode (Benchmark[®], Ventana, Strasbourg, France) durchgeführt. Hierbei erfolgte nach kurzer Denaturierung und Antigendemaskierung die Inkubation für 32 min mit den primären Antikörpern (anti-h-GFAP, anti h-CD105, anti-SV40 large T antigen) entsprechend der Konzentration in Tab. 7. Nach einem Waschschrift wurde der biotinylierte Antikörper (6,67nl/l, Dako, Glostrup) hinzugegeben und die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit Alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (enhanced SA-AP; Ventana, Strasbourg) inkubiert. Die Visualisierung wurde durch Auftropfen und 20-minütige Inkubation mit 'Fast Red'-Lösung (Ventana, Strasbourg) bei Raumtemperatur erreicht. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin.

Die Gewebeschnitte wurden dann durch Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eindeckmedium eingedeckt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Gewebeschnitte beurteilt und mit einer CCD-Kamera fotografiert (Axiovert 200M und AxioCam MRc5, Carl Zeiss AG, Jena).

Um die Fluoreszenzsignale der Tierversuchsreihen auszuwerten, wurde das schockgefrorene Hirngewebe mit dem Mikrotom 20 µm dick geschnitten, auf Objektträger gebracht und bei -20°C getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden unmittelbar mit dem speziellen Eindeckmedium eingedeckt, um die fluoreszierenden Eigenschaften zu bewahren. Die Beurteilung erfolgte dann unter dem Konfokallasermikroskop. Hierbei wurden die verschiedenen Gewebeschnitte zum Auffinden der Tumoren zunächst vorläufig beurteilt und dann die Fluoreszenz der GFP-positiven Tumoren (U373-GFP) und der RFP-positiven transfizierten MSC (balb/c-Tie2-RFP, L87-Tie2-RFP) bewertet (Konfokallasermikroskop TCS System SP2; Leica, Wetzlar). Für GFP wurde das Gewebe mit einer Frequenz von 488 nm angeregt, für RFP bei 543 nm, was zu einer Emission von Lichtwellen bei 512 nm (GFP) und 610 nm (RFP) führte.

2.2.8. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Expressionsdaten der Realtime-TaqMan® RT-PCR wurde ein nicht-parametrisches Verfahren verwendet, da das Datenmaterial aufgrund der begrenzten Anzahl der Tumorproben keine Normalverteilung aufwies.

Es wurde daher zum Vergleich der Expressionsdaten aller drei getesteten Gewebe (NNH, WHO-Grad II, WHO-Grad IV) der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus wurden bei $p < 0.05$ (marginal signifikant), $p < 0,01$ (signifikant) und $p < 0,001$ (hoch signifikant) festgelegt. Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Mesenchymale Stammzellen im Rahmen der Neoangiogenese maligner Hirntumore

Von Studeny et al. wurde im Jahr 2002 gezeigt, dass MSC im Rahmen des Tumorwachstums nach systemischer Applikation aus der Peripherie in das Tumorgewebe rekrutiert werden (Studeny, Marini et al. 2002). In diesem Teil der Arbeit sollte der Mechanismus der Rekrutierung für das GBM bestätigt und die Frage beantwortet werden, ob die MSC an der Bildung neuer Gefäße beteiligt sind und somit einen aktiven Beitrag zur Tumorprogression leisten können.

3.1.1. Rekrutierung primärer mesenchymaler Stammzellen in den Hirntumor nach systemischer Applikation

Die Beobachtung, dass maligne Tumoren MSC aus der Peripherie rekrutieren, bildet die Grundlage therapeutischer Ansätze, bei denen MSC als Transportmittel für zelluläre Vektoren verwendet werden (Arap and Pasqualini 2004).

Das Verhalten primärer humaner MSC wurde deshalb in einem xenogenen, orthotopen Tumormodell in T-Zell-defizienten Rh-/rnu-Ratten untersucht, um den Vorgang der Rekrutierung auch für das GBM zu zeigen. Nach Implantation der humanen Glioblastom-Zelllinie U373-GFP wurden primäre humane MSC intravenös injiziert und das Gewebe anschließend histopathologisch aufgearbeitet.

Das Oberflächenprotein CD105 wurde hierfür in einer FACS-Analyse (in Zusammenarbeit mit Dr. Josef Mysliwietz, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München) als Markerprotein identifiziert. CD105 ist auf primären humanen MSC exprimiert, jedoch nicht auf humanen U373-GFP-Tumorzellen. Der verwendete Antikörper weist zudem keine Kreuzreaktivität mit dem Gewebe der Ratte auf, so dass spezifisch humanes CD105 auf den humanen MSC nachgewiesen wird.

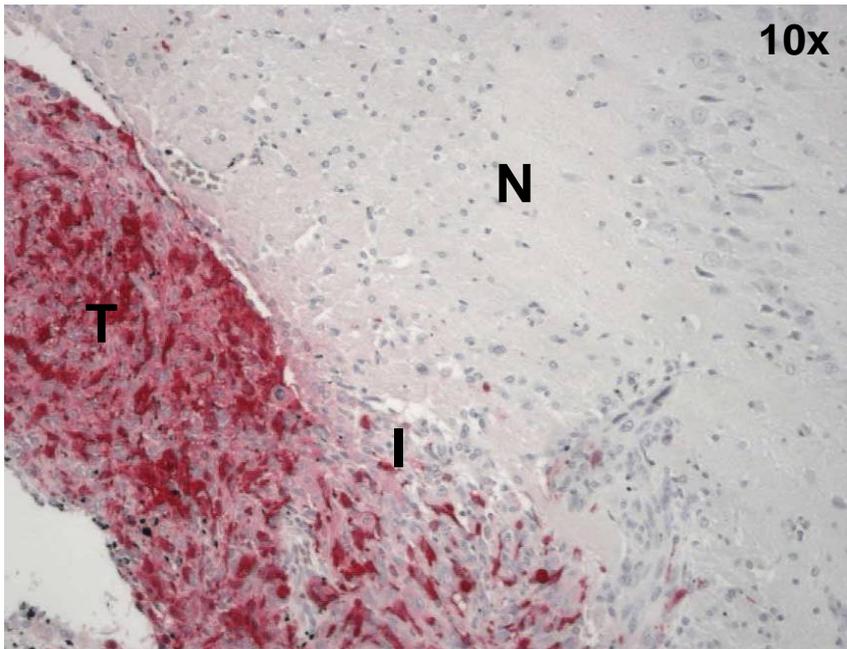


Abb. 11: Wachstum des U373-GFP-Glioms im Rattenhirn.
 Abgrenzung des humanen U373-GFP-Glioms (rot,T) vom normalen Hirnparenchym der Ratte (N) durch eine immunhistochemische Färbung gegen den humanen glialen Tumormarker GFAP (glial fibrillary acidic protein). Der Großteil der Tumorzellen ist rot angefärbt. Es zeigt sich ein, in den Ventrikel reichender, Tumor mit deutlich erhöhter Zelldichte, polymorphem Zellmuster sowie ausgeprägten Gefäßneubildungen. In der Invasionszone (I) infiltrieren rote Tumorzellen das normale Hirnparenchym. Das umliegende Hirnparenchym zeigt eine normale Morphologie und ist negativ für das humane GFAP.

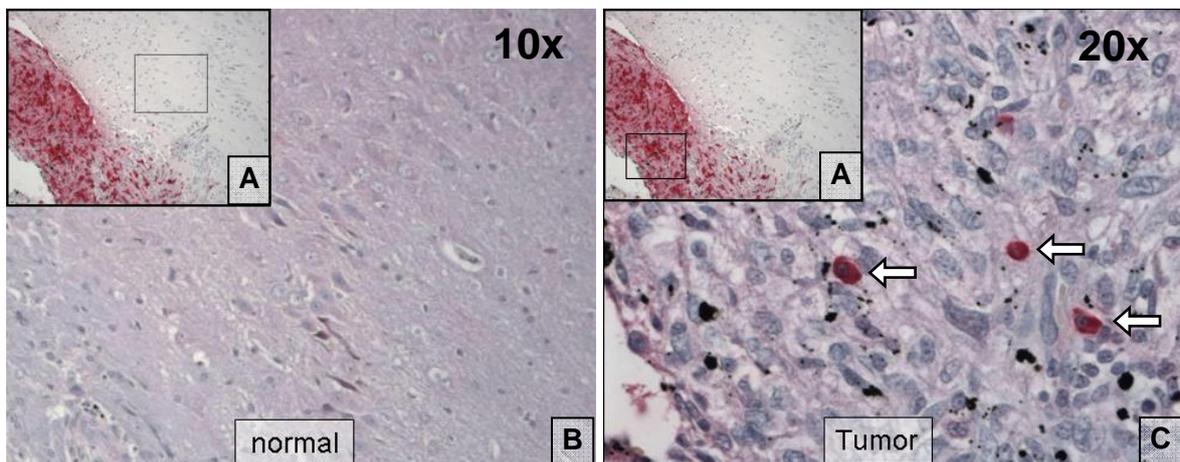


Abb. 12: Selektiver Nachweis primärer MSC im U373-Gliom.
Kleine Bilder (A): Lokalisierung des U373-GFP-Glioms durch eine Färbung gegen den humanen Tumormarker GFAP (s. Abb. 11). Der Kasten zeigt an, aus welchem Bereich die großen Bilder stammen.
Großes Bild (B): Humane anti-CD105-Färbung des peritumoralen Hirnparenchyms zur Detektion primärer humaner MSC *in vivo*. Im normalen Hirngewebe kein Nachweis CD105-positiver Zellen in der Nachbarschaft des U373-GFP-Glioms.
Großes Bild (C): Humane anti-CD105-Färbung zum Nachweis primärer humaner MSC (rot) im U373-GFP-Glioblastom. Vereinzelte MSC (weiße Pfeile) finden sich über das gesamte Tumorgewebe verteilt.

Mit der Anfärbung des humanen glialen Tumormarkers GFAP (glial fibrillary acidic protein) wurde das humane U373-GFP-Tumorgewebe vom normalen Hirnparenchym der Ratte abgegrenzt (Abb. 11) (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht).

Während im tumorfreien Hirnparenchym keine humanen CD105-positiven Signale detektiert werden, zeigen sich im Tumorgewebe vereinzelte, zellgebundene positive Signale. Diese entsprechen den primären humanen MSC, die nach der systemischen Applikation aktiv in den Tumor rekrutiert worden sind (Abb. 12) (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht).

Einige dieser CD105-positiven Zellen lassen sich in Gefäßen des Tumors lokalisieren. Die primären MSC haben sich hier in die Gefäßwände integriert und scheinen der Endothelzellschicht zuzuordnen zu sein (Abb. 13) (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht).

Die primären MSC sind somit nach systemischer Applikation aus der Peripherie aktiv ins Tumorgewebe rekrutiert worden und lassen sich dort sowohl im Tumorstroma als auch in den Gefäßen des Tumors nachweisen.

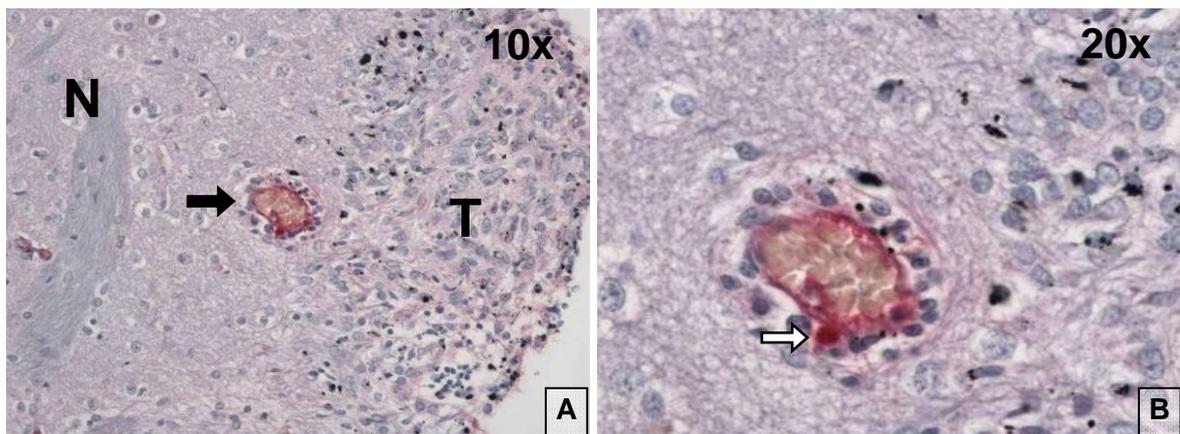


Abb. 13: Primäre MSC im Endothel einzelner Tumorgefäße.

Bild A (Vergrößerung 10x): Übergangszone vom Tumor (T) zum normalen Hirnparenchym (H). Tumorgefäß (schwarzer Pfeil) in der Randzone des U373-GFP-Glioms mit Endothelzellschicht und Erythrozyten im Gefäßlumen.

Bild B (Vergrößerung 20x): Humane anti-CD105-Färbung detektiert primäre humane MSC (rot, weißer Pfeil), die sich in die Gefäßwand des Tumorgefäßes integriert haben.

3.1.2. Chemokine als mögliche Mediatoren der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen

Die Expression von Chemokinen im Gliomgewebe könnte einen Mechanismus darstellen, über den MSC aus dem Knochenmark in das Tumorgewebe rekrutiert werden.

Mithilfe der Realtime-RT-PCR wurde die Expression verschiedener Chemokine auf mRNA-Ebene im Gliomgewebe analysiert. Die Selektion der untersuchten Chemokine erfolgte dabei aufbauend auf die Publikation von von Lüttichau et al. (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Es wurden somit die Liganden der Chemokin-Rezeptoren untersucht, für die in dieser Publikation eine aktive Expression auf den MSC nachgewiesen worden war. (Tab. 17).

Tab. 17: Tabellarische Darstellung der auf MSC exprimierten Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden.

Chemokin-Rezeptoren auf MSC	Systematischer Name der Liganden	Funktionelle Namen der Liganden
CCR1	CCL 3	MIP-1 α , LD78 α
	CCL 5	RANTES
CCR4	CCL17	TARC, ABCD-2
CCR7	CCL19	MIP-3 β , ELC, Exodus-3
	CCL21	6-ckine, SLC, Exodus-2
CCR10	CCL27	CTACK, ILC, ESkine
	CCL28	MEC
CXCR5	CXCL13	BCA-1, BLC

Für die Analyse der mRNA-Expression wurden Gewebeproben von WHO-Grad IV-Tumoren mit WHO-Grad II-Tumoren und Normalhirn (NNH, nicht-neoplastisches Hirngewebe) verglichen.

Für alle ausgewählten Chemokine, mit Ausnahme von CXCL13, zeigen in der Analyse Expressionswerte auf mRNA-Ebene (Abb. 14). CCL19 ist ausschließlich in 3 von 8 Glioblastom (WHO-Grad IV)-Tumorproben nachweisbar, die Gewebeproben der niedriggradigen Gliome (WHO Grad II) und des NNH zeigen keine mRNA-Expression dieses Chemokins (Abb. 14). Für CCL27 liegen die Expressionswerte der WHO-Grad IV-

Ergebnisse

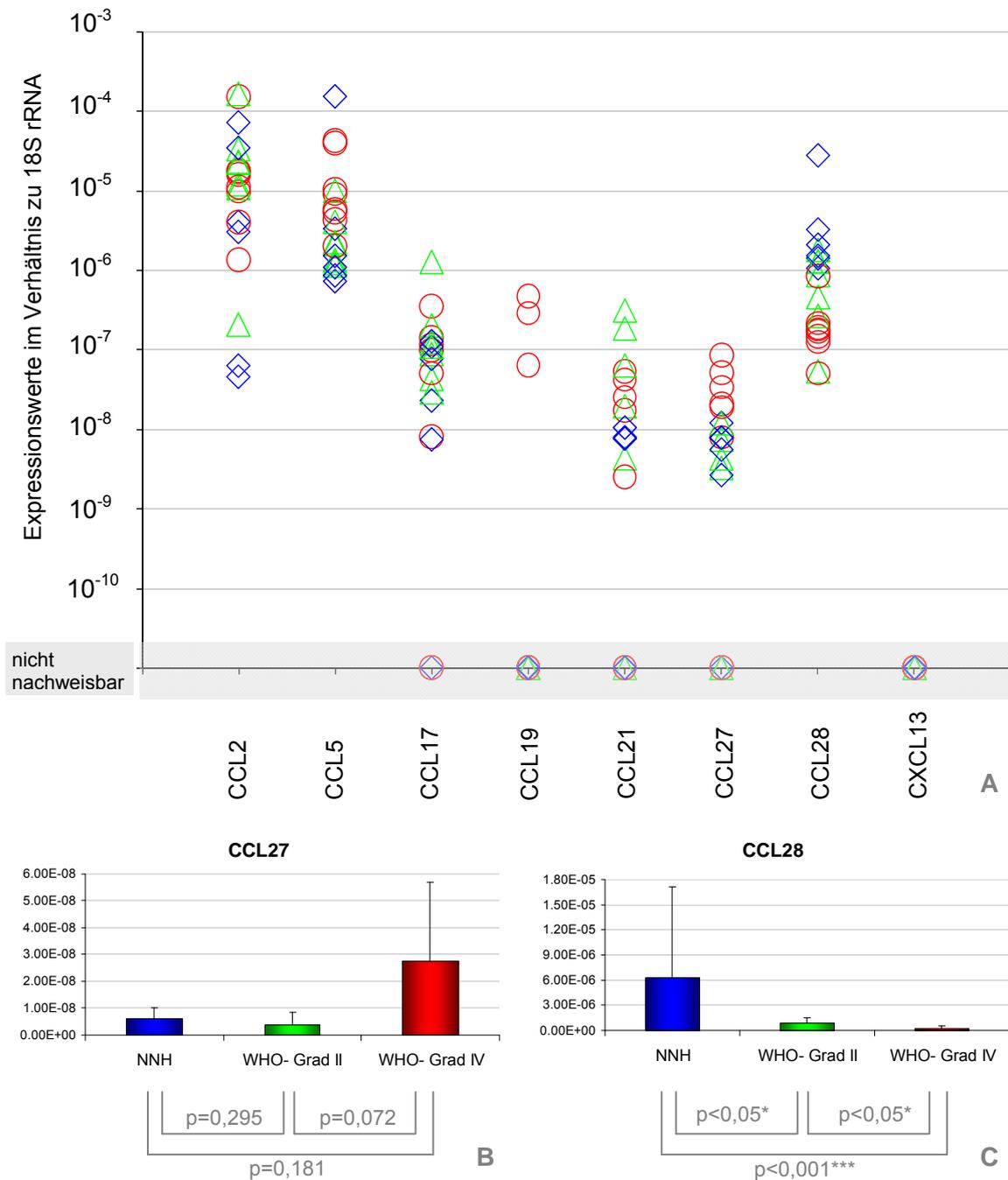


Abb. 14: Chemokine sind im Gewebe von Gliomen auf mRNA-Ebene nachweisbar.

Diagramm A: Die mRNA-Expression der Gewebeprobe wurde mithilfe der Realtime-RT-PCR quantifiziert. Für die Analyse wurden 8 WHO-Grad IV-Tumoren (△), 7 WHO-Grad II-Tumoren (○) und 6 Proben von nicht-neoplastischem Hirngewebe (NNH, ◇) analysiert. Alle Messwerte wurden gegen 18S rRNA normalisiert. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse das Verhältnis der Expressionswerte der einzelnen Messungen zu 18S rRNA an. Bis auf CXCL13 sind alle ausgewählten Chemokine in den Gliomen auf mRNA-Ebene exprimiert.

Diagramme B, C: Die Diagramme zeigen auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an. Im Mann-Whitney-U-Tests ist für CCL27 bei einem p von 0,181 (NNH vs. WHO-Grad IV), bzw. einem p von 0,072 (WHO-Grad II vs. IV) trotz deutlicher Expressionsunterschiede keine statistische Signifikanz nachzuweisen. Bei CCL28 unterscheiden sich dagegen die Expressionslevel aller untersuchten Gewebetypen signifikant voneinander. Die statistische Signifikanz ist dabei mit $p < 0,001$ hoch (***) bzw. mit $p < 0,05$ marginal (*).

Tumoren deutlich über denen der WHO-Grad II-Tumoren und des NNH. Die Expressionsunterschiede sind dabei zwar nicht statistisch signifikant, insgesamt korreliert die Höhe des Expressionslevels aber mit dem Malignitätsgrad des untersuchten Gewebes (Abb. 14). CCL28 zeigt dagegen eine negative Korrelation des Expressionslevels mit dem Malignitätsgrad des untersuchten Gewebes. Die Expressionswerte liegen hier im NNH statistisch signifikant höher als in den WHO-Grad II- und den WHO-Grad IV-Tumoren (Abb. 14).

Die Höhe der mRNA-Expression der anderen untersuchten Chemokine ist nicht eindeutig von der Dignität des Ursprungsgewebes abhängig (Abb. 14).

3.1.3. Integration mesenchymaler Stammzellen in die Gefäßwände der Tumorgefäße maligner Gliome

Im Rahmen von Gewebsverletzungen und Tumorwachstum unterstützen endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark die Gefäßneubildung (Urbich and Dimmeler 2004; Adams and Alitalo 2007). Dieses endotheliale Differenzierungspotenzial der MSC wurde hier auch im GBM gezeigt.

Die Versuche wurden dabei mit immortalisierten MSC-Linien (murine balb/c, humane L87) durchgeführt, die zuvor mit Vektoren transfiziert worden waren, bei denen das Reportermolekül RFP unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes steht (s. Kap. 2.2.6.3). Der Nachweis von RFP zeigt die Aktivierung des Tie2-Promotors an und beweist somit die Differenzierung einer MSC zu einer Tie2-positiven gefäßassoziierten Zelle an.

Sowohl in Versuchen mit der murinen (balb/c-Tie2-RFP) als auch der humanen MSC-Linie (L87-Tie2-RFP) wird das rote Fluoreszenzsignal im untersuchten Gewebe nachgewiesen. Die Signale sind dabei ausschließlich im Tumorgewebe nachzuweisen und zeigen sich dort mit den Tumorgefäßen assoziiert und in die Gefäßwand integriert (Abb. 15; A-D). Außerhalb der Gefäße sowie im restlichen Tumorgewebe ist keine Tie2-abhängige RFP-Emission zu registrieren (Abb. 15, A-D) (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht).

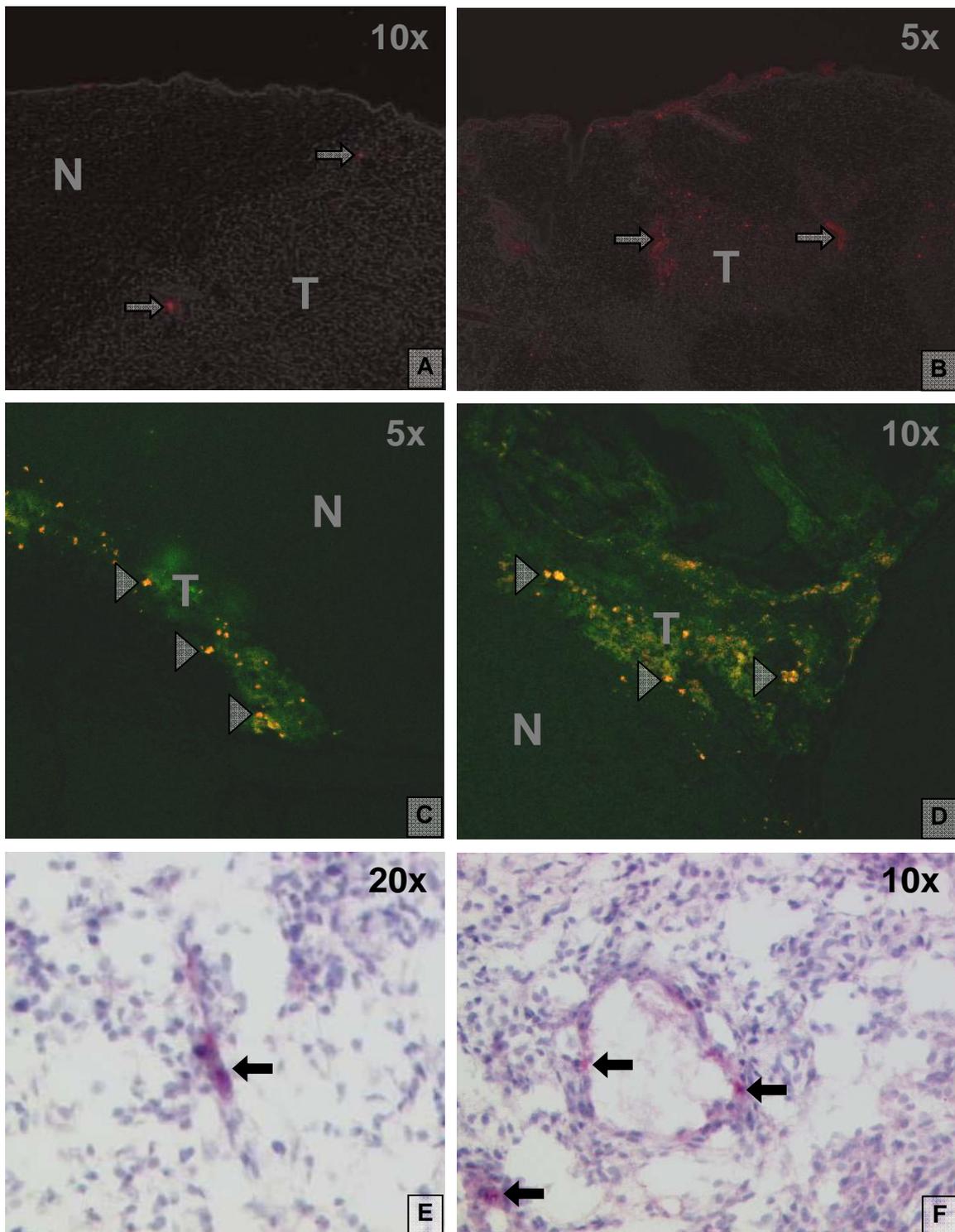


Abb. 15: Integration von MSC in Gefäße des implantierten Glioms.

Bilder A, B: Das murine C6-Gliom stellt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop durch eine erhöhte Strukturdichte des Tumorgewebes (T) im Vergleich zum normalen Hirnparenchym (N) dar. Im Tumor zeigen sich gefäßassoziiert rote Fluoreszenzsignale (*graue Pfeile*), die von aktivierten murinen balb/c-Tie2-RFP emittiert werden, nachdem sie sich in die Gefäßwand der Tumorgefäße integriert haben.

Bilder C, D: Das humane U373-GFP-Gliom (T) ist unter dem Konfokalmikroskop durch die grüne Emission der Tumorzellen vom normalen Hirngewebe (N) abgrenzbar. Die Abbildung zeigt im Tumorgewebe zusätzlich das rote Fluoreszenzsignal der aktivierten humanen L87-Tie2-RFP (*graue Pfeilspitzen*), die sich differenziert und in die in die Gefäßwand der Tumorgefäße integriert haben.

Bilder E, F: Genaue morphologische Zuordnung der systemisch applizierten mesenchymalen Stammzellen im Tumorgewebe durch den Nachweis des SV40 large T-Antigens. Es finden sich, endothelial lokalisiert, SV40-positive MSC (rot, schwarzer Pfeil; hier: balb/c-Tie2-RFP) in verschiedenen Gefäßen des Tumors.

Alle Visualisierungen wurden im kryokonservierten Gewebe durchgeführt.

Da die Immortalisierung beider MSC-Linien (balb/c, L87) über die Inkorporation des SV40 large T-Antigens erreicht wurde, kann die Integration der MSC in die Gefäßwand zusätzlich durch Färbung des Tumorgewebes beider Versuchsreihen mit einem Antikörper gegen das SV40 large T-Antigen bestätigt werden.

In diesen Färbungen zeigt sich der Großteil der SV40-positiven Zellen in den Gefäßwänden des Tumors lokalisiert und lässt sich dabei der Endothelzellschicht der Tumorgefäße zuordnen (Abb. 15; E, F) (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht). Wenige weitere SV40-positive Zellen liegen vereinzelt im Tumorgewebe verteilt.

3.1.4. Etablierung einer stabilen MSC-Linie mit HSV-TK unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde eine MSC-Linie hergestellt, die das Selbstmordgen HSV-TK unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes exprimiert. Die stabile Transfektion des Vektors (Tie2-TK) wurde dabei mit der immortalisierten humanen MSC-Linie L87 durchgeführt.

Die Transfektanten (L87-Tie2-TK) sind mithilfe eines Selektionsmediums identifiziert und weiter expandiert worden. Sie stehen nun für eine experimentelle, therapeutische Versuchsreihe zur Verfügung, für die bereits ein Applikations- und Behandlungsschema entworfen wurde (siehe Kap. 2.2.7.5). Leider konnten die *in vivo*-Versuche im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Der Versuchsplan wurde aber erstellt und soll in naher Zukunft befolgt werden.

3.2. Gefäßbiologie maligner Hirntumoren im Hinblick auf Mechanismen der Lymphangiogenese

Neben der Hämangiogenese ist auch die Lymphangiogenese ein wichtiges Kennzeichen aggressiver Tumoren und ist in vielen Tumorentitäten Voraussetzung für die Metastasierung (Swartz and Skobe 2001). In diesem Teil der Arbeit wurde die Expression lymphatischer Marker in Hirntumoren untersucht, um das Gefäßsystem der Hirntumoren genauer zu charakterisieren.

3.2.1. Expression lymphatischer Markerproteine in astrozytären Tumoren

Zunächst wurde die Expression lymphatischer Markerproteine in hochgradigen Astrozytomen (WHO-Grad IV) mit der Expression niedriggradiger Astrozytome (WHO-Grad II) und des Normalhirns (NNH, nicht-neoplastisches Hirngewebe) verglichen.

In einem ersten Schritt wurde die Expression der ausgewählten Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei können für alle untersuchten Gene Expressionswerte nachgewiesen werden (Abb. 16). Podoplanin, VEGFR-3 und CCR7 zeigen mit steigendem Malignitätsgrad erhöhte Expressionslevel. Die Expressionswerte dieser Gene liegen somit in den malignen WHO-Grad IV-Tumoren deutlich höher als in den benignen WHO-Grad II-Tumoren und im NNH. CCL19 ist ausschließlich in 3 WHO-Grad IV-Tumorproben zu detektieren, dagegen negativ im niedriggradigen Tumorgewebe und im NNH.

Für die weiteren untersuchten Markerproteine zeigt sich keine eindeutige Tendenz, die Höhe der Expressionswerte ist hier unabhängig vom Ursprungsgewebe (Abb. 16).

Ergebnisse

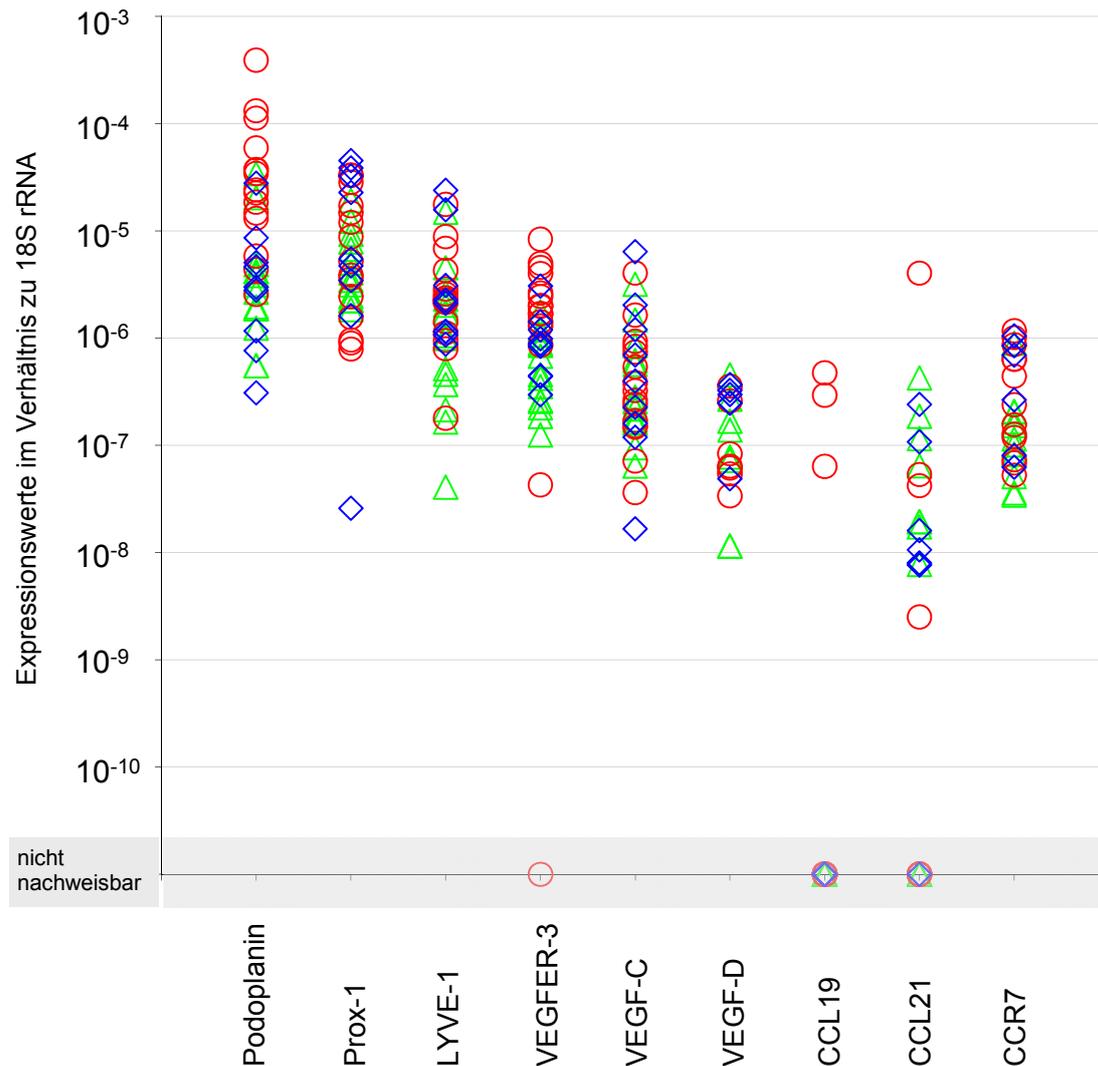


Abb. 16: Marker der Lymphangiogenese sind in Gliomen auf mRNA-Ebene exprimiert.

Die Realtime-TaqMan® RT-PCR wurde zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Gewebeproben mit unterschiedlichen Malignitätsstufen durchgeführt. Für die Analyse wurden insgesamt 39 Gewebeproben untersucht, darunter Gewebe von 9 NNH (◇) und 14 WHO-Grad II-Tumoren (△), die mit den Expressionswerten von 16 WHO-Grad IV-Tumoren (○) verglichen wurden. Alle Messwerte wurden gegen 18S rRNA normalisiert. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse das Verhältnis der Expressionswerte der einzelnen Messungen zu 18S rRNA an.

Alle untersuchten Marker der Lymphangiogenese lassen sich im Gewebe von humanen Gliomen auf mRNA-Ebene nachweisen.

3.2.1.1. Expression von Podoplanin und Prox-1

Eine deutliche Podoplanin-Expression zeigt sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Auf mRNA-Ebene liegt die Expression des Oberflächenproteins in den WHO-Grad IV-Tumoren deutlich höher als in den niedriggradigen Astrozytomen (WHO-Grad II) und dem NNH (Abb. 16; Abb. 17, F). Die Expressionsunterschiede zwischen diesen Geweben erreichen statistische Signifikanz (Abb. 17, F).

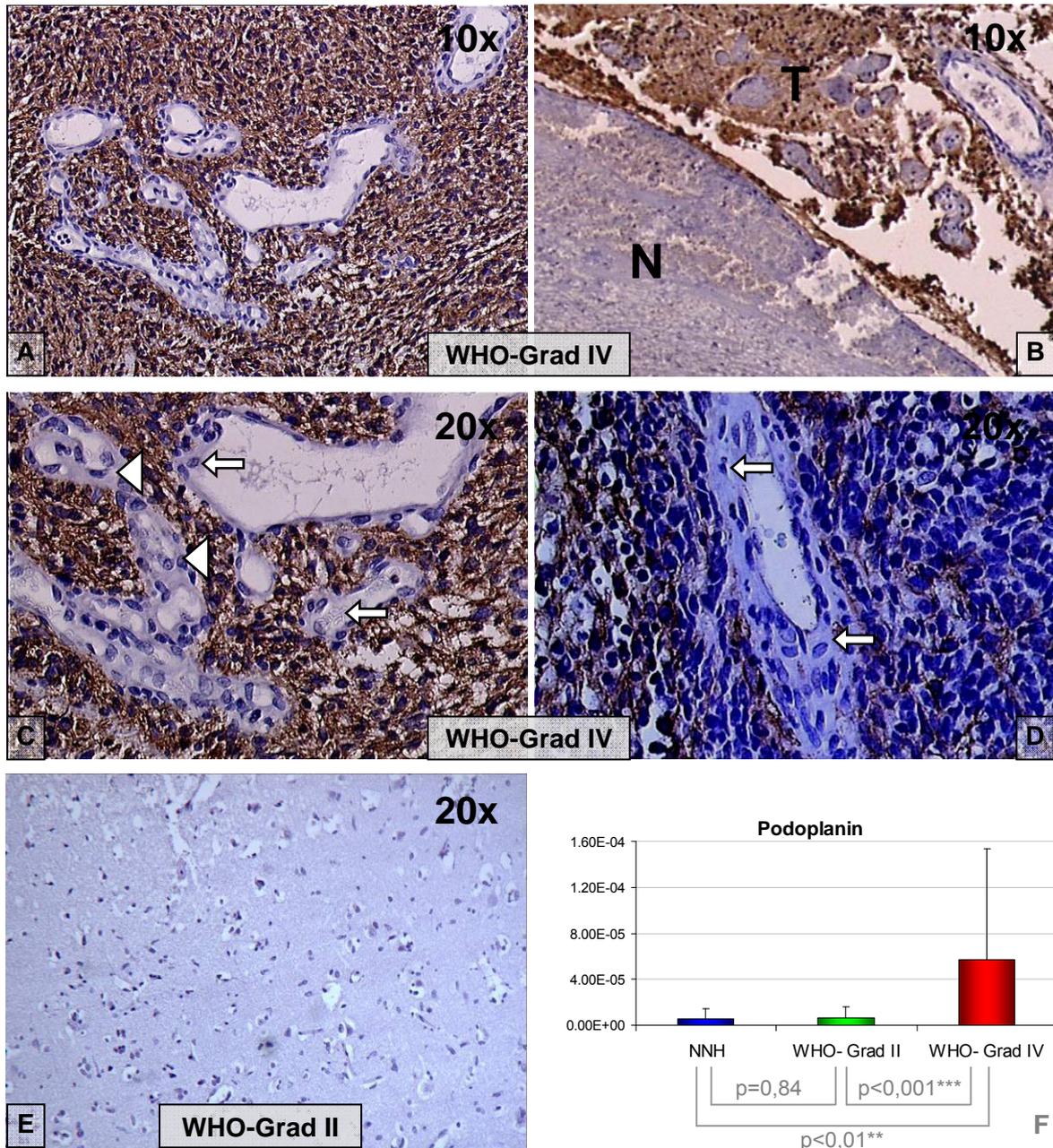


Abb. 17: Sehr starke Podoplanin-Expression im Glioblastom im Vergleich zum diffusen Astrozytom.

Bilder A-D: Expression des Oberflächenproteins Podoplanin (*braun*) in allen untersuchten Gewebeschnitten des GBM (WHO-Grad IV). Expressionssignal zeigt sich im gesamten Tumorgewebe (T), besonders ausgeprägt in der Umgebung von Nekrosen (N) (*Bild B*) und in stark vaskularisierten Bereichen (*Bilder A,C,D*) mit den charakteristischen Gefäßproliferaten (*weiße Pfeilspitzen*). Mit Ausnahme der Gefäß-Endothelzellen (*weiße Pfeile*) sind fast alle Zellen des Tumorgewebes oberflächlich für Podoplanin angefärbt.

Bild E: WHO-Grad II-Tumoren durchgehend negativ für Podoplanin. Sowohl Tumorzellen als auch Endothelzellen zeigen keine Anfärbung.

Bild F: Stark erhöhte Podoplanin-Expression für das GBM im Vergleich zum nicht-malignen Gewebe auf mRNA-Ebene. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an. Expressionsunterschiede sind dabei bei einem p von 0,0028 signifikant (**, WHO-Grad IV vs. NNH), bzw. hoch signifikant bei einem p von 0,00025 (***, WHO-Grad IV vs. WHO-Grad II).

Auch histopathologisch sind alle untersuchten Glioblastome (WHO-Grad IV, n = 11) positiv für Podoplanin (Abb. 17, A-D) (Grau, Trillsch et al. 2008). Das gesamte Tumorgewebe färbt sich mit dem Antikörper gegen Podoplanin an, besonders ausgeprägt perinekrotisch (Abb. 17, B) und in stark vaskularisierten Bereichen (Abb. 17; A,C,D) (Grau, Trillsch et al. 2008). Nahezu alle Tumorzellen zeigen hier eine intensive Anfärbung, während die Endothelzellen der Tumorgefäße eindeutig negativ für Podoplanin sind (Abb. 17; C,D) (Grau, Trillsch et al. 2008). Im Gegensatz dazu sind alle untersuchten WHO-Grad II-Tumoren (n = 7) durchgehend negativ für Podoplanin (Abb. 17, E).

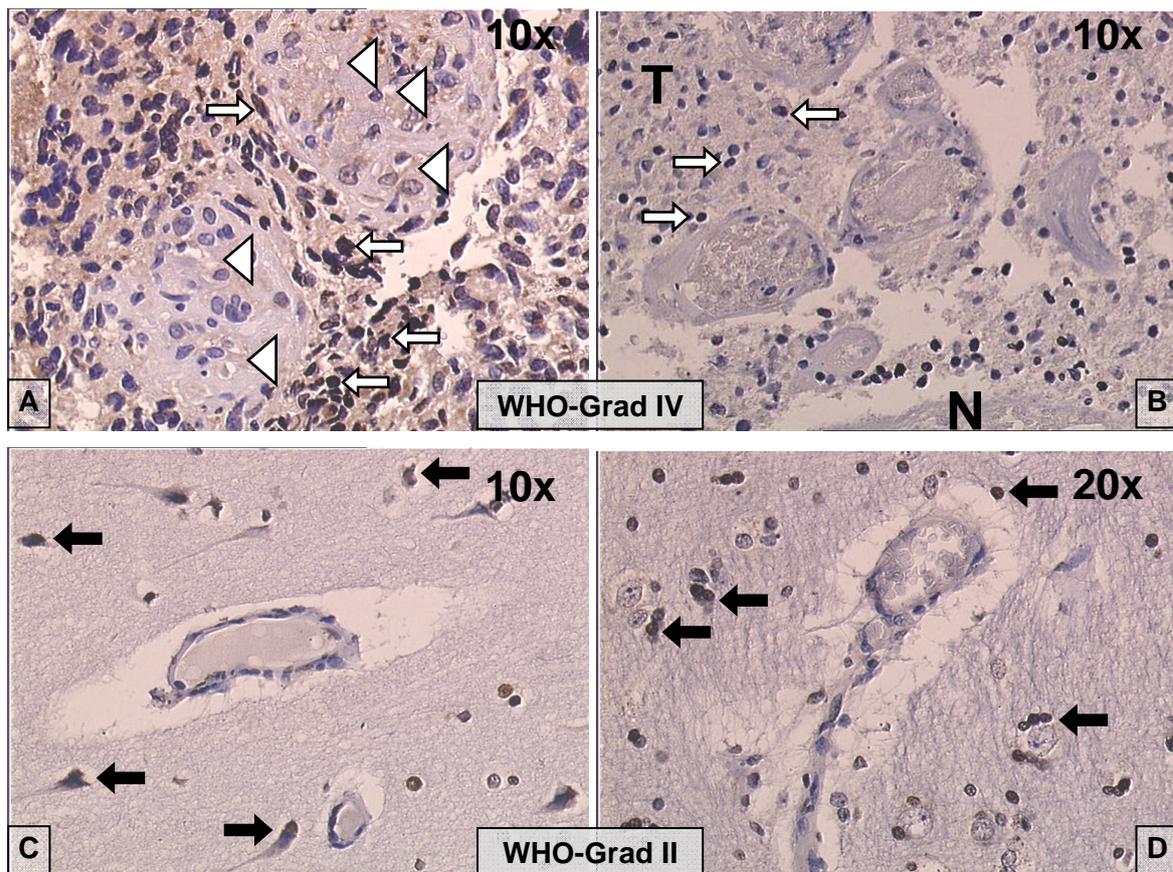


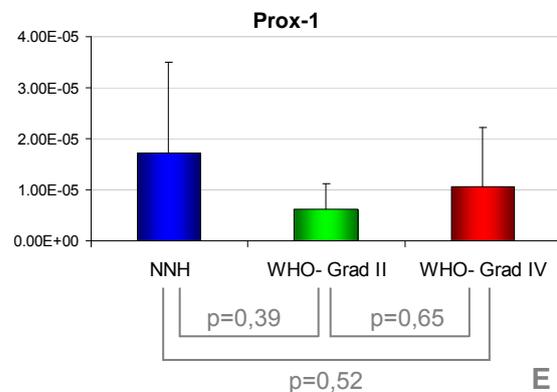
Abb. 18: Vereinzelt Prox-1-Expression in Gliomen.

Perinukleäre Anfärbung (braun) des Transkriptionsfaktors Prox-1.

Bilder A, B: Prox-1-positive Zellen (weiße Pfeile) in WHO-Grad IV-Tumoren vor allem perivaskulär (Bild A) und im perinekrotischen Gewebe (Bild B, Tumor: T, Nekrose: N). Die Zellen der charakteristischen Gefäßproliferate sind negativ (weiße Pfeilspitzen).

Bilder C, D: Diffus verteilte Zellen mit Prox-1-positivem Signal in der Umgebung von Tumorgefäßen (weiße Pfeile) der WHO-Grad II-Tumoren.

Bild E: Keine signifikanten Expressionsunterschiede für Prox-1 zwischen den untersuchten Gewebetypen in der Realtime-RT-PCR ($p > 0,05$). Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an.



Wie Podoplanin wird auch Prox-1 auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Gewebeproben gefunden (Abb. 16). Die Expressionslevel der WHO-Grad II und IV-Tumoren sowie der NNH unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 18, F).

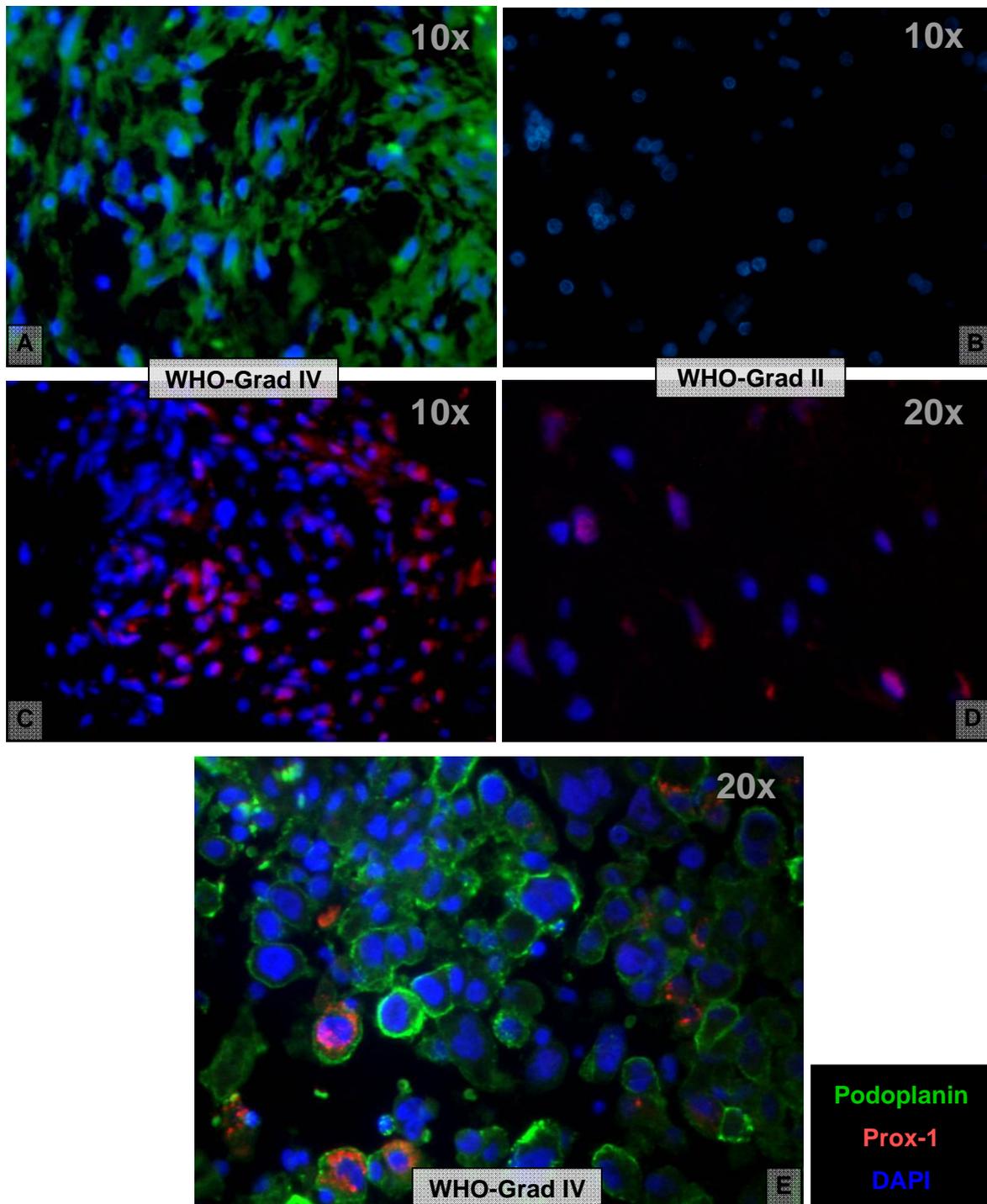


Abb. 19: Co-Expression von Podoplanin und Prox-1 im Glioblastom.

Bilder A, B: Einzelfärbung gegen Podoplanin (*grün*) mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*). Tumorzellen des Glioblastoms mit zellgebundenem grünem Signal auf der Zelloberfläche (*Bild A*). Keine Anfärbung für Podoplanin im WHO-Grad II-Tumor (*Bild B*).

Bilder C, D: Einzelfärbung gegen Prox-1 (*rot*) mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*). Diffus verteilte Prox-1-positive Tumorzellen sowohl im WHO-Grad IV- (*Bild C*) als auch im WHO-Grad II-Tumor (*Bild D*).

Bild E: Fusionsbild der Doppelfärbung gegen Podoplanin (*grün*) und Prox-1 (*rot*) bei Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*) im Glioblastomgewebe. Der Großteil der Tumorzellen ist einfach positiv für Podoplanin, einzelne Tumorzellen sind positiv für Podoplanin und Prox-1. Rotes Fluoreszenzsignal für Prox-1 ist hier Zellkern-assoziiert bei gleichzeitigem grünen Signal für Podoplanin auf der Zelloberfläche.

Für Prox-1 wurden in der Immunhistochemie in 3 von 6 Präparaten vereinzelte Prox-1-positive Zellen nachgewiesen, die sich perinukleär anfärben. Wie bei Podoplanin liegen diese Zellen vor allem in der Umgebung von Tumorgefäßen sowie im perinekrotischen Gewebe (Abb. 18; A,B). Die Gefäßzellen selbst sind negativ.

Im Gegensatz zu Podoplanin wird Prox-1 aber auch in 5 von 7 niedriggradigen Gliomen detektiert. Hier zeigen sich die vereinzelt positiven Zellen vornehmlich in der Invasionszone des Tumors, in räumlicher Nähe zu den Gefäßen (Abb. 18; C,D).

Für Podoplanin und Prox-1 wurden zudem Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt, um die räumliche Beziehung der beiden Markerproteine zueinander darzustellen.

In den jeweiligen Einzelfärbungen bestätigen sich zunächst die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung. Für Podoplanin wird im Glioblastom eine hohe Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen nachgewiesen (Abb. 19, A), die niedriggradigen Gliome sind dagegen negativ (Abb. 19, B). Bei der Einzelfärbung für Prox-1 finden sich sowohl im malignen als auch im niedriggradigen Gliom diffus verteilte Zellen, die ein Zellkern-assoziiertes Signal emittieren (Abb. 19; C,D).

In der Doppelfärbung der beiden Markerproteine im Glioblastomgewebe zeigt sich, dass vereinzelte Tumorzellen sowohl ein oberflächliches Signal für Podoplanin als auch ein Zellkern-assoziiertes Signal für Prox-1 emittieren. Diese Podoplanin-Prox-1-positiven Zellen sind im Tumorgewebe verteilt und liegen eingebettet zwischen anderen Podoplanin-positiven Tumorzellen (Abb. 19, E).

3.2.1.2. Expression von LYVE-1

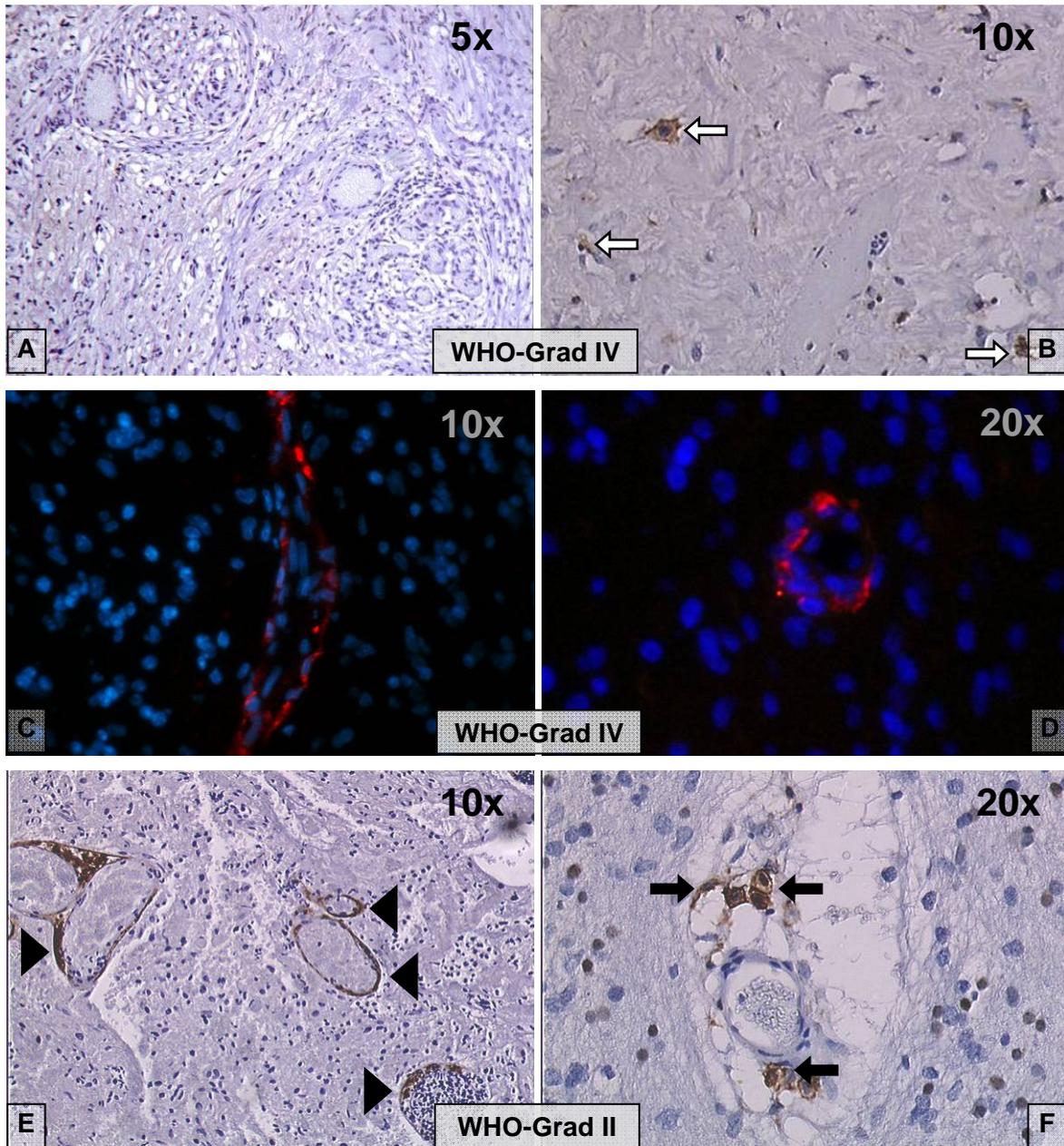
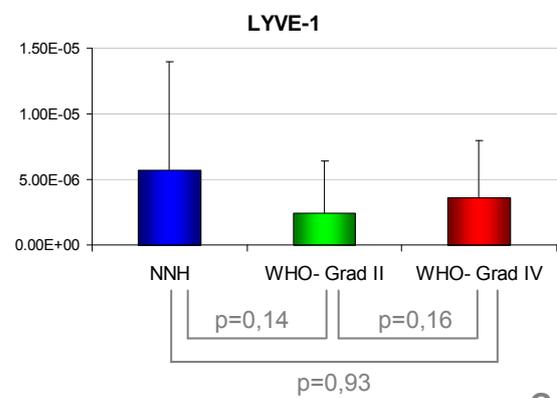


Abb. 20: Ganz vereinzelte LYVE-1-Expression in Gliomen.

Bilder A, B: Der überwiegende Teil des Glioblastomgewebes zeigt sich ohne LYVE-1-Expression (*Bild A*). Wenige Bereiche mit einzelnen LYVE-1-positive Zellen (*braun*) in der Umgebung kleiner Tumorgefäße (*Bild A, weiße Pfeile*).

Bilder C, D: Immunfluoreszenzfärbung gegen LYVE-1 (*rot*) im Glioblastomgewebe mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*). Ganz vereinzelte Gefäße mit endothelial lokalisiertem LYVE-1-Signal im WHO-Grad IV-Tumor.

Bilder E, F: In den WHO-Grad II-Tumoren nur



G

wenige positive mittelgroße Gefäße mit endothelialer Anfärbung für LYVE-1 (*Bild E, braun, schwarze Pfeilspitzen*). Auch vereinzelte Kapillaren komplexer Gefäßstrukturen sind positiv für LYVE-1 (*Bild F, schwarze Pfeile*).

Bild G: Die Expression auf mRNA-Ebene zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede ($p > 0,05$) zwischen den untersuchten Gewebetypen (NNH, WHO-Grad II, WHO-Grad IV). Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an.

Auf mRNA-Ebene wird LYVE-1 mithilfe der Realtime-RT-PCR in allen untersuchten Gewebeproben nachgewiesen. Das Expressionslevel korreliert dabei allerdings nicht mit der Dignität des Tumorgewebes (Abb. 20, G).

Trotz der mRNA-Expression ist der Großteil des Tumorgewebes auf Proteinebene negativ für LYVE-1 (Abb. 20, A). Im Glioblastom zeigen sich in der Immunhistochemie bei 4 von 8 untersuchten Gewebeproben nur ganz vereinzelte Bereiche mit wenigen positiven gefäßassoziierten Zellen (Abb. 20, B), die anderen 4 Gewebeproben sind negativ. Auch in einer Immunfluoreszenzfärbung der WHO-Grad IV-Tumoren können nur sehr wenige LYVE-1-positive Gefäße nachgewiesen werden. Bei diesen Gefäßen wird das LYVE-1-positive Signal dann aber eindeutig der Endothelzellschicht zugeordnet (Abb. 20; C,D).

Für die WHO-Grad II-Tumoren zeigen sich in 5 von 7 Tumorproben ebenfalls nur vereinzelte kleine und mittelgroße Gefäßstrukturen mit positiven, endothelial lokalisierten, Signalen für LYVE-1 (Abb. 20; E,F). Der Rest des Tumorgewebes ist negativ.

3.2.1.3. Expression von VEGFR-3, VEGF-C und -D

In der Immunhistochemie für VEGFR-3 zeigen alle 18 untersuchten Gewebeproben des Glioblastoms eine sehr starke Expression des Rezeptormoleküls, die hauptsächlich endothelial lokalisiert ist (Abb. 21; A,B) (Grau, Trillsch et al. 2007). Vor allem in den ausgeprägt vaskularisierten Bereichen des Tumorgewebes sind nahezu alle Gefäße positiv für VEGFR-3 (Abb. 21, B) (Grau, Trillsch et al. 2007). In niedriggradigen Astrozytomen ($n = 8$) zeigen dagegen nur ganz vereinzelte, mittelgroße Gefäße ein VEGFR-3-positives Signal. Die kleinen Kapillaren sind hier negativ (Abb. 21; C,D) (Grau, Trillsch et al. 2007).

Gemessen mit der Realtime-RT-PCR, wird dieses Expressionsmuster auch auf mRNA-Ebene bestätigt. Im Glioblastom sind die Expressionswerte für VEGFR-3 am Höchsten und unterscheiden sich signifikant von der niedrigeren Expression im Astrozytom und im NNH (Abb. 21, E) (Grau, Trillsch et al. 2007).

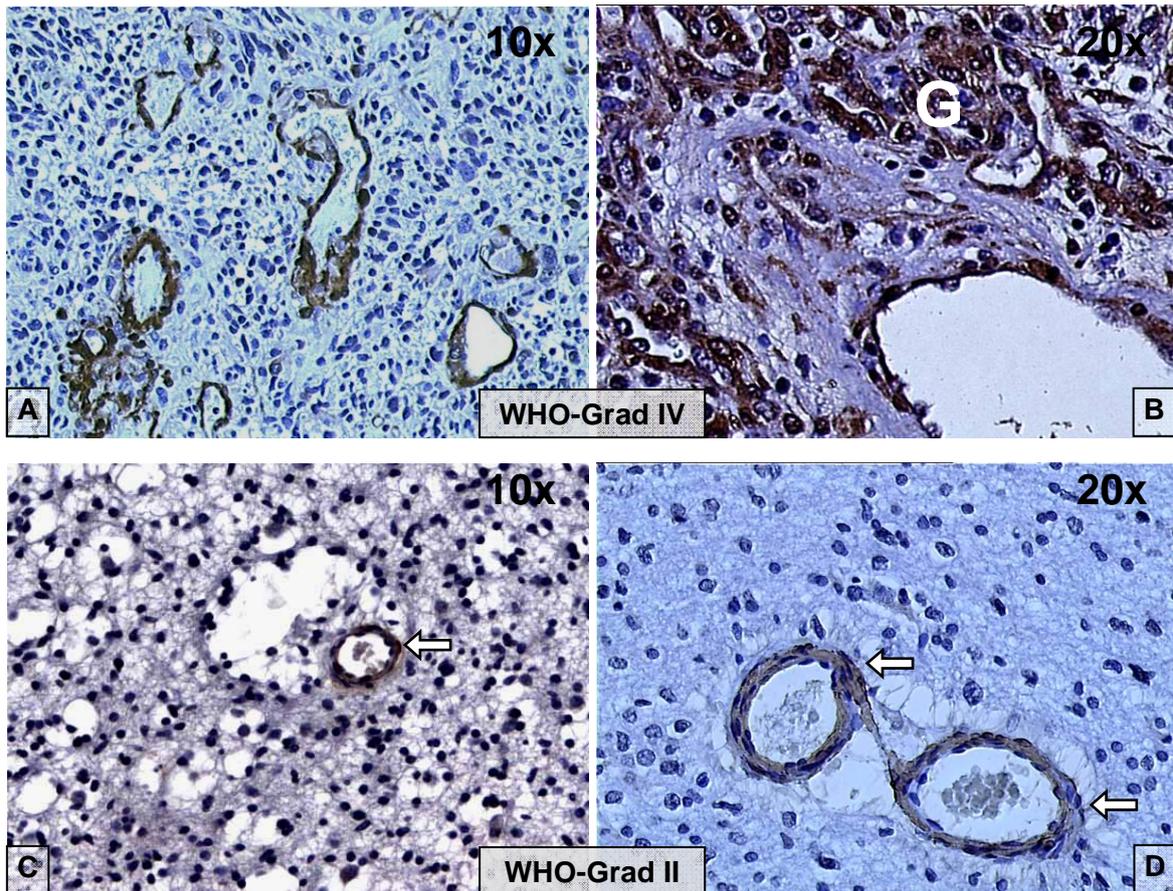
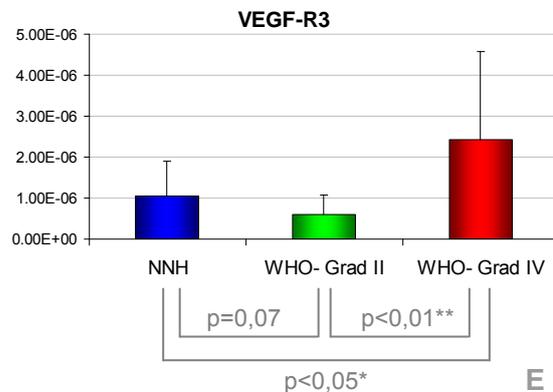


Abb. 21: VEGFR-3-Expression in Gliomen unterscheidet sich statistisch signifikant voneinander.

Bilder A, B: Starke VEGFR-3-Expression (braun) im Glioblastom, fast ausschließlich endothelial lokalisiert. In den charakteristischen glomeroiden Gefäßstrukturen (G) sind die Gefäßendothelien fast ausnahmslos angefärbt (Bild B).

Bilder C, D: Der Großteil des Tumorgewebes und der Gefäße des diffusen Astrozytoms ist negativ für VEGFR-3. Nur vereinzelt finden sich Gefäße mit positiv angefärbtem Gefäßendothel (weiße Pfeile).

Bild E: VEGFR-3-Expressionslevel ist auf mRNA-Ebene im WHO-Grad IV-Tumorgewebe eindeutig höher als in WHO-Grad II-Tumoren und im NNH. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an. Expressionsunterschiede sind bei einem p von 0,0018 signifikant (**, WHO-Grad IV vs. WHO-Grad II) bzw. marginal signifikant bei einem p von 0,037 (*, WHO-Grad IV vs. NNH).



Daneben wird sowohl für VEGF-C (Abb. 22; A, B) (Grau, Trillsch et al. 2007) als auch für VEGF-D (Abb. 23; A, B) (Grau, Trillsch et al. 2007) in allen untersuchten WHO-Grad IV-Tumoren (jeweils n = 18) ein intensives zellgebundenes Signal nachgewiesen. Dieses ist aber nicht nur auf die Endothelzellen der Tumorgefäße beschränkt, sondern auch auf Tumorzellen in der Umgebung von Gefäßen nachzuweisen. In den WHO-Grad II-Tumoren (n = 8) zeigt sich die Anfärbung für VEGF-C und -D dagegen nur sehr schwach und

lediglich auf vereinzelt Tumorzellen, die keine räumliche Beziehung zu den Gefäßen des Tumors aufwiesen (Abb. 22; C, D; Abb. 23; C, D) (Grau, Trillsch et al. 2007).

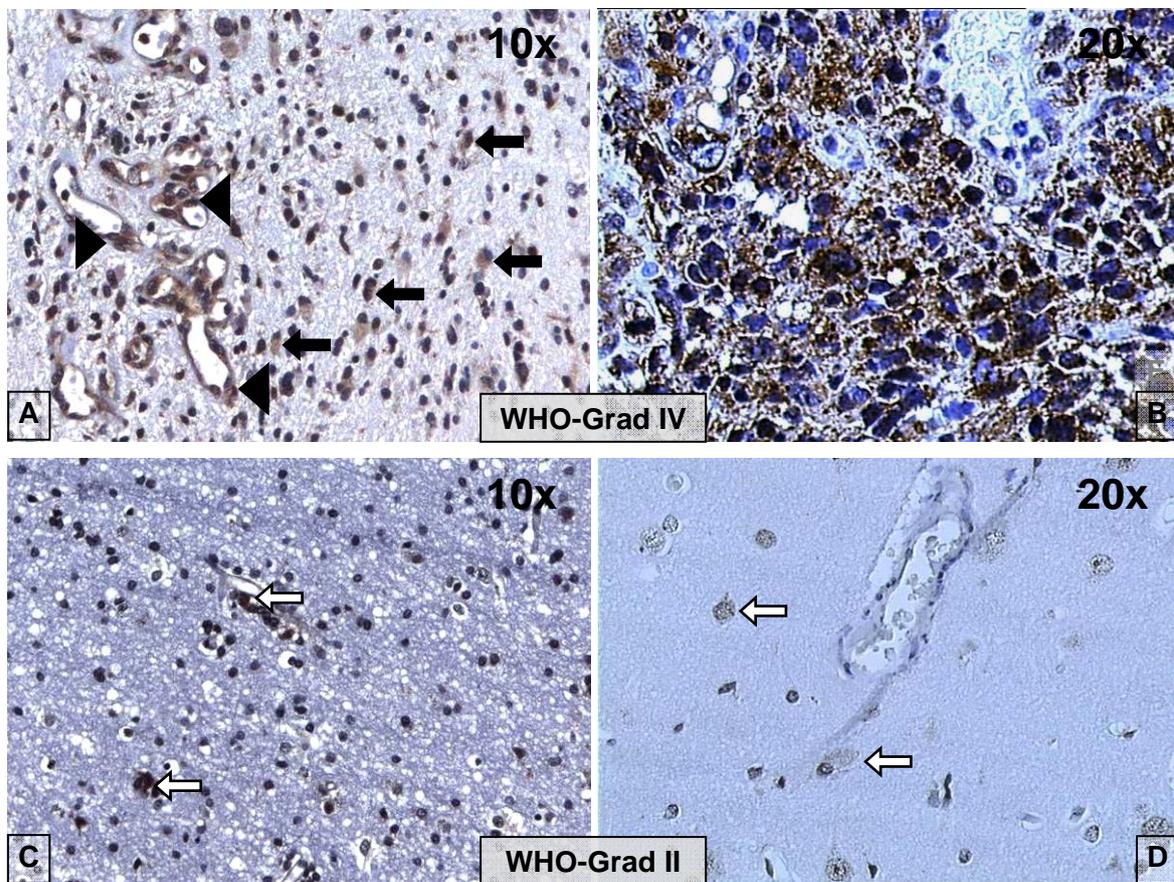
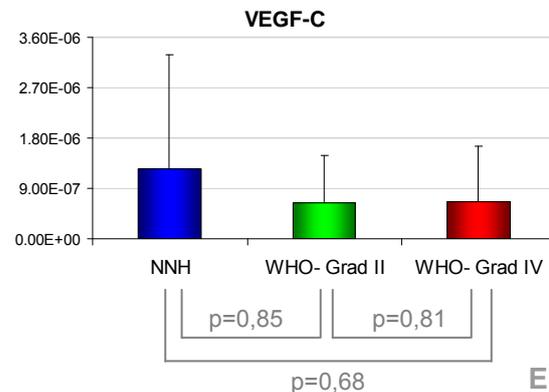


Abb. 22: VEGF-C ist sowohl in hoch- als auch in niedriggradigen Gliomen exprimiert.

Bilder A, B: Gefäßassoziierte VEGF-C-Expression (braun) in den WHO-Grad IV-Tumoren. Das Signal zeigt sich dabei sowohl endothelial (schwarze Pfeilspitzen) als auch auf vereinzelt Zellen in der Umgebung von Gefäßen (schwarze Pfeile). Massive VEGF-C-Expression in Bereichen mit aktiven Gefäßproliferaten (braun, Bild B).

Bilder C, D: Nur ganz vereinzelt VEGF-C-positive Zellen (weiße Pfeile) ohne Beziehung zu den Tumorgefäßen im Gewebe der WHO-Grad II-Tumoren.

Bild E: Keine signifikanten Expressionsunterschiede ($p > 0,05$) zwischen den untersuchten Gewebetypen (NNH, WHO-Grad IV, WHO-Grad II) in der Realtime-RT-PCR. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an.



Auf mRNA-Ebene kann die unterschiedliche Expression zwischen dem Glioblastom und dem diffusen Astrozytom für VEGF-C und-D allerdings nicht bestätigt werden. Für VEGF-C ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionswerten der malignen WHO-Grad IV-Tumoren und dem niedriggradigen Gewebe der WHO-Grad II-

Tumoren sowie dem NNH (Abb. 22, E). VEGF-D zeigt sogar eine Tendenz mit höheren Expressionswerten im NNH im Vergleich zum Glioblastom, auch wenn der Expressionsunterschied keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 23, E) (Grau, Trillsch et al. 2007).

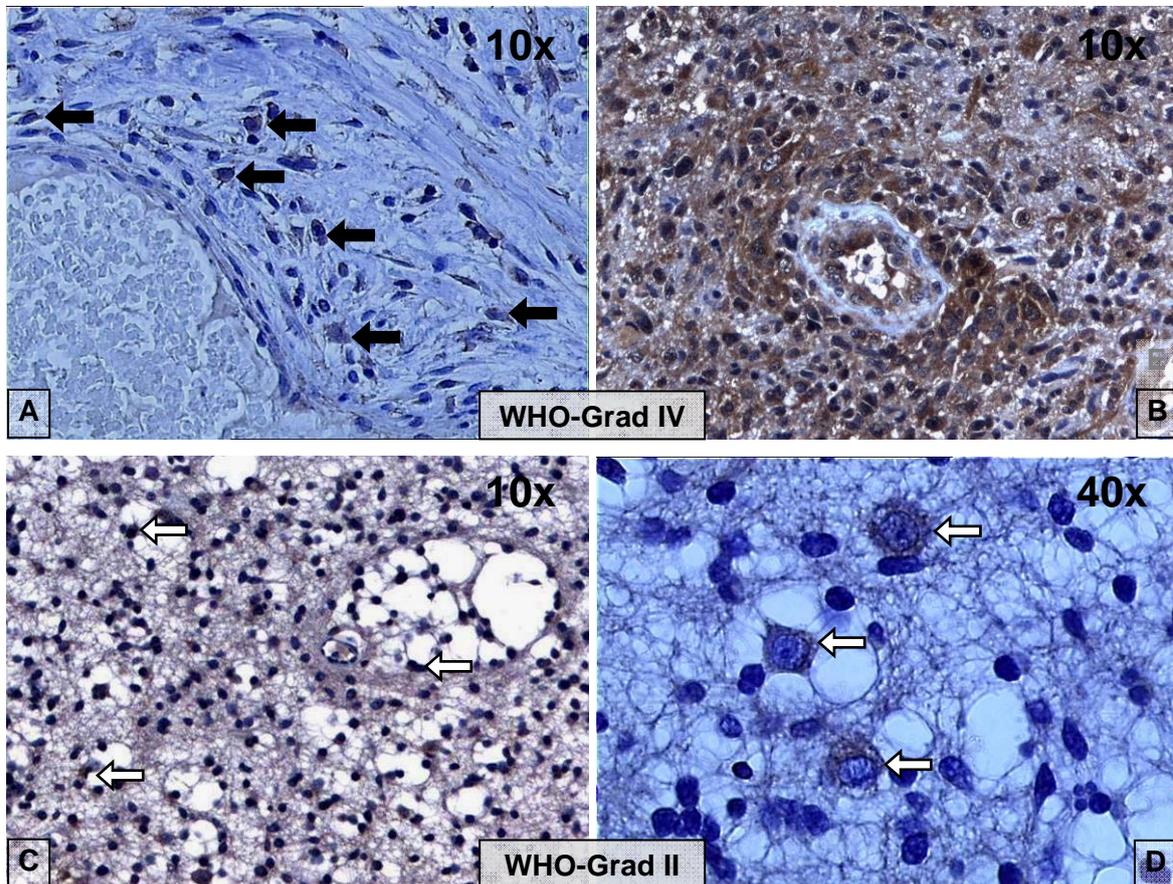
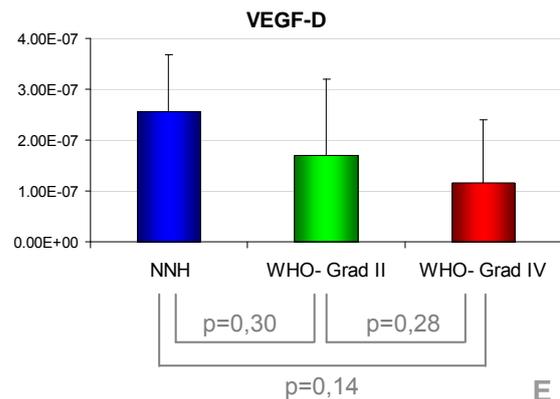


Abb. 23: VEGF-D mit deutlicher Expression in Gliomen.

Bilder A, B: VEGF-D-Expression in den WHO-Grad IV-Tumoren vornehmlich gefäßassoziiert (*braun*) und meist subendothelial (*schwarze Pfeile*). In der Umgebung aktiver Gefäßstrukturen ist VEGF-D massiv exprimiert (*braun, Bild B*).

Bilder C, D: Nur ganz vereinzelte VEGF-D-positive Zellen (*weiße Pfeile*) ohne Beziehung zu Tumorgefäßen im Gewebe der WHO-Grad II-Tumoren.

Bild E: Vom NNH, über die WHO-Grad II-, zu den WHO-Grad IV-Tumoren abnehmende Expressionswerte für VEGF-D auf mRNA-Ebene. Expressionsunterschiede erreichen aber keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an.



3.2.1.4. Expression von CCL19, CCL21 und CCR7

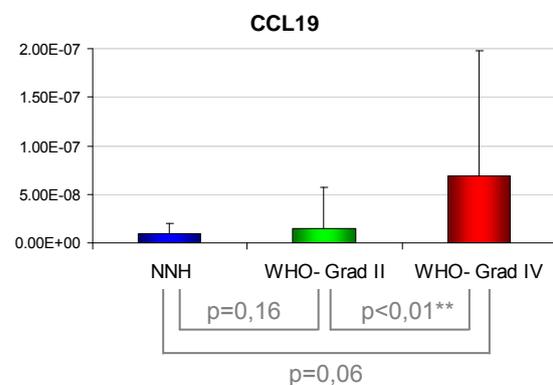
In der Realtime-RT-PCR wird das Chemokin CCL19 ausschließlich in 3 von 16 WHO-Grad IV-Tumorproben nachgewiesen. Die Gewebeproben des diffusen Astrozytoms und des NNH sind negativ für CCL19, so dass die Expressionsunterschiede vom Glioblastom im Vergleich zum niedrig malignen WHO-Grad II-Tumorgewebe statistische Signifikanz erreichen (Abb. 24). CCL21 ist sowohl im Glioblastom als auch im Astrozytom und im NNH exprimiert, allerdings ohne signifikante Expressionsunterschiede (Abb. 25, C). Der Chemokinrezeptor CCR7 ist ebenfalls in allen drei Gewebetypen nachzuweisen, wobei sowohl im NNH als auch in WHO-Grad IV-Tumoren ein deutlich höheres Expressionslevel im Vergleich zu den WHO-Grad II-Tumoren nachweisbar ist. Allerdings erreicht auch dieser Expressionsunterschied keine statistische Signifikanz (Abb. 26, C).

Die Expression von CCL21 und CCR7 wurde zudem mithilfe der Immunhistochemie auf Proteinebene in drei Glioblastom-Gewebeproben untersucht.

CCL21 zeigt dabei eine Proteinexpression, die sich hauptsächlich auf Gefäße und gefäßassoziierte Zellen konzentriert, zusätzlich aber auch auf einigen Zellen in der Umgebung der Gefäße nachzuweisen ist (Abb. 25; A,B). CCR7 ist in den gefäßreichen Tumorebenen auf vielen perivaskulären Zellen exprimiert, während sich die Gefäßzellen selbst negativ darstellen (Abb. 26; A,B).

Abb. 24: Signifikant erhöhte CCL19-Expression im Glioblastom auf mRNA-Ebene.

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an. Expressionsunterschiede sind bei einem p von 0,0029 signifikant (**, WHO-Grad IV vs. WHO-Grad II).



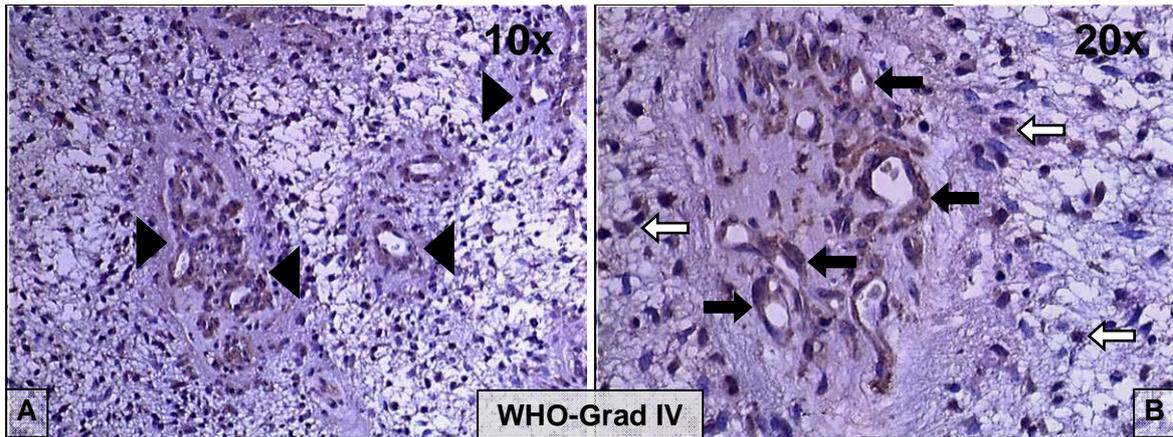


Abb. 25: Endotheliale CCL21-Expression im Glioblastom.
 Bilder A, B: Expression von CCL21 (braun) im Glioblastom im Bereich aktiver Gefäßproliferationen (schwarze Pfeilspitzen). Die Expression ist auf Endothelzellen dieser Gefäßstrukturen (schwarze Pfeile) und auf einigen perivaskulären Zellen zu detektieren (weiße Pfeile).
 Bild C: Expressionswerte von CCL21 auf mRNA-Ebene unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an.

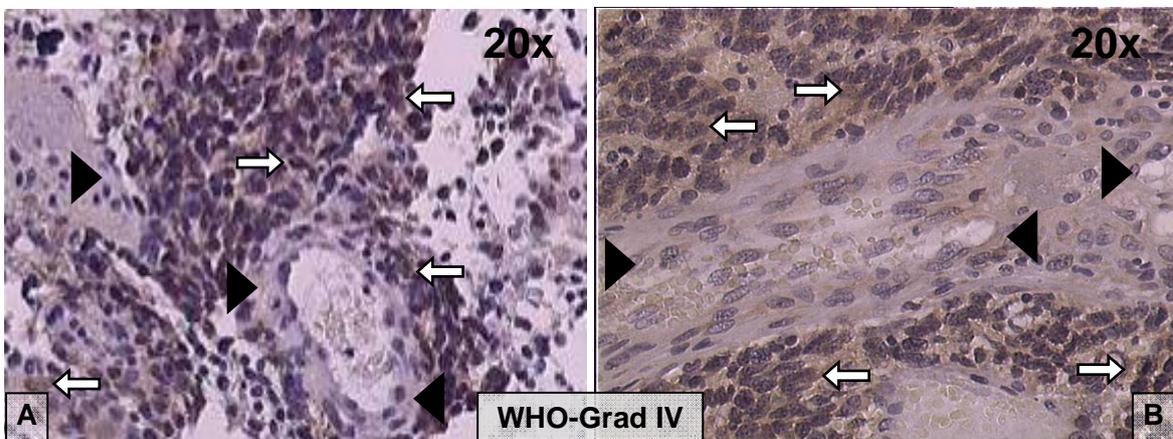
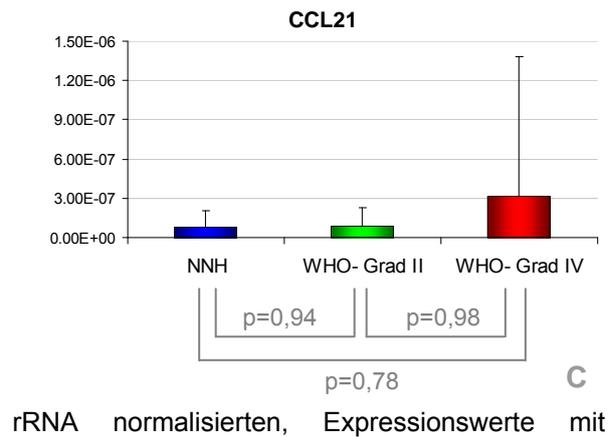
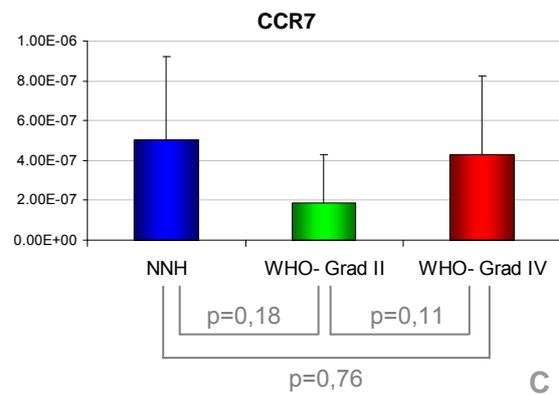


Abb. 26: Perivaskuläre CCR7-Expression im Glioblastom.
 Bilder A, B: Starke perivaskuläre CCR7-Expression (braun) im Glioblastom. Signal ist oberflächlich auf dem Großteil der umliegenden Zellen lokalisiert (weiße Pfeile). Endothelzellen der glomerulären Gefäßstrukturen (schwarze Pfeilspitzen) sind negativ.
 Bild C: Deutlich höhere Expressionswerte für CCR7 in WHO-Grad IV-Tumoren und im NNH auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den WHO-Grad II-Tumoren. Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der einzelnen, gegen 18S rRNA normalisierten, Expressionswerte mit Standardabweichung an. Die Expressionsunterschiede erreichen aber keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).



Ergebnisse

Alle Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung, die zur Analyse der Expression lymphatischer Markerproteine in astrozytären Tumoren durchgeführt wurde, sind in Tab. 18 tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aller immunhistochemischen Untersuchungen des Kapitels 3.2.1.
Bereits veröffentlichte Daten sind markiert ().*

Markerprotein	WHO-Grad	Anzahl	Ergebnisse
Podoplanin*	IV	11/11	Durchgehend starke Expression auf Tumorzellen in Bereichen mit hoher Gefäßdichte, den charakteristischen Gefäßproliferationen sowie perinekrotisch. Gefäßzellen sind alle negativ. Vereinzelte Podoplanin-positive Tumorzellen mit Co-Expression von Prox-1.
	II	0/7	Keine Expression in den untersuchten Gewebeproben.
Prox-1	IV	3/6	Expression auf einzelnen Tumorzellen, vor allem perivaskulär und perinekrotisch.
	II	5/7	Expression auf diffus verteilten Tumorzellen in der Umgebung von Tumorgefäßen.
LYVE-1	IV	4/8	Ganz wenige Areale mit vereinzelt positiven Zellen in der direkten Umgebung kleiner Gefäße.
	II	5/7	Wenige Areale mit vereinzelt positiven kleinen und mittelgroßen Gefäßen. LYVE-1 hier endothelial lokalisiert.
VEGFR-3*	IV	18/18	Durchgehend starke Expression, vornehmlich auf Endothelzellen der Tumorgefäße. Besonders ausgeprägt in Bereichen mit hoher Gefäßdichte.
	II	8/8	Vereinzelte Tumorgefäße mit positivem Gefäßendothel.
VEGF-C*	IV	18/18	Starke Expression, sowohl auf Tumorzellen in gefäßreichen Gebieten als auch auf Endothelzellen von Tumorgefäßen.
	II	3/8	Nur ganz vereinzelt positive Tumorzellen.
VEGF-D*	IV	18/18	Sehr starke Expression, gefäßassoziiert und in der Umgebung von Tumorgefäßen.
	II	3/8	Nur ganz vereinzelt positive Tumorzellen.
CCL21	IV	3/3	Endotheliale Expression in charakteristischen Gefäßproliferaten.
CCR7	IV	3/3	Perivaskuläre Expression auf vereinzelt Zellen im Tumorgewebe.

3.2.2. Expression lymphatischer Markerproteine im anaplastischen Oligodendrogliom (WHO-Grad III)

Die histopathologischen Eigenschaften des anaplastischen Oligodendroglioms sind denen des Glioblastoms sehr ähnlich, was die Abgrenzung der beiden Tumorentitäten voneinander erschwert (Louis, Holland et al. 2001). In immunhistochemischen Untersuchungen wurde deshalb in Kooperation mit Dr. Stefan Grau (Neurochirurgische Klinik der LMU, München) die Expression lymphatischer Markerproteine im anaplastischen Oligodendrogliom untersucht und mit der Expression im GBM verglichen. Hierzu wurden insgesamt 8 Tumorproben immunhistochemisch mit Antikörpern gegen die Oberflächenproteine VEGFR-3 und Podoplanin gefärbt.

Die Verteilung der Proteinexpression des Wachstumsfaktor-Rezeptors VEGFR-3 im anaplastischen Oligodendrogliom ähnelt dabei der zuvor untersuchten Expression im Glioblastom. Besonders stark ist VEGFR-3 in Bereichen des Tumors mit hoher Gefäßdichte und aktiver Gefäßproliferation zu finden. Dabei färben sich vor allem die Gefäßendothelien, aber auch vereinzelte, perivaskulär liegende Tumorzellen an (Abb. 27; A, B) (Grau, Trillsch et al. 2008).

Die Verteilung der Podoplanin-Expression unterscheidet sich dagegen von der Expression im Glioblastom, bei dem Podoplanin vornehmlich auf den Tumorzellen exprimiert ist. Im anaplastischen Oligodendrogliom ist Podoplanin, wie VEGFR-3, auch auf der Endothelzellschicht der Gefäße nachzuweisen (Abb. 28; A,B,C) (Grau, Trillsch et al. 2008).

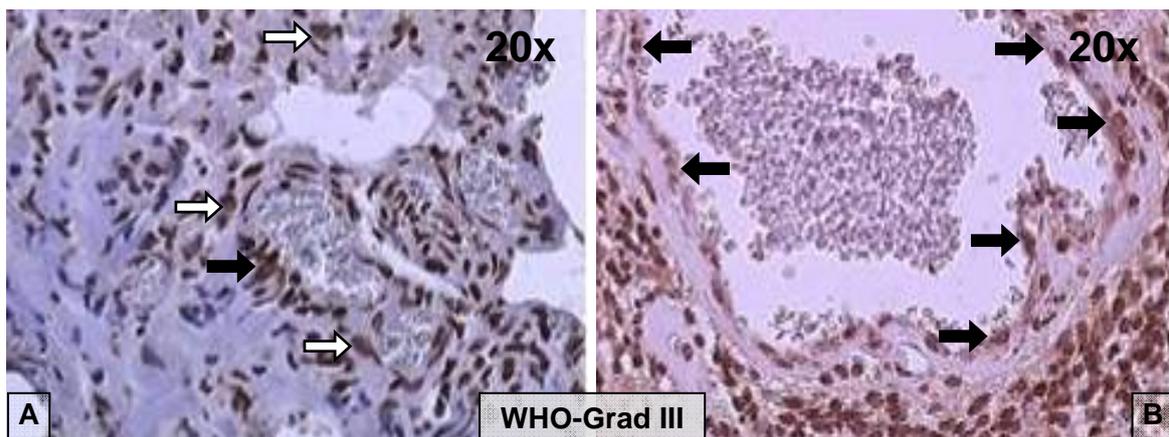


Abb. 27: VEGFR-3-Expression im anaplastischen Oligodendrogliom auf Tumor- und Endothelzellen.

Positives VEGFR-3-Signal (*braun*) vor allem in Bereichen mit hoher Gefäßdichte (*Bilder A, B*). Neben zahlreichen Tumorzellen (*weiße Pfeile*) ist die Endothelzellschicht der Tumorgefäße für VEGFR-3 angefärbt (*schwarze Pfeile*).

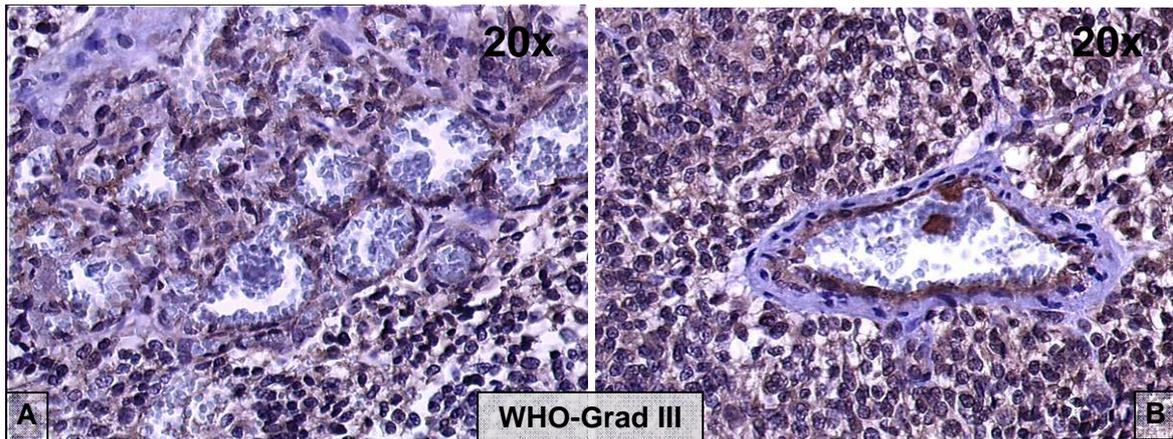
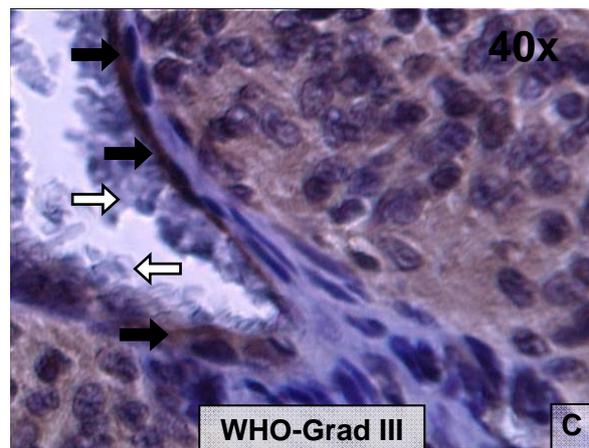


Abb. 28: Endothelial lokalisierte Podoplanin-Expression im anaplastischen Oligodendrogliom.

Podoplanin-Expression in Bereichen hoher Gefäßdichte und aktiver Gefäßneubildung streng endothelial lokalisiert. Spezifische Anfärbung der endothelialen Zellschicht (*schwarze Pfeile, Bild C*) der Gefäße, sowohl in aktiven Gefäßproliferaten (*Bild A*) als auch in größeren Gefäßen (*Bild B*). Die anderen Schichten der Gefäßwand sind negativ. Zudem zeigen sich im Gefäßlumen aggregierte Thrombozyten, die dem Gefäßendothel angeheftet sind (*Bild C, weiße Pfeile*).



Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen des anaplastischen Oligodendroglioms gegen VEGFR-3 und Podoplanin durchgeführt, bei denen die endotheliale Lokalisation der Expression bestätigt wurde. Mit einer Doppelfärbung wurde überprüft, ob beide Oberflächenproteine auf den Endothelzellen colokalisiert sind.

In den Einzelfärbungen zeigen sich zunächst, wie in der Immunhistochemie, jeweils endothelial lokalisierte Signale für VEGFR-3 und Podoplanin (Abb. 29; A, B). In der Doppelfärbung kann durch die Fusion der Abbildungen gezeigt werden, dass die Gefäßendothelien exakt das gleiche Expressionsmuster, sowohl für VEGFR-3 als auch für Podoplanin, zeigen und demnach beide Lymphangiogenesemarker gleichzeitig exprimieren (Abb. 29, C).

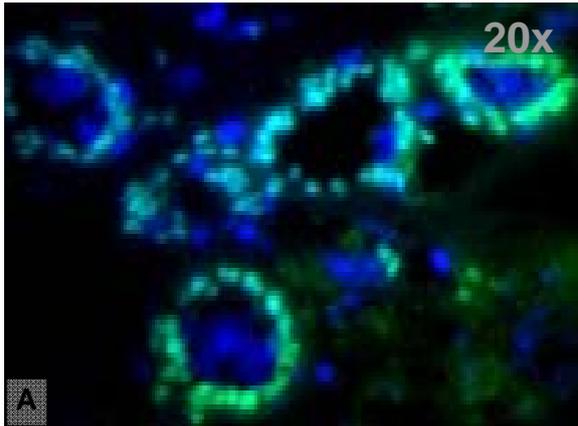


Abb. 29: Co-Expression von VEGFR-3 und Podoplanin im anaplastischen Oligodendrogliom.

Bild A: Einzelfärbung gegen VEGFR-3 (*grün*) im Gewebe des anaplastischen Oligodendroglioms mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*). Das Signal ist auf allen Gefäßstrukturen streng endothelial lokalisiert. Das umliegende Tumorgewebe ist weitgehend ohne Anfärbung.

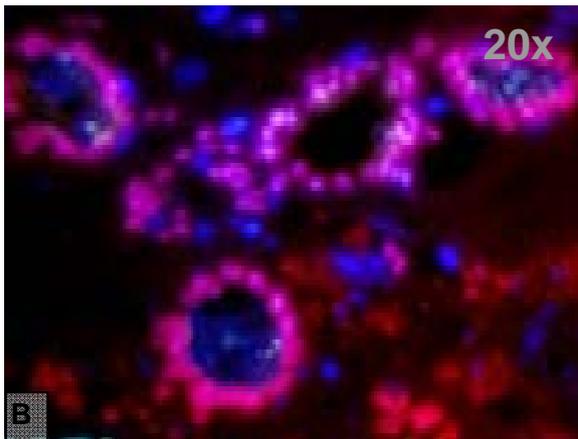


Bild B: Einzelfärbung gegen Podoplanin (*rot*) im Gewebe des anaplastischen Oligodendroglioms mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*). Streng endothelial lokalisiertes Signal auf allen Gefäßstrukturen, wenige der umliegenden Tumorzellen sind leicht positiv für Podoplanin.

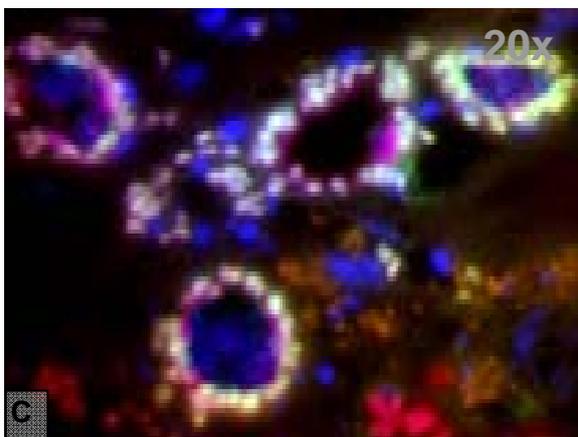


Bild C: Fusionsbild der Doppelfärbung gegen VEGFR-3 (*grün*) und Podoplanin (*rot*) mit Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*) im Gewebe des anaplastischen Oligodendroglioms. Übereinstimmung der Fluoreszenzsignale für VEGFR-3 und Podoplanin im Bereich des Gefäßendothels (*orange*).



3.3. Etablierung von zwei Tumorzelllinien mit stabiler Podoplanin-Überexpression

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass in Hirntumoren einige lymphatische Markerproteine exprimiert sind. Vor allem Podoplanin zeigt dabei eine, vom Malignitätsgrad abhängige, Expression.

Die Funktion von Podoplanin ist bisher allerdings weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zwei humane Glioblastom-Zelllinien (U87, U373) mit stabiler Podoplanin-Überexpression etabliert, die nun für weiterführende, experimentelle Studien zur Verfügung stehen.

Hierfür wurde zunächst die Podoplanin-Expression der beiden nicht-modifizierten Zelllinien mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Zelllinie U373 zeigt dabei keine Expression von Podoplanin (Abb. 30), während auf U87-Zellen ein positives, wenn auch schwaches, Podoplanin-Signal nachgewiesen werden kann (Abb. 29).

Diese Ergebnisse wurden mit Realtime-RT-PCR (Abb. 34; Abb. 35) und FACS-Analyse (Abb. 32, A, Abb. 33, A) bestätigt.

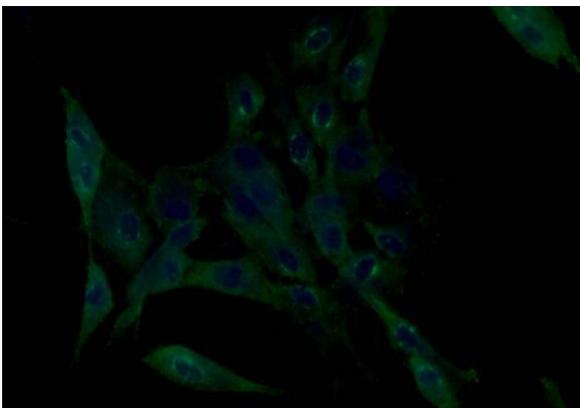


Abb. 30: Schwache Podoplanin-Expression der Glioblastom-Zelllinie U87.

In der Immunfluoreszenz-Färbung zeigt sich auf allen U87-Tumorzellen eine detektierbare, Expression des Oberflächenproteins Podoplanin (*grün*) bei Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*).

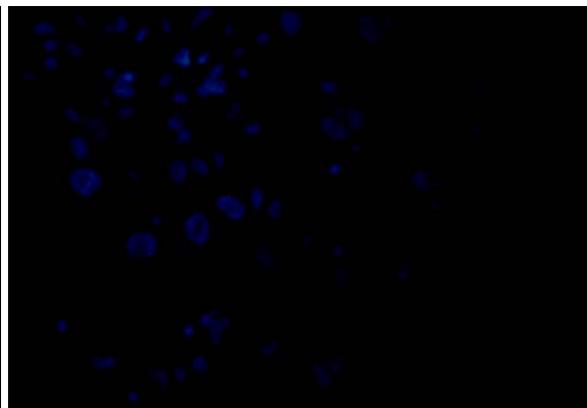


Abb. 31: Keine Podoplanin-Expression der Glioblastom-Zelllinie U373.

Für die U373-Tumorzellen lassen sich in der Immunfluoreszenz-Färbung keine Podoplanin-positiven Signale nachweisen. Es zeigt sich lediglich die Gegenfärbung des Zellkerns (*DAPI, blau*).

Nach der erfolgreichen Transfektion mit dem Podoplanin-Expressionsvektor (s. Kap. 2.2.6.3) zeigt sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in beiden Zelllinien (*U373-Podoplanin, U87-Podoplanin*) ein verändertes Expressionsmuster. Die zuvor Podoplanin-negativen U373-Zellen zeigen in der Realtime-RT-PCR (Abb. 35) sowie in der FACS-Analyse (Abb. 33, B) nun als U373-Podoplanin ein eindeutiges Signal für das Oberflächenprotein. Im Vergleich zu der bereits zuvor bestehenden Podoplanin-

Expression in den U87-Zellen wird nach der Transfektion in der Realtime-RT-PCR ein weitaus höheres Expressionssignal für die U87-Podoplanin-Zellen nachgewiesen (Abb. 34). Auch in der FACS-Analyse liegt das Fluoreszenzsignal nun deutlich weiter im positiven Bereich als bei den nicht-modifizierten U87-Zellen vor der Transfektion (Abb. 32, B).

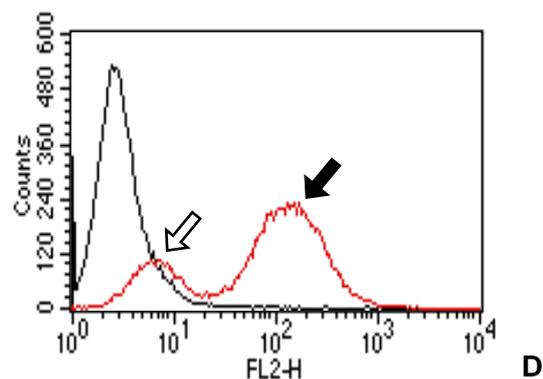
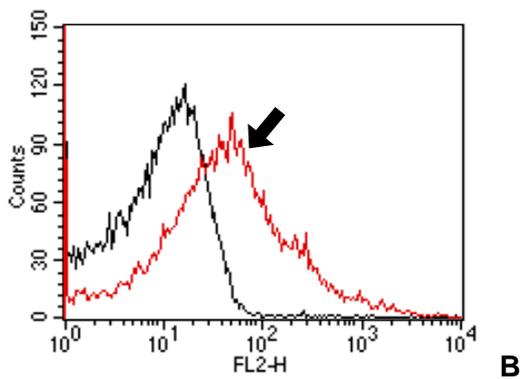
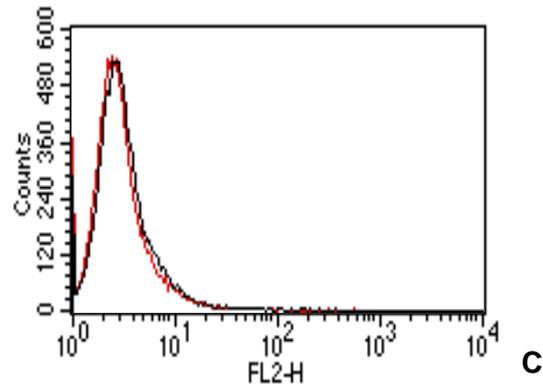
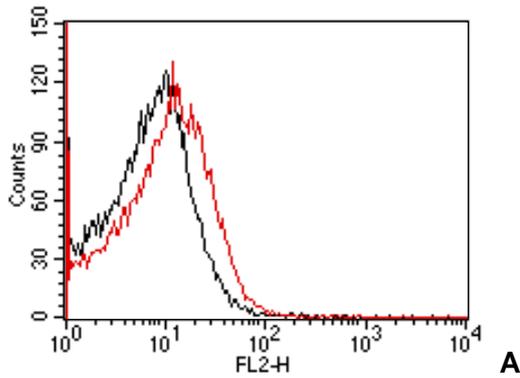


Abb. 32: FACS-Analyse mit verstärkter Podoplanin-Expression der U87-Zellen nach der stabilen Transfektion.

Bild A: Bereits vor der Transfektion zeigt U87 (rote Kurve) eine leichte Podoplanin-Expression (FL2-H).

Bild B: Nach der Transfektion ist das Podoplanin-Signal (FL2-H) in U87-Podoplanin deutlich positiver (schwarzer Pfeil; rote Kurve weiter vom Isotyp entfernt, nach rechts verschoben).

Abb. 33: FACS-Analyse mit Podoplanin-Expression der transfizierten U373-Zellen nach der stabilen Transfektion.

Bild C: Eindeutig kein Podoplanin-Signal (FL2-H) in U373 (rot) vor der Transfektion (rote Kurve deckt die Kurve des Isotyps).

Bild D: Nachweis der Podoplanin-Expression in U373-Podoplanin nach der Transfektion. Der Großteil der Zellen exprimiert Podoplanin (FL2-H) sehr stark (schwarzer Pfeil), ein kleinerer Teil etwas abgeschwächt (weißer Pfeil).

Ergebnisse

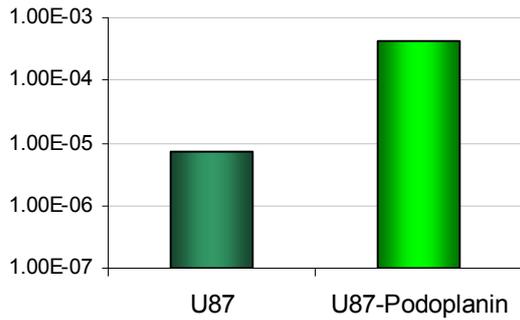


Abb. 34: Verstärkte Podoplanin-Expression der U87-Zellen auf mRNA-Ebene nach der stabilen Transfektion.

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die gegen 18S rRNA normalisierten Expressionswerte an. Podoplanin ist bereits vor der Transfektion in der Zelllinie U87 auf mRNA-Ebene zu detektieren. Nach der Transfektion ist die Expression in U87-Podoplanin aber deutlich erhöht.

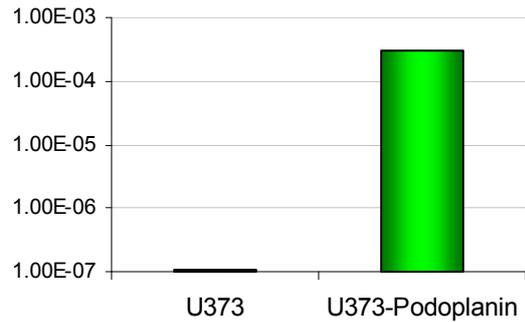


Abb. 35: Podoplanin-Expression der U373-Zellen auf mRNA-Ebene nach der stabilen Transfektion.

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die gegen 18S rRNA normalisierten Expressionswerte an. Keine Podoplanin-Expression in der Zelllinie U373 vor der Transfektion. Deutlich positives Podoplanin-Signal nach der Transfektion in U373-Podoplanin.

Die Expressionswerte für Podoplanin waren in wiederholten Untersuchungen (bis zur Passage 20) stabil und reproduzierbar.

Es stehen somit GBM-Zelllinien mit Podoplanin-Überexpression zur Verfügung, die sowohl in *in vitro*-Versuchen als auch in *in vivo*-Versuchen verwendet werden können. Wie in Kapitel 4.8 besprochen wird, können dabei die Eigenschaften Podoplanin-positiver Glioblastomzellen (*U87*, *U87-Podoplanin*, *U373-Podoplanin*) analysiert werden und diese mit dem Verhalten Podoplanin-negativer Glioblastomzellen (*U373*) verglichen werden.

4. Diskussion

Neoangiogenese ist ein charakteristisches Kennzeichen zahlreicher hoch maligner Neoplasien (Hillen and Griffioen 2007). Hohe Gefäßdichte korreliert dabei in verschiedenen Tumoren mit der Malignität des Tumors (Sharma, Sharma et al. 2005). Im Rahmen des Tumorwachstums ist somit der Übergang in eine angiogene Wachstumsphase ("angiogenic switch") charakteristisch (Ganss 2006) und bei Hirntumoren der entscheidende Schritt zur Progression vom niedriggradigen zum hochgradigen Gliom (Lebelt, Dzieciol et al. 2008).

Dementsprechend zeigt das hoch maligne Glioblastoma multiforme (GBM) im Rahmen des Tumorwachstums eine ausgeprägte Neoangiogenese (Goldbrunner, Wagner et al. 2000). Das Gefäßsystem weist einen außergewöhnlichen Phänotyp mit einer speziellen Architektur und schlechten qualitativen Eigenschaften auf. Trotz der extrem hohen Gefäßdichte wird das Tumorgewebe nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, so dass in einigen Gewebsabschnitten flächenhafte Nekrosen auftreten (Pietsch and Wiestler 1997). Die inkonstante Konfiguration der Gefäßwände führt außerdem zu tumorassoziierten Ödemen und begünstigt intratumorale Blutungen (Fischer, Gagner et al. 2005).

Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen ist das Gefäßsystem des GBM noch nicht vollständig charakterisiert worden. Die Mechanismen, die hinter dieser Gefäßneubildung stehen, sind nicht ausreichend verstanden (Jain, di Tomaso et al. 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das Verständnis für die Gefäßbiologie des GBM zu vertiefen und darauf aufbauend neue diagnostische und therapeutische Strategien zu identifizieren.

4.1. Maligne Hirntumoren rekrutieren mesenchymale Stammzellen

Mit den mesenchymalen Stammzellen (MSC) besitzt das adulte Knochenmark eine Subpopulation von Stammzellen, die aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften im Fokus der gegenwärtigen Forschung steht (Arthur, Zannettino et al. 2009). MSC können sich in verschiedene Zelltypen differenzieren, werden über bestimmte Signale aus dem Knochenmark mobilisiert und in geschädigtes Gewebe rekrutiert (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Durch dieses Differenzierungspotenzial sind MSC an Reparaturvorgängen von Organen nach Gewebsschädigung beteiligt und können die Regeneration solider Organe unterstützen (Korbling and Estrov 2003).

Nachdem die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen bereits für verschiedene Tumoren gezeigt wurde (Studený, Marini et al. 2002), konnte dieser Mechanismus zuletzt auch für maligne Hirntumoren bestätigt werden (Nakamura, Ito et al. 2004; Brower 2005; Hamada, Kobune et al. 2005; Nakamizo, Marini et al. 2005; Schichor, Birnbaum et al. 2006). Nakamizo et al. zeigten dabei, dass die Zellen auch nach systemischer Injektion in die Karotiden spezifisch in den Hirntumor rekrutiert werden (Nakamizo, Marini et al. 2005).

Als Basis für die weiterführenden, gefäßspezifischen Versuche wurde dieser Mechanismus zunächst auch für die Versuchsbedingungen dieser Arbeit nachgewiesen und somit das generelle Prinzip der Rekrutierung von MSC in das GBM bestätigt ("proof of principle").

Im Versuch mit immundefizienten Ratten zeigte sich, dass intravenös applizierte primäre MSC nach einiger Zeit im Tumorgewebe des zuvor implantierten Glioms nachzuweisen sind. Von großer Bedeutung für die weiteren Versuche dieser Arbeit war dabei die Tatsache, dass MSC zum Teil direkt mit den Gefäßen des Tumors assoziiert detektiert werden. In diesen Versuchen scheinen die Zellen in die Gefäßwand der Tumorgefäße integriert zu sein (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht).

Die für diese Rekrutierung verantwortlichen Signale sind allerdings noch nicht vollständig verstanden (Chamberlain, Fox et al. 2007). Im Rahmen von pathologischen Prozessen wie Inflammation und Gewebsverletzung wird die Rekrutierung verschiedener Zelltypen (Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) über Wachstumsfaktoren und Zytokine vermittelt (Bissell and Radisky 2001; Coussens and Werb 2002; Brower 2005). MSC werden unter anderem über Chemokine aus dem Knochenmark mobilisiert (Lapidot and Petit 2002; Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005), so dass dieser Mechanismus auch im GBM die Rekrutierung der MSC steuern könnte.

Chemokine sind Teil eines komplizierten Kommunikationssystems, das über die Interaktion der Chemokine mit ihren spezifischen Rezeptoren verschiedene Signale in das Innere der Zelle überträgt (Rot and von Andrian 2004). Diese Funktion ist vor allem im Rahmen der Leukozyten-Chemotaxis beschrieben worden, bei der die Expression von Chemokinen für die Migration der Leukozyten verantwortlich ist (Kunkel and Butcher 2002).

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits veröffentlicht, dass die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR4, CCR7, CCR10 und CXCR5 auf MSC exprimiert sind und entlang eines Chemokingradienten migrieren (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). In dieser Arbeit wird nun gezeigt, dass verschiedene Chemokine im humanen Gliomgewebe

exprimiert sind und somit möglicherweise wichtige Signale für die Rekrutierung von MSC in das GBM darstellen.

CCL27 und CCL28, die Liganden des Rezeptors CCR10, zeigen dabei ein interessantes Expressionsmuster. Diese Chemokine, die unter physiologischen Bedingungen auf den Gefäßendothelzellen der Haut exprimiert sind und die Migration von T-Zellen in die entsprechenden Hautstrukturen vermitteln (Homey, Wang et al. 2000; Wang, Soto et al. 2000), sind auch im Gliomgewebe nachzuweisen. Dabei liegen die Expressionswerte für CCL28 im Normalhirn statistisch signifikant höher als in den WHO-Grad II- und IV-Tumoren, während die Expressionswerte von CCL27 mit dem Malignitätsgrad des Gewebes korrelieren. Es erscheint daher möglich, dass diese Expressionsgradienten an der Vermittlung der Migration von MSC ins Tumorgewebe beteiligt sind.

Es ist allerdings auch zu vermuten, dass Chemokine bei der MSC-Rekrutierung nur Teil eines komplizierten Signalmechanismus sind und dass neben ihnen weitere Zytokine Einfluss auf die MSC ausüben (Nakamizo, Marini et al. 2005; Schichor, Birnbaum et al. 2006; Birnbaum, Roider et al. 2007).

4.2. Mesenchymale Stammzellen sind aktiv an der Neoangiogenese maligner Hirntumore beteiligt

Das Differenzierungspotenzial von MSC in Zellen des mesenchymalen Gewebes wie Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten ist bereits intensiv erforscht (Dominici, Le Blanc et al. 2006). Neuere Berichte deuten darauf hin, dass sich MSC unter entsprechenden Kulturbedingungen auch in Zellreihen differenzieren können, die nicht dem Mesenchym entstammen. Neben neuronalen Zellen (Woodbury, Schwarz et al. 2000; Kohyama, Abe et al. 2001), Epithelzellen (Davani, Marandin et al. 2003; Oswald, Boxberger et al. 2004), Hepatozyten (Ishii, Yoshida et al. 2008) und Kardiomyozyten (Gojo, Gojo et al. 2003) gehören dazu auch die Endothelzellen von Gefäßen (Davani, Marandin et al. 2003; Gojo, Gojo et al. 2003; Oswald, Boxberger et al. 2004). Zur Vorbereitung neuer gefäßspezifischer Therapieansätze wurde dieses Differenzierungspotenzial im GBM untersucht.

Im Rahmen der Gefäßentwicklung des GBM wird verschiedenen Mechanismen eine Bedeutung zugeschrieben (Goldbrunner, Bernstein et al. 1999). Unter anderem ist die Funktion endothelialer Vorläuferzellen beschrieben worden (Urbich and Dimmeler 2004; Adams and Alitalo 2007), auch wenn die genaue Herkunft dieser Zellen noch nicht eindeutig identifiziert worden ist (Bailey, Willenbring et al. 2006). Zusätzlich zu zirkulierenden Vorläuferzellen scheinen in Tumoren auch Vorläuferzellen des adulten Knochenmarks am Aufbau des Gefäßendothels beteiligt zu sein (Ganss 2006; Hillen and

Griffioen 2007). Die Zellen werden dabei sowohl der hämatopoetischen als auch der myeloischen Zellreihe zugeordnet (Bailey, Willenbring et al. 2006; Zovein and Iruela-Arispe 2006). Es handelt es sich somit um eine heterogene Gruppe verschiedener Zelltypen, die sich gegenseitig beeinflussen und in enger Wechselwirkung zueinander stehen (Ganss 2006).

Aufbauend auf Publikationen, die gezeigt haben, dass MSC über endotheliales Differenzierungspotenzial verfügen (Davani, Marandin et al. 2003; Gojo, Gojo et al. 2003; Oswald, Boxberger et al. 2004), in Gliome rekrutiert werden (Nakamizo, Marini et al. 2005; Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht) und *in vitro* eine Migration in Richtung der angiogenen Faktoren VEGF, IL-8 und TGF- β 1 zeigen (Schichor, Birnbaum et al. 2006; Birnbaum, Roider et al. 2007), wurde in dieser Arbeit die Hypothese formuliert, dass MSC an der Neoangiogenese des GBM beteiligt sind.

Diese Hypothese konnte bestätigt werden. In einer Versuchsreihe mit gentechnisch modifizierten MSC zeigte sich, dass MSC nach der Rekrutierung ins Tumorgewebe nicht nur räumlich mit den Tumorgefäßen des GBM assoziiert sind, sondern auch, dass sie sich aktiv in das Gefäßendothel integrieren (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht). Für diesen Nachweis waren MSC-Linien mit einem gefäßspezifisch aktivierbaren Vektor stabil transfiziert worden, bei dem die Expression des Reportermoleküls RFP unter der Kontrolle des Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes steht.

Tie2 ist auf allen Gefäßendothelzellen des menschlichen Körpers exprimiert (Dumont, Yamaguchi et al. 1992). Lediglich zwei kleinere Zellpopulationen (proangiogene Monozyten, Vorläuferzellen der Perizyten aus dem Tumorstroma), die wie die Gefäßendothelzellen eng mit der Gefäßneubildung assoziiert sind, exprimieren ebenfalls Tie2 (De Palma, Venneri et al. 2005). Die Aktivierung der Tie2-Expression zeigt somit die Differenzierung der MSC zu einer Endothel-assoziierten Gefäßzelle an, die in den Versuchen dieser Arbeit durch das rote Fluoreszenzsignal des RFP nachgewiesen wurde. Die RFP-positiven Zellen sind dabei ausschließlich in den Gefäßen des Tumorgewebes lokalisiert. Im umgebenden Hirngewebe wird keine RFP-Expression nachgewiesen, was zeigt, dass der Tie2-Promotor dort nicht aktiviert wird (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht). Die Untersuchungen dieser Arbeit suggerieren, dass MSC nach systemischer Injektion in das Gliomgewebe rekrutiert werden, sich am Aufbau der Gefäßwand neu entstehender Tumorgefäße beteiligen und in aktive Gefäßendothelzellen differenzieren (Schichor, von Lüttichau; Trillsch et al. 2009, eingereicht). Daraus lässt sich folgern, dass MSC bei der Gefäßneubildung in malignen Hirntumoren möglicherweise eine wichtige Rolle spielen.

4.3. Gentechnisch modifizierte mesenchymale Stammzellen für einen gefäßspezifischen Therapieansatz

Die aktive Beteiligung der MSC an der Neoangiogenese ermöglicht neue Einsatzmöglichkeiten dieser Zellen im Rahmen der Tumorthherapie.

Bereits im Jahr 2000 wurden neurale Stammzellen im Rahmen der experimentellen Therapie des GBM eingesetzt (Benedetti, Pirola et al. 2000; Ehtesham, Kabos et al. 2002; Ehtesham, Kabos et al. 2002), die Strategie allerdings aufgrund von technischen und ethischen Bedenken nicht weiter verfolgt (Ehtesham, Stevenson et al. 2005). Der Fokus der Forschung hat sich seitdem auf die adulten MSC verlagert, die sich in der Zellkultur gut kultivieren lassen und gentechnisch relativ gut zu modifizieren sind (Chamberlain, Fox et al. 2007).

Im Rahmen der Tumorthherapie können MSC als Vehikel für therapeutische Vektoren fungieren (Arap and Pasqualini 2004). Man macht sich dabei zunutze, dass MSC vom Tumor rekrutiert werden, um durch Differenzierung in die benötigten Zelltypen, das Tumorstadium aktiv zu unterstützen (Hall, Andreeff et al. 2007). Mithilfe gentechnischer Modifikation können MSC allerdings mit Genen beladen werden, die nach Integration in das Tumorgewebe eine gewebsschädigende Wirkung ausüben und somit dem Tumorstadium entgegenwirken (Hamada, Kobune et al. 2005). Solche, modifizierte MSC werden aus diesem Grund in der Literatur auch mit dem „Trojanischen Pferd“ der griechischen Mythologie verglichen (Arap and Pasqualini 2004; Miletic, Fischer et al. 2007).

Bei Therapieansätzen mit MSC für das GBM wurde in der Vergangenheit meist versucht, über eine unspezifische Überexpression verschiedener Zytokine das Tumorstadium abzuschwächen (Hamada, Kobune et al. 2005; Nakamizo, Marini et al. 2005). Mittlerweile wurden allerdings weitere, elegante Ansätze entwickelt, bei denen so genannte Selbstmordgene eingesetzt werden (Kucerova, Altanerova et al. 2007).

Ein Beispiel für ein solches Gen stellt die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus (HSV-TK) dar (Moolten and Wells 1990; Barba, Hardin et al. 1994; Chen, Shine et al. 1994). Dieses Enzym phosphoryliert das antivirale Pharmakon Ganciclovir zum zytotoxischen Antimetaboliten Ganciclovir-Triphosphat (GC-P). GC-P führt Kettenabbruch der DNA-Synthese und entfaltet dadurch einen zytotoxischen Effekt (Barba, Hardin et al. 1994). Über gap junctions gelangt GC-P in angrenzende Zellen, so dass eine lokale Gewebsschädigung ausgelöst wird und auch genetisch unveränderte Zellen in der Umgebung angegriffen werden (Culver, Ram et al. 1992). Exogene Vektoren, die dem Tumor zugeführt werden und für HSV-TK codieren, können somit nach Aktivierung umliegendes Tumorgewebe schädigen.

Für das GBM haben Miletic et al. dieses Prinzip 2007 in einer Versuchsreihe verfolgt (Miletic, Fischer et al. 2007). Die Expression von HSV-TK wurde dabei durch retroviralen Transfer in einer speziellen Subpopulation der MSC (BM-TIC, Bone Marrow derived Tumor-infiltrating Cells) induziert. Die intratumorale Applikation dieser modifizierten Zellen mit anschließender Ganciclovir-Injektion konnte im Rattenmodell das Wachstum des GBM abschwächen und das Überleben der behandelten Tiere verlängern (Miletic, Fischer et al. 2007).

Aufbauend auf diesem Prinzip ist nun in dieser Arbeit eine weitere, innovative Strategie zur Therapie des GBM entwickelt worden. MSC werden hierbei als Vehikel für einen therapeutischen Vektor eingesetzt, um ganz spezifisch das neu entstehende Gefäßsystem des GBM anzugreifen. Das Tumorstadium soll gestoppt werden, ohne eine Schädigung des umliegenden Hirngewebes und anderer Organe hervorzurufen. Hierzu wurde eine MSC-Linie stabil mit einem Vektor transfiziert, der das Selbstmordgen HSV-TK unter der Kontrolle des gefäßspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes enthält. Diese Zelllinie (MSC-Tie2-TK) steht zur systemischen Verabreichung in einer therapeutischen *in vivo*-Studie bereit.

Wir gehen davon aus, dass nach intravenöser Applikation im Rahmen des Tumorstadiums ein Teil dieser Zellen direkt in das Tumorgewebe des GBM rekrutiert wird und sich dort in das Endothel der Gefäße integriert. Dabei stellt die Differenzierung der modifizierten MSC zu einer Gefäßzelle den entscheidenden Schritt dar, durch den der Tie2-Promotor aktiviert wird. In den neu entstandenen Gefäßendothelien wird somit das Selbstmordgen HSV-TK exprimiert. Nach Verabreichung von Ganciclovir entfaltet sich der zuvor beschriebene zytotoxische Effekt, der das umliegende Tumorgewebe schädigt. Es ist zu erwarten, dass sich nach Anwendung des vorgestellten Behandlungsschemas das Tumorstadium verzögert und die Überlebenszeit der behandelten Tiere verlängert werden kann. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit anderen Tumorentitäten (Mammakarzinom, Pankreaskarzinom) haben die Effizienz dieser therapeutischen Strategie bereits bestätigen können (Hüseemann, von Lüttichau et al. in Vorbereitung). Erste vorbereitende Experimente bei Ratten mit implantierten Gliomen lassen vermuten, dass auch das Tumorstadium des Glioblastoms über diesen Therapieansatz deutlich abgeschwächt werden kann. Die Weiterführung dieser Experimente hat leider den Rahmen dieser Arbeit überstiegen, ein genauer Versuchsplan ist allerdings ausgearbeitet worden (s. Kap. 2.2.7.5).

Der Einsatz dieser gentechnisch modifizierten MSC hätte für die Therapie des GBM verschiedene Vorteile. Der Therapieansatz greift das neu entstehende Gefäßsystem des Tumors direkt an, könnte im Tumorgewebe eine hohe Wirkkonzentration erreichen,

gleichzeitig aber das umliegende Hirngewebe schonen. Die HSV-TK würde nur in den Zellen aktiviert werden, die den Prozess der Rekrutierung mit anschließender Differenzierung in Tie2-positive Zellen vollzogen haben. Eine unkontrollierte Aktivierung des Selbstmordgens wird somit verhindert. Alle weiteren MSC, die im Rahmen der Gefäßneubildung nicht rekrutiert und aktiviert werden, zirkulieren wie native MSC im Blutkreislauf, ohne eine Gewebsschädigung auszuüben.

Die Analyse des Verteilungsmusters der modifizierten MSC hat sich im Rahmen dieser Arbeit auf das Gehirn konzentriert. Dabei stand der Mechanismus der Rekrutierung in das Gliom und die Beteiligung der MSC an der Neoangiogenese von Hirntumoren im Vordergrund. Andere Organe wurden nicht auf die Expression des Reportermoleküls RFP hin untersucht.

Es ist allerdings auch nicht zu erwarten, dass der gefäßspezifische Tie2-Promotor/Enhancer unter normalen Bedingungen in anderen Organen aktiviert wird. Nach Abschluss der Embryonalentwicklung tritt signifikante physiologische Gefäßneubildung im menschlichen Körper nur während des weiblichen Menstruationszyklus zum Aufbau des Endometriums auf (Tonnesen, Feng et al. 2000; Fischer, Gagner et al. 2005). Pathologische Konditionen, die eine Neoangiogenese hervorrufen, sind Wundheilung, metabolische Krankheiten, Entzündungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und Tumorwachstum (Furuya, Nishiyama et al. 2005). Da sich diese Krankheitsbilder in der Regel klinisch bemerkbar machen, wären sie im Tiermodell und bei therapeutischen Anwendungen beim Menschen mit großer Wahrscheinlichkeit vorherzusehen und könnten bei der Planung des Behandlungsschemas berücksichtigt werden.

Insgesamt erscheint es vorstellbar und sinnvoll, diese Behandlungsstrategie mit autologen MSC durchzuführen. MSC lassen sich unter Zellkulturbedingungen gut modifizieren (Chamberlain, Fox et al. 2007), so dass die Zellen dem Patienten vor Beginn einer solchen Therapie entnommen werden könnten. Sie würden außerhalb des Körpers stabil transfiziert und im Anschluss daran demselben Patienten wieder appliziert. Komplikationen im Sinne einer Abstoßungsreaktion würden somit vermieden (Keating 2006). Eine Methode zur zeitnahen und effektiven Transfektion zu etablieren, stellt allerdings eine Herausforderung dar. Aufgrund technischer Möglichkeiten werden stabile Transfektionen in experimentellen Studien bislang meistens mit Zelllinien und nicht mit primären Zellen durchgeführt (Donato, Lahoz et al. 2008). Es wurden allerdings von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits erste Methoden entwickelt, mit denen auch primäre Zellen transfiziert werden können (Armeanu, Pelisek et al. 2000; Hamm, Krott et al. 2002) und die in Zukunft voraussichtlich im größeren Umfang zur Verfügung stehen werden (Gao, Kim et al. 2007).

Eine patientenfreundliche Applikationsform stellt die systemische Verabreichung der MSC dar, die in den Versuchen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die Injektion in eine der Schwanzvenen der Ratten ist dabei mit der intravenösen Verabreichung beim Patienten zu vergleichen. In bisherigen Versuchsreihen für die Gliomtherapie wurden MSC meist intrakraniell in die unmittelbare Umgebung des Hirntumors appliziert (Miletic, Fischer et al. 2007). Auch wenn durch diese Applikationsform eine große Anzahl der Zellen direkt zum Wirkungsort gebracht werden kann (Fox, Chamberlain et al. 2007), ist hierfür jeweils ein neurochirurgischer Eingriff notwendig, der weitere Komplikationen (Infektion, Blutung, Verletzung neuralen Gewebes, etc.) hervorrufen kann.

Die systemische Applikationsform erscheint daher als bessere Variante. MSC werden auch nach systemischer Applikation effektiv in den Tumor rekrutiert und darüber hinaus kann mit der Rekrutierung und anschließenden Differenzierung der MSC ein möglicherweise physiologischer Mechanismus nachempfunden werden.

Trotz aller ermutigenden Ergebnisse muss in Zukunft weiter berücksichtigt werden, dass die Langzeit-Komplikationsrate der Therapie mit MSC bisher noch nicht ausreichend beurteilt werden kann (Barry and Murphy 2004). Auch wenn nur ein kleiner Teil der applizierten MSC wirklich aktiv in Gewebe des menschlichen Körpers integriert wird, könnten Nebenwirkungen zu schwerwiegenden Konsequenzen für die Patienten führen (Fox, Chamberlain et al. 2007). So wird in Zukunft weiter verfolgt werden müssen, inwieweit MSC selbst ein tumorigenes Potenzial besitzen und das Auftreten von Zweitmalignomen begünstigen. Erste Berichte haben gezeigt (Dazzi and Horwood 2007), dass die langfristige Kultivierung von MSC *in vitro* die Mutationsrate deutlich erhöht und sie somit prinzipiell auch *in vivo* Tumorwachstum auslösen können (Tolar, Nauta et al. 2007). Zudem haben MSC einen immunsuppressiven Effekt, der langfristig über die geschwächte Immunabwehr die Entstehung von Zweitmalignomen begünstigen kann (Djouad, Plence et al. 2003).

Es wird daher in Zukunft von großer Bedeutung sein, dass solche potenziellen Komplikationen berücksichtigt und zum therapeutischen Nutzen ins Verhältnis gesetzt werden (Dazzi and Horwood 2007; Fox, Chamberlain et al. 2007).

4.4. Gefäßbiologie maligner Hirntumoren wird von Mechanismen der Lymphangiogenese beeinflusst

Obwohl das Gehirn zu einem der wenigen Organe des menschlichen Körpers zählt, das unter normalen Bedingungen kein Lymphgefäßsystem besitzt (Cursiefen, Chen et al. 2003; Johnston, Zakharov et al. 2004; Maruyama, Li et al. 2005), wurde in den Versuchen dieser Arbeit zur Charakterisierung der Gefäßstrukturen gezeigt, dass lymphatische Markerproteine in gefäßaktiven Arealen maligner Gliome exprimiert sind (Grau, Trillsch et al. 2007; Grau, Trillsch et al. 2008).

Die Expression von Podoplanin, Prox-1, LYVE-1, VEGFR-3, VEGF-C/-D, SLC und CCR7 kann sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen dem hochgradigen GBM (WHO-Grad IV), dem niedriggradigen diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) und dem Normalhirn (NNH) ergeben sich dabei allerdings nur für Podoplanin und VEGFR-3. Die Expression scheint für diese beiden Proteine mit dem Tumorgrad zu korrelieren und im Rahmen der Tumorprogression vom niedrig- zum hochgradigen Gliom eine Änderung des Phänotyps anzuzeigen. Auf Proteinebene wird eine endotheliale Expression für den Wachstumsfaktor VEGF-C und dessen Rezeptor VEGFR-3 (Grau, Trillsch et al. 2007), das Chemokin SLC, den Transkriptionsfaktor Prox-1 und ganz vereinzelt für das Oberflächenprotein LYVE-1, nachgewiesen. VEGF-D ist vorwiegend in angioaktiven Tumorarealen auf den umliegenden Tumorzellen zu finden (Grau, Trillsch et al. 2007).

Die Expression von Podoplanin zeigt sich sehr ausgeprägt auf den Tumorzellen, dagegen nicht auf den Endothelzellen der Tumorgefäße (Grau, Trillsch et al. 2008). Insgesamt ergeben sich auf Proteinebene eindeutige Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Tumorgraden für Podoplanin, VEGF-C, -D und VEGFR-3 (Grau, Trillsch et al. 2007).

Dieses, zum Teil charakteristische Expressionsmuster der lymphatischen Markerproteine deutet darauf hin, dass diese Proteine eine Bedeutung für die Gefäßentwicklung maligner Gliome haben. Allerdings ist die Expression nicht für alle Markerproteine eindeutig den Gefäßendothelien zuzuordnen, was gegen ein unabhängiges und funktionales Lymphgefäßsystem spricht. Dennoch scheinen einzelne Mechanismen und Teilaspekte der Lymphangiogenese einen Einfluss auf das Gefäßsystem und die Malignität der Hirntumore auszuüben. Ein genaues Verständnis dieser Mechanismen erscheint essenziell, um in Zukunft innovative therapeutische Strategien zu entwickeln. Die Gefäßbiologie des GBM muss vollständig verstanden werden, um die Angiogenese wirklich effektiv unterdrücken zu können und mögliche Komplikationen der Therapie zu vermeiden.

4.5. Rezeptor-Liganden-System VEGFR-3/VEGF-C,-D ist in malignen Hirntumoren aktiv exprimiert

Mit dem Nachweis des charakteristischen Expressionsmusters der Wachstumsfaktoren VEGF-C,-D und ihrem Rezeptor VEGFR-3 ist in dieser Arbeit ein vollständiges lymphatisches Wachstumsfaktoren-Signalsystem beschrieben worden, das mit dem abnormen Gefäßsystem des GBM assoziiert ist, dem im normalen Gehirn bislang aber keine Bedeutung zugeschrieben wurde (Grau, Trillsch et al. 2007).

Bislang wurde die Expression von VEGFR-3 vor allem mit Endothelzellen von Lymphgefäßen verschiedener humaner Gewebetypen in Verbindung gebracht (Ji 2005). Im Gegensatz dazu ist die Expression des Rezeptors auf den Zellen des hämatopoetischen Systems lediglich auf die Embryonalzeit beschränkt (Sleeman, Krishnan et al. 2001), kann allerdings im Rahmen von Tumorwachstum erneut aktiviert werden (Valtola, Salven et al. 1999). VEGFR-3 ist dann auf Endothelzellen von Tumorgefäßen exprimiert, während sich die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D auf den umgebenden Tumorzellen zeigt (Yonemura, Fushida et al. 2001; Stacker, Achen et al. 2002). Das Rezeptor-Liganden-System VEGFR-3/VEGF-C,-D wird deshalb mit der Tumorangio-genese in Verbindung gebracht und als ein wichtiger Faktor für die Metastasierung angesehen (Valtola, Salven et al. 1999; Mandriota, Jussila et al. 2001; Nakamura, Yasuoka et al. 2003).

Neuere Daten deuten darauf hin, dass diese Proteine zudem in Hirntumoren exprimiert werden. Debinski und Kollegen haben VEGF-D in Zelllinien maligner Gliome nachgewiesen und als potenzielles Onkogen vorgestellt (Debinski, Slagle-Webb et al. 2001). Eine verstärkte VEGF-D-Expression zeigte sich, nachdem die Expression des Wachstumsfaktors VEGF unterdrückt wurde (Moffat, Chen et al. 2006). Darüber hinaus wurde von Moffat et al. die Expression von VEGFR-3 in drei untersuchten GBM-Gewebe-proben beschrieben (Moffat, Chen et al. 2006). Zuletzt wurde zudem die Expression von VEGFR-3 und VEGF-C durch Jenny und Kollegen im GBM auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Jenny, Harrison et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation der VEGFR-3 und VEGF-C exprimierenden Zellen weiter spezifiziert (Grau, Trillsch et al. 2007). Im GBM zeigt sich immunhistochemisch die VEGFR-3-Expression endothelial lokalisiert auf nahezu allen Tumorgefäßen, dagegen nur auf wenigen umliegenden Tumorzellen. Die Expression von VEGF-C und -D findet sich vor allem auf Tumorzellen in Tumorarealen mit starker Gefäßneubildung. Besonders die, für das GBM charakteristischen, glomeroloiden Gefäßproliferate sind durchgehend positiv für VEGFR-3 und von VEGF-C und -D-positiven Tumorzellen umgeben (Grau, Trillsch et al. 2007).

Das Gewebe der diffusen Astrozytome (WHO-Grad II) zeigt dagegen eine schwache Reaktivität in der Immunhistochemie. Es finden sich nur einzelne VEGFR-3-positive Endothelzellen in wenigen Gefäßen der Tumoren und auch VEGF-C und -D sind lediglich auf ganz vereinzelt Zellen des diffusen Astrozytoms nachzuweisen, die nicht mit den Gefäßen des Tumors in Verbindung stehen (Grau, Trillsch et al. 2007).

Die Analyse auf mRNA-Ebene bestätigt die Ergebnisse von Jenny et al. (Jenny, Harrison et al. 2006) und zeigt für VEGFR-3 signifikante Expressionsunterschiede mit der höchsten Expression im GBM. Die Expressionswerte für VEGF-C und -D erreichen dagegen keine statistische Signifikanz. VEGF-D ist im GBM auf mRNA-Ebene sogar niedriger exprimiert als im diffusen Astrozytom und im Normalhirn (Grau, Trillsch et al. 2007), was im Widerspruch zu den Ergebnissen auf Proteinebene steht. Hierfür gibt es bislang noch keine Erklärung. Es erscheint aber möglich, dass posttranskriptionale oder posttranslationale Regulationsmechanismen dafür verantwortlich sind. Diese müssen in weiteren Untersuchungen mit dieser gezielten Fragestellung noch weiter identifiziert werden.

Der Nachweis des kompletten Rezeptor-Liganden-Systems VEGFR-3/VEGF-C,-D, die endotheliale Lokalisation der VEGFR-3-Expression sowie die Korrelation der Expressionswerte mit dem Tumorgrad lassen allerdings bereits jetzt eine funktionale Bedeutung von VEGFR-3 und seinen Liganden VEGF-C und -D im Rahmen des Tumorwachstums vermuten.

Für VEGFR-3 ist dabei die Eigenschaft, Gefäßentwicklung und endotheliale Proliferation zu induzieren, bereits gut charakterisiert (Cao, Linden et al. 1998; Kubo, Fujiwara et al. 2000; Dixelius, Makinen et al. 2003; Ji, Miura et al. 2004). VEGFR-3 unterstützt zusätzlich den klassischen Signalweg der Angiogenese über VEGFR-2 und kann die Phosphorylierung dieses Rezeptors induzieren (Dixelius, Makinen et al. 2003; Matsumura, Hirashima et al. 2003). Die Aktivierung von VEGFR-3 sollte daher als weiterer Signalweg der Tumorangio-genese berücksichtigt werden.

In der Vergangenheit wurde im Rahmen von Tumorthera-pieansätzen bereits in vielfacher Weise versucht, mit VEGFR-2 den angiogenen Rezeptor von VEGF zu blockieren und damit die Tumorangio-genese abzuschwächen (Jain 2001). Bei einem Gliom-Tumormodell in Mäusen wurde durch diese Therapie die Gefäßdichte deutlich reduziert und die Wirkung einer Strahlentherapie verstärkt (Tong, Boucher et al. 2004; Winkler, Kozin et al. 2004). Allerdings war dieser Effekt nur vorübergehend. Nach einem Zeitraum von einigen Tagen entwickelte sich in den behandelten Gliomen eine neue Form der Angiogenese, die trotz kontinuierlich fortgesetzter Therapie gegen VEGFR-2 nicht unterdrückt werden konnte (Winkler, Kozin et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eine mögliche Erklärung für diesen zweiten Schub der Gefäßneubildung ("second wave of angiogenesis"). Da mit der Blockierung des VEGFR-2-Signalwegs der Hauptmechanismus der Gefäßneubildung unterdrückt wird, werden möglicherweise alternative Signalwege aktiviert, die unter physiologischen Voraussetzungen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Das nachgewiesene Rezeptor-Liganden-System VEGFR-3/VEGF-C,-D könnte ein Beispiel hierfür darstellen. Es ist resistent gegenüber der ursprünglichen anti-VEGFR-2-Therapie und somit in der Lage, erneute Gefäßentwicklung zu vermitteln. Unterstützt wird diese Theorie durch Erkenntnisse von Moffat und Kollegen, die nach blockierter VEGF-Expression eine verstärkte Expression von VEGF-D beschrieben haben (Moffat, Chen et al. 2006).

Die regulatorischen Mechanismen hinter der Expression von VEGFR-3, VEGF-C und -D in Assoziation zu den Tumorgefäßen sind bislang noch weitgehend unbekannt (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). Versuche, bei denen der Zelltyp und die Herkunft dieser Zellen genauer analysiert wird, würden ein besseres Verständnis hierfür ermöglichen und sollten daher weiter verfolgt werden. Es erscheint allerdings bereits jetzt als äußerst sinnvoll, dass anti-angiogene Therapieansätze in Zukunft auch den alternativen Signalweg über VEGFR-3 berücksichtigen. Die kombinierte Blockade von VEGFR-2 und von VEGFR-3 könnte einen synergistischen Effekt erzielen, der eine längerfristige Unterdrückung des Gefäßwachstums im GBM ermöglicht und so bessere Überlebensraten garantiert.

4.6. Podoplanin-Expression in Astrozytomen korreliert mit dem Malignitätsgrad

Mit Expression des Oberflächenproteins Podoplanin in gefäßreichen Tumorarealen des GBM wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Markerprotein beschrieben, das seit der Erstbeschreibung im Jahr 1997 vornehmlich zur spezifischen Identifikation von Lymphgefäßen und zur Abgrenzung von Blutgefäßen im Rahmen der Lymphangiogenese verwendet worden ist. Die eigentliche biologische Funktion des Oberflächenproteins ist dabei über die gesamte Zeit weitgehend unklar geblieben und lange nicht gezielt untersucht worden (Schacht, Dadras et al. 2005).

Der Knockout von Podoplanin führt im Tierversuch während der Embryonalphase zu einer gestörten Entwicklung der Lunge sowie des lymphatischen Systems und ist für die Versuchstiere bereits pränatal letal (Ramirez, Millien et al. 2003; Schacht, Ramirez et al. 2003). In den vergangenen Jahren hat sich nun gezeigt, dass Podoplanin auch im Gewebe verschiedener humaner Neoplasien stark exprimiert ist. (Dumoff, Chu et al. 2005; Kato, Kaneko et al. 2005; Martin-Villar, Scholl et al. 2005; Schacht, Dadras et al. 2005;

Dumoff, Chu et al. 2006; Mishima, Kato et al. 2006; Ordonez 2006; Shibahara, Kashima et al. 2006; Wicki, Lehembre et al. 2006). Aufgrund der guten Korrelation von Expressionswerten mit klinischen Daten in manchen Tumorentitäten wird Podoplanin zudem eine Funktion im Rahmen der Tumorprogression zugeschrieben (Schacht, Dadras et al. 2005).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Expression von Podoplanin unterstützen diese Beobachtungen. Sie zeigen, dass die Podoplanin-Expression in Gliomen mit dem Malignitätsgrad des untersuchten Gewebes korreliert. Auf mRNA-Ebene liegen die Expressionswerte im Glioblastom signifikant höher als im diffusen Astrozytom und im Normalhirn. Immunhistochemisch ist das Oberflächenmolekül im Glioblastom fast im gesamten Tumorgewebe exprimiert. Dabei ist die Expression besonders stark in der Umgebung von Nekrosen und in Arealen mit hoher Gefäßdichte (Grau, Trillsch et al. 2008), auch wenn die Gefäße selbst negativ für Podoplanin sind.

Im deutlichen Gegensatz zum Glioblastom stellt sich das gesamte Tumorgewebe aller untersuchten diffusen Astrozytome negativ für Podoplanin dar.

Die genauen Regulationsmechanismen, die die Expression von Podoplanin und den anderen lymphatischen Marker kontrollieren, sind bislang noch weitgehend unbekannt (Adams and Alitalo 2007). In der Vergangenheit wurde vor allem dem Transkriptionsfaktor Prox-1 große Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines lymphatischen Systems zugeschrieben (Wigle and Oliver 1999). Die durch adenoviralen Gentransfer erzielte Überexpression von Prox-1 führt zu einer Expression Lymphgefäß-spezifischer Markerproteine wie VEGFR-3 und LYVE-1 und scheint somit die lymphatische Differenzierung von Endothelzellen einzuleiten (Wigle, Harvey et al. 2002).

Prox-1/Podoplanin-positive Zellen deuten auch im GBM auf einen regulatorischen Einfluss von Prox-1 auf das Expressionsmuster der Tumorzellen hin. In dieser Arbeit wurde durch eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gezeigt, dass im GBM Podoplanin-positive Tumorzellen zu finden sind, die gleichzeitig Prox-1 exprimieren (Grau, Trillsch et al. 2008).

Im Hinblick auf Podoplanin stimmen die Daten dieser Arbeit mit den Daten der Literatur (Mishima, Kato et al. 2006; Shibahara, Kashima et al. 2006) überein. In einer Untersuchung verschiedener ZNS-Tumoren hatten beide Arbeitsgruppen für die Astrozytome eine Assoziation des malignen Phänotyps mit der Intensität der Podoplanin-Expression vorgestellt. Shibara et al. stellten dabei allerdings den diagnostische Nutzen dieses Expressionsmusters in Frage, da sich Podoplanin auch in vielen anderen Hirntumorentitäten exprimiert zeigte (Shibahara, Kashima et al. 2006). Dagegen unterstützen die Ergebnisse von Mishima et al. sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. (Mishima, Kato et al. 2006).

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte im Rahmen dieser Arbeit das gegensätzliche Expressionsmuster von Podoplanin herausgearbeitet werden. Während alle Gewebeschnitte des GBM eine starke Anfärbung zeigen, sind alle untersuchten diffusen Astrozytome negativ für Podoplanin. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass es im Rahmen der Tumorprogression zum Übergang von niedriggradigen zu hochgradigen Hirntumoren kommt (Hulleman and Helin 2005), was die Abgrenzung der verschiedenen Tumorentitäten häufig erschwert. Zusätzliche immunhistochemische Marker könnten daher die Diagnostik erleichtern und absichern (Yip, lafrate et al. 2008).

Das gegensätzliche Expressionsmuster von Podoplanin scheint diesen Anforderungen zu entsprechen, so dass Podoplanin einen potenziellen Marker für die Diagnostik des GBM darstellt. Darüber hinaus könnte das Expressionsprofil auch im Rahmen der präoperativen Therapieplanung durch anti-Podoplanin-Antikörper genutzt werden. Nach Kopplung dieser Antikörper mit Tracermolekülen, könnte das Glioblastom im MRT oder im PET-Scan durch Detektion von Podoplanin-positiven Tumorzellen aufgesucht werden.

Auch im Rahmen neuer Therapiestrategien erscheint Podoplanin ein interessantes Zielmolekül zu sein. Hierbei könnte die Expression von Podoplanin dem Auffinden des Glioblastoms dienen, um daraufhin das Tumorgewebe selektiv zu schädigen (Hammer, Meyer et al. 2005). Das Expressionsprofil von Podoplanin ermöglicht somit vielfältige Möglichkeiten der Nutzung, die zu einer effizienteren Therapieplanung und Therapiedurchführung führen kann und daher weiterverfolgt werden wird.

4.7. Lymphatischer Phänotyp der Tumorgefäße des anaplastischen Oligodendroglioms

Nachdem Podoplanin in den Astrozytomen ein charakteristisches Expressionsmuster gezeigt hat, wurde zur Abgrenzung vom GBM auch das anaplastische Oligodendrogliom (AO) immunhistochemisch untersucht. Obwohl dieses Gliom zu den WHO-Grad III-Hirntumoren zählt, zeigt es charakteristische histopathologische Merkmale, die dem GBM sehr ähnlich sind (Louis, Holland et al. 2001). Das AO hat ebenfalls eine erhöhte Zelldichte, eine starke Zellpolymorphie und weist neben vereinzelt Einzelzellnekrosen eine deutlich erhöhte Gefäßdichte auf (Engelhard, Stelea et al. 2002). Es hat allerdings für die Patienten im Vergleich zum GBM eine deutlich bessere Prognose (Baehring 2005). Ein Teil der Tumoren zeigt eine deutliche Progredienz in Richtung des GBM, was dann eine Verschlechterung der Prognose zur Folge hat (Tatter 2002).

In der immunhistochemischen Untersuchung des AO zeigt sich für die lymphatischen Markerproteine Podoplanin und VEGFR-3 im Rahmen dieser Untersuchung ein auffälliges Expressionsmuster. Während sich die Expression von VEGFR-3 unverändert zum GBM

auf Gefäßendothelien und umgebenden Tumorzellen zeigt, ist im AO auch die Expression von Podoplanin endothelial lokalisiert. VEGFR-3 und Podoplanin sind auf dem Gefäßendothel dieser Gefäße eindeutig co-lokalisiert, was dem molekularen Expressionsprofil eines lymphatischen Phänotyps entspricht (Grau, Trillsch et al. 2008). Die intraluminal aggregierten Thrombozyten in diesen Tumorgefäßen können als indirekte Bestätigung für die endotheliale Lokalisation der Podoplanin-Expression gesehen werden, da die Thrombozyten-Aggregation eine bekannte Funktion von Podoplanin ist (Kato, Fujita et al. 2003), mündliche Kommunikation mit Prof. D. Kerjaschki, Klinisches Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Wien).

Die unterschiedliche Lokalisation Podoplanin-positiver Zellen im GBM und im anaplastischen Oligodendrogliom unterstützt die Theorie, dass es im Rahmen des Tumorwachstums und der Tumorangio-genese zu starken Veränderungen des Zellverbundes kommt (Stiver 2004).

Der Begriff des "vaskulären Mimikry" wurde dabei das erste Mal im Jahr 1999 vorgestellt (Maniotis, Folberg et al. 1999). Demnach sind maligne Tumoren unter speziellen Bedingungen in der Lage, unabhängig von Mechanismen der Angiogenese selbst zur Gefäßneubildung des Tumorgewebes beizutragen, indem sich Tumorzellen in Zellen mit endotheliale-m Phänotyp differenzieren (Hillen and Griffioen 2007). Aus den Tumorzellen entsteht so ein zusätzliches Gefäßsystem, das ebenfalls im Rahmen anti-angiogener Therapieansätze berücksichtigt werden sollte. Besonders interessant sind diese Beobachtungen vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion, ob möglicherweise die Transformation von Tumorstammzellen zur Entstehung des GBM beiträgt (Quigley, Post et al. 2007). Der Entstehungsmechanismus des GBM war bereits früh mit der chronisch myeloischen Leukämie verglichen worden, die infolge der Umprogrammierung von myeloischen Vorläuferzellen entsteht (Nakano and Kornblum 2006). Diese Hypothese wurde durch mehrere Studien gestützt, in denen gezeigt wurde, dass pluripotente neurale Vorläuferzellen sowohl subventrikulär im gesunden Hirn als auch im GBM nachzuweisen sind (O'Neill, Blondal et al. 2002; Recht, Jang et al. 2003; Yuan, Curtin et al. 2004; Pilkington 2005). Es erscheint demnach möglich, dass Astrozytome allgemein und das GBM im Speziellen als Neoplasien neuraler Vorläuferzellen anzusehen sind (Quigley, Post et al. 2007). Dabei können sich die transformierten Tumorstammzellen differenzieren und die Charakteristika verschiedener Zelltypen annehmen (Noble and Dietrich 2004). Die Theorie könnte zudem die Tatsache erklären, dass Hirntumoren regelmäßig eine Progredienz zu höher malignen Tumorformen zeigen und dass es auch Mischformen der Hirntumoren gibt, die eine Abgrenzung der verschiedenen Tumorentitäten erschweren. Eine diffuse Verteilung von Tumorstammzellen im angrenzenden Tumorgewebe könnte

zudem eine Erklärung für die hohe Rezidivrate der malignen Hirntumoren liefern (Quigley, Post et al. 2007).

Vor diesem Hintergrund könnte auch das gegensätzliche Expressionsmuster des Podoplanin erklärt werden (Grau, Trillsch et al. 2008). Tumorstammzellen würden sich demnach in verschiedene Tumorzelltypen differenzieren, unter anderem in die Podoplanin-positiven Tumorzellen des GBM und die Podoplanin-positiven Endothelzellen des AO. Die Differenzierung in die endothelialen Zellen könnte dabei als Hinweis auf die Theorie des „vaskulären Mimikries“ angesehen werden, bei dem ein Teil des Gefäßsystems des Tumors aus differenzierten Tumorzellen entsteht. Die Bestätigung dieser Vorgänge stellt eine Herausforderung dar, die in Zukunft in weiteren Studien spezifisch untersucht werden muss. Sie hätte große Bedeutung für die Gefäßbiologie der malignen Hirntumoren und müsste bei Diagnostik und Therapie berücksichtigt werden.

4.8. Strategien zur Untersuchung der noch ungeklärten Funktion des Podoplanins in Hirntumoren

Wie sich in dieser Arbeit herausgestellt hat, kann Podoplanin nicht nur in der Gefäßbiologie zur Abgrenzung von Lymphgefäßen genutzt werden, sondern ist auch in zahlreichen humanen Tumorentitäten exprimiert (Wicki, Lehembre et al. 2006; Grau, Trillsch et al. 2008). Daher konzentriert sich das Interesse der Forschung mehr und mehr auf die Funktion dieses Proteins. Neben der essenziellen Bedeutung für die Embryonalentwicklung (Ramirez, Millien et al. 2003; Schacht, Ramirez et al. 2003) gibt es Hinweise darauf, dass Podoplanin auch an der Karzinogenese beteiligt ist (Nose, Saito et al. 1990; Gandarillas, Scholl et al. 1997).

Für das Mammakarzinom hat sich in Untersuchungen von Wicki und Kollegen bereits gezeigt, dass Podoplanin eine mögliche Funktion im Rahmen der Invasion dieses Tumors ausübt (Wicki, Lehembre et al. 2006). Die transgene Expression von Podoplanin in einem Modell für Pankreas- β -Zell-Karzinogenese (Rip1Tag2-Mäusen) führt *in vivo* zu einem unkontrollierten und stark invasiven Tumorwachstum, losgelöst vom üblichen Wachstumsmuster (Wicki, Lehembre et al. 2006). *In vitro*-Studien mit Keratinozyten, Nierenzellen und einer Mammakarzinom-Zelllinie nach Transfektion mit einem Podoplanin-Überexpressionsvektor konnten aufzeigen, dass die forcierte Podoplanin-Expression zu Veränderungen der Zellmorphologie führt (Scholl, Gamallo et al. 1999; Martin-Villar, Scholl et al. 2005; Wicki, Lehembre et al. 2006). Unter anderem bilden die Zellen Membranprotrusionen, die Filopodien ähneln. Diese Veränderungen des Zellskeletts deuten auf eine vermehrte Mobilität der Podoplanin-positiven Zellen hin (Wicki, Lehembre et al. 2006).

Darüber hinaus zeigte sich in histopathologischen Untersuchungen, dass in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen (Ösophagus, Haut, Larynx, Lunge, Zervix) sowie im Mammakarzinom die Podoplanin-Expression vorwiegend im Bereich der Invasionszone des Tumors nachzuweisen ist (Wicki, Lehembre et al. 2006). Auch wenn dieses streng fokussierte Expressionsmuster in dieser Arbeit im GBM und bei Untersuchungen von Prostata-, Kolon-, und Adenokarzinomen (Wicki, Lehembre et al. 2006) nicht gesehen wurde, unterstreicht es doch eine mögliche Beteiligung von Podoplanin an der Invasion der Tumorzellen.

Podoplanin kann zudem die Aggregation von Thrombozyten begünstigen (Kato, Fujita et al. 2003). Tumorzell-induzierte Thrombozyten-Aggregation gilt dabei als einer der Mechanismen, mit denen sich Tumorzellen während der Metastasierung im Blutkreislauf gegen die Immunabwehr schützen (Kunita, Kashima et al. 2007). Kunita und Kollegen konnten in Versuchen mit Hamster-Ovarialzellen nachweisen, dass Punktmutationen in bestimmten Regionen der Podoplanin-Sequenz die Thrombozyten-aggregierende Funktion unterdrücken und gleichzeitig das Ausmaß der pulmonalen Metastasierung reduzieren. Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, dass die Metastasierungsrate auch durch Administration von Aspirin supprimiert werden kann (Kunita, Kashima et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur weiterführenden Untersuchung der Podoplanin-Funktion zwei Glioblastom-Zelllinien etabliert, die Podoplanin konstitutiv exprimieren. Hierzu ist ein Podoplanin-Überexpressionsvektor entwickelt worden, der durch stabile Transfektion in das Genom der Zelllinien U87 und U373 integriert wurde.

Durch die erfolgreiche stabile Transfektion stehen nun auf der einen Seite Podoplanin-positive Glioblastomzellen (U373-Podoplanin) zur Verfügung, die mit den Podoplanin-negativen Glioblastomzellen (U373) verglichen werden können. Auf der anderen Seite kann das Verhalten schwach Podoplanin-positiver Glioblastomzellen (U87), im Vergleich zu Zellen mit gesteigerter Podoplanin-Expression (U87-Podoplanin) untersucht werden. All diese Zelllinien haben unter Zellkultur-Bedingungen ein reproduzierbares und stabiles Wachstums- und Expressionsverhalten gezeigt.

In Planung sind Invasions- und Proliferationsversuche, die den Einfluss der Podoplanin-Expression auf das Migrationsverhalten und Wachstum der Glioblastomzellen zeigen sollen. In Tubuli-Bildungsversuchen soll analysiert werden, ob die Co-Kultur von Endothelzellen mit Podoplanin-positiven Glioblastomzellen die Bildung endothelähnlicher Strukturen fördert. Im Tiermodell wird das Wachstumsverhalten der Hirntumoren unter *in vivo*-Bedingungen weiter evaluiert. Hierbei kann das Tumolvolumen sowohl während der Testreihe mithilfe der Kernspintomographie verfolgt werden als auch im Anschluss im Rahmen der pathologischen Aufarbeitung. Zusätzliche Informationen wird die

histopathologische Untersuchung liefern, bei der auf strukturelle Veränderungen des Tumorgewebes eingegangen werden kann.

Diese geplanten Versuche mit den Podoplanin-positiven GBM-Zelllinien werden weitere Einblicke in diese Mechanismen des Tumorwachstums geben und dazu beitragen, den Einfluss von Podoplanin auf die Tumorprogression des GBM weiter zu erforschen.

4.9. Ausblick

Bis vor kurzem wurden Tumoren als einheitliche Zellmasse angesehen, die im Gegensatz zu normalen Organen keine Organisation des Gewebes aufweisen (Wicki and Christofori 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MSC an der Gefäßneubildung von Hirntumoren aktiv beteiligt sind und dass neben den klassischen Mechanismen der Hämangiogenese auch Mechanismen der Lymphangiogenese im Rahmen des Tumorwachstums eine Rolle zu spielen scheinen.

Die Bestätigung der aktiven Funktion mesenchymaler Stammzellen am Aufbau neu entstehender Tumorgefäße eröffnet vielfältige Möglichkeiten für innovative therapeutische Ansätze. In den Versuchen dieser Arbeit wurde eine stabil transfizierte MSC-Linie entwickelt, mit der nach Anwendung eines ausgearbeiteten Therapieschemas eine direkte und gezielte anti-neoplastische Wirkung auf das Hirntumorgewebe ausgeübt werden kann.

Zudem wurde der Nachweis erbracht, dass sowohl das Rezeptor-Liganden-System VEGFR-3/VEGF-C,-D als auch das Oberflächenprotein Podoplanin in Hirntumoren exprimiert ist, deren Expression bislang vor allem dem lymphatischen Gefäßsystem zugeschrieben wurde. Die Expression korreliert dabei mit dem Malignitätsgrad der Hirntumoren. Dieses charakteristische Expressionsmuster kann potenziell die histopathologische Abgrenzung der einzelnen Tumorentitäten unterstützen. Durch besseres Verständnis des Expressionsverhaltens und der Funktion dieser Moleküle im Hirntumorgewebe können nicht nur bereits bestehende Therapieansätze verbessert, sondern auch neue, gezielte Therapiestrategien entwickelt werden.

Das gegensätzliche Expressionsmuster von Podoplanin unterstützt darüber hinaus die Theorie, dass Tumorstammzellen an der Entstehung von Hirntumoren beteiligt sind und dass Tumorzellen möglicherweise selbst im Rahmen eines "vaskulären Mimikries" zur Gefäßentwicklung beitragen. Es wurde ein Zellmodell etabliert, mit dem die noch ungeklärte Funktion des Podoplanins im GBM weiter analysiert werden kann.

Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis für die Gefäßbiologie maligner Hirntumore und ermöglichen somit neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie dieser schwer zu behandelnden Tumoren.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM, WHO-Grad IV) ist ein äußerst aggressiver und stark vaskularisierter Tumor. Trotz multimodaler Therapiekonzepte mit chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie haben die betroffenen Patienten eine schlechte Prognose von lediglich 9 bis 15 Monaten Überlebenszeit nach Diagnosestellung. Innovative Therapiekonzepte sind daher dringend erforderlich. Im Fokus dieser Arbeit stand das abnorme Gefäßsystem maligner Hirntumoren. Aufbauend auf einem besseren Verständnis der Gefäßbiologie dieser Tumoren wurden potenzielle Strategien für Diagnostik und Therapie entwickelt und evaluiert.

Progenitorzellen aus dem Knochenmark sind in vielfacher Weise an der Neoangiogenese von Tumorgefäßen beteiligt. Immundefizienten Ratten wurden in dieser Arbeit primäre humane MSC systemisch appliziert, nachdem den Tieren zuvor ein humanes Gliom implantiert worden war. Die Rekrutierung der MSC in den Tumor wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Die endotheliale Differenzierung der MSC konnte mit gentechnisch modifizierten MSC-Linien bestätigt werden. Diese Zellen enthielten einen Vektor mit dem Reportergen RFP (red fluorescent protein), dessen Expression unter der Kontrolle des endothelspezifischen Tie2-Promotor/Enhancer-Konstruktes steht. Darauf aufbauend wurde eine MSC-Linie etabliert, bei der statt des Reportergens RFP das Selbstmordgen HSV-TK unter der Kontrolle des Tie2-Promoters steht. Die Hypothese hierzu ist, dass nach systemischer Verabreichung dieser MSC durch Zugabe von Ganciclovir eine selektive Toxizität auf den Tumor bewirkt wird.

Zur genaueren Charakterisierung der Gefäßstrukturen in Hirntumoren wurde die Expression Lymphgefäß-assoziiertes Moleküle in Gewebe unterschiedlicher Gliome untersucht. Die lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C,-D und ihr Rezeptor VEGFR-3 zeigten im GBM hohe Expressionswerte. Die Expression von VEGFR-3 unterschied sich signifikant von der in niedriggradigen Astrozytomen (WHO-Grad II). Podoplanin war in allen Gewebeproben des GBM sehr hoch exprimiert, in einigen Zellen zeigte sich eine Co-Lokalisation mit Prox-1. Die Expression war allerdings nicht gefäßassoziiert, sondern ausschließlich auf den Tumorzellen zu finden. Eine streng endotheliale Lokalisation zeigte sich dagegen im anaplastischen Oligodendrogliom (WHO-Grad III), in dem Podoplanin mit VEGFR-3 co-exprimiert ist. Durchgehend negativ für Podoplanin waren alle untersuchten Astrozytome (WHO-Grad II). Für weiterführende Untersuchungen zur Funktion von Podoplanin wurden zwei GBM-Zelllinien etabliert, die einen Podoplanin-Überexpressionsvektor stabil exprimieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die zentrale Bedeutung des Gefäßsystems für das GBM. Es wurde gezeigt, dass MSC effektiv aus der Peripherie in den Hirntumor rekrutiert werden und dort aktiv an der Angiogenese beteiligt sind. MSC eignen sich somit, nach genetischer Modifikation, als Vehikel für therapeutisch wirksame Gene, mit denen das neu entstehende Gefäßsystem des GBM gezielt angegriffen werden kann. Für die entsprechenden *in vivo*-Versuche wurde bereits eine gentechnisch modifizierte MSC-Linie entwickelt und ein Therapieschema entworfen.

Obwohl das Gehirn unter normalen Bedingungen kein Lymphgefäßsystem besitzt, wurden im Gewebe der malignen Hirntumoren in dieser Arbeit auch Lymphgefäß-assoziierte Moleküle nachgewiesen. Die Expression des Rezeptor-Liganden-Systems VEGFR-3/VEGF-C,-D korreliert dabei mit dem Malignitätsgrad der Hirntumoren. Das gegensätzliche Expressionsmuster von Podoplanin könnte ein diagnostisches Kriterium darstellen, um Hirntumore mit unterschiedlichem Malignitätsgrad histopathologisch voneinander zu unterscheiden oder es könnte eine potenzielle Zielstruktur für neue Therapieansätze darstellen. Mit den etablierten GBM-Zelllinien steht ein Zellmodell zur weiteren Analyse der noch ungeklärten Funktion des Podoplanins im GBM zur Verfügung.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prof. Rudolf Virchow	4
Abb. 2: Prof. Harvey Cushing.....	5
Abb. 3: Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen.....	16
Abb. 4: Gennerelles Prinzip für den Einsatz von genmodifizierten Stammzellen als Vehikel für therapeutische Vektoren.....	20
Abb. 5: Schematische Darstellung der Realtime-TaqMan® RT-PCR.....	45
Abb. 6: Darstellung der Expressionswerte durch das Programm ABI Prism.....	48
Abb. 7: Vektor pCMV/Bsd-Tie2-RFP.....	56
Abb. 8: Vektor pCMV/Bsd-Tie2-TK.....	56
Abb. 9: Podoplanin-Überexpressionsvektor pcDNA3-Podoplanin.....	57
Abb. 10: Vorschlag eines Therapieschemas für die Applikation von Ganciclovir.....	64
Abb. 11: Wachstum des U373-GFP-Glioms im Rattenhirn.....	68
Abb. 12: Selektiver Nachweis primärer MSC im U373-Gliom.....	68
Abb. 13: Primäre MSC im Endothel einzelner Tumorgefäße.....	69
Abb. 14: Chemokine sind im Gewebe von Gliomen auf mRNA-Ebene nachweisbar.....	71
Abb. 15: Integration von MSC in Gefäße des implantierten Glioms.....	73
Abb. 16: Marker der Lymphangiogenese sind in Gliomen auf mRNA-Ebene exprimiert.....	76
Abb. 17: Sehr starke Podoplanin-Expression im Glioblastom im Vergleich zum diffusen Astrozytom.	77
Abb. 18: Vereinzelte Prox-1-Expression in Gliomen.....	78
Abb. 19: Co-Expression von Podoplanin und Prox-1 im Glioblastom.....	79
Abb. 20: Ganz vereinzelte LYVE-1-Expression in Gliomen.....	81
Abb. 21: VEGFR-3-Expression in Gliomen unterscheidet sich statistisch signifikant voneinander.....	83
Abb. 22: VEGF-C ist sowohl in hoch- als auch in niedriggradigen Gliomen exprimiert.....	84
Abb. 23: VEGF-D mit deutlicher Expression in Gliomen.....	85
Abb. 24: Signifikant erhöhte CCL19-Expression im Glioblastom auf mRNA-Ebene.....	86
Abb. 25: Endotheliale CCL21-Expression im Glioblastom.....	87
Abb. 26: Perivaskuläre CCR7-Expression im Glioblastom.....	87
Abb. 27: VEGFR-3-Expression im anaplastischen Oligodendrogliom auf Tumor- und Endothelzellen.....	89
Abb. 28: Endothelial lokalisierte Podoplanin-Expression im anaplastischen Oligodendrogliom.....	90
Abb. 29: Co-Expression von VEGFR-3 und Podoplanin im anaplastischen Oligodendrogliom.....	91
Abb. 30: Schwache Podoplanin-Expression der Glioblastom-Zelllinie U87.....	92
Abb. 31: Keine Podoplanin-Expression der Glioblastom-Zelllinie U373.....	92
Abb. 32: FACS-Analyse mit verstärkter Podoplanin-Expression der U87-Zellen nach der stabilen Transfektion.....	93
Abb. 33: FACS-Analyse mit Podoplanin-Expression der transfizierten U373-Zellen nach der stabilen Transfektion.....	93

Abb. 34: Verstärkte Podoplanin-Expression der U87-Zellen auf mRNA-Ebene nach der stabilen Transfektion.	94
Abb. 35: Podoplanin-Expression der U373-Zellen auf mRNA-Ebene nach der stabilen Transfektion.	94

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation, Morphologie und Epidemiologie der Astrozytären Tumoren WHO-Grad II-IV (Norden and Wen 2006)	8
Tab. 2: Tabellarische Zusammenstellung charakteristischer Oberflächenmoleküle auf MSC.	14
Tab. 3: Tabellarische Zusammenstellung von Beispielen der klinischen Therapie mit MSC.	19
Tab. 4: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelltypen.....	32
Tab. 5: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (Primer und Sonden).	37
Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid/Sonden-Gemische (AoD, PDAR).....	38
Tab. 7: Primärantikörper.....	39
Tab. 8: Sekundärantikörper.....	40
Tab. 9: Zusammensetzung der Reaktionslösung für die reverse Transkription.	46
Tab. 10: Zusammensetzung der Gebrauchslösung für die Realtime-RT-PCR mit bereits gebrauchsfertigen Oligonukleotid-/Sondengemischen.....	47
Tab. 11: Zusammensetzung der Gebrauchslösung für die RT-PCR ohne kommerzielles Oligonukleotid-/Sondengemisch.....	47
Tab. 12: Zusammensetzung der Ansätze für die Realtime-TaqMan® RT-PCR.	48
Tab. 13: Während der Analyse verwendete Einstellungen des Taqman® 7000.	48
Tab. 14: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit transfizierten Zelllinien.....	57
Tab. 15: Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte (1-3) und geplante (4-5) Tierversuchsstudien. ...	62
Tab. 16: Zeitschema für die Applikation der MSC.....	63
Tab. 17: Tabellarische Darstellung der auf MSC exprimierten Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden.....	70
Tab. 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aller immunhistochemischen Untersuchungen des Kapitels 3.2.1.	88

8. Literaturverzeichnis

- Abdallah, B. M. and M. Kassem (2008). "Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications." Gene Ther **15**(2): 109-16.
- Aboody, K. S., A. Brown, et al. (2000). "Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12846-51.
- Adams, R. H. and K. Alitalo (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 464-78.
- Al-Rawi, M. A., R. E. Mansel, et al. (2005). "Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis." Eur J Surg Oncol **31**(2): 117-21.
- Arap, W. and R. Pasqualini (2004). "Engineered embryonic endothelial progenitor cells as therapeutic Trojan horses." Cancer Cell **5**(5): 406-8.
- Armeanu, S., J. Pelisek, et al. (2000). "Optimization of nonviral gene transfer of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo." Mol Ther **1**(4): 366-75.
- Arthur, A., A. Zannettino, et al. (2009). "The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair." J Cell Physiol **218**(2): 237-45.
- Baddoo, M., K. Hill, et al. (2003). "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection." J Cell Biochem **89**(6): 1235-49.
- Baehring, J. M. (2005). "An update on oligodendroglial neoplasms." Curr Opin Neurol **18**(6): 639-44.
- Bailey, A. S., H. Willenbring, et al. (2006). "Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13156-61.
- Baldwin, M. E., M. M. Halford, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system." Mol Cell Biol **25**(6): 2441-9.
- Banerji, S., J. Ni, et al. (1999). "LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan." J Cell Biol **144**(4): 789-801.
- Barba, D., J. Hardin, et al. (1994). "Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4348-52.
- Barry, F., R. E. Boynton, et al. (2001). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components." Exp Cell Res **268**(2): 189-200.
- Barry, F. P. and J. M. Murphy (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 568-84.
- Beasley, N. J., R. Prevo, et al. (2002). "Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer." Cancer Res **62**(5): 1315-20.

- Becker, N. and J. Wahrendorf (1997). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, Springer.
- Benedetti, S., B. Pirola, et al. (2000). "Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells." Nat Med **6**(4): 447-50.
- Birnbaum, T., J. Roider, et al. (2007). "Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines." J Neurooncol **83**(3): 241-7.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer **1**(1): 46-54.
- Bobis, S., D. Jarocha, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." Folia Histochem Cytobiol **44**(4): 215-30.
- Breiteneder-Geleff, S., K. Matsui, et al. (1997). "Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis." Am J Pathol **151**(4): 1141-52.
- Breiteneder-Geleff, S., A. Soleiman, et al. (1999). "Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium." Am J Pathol **154**(2): 385-94.
- Brower, V. (2005). "Search and destroy: recent research exploits adult stem cells' attraction to cancer." J Natl Cancer Inst **97**(6): 414-6.
- Bruder, S. P., K. H. Kraus, et al. (1998). "The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects." J Bone Joint Surg Am **80**(7): 985-96.
- Bruder, S. P., A. A. Kurth, et al. (1998). "Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells." J Orthop Res **16**(2): 155-62.
- Burger, P. C., E. R. Heinz, et al. (1988). "Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme." J Neurosurg **68**(5): 698-704.
- Burton, E. C. and M. D. Prados (2000). "Malignant gliomas." Curr Treat Options Oncol **1**(5): 459-68.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-402.
- Cao, Y., P. Linden, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14389-94.
- Caplan, A. I., M. Elyaderani, et al. (1997). "Principles of cartilage repair and regeneration." Clin Orthop Relat Res(342): 254-69.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-49.
- Chamberlain, J. R., U. Schwarze, et al. (2004). "Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta." Science **303**(5661): 1198-201.

- Chamberlain, M. C. (2006). "Treatment options for glioblastoma." Neurosurg Focus **20**(4): E2.
- Chen, S. H., H. D. Shine, et al. (1994). "Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3054-7.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, et al. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Conrad, C., H. Niess, et al. (2009). "Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo." Circulation **119**(2): 281-9.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-7.
- Culver, K. W., Z. Ram, et al. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors." Science **256**(5063): 1550-2.
- Cursiefen, C., L. Chen, et al. (2003). "Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology." Cornea **22**(3): 273-81.
- Cushing, H. (1932). Intracranial tumours; notes upon a series of two thousand verified cases with surgical-mortality percentages pertaining thereto. Springfield, Ill., Baltimore, Md., C. C. Thomas.
- Dadras, S. S., T. Paul, et al. (2003). "Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival." Am J Pathol **162**(6): 1951-60.
- Davani, S., A. Marandin, et al. (2003). "Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model." Circulation **108 Suppl 1**: II253-8.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell **87**(7): 1161-9.
- Dazzi, F. and N. J. Horwood (2007). "Potential of mesenchymal stem cell therapy." Curr Opin Oncol **19**(6): 650-5.
- De Palma, M., M. A. Venneri, et al. (2005). "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." Cancer Cell **8**(3): 211-26.
- Debinski, W., B. Slagle-Webb, et al. (2001). "VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme." Mol Med **7**(9): 598-608.
- Deng, W., M. Obrocka, et al. (2001). "In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP." Biochem Biophys Res Commun **282**(1): 148-52.
- Dennis, J. E. and P. Charbord (2002). "Origin and differentiation of human and murine stroma." Stem Cells **20**(3): 205-14.

- Dennis, J. E., A. Merriam, et al. (1999). "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse." J Bone Miner Res **14**(5): 700-9.
- Devine, S. M. (2002). "Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic?" J Cell Biochem Suppl **38**: 73-9.
- Digirolamo, C. M., D. Stokes, et al. (1999). "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate." Br J Haematol **107**(2): 275-81.
- Dixelius, J., T. Makinen, et al. (2003). "Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites." J Biol Chem **278**(42): 40973-9.
- Djouad, F., P. Ponce, et al. (2003). "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals." Blood **102**(10): 3837-44.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-7.
- Donato, M. T., A. Lahoz, et al. (2008). "Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies." Curr Drug Metab **9**(1): 1-11.
- Dumoff, K. L., C. Chu, et al. (2005). "Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix." Mod Pathol **18**(1): 97-104.
- Dumoff, K. L., C. S. Chu, et al. (2006). "Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation." Mod Pathol **19**(5): 708-16.
- Dumont, D. J., G. H. Fong, et al. (1995). "Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development." Dev Dyn **203**(1): 80-92.
- Dumont, D. J., T. P. Yamaguchi, et al. (1992). "tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors." Oncogene **7**(8): 1471-80.
- Ehteshami, M., P. Kabos, et al. (2002). "Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Cancer Res **62**(24): 7170-4.
- Ehteshami, M., P. Kabos, et al. (2002). "The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma." Cancer Res **62**(20): 5657-63.
- Ehteshami, M., C. B. Stevenson, et al. (2005). "Stem cell therapies for malignant glioma." Neurosurg Focus **19**(3): E5.
- Ekstrand, A. J., C. D. James, et al. (1991). "Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo." Cancer Res **51**(8): 2164-72.

- Engelhard, H. H., A. Stelea, et al. (2002). "Oligodendroglioma: pathology and molecular biology." Surg Neurol **58**(2): 111-7; discussion 117.
- Engelhard, H. H., A. Stelea, et al. (2003). "Oligodendroglioma and anaplastic oligodendroglioma: clinical features, treatment, and prognosis." Surg Neurol **60**(5): 443-56.
- Enholm, B., T. Karpanen, et al. (2001). "Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin." Circ Res **88**(6): 623-9.
- Fadel, B. M., S. C. Boutet, et al. (1998). "Functional analysis of the endothelial cell-specific Tie2/Tek promoter identifies unique protein-binding elements." Biochem J **330** (Pt 1): 335-43.
- Ferguson, S. and M. S. Lesniak (2005). "Percival Bailey and the classification of brain tumors." Neurosurg Focus **18**(4): e7.
- Ferrara, N. (2000). "Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis." Recent Prog Horm Res **55**: 15-35; discussion 35-6.
- Fischer, I., J. P. Gagner, et al. (2005). "Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology." Brain Pathol **15**(4): 297-310.
- Foerster, O. (1934). "Über die Bedeutung und Reichweite des Lokalisationsprinzips im Nervensystem." Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **46**: 117-211.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz, et al. (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-71.
- Fouillard, L., M. Bensidhoum, et al. (2003). "Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma." Leukemia **17**(2): 474-6.
- Fox, J. M., G. Chamberlain, et al. (2007). "Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking." Br J Haematol **137**(6): 491-502.
- Frelin, C., A. Ladoux, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis." Ann Endocrinol (Paris) **61**(1): 70-4.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-74.
- Furuya, M., M. Nishiyama, et al. (2005). "Pathophysiology of tumor neovascularization." Vasc Health Risk Manag **1**(4): 277-90.
- Gandarillas, A., F. G. Scholl, et al. (1997). "Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis." Mol Carcinog **20**(1): 10-8.

- Gang, E. J., J. A. Jeong, et al. (2006). "In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells." Cytotherapy **8**(3): 215-27.
- Ganss, R. (2006). "Tumor stroma fosters neovascularization by recruitment of progenitor cells into the tumor bed." J Cell Mol Med **10**(4): 857-65.
- Gao, X., K. S. Kim, et al. (2007). "Nonviral gene delivery: what we know and what is next." AAPS J **9**(1): E92-104.
- Giese, A. and M. Westphal (2001). "Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection." J Cancer Res Clin Oncol **127**(4): 217-25.
- Gilles, F. H. (1985). "Classifications of childhood brain tumors." Cancer **56**(7 Suppl): 1850-7.
- Gojo, S., N. Gojo, et al. (2003). "In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells." Exp Cell Res **288**(1): 51-9.
- Goldbrunner, R. H., J. J. Bernstein, et al. (1999). "Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms." J Neurosci Res **55**(4): 486-95.
- Goldbrunner, R. H., S. Wagner, et al. (2000). "Models for assessment of angiogenesis in gliomas." J Neurooncol **50**(1-2): 53-62.
- Grau, S. J., F. Trillsch, et al. (2007). "Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade." J Neurooncol **82**(2): 141-50.
- Grau, S. J., F. Trillsch, et al. (2008). "Lymphatic Phenotype of Tumor Vessels in Brain Tumors." Microvascular Research.
- Grau, S. J., F. Trillsch, et al. (2008). "Lymphatic phenotype of tumour vessels in malignant gliomas." Neuropathol Appl Neurobiol **34**(6): 675-9.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol **189**(1): 54-63.
- Gunn, M. D., S. Kyuwa, et al. (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." J Exp Med **189**(3): 451-60.
- Hall, B., M. Andreeff, et al. (2007). "The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles." Handb Exp Pharmacol(180): 263-83.
- Hamada, H., M. Kobune, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy." Cancer Sci **96**(3): 149-56.
- Hamm, A., N. Krott, et al. (2002). "Efficient transfection method for primary cells." Tissue Eng **8**(2): 235-45.
- Hammer, M. H., S. Meyer, et al. (2005). "HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy." Eur J Immunol **35**(7): 2250-8.
- He, Y., K. Kozaki, et al. (2002). "Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling." J Natl Cancer Inst **94**(11): 819-25.

- He, Y., I. Rajantie, et al. (2004). "Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." Cancer Res **64**(11): 3737-40.
- Henson, J. W. (2006). "Treatment of glioblastoma multiforme: a new standard." Arch Neurol **63**(3): 337-41.
- Hillen, F. and A. W. Griffioen (2007). "Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 489-502.
- Hoffman, S., J. M. Propp, et al. (2006). "Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999." Neuro-oncol **8**(1): 27-37.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, et al. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-80.
- Homey, B., W. Wang, et al. (2000). "Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)." J Immunol **164**(7): 3465-70.
- Hong, Y. K., N. Harvey, et al. (2002). "Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate." Dev Dyn **225**(3): 351-7.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nat Med **5**(3): 309-13.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." Blood **97**(5): 1227-31.
- Hulleman, E. and K. Helin (2005). "Molecular mechanisms in gliomagenesis." Adv Cancer Res **94**: 1-27.
- Hüsemann, Y., I. von Lüttichau, et al. (in Vorbereitung).
- Igura, K., X. Zhang, et al. (2004). "Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta." Cytotherapy **6**(6): 543-53.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." Haematologica **88**(8): 845-52.
- Ino, Y., R. A. Betensky, et al. (2001). "Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis." Clin Cancer Res **7**(4): 839-45.
- Ishii, K., Y. Yoshida, et al. (2008). "Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta." Hepatology **48**(2): 597-606.
- Iwama, A., I. Hamaguchi, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells." Biochem Biophys Res Commun **195**(1): 301-9.

- Jackson, D. G., R. Prevo, et al. (2001). "LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis." Trends Immunol **22**(6): 317-21.
- Jain, R. K. (2001). "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy." Nat Med **7**(9): 987-9.
- Jain, R. K., E. di Tomaso, et al. (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nat Rev Neurosci **8**(8): 610-22.
- Jain, R. K. and T. P. Padera (2003). "Development. Lymphatics make the break." Science **299**(5604): 209-10.
- Jenny, B., J. A. Harrison, et al. (2006). "Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas." J Pathol **209**(1): 34-43.
- Ji, R. C. (2005). "Characteristics of lymphatic endothelial cells in physiological and pathological conditions." Histol Histopathol **20**(1): 155-75.
- Ji, R. C. (2006). "Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics." Cancer Metastasis Rev **25**(4): 677-94.
- Ji, R. C., M. Miura, et al. (2004). "Expression of VEGFR-3 and 5'-nase in regenerating lymphatic vessels of the cutaneous wound healing." Microsc Res Tech **64**(3): 279-86.
- Jia, H., A. Bagherzadeh, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells." J Biol Chem **279**(34): 36148-57.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Johnston, M. and C. Papaiconomou (2002). "Cerebrospinal fluid transport: a lymphatic perspective." News Physiol Sci **17**: 227-30.
- Johnston, M., A. Zakharov, et al. (2004). "Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species." Cerebrospinal Fluid Res **1**(1): 2.
- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." Exp Cell Res **238**(1): 265-72.
- Karkkainen, M. J., P. Haiko, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins." Nat Immunol **5**(1): 74-80.
- Kato, S., H. Shimoda, et al. (2006). "Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers." Anat Sci Int **81**(2): 71-83.
- Kato, Y., N. Fujita, et al. (2003). "Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors." J Biol Chem **278**(51): 51599-605.
- Kato, Y., M. Kaneko, et al. (2005). "Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma." Tumour Biol **26**(4): 195-200.

- Keating, A. (2006). "Mesenchymal stromal cells." Curr Opin Hematol **13**(6): 419-25.
- Kerjaschki, D. (2005). "The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis." J Clin Invest **115**(9): 2316-9.
- Kerjaschki, D., H. M. Regele, et al. (2004). "Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates." J Am Soc Nephrol **15**(3): 603-12.
- Khalil, P. N., V. Weiler, et al. (2007). "Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease." Gastroenterology **132**(3): 944-54.
- Kleihues, P., P. C. Burger, et al. (1993). Histological typing of tumours of the central nervous system. Berlin ; New York, Springer-Verlag.
- Kleihues, P. and W. K. Cavenee (2000). Pathology and genetics of tumours of the nervous system, IARC Press, Lyon.
- Kleihues, P., W. K. Cavenee, et al. (2000). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon, IARC Press.
- Kleihues, P. and H. Ohgaki (1999). "Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis." Neuro-oncol **1**(1): 44-51.
- Koc, O. N., J. Day, et al. (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." Bone Marrow Transplant **30**(4): 215-22.
- Kohyama, J., H. Abe, et al. (2001). "Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent." Differentiation **68**(4-5): 235-44.
- Korbling, M. and Z. Estrov (2003). "Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?" N Engl J Med **349**(6): 570-82.
- Kubo, H., T. Fujiwara, et al. (2000). "Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis." Blood **96**(2): 546-53.
- Kucerova, L., V. Altanerova, et al. (2007). "Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy." Cancer Res **67**(13): 6304-13.
- Kunita, A., T. G. Kashima, et al. (2007). "The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis." Am J Pathol **170**(4): 1337-47.
- Kunkel, E. J. and E. C. Butcher (2002). "Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes." Immunity **16**(1): 1-4.
- Lapidot, T. and I. Petit (2002). "Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells." Exp Hematol **30**(9): 973-81.
- Lebelt, A., J. Dzieciol, et al. (2008). "Angiogenesis in gliomas." Folia Histochem Cytobiol **46**(1): 69-72.

- Lee, L. G., C. R. Connell, et al. (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res **21**(16): 3761-6.
- Li, Y., M. Chopp, et al. (2000). "Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice." J Cereb Blood Flow Metab **20**(9): 1311-9.
- Lin, M. I. and W. C. Sessa (2004). "Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity." Cancer Cell **6**(6): 529-31.
- Lin, P., J. A. Buxton, et al. (1998). "Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8829-34.
- Louis, D. N., E. C. Holland, et al. (2001). "Glioma classification: a molecular reappraisal." Am J Pathol **159**(3): 779-86.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Mahmood, A., D. Lu, et al. (2001). "Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells." Neurosurgery **49**(5): 1196-203; discussion 1203-4.
- Maisonpierre, P. C., M. Goldfarb, et al. (1993). "Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family." Oncogene **8**(6): 1631-7.
- Mandriota, S. J., L. Jussila, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis." Embo J **20**(4): 672-82.
- Maniotis, A. J., R. Folberg, et al. (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am J Pathol **155**(3): 739-52.
- Martin-Villar, E., F. G. Scholl, et al. (2005). "Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas." Int J Cancer **113**(6): 899-910.
- Maruyama, K., M. Li, et al. (2005). "Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages." J Clin Invest **115**(9): 2363-72.
- Matsumura, K., M. Hirashima, et al. (2003). "Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3." Blood **101**(4): 1367-74.
- Maula, S. M., M. Luukkaa, et al. (2003). "Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region." Cancer Res **63**(8): 1920-6.
- Miletic, H., Y. Fischer, et al. (2007). "Bystander Killing of Malignant Glioma by Bone Marrow-derived Tumor-Infiltrating Progenitor Cells Expressing a Suicide Gene." Mol Ther.
- Mishima, K., Y. Kato, et al. (2006). "Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma." Acta Neuropathol (Berl).

- Mishima, K., Y. Kato, et al. (2006). "Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression." Acta Neuropathol (Berl) **111**(5): 483-8.
- Moffat, B. A., M. Chen, et al. (2006). "Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D." Clin Cancer Res **12**(5): 1525-32.
- Moolten, F. L. and J. M. Wells (1990). "Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors." J Natl Cancer Inst **82**(4): 297-300.
- Moosmann, S., J. Hutter, et al. (2005). "Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones." Cells Tissues Organs **179**(3): 91-101.
- Muraglia, A., R. Cancedda, et al. (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." J Cell Sci **113** (Pt 7): 1161-6.
- Nakamizo, A., F. Marini, et al. (2005). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." Cancer Res **65**(8): 3307-18.
- Nakamura, K., Y. Ito, et al. (2004). "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." Gene Ther **11**(14): 1155-64.
- Nakamura, Y., H. Yasuoka, et al. (2005). "Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **91**(2): 125-32.
- Nakamura, Y., H. Yasuoka, et al. (2003). "Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up." Clin Cancer Res **9**(2): 716-21.
- Nakamura, Y., H. Yasuoka, et al. (2003). "Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up." Mod Pathol **16**(4): 309-14.
- Nakano, I. and H. I. Kornblum (2006). "Brain tumor stem cells." Pediatr Res **59**(4 Pt 2): 54R-8R.
- Ng, Y. S., D. Krilleke, et al. (2006). "VEGF function in vascular pathogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 527-37.
- Noble, M. and J. Dietrich (2004). "The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity." Trends Neurosci **27**(3): 148-54.
- Norden, A. D. and P. Y. Wen (2006). "Glioma therapy in adults." Neurologist **12**(6): 279-92.
- Nose, K., H. Saito, et al. (1990). "Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells." Cell Growth Differ **1**(11): 511-8.
- O'Neill, B. P., H. Blondal, et al. (2002). "Risk of cancer among relatives of patients with glioma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(9): 921-4.

- Ohl, L., M. Mohaupt, et al. (2004). "CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions." Immunity **21**(2): 279-88.
- Ordonez, N. G. (2006). "The diagnostic utility of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing between peritoneal mesotheliomas and serous carcinomas: a comparative study." Mod Pathol **19**(1): 34-48.
- Ordonez, N. G. (2006). "The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study." Mod Pathol **19**(3): 417-28.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, et al. (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8407-11.
- Oswald, J., S. Boxberger, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-84.
- Partanen, T. A., J. Arola, et al. (2000). "VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues." Faseb J **14**(13): 2087-96.
- Petrova, T. V., T. Makinen, et al. (2002). "Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor." Embo J **21**(17): 4593-9.
- Phinney, D. G., G. Kopen, et al. (1999). "Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation." J Cell Biochem **72**(4): 570-85.
- Pietsch, T. and O. D. Wiestler (1997). "Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors." J Neurooncol **35**(3): 211-22.
- Pilkington, G. J. (2005). "Cancer stem cells in the mammalian central nervous system." Cell Prolif **38**(6): 423-33.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Pittenger, M. F. and B. J. Martin (2004). "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." Circ Res **95**(1): 9-20.
- Plate, K. H. and H. D. Mennel (1995). "Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors." Exp Toxicol Pathol **47**(2-3): 89-94.
- Ponten, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." Acta Pathol Microbiol Scand **74**(4): 465-86.
- Preul, M. C. (2005). "History of brain tumor surgery." Neurosurg Focus **18**(4): 1.
- Preusser, M., C. Haberler, et al. (2006). "Malignant glioma: neuropathology and neurobiology." Wien Med Wochenschr **156**(11-12): 332-7.
- Pytowski, B., J. Goldman, et al. (2005). "Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody." J Natl Cancer Inst **97**(1): 14-21.

- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, et al. (2001). "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." N Engl J Med **344**(5): 385-6.
- Quigley, M. R., C. Post, et al. (2007). "Some speculation on the origin of glioblastoma." Neurosurg Rev **30**(1): 16-20; discussion 20-1.
- Ramirez, M. I., G. Millien, et al. (2003). "T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth." Dev Biol **256**(1): 61-72.
- Recht, L., T. Jang, et al. (2003). "Neural stem cells and neuro-oncology: quo vadis?" J Cell Biochem **88**(1): 11-9.
- Rishi, A. K., M. Joyce-Brady, et al. (1995). "Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives." Dev Biol **167**(1): 294-306.
- Ristimaki, A., K. Narko, et al. (1998). "Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C." J Biol Chem **273**(14): 8413-8.
- Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." Annu Rev Immunol **22**: 891-928.
- Rutka, J. T., A. Weyerbrock, et al. (2006). "Gliomas: quo vadis." Clin Neurosurg **53**: 58-63.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, et al. (2000). "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." Exp Neurol **164**(2): 247-56.
- Sato, T. N., Y. Qin, et al. (1993). "Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9355-8.
- Sato, T. N., Y. Tozawa, et al. (1995). "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation." Nature **376**(6535): 70-4.
- Schacht, V., S. S. Dadras, et al. (2005). "Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors." Am J Pathol **166**(3): 913-21.
- Schacht, V., M. I. Ramirez, et al. (2003). "T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema." Embo J **22**(14): 3546-56.
- Schichor, C., T. Birnbaum, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC)." Exp Neurol **199**(2): 301-10.
- Schichor, C., I. von Lüttichau; Trillsch, et al. (2009, eingereicht). "Adult human mesenchymal stem cells contribute to neoangiogenesis in malignant gliomas."
- Schlaeger, T. M., S. Bartunkova, et al. (1997). "Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3058-63.
- Schlaeger, T. M., Y. Qin, et al. (1995). "Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice." Development **121**(4): 1089-98.

- Schnurch, H. and W. Risau (1993). "Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage." Development **119**(3): 957-68.
- Scholl, F. G., C. Gamallo, et al. (1999). "Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes." J Cell Sci **112 (Pt 24)**: 4601-13.
- Sharma, S., M. C. Sharma, et al. (2005). "Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis." Histopathology **46**(5): 481-9.
- Shibahara, J., T. Kashima, et al. (2006). "Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system." Virchows Arch **448**(4): 493-9.
- Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh (2006). "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 549-60.
- Siemeister, G., M. Schirner, et al. (1999). "Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway." Cancer Res **59**(13): 3185-91.
- Skobe, M., T. Hawighorst, et al. (2001). "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis." Nat Med **7**(2): 192-8.
- Sleeman, J. P., J. Krishnan, et al. (2001). "Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail?" Microsc Res Tech **55**(2): 61-9.
- Stacker, S. A., M. G. Achen, et al. (2002). "Lymphangiogenesis and cancer metastasis." Nat Rev Cancer **2**(8): 573-83.
- Stacker, S. A., C. Caesar, et al. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." Nat Med **7**(2): 186-91.
- Stamm, C., B. Westphal, et al. (2003). "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration." Lancet **361**(9351): 45-6.
- Stiver, S. I. (2004). "Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors." Front Biosci **9**: 3105-23.
- Studeny, M., F. C. Marini, et al. (2002). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors." Cancer Res **62**(13): 3603-8.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." J Clin Oncol **25**(26): 4127-36.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-96.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell **87**(7): 1171-80.
- Swartz, M. A. and M. Skobe (2001). "Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis." Microsc Res Tech **55**(2): 92-9.

- Tammela, T., T. V. Petrova, et al. (2005). "Molecular lymphangiogenesis: new players." Trends Cell Biol **15**(8): 434-41.
- Taphoorn, M. J., R. Stupp, et al. (2005). "Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial." Lancet Oncol **6**(12): 937-44.
- Tatter, S. B. (2002). "Recurrent malignant glioma in adults." Curr Treat Options Oncol **3**(6): 509-24.
- Thalmeier, K., P. Meissner, et al. (2001). "Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice." Acta Haematol **105**(3): 159-65.
- Tolar, J., A. J. Nauta, et al. (2007). "Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells." Stem Cells **25**(2): 371-9.
- Tong, R. T., Y. Boucher, et al. (2004). "Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors." Cancer Res **64**(11): 3731-6.
- Tonnesen, M. G., X. Feng, et al. (2000). "Angiogenesis in wound healing." J Investig Dermatol Symp Proc **5**(1): 40-6.
- Tsai, M. S., J. L. Lee, et al. (2004). "Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol." Hum Reprod **19**(6): 1450-6.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-53.
- Valtola, R., P. Salven, et al. (1999). "VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer." Am J Pathol **154**(5): 1381-90.
- Veikkola, T., L. Jussila, et al. (2001). "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice." Embo J **20**(6): 1223-31.
- Virchow, R. L. K. (1863). Die krankhaften Geschwülste; dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin. Berlin,, Hirschwald.
- Von Lüttichau, I., M. Notohamiprodjo, et al. (2005). "Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4." Stem Cells Dev **14**(3): 329-36.
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, et al. (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **13**(4): 1253-9.
- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1994). "Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **76**(4): 579-92.
- Wang, W., H. Soto, et al. (2000). "Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2)." J Biol Chem **275**(29): 22313-23.
- Wen, P. Y., S. Kesari, et al. (2006). "Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment." Expert Rev Anticancer Ther **6**(5): 733-54.

- Weninger, W., T. A. Partanen, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells." Lab Invest **79**(2): 243-51.
- Wesseling, P., D. J. Ruiter, et al. (1997). "Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects." J Neurooncol **32**(3): 253-65.
- Wetterwald, A., W. Hoffstetter, et al. (1996). "Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes." Bone **18**(2): 125-32.
- Wicki, A. and G. Christofori (2007). "The potential role of podoplanin in tumour invasion." Br J Cancer **96**(1): 1-5.
- Wicki, A., F. Lehembre, et al. (2006). "Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton." Cancer Cell **9**(4): 261-72.
- Wigle, J. T., N. Harvey, et al. (2002). "An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype." Embo J **21**(7): 1505-13.
- Wigle, J. T. and G. Oliver (1999). "Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system." Cell **98**(6): 769-78.
- Winkler, F., S. V. Kozin, et al. (2004). "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases." Cancer Cell **6**(6): 553-63.
- Wong, A. J., S. H. Bigner, et al. (1987). "Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(19): 6899-903.
- Woodbury, D., E. J. Schwarz, et al. (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." J Neurosci Res **61**(4): 364-70.
- Yanai, Y., T. Furuhashi, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor C promotes human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice." J Exp Clin Cancer Res **20**(3): 419-28.
- Yip, S., A. J. Iafrate, et al. (2008). "Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers." J Neuropathol Exp Neurol **67**(1): 1-15.
- Yonemura, Y., S. Fushida, et al. (2001). "Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer." Eur J Cancer **37**(7): 918-23.
- Yuan, P., S. Temam, et al. (2006). "Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome." Cancer **107**(3): 563-9.
- Yuan, X., J. Curtin, et al. (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." Oncogene **23**(58): 9392-400.
- Zovein, A. C. and M. L. Iruela-Arispe (2006). "My O'Myeloid, a tale of two lineages." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 12959-60.
- Zülch, K. J. (1979). Histological typing of tumours of the central nervous system., WHO Genf.

Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res 2(6): 477-88.

9. Danksagung

Nach der Fertigstellung meiner Dissertation möchte ich den Personen danken, die mich bei der Durchführung der Versuche und beim Verfassen der Arbeit maßgeblich unterstützt haben.

Besonders herzlich danke ich dabei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Peter J. Nelson, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe der Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik Innenstadt und die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in dieser zu erstellen. Herr PD Dr. Nelson war für mich zu jeder Zeit ein hilfsbereiter Ansprechpartner, der mich durch seine große wissenschaftliche Sachkunde und ständige Diskussionsbereitschaft für die eigenständige Arbeit motiviert hat.

Frau Dr. Irene Teichert von Lüttichau hat diese Arbeit mit großem Einsatz, pädagogischem Geschick und sozialer Kompetenz ausgezeichnet betreut. Durch ihre zielstrebige und durchdachte Arbeitsweise ist sie mir ein wissenschaftliches Vorbild geworden. Sie stand mir bei allen Hürden dieser Arbeit uneingeschränkt zur Seite.

Herr PD Dr. Roland Goldbrunner hat als Leiter des Neuroonkologischen Labors der Neurochirurgischen Klinik Großhadern ermöglicht, die Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe aufzubauen und mir dabei große Kompetenzen zugestanden.

Aus seiner Arbeitsgruppe hat mich Herr Dr. Stefan Grau mit seiner positiven Einstellung besonders motiviert und durch viele Diskussionen sowie gemeinsame Versuchsreihen die Arbeit vorangetrieben. Herr Dr. Christian Schichor hat mit mir die Tierversuche durchgeführt und dabei durch Ratschläge und Diskussionen mein kritisches Denken gefördert.

Frau Anke Mojaat hat während der gesamten Forschungszeit exzellente technische Unterstützung geleistet und mir mit ihrer Erfahrung gerade am Anfang der Arbeit bei der Planung der zellbiologischen Versuche sehr geholfen. Frau Alexandra Wechselsberger, Frau Stefanie Lange und Frau Nicole Rieth haben mir darüber hinaus bei allen Versuchen und Fragen hilfsbereit zur Seite gestanden, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Unterstützung bei der pathologischen Beurteilung habe ich durch Herrn Prof. Dr. Jochen Herms und Herrn Dr. Bjarne Krebs vom Institut für Neuropathologie der LMU München erhalten.

Abschließend bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, die durch das freundliche und immer positive Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Fabian Trillsch
Geburtsdatum: 19.01.1982
Geburtsort: Bielefeld
Eltern: Dr. med. Klaus Martin Trillsch
Helga Trillsch, geb. Domke
Geschwister: Julia Trillsch (geb. 1978)
Konfession: evangelisch

Schulbildung

Aug.1988 – Juli 1992 Eichendorff-Grundschule, Bielefeld
Aug.1992 – Juni 2001 Öffentlich-Stiftisches Gymnasium Bethel, Bielefeld
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse: Mathematik, Französisch
Durchschnittsnote: 1,5
Sprachkenntnisse: Englisch: fließend in Wort und Schrift
Französisch: sehr gut in Wort und Schrift

Studium (*Humanmedizin*)

Okt. 2002 - Sept. 2004 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Physikum: gut (2,0) September 2004
Okt. 2004 - Nov. 2008 Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen: sehr gut (1,5) November 2008
USMLE: Step 1 März 2008
Step 2 CS Juli 2008
Step 2 CK Dezember 2008

Praktisches Jahr

31.03.08 - 31.07.08 3. Tertial (Innere Medizin)
Harvard Medical School, Boston, USA
- *Teilnahme als Stipendiat der LMU-HMI-Allianz
am Harvard-PJ-Programm* -
10.12.07 - 30.03.08 2. Tertial (Wahlfach, Pädiatrie)
Dr. von Haunersches Kinderspital, München
- *Pädiatrische Klinik* -
20.08.07 - 09.12.07 1. Tertial (Allgemeine Chirurgie)
Dr. von Haunersches Kinderspital, München
- *Kinderchirurgische Klinik* -

Famulaturen

- 05.03. - 01.04.2007 University of Michigan Hospital, Ann Arbor, USA
- *Abteilung für Rheumatologie* -
- 05.02. - 04.03.2007 University of Michigan Hospital, Ann Arbor, USA
- *Abteilung für Nephrologie* -
- 28.08. - 26.09.2006 Dr. von Haunersches Kinderspital, München
- *Kinderchirurgische Klinik* -
- 27.02. - 28.03.2006 Klinikum der Universität München, Großhadern
- *Chirurgische Klinik, Poliklinik und Nothilfe* -
- 07.03. - 31.03.2005 Krankenhaus München- Schwabing, München
- *Klinik für Kardiologie und Pneumologie* –
- 11.10. - 15.10.2004 Franziskus-Hospital, Bielefeld (*Kurzfamulatur*)
- *Klinik für Anästhesie* -

Wissenschaftliche Erfahrung

- 01.06.2005 - 31.12.2008 Doktorarbeit,
Ludwig-Maximilians-Universität München
- *Medizinische Poliklinik, Klinische Biochemie*
(*Labor PD Dr. Peter Nelson*)
- *Neurochirurgische Klinik Großhadern*
(*Labor PD Dr. Roland Goldbrunner*)
- 04.10.2006 - 04.02.2007 Forschungsaufenthalt,
University of Michigan, Ann Arbor, USA
- *Abteilung für Nephrologie* -
(*Labor Matthias Kretzler MD, associate professor*)
- 01.03.2004 - 19.03.2004 Laborpraktikum,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- *Institut für Anatomie und Zellbiologie* -
(*Labor Prof. Dr. Beate Brand- Saberi*)

Außeruniversitäre Aktivitäten

- Feld- und Hallenhockey,
- *aktives Mitglied der 1. Herrenmannschaft des ASV München (bis Nov. 2008)*-
Skifahren, Fußball
Percussion, Schlagzeug,
Mitglied des Percussionensembles „Bi- Cussion“
- *u.a. Bundessieger Jugend Musiziert 2000 (Schlagzeug-Ensembles)* -

Originalarbeiten

Grau SJ, Trillsch F, Herms J, Thon N, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R
Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade.
J Neurooncol 82(2): 141-50 (2007)

Grau SJ, Trillsch F, von Luettichau I, Nelson PJ, Herms J, Tonn JC, Goldbrunner R
Lymphatic Phenotype of Tumor Vessels in Brain Tumors.
Neuropathol Appl Neurobiol 34(6): 675-9 (2008)

Luan F*, Trillsch F*, Eichinger F, Appelman HD, Henger A, Woolf P, Kretzler M
A pilot study of gene expression-based categorization of pancreas transplant biopsies.
Transplantation 87(2): 222-6 (2009)

* Both authors contributed equally to this work

Schichor C, von Luettichau I, Krebs B, Korte B, Loos S, Trillsch F, Mysliwietz J, Birnbaum T, Herms J, Lah T, Tonn JC, Nelson PJ, Goldbrunner R
Therapeutically administered adult human mesenchymal stem cells contribute to neoangiogenesis in malignant gliomas.
(2009, eingereicht)

Kongressvortrag

Trillsch F, Schichor C, Grau S, Herms J, Goldbrunner R, von Luettichau I, Burdach S, Tonn JC, Nelson PJ
Mesenchymal stem cells contribute to neoangiogenesis in malignant gliomas and may serve as a therapeutic vector.
17. Arbeitstagung für experimentelle Neuroonkologie,
Bonn 2008

Kongressbeiträge

Luan F, Trillsch F, Henger A, Eichinger F, Appelman H, Kretzler M
Molecular Signature Observed in Pancreas Transplant Biopsy Specimens.
American Society Nephrology (ASN), Renal Week 2007,
San Fransisco 2007

Schichor C, Trillsch F, Loos S, von Luettichau I, Tonn JC, Nelson PJ, Goldbrunner R
Integration of adult human mesenchymal stem cells into the neoangiogenetic vasculature of gliomas.
98th Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR),
Los Angeles 2007

Schichor C, Birnbaum T, Schnell O, Grau S, Trillsch F, Loos S, Krebs B, Tonn JC, Nelson PJ, Goldbrunner R
Adult human mesenchymal stem cells are recruited by intracranial gliomas and integrated into the tumor vasculature.
Brain Tumor Meeting,
Berlin 2006

Schichor C, **Trillsch F**, Loos S, von Luettichau I, Tonn JC, Nelson PJ, Goldbrunner R
Integration of adult human mesenchymal cells into the neoangiogenetic vasculature of gliomas.

1st Meeting, Deutsche Gesellschaft für Stammzellforschung,
Cologne 2006

Grau S, **Trillsch F**, von Luettichau I, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R
Expression of lymphangiogenesis related factors in Glioma.

7th Congress, European Association for Neurooncology (EANO),
Vienna 2006

Schichor C, Birnbaum T, Goldbrunner R, **Trillsch F**, Loos S, Krebs B, Nelson PJ, Tonn JC

Glioma induced integration of adult human mesenchymal stem cells into the tumor vasculature.

7th Congress, European Association for Neurooncology (EANO),
Vienna 2006

Grau SJ, **Trillsch F**, von Luettichau I, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R

Expression of lymphangiogenesis related factors in Glioma.

2nd European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy (ECTA),
Munich 2006

Grau SJ, **Trillsch F**, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R

Grade dependent Expression of VEGFR3 in Glioma.

57th Annual Meeting, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC),
Essen 2006

Schichor C, **Trillsch F**, Loos S, Krebs B, Nelson PJ, Goldbrunner R

Distinct distribution patterns of adult mesenchymal stem cells in tumor bearing brain after local and systemic application.

57th Annual Meeting, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC),
Essen 2006

Grau SJ, **Trillsch F**, von Luettichau I, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R

Expression of lymphangiogenesis related factors in malignant Glioma.

97th Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR),
Washington 2006

Grau SJ, **Trillsch F**, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R

Expression of VEGFR3 in Glioma - a link to new angiogenic mechanisms?

AACR special conference (Anti-Angiogenesis and Drug Delivery to Tumors),
Boston 2005

Koehler T, Bonafede A, **Trillsch F**, Rodriguez- Niedenfuehr M, Christ B, Brand- Saberi B

The marginal mesenchyme controls the position of pre-muscle masses in the limb bud.

20th Annual Meeting, Deutsche Anatomische Gesellschaft,
Wuerzburg 2004