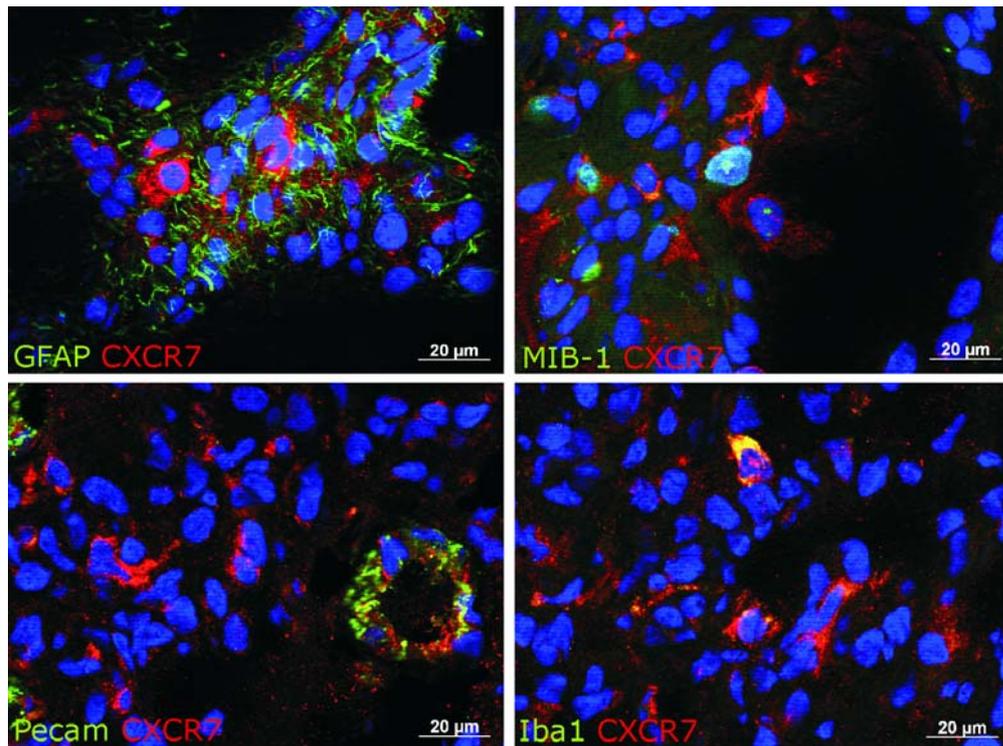


Vorkommen und funktionelle Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR7 in humanen astroglialen Tumoren



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Kirsten Hattermann

Kiel, im Mai 2009

**Vorkommen und funktionelle Bedeutung
des Chemokinrezeptors CXCR7
in humanen astroglialen Tumoren**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

**vorgelegt von
Kirsten Hattermann**

Kiel, im Mai 2009

Referent: Professor Dr. R. Mentlein

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Professor Dr. L. Kipp
(Der Dekan)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Astrozytome und Glioblastome	1
1.2 Die Tumorstammzellhypothese.....	3
1.3 Die Chemokinsuperfamilie	5
1.3.1 Klassifizierung der Chemokine.....	5
1.3.2 Chemokinrezeptoren	8
1.3.3 Chemokine im Zentralnervensystem.....	12
1.3.4 Chemokine in der Tumorbilogie	12
1.4 Der Chemokinrezeptor CXCR7	15
1.5 Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Gewebeproben und Zelllinien	18
2.1.2 Biochemikalien	18
2.1.3 Peptide, Enzyme und Hemmstoffe.....	20
2.1.4 Antikörper	20
2.1.5 Gebrauchsfertige Kits.....	21
2.1.6 TaqMan® Primer und Sonden	22
2.1.7 Geräte.....	22
2.1.8 Lösungen, Puffer und Medien	22
2.1.9 Verbrauchsmaterial	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2 Realtime RT-PCR.....	27
2.2.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie	31
2.2.4 Fluoreszenz-Immunzytochemie	32
2.2.5 Western Blot.....	33
2.2.6 Proliferationsversuch.....	37
2.2.7 Migrationsversuche	38
2.2.8 DNA-Fragmentierung (Apoptose-Assay)	39
2.2.9 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	40
2.2.10 Statistische Analysen und Auswertungen.....	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Transkriptionsanalyse der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Chemokine CXCL11 und CXCL12 in humanen astroglialen Tumoren.....	42
3.2 Nachweis des Chemokinrezeptors CXCR7 <i>in situ</i> an Gefrierschnitten von humanen Glioblastomen	43
3.3 Transkriptionsanalyse der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Chemokine CXCL11 und CXCL12 in humanen Zelllinien.....	46
3.4 Untersuchung der CXCR7-Expression auf Proteinebene.....	48
3.5 Untersuchung zum Transkriptionsprofil der Glioblastomzelllinie A764	49

3.6 Untersuchungen zur Regulation von CXCR7.....	50
3.6.1 Regulation von CXCR7 durch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren.....	50
3.6.2 Regulation von CXCR4 und CXCR7 durch Hypoxie.....	51
3.7 Untersuchungen zur Signaltransduktion von CXCL12 / CXCR7	52
3.7.1 Kinetik der Kinasephosphorylierung.....	52
3.7.2 Inhibition der Kinasephosphorylierung	54
3.7.3 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	55
3.8 Untersuchung der Effekte von CXCL12 auf die Proliferation	57
3.9 Untersuchung der Effekte von CXCL12 auf ungerichtete und gerichtete Migration	58
3.9.1 Untersuchung der ungerichteten Migration im Wundheilungstest (<i>Scratch-Test</i>)	59
3.9.2 Untersuchung der gerichteten Migration (Chemotaxis) durch Boydenkammer-Experimente	60
3.10 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von CXCL12 auf eine induzierte Apoptose	60
3.10.1 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand von DNA-Fragmentierungsanalysen.....	60
3.10.2 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand der Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase.....	62
3.10.3 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand der Aktivierung der Caspasen 9 und 3	63
3.11 Untersuchung der Wirkung von CXCL12 auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF	65
3.12 Untersuchungen zur Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression an Glioblastomsphären	67
3.12.1 Etablierung der Kultivierung von Neurosphären	67
3.12.2 Etablierung der Kultivierung von Glioblastomsphären	68
3.12.3 Untersuchungen zur Expression von CXCR4, CXCR7 und CXCL12 an der Glioblastomsphären-Kultur 25/07.....	74
4. Diskussion	78
4.1 Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und ihrer Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Glioblastomen	79
4.2 Etablierung einer Glioblastom-Stammzellartigen Zelllinie als Modell für Glioblastomstammzellen <i>in vitro</i>	84
4.3 Regulation der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren	87
4.4 Signaltransduktion des Chemokins CXCL12 über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7	89
4.5. Zelluläre Effekte der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7	92
4.5.1 Chemokinvermittelte Effekte auf Migrationsprozesse.....	93
4.5.2 Chemokinvermittelte Effekte auf Proliferation und Überleben	94
4.5.3 Beeinflussung von Stromazellen durch chemokinvermittelte Genexpressionsmodulation.....	96
5. Zusammenfassung	100
6. Summary	101
7. Literaturverzeichnis	102
Danksagung	118
Lebenslauf.....	119
Erklärung	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Magnetresonanztomografie und histologisches Bild eines Glioblastoms.....	2
Abbildung 2: Hierarchie der Gehirnzellen und mögliche Pfade der Entstehung von Gliomen.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Chemokinfamilien.....	7
Abbildung 4: Aktivierung und Desensitivierung des Chemokinrezeptors.....	10
Abbildung 5: Chemokinvermittelte Effekte in der Tumorbilogie	14
Abbildung 6: Transkription der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und der Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Astrozytom- und Glioblastomgeweben.	43
Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von CXCR7 und verschiedenen Markern an Glioblastomschnitten	44
Abbildung 8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCR7 und Pecam an gesundem humanem Hirngewebe.....	45
Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von CXCR7 (rot) und CXCR4 bzw. CXCL12 und von CXCR4 und CXCL12 an Glioblastomschnitten	46
Abbildung 10: Transkription der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Zelllinien.....	47
Abbildung 11: Proteinexpression von CXCR7 in humanen Glioblastomlinien.....	49
Abbildung 12: Transkriptionsprofil der humanen Glioblastomzelllinie A764	50
Abbildung 13: Regulation der CXCR7-Transkription und –Expression durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine.....	51
Abbildung 14: Regulation der Transkription von CXCR7 und CXCR4 durch Hypoxie.....	52
Abbildung 15: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von ERK1 / 2 (<i>Extracellular-signal related kinase 1 / 2</i>).....	53
Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase Akt.....	53
Abbildung 17: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase p38	54
Abbildung 18: Untersuchung der Hemmbarkeit der CXCL12 vermittelten Phosphorylierung von ERK1 / 2 durch einen MAP-Kinase-Inhibitor.....	54
Abbildung 19: Immunzytochemische Untersuchung der Translokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern.	56
Abbildung 20: Untersuchungen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF2, ELK-1 und CREB durch CXCL12	57
Abbildung 21: Auswirkungen von CXCL12 auf die Proliferation von A764-Glioblastomzellen	58
Abbildung 22: Beispiel für die Migration von A764-Glioblastomzellen im <i>Scratch-Test</i>	59
Abbildung 23: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der DNA-Fragmentierung.....	61
Abbildung 24: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase.....	62
Abbildung 25: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Aktivierung der Caspase 9.....	64
Abbildung 26: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Aktivierung der Caspase 3.....	65
Abbildung 27: Regulation ausgewählter Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und VEGF durch CXCL12 in A764-Glioblastomzellen	66
Abbildung 28: Immunzytochemische Färbungen von murinen Neurosphären	68
Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme und Fluoreszenzimmunzytochemie einer Gliomsphären-Kultur.....	69

Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis

Abbildung 30: Immunzytochemischer Nachweis der Glioblastomstammzellmarker CD133, Musashi-1 und Sox2 in Glioblastomsphären.....	70
Abbildung 31: Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern in den Glioblastomsphären sowie von glialen und neuronalen Markern in den ausdifferenzierten Kulturen.....	71
Abbildung 32: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von GFAP und CD133 differenzierten Glioblastomsphären-Zellen.....	72
Abbildung 33: Immunzytochemischer Nachweis der Differenzierungsmarker GFAP, MBP und NeuN an einer Parallelkultur.....	73
Abbildung 34 Untersuchung der Transkription von CXCR4, CXCR7 und CXCL12 in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Glioblastom-Stammzellähnlichen Zelllinie 25/07.....	76
Abbildung 35: Mögliche Lokalisierung des Chemokins CXCL12 und seiner Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 im gesunden Zentralnervensystem und im Glioblastom.....	83
Abbildung 36: Hierarchisches und statistisches Modell zur Erklärung des Vorkommens von Tumorstammzellen.....	86
Abbildung 37: Mögliche Signaltransduktionskaskaden des Ligand-Rezeptor-Paares CXCL12 / CXCR7.....	91
Abbildung 38: Signaltransduktionskaskaden des Liganden-Rezeptor-Paares CXCL12 / CXCR4.....	91
Abbildung 39: CXCL12-vermittelte Effekte an CXCR4-exprimierenden Glioblastomstammzellen und CXCR7-exprimierenden differenzierten Glioblastomzellen.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schwerpunktgebiete der Forschung an humanen Gliomen.....	3
Tabelle 2: Bekannte Chemokine und ihre Synonyme.....	6
Tabelle 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden.....	9
Tabelle 4: Chemokinüberexpression in neuroinflammatorischen Modellen.....	12

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-2	<i>Activator of transcription-2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CNPase	<i>2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
C _T	<i>Cycle of Threshold</i> , Schwellenwert
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> ; gliales fibrilläres azides Protein
GRK	G-protein-gekoppelter-Rezeptor-Kinase
HEPES	4, 2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELK1	<i>Ets-related transcription factor 1</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular-signal related kinases 1/2</i>
FKS	Fötales Kälberserum
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor 1α</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
Iba-1	<i>Ionized calcium-binding adaptor molecule-1</i>
ICC	Immunzytochemie
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>
kDa	kilo Dalton
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i> ; Myelin-basisches Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial adhesion molecule-1</i>
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDF-1 α	<i>Stromal cell-derived factor-1α</i> , CXCL12
TGF β 1	<i>Tumor growth factor β1</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
UNG	Uracil-N-Glykosylase
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1. Einleitung

1.1 Astrozytome und Glioblastome

Astrozytome und Glioblastome (*Glioblastoma multiforme*) sind die am häufigsten auftretenden Hirntumoren bei Erwachsenen. Sie leiten sich offenbar von Astrozyten oder deren Vorläufern ab. Meist exprimieren sie das astrogliale Filamentprotein GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), das auch zur neuropathologischen Diagnostik dieser Tumoren Anwendung findet. Astrozyten erfüllen im Zentralnervensystem vielfältige Funktionen, wobei sie unter anderem das extrazelluläre Milieu konstant halten, an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und die Funktionalität der Synapsen aufrechterhalten. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) sieht eine Klassifizierung der Astrozytome nach Malignität und weiteren biologischen und histologischen Charakteristika vor (Kleihues *et al.* 2002, Louis *et al.* 2007). Das Pilozytische Astrozytom (Grad I), ein benigner langsam wachsender, oft zystischer Tumor, ist im Erwachsenenalter selten und durchläuft nur sehr selten maligne Transformationen zum höhergradigen Astrozytom. Im Gegensatz dazu sind die höhergradigen, eher malignen Astrozytome (Grad II: Diffuses Astrozytom; Grad III: Anaplastisches Astrozytom) charakterisiert durch eine diffuse Infiltration des angrenzenden Hirnparenchyms und eine ausgeprägte Tendenz zur malignen Progression bis hin zum sekundären Glioblastom. Das Diffuse oder Fibrilläre Astrozytom (Grad II) zeigt ein hohes Maß an zellulärer Differenzierung und ein vergleichsweise langsames Wachstum, während Anaplastische Astrozytome (Grad III) bereits fokale oder generalisierte Zeichen der Anaplasie aufweisen, wie z.B. Kernpolymorphie, erhöhte Mitoseraten und einsproßende Gefäße. Das Glioblastom stellt den höchsten Entartungsgrad astroglialer Tumoren (Grad IV) dar und zeigt neben schnellem und stark infiltrativem Wachstum auch ausgedehnte Nekrosebereiche und Einblutungen. Es kann entweder *de novo* entstehen (primäres Glioblastom) oder als Rezidiv eines Astrozytoms auftreten (sekundäres Glioblastom). Innerhalb dieser Klassifizierung gibt es zahlreiche Unterkategorien und Variationen, darüber hinaus auch Mischgliome und gemischt-gliol-neuronale Tumoren, die meist sehr selten sind. Primäre Glioblastome treten in Europa bei Erwachsenen ungefähr 20-mal häufiger auf als sekundäre. Die Inzidenzrate beträgt ca. 6 Neuerkrankungen pro Jahr und pro 100 000 Menschen. Das mediane Diagnosealter beträgt ca. 65 Jahre, Männer sind 1,7-fach häufiger betroffen als Frauen (Ohgaki *et al.* 2004). Hauptlokalisationsorte der Tumoren sind die Großhirnhemisphären und die Balkenregion, wodurch auch ein Übertritt in die jeweils andere Hemisphäre erfolgen kann (Schmetterlingsgliom).

Die Prognose für Patienten, die an einem Glioblastom erkrankt sind, ist nach wie vor außerordentlich ungünstig. Die mediane Überlebenszeit beträgt ca. 9-12 Monate und die Zwei-Jahres-Überlebensrate liegt im Bereich von 8-14% (Stupp *et al.* 2002).

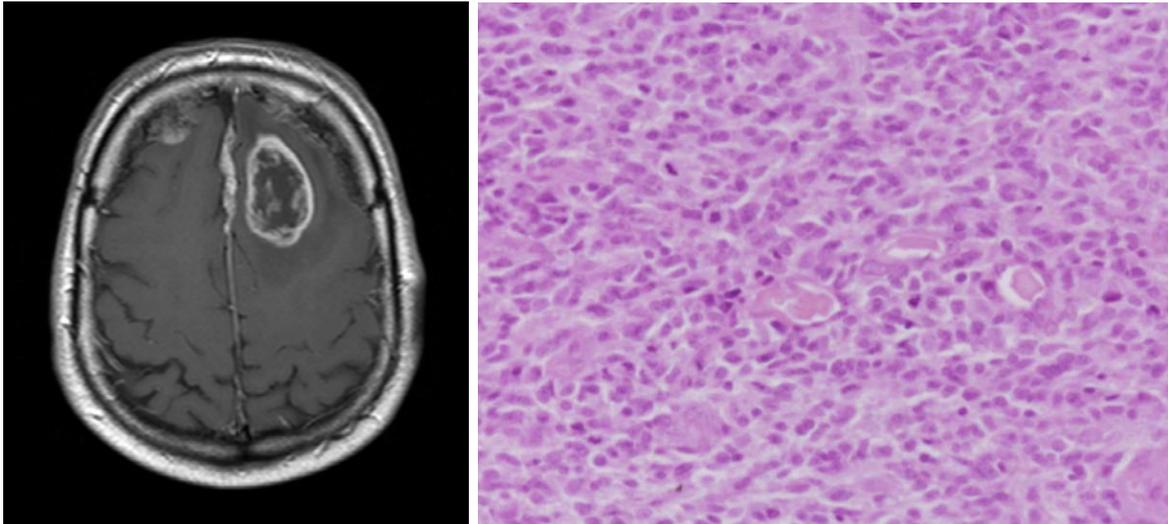


Abbildung 1: Magnetresonanztomografie und histologisches Bild eines Glioblastoms. Das Glioblastom ist in der MRT-Aufnahme (links) als kontrastmittelanreichernde Raumforderung frontal in der rechten Hemisphäre erkennbar. Der mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitt (H.E.-Färbung) zeigt das zellreiche Tumorgewebe aus polymorphen, anaplastischen Zellen und drei im Querschnitt getroffene Blutgefäße (rechts). Diese Aufnahmen wurden in der Klinik für Neurochirurgie im UK-SH, Campus Kiel angefertigt und freundlicherweise von Professor Dr. Mehdorn und Professor Dr. Dr. Held-Feindt zur Verfügung gestellt.

Eine kurative Therapie des *Glioblastoma multiforme* ist bisher nicht möglich. Die Therapie soll daher in erster Linie Symptome, wie z.B. Kopfschmerz, epileptische Anfälle und Ausfallerscheinungen, mildern und die Überlebenszeit verlängern. Zunächst wird eine möglichst vollständige Resektion des Tumors angestrebt. An die Operation schließt sich in der Regel entweder eine Radiotherapie oder eine kombinierte Radio-Chemotherapie an, welche meist nach dem Stupp-Schema (Stupp *et al.* 2002) durchgeführt wird. Das im Rahmen des Stupp-Schemas verwendete Chemotherapeutikum Temodal (Wirkstoff Temozolomid) bzw. dessen physiologisch aktiver Metabolit MITC (5-(3-Methyl)-1-Triazen-1-yl-imidazol-carboxamid) entfaltet seine Wirkung, indem es spezifisch das mittlere Guanin einer GGG-Sequenz methyliert, was durch ineffektive DNA-*Mismatch*-Reparaturen schließlich zur Apoptose der Tumorzelle führt (Mason *et al.* 2005). Da sich die Glioblastomzellen jedoch häufig als resistent gegenüber den verwendeten Therapiemaßnahmen erweisen, kommt es trotzdem in der Regel zu Rezidiven. Ein sehr gut untersuchter Mediator der Chemotherapieresistenz ist ein zelleigene Reparaturenzym, die O⁶-Methylguaninmethyltransferase (MGMT), die durch Temozolomid verursachte Methylierungen effektiv entfernt und somit die Wirksamkeit dieses Chemotherapeutikums vermindert. Allerdings treten als epigenetische Veränderungen Methylierungen der CpG-Inseln in der MGMT-Promotorregion auf, so dass die MGMT-Expression eingestellt wird und das Chemotherapeutikum in vollem Umfang wirken kann. Diese Stilllegung des MGMT-Gens wirkt sich deutlich positiv auf den Erfolg der Chemotherapie mit Temozolomid aus (Paz *et al.* 2004, Hegi *et al.* 2004) und korreliert mit längerer Überlebensdauer. Zur Analyse des MGMT-

Promotormethylierungsstatus stehen unterschiedliche Untersuchungsmethoden zur Verfügung (Esteller *et al.* 1999, Vlassenbroeck *et al.* 2008, Hattermann *et al.* 2008b), die zur Zeit vor allem in klinischen Studien Anwendung finden, jedoch möglicherweise in Zukunft für eine auf molekularbiologischen Parametern basierende, individualisierte Therapiestrategie bedeutsam sein werden.

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der O⁶-Methylguaninmethyl-transferase gibt es weitere, möglicherweise therapierelevante molekularbiologische Parameter in der translationalen Forschung („from bench to bedside“), jedoch haben diese noch nicht in einem vergleichbaren Maß Einzug in den klinischen Alltag gefunden.

Tabelle 1: Schwerpunktgebiete der Forschung an humanen Gliomen. Auswahl von Forschungsaspekten und den jeweiligen relevanten molekularbiologischen Parametern an humanen Gliomen.

Einfluss auf die Tumorigenese	Molekularbiologischer Parameter	Publikationen
Proliferation / Überleben	EGFR-Amplifikation /-Mutation	Schlegel <i>et al.</i> 1994
	PDGF-Expression	Maxwell <i>et al.</i> 1990
	TGFβ	Jennings <i>et al.</i> 1991
Zellzykluskontrolle	CDKN2A Deletion	Schmidt <i>et al.</i> 1994
	RB1-Deletion	Ueki <i>et al.</i> 1996
Tumorsuppressorgene	p53-Mutation/-Verlust	Sidranski <i>et al.</i> 1992
	PTEN-Mutation/-Verlust	Li et a. 1997
Therapieresistenz	MGMT-Methylierungsprofil	Esteller <i>et al.</i> 1999
	MDR1-Expression	Demeule <i>et al.</i> 2001
Migration / Invasion	Matrixmetalloproteinase (MMPs)	VanMeter <i>et al.</i> 2001
Angiogenese	VEGF-Überexpression	Plate 1992
	Hypoxie / HIF1α-Signalweg	Damert <i>et al.</i> 1997

1.2 Die Tumorstammzellhypothese

Die Prozesse der frühen Tumorigenese sind ein wesentlicher Aspekt aller tumorbiologischen Untersuchungen, da sie Ansatzpunkte für Ursachen, Therapiestrategien und Prophylaxe liefern können. Eine wichtige Hypothese zur Erklärung der Tumorentstehung ist die Tumorstammzellhypothese, die eine sehr kleine Population von tumor-initiiierenden Zellen mit Stammzellcharakter (Oberflächenmarker, ATP-abhängige Transporter) postuliert.

Bereits 1937 konnten Jacob Furth und Morton Kahn zeigen, dass eine einzige in eine Maus injizierte Zelle einer leukämischen Zelllinie ausreichen konnte, um diese systemische Erkrankung auf das Wirtstier zu übertragen. In den 1960er und 1970er Jahren konnte analog zu Untersuchungen der Hämatopoiese (*Colony-forming assays*) gezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil von Zellen aus primärem Tumorgewebe in der Lage ist, erneut Tumorzustand *in vitro* und *in vivo* hervorzurufen (Bruce & Van der Gaag 1971; Park *et al.*

1971, Hamburger & Salmon 1977). Diese Befunde stützen die Annahme, dass eine funktionale Heterogenität der Zellen innerhalb eines Tumors besteht und nur eine sehr kleine Subpopulation von Tumorzellen mit bestimmten molekularbiologischen Merkmalen das Potential für Initiation und Wachstum des Tumors besitzt. Neben der Expression definierter Oberflächenmarker ist auch die Selbsterneuerung ein solches Charakteristikum, das die tumor-initiiierenden Zellen mit adulten Stammzellen teilen.

Jüngere Studien haben ergeben, dass das Tumorstammzellkonzept nicht auf die Pathogenese von Leukämien beschränkt ist, sondern möglicherweise auf eine ganze Reihe von soliden Tumoren übertragbar ist. Durch Injektion von hochverdünnten Tumorzellsuspensionen in immundefiziente Mäuse konnte bisher unter anderem das tumorigene Potential einer Subpopulation von Mammakarzinomzellen (Al-Hajj *et al.* 2003), Glioblastomzellen (Singh *et al.* 2003) und Prostatakarzinomzellen (Collins *et al.* 2005) nachgewiesen werden, während der Großteil der Tumorzellen im Xenograft-Modell keinen Tumor auszulösen vermochte.

Orientiert an den Erkenntnissen über die Entstehung anderer Tumoren entwickelte sich die Hypothese, dass Glioblastomstammzellen durch die Entartung von adulten neuralen Stammzellen oder frühen neuralen Progenitorzellen entstehen können und somit spezifische Merkmale mit diesen Zellpopulationen gemeinsam haben (Abbildung 2, nach Clarke *et al.* 2004).

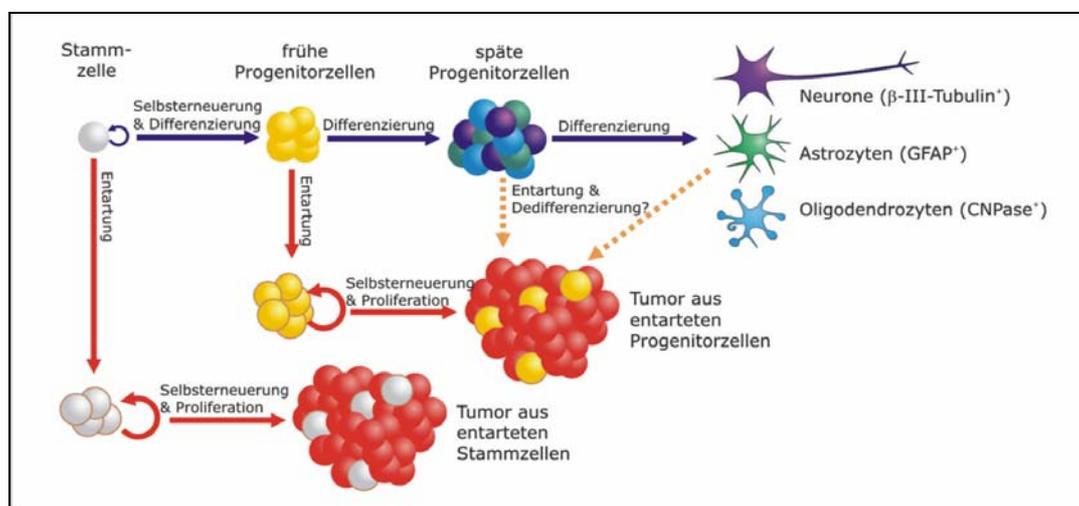


Abbildung 2: Hierarchie der Gehirnzellen und mögliche Pfade der Entstehung von Gliomen. (Nach Clarke *et al.* 2004) Aus der adulten neuralen Stammzelle (CD133+, Musashi-1+ u.a.) gehen Neurone (β -III-Tubulin+, MAP2+, u.a.), Astrozyten (GFAP+, u.a.) und Oligodendrozyten (CNPase+, MBP+, u.a.) hervor. Frühe Progenitorzellen erlauben teilweise noch eine Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen, in späteren Progenitorzellen ist das Schicksal schon festgelegt. Glioblastomstammzellen entwickeln sich möglicherweise aus adulten neuralen Stammzellen oder frühen Vorläuferzellen. Eine Entartung und Dedifferenzierung von höher entwickelten Zelltypen ist denkbar, scheint aber mittlerweile experimentell widerlegt (Brandner *et al.* 2008).

In initialen Isolationsexperimenten von Glioblastomstammzellen wurde daher CD133, ein Marker für neurale Stamm- und frühe Vorläuferzellen als Sortierungskriterium verwendet

(Singh *et al.* 2003). Nur wenig später gelang es, aus Tumorgewebe isolierte Glioblastomzellen mit hohem tumorigenem Potential zu kultivieren und näher zu charakterisieren (Galli *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2004). Diese Kultivierung erfolgte nach einem Modell, das zur Kultivierung und Anreicherung adulter neuraler Stammzellen aus der subventrikulären Zone entwickelt wurde (Reynolds & Weiss 1992). Unter serumfreien Bedingungen in einem definierten Mangelmedium und unter Zugabe von entsprechenden Wachstumsfaktoren (EGF und bFGF) proliferiert das isolierte Zellgemisch aus Stamm- und Progenitorzellen und bildet dreidimensionale Zellaggregate, so genannte Neurosphären. Durch wiederholte Vereinzelung der Zellen wird eine Anreicherung der adulten neuralen Stammzellen erzielt. Diese Stammzellen zeigen in Kultur eine hohe Proliferationsrate und Selbsterneuerung über längere Zeiträume, im Gegensatz zu den meisten differenzierten Zellen des Zentralnervensystems, die *in vitro* nur noch eine begrenzte Teilungs- und Überlebenskapazität besitzen. Dieses Kultivierungsmodell wurde erfolgreich auf die Kultivierung von Glioblastomstammzellen übertragen und konnte zur Anreicherung von Glioblastomzellen mit hohem tumorigenem Potential genutzt werden.

In weiterführenden Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass nicht nur CD133-exprimierende Zellen unter definierten Stammzellbedingungen expandierten, sondern dass auch CD133-negative Tumorzellen unter diesen Bedingungen Neurosphären bildeten, Selbsterneuerung zeigten und bei Injektion in immundefiziente Mäuse erneut Tumoren hervorriefen (Beier *et al.* 2007). Die Definition der Glioblastomstammzelle allein über den Oberflächenmarker CD133 muss heute in Frage gestellt werden, zumal auch die gezielte Einwanderung gesunder adulter neuraler Stamm- und Progenitorzellen in Glioblastome dokumentiert wurde (Aboody *et al.* 2000, Ehtesham *et al.* 2004) und aktuelle Untersuchungen eindeutig die nahe Verwandtschaft beziehungsweise funktionelle Entsprechung von CD133⁺ und CD133⁻ Glioblastom-initiiierenden Tumorzellen zeigten (Günther *et al.* 2008, Phillips *et al.* 2008).

Glioblastomstammzellen befinden sich im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der anwendungsorientierten Therapieentwicklung.

1.3 Die Chemokinsuperfamilie

1.3.1 Klassifizierung der Chemokine

Die komplexe Superfamilie der Chemokine umfasst eine Gruppe von kleinen, meist löslichen Peptidmediatoren mit einer Größe von 6 – 14 kDa. Ihre initiale Charakterisierung und ihr Name leiten sich von ihrer biologischen Funktion als Chemotaxis vermittelnde Zytokine ab, die sie auf eine Vielzahl von Leukozyten ausüben. Es stellte sich jedoch heraus, dass Chemokine von vielen verschiedenen Zellpopulationen gebildet werden und die Rekrutierung von Leukozyten bei weitem nicht der einzige Effekt ist, der von ihnen vermittelt wird. So

unterstützen sie beispielsweise die Entwicklung von Lymphozyten (Campbell *et al.* 1999), nehmen Einfluss auf das Netzwerk der Zytokininteraktionen (Sherry *et al.* 1992), verändern das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen (Huber *et al.* 1991), verstärken die Proliferationsrate (Hogaboam *et al.* 1999), regulieren die Angiogenese (Strieter *et al.* 1995), ermöglichen die Interaktion von Zellen gegen virale Infektionen (Cocchi *et al.* 1995), nehmen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung (Luca *et al.* 1997), regulieren die Hämatopoiese (Broxmeyer & Kim 1999) und aktivieren das angeborene Immunsystem (Hachicha *et al.* 1998).

Tabelle 2: Bekannte Chemokine und ihre Synonyme. (Nach Murphy *et al.* 2000, ergänzt)

<i>offizieller Name</i>	<i>Synonym</i>	<i>offizieller Name</i>	<i>Synonym</i>
CXC-Chemokine (α)		CC-Chemokine (β)	
CXCL1	GRO- α , MGSA, MIP-2	CCL1	I-309
CXCL2	Groß, MIP-2 α	CCL2	MCP-1
CXCL3	Groy, MIP-2 β	CCL3	MIP-1 α , LD78
CXCL4	Platelet-factor-4	CCL3L1	LD78 β
CXCL5	ENA-78	CCL3L2	LD78 γ
CXCL6	GCP-2	CCL4	MIP-1 β
CXCL7	PPBP	CCL5	RANTES
CXCL8	IL8	CCL6	C10
CXCL9	Mig	CCL7	MCP-3
CXCL10	γ IP-10	CCL8	MCP-2
CXCL11	I-TAC	CCL9	MRP-2
CXCL12	SDF-1 α	CCL10	MIP-1 γ , CCF18
CXCL13	BCA-1	CCL11	Eotaxin
CXCL14	BRAK	CCL12	MCP-5
CXCL16	SCYB16,SR-PSOX	CCL13	MCP-4
CXCL17	VCC-1, DMC	CCL14	CC-1
CXCL18	MIP-4, PARC	CCL15	HCC-2
		CCL16	HCC-4
		CCL17	TARC
		CCL18	DC-CK-1
		CCL19	MIP-3 β
		CCL20	MIP-3 α
		CCL21	6CKine
		CCL22	MDC
		CCL23	MPIF-1
		CCL24	MPIF-2
		CCL25	TECK
		CCL26	Eotaxin-3
		CCL27	ESKine
		CCL28	MEC, CCK1
C-Chemokine (γ)			
XCL1	Lymphotactin α		
XCL2	Lymphotactin β		
CX3CL-Chemokin (δ)			
CX3CL1	Fraktalkine		

Die etwa 50 bekannten Mitglieder der Chemokinsuperfamilie lassen sich anhand von konservierten cysteinhaltigen Motiven in vier Untergruppen aufteilen (Zlotnik & Yoshie 2000,

Tabelle 2 und Abbildung 3). Entscheidend für die Einordnung sind die ersten beiden N-terminalen Cysteinreste, die entweder durch eine andere, nicht konservierte Aminosäure getrennt (CXC- oder α -Chemokine), direkt benachbart (CC- oder β -Chemokine) oder durch drei andere, nicht konservierte Aminosäuren voneinander getrennt sein können (CX3C- oder δ -Chemokine). Im Fall der C- oder γ -Chemokine steht ein Cysteinrest allein. Die Cysteinreste bilden jeweils eine Disulfidbrücke zu einem bzw. zwei weiteren Cysteinresten innerhalb des Moleküls aus (Baggiolini *et al.* 1997; Murphy *et al.* 2000). Die Chemokine der α - und β -Familie haben eine konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur, die mit einer flexiblen, ausgedehnten N-terminalen Schleife beginnt. Nach dem charakteristischen Cysteinest-Motiv folgen dann eine kleine Helix mit nur einer Windung, drei antiparallele β -Faltblätter und schließlich eine α -Helix kurz vor dem C-terminalen Ende (Allen *et al.* 2007, Abbildung 3). Die Cysteinreste, die mit den N-terminalen Cysteinresten eine Disulfidbrückenbindung eingehen, befinden sich in den Schleifen, die erstes und zweites Faltblatt bzw. drittes Faltblatt und α -Helix verbinden.

Die Gruppe der α -Chemokine umfasst 30 Mitglieder, deren Gene beim Menschen auf dem Chromosom 4 lokalisiert sind. Sie lassen sich in zwei Untergruppen, jeweils mit oder ohne N-terminale ERL-Sequenz (Glutamat-Leucin-Arginin), einteilen. ERL⁺-Chemokine wirken vor allem auf Neutrophile, ERL⁻-Chemokine hingegen auf Lymphozyten (Strieter *et al.* 1995).

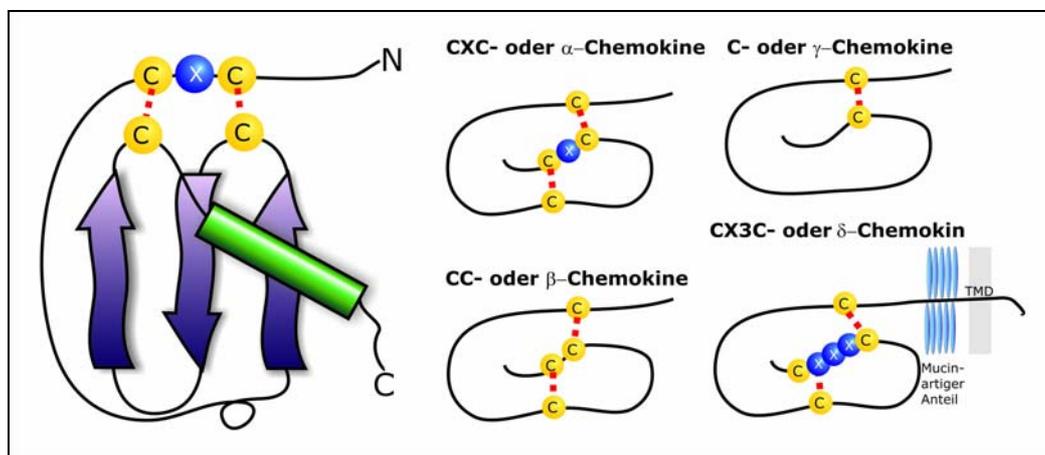


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Chemokinfamilien. In den Familien der α -, β - und δ -Chemokine folgt auf die variable N-terminale Schleife eine einwindige Helix, drei anti-parallel ausgerichtete β -Faltblätter und eine α -Helix kurz vor dem C-terminalen Ende. Die Disulfidbrücken bilden sich zwischen den ersten beiden N-terminalen Cysteinresten und jeweils einem Cysteinrest in der 30s-Schleife zwischen dem ersten und dem zweiten Faltblatt und in der 50s Schleife zwischen dem dritten Faltblatt und der α -Helix aus. Fraktalkine (CX3CL1) besitzt am N-Terminus einen Mucin-ähnlichen Anteil, eine hydrophobe Domäne, die die Zellmembran durchspannt und einen intrazellulären N-Terminus. Die beiden Mitglieder der γ -Chemokinfamilie weisen keine vergleichbar konservierte Tertiärstruktur auf.

Darüber hinaus unterschieden sich CXC-Chemokine mit und ohne ELR-Motiv auch in ihrer Beeinflussung von Angiogenese-Prozessen: ELR⁺-Chemokine gelten als Angiogenese-fördernde Faktoren, die *in vitro* die Proliferation und Migration von Endothelzellen und *in vivo*

die Angiogenese fördern (Koch *et al.* 1992, Strieter *et al.* 1995). Der pro-angiogenetische Effekt wird zumeist durch den auf Endothelzellen exprimierten Rezeptor CXCR2 vermittelt. Die ELR- Chemokine hingegen inhibieren die Wirkungen von Angiogenese-fördernden Faktoren, wie z.B. VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und FGF (*Fibroblast growth factor*), jedoch ist nicht bekannt, welcher Rezeptor diesen Effekt vermittelt (Locati & Murphy 1999).

Von der β -Gruppe sind bisher beim Menschen 18 Mitglieder bekannt, deren Gene auf dem Chromosom 17 liegen. Diese Chemokine wirken u.a. auf Monozyten und Makrophagen, Basophile, Eosinophile, Dendritische Zellen, NK-Zellen und T-Lymphozyten (Taub *et al.* 1993, Rollins 1997, Luster 1998).

Die Struktur von Fraktalkine, dem einzigen bekannten Vertreter der CX₃C- oder δ -Chemokine ähnelt der Struktur der CC- und der CXC-Chemokine, jedoch besitzt Fraktalkine am N-terminalen Ende zusätzlich einen Mucin-artigen Anteil, an den sich eine Transmembrandomäne und ein intrazellulärer Anteil anschließt. Damit nimmt Fraktalkine zusammen mit einem Mitglied der CXC-Familie, dem ebenfalls membranständigen Chemokin CXCL16, eine Sonderstellung unter den ansonsten löslichen Chemokinen ein. Fraktalkine und CXCL16 können durch proteolytische Spaltung (z.B. ADAM 10 und ADAM 17; Ludwig *et al.* 2005) freigesetzt werden. Fraktalkine wird unter anderem von Endothelzellen produziert, nachdem diese durch Zytokine aktiviert worden sind.

Die Familie der γ -Chemokine umfasst beim Menschen nur zwei Mitglieder: Lymphotactin- α /XCL1 und Lymphotactin- β /XCL2 (Kelner *et al.* 1994, Yoshida *et al.* 1995). Lymphozyten und NK-Zellen sind Zielzellen dieser Chemokine (Hedrick *et al.* 1997).

Neben der strukturellen Einteilung ergibt sich auch eine physiologische Einteilung, da die Chemokine verschiedene Funktionen übernehmen. Hierbei lassen sich drei Gruppen unterscheiden. Die inflammatorischen Chemokine zeichnen sich durch ihre Induzierbarkeit aus. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen im Falle einer Entzündungsreaktion (Infektion, Tumor). Homöostatische Chemokine werden konstitutiv exprimiert und steuern die kontinuierliche Wanderung der Lymphozyten durch gesundes Gewebe. Darüber hinaus sind sie beteiligt an der Hämatopoiese und an der Einleitung der adaptiven Immunantwort. Neben den inflammatorischen und den homöostatischen Chemokinen gibt es auch noch diejenigen, die beide Funktionen übernehmen. Sie sind essentiell für die Zellmigration und die interzelluläre Kommunikation (Mantovani *et al.* 1999, Moser 2003, Moser *et al.* 2004).

1.3.2 Chemokinrezeptoren

Chemokine binden an Chemokinrezeptoren, die zu der Familie der heptahelikalen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ gehören (Baggiolini *et al.* 1997; Murphy *et al.*

2000). Heute sind mehr als 20 Chemokinrezeptoren bekannt (Tabelle 3), die entsprechend der Struktur ihrer Liganden ebenfalls in vier Gruppen eingeteilt werden (CCR, CXCR, CX3CR, XCR). Das Molekulargewicht der Aminosäuresequenzen der Chemokinrezeptoren liegt bei ungefähr 40 kDa, jedoch variiert das tatsächliche Molekulargewicht durch unterschiedlich hohe Glykosylierungsanteile. Alle Chemokinrezeptoren besitzen die typische Struktur der heptahelikalen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben membran-durchspannenden α -Helices, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Das N-terminale Ende befindet sich im extrazellulären Raum, das C-terminale Ende liegt im Zytoplasma. An diesem C-Terminus findet man Serin- und Threoninreste, die für die Rezeptorregulation von Bedeutung sind.

Tabelle 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden. (nach Allen *et al.* 2007)

<i>Rezeptor</i>	<i>Liganden</i>
CC-Rezeptoren	
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	CCL2; CCL7, CCL8, CCL13, CCL16
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL24, CCL26, CCL28
CCR4	CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, CCL28
CCR11	CCL19, CCL21, CCL25
CXC-Rezeptoren	
CXCR1	CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3-A	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR3-B	CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL11, CXCL12
XC-Rezeptor	
XCR1	XCL1, XCL2
CX3C-Rezeptor	
CX3CR1	CX3CL1
Rezeptoren ohne Signalweiterleitung (Decoy-Rezeptoren)	
D6	CCL2, CCL3L1, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL11, CXCL13, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16, CCL17

Nach Rezeptoraktivierung werden diese Aminosäurereste phosphoryliert, worauf die Internalisierung des Rezeptors folgt. Der Rezeptor wird entweder degradiert oder nach der Dephosphorylierung wieder an die Zelloberfläche zurücktransportiert (Abbildung 4). Dieser Prozess ermöglicht eine Aufrechterhaltung der Sensitivität für chemotaktische Reize (Murphy

et al. 2000).

Innerhalb der Familie der Chemokinrezeptoren gibt es keine einzelne typische Signatur, sondern mehrere auffällige Merkmale, die vermehrt in dieser Familie vorkommen. Dies sind z.B. eine Länge von 340-370 Aminosäuren, ein saures, N-terminales Segment, die Sequenz DRYLANHA (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Asn-His-Ala) oder eine Variante in der zweiten intrazellulären Schleife, eine kurze, basische dritte intrazelluläre Schleife sowie jeweils ein Cysteinrest in allen vier extrazellulären Domänen (Murphy *et al.* 2000).

Fast alle Rezeptoren binden mehrere Liganden mit hoher Affinität (Tabelle 3). Alle Rezeptoren haben eine Spezifität für bestimmte Chemokinmuster und Leukozytensubpopulationen (Murphy *et al.* 2000). Innerhalb der inflammatorischen Chemokine gibt es Überlappungen in diesen „Zuständigkeitsbereichen“. Die funktionelle Ursache für diese Redundanz ist bisher unklar, möglicherweise dient sie der Feinregulation von Immunreaktionen (Mantovani 1999, Devalaraja & Richmond 1999). Die Überlappung von Rezeptoren und Liganden scheint aber der Grund dafür zu sein, dass Rezeptor- oder Ligandendefizienz im gesunden Organismus keinen Phänotyp hervorruft, solange kein pathologischer Status vorliegt (Power 2003).

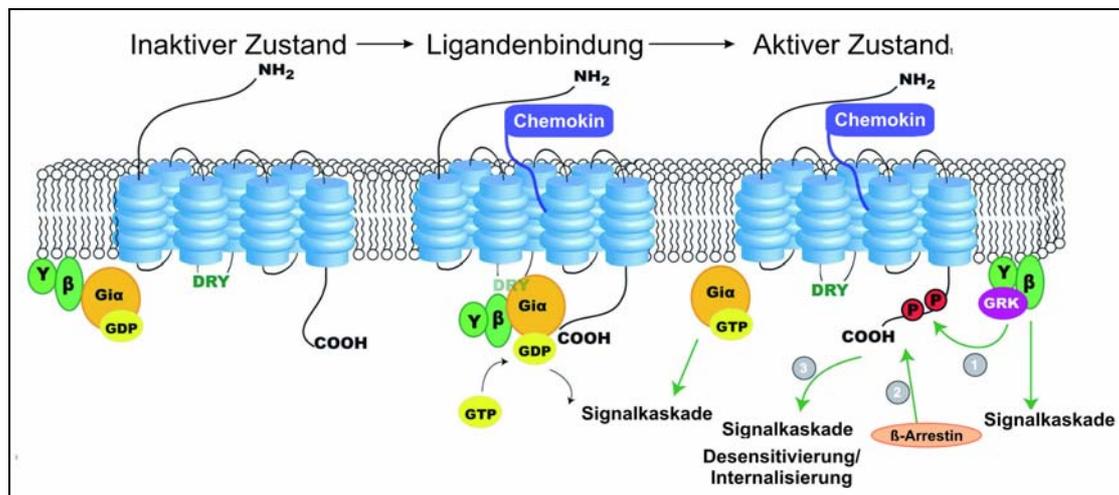


Abbildung 4: Aktivierung und Desensibilisierung des Chemokinrezeptors. Modifiziert nach O’Hayre *et al.* 2008. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor zerfällt das heterotrimeres G-Protein in seine aktiven Einheiten und löst die Signalkaskade aus, die eine zelluläre Antwort hervorruft. Der Rezeptor wird phosphoryliert und nach Bindung von β -Arrestin internalisiert und lysosomal abgebaut oder später an der Zelloberfläche reexprimiert.

Die Signalweiterleitung der Chemokinrezeptoren nach Aktivierung durch einen Liganden erfolgt über ein heterotrimeres G-Protein (Untereinheiten G_α , G_β und G_γ), das an die intrazellulären Schleifen des Chemokinrezeptors assoziiert ist. Bindet ein Chemokin an den Rezeptor, so wird ein Konformationszustand stabilisiert, der zur Aktivierung der GTPase-Domäne der G_α -Untereinheit und schließlich zur Dissoziation des G-Proteins in G_α -Untereinheit und $G_{\beta\gamma}$ -Heterodimer führt. Nachfolgend kann die Phospholipase C (PLC) aktiviert werden, die Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol

1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ führt zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium; dieses hat eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Folge. Die aktivierte PKC katalysiert die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die schließlich eine zelluläre Antwort auf das Chemokin zur Folge hat (Abbildung 4). Neben den G_β- und G_γ-Untereinheiten ist auch die inhibitorisch wirkende G_{αi}-Untereinheit an der Signaltransduktion beteiligt. Dies wird durch eine Inhibition des chemotaktischen Effektes durch das Toxin von *Bordatella pertussis* belegt (Spangrude *et al.* 1985, Rollins 1997). Durch die Signaltransduktionskaskade werden verschiedene Effekte vermittelt, z.B. gerichtete und ungerichtete Migration, gesteigerte Proliferation, Produktion bestimmter Zytokine sowie Angiogenese.

Der Rezeptor wird nach seiner Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) phosphoryliert, was eine Bindung des Proteins Arrestin an den zytoplasmatischen Rezeptorteil ermöglicht. Arrestin verursacht nun zwei Effekte, zum einen blockiert es die Bindungsstelle des heterotrimeren G-Proteinkomplexes (Desensitivierung des Rezeptors), andererseits vermittelt es die Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-beschichteten Vesikeln (Neel *et al.* 2005). Der internalisierte Rezeptor wird nun entweder lysosomal abgebaut oder durch Rücktransport an die Zelloberfläche reexprimiert.

Obwohl Chemokine und Chemokinrezeptoren sich evolutionär betrachtet höchstwahrscheinlich als antimikrobielle Abwehrmechanismen entwickelt haben, werden sie von einigen pathogenen Mikroorganismen zur Infektionsförderung ausgenutzt. Einerseits exprimieren humane Herpesvirenstämme auf ihren Wirtszellen unterschiedliche virale Chemokinrezeptoren (so genannte *pirate chemokine receptors*). Diese besitzen eine Bindungsaffinität für eine Vielzahl von Chemokinen, können aber auch konstitutiv aktiv sein und mitogene und angiogenese-fördernde Effekte ausüben, die z.B. tumorfördernd bei Karposi-Sarkomen wirken (Gao & Murphy 1994, Arvanitakis *et al.* 1997). Andererseits verwenden intrazelluläre Pathogene bestimmte Chemokinrezeptoren als Eintrittspforte in die Zelle, z.B. tritt der Malariaerreger *Plasmodium vivax* über den Rezeptor DARC / Duffy in die Wirtszelle ein (Horuk *et al.* 1993). Auch das Humane Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) nutzt Chemokinrezeptoren beim Eintritt in die Wirtszelle. HIV-1 dringt durch Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran in die Zelle ein. Primärer zellulärer Rezeptor hierfür ist CD4, das u.a. auf bestimmten T-Lymphozyten (T-Helferzellen), Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, und als Korezeptor ist zusätzlich ein Chemokinrezeptor erforderlich (Feng *et al.* 1996). Die *in vivo* am besten dokumentierten Rezeptoren sind CCR5 und CXCR4, die abhängig vom jeweiligen Erregerstamm genutzt werden. Viele andere Chemokinrezeptoren und strukturell verwandte *Orphan*-Rezeptoren zeigten *in vitro* ebenfalls die Eigenschaften eines HIV-1- Korezeptors (CCR2, CCR3, CCR8, CXCR6, CX3CR1, u.a.; Berger 1997, Rucker *et al.* 1997).

1.3.3 Chemokine im Zentralnervensystem

Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen nicht nur in der Immunabwehr eine zentrale Rolle, sondern werden auch im Gehirn auch auf mikrovaskulären Endothelzellen, Neuronen, Astroglia, Mikroglia und Meningealzellen (Rossi & Zlotnik 2000, Ambrosini & Aloisi 2004) exprimiert. Es wird diskutiert, dass ein Chemokin-Chemokinrezeptor-Netzwerk neben den Neurotransmittern und den Neuropeptiden im Gehirn eine dritte wichtige Regulationsfunktion einnimmt (Adler & Rogers 2005). Einige Chemokine werden im Gehirn konstitutiv exprimiert wie z.B. CXCL12 und CX3CL1, während andere (z.B. CXCL8 und CCL2) erst nach einem bestimmten Signal induziert werden (Asensio & Campbell 1999).

Bei der Gehirnentwicklung beeinflussen Chemokine unter anderem die neuronale Musterbildung (Reiss *et al.* 2002) und die Proliferation und das Migrationsvermögen glialer Vorläuferzellen (Hattermann *et al.* 2008a).

Tabelle 4: Chemokinüberexpression in neuroinflammatorischen Modellen. (nach Asensio & Campbell 1999)

<i>Pathologisches Bild</i>	<i>Chemokine</i>
Demyelinierungserkrankungen	
Multiple Sklerose	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8
Exp. autoimmune Enzephalomyelitis	CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7
Neurodegenerative Erkrankungen	
Morbus Alzheimer	CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8
HIV Demenz	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5
Schlaganfall	CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3
Hirnverletzung	CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL12, CCL23
Bakterielle Infektionskrankheiten	
bakterielle Meningitis	CXCL1, CXCL2, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4
Virale Infektionskrankheiten	
SIV Enzephalitis	CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7
Lymphozytäre Choriomeningitis	CXCL10, CCL2, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7
Herpes Simplex Virus Enzephalitis	CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4, CCL5, CCL7

Neben den normalen Funktionen, die das Chemokin-Chemokinrezeptor-Netzwerk im gesunden Gehirn einnimmt, spielt es auch unter pathologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle. Insbesondere in neuroinflammatorischen Erkrankungen sind die Chemokinexpressionsmuster gut untersucht (Tabelle 4; nach Asensio & Campbell 1999). Neuere Untersuchungen zeigen außerdem, dass Chemokine offenbar eine tragende Rolle in der Vermittlung und Modulation von Schmerzzuständen spielen (Knerlich-Lukoschus *et al.* 2008, White & Wilson 2008).

1.3.4 Chemokine in der Tumorbiologie

Tumoren gehen häufig aus chronischen Entzündungen hervor und weisen selbst

Entzündungsmerkmale (Expression von Entzündungsmediatoren, Einwanderung von Immunzellen) auf. Ebenso wie in regulären Entzündungsprozessen vermitteln Chemokine auch in der Tumorphathogenese eine Vielzahl von Effekten. Einerseits fördern sie die Metastasierung der Tumorzellen in entfernte Organe. So wurde eine spezifische Absiedlung von CXCR4-exprimierenden Mammakarzinomzellen in CXCL12-produzierende Organe beschrieben (Müller *et al.* 2001). CCR10-tragende Tumorzellen streuen häufig in die CCL27-produzierende Haut, während CCR7-exprimierende Tumoren häufig Metastasen in den Lymphknoten bilden, in denen der CCR7-Ligand CCL21 sezerniert wird (Kakinuma & Hwang 2006).

Andererseits schaffen Chemokine auch geeignete Umgebungsverhältnisse für den Tumor oder die Metastasen und wirken parakrin oder autokrin als Proliferations- oder Überlebenssignal für die Tumorzelle. Die Mikroumgebung des Tumors ähnelt in vielerlei Hinsicht der eines entzündeten Gewebes. Beide enthalten eine große Anzahl an Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, die von einem komplexen Netzwerk an Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen rekrutiert und aktiviert werden. Im Gegensatz zur geordneten Morphologie des nicht-neoplastischen Gewebes verbleibt das Tumorgewebe jedoch in einem Zustand chronischer Entzündung mit unstrukturiert proliferierender Tumormasse, abnormaler Vaskularisierung und Persistenz der Entzündungsmediatoren. Innerhalb der Tumorumgebung spielen Chemokine hier eine Rolle in der Modulation der Angiogenese, Zellrekrutierung, Proliferation und des Überlebens und tragen somit entscheidend zur Progression des Tumors bei.

Dabei wird der Effekt des Chemokin-Chemokinrezeptor-Netzwerks häufig durch die in der Tumorumgebung herrschenden Bedingungen parakrin oder autokrin verstärkt: Die Expression von Chemokinrezeptoren kann sowohl durch proinflammatorische Zytokine (z.B. Ludwig *et al.* 2005) als auch durch den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor*) erhöht werden (Bussilo & Benovic 2007).

Viele Chemokine der CC- und CXC-Familien fördern Proliferation und Metastasierung der unterschiedlichsten Tumoren, indem sie selbst als mitogener Faktor wirken oder über rezeptorvermittelte Migration Ein- oder Auswanderungsprozesse fördern (O'Hayre *et al.* 2008). Für einige dieser Chemokine konnte nachgewiesen werden, dass die Invasionssteigerung durch eine Induktion bestimmter Proteasen aus der Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) hervorgerufen wird, die die Extrazellulärmatrix zersetzen und so eine Migration der Tumorzellen durch Extrazellulärräume ermöglichen (z.B. Luca *et al.* 1997, Übersicht in O'Hayre *et al.* 2008).

Angiogenese fördernde ELR⁺-Chemokine der CXC-Chemokinfamilie, die über die Rezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR4 ihre Signale vermitteln, tragen wesentlich dazu bei, dass der stetig wachsende Tumor vaskularisiert und somit besser mit Blut versorgt wird.

So schaffen sie die Voraussetzung für eine weitere Vergrößerung des Primärtumors. Gleichzeitig wird das Eindringen von Tumorzellen in den Blutstrom begünstigt, sodass die Fernmetastasierung erleichtert wird. Die Neovaskularisierung setzt voraus, dass Endothelvorläuferzellen rekrutiert werden, proliferieren und sich der zukünftigen Gefäßbahn entsprechend ausrichten. Diese Vorgänge werden durch Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren vermittelt (Abbildung 5).

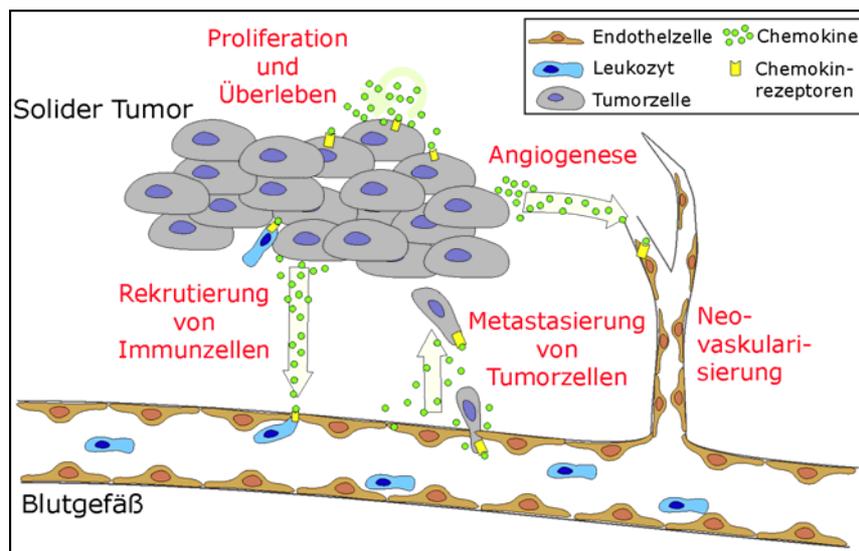


Abbildung 5: Chemokinvermittelte Effekte in der Tumorbildung. Abgewandelt nach Vandercappelen *et al.* 2008 und O'Hayre *et al.* 2008. Chemokine nehmen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen, fördern oder hemmen die Angiogenese, fördern das Auswandern und die Metastasierung von Tumorzellen und beeinflussen die Rekrutierung von Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen).

Schließlich wird auch die Anlockung und Einwanderung (*Homing*) von Makrophagen, Lymphozyten und Dendritischen Zellen in den Tumor durch Chemokine verursacht. Die Tumor-assoziierten Immunzellen können einen beträchtlichen Anteil der Tumormasse ausmachen. Obwohl sie als Boten des Immunsystems das Tumorstadium eindämmen sollen, können sie für den Tumor vorteilhaft wirken, da die Tumorzellen selbst durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Gewebsproteasen die Tumorzellen aktivieren, Proliferations- und Überlebenssignale senden und die Tumorprogression begünstigen.

Doch Chemokine können auch dem Tumorstadium entgegenwirken, wie z.B. die angiogenese-inhibierenden Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11, die über den Rezeptor CXCR3 (und seine Varianten) die Zelle erreichen und im Mausmodell sogar *in vivo* eine Reduktion des Tumors erzeugen können (Struyf *et al.* 2007). Außerdem zeigen kürzliche Untersuchungen, dass nicht-signalleitende Rezeptoren, wie z.B. DARC / Duffy und D6, tumorfördernde Chemokine der CC- und CXC-Familien binden, ohne dabei zelluläre Effekte auszulösen. Diese so genannten *Decoy-Rezeptoren* (*decoy*, engl. Lockvogel) werden dann internalisiert, wodurch die gebundenen Chemokine der Tumorumgebung

entzogen werden. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass eine höhere Expression von DARC mit geringerem Tumorwachstum, geringerer Angiogenese und geringerer Metastasierung in Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Prostatakarzinom und Mammakarzinom assoziiert ist (Addison *et al.* 2004, Shen *et al.* 2005, Wang *et al.* 2006).

Chemokine nehmen an einer Vielzahl von Prozessen in der Tumorigenese teil, daher sind sie auch für die Entwicklung von Therapeutika von großem Interesse. Verschiedene therapeutische Ansätze wie z.B. Rezeptorblockierung durch Antagonisten, blockierende Antikörper gegen Rezeptoren, viraler Gentransfer und intratumorale Injektion tumorhemmender Chemokine befinden sich jedoch größtenteils noch nicht auf anwendungsorientiertem Entwicklungsniveau.

1.4 Der Chemokinrezeptor CXCR7

Der Chemokinrezeptor CXCR7 wurde als so genannter *Orphan*-Rezeptor RDC1 (*orphan*, engl.: Waise; Rezeptor ohne bekannten Liganden) entdeckt. Er wurde initial aus einer DNA-Bibliothek der Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) des Hundes kloniert und basierend auf seiner Sequenzhomologie zu den Hormonrezeptoren als putativer G-Protein-gekoppelter 7-Transmembrandomänenrezeptor angesehen (Libert *et al.* 1989, Libert *et al.* 1990). Aufgrund der Ähnlichkeit zum humanen *Orphan*-Rezeptor GPRN1 (91 % Nukleotidsequenzhomologie, 94 % Proteinsequenzhomologie) wurden RDC1 und GPRN1 als hundspezifische bzw. humane Homologe eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors für den gastrointestinalen Neurotransmitters VIP (*Vasoactive intestinal peptide*) eingestuft (Sreedharan *et al.* 1991). Die Interaktion mit VIP wurde jedoch u.a. durch Radioligandenversuche mit ¹²⁵I-VIP (Nagata *et al.* 1992, Cook *et al.* 1992) und Gewebeexpressionsanalysen (Law *et al.* 1994) widerlegt.

Anschließend wurde der humane *Orphan*-Rezeptor RDC1 / CXCR7 als Rezeptor für das *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP, Kapas & Clark 1995) und später für Adrenomedullin (Martinez *et al.* 2000) angenommen. Jedoch wurde bereits kurz darauf durch gewebespezifische Expressionsanalysen gezeigt, dass RDC1 / CXCR7 weder als Rezeptor für CGRP noch für Adrenomedullin in Frage kommt (Charkravarty *et al.* 2000). Phylogenetische Analysen zeigten dann, dass RDC1 / CXCR7 in der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Rhodopsinfamilie zur Untergruppe der Chemokinrezeptoren gezählt werden muss (Joost & Methner 2002, Frederiksson *et al.* 2003).

Das Gen für RDC1 / CXCR7 besitzt Sequenzhomologien zu einigen anderen Chemokinrezeptoren, wie z.B. CXCR2 (43% Homologie) und liegt im humanen Genom in einem für Chemokinrezeptoren typischen Cluster mit den Genen für CXCR1, CXCR2 und CXCR4 auf dem Chromosom 2. Außerdem wurde gezeigt, dass RDC1 / CXCR7 ebenso wie viele andere Chemokinrezeptoren ein Korezeptor, also eine potentielle Eintrittspforte ins Zellinnere für HIV-1 (*Human immunodeficiency virus*) und den entsprechenden Affenerreger

SIV (*Simian immunodeficiency virus*) ist (Shimizu *et al.* 2000).

Erst 2005 konnte jedoch nachgewiesen werden, dass RDC1 / CXCR7 das Chemokin CXCL12 (SDF-1, *stromal-cell derived factor 1*) spezifisch bindet und nach der Bindung internalisiert wird (Balabanian *et al.* 2005). CXCL12 ist der einzige bekannte Ligand für CXCR4 und bis zu diesem Zeitpunkt war CXCR4 der einzige bekannte Rezeptor für CXCL12. Die Stimulation RDC1 / CXCR7-exprimierender B-Zellvorläufer mit CXCL12 führte zu einer Herunterregulation von RDC1 / CXCR7 auf Proteinebene und darüber hinaus wurde ein chemotaktischer Effekt von CXCL12 gemessen (Balabanian *et al.* 2005). Der ehemalige *Orphan*-Rezeptor RDC1 wurde umbenannt in CXCR7. Die Expression von CXCR7 konnte auch in anderen Zellen der Immunabwehr, nämlich in Monozyten, basophilen Granulozyten, reifen B-Zellen, NK-Zellen, einer kleinen Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen und Dendritischen Zellen, gezeigt werden (Infantino *et al.* 2006). Bei der Untersuchung der Bindungsaffinität vieler anderer bekannter Chemokine durch Radioligandenexperimente konnte außerdem die Bindung von CXCL11 (I-TAC, *Interferon-inducible T-cell α chemoattractant*) an CXCR7 nachgewiesen werden. CXCL11, das ebenso wie CXCL9 / Mig und CXCL10 / IP10 an den Rezeptor CXCR3 bindet, zeigte jedoch eine zehnfach geringere Bindungsaffinität an CXCR7 als CXCL12 (Burns *et al.* 2006, Sierro *et al.* 2007).

Der Phänotyp einer CXCR7^{-/-}-Maus zeigt, dass die Expression von CXCR7 unerlässlich ist für eine korrekte Herzentwicklung. Da CXCR7 im Embryonalstadium vor allem in der endothelialen Zellschicht des sich entwickelnde Herzens exprimiert wird, sind vor allem die Herzklappen von der Deletion des CXCR7-Gens betroffen. Aufgrund dieser Entwicklungsdefizite sterben 95% aller CXCR7^{-/-}-Mäuse in den ersten 24 Stunden nach der Geburt. Die überlebenden CXCR7^{-/-}-Mäuse zeigten keine Entwicklungsdefizite im Zentralnervensystem, im gastrointestinalen Gefäßsystem und im hämatopoietischen System, wohingegen insbesondere diese Entwicklungsprozesse in CXCR4- und CXCL12-defizienten Mäusen stark beeinträchtigt waren (Sierro *et al.* 2007, Gerrits *et al.* 2008).

Im Zentralnervensystem wurde die Expression von CXCR7 in Astrozyten, Neuronen und Blutgefäßen beschrieben (Schönemeier *et al.* 2008) und gezeigt, dass die Interaktion von CXCL12 mit CXCR4 oder CXCR7 die Regeneration ischämischer Hirnbereiche unterstützt, indem die Einsprossung von Blutgefäßen gefördert wird.

Die Expression von CXCR7 konnte bereits in soliden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, z.B. beim Prostatakarzinom (Wang *et al.* 2008), Mammakarzinom (Miao *et al.* 2007), Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Goldmann *et al.* 2008) und in verschiedenen kultivierten Tumorzelllinien (Meijer *et al.* 2008) beobachtet werden. Die biologische Bedeutung der CXCL12 / CXCR7-Interaktion scheint jedoch vom jeweiligen Zell- bzw. Gewebetyp abhängig. So vermittelt CXCL12 / CXCR7 in Dendritischen Zellen und T-Zellen Chemotaxis (Infantino *et al.* 2006, Balabanian *et al.* 2005). In Mammakarzinomzellen fördert die ligandenvermittelte

Aktivierung von CXCR7 die Zellproliferation (Burns *et al.* 2006), in Prostatakarcinomzellen hingegen die Invasivität und das Zellüberleben (Wang *et al.* 2008). In Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen korreliert die CXCR7-Expression mit einer Resistenz gegen Chemotherapeutika und somit einer schlechteren Prognose für die Patienten.

Obwohl bereits eine ganze Reihe von CXCL12 / CXCR7-vermittelten Effekten in gesunden und neoplastischen Geweben beschrieben worden sind, gibt es bisher keine Anhaltspunkte über die Signaltransduktionskaskade, die CXCL12 über Bindung an CXCR7 möglicherweise auslöst. Es gibt hingegen Untersuchungen, die gezeigt haben, dass über CXCR7 keine Kalziummobilisierung in der Zelle erfolgt (Balabanian *et al.* 2005). CXCR7 wird daher auch als möglicher weiterer Vertreter der nicht-signalleitenden Rezeptoren (*Decoy*-Rezeptoren) diskutiert.

Die Expression von CXCR7 in humanen Gliomen wurde bisher nicht untersucht. Seine Liganden CXCL11 und CXCL12 werden von Glioblastomen produziert (Honeth *et al.* 2006, Rempel *et al.* 2000). Insbesondere CXCL12 wird durch Interaktion mit seinem bisher bekannten Rezeptoren CXCR4 mit der Invasion von Progenitorzellen in den Tumor und Proliferation von CXCR4-exprimierenden Progenitorzellen in Glioblastomen in Verbindung gebracht (Ehtesham *et al.* 2004, 2006 und 2009).

1.5 Fragestellung

Das Chemokin CXCL12 und sein bis vor kurzem einziger bekannter Rezeptor CXCR4 spielen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle für Migration, Proliferation und Überleben von Zellen. Kürzlich wurde nun ein weiterer Rezeptor für CXCL12 beschrieben, der Chemokinrezeptor CXCR7.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie der Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Astrozytom- und Glioblastomgewebeproben zu untersuchen. Durch Immunfluoreszenzfärbungen sollten die Rezeptor-exprimierenden Zellen *in situ* näher charakterisiert werden. In einer geeigneten Glioblastomzelllinie sollten anschließend die durch CXCL12 und CXCR7 vermittelten Signaltransduktionswege sowie zelluläre Effekte, z.B. auf Migration, Proliferation und Apoptose untersucht werden.

Da die Expression von CXCR4 in anderen Untersuchungen auf einer bestimmten Glioblastomzellsubpopulation mit Stammzellcharakter festgestellt worden war, sollte die Kultivierung von stammzellartigen Glioblastomzellen etabliert werden, um eine Untersuchung der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression *in vitro* untersuchen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben und Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben stammen von Astrozytomen (WHO Grad I-IV), die in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, entnommen und freundlicherweise durch den Direktor, Professor Dr. H. M. Mehdorn, und die Leiterin des molekularbiologischen Forschungslabors, Professor Dr. Dr. J. Held-Feindt, zur Verfügung gestellt wurden. Die Resektionen waren medizinisch notwendig und die Patienten hatten im Vorwege einer Nutzung des entnommenen Tumorgewebes für wissenschaftliche Untersuchungen zugestimmt. Die jeweiligen Befunde wurden histopathologisch durch den Neuropathologen Dr. H. H. Hugo erstellt.

Nicht erkranktes Hirngewebe wurde vom Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert, mit Ausnahme jedoch derjenigen Proben, die für die Zellkultur verwendet wurden. Diese wurden so bald wie möglich aufbereitet.

Für die Präparation von murinen neuronalen Stammzellen wurden Hirne von früh postnatalen C57B6J-Mäusen (postnataler Tag 2-3) entnommen. Die Zuchttiere entstammten den Charles River Laboratorien in Les Oncins, Frankreich und wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein vermehrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Tumorzelllinien wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg erhalten oder wie unter 2.2.1 beschrieben in der Arbeitsgruppe selbst generiert. Humane Endothelzellen aus geborener Nabelschnur (HUVEC) wurden von Promocell erworben und maximal bis zur zehnten Subkultur verwendet.

2.1.2 Biochemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-/Bis-Lösung (29:1), 30%	Serva, Heidelberg
Agarose	Roth
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
Aquatex	Merck, Darmstadt
Blau / Orange-Beladungspuffer	Promega, Madison, WI, USA
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck
DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldichloridhydrat)	Sigma-Aldrich, München,
DNA-Leiter (100 bp DNA Ladder)	Promega

2. Material und Methoden

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, # 42430)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe,
Dulbecco's Modified Eagle Medium : Ham's F12 (1:1)	Gibco, Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix (Dinukleotidtriphosphat-Mischung)	Fermentas, Vilnius, Litauen
DTT (Dithiotreitol)	Biomol
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Eisessig	Roth
Entwicklerbad	Tetenal, Norderstedt
Ethanol, unvergällt	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fixierbad	Tetenal
FKS Gold (Fötales Kälberserum, teilsynthetisch)	PAA, Pasching, Österreich
Glutamin	Roth
Glycin	Roth
Hämalaun	Merck
Heparin	Sigma-Aldrich
HEPES (4, 2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure)	Merck
HUVEC-Medium plus Supplement	Promocell, Heidelberg
Immumount [®]	Thermo, Pittsburgh, USA
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Methanol	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumselenit Na ₂ SeO ₃	Sigma-Aldrich
Natronlauge (NaOH)	Roth
Nonidet-P40	Shell Chemicals, London, England
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Invitrogen
Proteinmarker (Page Ruler Prestained Protein Ladder)	Fermentas
Putrescindihydrochlorid NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂ · 2HCl	Sigma-Aldrich
Random Hexamer Primer	GE Healthcare, München
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth
SDS (Natrium-dodecylsulfat)	Serva
Sudanschwarz	Roth
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Sigma-Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
TMD-Substrat (3,3',5,5' Tetramethylbenzimidin)	Sigma-Aldrich
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck
TRIzol [®]	Invitrogen
Trypsin	Sigma-Aldrich
TrypEL™ Express	Gibco
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween-20	Fluka, über Sigma-Aldrich

2.1.3 Peptide, Enzyme und Hemmstoffe

bFGF (<i>basic fibroblast growth factor</i> , FGF2) *	Immunotools, Friesoythe,
CXCL11 (I-TAC, <i>Interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>) *	Tebu, Offenbach
CXCL12 (SDF-1 α ; <i>stromal-derived growth factor-1α</i>) *	Immunotools
DNase (RNase-frei)	Fermentas
EGF (<i>Epidermal growth factor</i>) *	Immunotools
Glycerolphosphat	Merck
Interleukin 1 β	RnD Systems, Wiesbaden
Interleukin 6	RnD Systems
Interleukin 15	RnD Systems
Insulin (aus Rinderpankreas, 10 mg / ml in 25 mM HEPES)	Sigma-Aldrich
Interferon γ *	Immunotools
LIF (leukemia inhibitory factor) *	Chemicon, Temacula, USA
Natriumvanadat NaVO ₃	Sigma-Aldrich
Progesteron	Sigma-Aldrich
Proteinase K (10 mg / ml)	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (40U / μ l)	Fermentas
RNase (DNase-frei) (20 mg / ml)	Sigma-Aldrich
TGF β 1 (<i>Tumor growth factor β1</i>)	Tebu
TNF α (<i>Tumor necrosis factor α</i>) *	Tebu
U0126	Biomol
VEGF A (<i>vascular endothelial growth factor A</i>)	RnD Systems

* rekombinant hergestellte Proteine / Peptide mit humanen Sequenzen

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Anwendung	Hersteller
anti-Akt	Kaninchen	WB (1:300)	Cell Signaling Tech., Beverly, USA
anti- β III-Tubulin	Maus	F-ICC (1:500)	AbD Serotec, Oxford, UK
anti-cleaved PARP	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-Caspase 3	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-Caspase 9	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-Caveolin-1	Kaninchen	WB (1:200)	Santa Cruz, CA, USA
anti-CD133	Ziege	F-ICC (1:100)	Santa Cruz
anti-CNPase	Maus	F-ICC (1:250)	Abcam, Cambridge, MA, USA
anti-CXCL12	Kaninchen	F-IHC (1:100)	Abcam
anti-CXCL16	Ziege	F-IHC (1:100)	RnD Systems
anti-CXCR4	Kaninchen	F-IHC (1:100), WB	Imgenex
anti-CXCR6	Maus	F-IHC (1:100)	RnD Systems
anti-CXCR7	Kaninchen	F-IHC (1:100), WB	Abcam
anti-ERK2 (p44/42)	Maus	WB (1:300)	Santa Cruz
anti-GFAP	Maus	F-IHC, F-ICC (1:100)	DAKO
anti-GAPDH	Kaninchen	WB 1:200	Santa Cruz

2. Material und Methoden

Antikörper	Spezies	Anwendung	Hersteller
anti-Iba1	Ziege	F-IHC (1:250)	Santa Cruz
anti-Ki67 (MIB1)	Maus	F-IHC (1:100)	DAKO
anti-MBP	Kaninchen	F-ICC (1:500)	Abcam
anti-Musashi	Maus	F-ICC (1:200)	RnD Systems
anti-Nestin	Maus	F-ICC (1:100)	RnD Systems
anti-NeuN	Maus	F-ICC (1:100)	Chemicon
anti-p65 (NF-κB)	Kaninchen	F-ICC (1:100)	Santa Cruz
anti-pAkt	Kaninchen	WB (1:300)	Cell Signaling Tech.
anti-pATF2 (Thr 71)	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-pELK (Ser383)	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-pERK(pp44/42)	Kaninchen	WB (1:300)	Cell Signaling Tech.
anti-pCREB	Kaninchen	WB (1:500)	Cell Signaling Tech.
anti-PECAM	Ziege	F-IHC (1:100)	Santa Cruz
anti-Sox2	Kaninchen	F-ICC (1:100)	Santa Cruz
anti-VEGF	Ziege	ELISA (0,8 µg/ml)	RnD Systems
anti-VEGF, biotinyliert	Ziege	ELISA (0,2 µg/ml)	RnD Systems

Sekundärantikörper und F(ab')₂-Fragmente

Markierung	Spezies	Spezifität	Anwendung	Hersteller
Alexa Fluor 488	Ziege	Maus	F-IHC (1:1000)	Invitrogen
	Esel	Kaninchen	F-IHC (1:1000)	Invitrogen
	Esel	Ziege	F-IHC (1:1000)	Invitrogen
Alexa Fluor 555	Ziege	Kaninchen	F-IHC (1:1000)	Invitrogen
	Esel	Ziege	F-IHC (1:1000)	Invitrogen
IgG F(ab') ₂ -Fragmente	Esel	Kaninchen	F-IHC (1:1000)	Dianova, Hamburg
Meerrettichperoxidase	Ziege	Kaninchen	WB (1:30000)	Santa Cruz
	Kaninchen	Maus	WB (1:20000)	DAKO

2.1.5 Gebrauchsfertige Kits

BioRad Protein Assay (Bradford Reagenz)	BioRad, München
CyQuant [®] Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, Invitrogen
ECL Advanced Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
PicoPure [®] RNA Isolation Kit	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
TaqMan [®] Universal Master Mix (20x)	Applied Biosystems, Forster City, USA

2.1.6 TaqMan® Primer und Sonden

Bezeichnung	ID-Nummer	Bezeichnung	ID-Nummer
18s rRNA	Hs99999901_s1	hGAPDH	Hs99999905_m1
hCD133	Hs00195682_m1	hGFAP	Hs00157674_m1
hCX3CL1	Hs00171086_m1	hMMP1	Hs00233958_m1
hCX3CR1	Hs00365842_m1	hMMP2	Hs00234422_m1
hCXCL11	Hs00171138_m1	hMMP9	Hs00234579_m1
hCXCL12	Hs00171022_m1	hMMP13	Hs00233992_m1
hCXCL16	Hs00222859_m1	hMMP14	Hs01037009_g1
hCXCR3	Hs00171041_m1	hNestin	Hs00707120_s1
hCXCR4	Hs00607978_s1	hSox2	Hs00602736_s1
hCXCR7	Hs00664172_s1	hVEGF	Hs00173626_m1

Alle TaqMan®-Primer und Sonden wurden von Applied Biosystems bezogen.

2.1.7 Geräte

ABI Prism®-7000 realtime PCR-Gerät	Applied Biosystems
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Blottingapparatur (<i>Semi Dry Blotter</i>)	BioRad
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Chemotaxiskammer	Neuro Probe, Inc. , Gaithersburg, MD, USA
ELISA-Messgerät	SLT Labinstruments, Crailsheim
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Jena
Fluoreszenzspektrometer F-2000	Hitachi, Düsseldorf
Gelelektrophoreseapparatur	BioRad
Inkubator Mikroskop	Zeiss
Kryostat (CM1100)	Leika, Nussloch
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop (invers, für Zellkultur)	Olympus, Hamburg
PCR-Gerät (Thermocycler t-Gradient)	Biometra, Göttingen
Photometer (Ultrospec 3100pro)	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Schüttler	Eppendorf
Spannungsquelle (für Western Blot)	Amersham Biosciences
Ultra-Torax Polytron PT 3000	Kinematica, Littau-Lucerne, Schweiz
Vortex-Mixgerät VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Werkbank (Hera-safe)	Heraeus
Zentrifuge (Christ Digifuge) mit Zytospin-Einsatz	Heraeus

2.1.8 Lösungen, Puffer und Medien

Diluent (ELISA):	0,1 % BSA
pH 7,3	0,05 % Tween-20
	10 mM TRIS
	150 mM NaCl

2. Material und Methoden

Dissoziationslösung:	24 mg HEPES 20 mg Trypsin 2 mg EDTA	in 10 ml DMEM lösen, steril filtrieren
Elektrodenpuffer: pH 8,2-8,3	23 mM TRIS 19 mM Glycin 0,1 % SDS	
Gelpuffer I: pH 8,8	1,5 M TRIS 0,4% SDS	
Gelpuffer II: pH 6,8	0,5 M TRIS 0,4 % SDS	
HEPES-Puffer (5 mM): pH 7,4	5 mM HEPES 2 mM EDTA	
HEPES-Puffer (20 mM) pH 7,4	20 mM HEPES 0,14 M NaCl 2 mM EDTA	
HEPES-Puffer (200 mM): pH 7,4	200 mM HEPES 1,4 M NaCl	
Lysispuffer (WB): pH 7,8	50 mM TRIS 100 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % Triton X-100 2 mM Natriumvanadat 1 mM Glycerolphosphat	vor Gebrauch zusetzen
Lysispuffer (DNA-Isolierung) pH 7,5	50 mM TRIS 20 mM EDTA 1 % Nonidet-P 40 (NP-40)	
Kulturmedium für neurale Stammzellen: Nach Reynolds und Weiss 1992	DMEM : Ham's F12 (1:1) +2 mM L-Glutamin + 0,6 % Glucose + 2 µg / ml Heparin + 4 mg / ml bovines Serumalbumin (BSA) + 6,3 ng / ml Progesteron + 25 µg / ml Insulin + 5,2 ng / ml Natriumselenit + 9,6 ng / ml Putrescindihydrochlorid + 10 ng / ml bFGF + 10 ng / ml EGF	
Kulturmedium für Tumorzelllinien:	DMEM + 10 % fötales Kälberserum + 3 % L-Glutamin + 1 % Penicillin /Streptomycin	

2. Material und Methoden

PBS (Phosphate Buffered Saline): pH 7,2-7,3	136 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄
für Zellkultur sterilisiert	8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA), 10x: pH 8	40 mM TRIS 0,2 M Eisessig 1 mM EDTA
TBST (Tris Buffered Saline + Tween): pH 7,5	20 mM TRIS 0,14 mM NaCl 1mM EDTA 0,1 % Tween-20
Transferpuffer: pH 9	25 mM TRIS 192 mM Glycin 10% Methanol
Trypsinlösung:	0,15 % EDTA 1 % Trypsin in PBS lösen, steril filtrieren

2.1.9 Verbrauchsmaterial

CultFoil, gasdurchlässig, flüssigkeitsundurchlässig	Zeiss
Deckgläschen	Roth
ELISA-Platten (96 Löcher, ebener Boden)	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Hyperfilm ECL (Chemoluminiszenz)	GE Healthcare
Kulturflaschen	Sarstedt
Kulturschale 35 mm	Nunc, Wiesbaden
Objektträger Super Frost	Roth
Optische Folie (realtime RT-PCR)	Sarstedt
Petrischale 35 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polycarbonatmembran, 8 µm Porengröße	Neuro Probe, Inc.
PVDF-Membran Hybond-P	GE Healthcare
Reaktionsgefäße („Tubes“; 0,2 und 1,5 ml)	Sarstedt
Realtime RT-PCR-Platten (96 Löcher)	Sarstedt
Röhrchen (10 ml und 50 ml)	Sarstedt
Whatman-Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung etablierter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit

kultiviert. Die etablierten Zelllinien U118, U343, MDA MB-231, HT29 und THP-1 wurden ebenso wie die generierten Glioblastomzelllinien A739, A761, A764, A767, A772 und A777 mit Kulturmedium für Tumorzelllinien (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin) versorgt. Humane Endothelzellen aus geborener Nabelschnur (HUVEC) wurden in HUVEC-Spezialmedium mit Supplement (enthält essentielle Wachstumsfaktoren und Hormone) gehalten. Bei entsprechender Zelldichte auf der Kulturflasche wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit gewärmtem PBS gespült und dann zum Ablösen mit einer Trypsin / EDTA-Lösung je nach Zellart drei bis fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Der abgelöste Zellrasen wurde mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium abgespült, in ein 10 ml-Röhrchen überführt, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend in bereits mit Medium gefüllten Kulturflaschen in der benötigten Zellzahl ausgesät.

Die Reinheit der Zelllinien wurde durch immunzytochemische Färbungen und realtime RT-PCR-Analysen der entsprechenden spezifischen Markerproteine untersucht. Die Kontamination mit Mycoplasmen wurde regelmäßig durch Färbungen mit DAPI getestet. Eine mutmaßliche Infektion zeigt sich durch die DNA-spezifische Anfärbung des Zytoplasmas infizierter Zellen. Zeigte sich ein solches Bild, wurde zur Sicherung des Befunds eine mycoplasmaspezifische PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt. Bei Infektion wurden die Zelllinien mit einem speziellen Antibiotika-Cocktail behandelt (BM-Cyclin, Roche, Mannheim).

Aufarbeitung von solidem Glioblastomgewebe für die Kultivierung in vitro

Die Aufarbeitung des soliden Glioblastomgewebes erfolgte für die konventionelle Glioblastomzellkultur und die Kultivierung von Glioblastomsphären (Glioma stem-like cells) gleich.

Das Gewebestück wurde zunächst auf der sterilen Werkbank in eine Petrischale mit kaltem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) überführt und durch Schwenken etwas gereinigt. Offensichtlich unbrauchbare Bereiche wie kleine Blutgefäße und stark eingeblutete Bereiche wurden mit einer Uhrmacherpinzette und einem Skalpell entfernt. Das übrige Gewebe wurde sorgfältig zerkleinert, in ein 10 ml-Röhrchen überführt und mit vorgewärmter Dissoziationslösung aufgeschüttelt. Das Röhrchen wurde für 15 Minuten bei 37 °C gehalten, dann wurden die Gewebestücke noch einmal kräftig aufgeschüttelt und DNase-Lösung mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugegeben. Es wurde erneut 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert, dann wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1100 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Für eine spätere Kultivierung als konventionelle Glioblastomzellkultur wurde das Zellpellet in Kulturmedium (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin und 1% Penicillin / Streptomycin) aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit verschiedenen dünnen Pasteurpipetten weiter vereinzelt und dann je nach geschätzter Zellzahl auf Kulturschalen

(Durchmesser 35 mm) oder kleine Kulturflaschen (Fläche 75 mm²) ausgesät. Die Glioblastomzelllinien A739, A761, A764, A767, A772 und A777 wurden in den Subkulturen 20 bis 35 verwendet. Ihre Reinheit wurde durch immunzytochemische Färbungen auf den Astrozytenmarker GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) verifiziert.

Kultivierung von murinen neuralen Stammzellen

Zur Etablierung der Kultivierung von Stammzellen, die später für die Kultivierung von Glioblastomsphären eingesetzt werden sollte, wurden zunächst neurale Stammzellen aus den Subventrikulärzonen von Maushirnen isoliert und kultiviert.

Hierfür wurden die Hirne von früh postnatalen Mäusen (postnataler Tag 2-3) entnommen und die Subventrikulärzone präpariert. Das Gewebe wurde, wie oben für die Glioblastomgewebe beschrieben, mechanisch und enzymatisch dissoziiert und in einem definierten, serumfreien Spezialmedium für die Kultivierung neuraler Stammzellen (nach Reynolds und Weiss 1992) in kleine Kulturflaschen ausgesät. Dieses Medium enthält neben einer Reihe von Faktoren, die die Anreicherung von neuralen Stammzellen *in vitro* fördern, als Wachstumsfaktoren 10 ng/ml bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und EGF (*endothelial growth factor*). Innerhalb von ca. 10 Tagen bildeten sich dreidimensionale Zellaggregate, die als Neurosphären bezeichnet werden. Für immunzytochemische Färbungen wurden diese Neurosphären mit einem Zytospin-Einsatz (Heraeus) auf Objektträger abzentrifugiert oder in einer sehr geringen Menge Medium auf PDL-beschichtete Deckgläschen gesetzt und hafteten dort innerhalb von zwei Tagen leicht an. Sie wurde dann ohne einen Spülschritt sofort sehr vorsichtig mit einem eiskalten Aceton-Methanol-Gemisch fixiert.

Kultivierung und Ausdifferenzierung von Glioblastomsphären

Für die Kultivierung der Glioblastomsphären unter Stammzellbedingungen wurden wie oben beschrieben dissoziierte Einzelzellen in Kulturmedium für neurale Stammzellen aufgenommen, welches nur das Überleben von Zellen mit Stammzellcharakter zulässt und auf Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser ausgesät.

Die vereinzelt Zellen, die aus solidem Glioblastomgewebe präpariert worden waren, wurden in Kulturmedium für Glioblastomsphären in einem 37°C Brutschrank mit 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Dreimal pro Woche wurden die Wachstumsfaktoren EGF und bFGF und gegebenenfalls das Zytokin LIF (*leukemia inhibitory factor*) zugegeben (jeweils 10 ng /ml). Innerhalb einer je nach Kultur individuellen Kultivierungsdauer (ca. 14-25 Tage) bildeten sich schwimmende oder teil-adhärente Zellaggregate, die so genannten Glioblastomsphären. Zur Anreicherung der proliferierenden, selbsterneuernden Zellen wurden diese Glioblastomsphären mit der Lösung TrypEL™ Express enzymatisch wieder in eine Einzelzellsuspension vereinzelt und erneut auf Schalen ausgesät. Die Glioblastomsphären-Kultur 25/07 wurde in zwei Kulturen parallel geführt, wobei die eine

Kultur in Stammzellmedium mit bFGF und EGF und die andere Kultur in Stammzellmedium mit bFGF, EGF und LIF gehalten wurde. Diese Glioblastomsphären-Kulturen wurden über einen Zeitraum von einem Jahr regelmäßig dissoziiert und bildeten anschließend aus den Einzelzellsuspensionen wieder Zellaggregate, die teilweise frei schwimmend waren, überwiegend jedoch teiladhärent.

Zur Ausdifferenzierung wurden die Glioblastomsphären zunächst wieder in eine Einzelzellsuspension vereinzelt, 3-5 Tage unter Stammzellbedingungen (mit bFGF und EGF, gegebenenfalls LIF) Gelegenheit zu Regeneration gegeben, dann auf eine entsprechende Zahl von Kulturschalen verteilt und mit 10 % FKS versetzt, während bFGF und EGF weggelassen wurden.

2.2.2 Realtime RT-PCR

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene erfolgte zunächst die Isolierung der Gesamt-RNA mithilfe des TRIzol[®] Reagenz aus Gewebe oder kultivierten Tumorzellen und mithilfe des PicoPure-Kits aus Glioblastomsphären und differenzierten Glioblastomsphärenzellen. Dann wurde die kontaminierende DNA verdaut und die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einzelsträngige cDNA (*copy*-DNA) umgewandelt. Diese cDNA-Probe wurde dann einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *Polymerase chain reaction*) mit speziellen Primern und fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden durchgeführt, sodass eine Quantifizierung der cDNA-Menge eines einzelnen Gens möglich wird.

RNA-Isolierung mit TRIzol[®] Reagenz

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus solidem Geweben von humanen Astrozytomen und Glioblastomen sowie nicht erkranktem Hirngewebe wurden Gewebeproben von ca. 100 mg mit einem Skalpell in kleine Stücken zerteilt und in Reaktionsgefäße überführt, die bereits 1 ml TRIzol[®] Reagenz enthält. TRIzol[®] Reagenz ist eine gebrauchsfertige Lösung, die unter anderem Phenol und Guanidiniumisothiocyanat enthält, die auch in der klassischen DNA-Extraktion mit der Chloroform-Phenol-Methode verwendet werden. Die Gewebeproben wurden mit einem Ultratorax homogenisiert und anschließend bei 12 000 xg für 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer (Detritus) von den löslichen Komponenten zu trennen, die auch die mRNA enthalten.

Tumorzelllinien wurden bis zur Konfluenz kultiviert, dann einmal mit warmem PBS gespült, sorgfältig abgesaugt und in 1 ml TRIzol[®] mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Auch diese Proben wurden 10 Minuten lang bei 12 000 xg und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen.

Im Folgenden wurde mit den TRIzol[®]-Lysaten von Gewebeproben und Zellkulturen identisch verfahren. Zu den Lysaten wurden jeweils 200 µl Chloroform gegeben und durch Schwenken

der Reaktionsgefäße für 30 Sekunden gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12 000 xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Dadurch kam es zur Phasentrennung, die obere wässrige Phase enthielt RNA, die wolkig-weiße Interphase enthielt DNA und die untere, rötliche Phase enthielt neben einem Chloroform-Phenol-Gemisch auch Proteine und Zelltrümmer. Die obere Phase, die ca. 60 % des Gesamtvolumens ausmachte, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert und durch 10 minütige Zentrifugation bei 12 000 xg und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 7 600 xg und 4°C) und nach dem Entfernen des Überstandes getrocknet. Je nach eingesetzter Gewebe- oder Zellmenge und Größe der erhaltenen Pellets wurden 30 – 50 µl RNase-freiem bidestilliertem Wasser zur Resuspension verwendet. Die RNA-Lösung wurde 10 Minuten lang auf 58 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Photometer bestimmt. Die Reinheit errechnete sich aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm, dieser Quotient sollte mindestens 1,8 betragen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

RNA-Isolierung mit dem PicoPure Kit

Die RNA-Isolierung wurde bei Kulturen von undifferenzierten und differenzierten Zellen von Glioblastomsphären durchgeführt. Undifferenzierte teiladhärente Glioblastomsphären wurden hierfür durch sanftes Aufspülen des Mediums mit einer 1000 µl-Pipette vom Boden der Kulturschalen abgelöst und in ein 10 ml-Röhrchen überführt. Nicht adhärente Glioblastomsphären wurden direkt überführt. Differenzierte, von Glioblastomsphären abstammende Zellen wurden durch kurze Behandlung mit einer Trypsin-/ EDTA-Lösung abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellsuspension ebenfalls in ein 10 ml-Röhrchen überführt. Die vollständige Ablösung und Überführung wurde bei undifferenzierten und differenzierten Zellen durch Sichtung der Schalen unter einem inversen Mikroskop überprüft. Die Zellsuspensionen wurden 10 Minuten lang bei 800 upm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 200 µl Zellsuspensionsmedium (PBS mit 10 % BSA und 50 mM EDTA) resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 3 000 xg 5 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Extraktionspuffer (Kitkomponente EB) durch Auf- und Abpipettieren sorgfältig resuspendiert und 30 Minuten lang bei 42°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend 2 Minuten lang bei 3 000 xg zentrifugiert, der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit dem gleichen Volumen 70 % Ethanol sorgfältig vermischt. Die RNA-Aufreinigungssäulen wurden

vorbereitet, indem je 250 µl Konditionierungsmedium (Kitkomponente CB) auf die Filtermembran pipettiert wurde, 5 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte und anschließend durch Zentrifugation bei 16 000 xg für eine Minute entfernt wurde. Das Zellextrakt-Ethanol-Gemisch wurde auf die vorbereitete Säule gegeben und zur Bindung der RNA zwei Minuten lang bei 100 xg und anschließend zur Entfernung des Puffers 30 Sekunden lang bei 16 000 xg zentrifugiert. Dann wurden jeweils 100 µl Waschpuffer 1 (Kitkomponente W1) auf die Säulen gegeben und bei 8 000 xg für eine Minute abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit Waschpuffer 2 (Kitkomponente W2) wiederholt. Es wurden erneut 100 µl Waschpuffer 2 auf die Säule gegeben und 2 Minuten bei 16 000 xg abzentrifugiert. Zur Entfernung möglicher Pufferreste wurden die Durchflusssammelflächen geleert und die Säulen für eine Minute bei 16 000 xg zentrifugiert. Die Säulen wurden dann in neue 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Je nach eingesetzter Zellmenge wurden 15 bis 30 µl Elutionspuffer (Kitkomponente EB) auf die Filtermembran pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Benetzung der Säule mit Elutionspuffer wurde dann eine Minute lang bei 1 000 xg zentrifugiert und schließlich zur Elution eine Minute bei 16 000 xg. Das Eluat wurde bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

DNA-Verdau und Reverse Transkription in cDNA

Vor der Umschreibung der mRNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase müssen zunächst die Spuren von kontaminierender DNA durch eine Behandlung mit RNase-freier DNase abgebaut werden. Hierfür wurde von der mit TRIzol[®] Reagenz isolierten RNA 1 µg in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf 7 µl mit RNase-freiem bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Von der mit dem PicoPure Kit isolierten RNA wurden 7 µl eingesetzt. Zu jedem Ansatz wurden 1 µl 10x DNase-Puffer (400 mM TRIS, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, pH 8) und 1 µl DNase (1U/µl) zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion und zur Inaktivierung der DNase wurde zu jedem Ansatz 1 µl EDTA-Lösung (20mM) zugegeben, gemischt und bei 65°C für 15 Minuten inkubiert.

Für die Umschreibung in cDNA wurde zunächst pro Ansatz 2 µl der Random Hexamer Primer Mischung (0,2 µg / µl) zugegeben und bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert, damit die Primer an die RNA binden können. Anschließend wurde ein Mastermix aus 4 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM TRIS, 259 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 8), 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Wasser zu jedem Ansatz gegeben, bei 25°C für 5 Minuten einheitlich temperiert und schließlich 1 µl Reverse Transkriptase (40 U / µl) zugegeben. Die Ansätze wurden in einem PCR-Gerät zunächst für 10 Minuten bei 25°C gehalten, dann 60 Minuten lang bei 42°C inkubiert und schließlich durch Erhitzung auf 70°C für 10 Minuten die Reaktion beendet. Die cDNA wurde abgekühlt und bei -20°C gelagert.

Realtime-PCR

Die eigentliche realtime PCR-Reaktion wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierfür wurde in jedes Loch eine cDNA-Menge pipettiert, die einer ursprünglichen RNA-Menge von 10 ng entsprach, d.h. die cDNA wurde 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und 2 µl dieser Verdünnung in jedes Loch vorgelegt und 18 µl einer vorbereiteten Mastermixlösung zugegeben. Der Mastermix bestand aus 1 µl 20x TaqMan Primer und Sonden (FAM™ gelabelte TaqMan-Sonden + ungelabelte TaqMan PCR-Primer in einer Lösung), 7 µl bidestilliertem Wasser und 10 µl 2x TaqMan PCR Universal MasterMix (enthält die DNA-Polymerase). Die Mikrotiterplatte wurde mit einer selbstklebenden optischen Folie verschlossen und im ABI Prism®-7000 SDS realtime PCR-Gerät mit dem entsprechenden realtime PCR-Programm auf die jeweiligen Reaktionstemperaturen gebracht und analysiert. Das Programm beinhaltete folgende Temperaturschritte: 2 Minuten 50°C (UNG-Aktivierung), 10 Minuten 95°C (Polymerase-Aktivierung) und 40 Zyklen 15 Sekunden 95°C (Denaturierung) und 1 Minute 60°C (*Annealing* und *Elongation*) mit angeschlossener Detektion der Fluoreszenzsignale. Diese Fluoreszenzsignale kommen durch folgenden Sachverhalt zustande: Die TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide, die komplementär zu einer Sequenz der cDNA-Vorlage sind, die zwischen den beiden Primern liegt. An einem Ende sind diese Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff und an dem anderen Ende mit einem Fluoreszenzlöcher (*Quencher*) gekoppelt. Befinden sich Fluoreszenzfarbstoff und Quencher in unmittelbarer Nähe, so gibt der angeregte Farbstoff seine Energie auf den Quencher ab und fällt in seinen Grundzustand zurück ohne die Energie in Form von Fluoreszenzlicht abzugeben (Förster Resonanz Energie Transfer *FRET*). Wenn eine entsprechende cDNA-Vorlage im Reaktionsansatz vorhanden ist, binden die Primer und die Oligonukleotidsonde an ihre komplementären Sequenzen und die Taq-Polymerase beginnt die Vervollständigung zu einem doppelsträngigen DNA-Strang. Gelangt sie dabei an die markierte Oligonukleotidsonde, so wird diese durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase gespalten. Reporterfarbstoff und Quencher werden voneinander räumlich getrennt und der Reporterfarbstoff gibt nun nach Anregung seine Energie als Fluoreszenzlicht ab. Das realtime PCR-Gerät misst und berechnet mit der entsprechenden Software den Anstieg der Fluoreszenzintensität über einen bestimmten Schwellenwert (*Cycle of threshold*, C_T -Wert), der im Bereich der exponentiellen Steigerung liegt.

Quantifizierung

Als Referenz für die relative Quantifizierung der Expression des untersuchten Gens wird für jede Probe die Expression eines Haushaltsgens (*Housekeeping gene*) auf derselben Mikrotiterplatte analysiert. In dieser Arbeit wurde hierfür die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Die relative Genexpression wurde nach der ΔC_T -Methode unter Verwendung der vom Gerät ausgegebenen C_T -Werte berechnet:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Gen}) - C_T(\text{GAPDH}) \quad \text{Gen} = \text{untersuchtes Gen, z.B. CXCR7}$$

Bei Untersuchung der Expression in Duplikaten oder Triplikaten wurden jeweils Mittelwerte verwendet. Der ΔC_T -Wert gibt an, wie viele Zyklen später als das Referenzgen das untersuchte Gen den Fluoreszenzschwellenwert überschritten hat. Die Amplifikationsreaktion verläuft nicht linear, sondern exponentiell, daher kann der ΔC_T -Wert mit folgender Formel linearisiert werden:

$$\text{Linearisierte relative Expression} = 2^{-(\Delta C_T)}$$

Ein ΔC_T -Wert von 3,33 entspricht also einer zehnfach geringeren Expression der untersuchten Gens gegenüber dem Haushaltsgen.

Für die Auswertung von Stimulationsversuchen, in denen die Expressionsänderungen im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle dargestellt werden sollten, wurde die so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Diese liefert die linearisierte Expressionsänderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle:

$$\text{Linearisierte Expressionsänderung} = 2^{-(\Delta C_T [\text{stimuliert}] - \Delta C_T [\text{Kontrolle}])}$$

2.2.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie (F-IHC) ermöglicht die simultane Darstellung zweier (oder mehr) Antigene *in situ*. Dadurch können beispielsweise Erkenntnisse gewonnen werden über die Expression eines Proteins durch eine bestimmte Subpopulation von Zellen in einem Gewebe oder auch darüber, in welchem Zellkompartiment das Protein vornehmlich vertreten ist.

Für die Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden zunächst mit einem Kryostat 10 μm dicke Gefrierschnitte der Gewebeproben (Glioblastome und Normalhirn) angefertigt und auf Super Frost Objektträger überführt. Die Fixierung der Proben erfolgte durch ein eiskaltes Gemisch aus Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1 für 10 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal fünf Minuten in TBST (TRIS-gepufferte Salzlösung) gespült. Dann wurden die Schnitte je zwei Minuten in 20 % und 70 % Ethanol geschwenkt und 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1% Sudanschwarz (in 70 % Ethanol) inkubiert, um die Autofluoreszenz des stark lipidhaltigen Gewebes zu verringern. Der überschüssige Farbstoff wurde in 70 % Ethanol abgewaschen und nach einer zweiminütigen Inkubation in 20 % Ethanol wurden die Schnitte wiederum in TBST gewaschen (5 Minuten). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte dann 60 – 80 Minuten mit einer Lösung von 0,5 % BSA und 0,5 % Glycin in TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Blockierlösung wurde nur etwas abgeschüttelt, bevor die in TBST verdünnten

Primärantikörper aufgetragen wurden. Es wurden Mischungen der beiden Primärantikörper verwendet, wenn diese aus unterschiedlichen Spezies stammten (z.B. Maus und Kaninchen) und keine Kreuzreaktivitäten der Sekundärantikörper zu befürchten waren.

Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper bzw. der Primärantikörpermischung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert und am nächsten Morgen dreimal fünf Minuten in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in TBST verdünnten Sekundärantikörper bzw. der Sekundärantikörpermischung für eine Stunde bei 37°C in Dunkelheit. Die Schnitte wurden erneut dreimal fünf Minuten in TBST gespült und dann für 30 Minuten mit einer DAPI-Lösung (gelöst 1 mg / ml in H₂O bidest. verdünnt 1:30 000 in TBST) bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Schließlich wurden die Schnitte noch zweimal fünf Minuten in TBST gespült, einmal kurz in destilliertem Wasser geschwenkt (Entsalzung) und mit Immumount® eingedeckelt. Antikörperkombinationen, die die oben genannten Voraussetzungen nicht erfüllten, wurden seriell gefärbt, wobei bei Kombination zweier Antikörper aus Kaninchen (z.B. CXCR4 und CXCR7) stets zuerst gegen CXCR7 gefärbt wurde (Primärantikörper und Sekundärantikörper), dann wurden die Schnitte mit so genannten F(ab')₂-Fragmenten inkubiert (eine Stunde, 37°C) und anschließend wurde der zweite Primärantikörper mit korrespondierendem Sekundärantikörper gefärbt. Diese F(ab')₂-Fragmente sind Anteile eines gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichteten IgG-Antikörpers, von denen jedoch durch limitierten Pepsinverdau der speziesspezifische Fc-Teil abgespalten wurde. Sie binden und blockieren also alle spezifischen und unspezifischen Stellen, die ein gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichteter Sekundärantikörper markieren würde, sodass die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper aus dem Kaninchen möglich wird. Bei Kombination von Antikörpern aus Ziege und Kaninchen (z.B. Iba1 und CXCR7) wurde stets zuerst der Antikörper aus der Ziege und der korrespondierende Sekundärantikörper appliziert, anschließend wurde dann der Antikörper aus dem Kaninchen und der entsprechende Sekundärantikörper verwendet.

Die Schnitte wurden mit einem Axiovert 200 M Mikroskop mit Apotom mikroskopiert und mit der angeschlossenen Digitalkamera AxioCamMR3 fotografiert.

2.2.4 Fluoreszenz-Immunzytochemie

Die Fluoreszenz-Immunzytochemie wurde zur Untersuchung von Differenzierungsmerkmalen (Markern) an Glioblastomsphären verwendet. Hierfür wurden die Glioblastomsphären wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben vorbereitet und in Kulturschalen liegenden, mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Beschichtung der Deckgläschen erfolgte durch Überschichtung mit einer 0,002 %-igen PDL-Lösung und anschließende Trocknung unter sterilen Bedingungen. Die Differenzierung der Glioblastomsphären wurde durch Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS) eingeleitet.

Das Medium wurde regelmäßig einmal wöchentlich zur Hälfte entfernt und durch neues Kulturmedium für Glioblastomsphären mit 10 % FKS aufgefüllt. Die Zellen wurden über den Versuchszeitraum kultiviert und bei Versuchsende zunächst einmal vorsichtig mit warmem PBS gespült. Dann wurden sie mit einer eiskalten Mischung aus Aceton und Methanol (1:1) für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die Deckgläschen dreimal 5 Minuten mit PBS gespült und 60 – 80 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 % BSA / 0,5 % Glycin in PBS blockiert. Die in PBS verdünnten Primärantikörper wurden nach leichtem Abtropfen der Blockierlösung auf die Deckgläschen aufgetragen und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Deckgläschen dreimal 5 Minuten in mit PBS gewaschen, dann wurde der in PBS verdünnten Sekundärantikörper aufgetragen und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Spülen in PBS entfernt und die Deckgläschen für 30 Minuten mit DAPI inkubiert (Raumtemperatur). Schließlich wurden die Deckgläschen noch zweimal in PBS und einmal in destilliertem Wasser gespült (Entsalzung) und mit Immumount® auf Super frost Objektträger eingedeckelt. Die Deckgläschen wurde mit einem Axiovert 200 M Mikroskop mikroskopiert und mit der angeschlossenen Digitalkamera AxioCamMR3 fotografiert.

2.2.5 Western Blot

Probenvorbereitung

Zellhomogenate für die Analyse phosphorylierter Kinasen

Zur Analyse der Signaltransduktionswege, die durch Stimulation mit CXCL12 angesprochen werden, wurden 400 000 A764-Glioblastomzellen auf kleine Kulturflaschen ausgesät und 48 Stunden in Kulturmedium für Tumorzelllinien inkubiert. Die Konfluenz betrug zu Stimulationsbeginn ca. 50-70%. Vor Beginn der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gespült und mit Stimulationsmedium (DMEM + 1% BSA) versehen eine Stunde lang im Brutschrank inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um das serumhaltige Medium vollständig zu entfernen. Nach Zugabe der Stimuli wurden die Kulturflaschen für den jeweils erforderlichen Stimulationszeitraum in einen Brutschrank gegeben. Bei Verwendung von Hemmstoffen (Inhibitoren) wurden diese eine Stunde vor Stimulationsbeginn in das entsprechende Stimulationsmedium gegeben, vor der Zugabe der Stimuli wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, sodass die Konzentration der Hemmstoffe während der Chemokinstimulation erhalten blieb.

Zum Abbruch der Stimulation wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit kaltem PBS gespült und trocken abgesaugt. Der Zellrasen wurde in 250 µl Lysispuffer (mit 2 mM Natriumvanadat und 1 mM Glycerolphosphat) mit einem Zellschaber abgekratzt und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde jeweils ein Aliquot von 5 µl der Probe mit 795 µl bidest.

Wasser verdünnt und mit 200 µl BioRad Protein Assay (Bradford-Reagenz) versetzt. Als Leerwert wurden 5 µl Lysispuffer verwendet, als Standard wurde eine 1mg / ml BSA-Lösung verwendet. Die Extinktion der Proben wurden bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen und der Proteingehalt in Bezug auf den Standard berechnet.

Von jeder Probe wurden Aliquots, die 25 µg Protein entsprachen in neue Reaktionsgefäße überführt, mit SDS-Probenpuffer auf 100 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Membranisolierung für die Analyse membranständiger Chemokinrezeptoren

Zur Untersuchung der Expression von membranständigen Chemokinrezeptoren (CXCR4, CXCR7) auf Proteinebene wurden aus kultivierten Zellen die Zellmembranfraktionen isoliert. Hierfür wurden die Zelllinien in großen Kulturflaschen (200 mm²) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und abgesaugt. Die Zellrasen wurden in je 1 ml eiskaltem, hypotonem HEPES-Puffer (5 mM) mit einem Zellschaber abgekratzt und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 100 µl eiskalter hypertoner HEPES-Puffer (200 mM) wurden zugegeben und bei 4°C 5 Minuten lang bei 700 xg zentrifugiert, um Zell- und Kerntrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und 60 Minuten lang bei 20 000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in isotonem HEPES-Puffer (20 mM) resuspendiert (Volumen je nach Pelletgröße ca. 50 µl). Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte wie oben für Zellhomogenate beschrieben, jedoch wurde jeder Probe 5 µl 1 N Natronlauge zugesetzt, wodurch die Proteine aus den Membranfragmenten herausgelöst und somit für den kolorimetrischen Nachweis zugänglich werden. Wie für die Zellhomogenate beschrieben, wurden die Proben je nach Proteingehalt mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C gehalten und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

SDS-Probenpufferlysate für die Analyse von Apoptoseprodukten

Für die Analyse von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP) –Spaltfragmenten, die beim programmierten Zelltod, der Apoptose, auftreten, wurden jeweils 400 000 Zellen auf kleine Kulturflaschen ausgesät und 24 Stunden lang vorkultiviert. Bei Stimulationsbeginn betrug die Konfluenz ca. 30-50 %. Vor Stimulationsbeginn wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gespült und mit Stimulationsmedium (DMEM + 0,2 % FKS) versorgt. Anschließend wurden die jeweiligen Stimuli zugesetzt. Die Kulturflaschen wurden für den jeweiligen Stimulationszeitraum zurück in den Brutschrank gegeben. Zur Beendigung des Versuchs wurden die Zellrasen einmal mit warmem PBS gespült, trocken gesaugt und in 200 µl SDS-Probenpuffer abgekratzt. Durch die sofortige Denaturierung aller Proteine durch die im Puffer enthaltenen Agentien wird eine artifizielle Spaltung der PARP vermieden. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäße überführt und 15 Minuten bei 95°C inkubiert. Bis zur weiteren

Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

SDS-Gelelektrophorese

Für die vertikale SDS-Gelelektrophorese wurden zunächst die Glasplatten der Apparatur mit 70 % Ethanol entfettet und in den Gießstand eingesetzt. In einem Plastikgefäß wurde zunächst für das Trenngel (10 % Acrylamid) folgende Reagentien gemischt:

4,05 ml bidest. Wasser
2,6 ml Gelpuffer I
3,35ml Acrylamid / Bis-Lösung 29:1, 30%
60 µl APS (10% in dest. Wasser)
30 µl TEMED

Rezept für zwei Gele

Diese Lösung wurde bis ca. $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe zwischen die entfetteten Glasplatten gefüllt und mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine luftblasenfreie, glatte Abschlusskante zu erhalten. Nach Abschluss der Polymerisation (ca. 15 Minuten) wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (4,5 % Acrylamid)

gemischt: 5,8 ml bidest. Wasser
2,6 ml Gelpuffer II
1,7 ml Acrylamid / Bis-Lösung 29:1, 30%
60 µl APS (10% in dest. Wasser)
30 µl TEMED

Rezept für zwei Gele

Mit der Sammelgellösung wurden die Gele bis zur Oberkante der Glasplatten aufgefüllt, ein Plastikamm wurde in das noch flüssige Gel gesteckt, um Taschen für die Proben zu erhalten. Nachdem auch das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war, wurden die Kämmen entfernt und die Taschen mit Hilfe einer dünnen, stumpfen Kanüle mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Taschen mit den vorbereiteten Proben befüllt. In jedem Gel wurde eine äußere Tasche mit dem Marker, einem Gemisch aus vorgefärbten Proteinen definierter Größen von 10 – 160 kDa, befüllt. Die resultierenden Banden dienten später zur Größenbestimmung der detektierten Proteinbanden. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrodenpuffer befüllt, einige Tropfen einer gesättigten Bromphenolblaulösung wurden in die mittlere Kammer als Lauffrontmarker gegeben. Die Gelelektrophorese wurde bei maximal 400 V durchgeführt und war abgeschlossen, sobald die 10 kDa-Bande (grün gefärbt) die untere Kante des Gels fast erreicht hatte (ca. 40 Minuten).

Transfer auf PVDF-Membran (Semi-Dry-Blotting)

Während der Gelelektrophorese wurde eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) -Membran in der Größe des Trenngels zugeschnitten und zuerst 5 Minuten in Methanol und dann 5 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Zusätzlich wurden vier Lagen Whatman-Filterpapier pro Gel zugeschnitten und in Transferpuffer equilibriert. Nach Ende der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten von den Gelen entfernt. Je Gel wurden zwei Lagen equilibriertes Filterpapier und eine vorbereitete Membran auf die untere Platte des Semi-Dry-Blot-Gerätes gelegt, darauf wurde ein Gel gelegt und darauf zwei weitere Lagen Filterpapier. Mit einer

Tapetenrolle wurden alle Luftblasen aus dem Stapel entfernt. Obere und untere Platte des Blot-Gerätes wurden mit Transferpuffer befeuchtet, das Gerät geschlossen und an die Stromquelle angeschlossen. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte mit einer Stromstärke von $1\text{mA}/\text{cm}^2$, dabei wurde eine maximale Spannung von 25 Volt nicht überschritten. Nach 60 Minuten wurde der Stromfluss beendet.

Antikörperinkubation und Detektionsreaktion

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen mit Magermilchpulverlösung (5% in TBST) eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln blockiert, um unspezifische Bindungen der im Folgenden verwendeten Antikörper zu verhindern. Die Primärantikörper wurden in Magermilchpulverlösung oder 5 % BSA in TBST (pAkt, pErk) verdünnt. Bei Verwendung von Antikörpern gegen phosphorylierte Antigene (pAkt, pErk) wurden die Membranen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper zunächst dreimal 15 Minuten mit TBST gespült, da hier die Antikörperbindung durch Kasein gestört wird. Die Membranen wurden mit jeweils 1 ml verdünntem Antikörper in Schlauchfolie eingeschweißt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal 10 Minuten in TBST gespült und anschließend für eine Stunde mit dem in TBST verdünnten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Membranen erneut dreimal 15 Minuten lang mit TBST gewaschen. Für die Detektionsreaktion wurde das Zwei-Komponenten-System ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit verwendet. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase kann in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und unter alkalischen Bedingungen Luminol oxidieren und so in einen angeregten Zustand überführen. Durch Phenole, die ebenfalls im Kit enthalten sind, wird diese Reaktion verstärkt und verlängert.

Die beiden Komponenten des Kits wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die waagrecht und faltenfrei liegenden Blots gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Flüssigkeit abgetropft, die Blots in dünne Folie eingeschlagen und diese in eine Filmkassette gelegt. In unterschiedlich langen Expositionszeiten wurde die Chemolumineszenz auf hochsensitiven Spezialfilmen aufgezeichnet, die anschließend in Entwickler- und Fixierbad entwickelt wurden.

Auftragskontrolle (Reblot)

Die einheitliche Auftragsmenge wurde kontrolliert, indem die Membranen durch Waschen mit 0,1 M Glycin, pH 2,5 (dreimal 5 Minuten) und 0,1 M TRIS, pH 7,5 (dreimal 15 Minuten) von Primär- und Sekundärantikörper befreit wurden (*Stripping*). Dann wurden die Membranen erneut blockiert (5% Magermilchpulver in TBST, eine Stunde) und die verdünnten Primärantikörper aufgetragen (GAPDH, Akt, ERK-2). Der weitere Versuch wurde analog zur oben beschriebenen ersten immunologischen Detektionsreaktion durchgeführt.

Alle Western blot-Analysen wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit unabhängiger Probengewinnung durchgeführt und in der vorliegenden Arbeit werden repräsentative Aufnahmen dieser Experimente gezeigt.

2.2.6 Proliferationsversuch

Für die Untersuchung der Proliferation von stimulierten und unstimulierten Zellen wurde das Cyquant[®] Cell Proliferation Assay Kit verwendet. Dabei wurden die kultivierten und stimulierten Zellen lysiert und der DNA-Gehalt durch Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffs gemessen, der bei der Interkalation in doppelsträngige DNA eine starke Erhöhung der bei 520 nm emittierten Fluoreszenz zeigte.

Für den Versuch wurden A764 Glioblastomzellen mit einer Zelldichte von 50 000 Zellen pro Schale auf 35 mm-Kulturschalen ausgesät. Gleichzeitig wurden ebenfalls 50 000 Zellen in vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße gefüllt, abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig abpipettiert und die Reaktionsgefäße bei -20°C tiefgefroren. Diese Proben dienten später als interner Standard für 50 000 Zellen. Der im Kit enthaltene DNA-Standard war hierfür nicht geeignet, da kultivierte Tumorzelllinien durch vielfältige Mutationen Zugewinne oder Verluste an der eigentlichen DNA-Menge haben können.

Die Zellen wurden in den Kulturschalen zunächst für 24 Stunden in Kulturmedium mit 10 % FKS kultiviert. Nach 24 Stunden wurden drei der Kulturschalen abgesaugt, einmal mit warmem PBS gespült, trocken abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Die anderen Kulturschalen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Stimulationsmedium (DMEM + 0,2 % FKS) und den entsprechenden Stimuli versehen (3 Schalen je Stimulus). Als Kontrolle für optimale Wachstumsbedingungen wurden jeweils drei Kulturschalen mit DMEM + 10 % FKS versorgt. Die Schalen wurden weitere 24 Stunden kultiviert, mit PBS gewaschen, trocken abgesaugt und bei -20°C eingefroren.

Zur Herstellung des Reaktionspuffers wurde der 20x Cyquant Puffer 1:20 mit sterilem bidestilliertem Wasser verdünnt. Für den eigentlichen Lysispuffer wurde dem Reaktionspuffer eine DNase-freie RNase-Lösung mit einer Endkonzentration von 1,6 U / ml zugesetzt. Zu jeder vorbereiteten Kulturschale und jedem Reaktionsgefäß mit eingefrorenen Zellpellet wurden 250 µl des Lysispuffers gegeben. Diese Ansätze wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erzielen. Dann wurden die Zellrasen von den Kulturschalen mit einem Zellschaber abgekratzt und die Proben jeweils in Reaktionsgefäße überführt.

Für die fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße jeweils 200 µl Reaktionspuffer vorgelegt. Von den Proben wurden nach sorgfältigem Mischen jeweils 50 µl abgenommen und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit Reaktionspuffer

überführt. Ein Leerwert wurde mit 200 µl Reaktionspuffer und 50 µl Lysispuffer (mit RNase) vorbereitet. Das Farbreagenz des Cyquant® Cell Proliferation Assay Kit wurde 1:200 mit Reaktionspuffer verdünnt und jeweils 250 µl zu jedem Probenansatz und dem Leerwert zugefügt. Die Proben wurden kurz geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert.

Die Proben wurden im Fluoreszenzspektrometer F-2000 (Hitachi) gemessen. Als Vorspannung wurden 400 Volt eingestellt, die Extinktionswellenlänge betrug $\lambda_{\text{Extinktion}} = 480$ nm, die Emissionswellenlänge war $\lambda_{\text{Emission}} = 520$ nm.

Aus den Messergebnissen der Triplikate wurden Mittelwerte ermittelt. Die Messwerte der in den Reaktionsgefäßen pelletierten Zellen wurde unter Berücksichtigung des Leerwertes gleich 50 000 gesetzt und die übrigen Messwerte hierauf bezogen.

2.2.7 Migrationsversuche

Eine häufige biologische Funktion von Chemokinen ist die Anlockung von Zellen, z.B. immunmodulatorischen Zellen an den Ort der Entzündung. Zur Untersuchung dieses biologischen Effektes wurden zwei Migrationsexperimente durchgeführt, die die ungerichtete und die gerichtete Migration durch einen Chemokinstimulus darstellen.

Wundheilungstest (Scratchtest)

Im so genannten Scratchtest wird die ungerichtete Migration von Glioblastomzellen in einen freien, nicht von Zellen besiedelten Raum untersucht. Er dient als Modell für die Bildung der Astrozytennarbe, die nach Verletzung im Zentralnervensystem durch einwandernde Astrozyten erfolgt.

Die Glioblastomzelllinie A764 wurde in 35 mm-Kulturschalen bis zu vollständiger optischer Konfluenz kultiviert. Mit einer senkrecht aufgesetzten Pipettenspitze wurde unter geringem Druckaufwand durch den Zellrasen gekratzt, sodass eine ca. 500 µm breite, zellfreie Linie erhalten wurde. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch Stimulationsmedium (DMEM + 0,2 % FKS) mit dem entsprechenden Stimulus ersetzt. Eine Klimakammer wurde unter dem Axiovert 200 M Mikroskop installiert, in der eine Temperatur von 37°C und ein CO₂-Gehalt von 5 % unter beständiger Zirkulation im geschlossenen System aufrechterhalten wurde. Da es technisch nicht möglich war, eine Sättigung der zirkulierenden Luft mit Luftfeuchtigkeit zu erzielen, wurden die Schalen während der Versuchsdauer mit einer gasdurchlässigen, flüssigkeitsundurchlässigen Membranfolie abgedeckt, um die Verdunstung des Stimulationsmediums von 40 µl / h auf 3 µl / h zu reduzieren.

Die zellfreie Linie im Zellrasen wurde unter dem Mikroskop fokussiert und in einem Intervall von 10 Minuten fotografiert über einen Versuchszeitraum von 10 Stunden.

Die Größe des zellfreien Raums zu Beginn und bei Versuchsende wurde mit dem Auswertungsprogramm PC-BAS ausgemessen. Die besiedelte Fläche wurde in Relation zur

ursprünglich freien Fläche gesetzt und unstimulierte und stimulierte Proben verglichen.

Invasionstest (Boydenkammer-Assay)

Die gerichtete Migration in einem Chemokingradienten wurde durch Experimente mit einer Chemotaxiskammer (Boydenkammer) untersucht. Diese aus Acrylglas hergestellte Kammer besteht aus einem unteren Teil mit 48 Bohrungen (Durchmesser ca. 8 mm), der für die Befüllung mit chemotaktischen Stimuli vorgesehen ist und einem oberen Teil mit 48 Bohrungen, in die die Zellsuspension gefüllt wird.

Für die Untersuchung der Wirkung von CXCL12 auf die gerichtete Migration von A764-Glioblastomzellen wurde ein Chemotaxismedium bestehend aus DMEM mit 0,2% FKS und 1 nM CXCL12 bzw. DMEM mit 5 % FKS (als Positivkontrolle) angesetzt und luftblasenfrei in die Bohrungen des unteren Kammerteils pipettiert. Auf den unteren Teil der Kammer wurde eine durch Waschen in Methanol entfettete, getrocknete 25x80 mm große Polycarbonatmembran mit 8 µm Porendurchmesser ohne Einschluss von Luftblasen aufgelegt und mit einer mit 48 Löchern versehenen Silikonmatte abgedeckt, die später das Austreten von Zellsuspension vermeiden sollte. Hierauf wurde der obere Kammerteil gesetzt und durch Schrauben- und Mutterverbindungen befestigt. In die Bohrungen des oberen Kammerteils wurden jeweils 25 µl einer vorbereiteten Zellsuspension luftblasenfrei einpipettiert. Die Zellsuspension enthielt 800 000 Zellen pro Milliliter in DMEM mit 0,2 % FKS, sodass in jede Bohrung also 20 000 Zellen eingefüllt wurden. Die Chemotaxiskammer wurde für unterschiedliche Zeiträume zwischen 12 und 30 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Zur Beendigung der Migrationszeit wurde das Medium aus den oberen Bohrungen entfernt, die Kammer geöffnet und die Polycarbonatmembran entnommen. Die Membran wurde gewendet und die nicht gewanderten Zellen von der Oberseite vorsichtig mit PBS abgewaschen. Die Membranen wurden 10 Minuten lang in Methanol fixiert, kurz in PBS gespült und die Zellkerne der durchgewanderten Zellen mit Hämalaun 30 Minuten lang gefärbt. Dann wurden die Membranen zum Bläuen für 5 Minuten in Leitungswasser gelegt, kurz gespült, halbiert und auf Objektträger mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.8 DNA-Fragmentierung (Apoptose-Assay)

Zur Untersuchung von Chemokineffekten auf die durch Doppelstrangbrüche ausgelöste Apoptose wurde eine DNA-Fragmentierungsanalyse vorgenommen.

Stimulation und DNA-Isolierung

Die Glioblastomzelllinie A764 wurde auf großen Kulturflaschen (200 mm²) ausgesät (2·10⁶ Zellen pro Flasche) und einen Tag in Kulturmedium für Tumorzelllinien vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gespült und mit Stimulationsmedium (DMEM + 0,2 % FKS) versorgt. Nach Zugabe der Stimuli wurden die

Zellen für die entsprechende Versuchsdauer zurück in den Brutschrank gegeben. Zur Beendigung des Versuches wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, der Zellrasen mit warmem PBS gespült und in 100 µl Lysispuffer (für DNA-Isolierung) abgekratzt und gut gemischt. Die Proben wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur Entfernung der Zelltrümmer 5 Minuten bei 1 600 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 10 µl einer 10% SDS-Lösung und 2 µl einer DNase-freien RNase A-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden zum Verdau der RNA 2 Stunden lang bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl einer Proteinase K-Lösung zugegeben (10 mg / ml) und zum Abbau der Proteine 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Dann wurde die DNA gefällt, indem 50 µl 10 M Ammoniumacetat und 500 µl eiskaltes Ethanol (100%) zugegeben und sorgfältig gemischt wurde. Durch Zentrifugation bei 12 000 xg für 15 Minuten wurde die gefällte DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet je nach Größe in ca. 20 µl Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der DNA-Spaltfragmente wurde ein 1,5 %iges Agarosegel zubereitet, indem 3 g Agarose in 200 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht wurde, bis die Lösung vollkommen klar und schlierenfrei war. Das Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen, der in einen Gießstand eingespannt war und ein Kamm als Platzhalter für die Probentaschen eingesetzt. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Die Kammer wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt. Die DNA-Proben und die DNA-Basenpaarleiter wurden im Verhältnis 6:1 mit Blau / Orange-Beladungspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert (12 µl Proben, 6 µl DNA-Leiter). Die Elektrophorese wurde bei einem maximalen Stromfluss von 150 mA durchgeführt, anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad für 30 Minuten gefärbt. Die Banden wurden unter UV-Licht detektiert und fotografiert.

2.2.9 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Zur Untersuchung der Regulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF durch Stimulation CXCR7-positiver Glioblastomzellen mit CXCL12 auf Proteinebene wurde ein Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) durchgeführt. Zur Probengewinnung wurden jeweils 500 000 A764-Glioblastomzellen in kleinen Kulturflaschen ausgesät und 24 Stunden lang in normalem Kulturmedium (mit 10% FKS) kultiviert. Dann wurden die Zellrasen mit PBS gespült, mit serumfreiem Medium (DMEM + 1% BSA) versehen und für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen weiterkultiviert. Nach Ablauf dieser Vorinkubationszeit wurde das Medium entfernt und durch 3,5 ml frisches serumfreies Medium mit oder ohne Zusatz von 1 nM CXCL12 ersetzt. Eine Stunde nach Inkubationsbeginn wurden 500 µl dieses Mediums jeweils als Startwert

abgenommen. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde je Flasche eine weitere Probe abgenommen und der Versuch beendet.

Für den Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest wurde zunächst eine 96-Lochplatte mit ebenem, optisch durchlässigem Boden mit dem ersten Antikörper gegen VEGF (*Capture*-Antikörper) beschichtet. Hierfür wurden in jede Vertiefung dieser Platte 200 µl einer 0,8 µg/ml Antikörperverdünnung (in PBS) gefüllt und unter Schütteln für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Vertiefungen dreimal mit PBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktionen wurde die Platte mit einer Blockierungslösung (1 % BSA, 5 % Saccharose in PBS) für drei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend erneut drei Waschschriffe mit PBS + 0,05 % Tween-20 durchgeführt. Durch Verdünnung von rekombinantem VEGF in PBS + 0,1 % BSA wurde eine Konzentrationsreihe von 2 ng/ml bis 37,5 pg/ml hergestellt, die als Standard für die spätere Auswertung dienen sollte. Jeweils 200 µl dieser Standardkonzentrationen und der zu untersuchenden Proben wurden in die Vertiefungen der vorbereiteten 96-Loch-Platte pipettiert und über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen geleert und dreimal mit PBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen, bevor jeweils 200 µl einer Antikörperlösung des in Diluent verdünnten biotinylierten VEGF-Antikörpers pro Vertiefung einpipettiert und für drei Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde eine 1:200 in Diluent verdünnte Streptavidin-Peroxidase-Komplexlösung aufgetragen (200 µl pro Vertiefung) und unter Schütteln für 20 Minuten inkubiert. Drei weitere Waschschriffe schlossen sich daran an. Für die Detektionsreaktion wurde jeweils 100 µl einer gebrauchsfertige 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidinlösung als Substrat zugegeben und die Reaktion nach 10 Minuten durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Das gelbe Farbsignal wurde in einem ELISA-Messgerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zur Auswertung wurden die VEGF-Konzentrationen der jeweiligen Proben mithilfe der mitgeführten Standardreihe bestimmt. Die Werte der eine Stunde nach Stimulationsbeginn abgenommenen Proben wurden von den jeweiligen Werten nach 24 Stunden abgezogen. Aus den gemessenen sekretierten VEGF-Mengen der unstimulierten und CXCL12-stimulierten Proben wurden jeweils Mittelwerte gebildet und der Mittelwert der unstimulierten Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

2.2.10 Statistische Analysen und Auswertungen

Alle angegebenen Fehler sind als Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe bestimmt worden. Zur Untersuchung von Signifikanzen wurde ein heteroskedastischer, zweiseitiger Student'scher T-Test durchgeführt. Die Grenzen für statistische Signifikanz wurden bei 5 % (* $p < 0,05$), 1 % (** $p < 0,01$) und 0,1 % (***) $p < 0,001$) gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Transkriptionsanalyse der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Chemokine CXCL11 und CXCL12 in humanen astroglialen Tumoren

Zunächst sollte das Vorkommen der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie der Liganden CXCL11 und CXCL12 in astroglialen intrakraniellen Tumoren und eine mögliche Korrelation mit dem Malignitätsgrad untersucht werden. Hierfür wurde die Transkription dieser Gene auf mRNA-Ebene in humanen Astrozytom- und Glioblastomgewebeproben unterschiedlicher WHO-Grade (Grad I-III und Glioblastom, GBM) und nicht-neoplastischen humanen Hirngewebeproben (NH, Normalhirn) mittels realtime RT-PCR mit entsprechenden TaqMan[®] Primern und Sonden untersucht. Im logarithmischen Reaktionsverlauf der Polymerase-Kettenreaktion wurden die entsprechenden C_T -Werte aufgezeichnet, die jeweils in Bezug gesetzt wurden zu den C_T -Werten des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), sodass ein ΔC_T -Wert erhalten wurde. Ein ΔC_T -Wert-Unterschied von 3,33 entspricht also einem zehnfachen Expressionsunterschied, wobei höhere ΔC_T -Werte einer niedrigeren Expression und niedrigere ΔC_T -Werte einer höheren Expression entsprechen. In Abbildung 6 sind auf der linken Ordinate die ΔC_T -Werte verzeichnet, während die rechte Skala die relative Genexpression verglichen zum Haushaltsgen GAPDH in logarithmischer Darstellung angibt.

Die Transkription des Rezeptors CXCR4 wies allgemein eine stärkere Streuung auf, jedoch zeigte sich auf mRNA-Ebene tendenziell eine höhere CXCR4-Expression in den astroglialen Tumoren verglichen mit dem nicht-neoplastischen Gewebe (Abbildung 6, links). Da in einer Normalhirnprobe kein CXCR4 detektiert wurde, wurde der Mittelwert aus den detektierbaren vier ΔC_T -Werten gebildet. Er betrug 7,78, die Mittelwerte der Astrozytomproben betragen 6,70 (Grad I), 8,06 (Grad II), 6,81 (Grad III) und der Mittelwert der Glioblastomprobe war 9,07. Eine Zunahme der CXCR4-Transkription mit höherem Malignitätsgrad wurde also nicht festgestellt. Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit in der Literatur beschriebenen Sachverhalten (Ma *et al.* 2008).

Im Gegensatz dazu wurde eine signifikant höhere CXCR7-Expression in malignen Astrozytomen und Glioblastomen festgestellt: Während die Expression von CXCR7 in nicht-neoplastischem Hirngewebe und in den benignen Astrozytomen Grad I nahezu identisch war (Mittelwerte ΔC_T 5,59 bzw. 5,29), waren die ΔC_T -Werte im Vergleich dazu in höhergradigen, malignen Astrozytomen auf 2,80 (Grad II) und 3,63 (Grad III) und in den als Grad IV eingestuften Glioblastomen auf 3,67 erhöht (Abbildung 6, Mitte). Demnach ist die durchschnittliche Transkription von CXCR7 in malignen Astrozytomen und Glioblastomen (Grad II bis IV) fast zehnfach erhöht gegenüber den nicht-neoplastischen Hirnproben und den benignen Astrozytomproben. Die Unterschiede der malignen zum nicht-neoplastischen

Hirngewebe waren signifikant (* $p < 0,05$; ** $< 0,01$), im Fall der Glioblastomproben sogar hochsignifikant (***) $p < 0,001$).

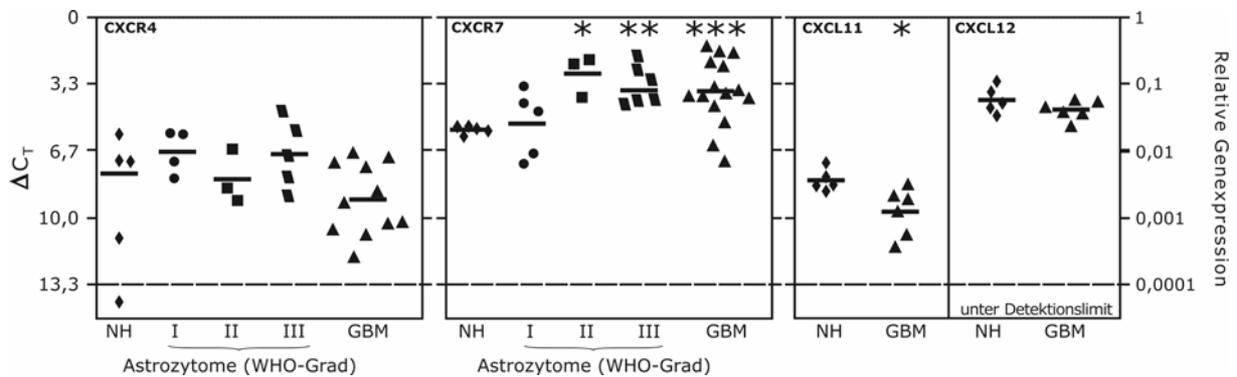


Abbildung 6: Transkription der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und der Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Astrozytom- und Glioblastomgeweben. Die mRNA-Expression wurde in Normalhirnproben (NH), Astrozytomproben unterschiedlicher WHO-Graduierung und Glioblastomproben (WHO Grad IV, GBM) mittels realtime RT-PCR mit TaqMan® Primern und Sonden in Triplikaten untersucht, als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. CXCR7 wurde in astroglialen Tumorproben signifikant stärker exprimiert als in gesundem Hirngewebe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Transkription des Chemokins CXCL11 in Glioblastomgewebe (GBM) war leicht, aber signifikant reduziert im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe (NH). Die gemittelten ΔC_T -Werte betragen 8,12 (Normalhirn) und 9,68 (Glioblastome). Das Chemokin CXCL12 hingegen wurde in nicht-neoplastischem Hirngewebe und in Glioblastomgewebe ungefähr im gleichen Maße detektiert. Der mittlere ΔC_T -Wert betrug für Normalhirnproben 4,12 und für Glioblastomproben 4,6 (Abbildung 6, rechts). Der Rezeptor CXCR3, der neben CXCR7 auch als Rezeptor für CXCL11 zur Verfügung steht, wurde in den untersuchten Glioblastomproben nicht oder nur in sehr geringem Maß detektiert (nicht abgebildet).

3.2 Nachweis des Chemokinrezeptors CXCR7 *in situ* an Gefrierschnitten von humanen Glioblastomen

Nachdem festgestellt worden war, dass CXCR7 in humanen malignen Astrozytomen und Glioblastomen in stärkerem Maß exprimiert wird als in nicht-neoplastischem Hirngeweben und benignen Astrozytomgeweben, stellte sich die Frage, welche Zellen im Tumorverband CXCR7 exprimieren. Durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an Gefrierschnitten von humanen Glioblastomen wurde CXCR7 mit Markern für verschiedene Zellpopulationen innerhalb des Tumors verglichen. Als astroglialer Marker wurde das gliale Filamentprotein GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) verwendet, das sowohl von gesunden Astrozyten als auch von Glioblastomzellen mit astroglialem Charakter gebildet wird. In Glioblastomen gibt es allerdings auch häufig Regionen, in denen kein GFAP detektiert werden kann. Dies kann auf den hohen Entartungsgrad der Tumorzellen zurückgeführt werden. Für die Färbung von Mikroglia wurde ein Antikörper gegen Iba1 (*Ionized calcium binding adapter molecule 1*)

verwendet, ein Kalziumionen-bindendes Adapterprotein, das spezifisch auf Mikrogliazellen und Makrophagen gefunden wird. Als Marker für Endothelzellen wurde Pecam1 (CD31, *Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) verwendet, das zur Gruppe der Zelladhäsionsproteine (*Cell adhesion molecules*, CAM) gehört. Zur Detektion von proliferierenden Zellen wurde der monoklonale Antikörper MIB-1 (*Made in Borstel*) verwendet, der an das Antigen Ki-67 bindet. Dieses Antigen tritt während des Zellzyklus in der G1-Phase, S-Phase, G2-Phase und M-Phase auf, jedoch nicht in der ruhenden Zelle (G0-Phase).

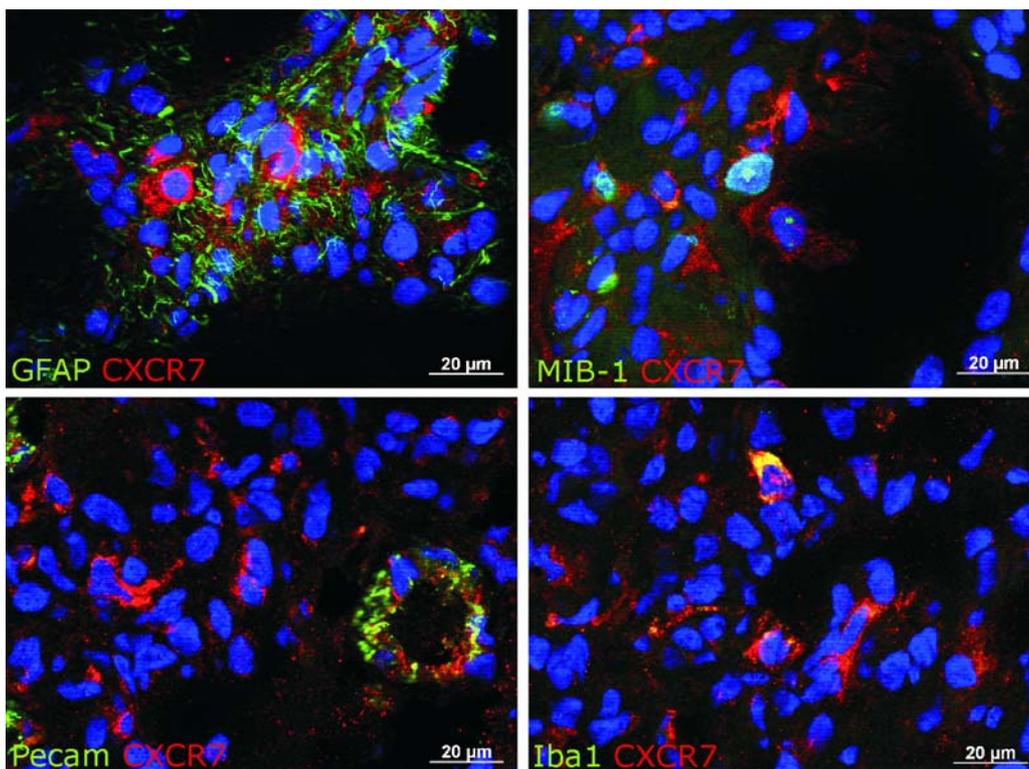


Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von CXCR7 (rot) und verschiedenen Markern (grün) an Glioblastomschnitten. Gefrierschnitte von humanen Glioblastomen wurden mit Antikörpern gegen CXCR7 und gegen Marker unterschiedlicher Zellpopulationen und den entsprechend markierten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 555 rot; Alexa Fluor 488 grün) behandelt. Zellkerne wurden mit DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldichloridhydrat) blau markiert. Als Marker wurden GFAP (Astroglia), MIB-1 (proliferierende Zellen), Pecam (Endothelzellen) und Iba1 (Mikroglia) verwendet. CXCR7 wurde von Mikroglia und tumor-assoziierten Gefäßzellen exprimiert, jedoch hauptsächlich von proliferierenden Tumorzellen, die teilweise GFAP exprimierten.

Es konnte gezeigt werden, dass Färbungen für CXCR7 kolokalisiert waren mit Mikrogliafärbungen (Iba1) und Endothelfärbungen (Pecam) (Abbildung 7, unten). Da im gesunden Hirngewebe Mikroglia funktionell den Gewebsmakrophagen entsprechen, wird Iba1 als spezifisches Mikroglia-merkmal in Hirngewebe angesehen. Bei einer Glioblastomerkrankung können jedoch auch von extern Makrophagen einwandern. Die mit Iba1-Antikörpern angefärbte Zellpopulation muss also als Glioblastom-assoziierte Makrophagen / Mikroglia-Mischpopulation angesehen werden. Über die Endothelzellen und die Mikroglia / Makrophagen hinaus war jedoch eine Vielzahl von Tumorzellen, die häufig in

GFAP-positiven Regionen des Tumors lokalisiert waren, ebenfalls CXCR7-positiv. Einige der CXCR7-exprimierenden Tumorzellen befanden sich in der Proliferationsphase, sodass sie durch den Proliferationsmarker MIB-1 markiert wurden. Die in Abbildung 7 gezeigte nukleäre Färbung gibt das typische Bild dieses Antikörpers wieder, der auch in diagnostischen Routinefärbungen zur Bestimmung von Malignitätsgraden anderer Tumoren (z.B. von Melanomen) Verwendung findet. Neben den Endothelzellen und den Mikrogliazellen exprimierte also ein Großteil der Tumorzellen, die in GFAP-positiven Regionen lokalisiert waren und sich in der Teilungsphase befanden, den Chemokinrezeptor CXCR7.

Im Vergleich dazu wurden Färbungen an nicht-neoplastischem Hirngewebe durchgeführt (Abbildung 8). Hier war der überwiegende Teil des Gewebes nicht immunreaktiv für CXCR7, CXCR7-Expression fand sich jedoch ebenfalls auf Endothelzellen und Mikrogliazellen.

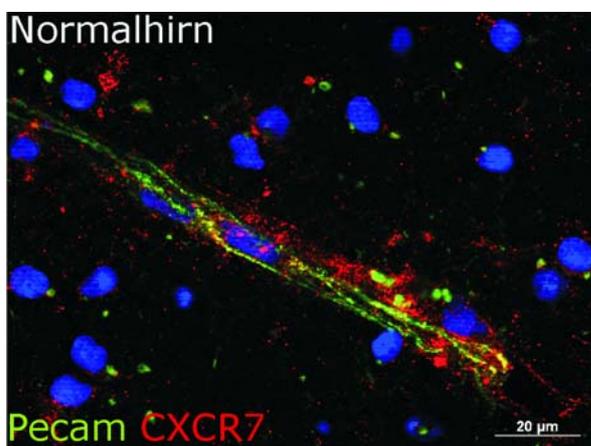


Abbildung 8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CXCR7 (rot) und Pecam (grün) an gesundem humanem Hirngewebe. Gefrierschnitte von humanem Hirngewebe wurden mit Antikörpern gegen CXCR7 und Pecam sowie entsprechend markierten Sekundärantikörpern gefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. In gesundem Hirngewebe wurde CXCR7 vor allem auf Gefäßen gefunden.

Schließlich sollte durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen geklärt werden, ob die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden oder auf jeweils den gleichen Zellen vorkommen. Auch die Lokalisation des Chemokins CXCL12 im Verhältnis zu den rezeptortragenden Zellen wurde durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen bestimmt.

Es zeigte sich, dass nur wenige Zellen innerhalb des Tumors überhaupt CXCR4 exprimierten und diese nicht identisch waren mit den CXCR7 exprimierenden Zellen (Abbildung 9, oben links). Der Ligand CXCL12 war sowohl kolokalisiert mit CXCR7 (Abbildung 9, oben rechts) als auch mit CXCR4 (Abbildung 9, unten links). Hierbei kann es sich um von diesen Zellen selbst produziertes und sezerniertes CXCL12 oder auch um rezeptorgebundenes und teilweise bereits internalisiertes CXCL12 handeln.

Da für diese Doppelfärbungen Primärantikörper aus derselben Spezies verwendet wurden, wurde zwischen den entsprechenden Inkubationsschritten eine Blockierung mit $F(ab')_2$ -Fragmenten durchgeführt. Neben den gewöhnlichen Sekundärantikörperkontrollen, bei denen eine Inkubation ohne Erstantikörper erfolgt, wurde hier deshalb auch eine Kontrolle der $F(ab')_2$ -Blockierung durchgeführt. Der Antikörper gegen CXCR7 wurde wie gewöhnlich

inkubiert, der zweite Primärantikörper (z.B. anti-CXCL12) jedoch weggelassen, um eventuelle unspezifische Bindungen des zweiten Sekundärantikörpers an den ersten Primärantikörper zu detektieren (Abbildung 9, unten rechts). Auf dieser Aufnahme sind daher nur CXCR7-exprimierende Zellen angefärbt.

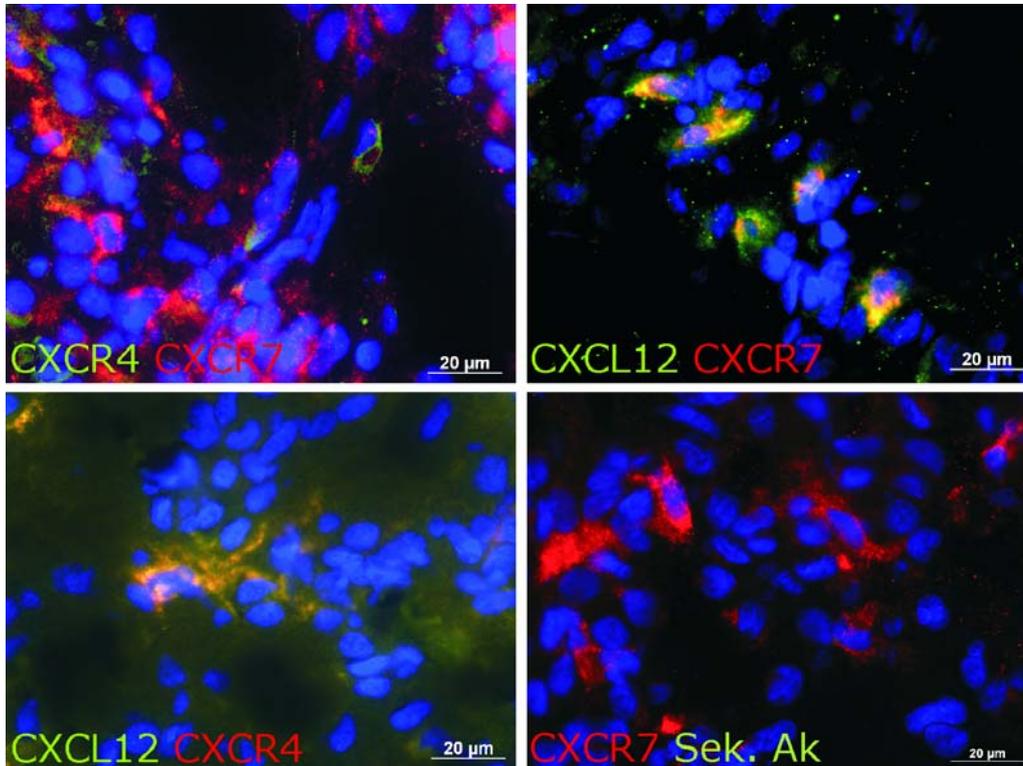


Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von CXCR7 (rot) und CXCR4 bzw. CXCL12 (grün) und von CXCR4 (rot) und CXCL12 (grün) an Glioblastomschnitten. Gefrierschnitte von humanen Glioblastomen wurden mit Antikörpern gegen CXCR7, CXCR4 und CXCL12 und den entsprechend markierten Sekundärantikörpern in unterschiedlichen Kombinationen markiert. Primärantikörper aus derselben Spezies wurden mit einer F(ab')₂-Fragmentblockierung seriell gefärbt, die Kontrollfärbung unten rechts zeigt die erfolgreiche Blockierung (nur CXCR7 gefärbt, keine Bindung des grün markierten Sekundärantikörpers). Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. CXCR7 wird von vielen Tumorzellen exprimiert, CXCR4 nur von vereinzelt, die nicht CXCR7 zeigen. CXCL12 und CXCR7 sowie CXCL12 und CXCR4 sind jeweils auf denselben Zellen zu detektieren.

3.3 Transkriptionsanalyse der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Chemokine CXCL11 und CXCL12 in humanen Zelllinien

Die funktionelle Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR7 sollte durch *in vitro*-Experimente mit einer geeigneten Glioblastomzelllinie untersucht werden. Daher wurde zunächst in einer Übersichtsuntersuchung (*Screen*) die Transkription der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie der Chemokine CXCL11 und CXCL12 in humanen Zelllinien mittels einer realtime RT-PCR analysiert. Es wurden acht verschiedene humane Glioblastomlinien untersucht, die z.T. kommerziell erhältlich waren (U118, U343), jedoch überwiegend durch Kultivierung von primären Glioblastomzellen über einen längeren Zeitraum generiert worden waren (Bezeichnung A...). Außerdem wurde die humane Mammakarzinomzelllinie MDA MB-

231, die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 und die humane monozytäre Tumorzelllinie THP-1 sowie primäre humane Endothelzellen aus Nabelschnurpräparationen (HUVEC) untersucht (Abbildung 10).

In den Glioblastomzelllinien konnte CXCR4 nicht oder in nur sehr geringem Maß (A767, ΔC_T -Wert 15,79) detektiert werden. Die humane Mammakarzinomzelllinie MDA MB-231 exprimierte CXCR4 (ΔC_T -Werte 11,55) und in der monozytären Leukämiezelllinie THP-1 wurde sogar über 100-fach mehr CXCR4-mRNA detektiert (ΔC_T -Wert 4,21). Dies deckt sich mit aus der Literatur bekannten Daten (Kang *et al.* 2005, Schols *et al.* 1997).

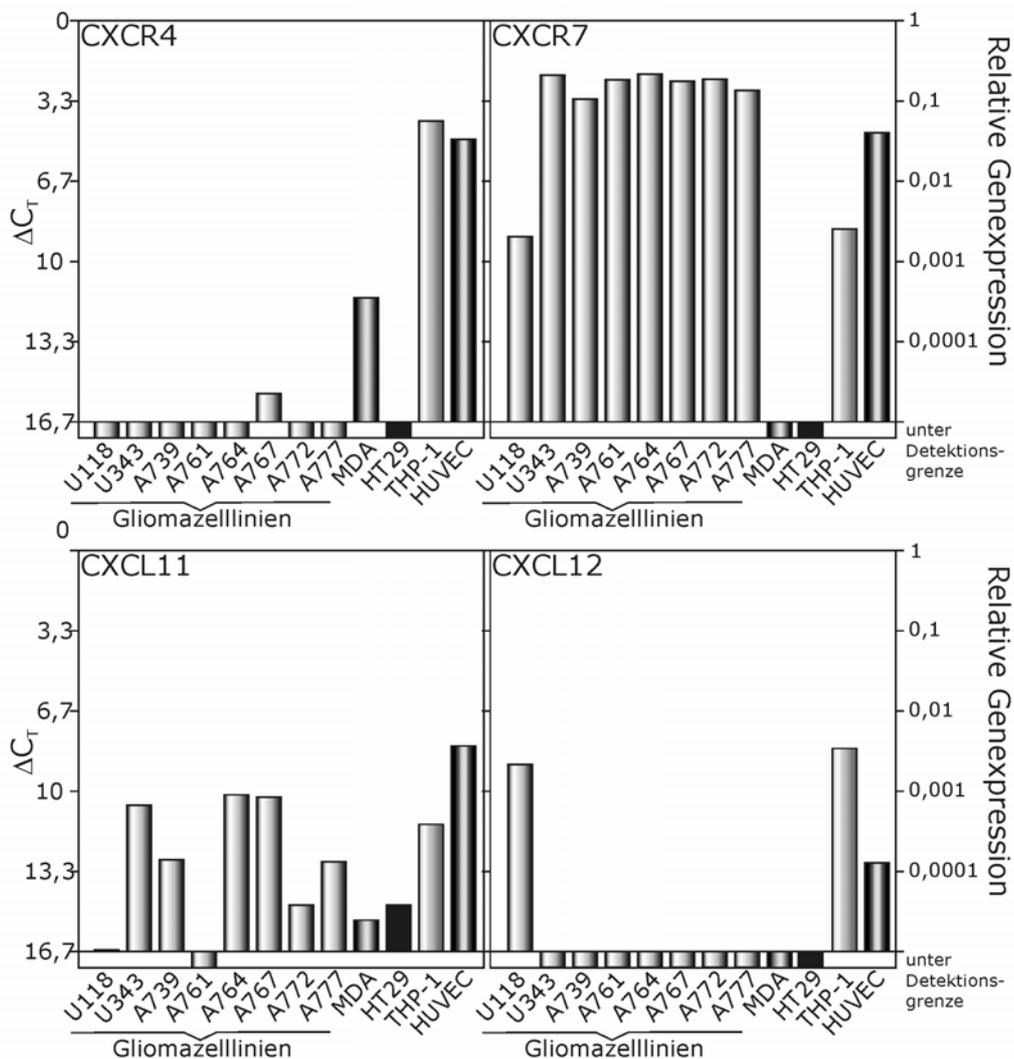


Abbildung 10: Transkription der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Zelllinien. Zur Überblicksuntersuchung (Screen) an humanen Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft und humanen Endothelzellen (HUVEC) wurde die jeweilige mRNA-Expression mittels realtime RT-PCR mit TaqMan® Primern und Sonden untersucht, als Referenzgen wurde GAPDH untersucht. CXCR4 wurde in humanen Glioblastomzelllinien nicht oder kaum exprimiert, während CXCR7 sehr stark vorhanden ist. Die Liganden CXCL11 und CXCL12 wurden teilweise auf mäßigem Niveau, teilweise gar nicht transkribiert.

Im Gegensatz zur geringen Transkription von CXCR4 wurden in den Glioblastomlinien große Mengen CXCR7-mRNA detektiert. Hierbei lagen die ΔC_T -Werte für U343 und die selbst-

generierten Linien zwischen 3,3 (A739) und 2,14 (A764), nur in U118-Zellen war die CXCR7-Transkription erheblich geringer (ΔC_T -Wert 9,02). In den Proben der Mammakarzinomzelllinie MDA MB-231 und der Kolonkarzinomzelllinie HT29 konnte keine CXCR7-mRNA detektiert werden. Die Monozytenzelllinie THP-1 und die Endothelzellen zeigten eine verhältnismäßig hohe CXCR7-Expression auf mRNA-Ebene (ΔC_T -Werte 8,35 bzw. 4,68), jedoch niedriger als in den untersuchten Glioblastomzelllinien.

Die Transkription des Chemokins CXCL11 war in den Glioblastomlinien sehr variabel. In der Linie U118 wurde kaum, in der Linie A761 gar keine CXCL11-mRNA detektiert. Die übrigen Linien zeigten geringe (A772, ΔC_T -Wert 14,79) bis mäßige CXCL11-Expression (A764, ΔC_T -Wert 10,20). In den Mammakarzinomzellen MDA MB-231, der Kolonkarzinomzellen HT29 und der Monozytenlinie THP-1 war die CXCL11-Transkription eher gering (15,41, 14,78 bzw. 11,43). Die humanen Endothelzellen zeigten eine vergleichsweise hohe mRNA-Expression (ΔC_T -Wert 8,17).

Das Chemokin CXCL12 wurde in den Glioblastomlinien – mit Ausnahme von U118-Zellen (ΔC_T -Wert 8,94) – nicht exprimiert. Auch die Mammakarzinomzelllinie MDA MB-231 und die Kolonkarzinomzelllinie HT29 zeigten keine CXCL12-Expression. Die monozytäre Tumorzelllinie THP-1 exprimiert verhältnismäßig viel CXCL12-mRNA (ΔC_T -Wert 8,28), die humanen Endothelzellen (HUVEC) etwas weniger (ΔC_T -Wert 13,02).

Die untersuchten Glioblastomzelllinien exprimierten also größtenteils kein CXCR4, jedoch sehr viel CXCR7-mRNA. Die CXCL11-Transkription war innerhalb der Glioblastomlinien sehr heterogen, wohingegen nur eine der untersuchten Glioblastomlinien CXCL12 auf mRNA-Ebene exprimierten.

3.4 Untersuchung der CXCR7-Expression auf Proteinebene

Um zu untersuchen, ob CXCR7 auch auf Proteinebene gebildet wird, wurden von sieben verschiedenen Glioblastomzelllinien Zellmembranen isoliert und diese Proben einer Western blot-Untersuchung mit einem Antikörper gegen CXCR7 unterzogen. Anhand der Aminosäuresequenz und dem zu erwartenden Glykosylierungsmuster wurde für CXCR7 ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa vorhergesagt, in diesem Bereich befand sich auch die durch den Antikörper detektierte Bande.

Im Bereich des spezifischen Molekulargewichts für CXCR7 konnte nur für die Zelllinie U118, die eine mittelstarke Expression von CXCR7 auf mRNA-Ebene aufwies, keine Bande detektiert werden. Die Membranpräparationen der übrigen Glioblastomzelllinien hingegen wiesen beim spezifischen Molekulargewicht von 55 kDa Proteinbanden von unterschiedlicher Intensität auf (Abbildung 11). Die stärkste Proteinbande wurde für die Zelllinie A761 detektiert, gefolgt von A767 und A764.

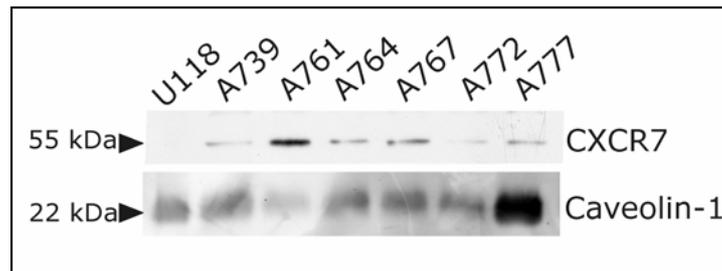


Abbildung 11: Proteinexpression von CXCR7 in humanen Glioblastomlinien. Membranpräparationen von 7 unterschiedlichen humanen Glioblastomlinien wurden durch Western blot-Analysen hinsichtlich ihrer CXCR7-Expression untersucht. CXCR7 war in den Selbsthergestellten Glioblastomlinien A 739 bis A777 detektierbar, jedoch nicht in der Glioblastomlinie U118, die auch auf mRNA-Ebene eine sehr viel geringere CXCR7-Transkription gezeigt hatte. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Präparation der Membranfraktion wurde eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen Caveolin-1 durchgeführt.

Nach der Detektion der CXCR7-Banden wurden Primär- und Sekundärantikörper von der PVDF-Membran abgewaschen und eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen Caveolin-1 durchgeführt. Caveolin-1 ist ein 22 kDa großes, membranständiges Protein, das an der Bildung von Caveolae an der Zelloberfläche beteiligt ist. Da Caveolin bei vielen Prozessen an der Zellmembran wie beispielsweise Exozytose und Zellteilung eine Rolle spielt, die in unterschiedlichen Zelllinien nicht miteinander vergleichbar sind, diente die Untersuchung des Caveolingehaltes nicht als Beladungskontrolle oder zur Quantifizierung der CXCR7-Bande. Vielmehr sollte sichergestellt werden, dass die Präparation der Membranfraktion erfolgreich gewesen war.

3.5 Untersuchung zum Transkriptionsprofil der Glioblastomzelllinie A764

Für die weiteren Experimente sollte aus den zur Verfügung stehenden humanen Glioblastomzelllinien eine geeignete Linie ausgewählt werden. Bei der genaueren Charakterisierung der selbstgenerierten Glioblastomzelllinien (A...) stellte sich heraus, dass die anhand der Proteinexpression bevorzugte Linie A761 keinerlei GFAP-Expression auf mRNA-Ebene aufwies. Da dies jedoch ein wesentliches Merkmal von Glioblastomen ist, konnte die Linie A761 nicht als *in vitro*-Modell verwendet werden. Die Linie A767 wies neben der Transkription von CXCR7 auch eine geringe CXCR4-mRNA-Menge auf und war daher ebenfalls nicht geeignet, die CXCR7-vermittelten Effekte isoliert zu untersuchen. Daher wurde die Glioblastomzelllinie A764 ausgewählt und mittels realtime RT-PCR noch exakter charakterisiert (Abbildung 12).

Der astrogliale Marker GFAP wurde auf hohem Niveau exprimiert (ΔC_T -Wert $2,25 \pm 0,41$), ebenso wie der Chemokinrezeptor CXCR7 (ΔC_T -Wert $2,27 \pm 0,11$). Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 konnten nicht detektiert werden, ebenso wie CXCL12, der Ligand für CXCR4 und CXCR7. Der weniger affine Ligand CXCL11 für CXCR3 und CXCR7 war auf mRNA-Ebene mittelstark exprimiert (ΔC_T -Wert $10,20 \pm 1,72$).

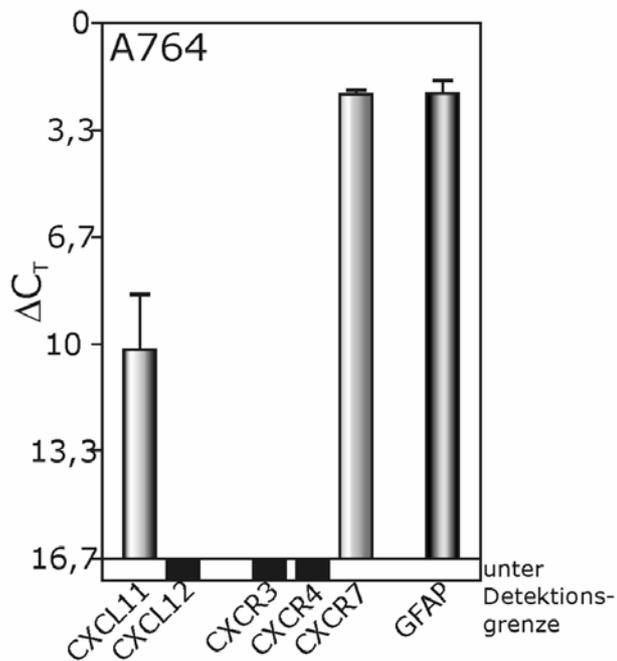


Abbildung 12: Transkriptionsprofil der humanen Glioblastomzelllinie A764. Die Transkription verschiedener Chemokine und ihrer Rezeptoren sowie des astroglialen Markers GFAP wurden mittels realtime RT-PCR mit TaqMan® Primern und Sonden untersucht, GAPDH diente als Referenzgen (n = 3 individuelle RNA-Präparationen). Die Zelllinie exprimiert CXCR7 in hohem Maße, ebenso wie den astroglialen Marker GFAP. Die übrigen untersuchten Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 wurden nicht detektiert. Der Ligand CXCL11 wurde mäßig stark, CXCL12 nicht exprimiert.

Die Glioblastomzelllinie A764 war also hinsichtlich des Transkriptionsprofils der Chemokinrezeptoren ein geeignetes in vitro-Modell zur Untersuchung CXCL12-CXCR7-vermittelter Signaltransduktionskaskaden und zellulären Effekte.

3.6 Untersuchungen zur Regulation von CXCR7

Chemokinrezeptoren können von einer Reihe von Faktoren reguliert werden. Im Zusammenhang mit ihrer Funktion in Tumoren kommen hierfür einerseits biologische Signalmoleküle wie Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie die als Liganden fungierenden Chemokine selbst in Frage, andererseits kann auch Sauerstoffmangel (Hypoxie) die Chemokinrezeptorexpression beeinflussen. Die Einflüsse dieser Faktoren auf die Expression des Chemokinrezeptors CXCR7 wurden im Folgenden durch Stimulationsexperimente mit A764-Glioblastomzellen und anschließenden realtime RT-PCR-Analysen untersucht.

3.6.1 Regulation von CXCR7 durch Zytokine, Chemokine und Wachstums-faktoren

Zur Untersuchung der Regulation von CXCR7 auf mRNA-Ebene wurde die Glioblastomzelllinie A764 unter serumfreien Bedingungen für 24 Stunden mit den Zytokinen Interferon γ (IFN γ , 10 ng/ml, ~ 0,6 nM), Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α , 10 ng/ml, ~ 0,6 nM), Interleukin 1 β (IL1 β , 10 ng/ml, ~ 0,6 nM), Interleukin 6 (IL6, 10 ng/ml, ~ 0,5 nM) und Interleukin 15 (IL15, 10 ng/ml, ~ 0,8 nM), dem Tumor-Wachstumsfaktor β 1 (TGF β 1, 5 ng/ml, ~ 0,2 nM) sowie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, 10 ng/ml, ~ 1,7 nM) und den Chemokinen CXCL11 (10 ng/ml, ~ 1,2 nM) und CXCL12 (10 ng/ml, ~ 1,3 nM) stimuliert. Aus den stimulierten Zellen wurde die RNA isoliert und mittels realtime RT-PCR untersucht. Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der die gemessenen ΔC_T -Werte der

stimulierten Proben auf die jeweils unstimulierte Kontrolle bezogen und linearisiert werden.

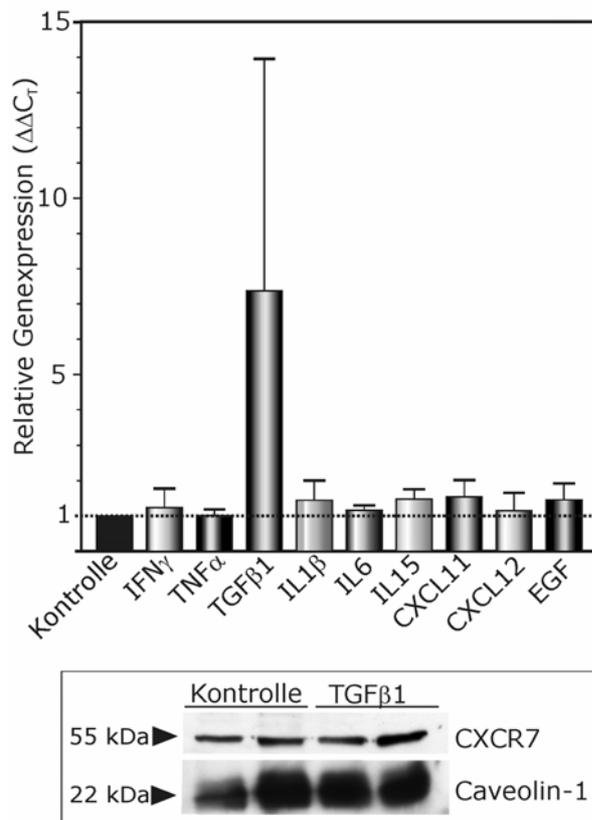


Abbildung 13: Regulation der CXCR7-Transkription und -Expression durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine.

Die Glioblastomzelllinie A764 wurde 24 Stunden lang unter serumfreien Bedingungen (DMEM + 1% BSA) stimuliert. Die Stimulanzien wurden in einer Endkonzentration von 10 ng/ml verwendet, mit Ausnahme von TGF β 1 (5 ng/ml). Die Transkription von CXCR7 wurde mittels realtime RT-PCR mit TaqMan® Primern und Sonden untersucht, GAPDH diente als Referenzgen (n = 3) und mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert ausgewertet (oben).

Aufgrund der hohen Streuung war die für TGF β 1 ermittelte Steigerung der CXCR7-Transkription nicht signifikant, daher wurde dieser Effekt auf Proteinebene untersucht. Aus unter serumfreien Bedingungen mit oder ohne 5 ng/ml TGF β 1 inkubierte A764-Glioblastomzellkulturen wurden Zellmembranen isoliert und in einer Western blot-Analyse mit einem Antikörper gegen CXCR7 untersucht. Die Auftragsmenge wurde durch eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen Caveolin-1 überprüft. Eine Regulation der CXCR7-Expression durch TGF β 1 konnte nicht gezeigt werden.

Die meisten untersuchten Stimulanzien regulierten die CXCR7-Transkription nicht oder kaum. Dies war für IFN γ ($1,24 \pm 0,54$), TNF α ($1,00 \pm 0,17$), IL1 β ($1,45 \pm 0,57$), IL6 ($1,17 \pm 0,14$), IL15 ($1,48 \pm 0,28$), CXCL11 ($1,55 \pm 0,45$), CXCL12 ($1,15 \pm 0,51$) und EGF ($1,46 \pm 0,45$) der Fall (Abbildung 13).

Nur TGF β 1 zeigte eine Steigerung der Transkription von CXCR7 im Mittel auf das ca. siebenfache ($7,37 \pm 6,59$), jedoch war dieser Effekt aufgrund der hohen Streuung der Ergebnisse (2,67, 7,41 und 16,68) nicht signifikant.

Daher wurde im Anschluss untersucht, ob der Tumorstromfaktor TGF β 1 die Expression von CXCR7 auf Proteinebene steigert. Hierfür wurden A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen mit oder ohne 5 ng/ml ($\sim 0,2$ nM) TGF β 1 für 24 Stunden inkubiert und eine Membranisolierung der jeweiligen Kulturen vorgenommen. Die Membranpräparationen wurden in einer Western blot-Analyse mit einem Antikörper gegen CXCR7 untersucht und die Auftragsmenge durch eine erneute Immuninkubation mit Caveolin-1 kontrolliert (Abbildung 13, unten). Es zeigte sich, dass die Expression von CXCR7 auf Proteinebene nicht durch Stimulation mit TGF β 1 gesteigert werden konnte.

3.6.2 Regulation von CXCR4 und CXCR7 durch Hypoxie

Zur Untersuchung der Einflüsse von hypoxischen Bedingungen auf die Chemokinrezeptorexpression wurden Kulturen von A764-Glioblastomzellen für 24 und 48 Stunden in

Kulturmedium mit 10 % FKS in einem normalen Sauerstoffpartialdruck (21 % O₂) und parallel in einem Brutschrank mit 5 % O₂, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert, anschließend wurde die RNA isoliert. Da die normalerweise in den realtime RT-PCR als Haushaltsgen verwendete GAPDH unter hypoxischen Bedingungen reguliert werden kann, wurde in der anschließenden realtime RT-PCR ein TaqMan[®] Primer und Sonde-Mix für 18s rRNA verwendet. CXCR4 konnte in den A764-Kulturen, die einem normalen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt worden waren, nicht detektiert werden. In den unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Kulturen konnte CXCR4 sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubationszeit detektiert werden.

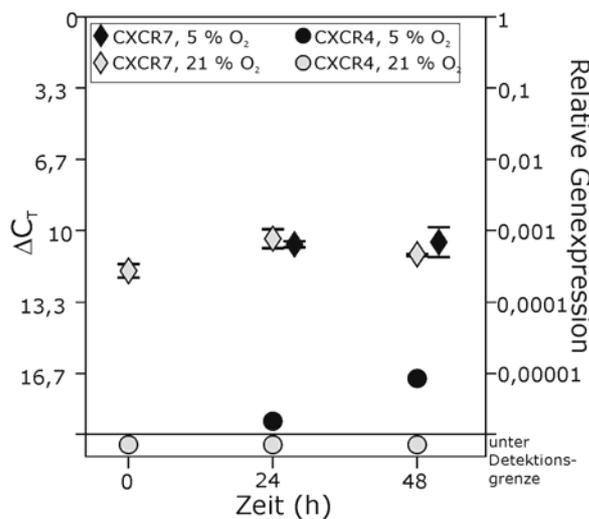


Abbildung 14: Regulation der Transkription von CXCR7 und CXCR4 durch Hypoxie. Die Glioblastomzelllinie A764 wurde in Kulturmedium mit 10% FKS kultiviert und normoxischen (21 % O₂, hellgrüne Symbole) und hypoxischen Bedingungen (5 % O₂, dunkelgrüne Symbole) ausgesetzt. Die Expression von CXCR7 (Rauten) und CXCR4 (Kreise) wurde mittels realtime RT-PCR untersucht, wobei als Haushaltsgen 18s rRNA verwendet wurde. Die Expression von CXCR4 wurde unter hypoxischen Bedingungen heraufreguliert, während CXCR7 nicht reguliert wurde.

Die Transkription von CXCR4 wurde also wie in der Literatur für U87MG-Gliomzellen beschrieben (Zagzag *et al.* 2006) in A764-Glioblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen etwas gesteigert, wohingegen die Transkription von CXCR7 im Rahmen der üblichen Schwankungen zwischen verschiedenen Kulturen konstant blieb (Abbildung 14).

3.7 Untersuchungen zur Signaltransduktion von CXCL12 / CXCR7

Bislang wurde die Signaltransduktion des Ligand-Rezeptorpaars CXCL12 / CXCR7 in der Literatur nicht zufrieden stellend geklärt. Es gibt sogar Untersuchungen, die andeuten, dass CXCR7 möglicherweise kein signalleitender Rezeptor ist. Daher wurde im Folgenden die durch CXCL12 / CXCR7 ausgelöste Signaltransduktion in der humanen Glioblastomzelllinie A764 auf Ebene der Kinasephosphorylierung und auf Ebene der Transkriptionsfaktoren untersucht.

3.7.1 Kinetik der Kinasephosphorylierung

Für die initialen Untersuchungen, ob CXCL12 auf CXCR7-exprimierenden Glioblastomzellen eine Signaltransduktionskaskade auslöst, wurden A764-Glioblastomzellen unter serumfreien

Bedingungen mit 1 nM CXCL12 unterschiedlich lang stimuliert (10, 20 und 40 Minuten) und in einer Western blot-Analyse auf eine Phosphorylierung der Kinasen ERK1 / 2 (*Extracellular-signal related kinase 1 / 2*), Akt und p38 untersucht.

Phosphorylierung von ERK 1 / 2 (p42/44)

Die Untersuchungen der beiden MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 ergaben, dass bereits nach zehnminütiger Stimulation der A764-Glioblastomzellen mit 1 nM CXCL12 ein deutliches und nach zwanzigminütiger Stimulation ein starkes Phosphorylierungssignal detektiert werden konnte (Abbildung 15). Das Signal nach 20 Minuten entsprach ungefähr demjenigen der als Positivkontrolle mitgeführten Probe einer zehnminütigen EGF-Stimulation. In einem Vorversuch wurde gezeigt, dass bei einer Stimulation mit EGF nach 10 Minuten ein maximales Phosphorylierungssignal von ERK 1 / 2 erhalten wurde.

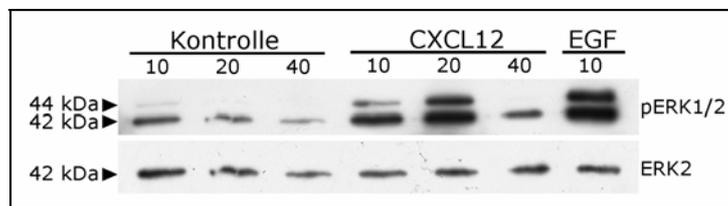


Abbildung 15: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von ERK1 / 2 (*Extracellular-signal related kinase 1 / 2*). A764-Glioblastomzellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit 1 nM CXCL12 oder 1 nM EGF (Positivkontrolle) für 10, 20 oder 40 Minuten stimuliert und in Lysispuffer mit Glycerolphosphat und Vanadat geerntet. Die Proben wurden im Western blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte ERK1 und 2 (pERK1/2) untersucht. Die Membran wurde zur Auftragskontrolle mit einem Antikörper gegen ERK2 behandelt. Die Stimulation mit CXCL12 löste eine transiente Aktivierung von ERK 1 und 2 aus, die nach 20 Minuten ihr Maximum erreichte.

Die Aktivierung von ERK1 / 2 erreichte nach 40-minütiger Inkubation mit CXCL12 wieder das Grundniveau der Kontrollproben, was eine transiente Aktivierung von Erk 1 / 2 anzeigt, die bei 20 Minuten ihr Maximum erreicht.

Phosphorylierung von Akt

Bei der Analyse der Kinase Akt konnte kein vergleichbarer Aktivierungseffekt nachgewiesen werden. Die in einer Höhe von 60 kDa detektierten Banden der mit CXCL12 stimulierten Proben wurden ähnlich intensiv detektiert wie die Kontrollproben. Durch Stimulation mit CXCL12 wurde also keine Aktivierung der Kinase Akt erzielt (Abbildung 16).

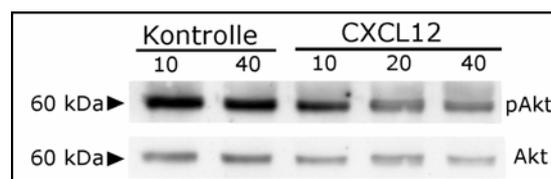


Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase Akt. A764 Glioblastomzellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit und ohne 1 nM CXCL12 für 10, 20 oder 40 Minuten inkubiert und in Lysispuffer mit Glycerolphosphat und Vanadat geerntet. Die Proben wurden in einer Western blot-Analyse mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Akt (pAkt) untersucht, als Auftragskontrolle diente Akt. Eine Aktivierung von Akt durch CXCL12 konnte nicht festgestellt werden.

Phosphorylierung von p38

Schließlich wurde die Kinase p38 untersucht. Auch bei dieser Kinase zeigte sich kein Unterschied in der Phosphorylierung und somit Aktivierung zwischen Kontrollproben und mit 1 nM CXCL12 stimulierten Proben. Die als Positivkontrolle mitgeführte mit 1 nM EGF stimulierte Probe zeigte eine etwas intensivere Bande für phosphoryliertes p38 (Abbildung 17). Eine Aktivierung der Kinase p38 durch Stimulation mit CXCL12 wurde also nicht nachgewiesen.

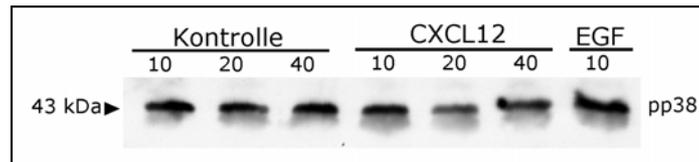


Abbildung 17: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase p38. A764 Glioblastomzellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit 1 nM CXCL12 oder 1 nM EGF für 10, 20 oder 40 Minuten inkubiert und in Lysispuffer mit Glycerolphosphat und Vanadat geerntet. Die Proben wurden im Western blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte p38 (pp38) untersucht. Eine Aktivierung von p38 durch CXCL12 konnte nicht gezeigt werden.

3.7.2 Inhibition der Kinasephosphorylierung

Um abzusichern, dass es sich bei der Phosphorylierung der Kinasen ERK1 und ERK2 um einen spezifischen, durch CXCL12 / CXCR7 vermittelten Signaltransduktionsprozess handelt, wurden Experimente mit dem Hemmstoff U0126 durchgeführt, der die MEK (MAPKK, *mitogen-activated protein kinase kinase*) spezifisch inhibiert. Der Hemmstoff U0126 wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in der Konzentration 100 µM eingesetzt. Um eine vollständige Inhibition der MEK von Versuchsbeginn an zu gewährleisten, wurden die A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen zwei Stunden lang mit dem Inhibitor U0126 vorinkubiert, bevor CXCL12 oder EGF (je 1 nM) als Stimulus zugesetzt wurde. In den Kontrollen wurde jeweils DMSO zugesetzt, um einen Lösungsmittelleffekt auszuschließen.



Abbildung 18: Untersuchung der Hemmbarkeit der CXCL12 vermittelten Phosphorylierung von ERK1 / 2 durch einen MAP-Kinase-Inhibitor. A764 Glioblastomzellen wurden unter serumfreien Bedingungen zwei Stunden lang mit dem MAP-Kinase-Inhibitor U0126 oder dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert. Dann wurden 1 nM CXCL12 oder 1 nM EGF zugegeben und die Zellen nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten (CXCL12) bzw. 10 Minuten (EGF) in Lysispuffer mit Glycerolphosphat und Vanadat geerntet. Die Proben wurden im Western blot auf phosphorylierte ERK1 / 2 (pERK1 / 2) untersucht. Zur Auftragskontrolle wurde eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen ERK2 durchgeführt. Der Hemmstoff U0126 konnte die durch CXCL12 ausgelöste Phosphorylierung von ERK 1 / 2 inhibieren.

Da CXCL12- und EGF-Stimulationen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten ein maximales Phosphorylierungssignal hervorriefen (Abbildung 15), wurde als Inkubationszeit

für CXCL12 20 Minuten gewählt, während mit EGF jeweils nur 10 Minuten lang stimuliert wurde. Wie in Abbildung 18 gezeigt, konnte durch Vorinkubation mit dem Hemmstoff U0126 sowohl das starke Phosphorylierungssignal von CXCL12 als auch das durch EGF hervorgerufene Signal auf das Niveau der unstimulierten Kontrollproben reduziert werden. Die durch CXCL12 / CXCR7 ausgelöste Signaltransduktionskaskade konnte also mithilfe von U0126 effektiv unterdrückt werden.

3.7.3 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CXCL12 spezifische Effekte auf Ebene der Kinasephosphorylierung in den CXCR7-exprimierenden A764-Glioblastomzellen auslösen konnte, wurde der Weg der Signaltransduktion auf Ebene der Transkriptionsfaktoren weiter verfolgt. Hierfür wurden zum einen auf Deckgläschen ausgesäte A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen mit 1 nM CXCL12 stimuliert, fixiert und immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen die NF- κ B-Untereinheit p65 gefärbt, um eine Translokation dieses Faktors in den Kern und somit dessen Aktivierung zu untersuchen. Außerdem wurden A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen mit 1 nM CXCL12 stimuliert und die Zellhomogenate in einer Western blot-Analyse hinsichtlich der Phosphorylierung und somit Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF2 (*Activating transcription factor 2*), ELK-1 (*Ets-like gene 1*) und CREB (*cAMP response element-binding protein*) untersucht.

Translokation des p65-Proteins des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern

Der Transkriptionsfaktor NF κ B (*Nuclear factor- κ B*) besteht meist aus einem Heterodimer der beiden Faktoren p65 und p50. Im inaktivierten Zustand liegt NF- κ B im Zytosol assoziiert an sein Inhibitionsprotein I- κ B vor. Die Aktivierung von NF- κ B kann unter anderem in der Folge der Aktivierung der ERK (*Extracellular-signal related kinases*) erfolgen, indem zwei Serinreste des I- κ B phosphoryliert werden, wodurch eine Bindungsstelle für Ubiquitin entsteht. Die Bindung von Ubiquitin führt zum Abbau von I- κ B und gleichzeitig zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Dort bindet NF- κ B an eine spezifische, ca. 10 Basenpaare umfassende Sequenz, das so genannte NF- κ B-Motiv, und kann so die Transkription der entsprechenden Zielgene auslösen. Die Translokation von NF- κ B in den Zellkern wurde durch eine immunzytochemische Färbung des p65-Proteins von A764-Glioblastomzellen untersucht, die unter serumfreien Bedingungen (DMEM + 1% BSA) für 10, 30 oder 60 Minuten mit oder ohne 1 nM CXCL12 inkubiert worden waren.

Bei der anschließenden mikroskopischen Analyse wurde mithilfe eines Apotoms ein optischer Schnitt durch die jeweilige Kernebene gelegt, so dass die Kernfärbung exakt untersucht werden konnte.

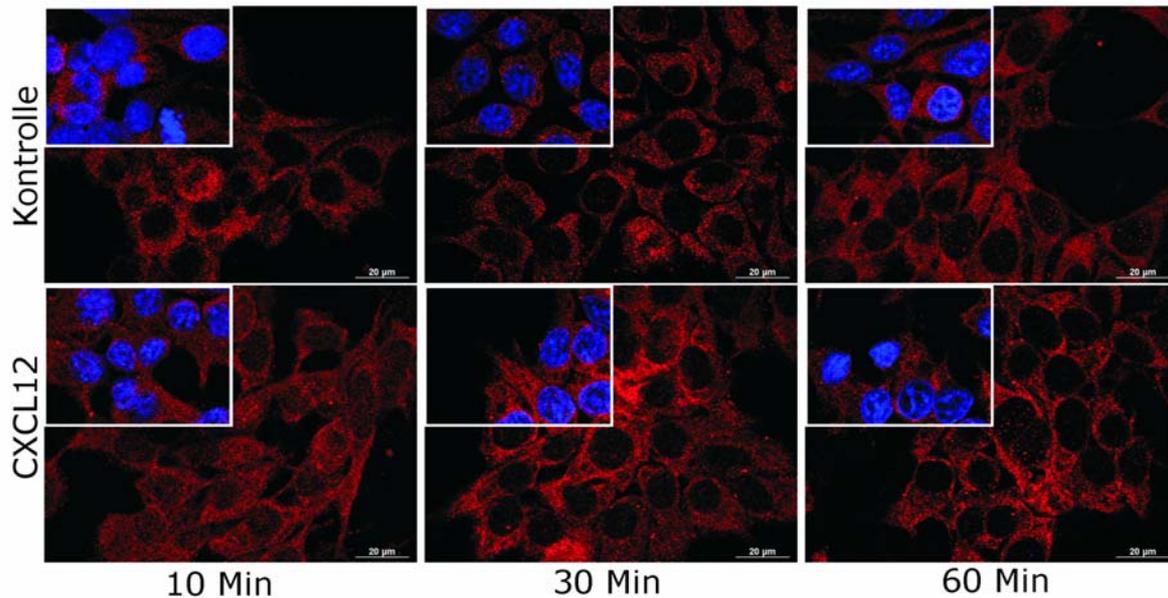


Abbildung 19: Immunzytochemische Untersuchung der Translokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern. A764-Glioblastomzellen wurden mit oder ohne 1 nM CXCL12 für 10, 30 und 60 Minuten inkubiert, fixiert und immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen p65 gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 555 anti-Maus verwendet und Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt. Durch die Verwendung eines Apotoms wurde die Kernebene mikroskopisch analysiert.

Wie in Abbildung 19 beispielhaft dargestellt, zeigte sich sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten Kulturen eine zytosolische Färbung. In den Zellkernen wurde jedoch keine Immunreaktivität für p65 beobachtet. Eine Aktivierung des p65-enthaltenden Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde also nicht gezeigt.

Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ATF2, ELK-1 und CREB

Der Transkriptionsfaktor ATF2 (*Activating transcription factor 2*, auch CRE-BP1 *cAMP response element-binding protein 1*) ist ein Mitglied der Leuzin-Zipper-Familie der DNA-bindenden Proteine. Er kann in der Signalkaskade über die Kinase p38 phosphoryliert und damit aktiviert werden. Als Homodimer oder zusammen mit c-jun als Heterodimer bindet er an cAMP-Response-Elemente (CRE) und löst dort die Transkription aus.

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK-1 (*Ets-like gene -1*) tritt häufig in Folge einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch extrazelluläre Mitogene auf. ELK-1 ist ein Mitglied der Ets-Onkogen-Familie und gehört zur Unterfamilie der Ternärkomplexfaktoren (TCF). Mitglieder dieser Unterfamilie bilden einen ternären Komplex zusammen mit dem *Serum-Response Factor* (SRF) und dem *Serum-Response Element* (SRE) des c-fos-Promotors. Die Phosphorylierung von ELK-1 ist ein mögliches Ereignis, das durch die Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade ausgelöst werden kann.

Auch der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) gehört zur Familie der Leuzin-Zipper der DNA-bindenden Proteine und bildet Homodimere, die an die cAMP-Response Elemente der DNA binden können.

Die Aktivierung von CREB kann unter anderem durch die ERK (*Extracellular-signal related kinases*) erfolgen.

Zur Untersuchung einer möglichen Aktivierung dieser drei Transkriptionsfaktoren durch CXCL12 wurden A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen mit und ohne 1 nM CXCL12 inkubiert (10, 20 und 40 Minuten bzw. 30, 60 und 90 Minuten), in Lysispuffer mit Vanadat und Glycerolphosphat geerntet und einer Western blot-Analyse mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ATF2, ELK-1 und CREB durchgeführt.

Weder bei den in Abbildung 20 gezeigten kürzeren Inkubationszeiten, noch bei längeren Inkubationszeiten mit CXCL12 (30, 60 und 90 Minuten, nicht gezeigt) wurde eine Phosphorylierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren beobachtet. Es konnte also keine Aktivierung von ATF-2, ELK-1 oder CREB durch Stimulation CXCR7-exprimierender Glioblastomzellen mit 1 nM CXCL12 nachgewiesen werden.

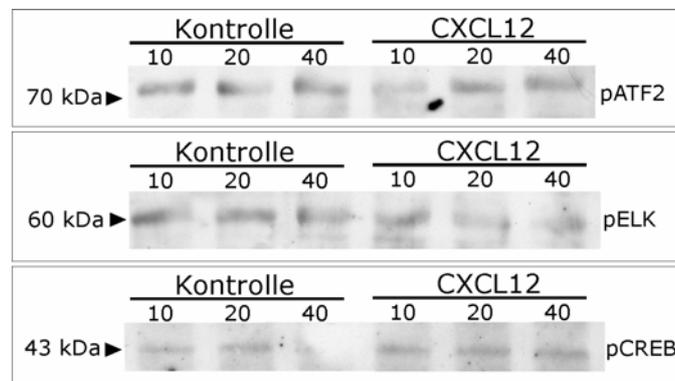


Abbildung 20: Untersuchungen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF2, ELK-1 und CREB durch CXCL12. A764-Glioblastomzellen wurden unter serumfreien Bedingungen unterschiedlich lang mit oder ohne 1 nM CXCL12 inkubiert und in Lysispuffer mit Glycerolphosphat und Vanadat geerntet. Mit den Proben wurden ein Western blot-Analysen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ATF2, ELK-1 und CREB durchgeführt. Eine Phosphorylierung und somit Aktivierung durch Stimulation mit CXCL12 konnte für keinen der untersuchten Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

3.8 Untersuchung der Effekte von CXCL12 auf die Proliferation

Nun sollte untersucht werden, welche biologischen Effekte durch die Aktivierung des Rezeptors CXCR7 und der dadurch ausgelösten Signalkaskade hervorgerufen werden konnten. Zuerst wurden die Auswirkungen von CXCL12 auf die Proliferation untersucht. Hierfür wurden A764-Glioblastomzellen unter serumarmen Bedingungen (DMEM + 0,2 % FKS) mit CXCL12 über 24 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle, ob die ausgesäten Zellen während der Stimulationszeit weiter proliferierten, wurden Startwerte zu Beginn der Stimulationsperiode geerntet.

Als Referenzen zur Berechnung der Zellzahl wurden zum Zeitpunkt der Aussaat Aliquots mit 50 000 Zellen für die spätere Aufarbeitung eingefroren. Die Auswertung erfolgte durch Messung des DNA-Gehaltes, der anhand der Referenzproben auf die Zellzahl umgerechnet

wurde. Wie in Abbildung 21 gezeigt, nahm die Zellzahl während der Stimulationszeit sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten Proben zu.

Die Zellzahl zu Versuchsbeginn betrug auf drei geltende Ziffern gerundet $12\,400 \pm 100$ Proben, die über den Versuchszeitraum in Stimulationsmedium (mit 0,2 % FKS) ohne weiteren Zusätze kultiviert wurden, erreichten eine Zellzahl von $102\,300 \pm 2\,900$ ($100 \pm 2,8$ %). In frischem Kulturmedium mit 10 % FKS wurde die höchste Proliferationsrate erzielt ($135\,400 \pm 12\,200$ Zellen; $132,4 \pm 12$ %). Durch den Wachstumsfaktor EGF, der als Positivkontrolle mitgeführt wurde, wurde eine Zellzahl von $122\,600 \pm 5\,300$ ($120 \pm 5,2$ %) erreicht. Die mit 1 nM CXCL12 stimulierten Proben ergaben eine Zellzahl von $100\,700 \pm 400$ ($98,5 \pm 0,4$ %).

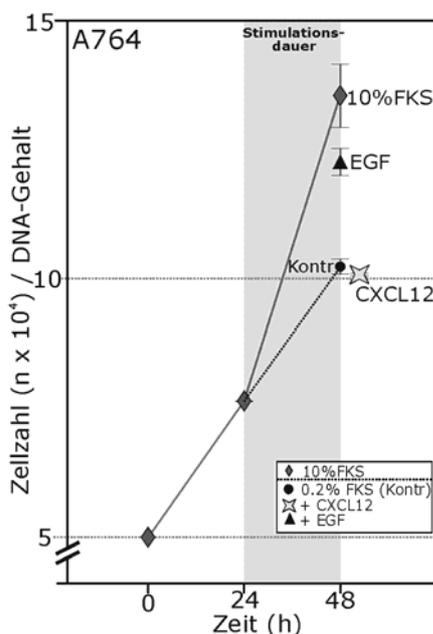


Abbildung 21: Auswirkungen von CXCL12 auf die Proliferation von A764-Glioblastomzellen. 50 000 A764-Zellen wurden auf Kulturschalen ausgesät, einen Tag in Kulturmedium (mit 10% FKS) vorinkubiert und in serumarmem Medium (DMEM + 0,2 % FKS) mit 1 nM CXCL12 (gelber Stern) oder 1 nM EGF (schwarzes Dreieck, Positivkontrolle) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen in serumarmem Medium kultiviert (roter Kreis; Kontr), als Positivkontrolle in frischem Kulturmedium mit 10 % FKS (blaue Raute). Als Kontrolle des Proliferationsverlauf wurden ein Startwert (50 000 Zellen; 0 h) und ein Wert zu Stimulationsbeginn erhoben (50 000 Zellen, 24 h in Kulturmedium vorinkubiert, 24 h). Der Startwert diente zugleich als interner Standard zur Bestimmung der Zellzahl. Die Stimulation mit CXCL12 ergab keine Steigerung der Proliferationsrate. In zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils vier Schalen pro Wert stimuliert.

Eine Steigerung der Proliferation durch Stimulation mit CXCL12 konnte in A764-Glioblastomzellen nicht gezeigt werden.

3.9 Untersuchung der Effekte von CXCL12 auf ungerichtete und gerichtete Migration

Hinsichtlich der Untersuchung von migrationsfördernden Effekten muss eine Unterscheidung zwischen der ungerichteten und der gerichteten Migration vorgenommen werden. Die Förderung ungerichteter Spontanbewegung (*random migration*) beruht auf einer allgemeinen Steigerung der Zellmotilität, die z.B. durch Umstrukturierungen des Zytoskeletts verursacht werden kann. Der Begriff der gerichteten Migration hingegen bezeichnet eine Zellbewegung entlang eines Gradienten (Chemotaxis). Beide Phänomene sind in der Literatur als Effekte der Chemokinstimulation beschrieben.

3.9.1 Untersuchung der ungerichteten Migration im Wundheilungstest (*Scratch-Test*)

Die Untersuchung der ungerichteten Migration erfolgte in einem Wundheilungsversuch (*Scratch-Test*). Hierbei wurde ein A764-Zellrasen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und mithilfe einer Pipettenspitze ein ca. 500 µm breiter Kratzer gesetzt. Da kein anderer freier Raum zur Besiedlung zur Verfügung stand, mussten die Zellen im Zuge der ungerichteten Migration in die entstandene freie Fläche einwandern. Der Versuch wurde jeweils in einer Inkubationskammer unter einem inversen Mikroskop durchgeführt, welches in zehnminütigem Abstand automatisch ein Foto des eingestellten Bereichs aufnahm.

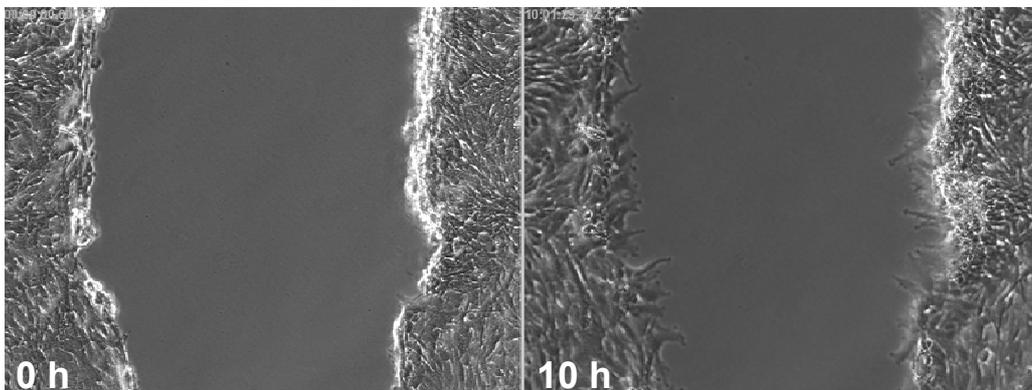


Abbildung 22: Beispiel für die Migration von A764-Glioblastomzellen im *Scratch-Test*. Die Einwanderung von A764-Zellen in einen mit einer Pipettenspitze gesetzten Kratzer wurde über 10 Stunden in einer Inkubationskammer unter einem inversen Mikroskop verfolgt. A764-Glioblastomzellen migrieren sehr langsam, ein durch CXCL12-Stimulation ausgelöster Effekt konnte nicht beobachtet werden.

Als Versuchsdauer wurde ein Zeitraum von 10 Stunden gewählt, da man zu diesem Zeitpunkt einen Einfluss möglicher Proliferationseffekte noch ausschließen konnte. Verglichen wurden mit Stimulationsmedium (DMEM + 0,2 % FKS) versehene Kontrollproben mit den mit 1 nM CXCL12 stimulierten Proben. Eine beispielhafte Gegenüberstellung der zellfreien Fläche bei Versuchsbeginn und nach 10 Stunden in einer unstimulierten Kontrollprobe zeigt Abbildung 22.

Nach 10 Stunden war in den mit Stimulationsmedium (0,2 % FKS) versehenen Kontrollen im Mittel $20,4 \pm 5,1$ % der zellfreien Fläche besiedelt. In den mit 1 nM CXCL12 stimulierten Proben waren die Zellen auf $14,8 \pm 4,0$ % der zellfreien Fläche eingewandert. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Eine statistische Signifikanz zwischen mit CXCL12 stimulierten und unstimulierten Proben ergab sich nicht. Es konnte also keine Steigerung der ungerichteten Migration von A764-Glioblastomzellen durch CXCL12 festgestellt werden.

3.9.2 Untersuchung der gerichteten Migration (Chemotaxis) durch Boydenkammer-Experimente

Zur Untersuchung der gerichteten Migration wurden Migrationsexperimente in einer Boydenkammer durchgeführt. Hierbei wurde in die Bohrungen der unteren Kammer ein serumarmes Stimulationsmedium (DMEM + 0,2% FKS) mit oder ohne 1 nM CXCL12 gefüllt, mit einer entfetteten Polycarbonatmembran mit 8 µm großen Poren bedeckt, die obere Kammer aufgesetzt und eine Zellsuspension von A764-Glioblastomzellen in die Bohrungen der oberen Kammer gegeben. Nach Versuchsende wurden die Membranen jeweils in Methanol fixiert und die Zellkerne der durchgewanderten Zellen wurden mit Hämalaun gefärbt.

Experimente mit unterschiedlich langen Wanderungszeiten zwischen 12 und 30 Stunden zeigten, dass die A764-Glioblastomzellen weder auf den chemotaktischen Reiz des CXCL12 hin noch auf den als Positivkontrolle verwendeten Zusatz von 5 % Kälberserum zum Medium in der unteren Kammer mit einer Migration durch die Poren der Polycarbonatmembran antworteten.

Die A764-Glioblastomzellen zeigten also weder im Wundheilungstest noch im Chemotaxisversuch eine Tendenz zur Migration. Eine Steigerung oder Reduktion der Migration durch CXCL12-Stimulation konnte nicht beobachtet werden.

3.10 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von CXCL12 auf eine induzierte Apoptose

Der induzierte Zelltod - und somit auch seine Hemmung - lässt sich an Glioblastomzelllinien häufig schwer nachweisen, da diese Tumorzellen *per se* ein vielfältiges Spektrum an potenten Inhibitoren der Apoptosekaskade aufweisen. *In situ* verhindern diese Mechanismen, dass auf den Tumor sensibilisierte Zellen der Immunabwehr (z.B. Mikroglia) die Apoptose der entarteten Zellen auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe verschiedenartiger Experimente zum Auslösen und zur Detektion von Apoptose bzw. deren Hemmung durch CXCL12 in A764-Glioblastomzellen ausprobiert, von denen im Folgenden drei Ergebnisse vorgestellt werden. Zur Untersuchung eines möglichen anti-apoptischen Effektes von CXCL12 wurden A764-Glioblastomzellen mit Camptothecin, CXCL12 oder beiden Stimulantien für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Camptothecin ist ein Inhibitor der DNA-Topoisomerase I, der Apoptose induziert.

3.10.1 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand von DNA-Fragmentierungsanalysen

Die Fragmentierung der DNA erfolgt durch Endonukleasen, die verhältnismäßig spät während der Apoptose aktiviert werden. DNA-Fragmentierung ist ein für apoptotische

Untergangsprozesse spezifisches Ereignis, sodass die Untersuchung der DNA-Fragmentierung eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ermöglicht. Zur Untersuchung einer möglichen anti-apoptotischen Wirkung von CXCL12 wurden A764-Glioblastomzellen mit 50 µg/ml Camptothecin (gelöst in DMSO) und mit und ohne 1 nM CXCL12 für 72 Stunden unter serumarmen Bedingungen (DMEM + 0,2 % FKS) stimuliert. Aus den Proben wurde jeweils die DNA gewonnen, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Wie Abbildung 23 zeigt, ergab die mit Camptothecin stimulierte Probe eine über die Länge der Laufstrecke ausgedehnte angefärbte Bande, die aus den vielen unterschiedlich großen DNA-Fragmenten hervorgeht.

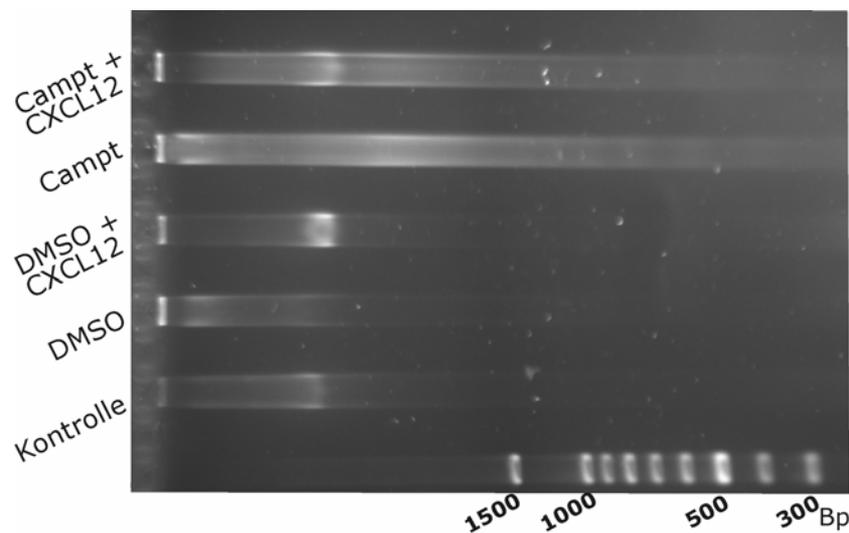


Abbildung 23: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der DNA-Fragmentierung. A764-Glioblastomzellen wurden mit 50 µg / ml Camptothecin oder entsprechendem Volumen DMSO und mit und ohne 1 nM CXCL12 für 72 Stunden inkubiert (n = 2). Aus den stimulierten Zellen wurden DNA-Proben isoliert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert. Die DMSO-Kontrollen zeigten ein DNA-Signal im sehr hohen Basenpaarbereich außerhalb der verwendeten Basenpaarleiter, also deutlich größer als 1500 Basenpaare, das auf intakte genomische DNA hinweist. Die durch Camptothecin-Stimulation erhaltenen Proben zeigten eine durchgehend gefärbte Bahn, die durch DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen verursacht wurde. In der mit CXCL12 und Camptothecin kostimulierten Probe war die Intensität der Fragmentbahn geringer, dafür konnte im Bereich der genomischen DNA eine deutliche Bande detektiert werden.

Die unstimulierte Kontrolle und die mit DMSO und 1 nM CXCL12 stimulierten Proben hingegen zeigten abgegrenzte Banden im hochmolekularen Bereich, deutlich größer als 1500 Basenpaaren, die die nicht fragmentierte DNA darstellen, die im Spannungsfeld viel langsamer transportiert wird als die weniger großen Fragmente.

Die mit DMSO stimulierte Probe zeigte kaum detektierbare DNA. Dies ist vermutlich auf eine geringere Auftragsmenge verglichen mit den übrigen Bahnen zurückzuführen. Die mit Camptothecin und CXCL12 kostimulierte Probe zeigte zwar ebenfalls eine auf Fragmente hinweisende Spur, diese war jedoch deutlich schwächer als die in der Camptothecin-stimulierten Probe. Zusätzlich wurde nicht-fragmentierte DNA detektiert, die darauf hinweist, dass in der mit CXCL12 kostimulierten Probe ein höherer Anteil an intakten Zellen enthalten war.

Durch eine Kostimulation der A764-Glioblastomzellen mit Camptothecin und 1 nM CXCL12 konnte eine Apoptose-bedingte DNA-Fragmentierung deutlich verringert werden im Vergleich zur Stimulation mit Camptothecin allein.

3.10.2 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand der Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase

Ein ebenfalls im späten Stadium der Apoptose stattfindendes Ereignis ist die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase. Die PARP leitet durch Bindung an DNA-Einzelstränge und Rekrutierung der DNA-Ligase und der DNA-Polymerase β die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen ein. Während der Apoptose wird die ca. 116 kDa große PARP durch Mitglieder der ICE-Proteasen (*Interleukin converting enzyme*) in zwei Fragmente von ca. 89 kDa und ca. 27 kDa Molekulargewicht gespalten.

Zur Untersuchung der anti-apoptotischen Wirkung von CXCL12 in Bezug auf die Spaltung der PARP wurden A764-Glioblastomzellen unter serumarmen Bedingungen (DMEM + 0,2 % FKS) mit 50 $\mu\text{g/ml}$ oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Camptothecin und mit und ohne 1nM CXCL12 für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden zur sofortigen Denaturierung in SDS-Probenpuffer geerntet, um eine Spaltung der PARP durch unphysiologische Mechanismen zu verhindern. Mit den Proben wurden Western blot-Analysen mit einem Antikörper gegen das 89 kDa große Spaltprodukt der PARP durchgeführt. Anschließend wurde die Membran gewaschen und eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen GAPDH durchgeführt, um abzusichern, dass pro Laufstrecke vergleichbare Mengen Protein aufgetragen wurden. GAPDH hat ein Molekulargewicht von ungefähr 37 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass in den Camptothecin-stimulierten Proben dosisabhängig eine spezifische Bande des PARP-Spaltproduktes detektiert werden konnte (Abbildung 24).

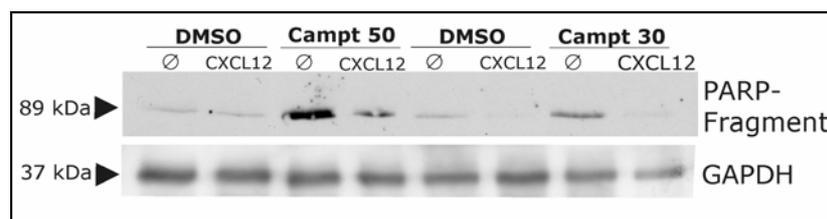


Abbildung 24: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase. A764-Glioblastomzellen wurden mit 30 oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Camptothecin oder entsprechendem Volumen DMSO und mit und ohne CXCL12 für 48 Stunden inkubiert ($n = 4$). Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer geerntet und die erhaltenen Proben durch Western blot-Analyse mit einem Antikörper gegen ein 89 kDa großes Fragment der PARP untersucht. Zur Kontrolle gleicher Auftragsmengen wurden die Antikörper von der PVDF-Membran abgewaschen und eine erneute Immuninkubation mit einem Antikörper gegen GAPDH durchgeführt. In den Camptothecin-stimulierten Proben trat dosisabhängig eine Bande in Höhe von 89 kDa auf, die bei den mit CXCL12 kostimulierten Proben fast auf das Niveau der DMSO-Kontrollen zurückgeführt werden konnte.

In den Proben, die mit Camptothecin und 1 nM CXCL12 kostimuliert worden waren, zeigte sich eine gering gefärbte Bande (mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Camptothecin) bzw. keine Bande (mit 30 $\mu\text{g/ml}$

Camptothecin). Es konnte also gezeigt werden, dass die durch Camptothecin ausgelöste Spaltung der PARP durch 1 nM CXCL12 vermindert oder sogar ganz verhindert werden konnte.

3.10.3 Untersuchung der Apoptosehemmung durch CXCL12 anhand der Aktivierung der Caspasen 9 und 3

Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen, die bei apoptotischen und nekrotischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Sie werden im Verlauf der Apoptosekaskade durch proteolytische Spaltung ihrer Proform aktiviert. Initiatorcaspasen, wie z.B. Caspase 8 und 9, können in ihrer aktiven Form wiederum andere Caspasen aktivieren. Diese Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3, 6 und 7) können weitere Enzyme aktivieren, die an apoptotischen Vorgängen beteiligt sind (z.B. Endonukleasen). Die mögliche Apoptosehemmung durch CXCL12 wurde an der Initiatorcaspase 9 und der Effektorcaspase 3 untersucht.

Untersuchung zur Aktivierung der Caspase 9

Die Caspase 9 ist in ihrem aktivierten Zustand eine Initiatorcaspase der intrinsischen Apoptosekaskade (Typ II Apoptose). Im Verlauf der intrinsischen Apoptose wird zunächst Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, das an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1) bindet. Dies führt zu einer Konformationsänderung, sodass die Caspase-Rekrutierungsdomäne (CRD) freigelegt wird und die Procaspase 9 (ca. 47 kDa) binden kann. Durch autokatalytische Proteolyse können aus der Procaspase 9 zwei größere, aktive Fragmente entstehen (35 und 37 kDa) und ein kleineres, inaktives Spaltprodukt (ca. 15 kDa). Die aktive Caspase 9 aktiviert als Initiatorcaspase in der Apoptosekaskade die Effektorcaspasen (z.B. Caspasen 3, 6 und 7), die wiederum durch weitere proteolytische Vorgänge den Zelltod auslösen.

Zur Untersuchung der anti-apoptotischen Wirkung von CXCL12 in Bezug auf die Aktivierung von Caspase 9 wurden A764-Glioblastomzellen unter serumarmen Bedingungen (DMEM + 0,2 % FKS) mit 10 µg/ml oder 30 µg/ml Camptothecin und mit und ohne 1nM oder 5 nM CXCL12 für 48 Stunden inkubiert. Zur Vermeidung unerwünschter Abbauprodukte wurden die stimulierten Zellen in SDS-Probenpuffer geerntet und somit direkt denaturiert. In einer Western blot-Analyse mit einem Antikörper, der die Caspase 9 sowohl in der 47 kDa großen Proform als auch die aktiven Caspase 9 Fragmente (35 und 37 kDa) erkennt, wurden die Proben untersucht.

Hierbei wurden auf der Höhe der Procaspase 9 spezifische Banden detektiert, die jeweils ungefähr gleich intensiv waren, auf der Höhe der erwarteten aktiven Caspase 9-Fragmente zeigten sich jedoch weder in den Camptothecin behandelten, noch in den unbehandelten Proben Banden (Abbildung 25).

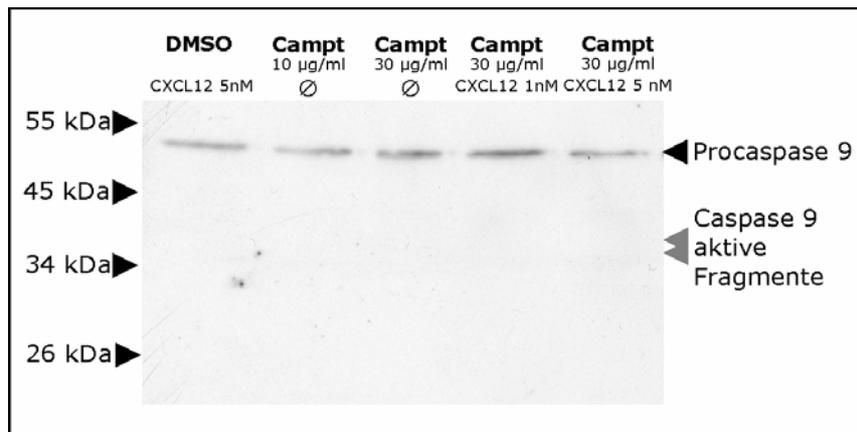


Abbildung 25: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Aktivierung der Caspase 9. A749-Glioblastomzellen wurden mit 10 oder 30 µg / ml Camptothecin oder entsprechendem Volumen DMSO und mit und ohne 1 nM oder 5 nM CXCL12 für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer geerntet und die erhaltenen Proben durch Western blot-Analyse mit einem Antikörper inkubiert, der Procaspase 9 (47 kDa) und drei bei der Aktivierung entstehende Fragmente (17, 35 und 37 kDa) detektiert. Es wurde eine Bande in der Höhe der ungespaltenen Caspase 9, aber keinerlei Spaltprodukte erhalten. Eine Aktivierung der Caspase 9 wurde also durch Camptothecin nicht ausgelöst.

Eine Aktivierung der Initiatorcaspase 9 durch Camptothecin konnte also ebenso wenig gezeigt werden, wie eine Hemmung einer solchen Aktivierung durch CXCL12.

Untersuchung zur Aktivierung der Caspase 3

Die Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, die durch die Initiatorcaspase 9, aber auch durch eine andere Effektorcaspase, Caspase 7, von ihrer Proform (35 kDa) in zwei aktive Fragmente (17 kDa und 19 kDa) gespalten wird. Die aktive Caspase 3 bewirkt unter anderem die Spaltung der PARP und die Aktivierung von Caspase-aktivierten DNasen (CAD), die die Fragmentierung der DNA einleiten.

Die mögliche Hemmung der durch Camptothecin induzierten Apoptose durch Kostimulation mit CXCL12 wurde anhand von Proben untersucht, die mit oder ohne 10 µg / ml oder 30 µg / ml Camptothecin und mit oder ohne 1 nM oder 5 nM CXCL12 unter serumarmen Bedingungen (DMEM + 0,2 % FKS) für 48 Stunden inkubiert und anschließend zur sofortigen Denaturierung in SDS-Probenpuffer geerntet wurden.

Die Proben wurden in einer Western blot-Analyse mit einem Antikörper gegen die Caspase 3 in der Proform (35 kDa) und in den aktivierten Formen (15 und 17 kDa) untersucht. Wie in Abbildung 26 gezeigt, wurde zwar eine spezifische Bande bei 35 kDa für die Proform der Caspase 3 detektiert, jedoch waren keine Banden in Höhe der aktiven Fragmente erkennbar. Es konnte also keine Aktivierung der Caspase 3 durch Stimulation mit Camptothecin festgestellt werden.

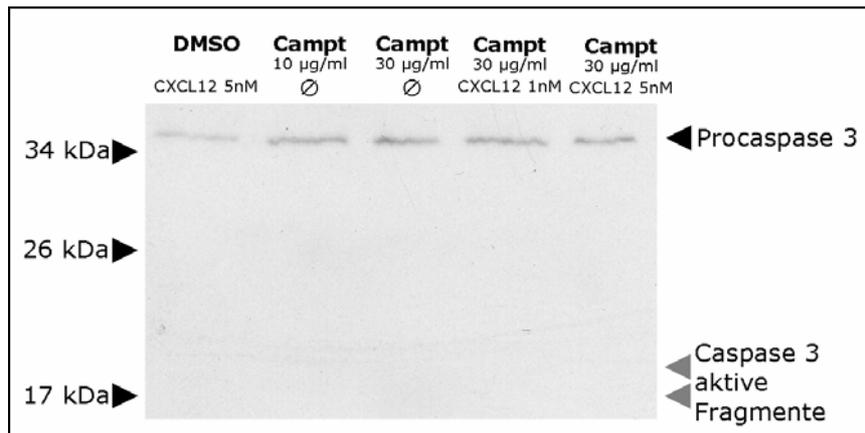


Abbildung 26: Einfluss von CXCL12 auf die durch Camptothecin induzierte Apoptose hinsichtlich der Aktivierung der Caspase 3. A764-Glioblastomzellen wurden mit 10 oder 30 µg / ml Camptothecin oder entsprechendem Volumen DMSO und mit und ohne 1 nM oder 5 nM CXCL12 für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer geerntet und die erhaltenen Proben durch Western blot-Analyse mit einem Antikörper inkubiert, der an Caspase 3 (35 kDa) und zwei bei der Aktivierung entstehende Fragmente (17 und 19 kDa) bindet. Es konnte eine spezifische Bande für die ungespaltene Caspase 3 in einer Höhe von 35 kDa detektiert werden, Spaltprodukte wurden jedoch nicht detektiert. Durch Stimulation mit Camptothecin konnte also keine Aktivierung der Caspase 3 ausgelöst werden.

3.11 Untersuchung der Wirkung von CXCL12 auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF

In den bisher beschriebenen Experimenten wurden die unmittelbaren zellulären Effekte der Stimulation von CXCR7 durch CXCL12 untersucht. Jedoch besteht unabhängig davon die Möglichkeit, dass die Interaktion von CXCL12 und CXCR7 zu einer Expressionsmodulation von sezernierten Proteinen führt, die wiederum die Migration oder Proliferation von Stromazellen fördern können. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Transkriptionsmodulation von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die Bestandteile der Extrazellulärmatrix zersetzen und somit sowohl die Auswanderung von Tumorzellen als auch die Invasion von Immunzellen in den Tumor unterstützen können. Außerdem wurde die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) untersucht, der durch Proliferationssteigerung und Ausrichtung von Endothelvorläuferzellen das Einsprossen von Gefäßen in den Tumor fördert.

Für die Untersuchung der Transkriptionsmodulation verschiedener Matrixmetalloproteinasen und VEGF durch CXCL12 wurden A674-Glioblastomzellen mit 1 nM CXCL12 unter serumfreien Bedingungen (DMEM + 1 % BSA) für 24 Stunden stimuliert oder unstimuliert belassen und in einer realtime RT-PCR auf die Transkription von MMP1 (interstitielle Gelatinase), MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), MMP13 (Kollagenase 3) und MMP14 (MT-1-MMP) sowie VEGF untersucht, als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die Proteinasen MMP1 und MMP9 wurden weder in den unstimulierten noch in den mit 1 nM

CXCL12 stimulierten Proben detektiert. Für die Transkription von MMP2, MMP13 und MMP14 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen CXCL12-stimulierten und unstimulierten Proben festgestellt werden (Abbildung 27, links). Im Einzelnen ergaben die für MMP2 detektierten ΔC_T -Werte Mittelwerte von $14,33 \pm 0,39$ (unstimuliert) und $13,27 \pm 1,14$ (CXCL12), beziehungsweise eine gemittelte Steigerung der mRNA-Expression auf das 2,7-fache $\pm 1,3$ ($\Delta\Delta C_T$). Für MMP13 betragen die durchschnittlichen ΔC_T -Werte $18,73 \pm 1,37$ (unstimuliert) und $17,95 \pm 0,95$ (CXCL12), was einer Transkriptionssteigerung auf das 2,25-fach $\pm 0,7$ ($\Delta\Delta C_T$) entsprach. Die Mittelwerte für MMP14 waren $6,16 \pm 0,47$ (unstimuliert) und $6,11 \pm 0,51$ (CXCL12), und somit eine ungefähr gleiche Transkription in unstimulierten und stimulierten Proben. Keine der gemessenen leichten Transkriptionserhöhungen der Matrixmetalloproteinasen war signifikant.

Die Transkription des VEGF hingegen wurde durch Stimulation mit 1 nM CXCL12 von einem mittleren ΔC_T -Wert von $8,75 \pm 0,49$ (unstimuliert) auf $7,81 \pm 0,45$ (CXCL12) signifikant gesteigert. Dies entspricht einer Steigerung der mRNA-Expression auf ca. das 2,6-fache $\pm 1,2$ ($\Delta\Delta C_T$).

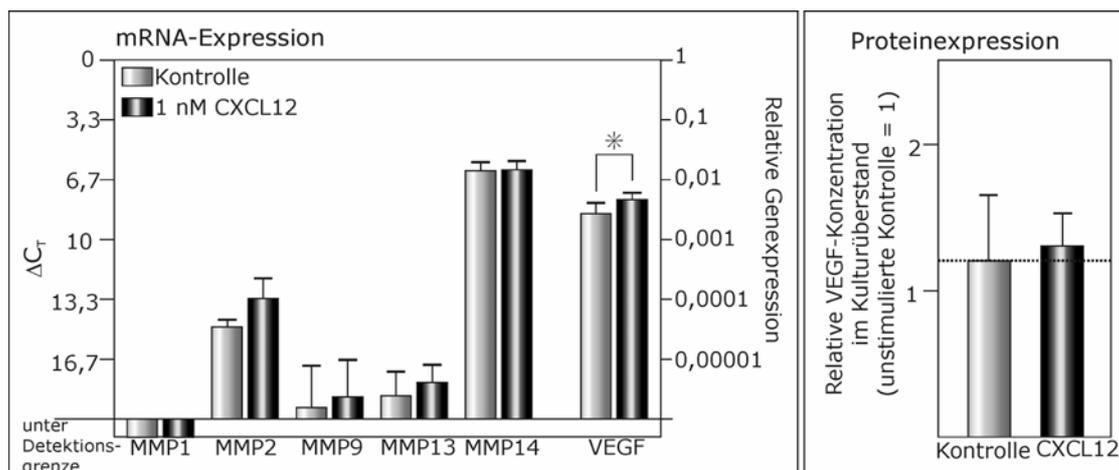


Abbildung 27: Regulation ausgewählter Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und VEGF durch CXCL12 in A764-Glioblastomzellen. A764-Glioblastomzellen wurden unter serumfreien (DMEM + 1 % BSA) Bedingungen mit 1 nM CXCL12 für 24 Stunden stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Die Proben wurden in einer realtime RT-PCR mit entsprechenden TaqMan® Primern und Sonden hinsichtlich der Expression von MMP1, MMP2, MMP9, MMP13 und MMP14 sowie VEGF untersucht, GAPDH diente als Referenzgen (n = 4). Eine signifikante Änderung der Transkription durch Stimulation mit CXCL12 war für die untersuchten MMPs nicht feststellbar. Die Transkription von VEGF wurde leicht erhöht. (* p < 0,05). In Zellkulturüberständen von Zellen, die unter serumfreien Bedingungen mit oder ohne 1 nM CXCL12 inkubiert worden waren, konnte jedoch eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf Proteinebene nicht bestätigt werden (n = 2).

Anschließend sollte untersucht werden, ob diese geringfügige Transkriptionssteigerung des VEGF durch Stimulation mit CXCL12 sich auf Proteinebene in Gestalt einer höheren Menge an sezerniertem VEGF in den Überständen von CXCL12-stimulierten Glioblastomzellen auswirkt. Hierfür wurden A764-Glioblastomzellen unter serumfreien Bedingungen mit oder ohne 1 nM CXCL12 für 24 Stunden inkubiert und Aliquots der Kulturüberstände jeweils eine Stunde und 24 Stunden nach Stimulationsbeginn abgenommen. Diese wurden in einem

Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest hinsichtlich ihrer VEGF-Konzentration untersucht. Der Mittelwert der unstimulierten Kontrollproben wurde gleich 1 gesetzt, wobei sich aus den individuellen Versuchen eine Standardabweichung von $\pm 0,37$ ergab. Der auf die Kontrolle bezogene Mittelwert der CXCL12-stimulierten Proben betrug $1,08 \pm 0,19$. Die Menge des sekretierten VEGF wurde also durch eine Stimulation mit 1 nM CXCL12 nicht beeinflusst (Abbildung 27, rechts).

3.12 Untersuchungen zur Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression an Glioblastomsphären

Voraussetzung für Untersuchungen an Glioblastomsphären-Kulturen, in denen Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter angereichert sind, war zunächst die Etablierung von Kultivierungsbedingungen für adulte neurale Stammzellen in Neurosphären. Dies erfolgte mithilfe von neuronalen Stammzellen aus der subventrikulären Zone von früh postnatalen Maushirnen. Anschließend war eine Übertragung dieser Kultivierungsbedingungen auf die Kultur von dissoziierten Glioblastomzellen erforderlich. Hierbei sollte auch überprüft werden, ob die so angereicherten stammzellartigen Zellen durch Stimulation mit Serum noch in der Lage waren, in verschiedene Zelllinien auszudifferenzieren. Schließlich sollten die Glioblastomsphären hinsichtlich ihrer Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression untersucht werden.

3.12.1 Etablierung der Kultivierung von Neurosphären

Zur Etablierung der Kultivierungsbedingungen adulter neuraler Stammzellen wurden die Subventrikulärzonen von früh postnatalen Maushirnen präpariert, dissoziiert und in dem von Reynolds und Weiss (1992) beschriebenen Stammzellmedium mit bFGF und EGF aufgenommen. Die Mediumzusätze und die Auswahl der Wachstumsfaktoren begünstigen das Überleben und Proliferieren von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen und wirken negativ für das Überleben anderer Zellpopulationen (Astrozyten, Mikroglia). Dadurch reichern sich Stamm- und Progenitorzellen an und bilden innerhalb von 10 bis 14 Tagen dreidimensionale, frei schwimmende Zellaggregate, so genannte Neurosphären (*Neurospheres*). Diese Neurosphären dürfen nicht als reine Stammzellkultur verstanden werden, sondern es liegt eine Mischpopulation verschiedener, unterschiedlich weit differenzierter Progenitorzellen vor, die durch Schaffung eines bestimmten Mikromilieus das Überleben und die Proliferation von einzelnen, neuronalen Stammzellen in dieser Mischpopulation ermöglichen.

Abbildung 28 zeigt immunzytochemische Färbungen von murinen Neurosphären-Kulturen, die durch Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht worden waren. Die Größe der

Neurosphären kann je nach Kulturzeitraum variieren, die hier gezeigten Aggregate sind zwischen ca. 80 und 160 μm groß.

Die Neurosphären wurden durch einen Antikörper gegen den Marker für gliale Progenitorzellen und reaktive Astrozyten Nestin stark angefärbt, ein Großteil der in den Sphären enthaltenen Zellen war Nestin-positiv. Eine immunzytochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den Stammzellmarker CD133 zeigte eine schwächere Färbung, die vor allem im Inneren der Aggregate vorlag. Die Kultivierung neuraler Stammzellen gelang also in diesen Neurosphären-Kulturen und unter Verwendung des definierten Stammzellmediums.

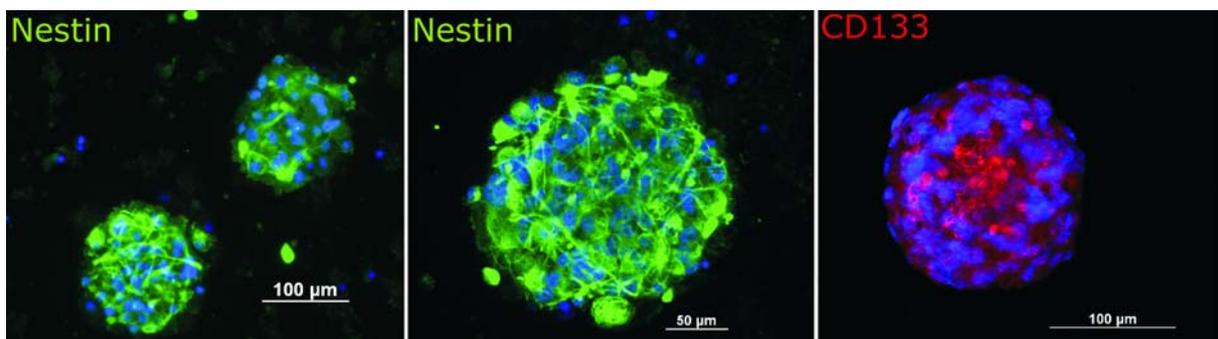


Abbildung 28: Immunzytochemische Färbungen von murinen Neurosphären. Die in der Subventrikulärzone früh postnataler Maushirne enthaltenen adulten neuralen Stammzellen wurden in einer Neurosphärenkultur angereichert, durch Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht und immunzytochemisch auf den glialen Vorläufermarker Nestin und den Stammzellmarker CD133 gefärbt, unter Verwendung der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-Maus (Nestin) und Alexa Fluor 555 anti-Ziege (CD133). Die Neurosphären wiesen eine Größe zwischen ca. 80 und 160 μm Durchmesser auf und zeigten starke Immunreaktivität für Nestin und etwas geringere, vornehmlich im inneren der Neurosphären detektierbare Immunreaktivität für CD133.

Ergebnisse zu Untersuchungen des Chemokins CXCL16 und seines Rezeptors CXCR6 an diesen Neurosphären-Kulturen und Differenzierungsversuche unter Serumzusatz wurden publiziert (Hattermann *et al.* 2008a), sollen aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

3.12.2 Etablierung der Kultivierung von Glioblastomsphären

Die Übertragung der Neurosphären-Kulturbedingungen auf die Kultivierung von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter in der so genannten Glioblastomsphären-Kultur gelang, ohne dass Modifikationen an der Präparation der Einzelzellsuspension aus Tumorgewebe oder an der Zusammensetzung des definierten Kulturmediums erforderlich waren. Es zeigte sich jedoch, dass ca. 50% aller Glioblastomzellsuspensionen, die unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, keine Glioblastomsphären-Kulturen bildeten, sondern innerhalb einiger Tage abstarben. Das Stammzellmedium war als Mangelmedium formuliert, in dem nur Zellen mit Stammzellcharakter überleben können. Daher stellte das Überleben und Proliferieren unter diesen definierten Bedingungen, die Expression von Stammzellmarkern und die Differenzierbarkeit in reifere Zellstadien die gewünschten

Stammzellcharakteristika dar. Im Folgenden sollen beispielhaft Kulturen gezeigt werden, die in dem Stammzellmedium überlebten und proliferierten und an denen die Expression von Stammzellmarkern und die Differenzierbarkeit in verschiedene Zellpopulationen untersucht wurden.

Kultur 1: Lichtmikroskopische Aufnahme und immunzytochemischer Nachweis von Nestin und CD133

Die erste Kultur wurde aus vermeintlichem Glioblastomgewebe hergestellt, das sich später nach eingehender Untersuchung des Neuropathologen als hochmalignes Gangliogliomgewebe herausstellte. Gangliogliome sind sehr selten auftretende gemischtgliale-neuronale Tumoren, die sowohl neoplastische Ganglienzellen als auch gliale Zellen enthalten. In der Kulturflasche bildeten sich nach ca. 10 Tagen dreidimensionale Zellaggregate, so genannte Gliosphären, aus (Abbildung 29, links).

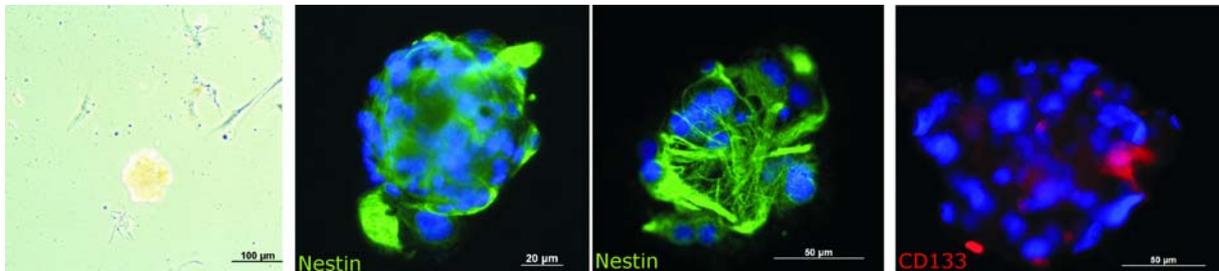


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme und Fluoreszenzimmunzytochemie einer Gliosphären-Kultur. Eine Kulturflasche mit einer ca. 10 Tage alten Gliosphären-Kultur wurde unter einem inversen Mikroskop mit Digitalkamera fotografiert. Erkennbar ist ein knapp 100 µm großes, frei schwimmendes Zellaggregat sowie einige adhärent wachsenden Zellen, die noch nicht abgestorben waren (links). Nach 20 Tagen wurden die frei schwimmenden Zellaggregate durch Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht, fixiert und immunzytochemisch auf die Expression des glialen Vorläufermarkers Nestin (Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-Maus) und CD133 (Sekundärantikörper Alexa Fluor 555 anti-Ziege) analysiert. Die Gliosphären waren stark Nestin-positiv, die Expression von CD133 schien auf Einzelzellen beschränkt.

Die Größe der Gliosphären variierte und nahm mit längerer Kultivierungszeit zu bis maximal ca. 150 µm Durchmesser. Nach 20 Tagen in Kultur wurden die Gliosphären durch Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger transferiert, fixiert und immunzytochemisch mit Antikörpern gegen Nestin und CD133 gefärbt. CD133 ist ein membrandurchspannendes Glykoprotein, das vornehmlich auf hämatopoietischen und neuralen Stammzellen exprimiert wird. Es ist der am häufigsten beschriebene Marker für Glioblastomstammzellen. Nestin ist ein Typ IV Intermediärfilamentprotein, das von Progenitorzellen der glialen und neuronalen Linien gebildet wird, aber auch bei pathologischen Prozessen, z.B. der Bildung einer Glianarbe im Zentralnervensystem, wieder auftritt.

Wie Abbildung 29 zeigt, waren die Gliosphären stark immunpositiv für Nestin (Mitte), wohingegen die Expression von CD133 auf einzelne Zellen beschränkt schien (rechts).

Kultur 2: Immunzytochemischer Nachweis der Glioblastomstammzellmarker CD133, Musashi-1 und Sox2

Ebenso wie oben für die Sphären-Kultur des Ganglioglioms beschrieben, bildeten die erfolgreichen Glioblastomsphären-Kulturen innerhalb einer Kultivierungszeit von 10 bis 20 Tagen dreidimensionale Zellaggregate, die zunächst freischwimmend, in späteren Kultivierungsphasen oft auch teiladhärent waren.

In einer solchen Kultur sollten nun mittels Immunzytochemie typische, in soliden Glioblastomen beobachtete Stammzellmarker (Ma *et al.* 2008) nachgewiesen werden. Die Zellaggregate wurden hierfür 20 Tage nach der Inkulturnahme in sehr wenig Medium auf PDL-beschichtete Deckgläschen transferiert und hafteten innerhalb der nächsten zwei Tage leicht an der Oberfläche an. Die Sphären wurden dann fixiert und mit Antikörpern gegen CD133, Musashi-1 und Sox2 behandelt. Musashi-1 ist ein RNA-bindendes Protein, das in den Notch-Signalweg eingreift und in neuronalen Stammzellen auftritt. Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Stammzellen an der Erhaltung der Pluripotenz beteiligt ist.

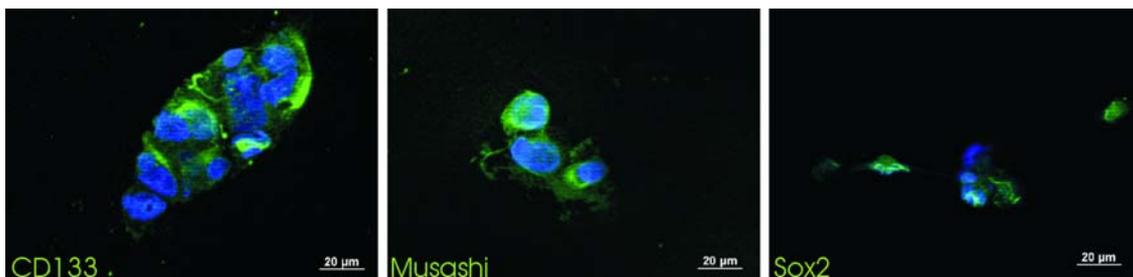


Abbildung 30: Immunzytochemischer Nachweis der Glioblastomstammzellmarker CD133, Musashi-1 und Sox2 in Glioblastomsphären. Glioblastomsphären wurden auf Objektträger aufgebracht, fixiert und unter Verwendung von Antikörpern gegen CD133, Musashi-1 und Sox2 immunzytochemisch gefärbt (Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-Ziege, anti-Maus bzw. anti-Kaninchen). Die Glioblastomsphären zeigten Immunreaktivität für alle drei Stammzellmarker, wobei nicht immer alle Zellen positiv waren.

Wie Abbildung 30 zeigt, konnten alle drei Marker auf der untersuchten Glioblastomsphären-Kultur nachgewiesen werden, jedoch waren jeweils nicht alle Zellen der Kultur positiv für das entsprechende Protein. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit Apotom durchgeführt, sodass die zelluläre Lokalisation der Marker genauer bestimmt werden konnte. Hierbei fand sich das Transmembranprotein CD133 tatsächlich auf den Zelloberflächen und das RNA-bindende Protein Musashi-1 wurde intrazellulär detektiert, während der Transkriptionsfaktor Sox2 vor allem in Kernnähe detektiert wurde.

Eine Isolierung von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter sowie die Kultivierung in einer Sphären-Kultur war also erfolgreich.

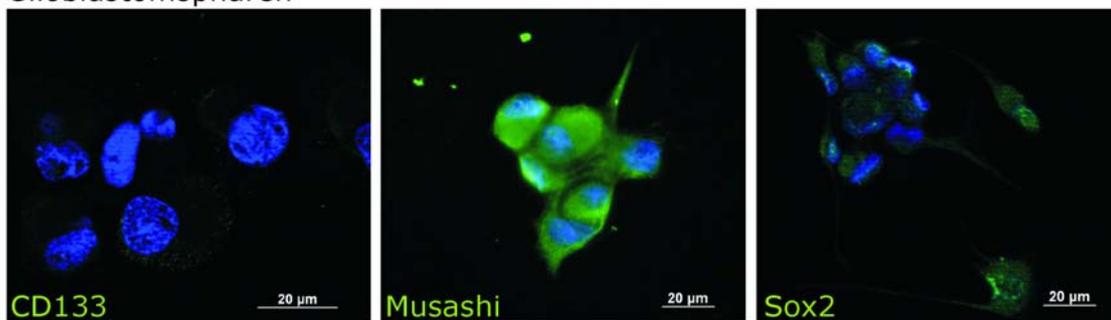
Kultur 3: Immunzytochemischer Nachweis von Musashi-1 und Sox2, nicht aber CD133, und immunzytochemischer Nachweis der Differenzierbarkeit

Neben den Glioblastomstammzellmarkern war ein weiterer Gesichtspunkt der Untersuchungen, dass die kultivierten Zellen sich laut Literatur durch Zugabe von fötalem

Kälberserum in einen höheren Differenzierungsstatus überführen lassen sollten.

Dies wurde anhand einer weiteren Glioblastomspären-Kultur untersucht. Hierfür wurde eine Glioblastomspären-Kultur aufgeteilt und während ein Teil der Sphären auf PDL-beschichtete Deckgläschen aufgesetzt und immunzytochemisch auf die Stammzellmarker CD133, Musashi-1 und Sox2 untersucht wurde, wurden die übrigen Sphären enzymatisch dissoziiert, auf Deckgläschen aufgesetzt und 6 Tage lang in Kulturmedium für neurale Stammzellen ohne bFGF und EGF, aber mit 10 % FKS kultiviert, um eine Differenzierung einzuleiten. Es zeigte sich, dass die Glioblastomspären zwar CD133-negativ waren, die anderen beiden Stammzellmarker jedoch exprimiert wurden (Abbildung 31 oben).

Glioblastomspären



Differenzierung mit 10 % FKS für 6 Tage



Abbildung 31: Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern in den Glioblastomspären (oben) sowie von glialen und neuronalen Markern in den ausdifferenzierten Kulturen (unten). Glioblastomspären wurden immunzytochemisch auf die Glioblastomstammzellmarker CD133, Musashi-1 und Sox2 untersucht. Die Zellen zeigten Immunreaktivität für Musashi-1 und teilweise für Sox2, jedoch nicht für CD133. Nach Ausdifferenzierung durch Inkubation mit 10% FKS im Stammzellmedium für 6 Tage wurden die Marker GFAP (astroglial), NeuN (neuronal) und MBP (oligodendroglial) immunzytochemisch angefärbt. Sehr viele Zellen waren GFAP-positiv, NeuN- und MBP-positive waren nur vereinzelt zu beobachten. Der Zusatz von Serum hatte also einen höheren Differenzierungsgrad bewirkt.

Die vereinzelt Zellen wurden unter Serumeinfluss innerhalb kurzer Zeit adhären und wuchsen nicht mehr in dreidimensionalen Zellaggregaten. Stattdessen bekamen sie unterschiedlich lange und unterschiedlich stark verzweigte Ausläufer. Viele dieser Zellen zeigten starke Immunreaktivität für den astroglialen Marker GFAP (Abbildung 31 unten). Vereinzelt waren Zellen im Kern angefärbt für NeuN (*Neuronal Nuclei*), neuronenspezifisches Kernprotein, und ebenfalls sehr wenige Zellen wiesen Immunreaktivität für das Myelin Basische Protein (MBP) auf, das kennzeichnend für

Oligodendrozyten ist. Obwohl diese Glioblastomspären-Kultur also nur die Stammzellmarker Musashi-1 und Sox2 exprimierte, nicht aber den in der Literatur am häufigsten beschriebenen Oberflächenmarker CD133, konnten die Zellen durch Entzug von bFGF und EGF und Zugabe von Serum zum Medium in höhere Differenzierungszustände (glialer und neuronaler Natur) überführt werden.

Kultur 4: Fluoreszenz-Doppelfärbung von CD133 und GFAP an Glioblastomspären unter Differenzierungsbedingungen

Um zu untersuchen, inwiefern Zellen aus Glioblastomspären mit Stammzellcharakter diesen unter Differenzierungsbedingungen beibehalten oder verlieren, wurde eine weitere Glioblastomspären-Kultur vereinzelt, auf Deckgläschen aufgesetzt und durch Zugabe von 10% Serum zum Medium über einen Zeitraum von 6 Tagen zur Differenzierung stimuliert. Anschließend wurden Einzelfärbungen auf die Stamm- und Vorläuferzellmarker Musashi-1, Sox2 und Nestin und die Differenzierungsmarker NeuN und MBP sowie eine Doppelfärbung auf GFAP und CD133 durchgeführt.

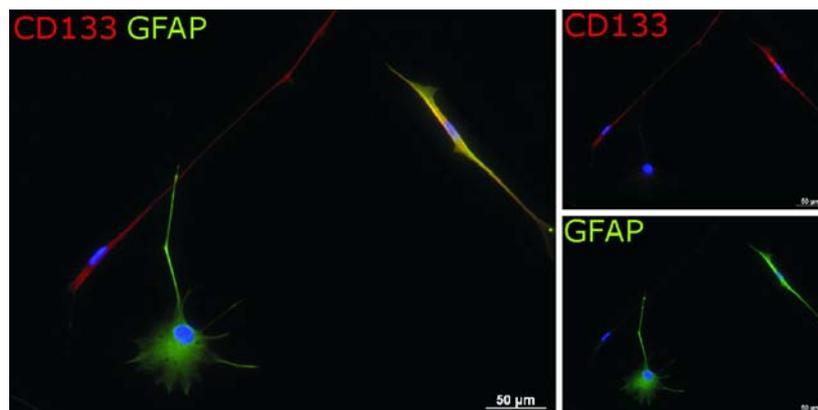


Abbildung 32: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von GFAP (grün) und CD133 (rot) differenzierten Glioblastomspärenzellen. Glioblastomspären wurden dissoziiert und 6 Tage lang unter Zusatz von 10 % FKS ausdifferenziert. Mit Antikörpern gegen CD133 und GFAP wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung durchgeführt, die zeigte, dass sowohl GFAP als auch CD133 exprimiert wurden. Links Überlagerung aller drei Farbkanäle, rechts oben CD133- und Kernfärbung, rechts unten GFAP- und Kernfärbung.

Die große Mehrheit der Zellen war Nestin-positiv und GFAP-positiv, nur sehr wenige Zellen zeigten schwache Immunreaktivität gegenüber NeuN und MBP. Die Doppelfärbung von CD133 und GFAP zeigte jedoch, dass sehr viele Zellen GFAP-positiv waren und keine Immunreaktivität für CD133 besaßen. Einige wenige Zellen, die eher lang gestreckt und spindelförmig (im Vergleich zu den stark verzweigten, teilweise sogar flächigen GFAP-positiven Zellen) waren, wiesen eine CD133-Färbung auf.

Außerdem gab es eine kleine Population von Zellen, die sowohl GFAP- als auch CD133-positiv waren (Abbildung 32). Eine Ausdifferenzierung zu GFAP-positiven Zellen hatte also stattgefunden, jedoch waren nach einem Stimulationszeitraum von 6 Tagen mit 10% FKS noch CD133-positive Zellen in den Kulturen vorhanden.

Kultur 5: Untersuchung der serum- oder BMP4-induzierten Differenzierung in einer Parallelkultur mit und ohne 10 ng/ml LIF im Glioblastosphären-Medium

An weiteren Glioblastosphären-Kulturen wurden sowohl der Einfluss von LIF als Zusatz im Kulturmedium für neurale Stammzellen als auch des in der Literatur diskutierten Differenzierungsfaktors BMP4 (*Bone morphogenetic protein*) untersucht (Picirillo et al 2006). Diese Untersuchungen erforderten eine größere Menge an Glioblastosphären, daher wurden diese für 2-3 Monate in Kultur unter regelmäßiger Dissoziation vermehrt.

Alle untersuchten Glioblastosphären-Kulturen wurden unter Einfluss des Differenzierungsreizes – sowohl 10% FKS als auch 10 ng/ml BMP4 – adhärent und konnten durch immunzytochemische Färbungen hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmerkmalen analysiert werden. Wie in Abbildung 33 beispielhaft an einer Kultur gezeigt, war ein Großteil der Zellen immunpositiv für den astroglialen Marker GFAP, häufig waren auch oligodendrogliale (MBP oder CNPase) und neuronale Marker (NeuN oder β -III-Tubulin) detektierbar.

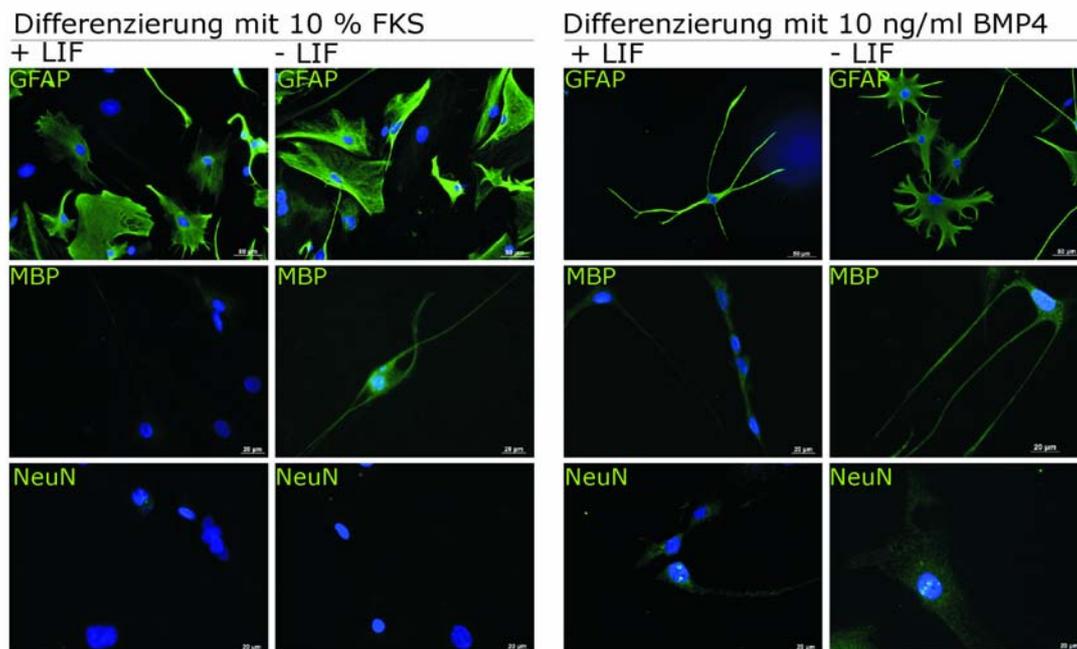


Abbildung 33: Immunzytochemischer Nachweis der Differenzierungsmarker GFAP, MBP und NeuN an einer Parallelkultur. Von einer Glioblastomprobe wurden Kulturen parallel in Stammzellmedium mit und ohne 10 ng/ml LIF angelegt und über einen Zeitraum von 2 Monaten als Glioblastosphären kultiviert. Zur Ausdifferenzierung wurden diese Glioblastosphärenzellen enzymatisch dissoziiert und auf Deckgläschen aufgesetzt. Durch Zugabe von 10 % und Weglassen des EGF und bFGF wurden die Zellen adhärent und wurden nach 6 Tagen fixiert und immunzytochemisch angefärbt. Sowohl mit 10 % FKS als auch mit 10 ng/ml BMP4 behandelte Zellen zeigten starke Immunreaktivität für den astroglialen Marker GFAP. Einzelne Zellen wiesen auch den oligodendroglialen Marker MBP oder den neuronalen Marker NeuN auf.

In Kulturen, die mit 10 % FKS ausdifferenziert worden waren, zeigten die GFAP-positiven Zellen eine flächige Morphologie, wohingegen mit 10 ng/ml BMP4 ausdifferenzierte Kulturen vor allem stark verzweigte GFAP-positive Zellen mit langen Ausläufern aufwiesen. In

Kulturen, die von Beginn an in Medium für neurale Stammzellen mit 10 ng/ml LIF kultiviert worden waren, bildeten sich weniger häufig Zellen mit oligodendroglialen Markern aus als in Stammzellmedium ohne LIF-Zusatz kultivierte Kulturen (Abbildung 33, Mitte). Dagegen führte die Differenzierung mit BMP-4 häufiger zur Ausbildung von Zellen mit neuronalem Charakter (Abbildung 33, unten).

Diese Differenzierungsexperimente zeigten deutlich, dass es sowohl durch Zusatz von Medium als auch von 10 ng/ml BMP4 möglich war, die Glioblastomsphärenzellen in einen höheren Differenzierungsstatus zu überführen. Die Merkmale reifer Oligodendrozyten und reifer Neurone konnten jeweils auf kleinen Subpopulationen detektiert werden, allerdings lagen auch Kulturen vor, in denen – abgesehen vom astroglialen Marker GFAP, der in allen Differenzierungskulturen detektiert wurde – nur entweder neuronal geprägte oder oligodendrogliale Zellpopulationen entsprechend angefärbt worden waren.

3.12.3 Untersuchungen zur Expression von CXCR4, CXCR7 und CXCL12 an der Glioblastomsphären-Kultur 25/07

In den Glioblastomsphären-Kulturen 25/07, die parallel über den gesamten Kulturzeitraum ohne LIF und mit LIF im Medium kultiviert worden waren, wurden durch regelmäßige enzymatische Vereinzelung über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr diejenigen Zellen angereichert, die unter Stammzellkulturbedingungen ein hohes Maß an Proliferation und Selbsterneuerung zeigten. Da die Kultivierung über deutlich mehr als 20 Subkulturen erfolgt war, wurden diese Glioblastomsphären-Kulturen als Glioblastomzelllinie mit Stammzellcharakteristika oder Glioblastom-Stammzellähnliche Zelllinie (*Glioblastoma stem-like cell line*) betrachtet.

Diese beiden Zelllinien erfüllten mit dem Wachstum in Stammzellmedium, Selbsterneuerung über einen längeren Zeitraum und Differenzierbarkeit durch Serumzusatz wesentliche Stammzellcharakteristika und exprimierten den Stammzellmarker CD133 – wenn auch in geringem Maße. Sie wurden als *in vitro*-Modell für Glioblastomstammzellen zur Untersuchung der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression verwendet. Hierfür wurden die beiden parallelen Kulturen (mit und ohne LIF-Zusatz) vereinzelt und auf Kulturschalen aufgeteilt, drei Tage in Stammzellmedium mit den jeweiligen Zusätzen belassen, dann wurde das Medium auf Stammzellmedium mit 10 % FKS umgestellt (zur Ausdifferenzierung) oder als Stammzellmedium mit den üblichen Wachstumsfaktoren (EGF, bFGF und gegebenenfalls LIF) belassen (für undifferenzierte Zellen). Diese Kulturen wurden 21 Tage lang unter regelmäßiger Erneuerung der Medien inkubiert und dann entweder für realtime RT-PCR-Analysen aufgearbeitet oder immunzytochemisch auf die Marker früher Oligodendrozyten, CNPase, und Neurone, β -III-Tubulin, gefärbt. Diese Marker werden im Gegensatz zu MBP und NeuN bereits von nicht vollständig ausgereiften Oligodendrozyten bzw. Neuronen

gebildet, so dass diese ebenfalls detektiert werden können.

Wie Abbildung 34 zeigt, wurde sowohl die in Stammzellmedium mit LIF gehaltenen Kulturen als auch diejenigen, die ohne LIF kultiviert worden waren durch den Zusatz von 10% FKS zum Stammzellmedium vollständig adhärent und konnten mit Antikörpern gegen GFAP und β -III-Tubulin angefärbt werden. Ein Großteil der Zellen war hierbei GFAP-positiv und nur eine kleine Subpopulation war immunreaktiv für β -III-Tubulin. Die Morphologie der GFAP-exprimierenden Zellen variierte stark, von sehr großen, eher flächigen Zelleibern bis zu schlanken, spindel- oder sternförmiger Gestalt. Die Zellen, in denen das neuronale Filamentprotein β -III-Tubulin detektiert wurde, besaßen stets im Verhältnis sehr kleine Zellkerne und schlanke Zelleiber mit sehr langen Ausläufern. CNP-ase-positive Zellen wurden nicht beobachtet.

Die Zunahme der GFAP-Expression unter Serumeinfluss wurde mittels realtime RT-PCR bestätigt. Hierbei wurde für die undifferenzierten Kontrollen (in Stammzellmedium mit bFGF und EGF) ohne LIF ein mittlerer ΔC_T -Wert von $7,26 \pm 1,16$ erhalten, der ΔC_T -Mittelwert der mit FKS ausdifferenzierten Zellen betrug $3,82 \pm 0,22$. Damit war die GFAP-Expression auf das 10,8-fache angestiegen. In den mit LIF inkubierten Kulturen betrug der ΔC_T -Mittelwert von GFAP in den undifferenzierten Kontrollkulturen $8,77 \pm 0,97$, der gemittelte ΔC_T -Wert der ausdifferenzierten Kulturen betrug $-2,66 \pm 0,33$. Die Expressionsteigerung betrug in diesem Fall sogar fast das 3000-fache. Gleichzeitig wurde die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Sox2 durch Serumeinfluss auf ungefähr die Hälfte in den Kulturen ohne LIF ($0,46 \pm 0,19$) und ungefähr ein Zehntel in den Kulturen mit LIF ($0,07 \pm 0,09$) beobachtet.

In Bezug auf den Chemokinrezeptor CXCR4 wurde sowohl in den mit LIF kultivierten Zellen als auch denjenigen, die ohne LIF gehalten worden waren, eine Abnahme der CXCR4-Expression in den durch Serumzusatz in einen höheren Differenzierungszustand überführten Kulturen festgestellt. Bei den Kulturen, die kein LIF erhalten hatten, betrug der mittlere ΔC_T -Wert der undifferenzierten Kontrollkulturen $6,34 \pm 0,45$, die unter Serumeinfluss differenzierten Zellen wiesen nur noch einen ΔC_T -Mittelwert von $10,25 \pm 0,44$ und somit nur ca. ein Zehntel der CXCR4-Expression verglichen mit den unstimulierten Kulturen auf. Auch in den mit LIF kultivierten Zellen zeigte sich ein vergleichbarer Effekt: Hier betrug der ΔC_T -Mittelwert der nicht-differenzierten Kulturen $6,53 \pm 0,56$, während die serum-stimulierten Kulturen nur ca. ein Sechstel dieser Expression aufwiesen (ΔC_T $9,23 \pm 0,44$).

Hingegen stieg die CXCR7-Expression mit dem gestiegenem Differenzierungsstatus an. Die ohne LIF-Zusatz kultivierten Zellen hatten ΔC_T -Werte von $8,96 \pm 0,25$ (undifferenziert) und $6,14 \pm 0,23$ (differenziert), was einer Expressionssteigerung auf das ca. Siebenfache entspricht, während die mit LIF im Medium gehaltenen Kulturen mittlere ΔC_T -Werte von $10,65 \pm 0,10$ (undifferenziert) und $1,5 \pm 0,06$ aufwiesen, und dementsprechend in den differenzierten Zellen eine Steigerung der CXCR7-Expression auf das 500-fache verglichen

mit den Kulturen, denen kein Serum zugesetzt worden war.

Die CXCL12-Expression wurde in den ohne LIF kultivierten Zellen unter Serumeinfluss nur etwas verdoppelt, was mittleren ΔC_T -Werten von $8,46 \pm 0,01$ (undifferenziert) und $7,34 \pm 0,01$ entspricht. In den mit LIF im Medium kultivierten Zellen fiel der Unterschied erheblich größer aus, der ΔC_T -Mittelwert betrug für die undifferenzierten Zellen $8,03 \pm 0,43$, während in den differenzierten Zellen ein mittlerer ΔC_T -Wert von $4,83 \pm 0,25$ erhalten wurde. Dies entspricht einer Expressionssteigerung auf etwa das Neunfache.

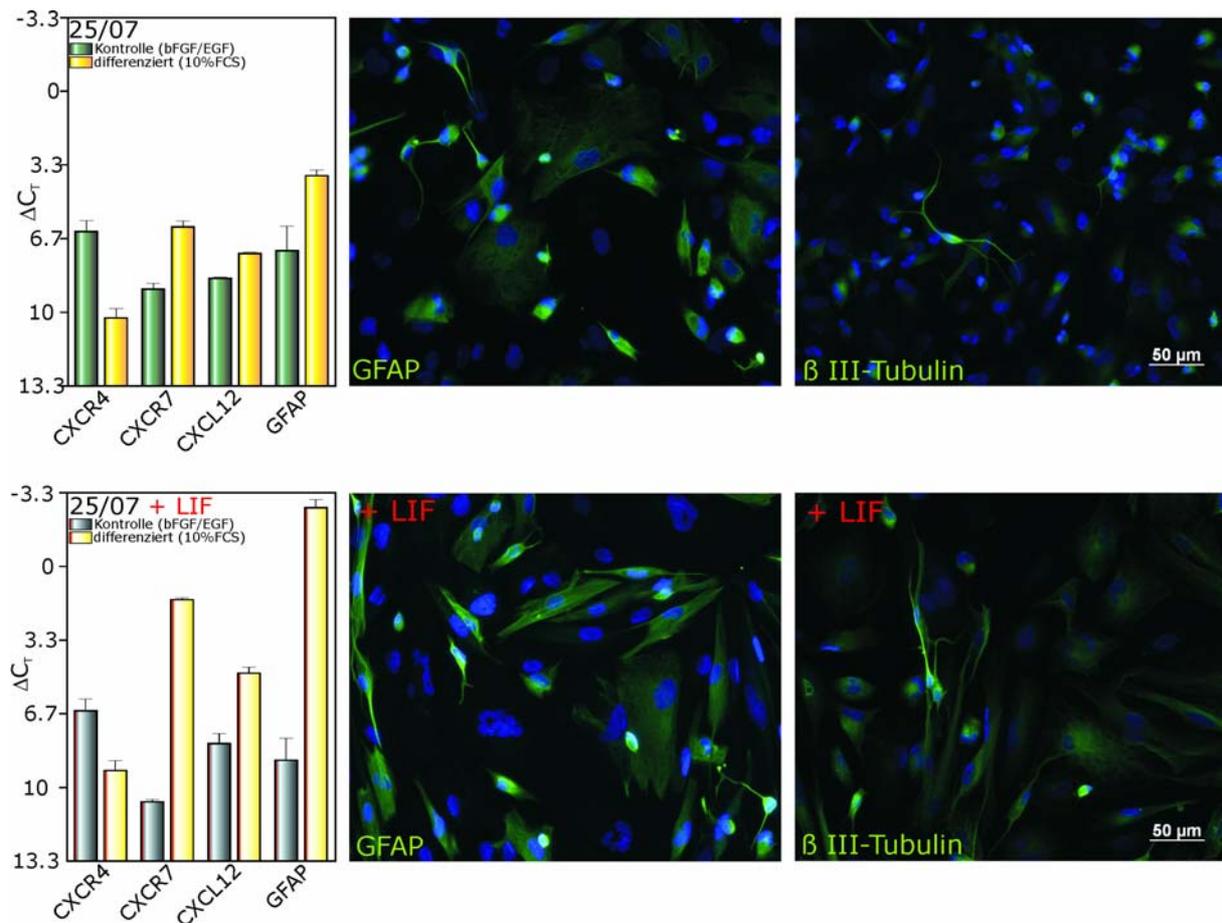


Abbildung 34 Untersuchung der Transkription von CXCR4, CXCR7 und CXCL12 in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Glioblastom-Stammzellähnlichen Zelllinie 25/07. Die Glioblastomsphären 25/07 wurden in parallelen Kulturen mit oder ohne LIF über ein Jahr lang kultiviert und durch regelmäßiges Dissoziieren wurden Zellen mit hoher Selbsterneuerungskapazität angereichert. Aufgrund der Häufigkeit der Subkultivierung wurde schließlich sowohl für die mit LIF und bFGF / EGF im Stammzellmedium gehaltenen Kulturen als auch für die Kulturen, die kein LIF, sondern nur bFGF und EGF erhalten hatten, ein Zellliniencharakter angenommen. Durch Zusatz von 10 % FCS differenzierten beide Parallelkulturen in viele GFAP-positive und vereinzelte β -III-Tubulin-positive Zellen aus (rechts; oben Kulturen ohne LIF, unten Kulturen mit LIF). Die Steigerung der GFAP-Expression wurde durch realtime RT-PCR bestätigt, dabei wurde GAPDH als Referenzgen verwendet. Realtime RT-PCR-Analysen zeigten außerdem, dass in den differenzierten Zellen die CXCR4-Expression abnahm, die Expression von CXCR7 und CXCL12 stieg jedoch an, teilweise sogar stark (jeweils $n = 2$ unabhängige Differenzierungsexperimente).

Es war also gelungen, sowohl durch immunzytochemische Färbungen als auch durch quantitative RT-PCR nachzuweisen, dass die stammzellartigen Glioblastomzellen der Linie

25/07 durch Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum über einen Zeitraum von 21 Tagen einen höheren Differenzierungsstatus erhielten. Im Vergleich zu den wenig differenzierten Zellen, die weiterhin bFGF und EGF als Wachstumsfaktoren erhielten, wurde in den stärker differenzierten Zellen eine geringere mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und höhere Expressionen des Rezeptors CXCR7 und des Liganden CXCL12 detektiert.

Diese Ergebnisse konnten sowohl in den Kulturen beobachtet werden, die von Beginn an mit LIF-Zusatz zum Stammzellmedium (mit bFGF und EGF) kultiviert worden waren als auch bei denjenigen, die in Stammzellmedium mit EGF und bFGF allein gehalten wurden. In den Kulturen, die LIF regelmäßig erhalten hatten, waren jedoch die Expressionssteigerungen von CXCR7, CXCL12 und GFAP merklich bis deutlich höher als bei den Kulturen ohne LIF.

4. Diskussion

Seit der Entdeckung des ersten Chemokins CXCL8 / IL8 (Walz *et al.* 1987, Yoshimura *et al.* 1987), das als chemotaktisch wirksamer Faktor auf neutrophile Granulozyten identifiziert wurde, ist die Familie der Chemokine und ihrer Rezeptoren beständig gewachsen und umfasst zur Zeit mehr als 50 Chemokine, die an 23 bekannte Rezeptoren binden. Daraus resultiert eine hohe Rezeptor-Liganden-Redundanz, so dass ein Ligand häufig an mehrere Rezeptoren binden kann und ein Rezeptor häufig mehr als einen Liganden besitzt. Chemokine und ihre Rezeptoren sind evolutionär betrachtet hoch konserviert.

Chemokine wurden zunächst in der Leukozyten-Kommunikation und Migration sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Prozessen beschrieben und zeigten sich verantwortlich für die Steuerung von Immunzellen zwischen Blutgefäßen, Lymphflüssigkeit, lymphatischen Organen und den Orten akuter oder chronischer Entzündung. Fehlregulationen der Chemokinexpression konnten mit chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Arthritis, Atherosklerose, entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn) und Glomerulonephritis in Verbindung gebracht werden (Feng *et al.* 2000, Murdoch & Finn 2000, Baggiolini 2001).

Auch im Zentralnervensystem werden Chemokine und ihre Rezeptoren in großer Vielfalt exprimiert (Rossi & Zlotnik 2000) und nehmen neben den Neurotransmittern und Neuropeptiden eine wichtige Regulationsfunktion ein (Adler & Rogers 2005). Die physiologischen Aufgaben der Chemokine bestehen in der Steuerung der Zellmigration, Zytokinproduktion und Zellproliferation sowie in der Regulation von Apoptose und Überleben. So tragen Chemokine und ihre Rezeptoren auch wesentlich zu Entwicklungsprozessen im Zentralnervensystem bei. Sie nehmen Einfluss auf die neuronale Musterbildung (Reiss *et al.* 2002) und Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen (Glia-Glia, Neuron-Glia). Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise neuroinflammatorischen und neurologischen Erkrankungen, wurden definierte Chemokinexpressionsmuster beschrieben (Asensio & Campbell 1999, Xia *et al.* 1998).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Chemokine nicht nur eine Rolle in der Entwicklung und Homöostase von Geweben und des Immunsystems spielen, sondern auch in pro- und anti-angiogenetische Prozesse und in die Entstehung und Progression von Tumoren eingreifen (Belperio *et al.* 2000, Rossi & Zlotnik 2000).

Viele Tumoren produzieren ein komplexes Netzwerk von Chemokinen und Chemokinrezeptoren, die die Tumorigenese massiv beeinflussen (Vicari & Caux 2002). Im Vergleich zum entsprechenden nicht-neoplastischen Gewebe sind diese Tumoren häufig durch fehlregulierte Produktion oder Überexpression der Chemokine und der Chemokinrezeptoren sowie durch komplexe Effekte der Chemokin-Chemokinrezeptor-

Signaltransduktion gekennzeichnet (Dhawan & Richmond 2002, Skinnider & Mak 2002).

Tumor-assoziierte Chemokine beeinflussen dabei mindestens fünf Aspekte der Biologie primärer Tumoren und Metastasen: Infiltration von Stromazellen in den Tumor; Manipulation der Tumorimmunantwort; Regulation der Angiogenese; Wirkung als autokrine oder parakrine Wachstums- oder Überlebensfaktoren; Steuerung der Migration von Tumorzellen (Balkwill 2003).

In humanen Tumoren des Nervensystems werden eine Reihe von Chemokinen und Chemokinrezeptoren produziert, die mit unterschiedlichen Prozessen der Tumorigenese in Verbindung gebracht werden. So wurde beispielsweise beschrieben, dass das Chemokin CCL2 in humanen Gliomen über seinen Rezeptor CCR2 sowohl die Einwanderung von Makrophagen / Mikrogliazellen (Desbaillets *et al.* 1994) als auch eine gesteigerte Migration der Gliomzellen selbst vermitteln kann (Liang *et al.* 2008). Das Chemokin CXCL8 / IL8 fördert die Neovaskularisierung von Gliomen (Brat *et al.* 2005), während das Chemokin CXCL16 und sein Rezeptor CXCR6 in humanen Schwannomen überexprimiert werden und eine Steigerung der Proliferation und Migration der Tumorzellen *in vitro* bewirken (Held-Feindt *et al.* 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Vorkommen und die Funktion des Chemokinrezeptors CXCR7 in humanen Glioblastomen untersucht werden. Das Zusammenspiel von CXCR4 und CXCR7, den beiden alternativen Rezeptoren für CXCL12, soll im Folgenden durch Vergleiche von Expression und Lokalisation sowie Modulation der Chemokin-Chemokinrezeptor-Antwort, Gegenüberstellung möglicher Signaltransduktionswege und Vergleich der zellulären Effekte in unterschiedlichen Tumoren, insbesondere in humanen Astrozytomen und hochmalignen Glioblastomen dargestellt werden.

4.1 Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und ihrer Liganden CXCL11 und CXCL12 in humanen Glioblastomen

Das konstitutiv in vielen Geweben produzierte Chemokin CXCL12 / SDF-1 ist der einzige bekannte Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR4 und bis vor kurzem war CXCR4 der einzige bekannte Rezeptor, an den CXCL12 bindet. Das Chemokin CXCL11 / I-TAC, dem in vielen Geweben ein Einfluss auf die Angiogenese zugeschrieben wird, bindet hingegen an den Chemokinrezeptor CXCR3. Kürzlich konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch der Rezeptor RDC1 / CXCR7 die Chemokine CXCL11 und CXCL12 binden kann. Bis dahin war CXCR7 ein so genannter *Orphan*-Rezeptor, also ein als G-Protein-gekoppelter Rezeptor identifiziertes Protein ohne bekannten Liganden. Die Affinität der Bindung von CXCL12 an CXCR7 beträgt ~ 100 – 200 pM, während CXCL11 mit einer 10-fach niedrigeren Affinität (~ 2-5 nM) bindet (Burns *et al.* 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR7 sowie der Chemokine CXCL11 und CXCL12 auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass der kürzlich entdeckte Chemokinrezeptor CXCR7 in humanen malignen Astrozytomen und Glioblastomen signifikant stärker exprimiert wurde als in den untersuchten nicht-neoplastischen Hirngewebebeobproben. Der alternative CXCL11-Rezeptor CXCR3 wurde nur vereinzelt und in nur sehr geringem Maße detektiert. Die Expression des alternativen CXCL12-Rezeptors CXCR4 war in den Astrozytomen und Glioblastomen im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Kontrollgewebebeobproben leicht erhöht. Die beiden bisher bekannten Liganden dieses Rezeptors, CXCL11 und CXCL12, wurden ebenfalls nachgewiesen. Das Chemokin CXCL12, das gewöhnlich konstitutiv in vielen Geweben exprimiert wird, wurde in den untersuchten nicht-neoplastischen Hirngewebebeobproben und den Glioblastomproben annähernd gleich stark exprimiert, während das Chemokin CXCL11, das unter physiologischen Bedingungen die Angiogenese hemmt, sogar signifikant weniger exprimiert wurde.

Expression des Chemokinrezeptors CXCR7

Diese ersten Nachweise des Chemokinrezeptors CXCR7 in humanen astroglialen Tumoren zeigen, dass auch dieser Rezeptor für CXCL12 und CXCL11 eine mögliche Rolle in der Entwicklung und Progression astroglialer Tumoren spielt.

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR7 wurde bisher sowohl in gesunden als auch in pathologisch veränderten Geweben nachgewiesen. Neben der Expression von CXCR7 durch humane reife B-Zellen und Monozyten (Infantino *et al.* 2006), wurde beispielsweise auch eine Modulation der CXCR7-Expression bei akutem Nierenversagen (Mazzinghi *et al.* 2008), bei ischämischen Ereignissen im Gehirn (Schönemeier *et al.* 2008) und während der Schwangerschaft in der Plazenta (Tripathi *et al.* 2008) gezeigt. Bezüglich neoplastischer Erkrankungen wurde die Expression von CXCR7 in Prostatakarzinomen (Wang *et al.* 2008), Mammakarzinomen (Miao *et al.* 2007) und dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Goldmann *et al.* 2008) beschrieben. Darüber hinaus wurde die Expression von CXCR7 in etablierten Zelllinien humaner Kolon- und Pankreaskarzinome (CT26 und Panc02) sowie der murinen Mammakarzinomzelllinie KEP1 festgestellt (Meijer *et al.* 2008).

Expression des Chemokinrezeptors CXCR4

Die vorliegenden Befunde zur leicht erhöhten mRNA-Expression von CXCR4 in astroglialen Tumoren unterschiedlicher Malignitätsgrade stehen im Einklang mit anderen Arbeiten (z.B. Ma *et al.* 2008), die ebenfalls eine leichte Steigerung der CXCR4-Expression in humanen Astrozytomen und Glioblastomen verglichen mit dem nicht-neoplastischen Kontrollgewebe

beschreiben. Diese Steigerung korreliert jedoch nicht mit dem Malignitätsgrad. Die hohe inter-individuelle Streuung der CXCR4-Expression, in den untersuchten Gewebeproben ist möglicherweise eine Folge der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gewebe aus verschiedenen Zellpopulationen. Im gesunden, adulten Zentralnervensystem stellen - neben den Endothelzellen und den Mikrogliazellen - Neurone und neurale Progenitorzellen die wesentlichen CXCR4-exprimierenden Zellpopulationen dar, die regional unterschiedlich zahlreich vertreten sind (Stumm & Höllt 2007). Im neoplastischen Gewebe können starke Expressionsschwankungen möglicherweise auf die unterschiedlich großen Anteile der CXCR4-positiven Zellpopulationen von Tumorstammzellen und Mikroglia zurückzuführen sein. So können beispielsweise Stammzellmarker-exprimierende Zellen im Mittel ca. 10-15 % der Tumormasse eines Glioblastoms ausmachen (Ma *et al.* 2008). Einwandernde Mikrogliazellen und Makrophagen können ebenfalls bis zu einem Drittel der Gesamttumormasse beitragen (Gräber *et al.* 2002). Das Expressionsniveau des Rezeptors CXCR4 könnte also möglicherweise stark vom Anteil der jeweiligen Zellpopulationen an der Gesamttumormasse abhängen. Hierzu liegen jedoch keine bestätigenden oder widersprechenden Befunde vor.

Unter den Chemokinrezeptoren wurde der Rezeptor CXCR4 als erster im Zusammenhang mit der Entwicklung, Aufrechterhaltung und Progression von Tumoren beschrieben. Müller *et al.* beschrieben 2001 erstmals die CXCL12-abhängige Migration von Mammakarzinomzellen *in vitro* und die Metastasierung dieser CXCR4-exprimierenden Zellen in CXCL12-produzierende Gewebe *in vivo*. Die Expression des Rezeptors CXCR4 wurde unter anderem auch für Melanome (Murakami *et al.* 2002), Ovarialkarzinome (Scotton *et al.* 2002), Non-Hodgkin-Lymphome (Bertolini *et al.* 2002), Prostatakarzinome (Taichman *et al.* 2002) und Pankreaskarzinome (Koshiba *et al.* 2000) beschrieben.

In Glioblastomen wurde die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 zunächst in Nekrosen und Regionen einsprossender Gefäße gezeigt (Rempel *et al.* 2000). In späteren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die verhältnismäßig kleine CXCR4-exprimierende Subpopulation Stamm- oder Progenitorzellcharakter besitzt (Aboody *et al.* 2001, Ehtesham *et al.* 2004), und dass möglicherweise Tumorstammzellen beziehungsweise tumor-initiiierende Zellen den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren.

In situ-Lokalisation von CXCR4 und CXCR7 sowie ihres Liganden CXCL12

Durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen konnte der Chemokinrezeptor CXCR7 in dieser Arbeit *in situ* auf tumor-assoziierten Endothel- und Mikrogliazellen, im wesentlichen aber auf proliferierenden Tumorzellen in GFAP-positiven Regionen lokalisiert werden.

In nicht-neoplastischem humanem Hirngewebe zeigten nur vereinzelte Mikrogliazellen und Endothelzellen *in situ* eine Expression von CXCR7 auf Proteinebene. Vorherige

Untersuchungen durch Schönemeier *et al.* (2008) zum Einfluss von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei ischämischen Läsionen ergaben eine Expression von CXCR7 auf mRNA-Ebene auch in Astrozyten und Neuronen in bestimmten Regionen des Rattenhirns. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Normalhirnproben wurden diese Befunde für den menschlichen Organismus *in situ* jedoch nicht bestätigt.

In den untersuchten Glioblastomgewebeproben wurden CXCR4 und CXCR7 nicht von denselben Zellpopulationen exprimiert, doch sowohl für CXCR4 und den Liganden CXCL12 als auch für CXCR7 und CXCL12 konnte eine Kolokalisation festgestellt werden. Aus dieser Kolokalisation ist jedoch nicht zu entnehmen, ob CXCR4- und CXCR7-positive Zellen selbst CXCL12 sekretieren, oder ob durch die Fluoreszenzfärbung das an den Rezeptor assoziierte Chemokin detektiert wird. Die CXCR4-positiven Tumorzellen bildeten nur eine verhältnismäßig kleine Subpopulation innerhalb der untersuchten Tumoren, wohingegen die CXCR7-positiven Zellen einen Großteil des Tumors ausmachten.

Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie ihrer Liganden in vitro

Diese Befunde zeigten eine gute Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsdaten, die in einer Übersichtsuntersuchung von humanen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs und primären Endothelzellen erhalten wurde: Etablierte Glioblastomzelllinien zeigten eine hohe CXCR7-Expression auf mRNA-Ebene, während CXCR4 nicht oder nur in sehr geringem Maße transkribiert wurde. Da der Rezeptor CXCR4 *in situ* nur auf einer kleinen Subpopulation von Glioblastomzellen detektiert worden war, liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellpopulation entweder unter den üblichen Kultivierungsbedingungen für Glioblastomzellen abstarb, durch die möglicherweise höhere Teilungsrate der CXCR7-positiven Glioblastomzellen verdrängt wurde, oder dass die Expression von CXCR4 *in vitro* eingestellt wurde. CXCR4- und CXCR7-mRNA wurden darüber hinaus jeweils in einer Monozytenzelllinie und in primären Endothelzellen aus der Nabelschnur detektiert. Dies deckt sich mit den Befunden der immunhistochemischen Fluoreszenzdoppelfärbungen, wo jeweils eine Kolokalisation mit dem Mikroglia marker Iba1 und dem Endothelzellmarker Pecam-1 beobachtet wurde.

Diese Befunde deuten an, dass möglicherweise auch endotheliale und monozytäre Zellen innerhalb des Glioblastomgewebes über die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 mit der jeweiligen Mikroumgebung kommunizieren können. Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von CXCR4 und CXCR7 auf infiltrierenden Mikrogliazellen und Makrophagen sowie tumor-assoziierten Endothelzellen kann möglicherweise in Zukunft einen weiteren Ansatz zum Verständnis der Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion in der Tumorigenese bieten.

Die Liganden für CXCR7, CXCL11 und CXCL12, waren in den untersuchten Glioblastom-

linien nur teilweise exprimiert. Die überraschend geringe Expression des Chemokins CXCL12 in kultivierten Tumorzellen im Vergleich zum soliden Tumorgewebe ist sowohl für Glioblastomzellen (Komatani *et al.* 2009) als auch für andere Tumoren beschrieben worden (z.B. Brand *et al.* 2005). Möglicherweise führen die Kulturbedingungen zu einer drastischen Reduktion der CXCL12-Expression. Es gibt jedoch auch Anzeichen, dass das in den Glioblastomproben detektierte CXCL12 hauptsächlich durch Endothelzellen und Mikrogliazellen produziert wird (Salmaggi *et al.* 2004).

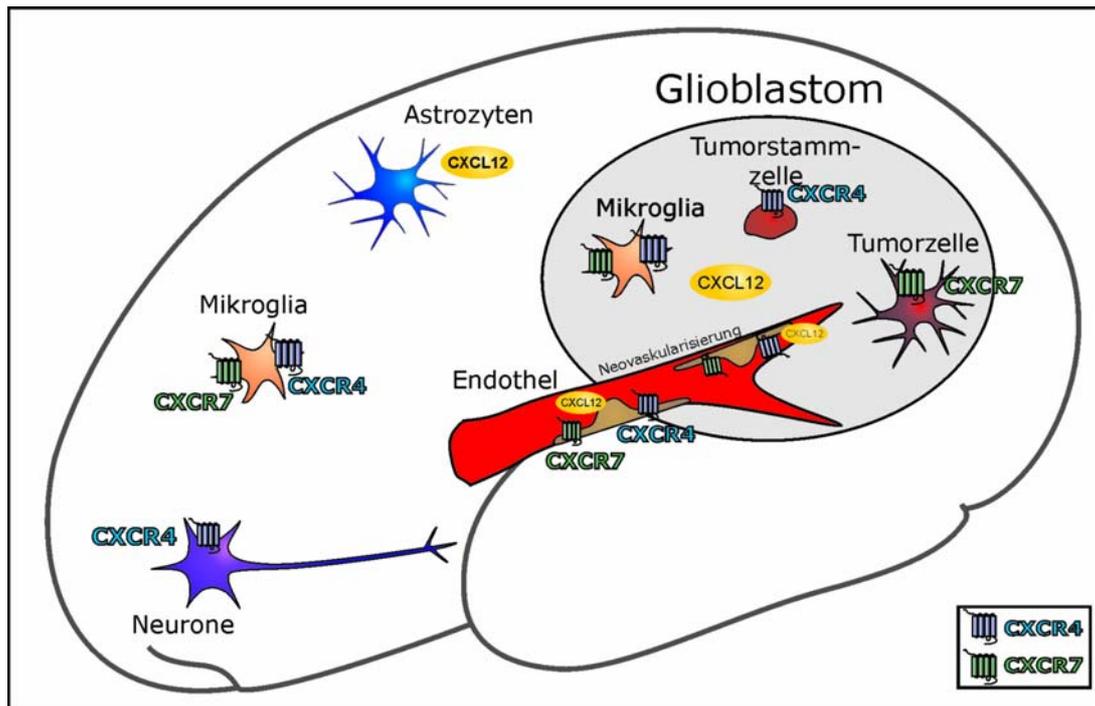


Abbildung 35: Mögliche Lokalisierung des Chemokins CXCL12 und seiner Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 im gesunden Zentralnervensystem und im Glioblastom. Im nicht-neoplastischen ZNS wird CXCL12 von Astrozyten und Endothelzellen gebildet, CXCR4 ist auf bestimmten Neuronen, Mikrogliazellen und Endothelzellen zu finden, während CXCR7 nur von Endothelzellen und Mikrogliazellen exprimiert wird. Im Glioblastom ist CXCR4 darüber hinaus auf einer Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzellcharakter vertreten, während reife Tumorzellen CXCR7 exprimieren. Daten von Rempel *et al.* 2000, Bajetto *et al.* 2001, Ehtesham *et al.* 2006, Schönemeier *et al.* 2008 und Befunde der vorliegenden Arbeit.

Der Chemokinrezeptor CXCR7 war also auf dem Großteil der Glioblastomzellen *in situ* und *in vitro* der vornehmliche Rezeptor für CXCL12, während CXCR4 *in situ* auf einer Subpopulation von Glioblastomzellen detektiert wurde, die jedoch unter den konventionellen Kultivierungsbedingungen *in vitro* nicht erhalten blieb oder ihre CXCR4-Expression einstellte. Eine schematische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 35.

Eine mögliche Erklärung für die geringe CXCR4-Expression *in situ* lautet, dass Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter die CXCR4-positive Subpopulation ausmachen, die unter den konventionellen Kulturbedingungen nicht erhalten bleiben kann. Daher wurde in dieser Arbeit eine Anreicherung dieser Zellpopulation mit Stammzellcharakteristika *in vitro* durch die so genannte Glioblastom-sphären-Kultur etabliert.

4.2 Etablierung einer Glioblastom-Stammzellartigen Zelllinie als Modell für Glioblastomstammzellen *in vitro*

Zur Etablierung der Kultur von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter wurden im Verlauf dieser Arbeit Glioblastomzellen aus humanen Glioblastomgeweben isoliert und unter Stammzellkulturbedingungen kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen war eine Anreicherung von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter möglich. Diese Glioblastomsphären-Kulturen sollten als *in vitro*-Modell für die in den soliden Tumoren existierende Population von Glioblastomstammzellen zur Untersuchung der Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie ihres gemeinsamen Liganden CXCL12 verwendet werden.

Glioblastomstammzellen werden in der Literatur häufig gleichgesetzt mit einer Subpopulation von Tumor-initiiierenden Zellen, die bei Injektion in immundefiziente Mäuse bereits in geringer Zellzahl Glioblastome hervorrufen können und durch wiederholte Passagen *in vivo* angereichert werden. Wie Bjerkvig *et al.* (2005) kritisieren, handelt es sich hierbei um eine Subpopulation von Glioblastomzellen, die besonders gut angepasst ist an die Proliferation in murinen Hirnen. Besonders unter dem Aspekt, dass murine und humane Hirngewebebeobachten generell voneinander verschiedene Chemokinexpressionsmuster aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Anreicherung von tumor-initiiierenden Glioblastomzellen durch Xenograftmodelle bewusst verzichtet und stattdessen die Kultivierung unter Stammzellbedingungen, die Expression von Stammzellmarkern, die Differenzierbarkeit unter Serumeinfluss und die Anreicherung von Zellen mit Selbsterneuerungspotential als Kriterien des Stammzellcharakters angelegt.

Für die vorliegende Arbeit wurden die von Reynolds und Weiss (1992) entwickelten Kultivierungsbedingungen für neurale Stammzellen mit geringfügigen Modifikationen (wie z.B. von Yuan *et al.* 2004 beschrieben) verwendet. Diese Bedingungen erlauben die Anreicherung von Glioblastomzellen, die besonders resistent gegenüber der Kultivierung in Mangelmedium sind, bestimmte Stammzellmarker tragen und die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in unterschiedliche Zellpopulationen (oligodendroglial, neuronal und astroglial) besitzen. Dabei zeigte sich, dass das anfänglich in der Literatur häufig als Glioblastomstammzellmarker vorgeschlagene Transmembranprotein CD133 (Prominin-1; Singh *et al.* 2004, Galli *et al.* 2004) nicht in allen Glioblastomsphären-Kulturen, die im Rahmen dieser Arbeit angelegt wurden, exprimiert wurde. Diese Kulturen konnten jedoch unter den entsprechenden Bedingungen trotzdem in adhärenente Zellen unterschiedlicher Differenzierungslinien ausdifferenziert werden. Dies deckt sich mit Befunden anderer Forschergruppen, die ebenfalls stammzellartigen Charakter sowohl in CD133-negativen wie auch CD133-positiven Glioblastomzellen nachwiesen (Beier *et al.* 2007, Günther *et al.* 2008).

Die in dieser Arbeit vorgestellten CD133-negative Glioblastomsphären-Kulturen waren jedoch immunpositiv für zwei andere Stammzellmarker, Musashi-1 und Sox2, die eine funktionelle Rolle in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von neuronalen Stammzellen spielen und deren Expression mit steigender Malignität von humanen Astrozytomen und Glioblastomen korreliert werden kann (Ma *et al.* 2008). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde zudem beschrieben, dass das Transmembranprotein CD133 durch bioenergetischen Stress (z.B. Hypoxie, mitochondriale Dysfunktion) reversibel reguliert wird. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass in CD133-negativen Zelllinien die Expression von CD133 durch Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) hervorgerufen werden konnte (Griguer *et al.* 2008). Die Expression von CD133 in Glioblastomzellen ist also bestimmten Umgebungsverhältnissen unterworfen, die *in vitro* möglicherweise nicht aufrechterhalten werden können. In einer anderen Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass in CD133-positiven und CD133-negativen Glioblastomzellisolaten die Expression anderer Stammzellmarker, wie beispielsweise Sox2, nicht deutlich unterschiedlich war (Clément *et al.* 2009). Unter diesen Gesichtspunkten stellt sich die Frage, ob die Expression von CD133 tatsächlich als Kriterium für Glioblastomstammzellen gelten sollte, oder ob möglicherweise andere Charakterisierungsmerkmale verwendet werden sollen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Glioblastomstammzellen anhand ihrer Fähigkeit zum Überleben unter Stammzellkulturbedingungen, der Expression von funktionellen Stammzellmarkern (Sox2, Musashi1) und der Differenzierbarkeit in unterschiedliche Zelltypen charakterisiert.

Die Anreicherung von Glioblastomzellen mit Selbsterneuerungspotential unter Stammzellkulturbedingungen führte schließlich zur Generierung zweier Glioblastom-Stammzellartigen Zelllinien. Diese Zelllinien stammten von Glioblastomsphären-Kulturen ab, die aus einer Glioblastomgewebeprobe gewonnen und anschließend getrennt voneinander in Stammzellmedium mit EGF und bFGF kultiviert wurden. Ein Teil der Glioblastomsphären erhielt dabei durchgehend von Beginn der Kultivierungsbeginn an zusätzlich LIF als dedifferenzierenden Faktor. Beide Glioblastomsphären-Kulturen wurden über einen Zeitraum von einem Jahr regelmäßig dissoziiert und zeigten anschließend verstärkte Proliferation und die Bildung von kleinen bis mittelgroßen, schwimmenden oder teiladhärenten Sphären. Da mehr als 20 Subkultivierungen durchgeführt wurden, wurden diese Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter als Zelllinien angesehen. Sie zeigten ausreichende Proliferationsfähigkeit, um die Chemokinexpression in undifferenzierten und unter Serumeinfluss differenzierten Zellen zu vergleichen und gleichzeitig Kontrollexperimente zur Überprüfung der Differenzierung durchzuführen.

Es konnte in diesen Experimenten reproduzierbar gezeigt werden, dass die Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter CXCR4 in höherem Maße exprimieren als die ausdifferenzierten Zellen der entsprechenden Kultur.

Durch seruminduzierte Differenzierung wurde die Expression von CXCR4 dramatisch reduziert und die Expression von CXCR7 stark erhöht. Gleichzeitig nahm die mRNA-Expression des stammzellspezifischen Transkriptionsfaktors Sox2 ab, während die Expression adulter Zellmarker wie GFAP und β -III-Tubulin stark anstieg.

Diese Effekte waren besonders drastisch in den Kulturen, die langfristig mit dem Zytokin LIF kultiviert worden waren. Obwohl LIF *in vitro* die Differenzierung von Neuralleistenzellen in sensorische Neurone fördert (Murphy *et al.* 1994), erhält es in adulten neuronalen Stammzellkulturen den Stammzellcharakter und fördert die Selbsterneuerung (Bauer 2009). In Glioblastomspären-Kulturen trug LIF offensichtlich dazu bei, den Stammzellcharakter zu erhalten. Der Differenzierungsstatus von adulten neuronalen Stammzellkulturen scheint ein fragiles Gleichgewicht zu sein, das stark von Herkunft und vorherigem Entwicklungsstand der Zellen abhängt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass CXCR4 von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter exprimiert wird und mit steigendem Differenzierungsgrad verschwindet, während die Expression von CXCR7 ansteigt. Somit ist vermutlich CXCR4 der vornehmliche Rezeptor für CXCL12 auf neuronalen Stammzellen und Glioblastomstammzellen, während der kürzlich entdeckte Rezeptor CXCR7 vor allem in der Hauptmasse der Tumorzellen mit höherem Differenzierungsgrad den vorherrschenden Rezeptor für CXCL12 darstellt.

In der Diskussion um die Tumorstammzellhypothese werden zurzeit zwei mögliche Erklärungsmodelle der Entstehung und Erhaltung von Tumorstammzellen im soliden Tumor einander gegenüber gestellt.

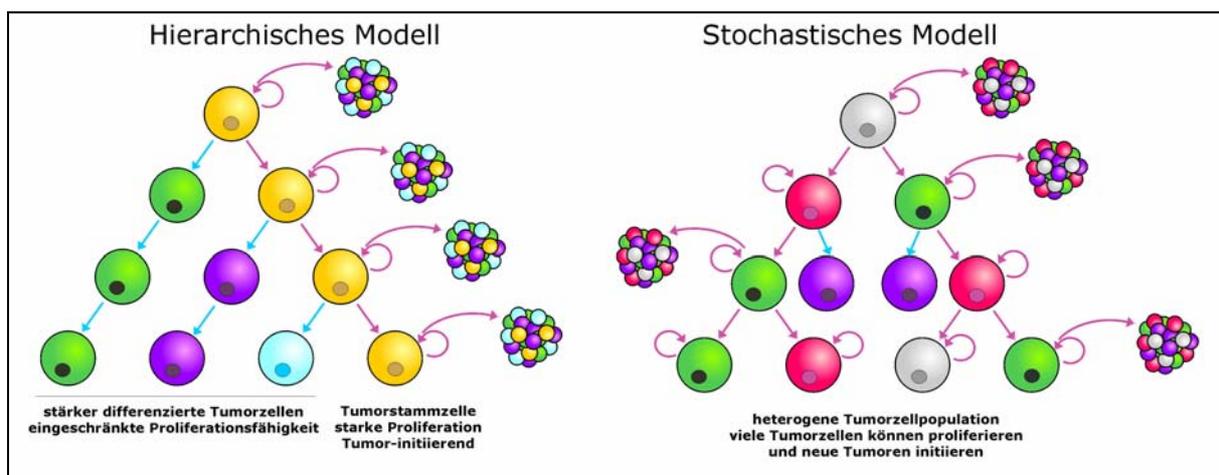


Abbildung 36: Hierarchisches und statistisches Modell zur Erklärung des Vorkommens von Tumorstammzellen. Abbildung modifiziert nach Reya *et al.* 2001 und Vescovi *et al.* 2006. Das hierarchische Modell postuliert eine Ursprungszelle („cell of origin“), die Stammzellmarker exprimiert und unbegrenzt teilungspotential besitzt. Im stochastischen Modell wird das Auftreten von Tumorzellen mit hohem Selbsterneuerungspotential und der Fähigkeit zur Initiation neuer Tumoren als zufälliges, mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auftretendes Ereignis beschrieben.

Das ursprüngliche, hierarchische Modell postuliert eine einzelne Tumorstammzelle, die durch die Entartung einer Stamm- oder Progenitorzelle entstanden ist und durch asymmetrische Teilungen stets selbst erhalten wird und Tochterzellen hervorbringt, die nur noch in begrenztem Maß proliferieren können.

Ein zweites, alternatives Modell zur Erklärung der Tumorstammzellen ist das stochastische Modell, das das Auftreten von besonders aggressiven Tumorzellen (hohe Teilungsraten, starke Resistenz gegen Radio- und Chemotherapie usw.) als wahrscheinlichkeitsgesteuertes Ereignis bei der Teilung der weniger aggressiven Tumorzellen ansieht. (Abbildung 36, nach Reya *et al.* 2001 und Vescovi *et al.* 2006)

Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere die hohe CXCR7-Expression und das Fehlen von CXCR4 in den etablierten Glioblastomzelllinien sprechen eher für das hierarchische Modell der Tumorstammzellhypothese. *In situ* und *in vitro* wurde in der vorliegenden Arbeit und auch durch andere Arbeitsgruppen (z.B. Ehtesham *et al.* 2006) die Expression des Rezeptors CXCR4 auf Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter nachgewiesen. Mit zunehmendem Differenzierungsstatus, belegt durch steigende GFAP-Expression und sinkende Sox2-Expression, sank die CXCR4-Expression zugunsten der Expression des alternativen CXCL12-Rezeptors CXCR7. Auch Stamm- und Progenitorzellpopulationen im adulten Hirn exprimieren CXCR4. Durch eine Entartung dieser wenig differenzierten CXCR4-positiven Zellen könnte es also zu einer CXCR4-positiven Population von Tumorzellen mit Stamm- oder Progenitorzellcharakter kommen, die durch asymmetrische Teilungen sich selbst erneuert und gleichzeitig eine CXCR4-negative, CXCR7-positive, begrenzt proliferierende Population hervorrufen kann.

4.3 Regulation der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Die Modulation der Chemokin-Chemokinrezeptor-Antwort spielt in Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle, da veränderte Expressionsmuster von Chemokinen und Chemokinrezeptoren die Tumorigenese in verschiedenen Aspekten, z.B. hinsichtlich Proliferation und Migrationskapazität, beeinflussen können. Die Modulation der Chemokin-Chemokinrezeptor-Antwort kann auf Ebene der Liganden oder auf Ebene der Rezeptoren erfolgen.

Um einen Einblick zu erhalten, ob und wie der Chemokinrezeptor CXCR7 in die Modulation der CXCL12-vermittelten Effekte in humanen Glioblastomen eingreift, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von CXCR7 untersucht. Über die Regulation des Rezeptors CXCR4 liegen in der Literatur umfangreiche Erkenntnisse vor, die im Folgenden den eigenen Daten gegenübergestellt werden sollen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription des Rezeptors CXCR7 in A764-Glioblastomzellen weder durch die untersuchten proinflammatorischen Zytokine noch durch die Liganden CXCL11 und CXCL12 beeinflusst. Der Tumorstromungsfaktor TGF β 1 zeigte in Stimulationsversuchen eine Steigerung der CXCR7-mRNA-Expression, die jedoch aufgrund der starken Streuung nicht signifikant war. Auf Proteinebene wurde diese Steigerung der CXCR7-Expression durch TGF β 1 nicht bestätigt, möglicherweise fand also auf posttranskriptioneller Ebene eine Gegenregulation statt.

Auch unter hypoxischen Bedingungen wurde die Expression von CXCR7 in den A764-Glioblastomzellen nicht verändert. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von Schutyser *et al.* (2007), die unter hypoxischen Bedingungen eine Zunahme der CXCR4-Expression, nicht jedoch der CXCR7-Expression in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) beobachteten.

Dies deutet darauf hin, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR7 *in vitro* wenig reguliert wird. Im Hinblick auf die oben diskutierte Steigerung der CXCR7-Expression durch Differenzierung von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter sollte diese Feststellung jedoch auf Zellen beschränkt werden, die bereits einen hohen Differenzierungsstatus erreicht haben. Im Falle der A764-Glioblastomzellen ist dieser hohe Differenzierungsstatus anhand einer hohen GFAP-Expression zu belegen.

Im Gegensatz zu diesen Befunden wurde in unterschiedlichen Zelltypen gezeigt, dass die Transkription von CXCR4 durch eine ganze Reihe von Signalmolekülen reguliert werden kann. Eine Verstärkung der CXCR4-Transkription wurde durch die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15 sowie die Wachstumsfaktoren TGF β 1, bFGF, VEGF und EGF beschrieben, während die inflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ und IL-1 β die CXCR4 Expression verringerten (Übersichtsartikel von Busillo & Benovic 2007). In Tumorzellen glialen Ursprungs wurde außerdem beschrieben, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 unter hypoxischen Bedingungen heraufreguliert wird (Zagzag *et al.* 2006). Der geringe Sauerstoffpartialdruck führt dazu, dass der Transkriptionsfaktors HIF1 α (*Hypoxia inducible factor 1 α*) nicht mehr abgebaut wird und an HRE-Promotorregionen (*Hypoxia response elements*) binden kann. Durch Stimulation mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF, der ebenfalls unter Kontrolle des HRE-Promotors steht, wurde in Gliomzellen der Chemokinrezeptor CXCR4 überexprimiert (Zagzag *et al.* 2006, Yang *et al.* 2005).

Eine weitere Möglichkeit der Modulation Chemokin-Chemokinrezeptor-Antwort besteht in der Regulation des jeweiligen Liganden. Der Ligand CXCL12 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert und seine Expression wird auch in physiologischen Entwicklungsprozessen des Gehirns nur wenig reguliert. Eine Steigerung der CXCL12-Expression konnte jedoch in

verschiedenen Hirnzellen durch Stimulation mit Lipopolysaccharide (LPS, Ohtani *et al.* 1998) oder löslichem Myelin basischen Protein (MBP, Calderon *et al.* 2006) gezeigt werden.

Auch in Überständen von Glioblastomzellen konnte ein erhöhter CXCL12-Gehalt nach Irradiation und nach Stimulation mit Temozolomid gezeigt werden (Tabatabai *et al.* 2006). Diese Versuchsbedingungen sollten die Stresssituation unter Radio- und Chemotherapie im Glioblastom nachempfinden und somit Einblick in die Änderung der CXCL12-Expression während der Therapie liefern.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass das Chemokin CXCL12, der gemeinsame Ligand von CXCR4 und CXCR7, in humanen Glioblastomgewebeprobe nicht stärker transkribiert wurde als in den untersuchten nicht-neoplastischen Hirngewebeprobe. Dies deutet an, dass die transkriptionelle Regulation des Chemokins CXCL12 hinsichtlich der Modulation der Chemokin-Chemokinrezeptor-Antwort in Glioblastomen *in vivo* eine untergeordnete Rolle spielt. Die Modulation eines Chemokinsignals kann zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle auch auf Ebene der Ligandensequestrierung erfolgen, indem bestimmte Proteasen Chemokine inaktivieren. Im Fall von CXCL11 und CXCL12 ist für die Inaktivierung die Dipeptidylpeptidase IV (CD26) verantwortlich (Proost *et al.* 1998), die jedoch in humanen Glioblastomen nicht exprimiert wird (unveröffentlichte Daten Rolf Mentlein).

Zusammen mit in der Literatur beschriebenen Daten zeigten diese Ergebnisse also, dass die Modulation der CXCL12-vermittelten Kommunikation von Glioblastomzellen in erster Linie über die Regulation des Rezeptors CXCR4 unter hypoxischen Bedingungen erfolgt (Zagzag *et al.* 2006), während der alternative Rezeptor CXCR7 unter den untersuchten Bedingungen stets gleichmäßig stark exprimiert wurde. Bezüglich des Liganden CXCL12 wurde eine Regulation bisher nur unter therapievermittelten Stressbedingungen beschrieben (Tabatabai *et al.* 2006), eine Modulation durch proteolytischen Abbau von CXCL12 wurde in Glioblastomen bisher nicht beschrieben.

4.4 Signaltransduktion des Chemokins CXCL12 über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7

Über die durch CXCR7-vermittelte Signaltransduktionskaskade ist bisher wenig bekannt. Obwohl das CXCR7-Homolog im Zebrafisch offenbar funktional an der Embryonalentwicklung beteiligt ist (Dambly-Chaudiere *et al.* 2007), konnte eine Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen bisher nicht gezeigt werden (Knaut & Schier 2008). Daher wurde der Chemokinrezeptor CXCR7 bisher als möglicher nicht-signalleitender Rezeptor (*Decoy-Rezeptor*) diskutiert (Thelen & Thelen 2008)

In der vorliegenden Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass durch Stimulation mit dem Chemokin CXCL12 eine Aktivierung der Kinasen ERK 1 / 2 erfolgte, nicht jedoch der Kinasen Akt und p38. Eine nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die häufig infolge der ERK-Phosphorylierung beschrieben wird, wurde in diesem Fall zumindest für die p65-Untereinheit nicht beobachtet. Da es jedoch auch aktive NF- κ B-Proteine gibt, die keine p65-Untereinheit enthalten (z.B. p50-Homodimere), kann eine Aktivierung von NF- κ B nicht vollständig ausgeschlossen werden. Viele Chemokinrezeptoren sind an ein G-Protein mit inhibitorischer G $_{\alpha}$ -Untereinheit assoziiert, die die Adenylatzyklase inhibiert. Dies könnte möglicherweise auch für CXCR7 der Fall sein, denn eine Aktivierung des cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktors CREB wurde durch Stimulation mit CXCL12 nicht hervorgerufen. Auch der Transkriptionsfaktor ATF2, der häufig in der Folge einer p38-Phosphorylierung aktiviert wird, und der Transkriptionsfaktor ELK-1, der im Signalweg der ERK-Aktivierung phosphoryliert werden kann, wurden nicht aktiviert.

In bisherigen Untersuchungen war zunächst die Hypothese bestärkt worden, dass CXCR7 ein nicht-signalleitender *Decoy*-Rezeptor sei: In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die CXCR7, nicht jedoch CXCR4 exprimiert, wurde keine intrazelluläre Kalziummobilisierung durch Stimulation mit CXCL12 ausgelöst, die sonst ein häufiges Ereignis in der Signaltransduktion bekannter Chemokinrezeptoren ist (Burns *et al.* 2006). Im Gegensatz hierzu konnte kurz darauf in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 gezeigt werden, dass synthetische Agonisten des Rezeptors CXCR7 eine intrazelluläre Mobilisierung von Kalziumionen, nicht jedoch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels auslösen können (Jones *et al.* 2006). In der humanen Prostatazelllinie C4-2B wurde eine CXCR7-vermittelte Aktivierung des Akt-Signalwegs durch Stimulation mit CXCL12 beobachtet (Wang *et al.* 2008).

Zudem wurde eine Internalisierung des Rezeptors CXCR7 nach Bindung seines Liganden CXCL12 in humanen T-Lymphozyten nachgewiesen (Balabanian *et al.* 2006). Ob jedoch eine Reexpression an der Zelloberfläche stattfindet oder der Rezeptor lysosomal abgebaut wird, wurde bisher nicht untersucht (s. Abbildung 37).

Diese Hinweise darauf, dass es sich bei CXCR7 doch um einen signalleitenden Rezeptor handelt, werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestärkt: Durch Stimulation von CXCR7-exprimierenden Glioblastomzellen erfolgte eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges, die bisher für eine CXCL12-CXCR7-Wechselwirkung noch nicht beschrieben worden war. Hingegen wurde keine Aktivierung der Kinase Akt beobachtet, wie sie über Prostatakarzinomzellen berichtet worden ist (Wang *et al.* 2008).

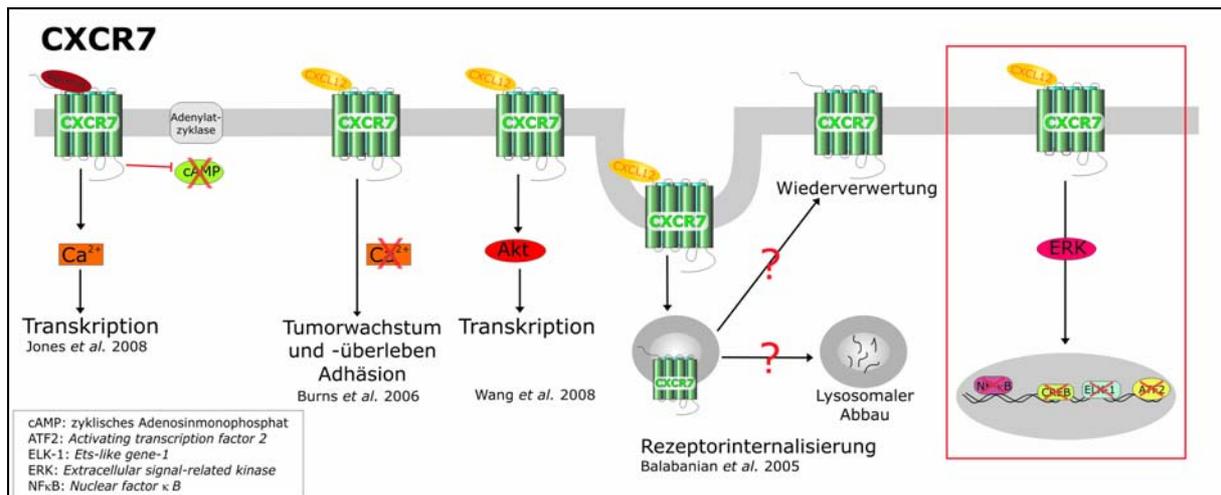


Abbildung 37: Mögliche Signaltransduktionskaskaden des Ligand-Rezeptor-Paares CXCL12 / CXCR7. Ergebnisse aus Balabanian *et al.* 2005, Burns *et al.* 2006, Jones *et al.* 2008, Wang *et al.* 2008 und eigene Ergebnisse (rot hervorgehoben).

Im Gegensatz zu den wenigen bisher publizierten Befunden zur Signaltransduktion von CXCR7 sind hinsichtlich der Signalkaskade, die das Chemokin CXCL12 über den länger bekannten Rezeptor CXCR4 auslöst, eine Reihe von Befunden in Zellen unterschiedlicher Herkunft erhoben worden (s. Abbildung 38). Zusammengefasst wurde eine Hemmung der Adenylatzyklase durch die G_{ai}-Untereinheit, eine intrazelluläre Kalziummobilisierung und die Aktivierung der Signalwege über die Kinasen Akt, ERK und p38 beobachtet, gefolgt von einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Kern. Der Rezeptor CXCR4 wurde anschließend internalisiert und nach Entfernung des Liganden entweder zurück an die Zelloberfläche gebracht oder lysosomal degradiert.

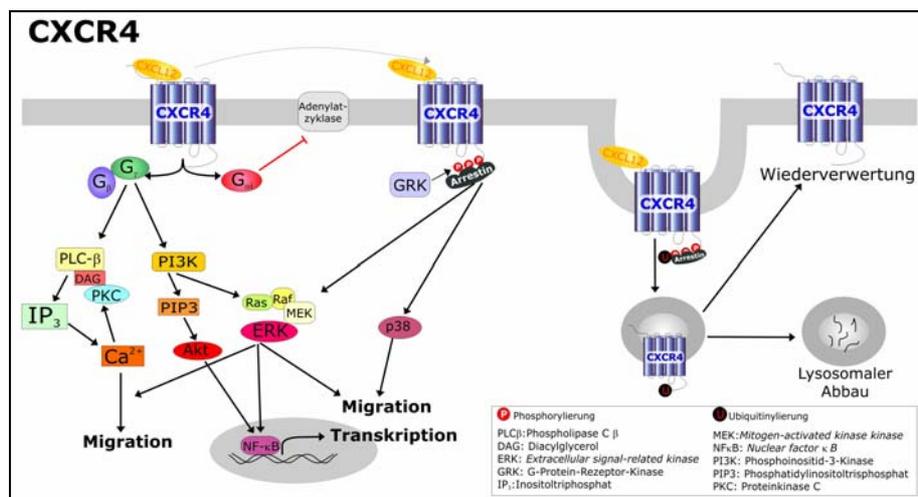


Abbildung 38: Signaltransduktionskaskaden des Liganden-Rezeptor-Paares CXCL12 / CXCR4. (Vereinfacht nach Bussilo & Benovic 2007).

Speziell wurden in glialen Tumorzellen die Mobilisierung intrazellulärer Kalziumionen (Yang *et al.* 2005), sowie die Aktivierung der Kinasen Akt (Zhou *et al.* 2002) und ERK1 / 2 (Barbero *et al.* 2003) beobachtet. Hinsichtlich der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wurde eine CXCL12-CXCR4 vermittelte Translokation von NF- κ B in den Zellkern in primären murinen Astrozyten beschrieben (Han *et al.* 2001). Eine über den alternativen CXCL12-Rezeptor vermittelte Aktivierung von ERK 1 / 2 wurde im Rahmen dieser Arbeit an einer Glioblastomzelllinie ebenfalls gezeigt, eine anschließende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Obwohl der Chemokinrezeptor CXCR7 also zunächst als nicht-signalleitender Rezeptor eingestuft worden war, scheint er zumindest in einigen humanen Zelllinien, wie embryonalen Nierenzellen, Prostatakarzinomzellen und Glioblastomzellen, eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen. Dies muss jedoch nicht in jedem Gewebe der Fall sein und ist möglicherweise mit Entwicklungs- oder pathologischen Prozessen assoziiert. Möglicherweise ergibt sich auch durch die Interaktion der beiden CXCL12-bindenden Rezeptoren eine Modulation der Rezeptorantwort. Die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 können sowohl Homo- als auch Heterodimere miteinander bilden (Luker *et al.* 2008), so könnte die Art und Stärke des durch CXCL12 ausgelösten Signals möglicherweise durch die Interaktion beider Rezeptoren beeinflusst werden. Diese Hypothese liefert weitere Ansatzpunkte zur Untersuchung der Funktion des Chemokinrezeptors CXCR7, insbesondere an Zellen, die sowohl CXCR4 als auch CXCR7 exprimieren.

4.5. Zelluläre Effekte der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Der Einfluss auf Migrationsprozesse von Leukozyten in Inflammationsprozessen war der erste zelluläre Effekt, der für Chemokine beschrieben wurde. Doch Chemokine können neben ihrem Einfluss auf die Migration und Metastasierung eine Reihe weiterer Effekte in der Tumorbiologie ausüben. So können sie beispielsweise autokrin oder parakrin als Wachstumsfaktoren das Tumorwachstum fördern, Metastasierungsprozesse steuern, die Neovaskularisierung und die Einwanderung von Stromazellen in den Tumor beeinflussen. Im Folgenden sollen die möglichen Effekte der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf Migration, Invasion, Proliferation und Überleben von Tumorzellen sowie die mögliche Wirkung auf Stromazellen durch Änderung der Genexpression von Matrixmetalloproteinasen und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation CXCR7-positiver Glioblastomzellen mit CXCL12 keine Verstärkung der Migration oder der Proliferation bewirkte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stimulation mit CXCL12 die Effekte der induzierten Apoptose vermindern konnte. Matrixmetalloproteinasen wurden nicht reguliert,

und obwohl eine leichte Steigerung der VEGF-Transkription beobachtet wurde, resultierte dies nicht in einer verstärkten Sekretion von VEGF in das Kulturmedium.

4.5.1 Chemokinvermittelte Effekte auf Migrationsprozesse

Die CXCR7-positive Glioblastomzelllinie A764 zeigte in den eigenen Untersuchungen grundsätzlich eine sehr geringe Migrationsfähigkeit. Dies betraf sowohl die ungerichtete Migration im Wundheilungstest als auch die gerichtete Migration in einer Chemotaxiskammer (Boyden-Kammer). Durch Stimulation mit dem Chemokin CXCL12 wurde die Migration in beiden Versuchsgestaltungen nicht verstärkt.

In publizierten Arbeiten wurden eine über CXCL12 und CXCR7 vermittelte chemotaktische Migration bisher nur in der Kolonkarzinomzelllinie CT26, nicht jedoch in Mamma-, Prostata- oder Lungenkarzinomzelllinien gezeigt (Meijer *et al.* 2008, Burns *et al.* 2006, Wang *et al.* 2008, Miao *et al.* 2007).

Der bisher bekannte Rezeptor für CXCL12, der Chemokinrezeptor CXCR4 hingegen vermittelt häufig Migration in unterschiedlichen Zelltypen. So wurde die Rolle des Chemokin-/Chemokinrezeptorpaars CXCL12 und CXCR4 bei der Entwicklung des Kleinhirns im Anatomischen Institut der Universität Kiel durch Prof. Dr. Karina Reiss untersucht (Reiss *et al.* 2002). Die Untersuchungen zeigten, dass CXCL12 und CXCR4 an der neuronalen Musterbildung im Kleinhirn während der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Die Wanderungsprozesse der Neurone werden in der entsprechenden Entwicklungsphase durch Regulation der Rezeptors CXCR4 gesteuert, wohingegen das Chemokin CXCL12 konstitutiv exprimiert wird.

Auch in verschiedenen Tumoren bewirken CXCL12 und CXCR4 eine verstärkte Zellmigration. So wurde gezeigt, dass CXCR4-exprimierende humane Mammakarzinomzellen *in vitro* stärker migrieren und *in vivo* häufiger Metastasen bilden können (Müller *et al.* 2001). Auch in Lungenkarzinomen (Su *et al.* 2005), in Melanomen (Murakami *et al.* 2002), Pankreaskarzinomen (Zhang *et al.* 2008, Matsuo *et al.* 2009) und Kolonkarzinomen (Kollmar *et al.* 2007) wurde ein Einfluss von CXCL12 und CXCR4 auf die Invasion und Metastasierung festgestellt. Für einige Tumoren wird die Überexpression von CXCR4 inzwischen als prognostisches Merkmal für einen besonders aggressiven Krankheitsverlauf diskutiert (Kolonkarzinom, Speetjens *et al.* 2008; Pankreaskarzinom, Maréchal *et al.* 2009).

In Hinblick auf Glioblastome ist der Einfluss von Chemokinen auf die Migration nicht im Kontext einer möglichen Metastasierung zu betrachten, da Glioblastome in der Regel keine Metastasen außerhalb des ZNS bilden. Entscheidender ist hier die Infiltration und Mikrosatellitenbildung von Tumorzellen in benachbarten Hirnarealen. Dieses infiltrative Wachstum führt zu einem dazu, dass der Tumor rasch in umliegendes Gewebe eindringt.

Außerdem verbleiben nach einer Resektion häufig Tumorzellen in makroskopisch unauffälligem Gewebe und können so Rezidive ausbilden.

Über Glioblastome wurde zunächst eine CXCL12-CXCR4-vermittelte Einwanderung von adulten neuralen Stammzellen in den Tumor berichtet. (Aboody *et al.* 2001, Ehtesham *et al.* 2004). Auf Glioblastomstammzellen wirkt CXCL12 über den Rezeptor CXCR4 ebenfalls in Form einer Steigerung der migratorischen Kapazität und darüber hinaus als proliferationsfördernder Reiz *in vitro* (Ehtesham *et al.* 2009). Hiermit wird vermutlich eine Progression des Tumors gefördert, indem die Zahl hoch-proliferativer und migratorisch aktiver Glioblastomstammzellen erhöht und ihre Invasion in das umliegende Gewebe gefördert wird. Auch wird in Glioblastomen die Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 als Merkmal für eine hohe Rezidivrate und eine schlechte Überlebensprognose diskutiert (Bian *et al.* 2007, Ehtesham *et al.* 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass stärker differenzierte Glioblastomzellen kaum den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren, stattdessen jedoch eine hohe Expression von CXCR7 aufweisen. Diese stärker differenzierten Tumorzellen wurden entweder durch Stimulation mit 10% FKS aus Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter erhalten oder als etablierte Glioblastomzelllinien in Medium mit 10% FKS kultiviert.

Insgesamt stärken diese Ergebnisse die These, dass CXCR4-positive Glioblastomzellen mit Stammzellcharakteristika ein höheres Potential zur Migration und Invasion in umliegendes Gewebe besitzen und somit zur Tumورprogression beitragen, während die reiferen, stärker differenzierten Glioblastomzellen weniger invasiv zu sein scheinen.

4.5.2 Chemokinvermittelte Effekte auf Proliferation und Überleben

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Untersuchung der CXCL12 / CXCR7-vermittelten Effekte auf die Proliferation und das Überleben von Glioblastomzellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Folgenden mit den bisher in der Literatur bekannten Daten zu CXCR7- und CXCR4-vermittelten Effekten gegenübergestellt werden.

In eigenen Experimenten zeigten CXCR7-exprimierende Glioblastomzellen unter serumarmen Kulturbedingungen innerhalb von 24 Stunden eine geringfügige Proliferation. Diese wurde durch Stimulation mit CXCL12 nicht gesteigert.

Durch den Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin hervorgerufene Apoptoseprozesse konnten jedoch durch CXCL12 deutlich reduziert werden. Die Stimulation mit Camptothecin löste eine Fragmentierung der DNA und der Poly (ADP-Ribose)-Polymerase aus, die jeweils durch gleichzeitige Stimulation mit CXCL12 abgemildert wurde. Eine Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 durch Camptothecin konnte hingegen nicht beobachtet werden. Dieses Phänomen einer caspase-unabhängigen Apoptose wurde für Gliomzellen bereits in einigen

Fällen beschrieben (z.B. Wischhusen *et al.* 2003, Cho *et al.* 2006).

Die caspase-unabhängige Apoptose wurde zuerst in peripheren humanen T-Lymphozyten (Dumont *et al.* 2000) und in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Susin *et al.* 2000) untersucht. Hierbei wird ein mitochondrialer apoptose-induzierender Faktor (AIF, *Apoptosis-inducing factor*) freigesetzt, der mittels einer spezifischen Domäne an die DNA bindet und vermutlich durch die Rekrutierung von Nukleasen die Apoptose einleitet (Dumont *et al.* 2000, Susin *et al.* 2000, Bras *et al.* 2005). Eine Aktivierung der Caspasen wird erst sehr spät im Apoptoseprozess oder gar nicht beobachtet. Möglicherweise wird eine solche caspase-unabhängige Apoptose auch durch Camptothecin in A764-Glioblastomzellen ausgelöst, sodass eine proteolytische Aktivierung der Caspasen nicht zu beobachten ist.

In der Literatur wurde eine vergleichbare protektive Wirkung von CXCL12 / CXCR7 auch in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 beschrieben. Durch Stimulation mit CXCL12 konnte das Absterben dieser CXCR7-positiven Zellen unter serumarmen vermindert werden (Burns *et al.* 2006). In Pankreaskarzinomzellen konnte sogar ein proliferationsfördernder Effekt durch CXCR7 *in vitro* beobachtet werden (Meijer *et al.* 2008). Andere Untersuchungen belegen, dass CXCR7-überexprimierende Tumorzellen ein verstärktes Tumorstadium *in vivo* zeigen (Burns *et al.* 2006, Miao *et al.* 2007). Die untersuchten Zelllinien zeigten jedoch kein gesteigertes Zellwachstum bei Stimulation mit CXCL12 *in vitro*. Dies deutet darauf hin, dass auch in diesem Fall zunächst ein besseres Überleben der CXCR7-exprimierenden Zellen den Wachstumsvorteil bietet.

Auch der länger bekannte Rezeptor für CXCL12, CXCR4, kann proliferative Effekte in Tumoren vermitteln. Dies wurde zum Beispiel für Prostatakarzinomzellen (Sun *et al.* 2003), Leberkarzinomzellen (Sutton *et al.* 2007) und leukämische B-Zellprogenitoren (Juarez *et al.* 2007) sowie einige intrakranielle Tumoren wie Neuroblastome (Meier *et al.* 2007), Meningiome (Barbieri *et al.* 2006) und Hypophysenadenome (Barbieri *et al.* 2008) beschrieben. In CXCR4-exprimierenden Glioblastomzelllinien wurde hingegen kein proliferationsfördernder Effekt durch CXCL12-Stimulation beobachtet, jedoch konnte diese Stimulation das Absterben der Zellen unter serumarmen Bedingungen verringern (Zhou *et al.* 2002). Dieser Effekt ist möglicherweise vergleichbar mit der in dieser Arbeit beobachteten protektiven Wirkung von CXCL12-CXCR7 nach Einleitung der Apoptose.

In Glioblastomstammzellen und adulten neuralen Stammzellen wurde ebenfalls eine Steigerung der Proliferation durch Stimulation mit CXCL12 erzielt (Ehtesham *et al.* 2009, Aboody *et al.* 2001). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde *in situ* die Expression von CXCL12 in Pseudopalisadenzellen und Mikrogefäßen von Glioblastomen beobachtet, die das histologische Korrelat für ein invasives Wachstum in umliegende Hirnareale darstellen (Komatani *et al.* 2009). Zudem fördert CXCL12 / CXCR4 im gesunden Organismus das Überleben von postmitotischen Neuronen des Rattenkortex durch eine

gesteigerte Aktivität des als transkriptioneller Repressor fungierenden Rb-Proteins (Khan *et al.* 2008). Im Gegensatz hierzu wurde in humanen Kolorektalkarzinomzellen beschrieben, dass endogenes CXCL12 Apoptose auslöst und Metastasierungsprozesse inhibiert (Wendt *et al.* 2008).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass CXCL12 über seinen Rezeptor CXCR4 in verschiedenen Arten von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* eine vermehrte Proliferation bewirken kann. Auch in Glioblastomstammzellen und adulten neuronalen Stammzellen wird ein proliferationsfördernder Effekt über CXCR4 beschrieben (Aboody *et al.* 2001, Ehtesham *et al.* 2004, 2006, 2009). In reifen Glioblastomzellen vermittelt CXCL12 sowohl über den Rezeptor CXCR4 als auch über den Rezeptor CXCR7 vor allem anti-apoptotische Signale. Dieser Effekt könnte möglicherweise zu der bei Glioblastomen häufig beobachteten Resistenz gegenüber zytotoxischen Agentien beitragen, die die Therapieerfolge drastisch beeinflusst. Anhand einer retrospektiven Studie zur Expression von CXCR7 und dem Chemotherapieerfolg von Patienten, die an einem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom erkrankt worden waren, wurde CXCR7 kürzlich auch als prognostischer Faktor für die Chemotherapieresistenz vorgeschlagen (Goldmann *et al.* 2008). In der Zukunft könnte untersucht werden, inwieweit diese *in vitro* beobachtete protektive Wirkung der CXCL12-CXCR7-Signalachse auch für in der Anwendung befindliche Zytostatika eine Rolle spielt und welche Optionen zur Modulation dieses Effektes (z.B. durch CXCR7-Antagonisten) zur Verfügung stehen. Zudem machen diese Ergebnisse deutlich, dass es sich bei CXCR7 um einen signalleitenden Rezeptor handelt, der durch Interaktion mit seinem Liganden CXCL12 apoptotische Prozesse abmildern kann.

4.5.3 Beeinflussung von Stromazellen durch chemokinvermittelte Genexpressionsmodulation

Chemokine und ihre Rezeptoren können auch die zelluläre Zusammensetzung von Tumoren beeinflussen. So können sie auf der einen Seite direkt als chemotaktische oder proliferationsfördernde Reize auf Stromazellen wirken (z.B. Makrophagen, Endothelzellen wirken), aber auch indirekt, indem sie die Genexpression der Tumorzellen so beeinflussen, dass Proteasen oder Wachstumsfaktoren gebildet werden, die die Einwanderung und Proliferation der Stromazellen beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch für diese indirekte Wirkung der CXCL12/CXCR7-Signalachse auf Stromazellen die Änderung der Transkription verschiedener Matrixmetalloproteinasen und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF durch Stimulation von A764-Glioblastomzellen mit CXCL12 untersucht.

Modulation der Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die allgemein in der Lage sind, Proteine der Extrazellulärmatrix zu zersetzen. Daher spielen sie eine wichtige Rolle bei Umstrukturierungen des Gewebes, wie beispielsweise Entwicklungsprozessen, Angiogenese und Heilungsprozessen. In vielen Tumorentitäten sind Matrixmetalloproteinasen überexprimiert und vermitteln zum einen eine gesteigerte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen, aber auch andererseits die Durchdringung des Tumorgewebes mit Tumorinfiltrierenden Stromazellen. In humanen Glioblastomen wurde eine Regulation der Matrixmetalloproteinasen beispielsweise durch TGF β 1 beschrieben (Wick *et al.* 2001).

In eigenen Experimenten mit der humanen A764-Glioblastomzellen zeigte sich keine oder nur sehr geringe Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP1 (interstitielle Gelatinase), MMP9 (Gelatinase B) und MMP13 (Kollagenase 3). Die Proteinase MMP2 (Gelatinase A) und MMP14 (MT1-MMP) wurden mittelstark exprimiert, durch Stimulation mit CXCL12 wurden diese Matrixmetalloproteinasen nicht signifikant reguliert. Die Expression der untersuchten Matrixmetalloproteinasen wurde also auf transkriptioneller Ebene nicht durch CXCL12 / CXCR7 beeinflusst.

In humanen Chondrozytenkulturen aus gesundem und osteoarthritischem Knorpel wurden hingegen signifikante Zunahmen der Expression von MMP1, MMP2, MMP3 und MMP13 über RDC1 / CXCR7-vermittelte Signaltransduktion nachgewiesen (Jones *et al.* 2006). Da zum Zeitpunkt der Veröffentlichung das Chemokin CXCL12 noch nicht als natürlicher Ligand des Rezeptors RDC1 / CXCR7 bekannt war, wurden die Stimulationsexperimente mit dem synthetischen Liganden C5 (*Compound 5*) durchgeführt. Daher bleibt unklar, ob die durch CXCR7-vermittelte Expressionssteigerung der Matrixmetalloproteinase 2 zellspezifisch in Chondrozyten, nicht aber in Glioblastomzellen stattfindet, oder ob durch den synthetischen Liganden eine andere Zellantwort ausgelöst wird als durch den natürlichen Liganden CXCL12.

In murinen Astrozyten wurde im Zuge der Glianarbenbildung eine CXCL12-CXCR4-vermittelte Überexpression der Proteasen MMP2 und MMP9 festgestellt (Okamoto *et al.* 2005), während die Stimulation von Gliomzellen mit CXCL12 eine Steigerung der Expression von MT2-MMP (MMP15) zur Folge hatte (Zhang *et al.* 2005). Auch in anderen Tumorzellen wurde eine CXCL12-CXCR4 vermittelte Expressionssteigerung festgestellt, so unter anderem auch von MMP2 und MMP9 in Ovarialkarzinomen (Yuecheng *et al.* 2007), von MMP13 in humanen Basalkarzinomzellen (Chu *et al.* 2007) und von MMP14 (MT1-MMP) in Melanomzellen (Bartolomé *et al.* 2004).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die mögliche Regulation unterschiedlicher Matrixmetalloproteinasen durch CXCL12 sowohl vom jeweils vorhandenen Rezeptor, also CXCR4 oder CXCR7, als auch vom Zelltyp abhängig sein könnte.

Modulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF ist sowohl in gesunden als auch in pathologisch verändertem Gewebe der wesentliche Faktor, der Erhalt und Neubildung von Gefäßen unterstützt (Leung *et al.* 1989, Keck *et al.* 1989). Auch in glialen Tumoren, die mit zunehmender Malignität eine starke Vaskularisierung aufweisen, wird die Angiogenese durch VEGF vermittelt (Plate *et al.* 1992). Die Expression von VEGF kann *in vivo* und *in vitro* durch verschiedene Einflüsse wie Hypoxie, Zytokine (z.B. IL-1 β) und Wachstumsfaktoren (TGF β , EGF, PDGF-BB *platelet-derived growth factor* β) gesteigert werden (Machein & Plate 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Dabei wurde eine leichte Steigerung der VEGF-Transkription infolge der Stimulation mit CXCL12 beobachtet, die sich auf Proteinebene jedoch nicht bestätigte. Offenbar findet also eine CXCR7-vermittelte Steigerung der VEGF-Expression mit nachfolgender Wirkung auf die Neovaskularisierung in Glioblastomen nicht statt.

Das Chemokin CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 werden hingegen in Regionen der Neovaskularisierung in humanen Glioblastomen gefunden (Rempel *et al.* 2000), fördern das Überleben von humanen Endothelzellen in Primärkulturen (Salmaggi *et al.* 2004) und fördern in CXCR4-positiven Glioblastomzelllinien die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (Yang *et al.* 2005).

Bisher wurde nicht beschrieben, dass über den Chemokinrezeptor CXCR7 eine Steigerung der VEGF-Expression *in vitro* oder gesteigerte Tumovaskularisierung *in vivo* ausgelöst wurde. Während der Embryonalentwicklung muss über CXCR7 jedoch ein Einfluss auf Endothelzellen ausgeübt werden, da CXCR7-defiziente Mäuse vielfältige Fehlentwicklungen des Herzens und der herznahen Gefäße aufweisen, die sich bei 95% der Tiere innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt letal auswirken (Sierra *et al.* 2007). Ähnliche Defekte sind auch in CXCR4- und CXCL12-defizienten Mäusen zu beobachten, diese zeigen jedoch zusätzlich massive Störungen der Hirnentwicklung und Bildung und Reifung von Immunzellen, sowie der Vaskularisierung des Gastrointestinaltraktes (Ma *et al.* 1998).

Diese Befunde deuten an, dass entweder CXCR4 ein Fehlen des Rezeptors CXCR7 kompensieren kann, oder dass der Rezeptor CXCR7 in der Gewebeentwicklung – mit Ausnahme des Herzens – eine untergeordnete Rolle spielt und erst in adulten Zellen oder unter pathologischen Bedingungen funktionelle Effekte erfüllt.

Eine CXCL12-vermittelte Regulation der Angiogenese in Gliomen durch Modulation der VEGF-Expression erfolgt also vornehmlich über den Rezeptor CXCR4.

Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass der kürzlich identifizierte alternative Rezeptor für CXCL12, der Chemokinrezeptor CXCR7, in humanen Astrozytomen höherer Malignitätsgrade und Glioblastomen signifikant höher exprimiert wird

als in nicht-neoplastischem Hirngewebe. Während der länger bekannte Rezeptor CXCR4 auf einer kleinen Subpopulation von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter exprimiert wurde, trug ein Großteil der stärker differenzierten Glioblastomzellen den Rezeptor CXCR7. Durch Ausdifferenzierung von stammzellartigen Glioblastomzellen *in vitro* konnte die CXCR4-Expression reduziert und die CXCR7-Expression gesteigert werden. In einer Glioblastomzelllinie mit hohem Differenzierungsstatus hingegen blieb die Expression von CXCR7 in Gegenwart biologischer Signalmoleküle wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder den eigenen Liganden, und auch unter hypoxischen Bedingungen konstant. Durch Stimulation mit CXCL12 wurde in dieser CXCR7-positiven Glioblastomzelllinie eine Aktivierung der Kinasen ERK 1 / 2 ausgelöst. Die Aktivierung der CXCL12-CXCR7-Signalachse hatte keinen Einfluss auf Migration oder Proliferation, konnte aber die Fragmentierungsprozesse der Camptothecin-induzierten Apoptose reduzieren, was möglicherweise auch im Zusammenhang mit der höheren Malignität steht.

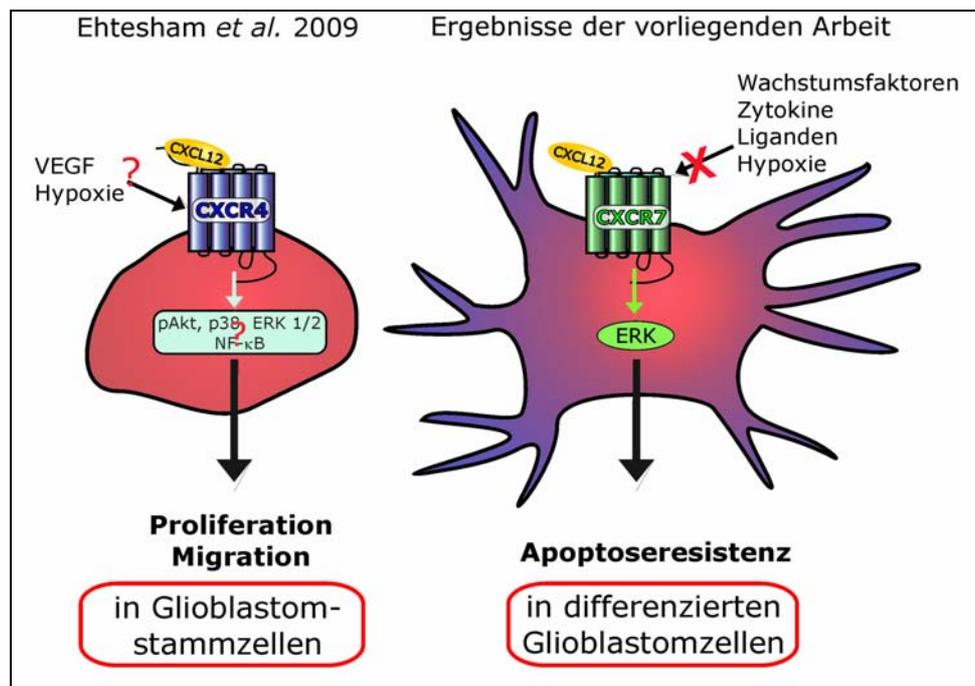


Abbildung 39: CXCL12-vermittelte Effekte an CXCR4-exprimierenden Glioblastomstammzellen und CXCR7-exprimierenden differenzierten Glioblastomzellen. (Nach Ehtesham *et al.* 2009 und den Befunden der vorliegenden Arbeit)

Zusammengefasst vermittelt CXCL12 an CXCR4-exprimierenden Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter Proliferation und Migration und fördert so die Progression des Glioblastoms, während CXCL12 an CXCR7-exprimierenden, stärker differenzierten Glioblastomzellen eine Apoptoseresistenz bewirkt, die möglicherweise zur hohen Chemotherapieresistenz und schlechten Prognose von Glioblastomen beiträgt.

5. Zusammenfassung

Das Chemokin CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 spielen eine wesentliche Rolle bei der Invasion, Proliferation und Metastasierung von Tumoren. Kürzlich wurde CXCR7 als neuer, alternativer Rezeptor für CXCL12 und mit geringerer Affinität für CXCL11 identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen dieser beiden Rezeptoren und ihrer Liganden in humanen Astrozytomen und Glioblastomen und insbesondere die funktionelle Bedeutung von CXCR7 untersucht. *In situ* wurde CXCR7 auf tumor-assoziierten Endothel- und Mikrogliazellen und vor allem auf einem Großteil der Glioblastomzellen exprimiert. Die Expression von CXCR4 hingegen ist neben Endothel- und Mikrogliazellen auf eine kleine Subpopulation von Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter beschränkt. CXCL12 ist häufig kolokalisiert mit CXCR7 oder CXCR4, was darauf hindeutet, dass der Ligand an seine Rezeptoren gebunden vorliegt. In Homogenaten von soliden Astrozytomen wurde ein Anstieg der CXCR7-Transkription mit steigender Malignität festgestellt. *In vitro* wurde CXCR7 in allen untersuchten Glioblastomzelllinien auf hohem Niveau exprimiert, während CXCR4 nur in einer von acht Glioblastomzelllinien in geringem Maß detektiert wurde. Eine Glioblastomzelllinie mit Stammzellcharakter, die unter speziellen Stammzellkultivierungsbedingungen generiert worden war, hingegen exprimierte vor allem CXCR4. Bei seruminduzierter Differenzierung wurde die CXCR4-Expression geringer, während die Expression von CXCR7 drastisch zunahm.

In einer konventionellen Glioblastomzelllinie wurde die Expression von CXCR7 weder durch Zytokine und Wachstumsfaktoren noch durch Hypoxie reguliert, wohingegen eine Modulation der CXCR4-Expression unter diesen Bedingungen bekannt ist.

Durch Stimulation von CXCR7-positiven, CXCR4-negativen Glioblastomzellen mit CXCL12 wurde eine transiente Phosphorylierung der Kinasen ERK 1 / 2 (*extracellular signal-related kinases*) hervorgerufen, die andeutet, dass dieser Rezeptor funktionell aktiv ist. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ELK-1, ATF2, CREB oder NF- κ B wurde jedoch nicht beobachtet.

Während die Proliferation und Migration von Glioblastomzellen nicht beeinflusst wurden, schützte die Stimulation mit CXCL12 diese Zellen vor einer Camptothecin-induzierten Apoptose.

Daher ist auf differenzierten Glioblastomzellen CXCR7, nicht jedoch CXCR4, der vorherrschende Rezeptor für CXCL12 und vermittelt Apoptoseresistenz.

6. Summary

The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 play a major role in tumor invasion, proliferation and metastasis. Recently, the former orphan receptor CXCR7 was identified as a novel, alternate receptor for CXCL12 and with less affinity for CXCL11. Within the scope of this work, expression of both receptors and their ligands in human astrocytomas and glioblastomas were investigated focussing especially on the function of CXCR7. *In situ*, CXCR7 is highly expressed on tumor-associated endothelial and microglia cells and particularly on the bulk of glioblastoma cells. In contrast, CXCR4 expression is alongside with endothelial and microglial cells restricted to a small subpopulation of glioblastoma cells showing stem cell characteristics. CXCL12 is often co-localized with CXCR7 or CXCR4 indicating that the ligand is bound to its receptors. CXCR7-transcription in homogenates of solid astrocytomas increased with malignancy. *In vitro*, CXCR7 was highly expressed in all glioblastoma cell lines investigated whereas CXCR4 was only scarcely transcribed on 1 of 8 lines. However, a glioblastoma stem-like cell line established under special stem cell conditions preferentially expressed CXCR4. Upon serum-induced differentiation CXCR4 expression diminished whereas CXCR7 rose drastically.

In a conventional glioblastoma cells CXCR7 expression was modulated neither by cytokines or growth factors nor by hypoxia, in contrast to known up-regulation of CXCR4 under these conditions.

Stimulation of CXCR7-positive and CXCR4-negative glioblastoma cells by CXCL12 induced transient phosphorylation of extracellular-signal regulated kinases Erk1 / 2 indicating that the receptor is functionally active. However, no activation of the transcription factors ELK-1, ATF2, CREB and NF- κ B was observed.

Whereas proliferation and migration of glioblastoma cells were not influenced, CXCL12 stimulation prevented Camptothecin-induced apoptosis. Thus, CXCR7 and not CXCR4 is the major receptor for CXCL12 on mature glioblastoma cells and mediates resistance to apoptosis.

7. Literaturverzeichnis

- Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12846-51. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 777.
- Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM (2004) Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumour cells results in increased tumour necrosis. *BMC Cancer* 4, 28.
- Adler MW, Rogers TJ (2005) Are chemokines the third major system in the brain? *J Leuk Biol* 78, 1204-1209.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007) Chemokine: receptor structure, interactions and antagonisms. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3983-3988.
- Ambrosini E, Aloisi F (2004) Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 29, 1017-1038.
- Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E (1997) Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-proteincoupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* 385, 347-350.
- Asensio VC, Campbell IL (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* 22, 504-512.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
- Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250, 91-104.
- Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G (2001) Stromal cell-derived factor-1 α induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 77, 1226-1236.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The Chemokine SDF-1 / CXCL12 binds and signals through the orphan receptor RDC1 in T-Lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.
- Balkwill F (2003) Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol* 15, 49-55.
- Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio T, Schettini G (2003) Stromal cell-derived factor 1 α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* 63, 1969-1974.

- Barbieri F, Bajetto A, Stumm R, Pattarozzi A, Porcile C, Zona G, Dorcaratto A, Ravetti JL, Minuto F, Spaziante R, Schettini G, Ferone D, Florio T (2008) Overexpression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 induces autocrine/paracrine cell proliferation in human pituitary adenomas. *Clin Cancer Res* 14, 5022-5032
- Barbieri F, Bajetto A, Porcile C, Pattarozzi A, Massa A, Lunardi G, Zona G, Dorcaratto A, Ravetti JL, Spaziante R, Schettini G, Florio T (2006) CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1090, 332-343.
- Bartolomé RA, Gálvez BG, Longo N, Baleux F, Van Muijen GN, Sánchez-Mateos P, Arroyo AG, Teixidó J (2004) Stromal cell-derived factor-1 α promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 64, 2534-2543.
- Bauer S (2009) Cytokine control of adult neural stem cells: chronic versus acute exposure. *Ann NY Acad Sci* 1153, 48-56.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Boghdahn U, Beier CP (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67, 4010-4015.
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8.
- Berger EA (1997) HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 11 (Suppl. A), S3-16.
- Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G, Martinelli G (2002) CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 62, 3106-3112.
- Bian XW, Yang SX, Chen JH, Ping YF, Zhou XD, Wang QL, Jiang XF, Gong W, Xiao HL, Du LL, Chen ZQ, Zhao W, Shi JQ, Wang JM (2007) Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery* 61, 570-578.
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ (2005) Opinion: the origin of cancer stem cells: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 5, 899-904.
- Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST (2005) CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 310, 117-130.
- Brandner S, Jacques TS, Naumann H, Swales A, Alvarez-Buylla A (2008) Brain tumours can arise from stem / progenitor cells in the adult brain through activation of oncogenic

- pathways: evidence for pathway-specific tumour phenotype. *Brain Tumor* 2008, Abstract-Band, S. 9.
- Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)* 70, 231-239.
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7, 122-133.
- Broxmeyer HE, Kim CH (1999) Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 27, 1113-1123.
- Bruce WR, Van Der Gaag H (1971) A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 199, 79-80.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203, 2201-2213.
- Bussilo JM, Benovic JL (2007) Regulation of CXCR4 signalling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 952-963.
- Calderon TM, Eugenin LA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, Berman JW (2006) A role for CXCL12 (SDF-1 α) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 177, 27-39.
- Campbell JJ, Pan J, Butcher EC (1999) Cutting edge: developmental switches in chemokine response during T cell maturation. *J Immunol* 163, 2353-2357.
- Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, Smith DM (2000) CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissue. *Br J Pharmacol* 130, 189-195.
- Cho WH, Choi CH, Park JY, Kang SK, Kim YK (2006) 15-deoxy-(Δ 12,14)-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) induces cell death through caspase-independent mechanism in A172 human glioma cells. *Neurochem Res* 31, 1247-1254.
- Chu CY, Cha ST, Chang CC, Hsiao CH, Tan CH, Lu YC, Jee SH, Kuo ML (2007) Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-derived factor 1 α -directed invasion of human basal cell carcinoma cell. *Oncogene* 26, 2491-2051.
- Clarke MF (2004) At the root of brain cancer. *Nature* 432, 281-282.
- Clément V, Dutoit V, Marino D, Dietrich PY, Radovanovic I (2009) Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer*, Epub ahead of print.

- Cocchi D, DeVico AL, Garzio-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ cells. *Science* 270, 1811-1815.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946–10951.
- Cook JS, Wolsing DH, Lamah J, Olsen CA, Corea PE, Sadee W, Blumenthal EM, Rosenbaum JS (1992) Characterization of the RDC1 gene which encodes the canine homolog of a proposed human VIP receptor. Expression does not correlate with an increase in VIP binding sites. *FEBS Lett* 300, 149-152.
- Dambly-Chaudiere C, Cubedo N, Ghysen A (2007) Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol* 7:23.
- Damert A, Ikeda E, Risau W (1997) Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* 327, 419-423.
- Demeule M, Shedid D, Beaulieu E, Del Maestro RF, Moghrabi A, Ghosn PB, Moumdjian R, Berthelet F, Béliveau R (2001) Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *Int J Cancer* 93, 62–66.
- Desbaillets I, Tada M, de Tribolet N, Diserens AC, Hamou MF, Van Meir EG (1994) Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 58, 240-247.
- Devalaraja MN, Richmond A (1999) Multiple chemotactic factors: Fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 20, 151–56.
- Dhawan P, Richmond A (2002) Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* 72, 9-18.
- Dumont C, Dürrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kroemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A (2000) Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood lymphocyte: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* 96, 1030-1038.
- Ehteshami M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC (2009) CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett* 274, 305-312.
- Ehteshami M, Stevenson CB, Thompson RC (2008) Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery* 63, E820.
- Ehteshami M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC (2006) CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* 25, 2801-2806

- Ehtesham M, Yuan X, Kabos P, Chung NHC, Liu G, Akasaki Y, Black KL, Yu JS (2004) Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* 6, 287-293.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 15, 793-797.
- Feng L (2000) Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res* 21, 203-210.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger E (1996) HIV-1 entry co-factor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Frederiksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome from five main families: phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- Furth J, Kahn M (1937) The transmission of leukaemia of mice with a single cell. *Am J Cancer* 31, 276-282.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic- stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011-7021
- Gao JL, Murphy PM (1994) Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *J Biol Chem* 269, 28539-28542.
- Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA (2008) Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis* 46, 235-45.
- Goldmann T, Dromann D, Radtke J, Marwitz S, Lang DS, Schultz H, Vollmer E (2008) CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissue; possible regulation upon chemotherapy. *Virchows Arch* 452, 347-348.
- Gräber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW (2002) Microglia in brain tumors. *Glia* 40, 252-259.
- Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Gillespie GY (2008) CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PloS one* 3, e3655
- Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Mordrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K (2008) Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria *Oncogene* 27, 2897-2909.

- Hachicha M, Rathanaswami P, Naccach PH, McColl SR (1998) Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J Immunol* 160, 449-454.
- Hamburger AW, Salmon SE (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.
- Han Y, He T, Huang D, Pardo CA, Ransohoff RM (2001) TNF- α mediates SDF-1 α -induced NF- κ B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest* 108, 425-435.
- Hattermann K, Ludwig A, Gieselmann V, Held-Feindt J, Mentlein R (2008a) The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6. *Mol Cell Neurosci* 39, 133-141.
- Hattermann K, Mehdorn HM, Mentlein R, Schultka S, Held-Feindt J (2008b) A methylation-specific and SYBR®-Green-based quantitative PCR for MGMT promoter methylation analysis. *Anal Biochem* 377, 62-71.
- Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R (2004) Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine DNA methyltransferase promoter treated with temozolamide. *Clin Cancer Res* 10, 1871-1874.
- Hedrick 1997 (Lymphozyten und Chemokine)
- Held-Feindt J, Rehmke B, Mentlein R, Hattermann K, Knerlich F, Hugo HH, Ludwig A, Mehdorn HM (2008) Overexpression of CXCL16 and its receptor CXCR6 / Bonzo promotes growth of human schwannomas. *Glia* 56, 764-774.
- Hoagaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhilber ML, Likacs NW, Colletti LM, Simpson KJ, Strieter RM, Kinkel SL (1999) Novel CXCR2-dependent liver regeneration qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB J* 13, 1565-1574.
- Honeth G, Staflin K, Kalliomäki S, Lindvall M, Kjellman C (2006) Chemokine-directed migration of tumor-inhibitory neural progenitor cells towards an intracranially growing glioma. *Exp Cell Res* 312, 1265-1276.
- Horuk R, Chitnis C, Darbonne W, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH (1993) The erythrocyte chemokine receptor is a receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 261, 1182-1184.
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.
- Infantino S, Moepps B, Thelen M (2006) Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol* 176, 2197-2207.

- Jennings MT, Maciunas RJ, Carver R, Bascom CC, Juneau P, Misulis K, Moses HL (1991) TGF beta 1 and TGF beta 2 are potential growth regulators for low-grade and malignant gliomas in vitro: evidence in support of an autocrine hypothesis. *Int J Cancer* 49, 129-139.
- Jones SW, Brockbank SM, Mobbs ML, Le Good NJ, Soma-Haddock S, Heuze AJ, Langham CJ, Timms D, Newham P, Needham MR (2006) The orphan G-protein coupled receptor RDC1: evidence for a role in chondrocyte hypertrophy and articular cartilage matrix turnover. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 597-608.
- Joost P, Methner A (2002) Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol* 3, RESEARCH0063.
- Juarez J, Baraz R, Gaundar S, Bradstock K, Bendall L (2007) Interaction of interleukin-7 and interleukin-3 with the CXCL12-induced proliferation of B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 92, 450-459.
- Kakinuma T, Hwang ST (2006) Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leuk Biol* 79, 639-651.
- Kang H, Mansel RE, Jiang WG (2005) Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol* 26, 1429-1434.
- Kapas S, Clark AJ (1995) Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 832-838.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaspada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokines. *Science* 266, 1395-1399.
- Khan MZ, Brandimarti R, Shimizu S, Nicolai J, Crowe E, Meucci O (2008) The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. *Cell Death Diff* 15, 1663-1672.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumours of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 215-225.
- Knaut H, Schier AF (2008) Clearing the path for germ cells. *Cell* 132, 337-339.
- Knerlich-Lukoschus F, Juraschek M, Blömer U, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008) Force-Dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2 /

- CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *J Neurotrauma* 25, 427-448.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798–1801.
- Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007) Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 9, 862-870.
- Komatani H, Sugita Y, Arakawa F, Ohshima K, Shigemori M (2009) Expression of CXCL12 on pseudopalisading cells and proliferating microvessels in glioblastomas: an accelerated growth factor in glioblastomas. *Int J Oncol* 34, 665-672.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M (2000) Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 6, 3530-3535.
- Law NM, Rosenzweig SA (1994) Characterization of the G-protein linked orphan receptor GPRN1/RDC1. *Biophys Biochem Res Commun* 201, 458-465.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Liang Y, Bollen AW, Gupta N (2008) CC chemokine receptor CCR2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol* 86, 153-163.
- Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G (1989) Selective amplification and cloning of four members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 244, 569-572.
- Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dumont JE, Vassart G (1990) Complete nucleotide sequence of a putative Gprotein coupled receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res* 18, 1917.
- Locati M, Murphy PM (1999) Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 50, 425-440.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97-109.

- Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M (1997) Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 151, 1105-1113.
- Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Brodway N, Held-Feindt J, Mentlein R (2005) Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *J Neurochem* 93, 1293-1303.
- Luker KE, Gupta M, Luker GD (2008) Imaging CXCR4 signaling with firefly luciferase complementation. *Anal Chem* 80, 5565-5573.
- Luster AD (1998) Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9448-9453.
- Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. (2008) Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 86, 31-45.
- Machain MR, Plate KH (2000) VEGF in brain tumors. *J Neuro-Oncol* 50, 109-120.
- Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol.Today* 20, 254–57.
- Maréchal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, Closset J, Devière J, Salmon I, Van Laethem JL (2009) High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*, Epub ahead of print.
- Martinez A, Kapas S, Miller MJ, Ward Y, Cuttitta (2000) Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic β -cells. *Endocrinology* 141, 406-411.
- Mason WP, Cairncross JG (2005) Drug insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma – impact of a recent trial. *Nat Clin Pract Neurol*, 88-95.
- Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Tong Z, Guha S (2009) CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 124, 853-861.
- Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Black PM, Antoniades HN (1990) Coexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance. *J Clin Invest* 86, 131-140.

- Mazzeinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Gesualdo L, Rotondi M, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P (2008) Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med* 205, 479-490.
- Meier R, Mühlethaler-Mottet A, Flahaut M, Coulon A, Fusco C, Louache F, Auderset K, Bourlout KB, Daudigeos E, Ruegg C, Vassal G, Gross N, Joseph JM (2007) The chemokine receptor CXCR4 strongly promotes neuroblastoma primary tumour and metastatic growth, but not invasion. *PLoS ONE* 2, e1016.
- Meijer J, Ogink J, Roos E (2008) Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Brit J Canc* 99, 1493-1501.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TC (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15735-15740.
- Moser B (2003) Chemokines: role in immune cell traffic. *Eur Cytokine Netw* 14, 204–10
- Moser B, Willmann K (2004) Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63(Suppl. 2), ii84–89.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST (2002) Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 62, 7328-7334.
- Murdoch C, Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043.
- Murphy M, Reid K, Ford M, Furness JB, Bartlett PF (1994) FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 120, 3519-3528.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176.
- Nagata S, Ishihara T, Rebberecht P, Libert F, Parmentier M, Christophe J, Vassart G (1992) RDC1 may not be VIP receptor. *Trends Biochem Sci* 13, 102-103.
- Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A (2005) Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 637–658.

- O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ (2008) Chemokines and cancer: migration, intracellular signaling, and intercellular communication in the microenvironment. *Biochemical J* 409, 635-649.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64, 6892-6899.
- Ohtani Y, Minami M, Kawaguchi N, Nishiyori A, Yamamoto J, Takami S, Satoh M (1998) Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neurosci Lett* 249, 163-166.
- Okamoto M, Wang X, Baba M (2005) HIV-1 infected macrophages induce astrogliosis by SDF-1 α and matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Comm* 336, 1214-1220.
- Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA (1971) Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 46, 411-422.
- Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Céspedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M (2004) CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 10, 4933-4938.
- Phillips HS, Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Modrusan Z, Nacu S, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, Vandenberg SR, Cowdrey CJ, Prados M (2008) A hierarchy of self-renewing tumour-initiating cell types in glioblastoma. *Brain Tumor* 2008, Abstract-Band, S. 11.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359, 845-849.
- Power CA (2003) Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo. *J Immunol Methods* 273, 73-82.
- Proost P, Struyf S, Scholz D, Durinx C, Wuyts A, Lenaerts JP, De Clercq E, De Meesters I, Van Damme J (1998) Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell derived factor-1 α . *FEBS Lett* 432, 73-76.
- Reiss K, Mentlein R, Sievers J, Hartmann D (2002) Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as a chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 115, 295-305.

- Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA (2000). Identification and localization of the cytokine SDF-1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 6, 102-111.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) *Science* 255, 1707-1710.
- Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, Yi Y, Margulies B, Collman RG, Doranz BJ, Parmentier M, Doms RW (1997) Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71, 8999-9007.
- Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Frigerio S, Eoli M, Silvani A, Broggi G, Ciusani E, Boiardi A, De Rossi M (2004) CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J Neuro-Oncol* 67, 305-317.
- Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N, Kiessling M (1994) Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer* 57, 72-77.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifemberger G, Collins VP (1994) CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54, 6321-6324.
- Schönemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R (2008) Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol* 10, 207-220.
- Schönemeier B, Schulz S, Hoell V, Stumm R (2008) Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol* 198, 39-45.
- Schuttyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, Richmond A (2007) Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 18, 59-70.
- Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR (2002) Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938.
- Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB (2006) The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumour growth. *FASEB J.* 20, 59-64.

- Sherry B, Horii Y, Manogue KR, Widmer U, Cerami A (1992) Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: an overview. *Cytokines* 4, 117-130.
- Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, Hoshino H (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 74, 619–626.
- Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B (1992) Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 355, 846-847.
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez A, Mackay CR, Mackay F (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14759–14764.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkin C, Squire JA, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267-7273.
- Skinnider BF, Mak TW (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 4283-4297.
- Sreedharan SP, Robichon A, Peterson KE, Goetzl EJ (1991) Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4986-4990.
- Spangrude GJ, Sacchi G, Hill HR, Van Epps DE, Daynes RA (1985) Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* 135, 4135-4143.
- Speetjens FM, Liefers GJ, Korbee CJ, Mesker WE, van de Velde CJ, van Vlierberghe RL, Morreau H, Tollenaar RA, Kuppen PJ (2008) Nuclear Localization of CXCR4 Determines Prognosis for Colorectal Cancer Patients. *Cancer Microenviron*, Epub ahead of print.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arensberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Damme JV, Walz A, Marriot D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB (1995) The functional role of the ERL-motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270, 27348-27357.
- Struyf S, Burdick MD, Peeters E, Van den Broeck K, Dillen C, Proost P, Van Damme J, Strieter RM (2007) Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res* 67, 5940–5948.

- Stumm R, Höllt R (2007) CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J Mol Endocrinol* 38, 377-382.
- Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S (2002) Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 20, 1375-1382.
- Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S (2005) Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 11, 8273-8280.
- Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS (2003) Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 3, 462-473.
- Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, Samejima, Zamzami N, Loeffler M, Constantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brother G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-579.
- Sutton A, Friand V, Brulé-Donneger S, Chaigneau T, Ziol M, Sainte-Catherine O, Poiré A, Saffar L, Kraemer M, Vassy J, Nahon P, Salzmann JL, Gattegno L, Charnaux N (2007) Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res* 5, 21-33.
- Tabatabai G, Frank B, Möhle R, Weller M, Wick W (2006) Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* 129, 2426-2435.
- Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK (2002) Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis in bone. *Cancer Res* 62, 1832-1837.
- Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ (1993) Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358.
- Thelen M, Thelen S (2008) CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198, 9-13.
- Tripathi V, Verma R, Dinda A, Malhotra N, Kaur J, Luthra K (2008) Differential Expression of RDC1/CXCR7 in the Human Placenta. *J Clin Immunol*, Epub ahead of print.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated *Cancer Res* 56, 150-153.

- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 28, 226-44.
- VanMeter TE, Roprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ (2001) The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol* 53, 213-235.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6, 425-436.
- Vicari AP, Caux C (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13,143-154.
- Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, Migliavacca E, Straub J, Di Stefano I, Moreau F, Hamou MF, Renard I, Delorenzi M, Flamion B, DiGuseppi J, Bierau K, Hegi ME (2008) Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn* 10, 332-337.
- Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini m (1987) Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 149, 755-761.
- Wang J, Ou ZL, Hou YF, Luo JM, Shen ZZ, Ding J, Shao ZM (2006) Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. *Oncogene* 25, 7201–7211.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008) The role of CXCR7 / RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12 / SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283-4294.
- Wendt MK, Drury LJ, Vongsa RA, Dwinell MB (2008) Constitutive CXCL12 expression induces anoikis in colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology* 135, 508-517.
- White FA, Wilson NM (2008) Chemokines as pain mediators and modulators. *Curr Opin Anaesthesiol*, 21 580-585.
- Wick W, Platten M, Weller M (2001) Glioma cell invasion: regulation of matrixmetalloproteinase activity by TGF- β . *J Neurooncol* 53, 177-185.
- Wischhusen J, Naumann U, Ohgaki H, Rastinejad F, Weller M (2003) CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* 22, 8233-8245.
- Xia MQ, Qin SX, Wu LJ, Mackay CR, Hyman BT (1998) Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am J Pathol* 153, 31-37.
- Yang SX, Chen JH, Jiang XF, Wang QL, Chen ZQ, Zhao W, Feng YH, Xin R, Shi JQ, Bian XW (2005) Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells

- promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Comm* 335, 523-528.
- Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O (1995) Molecular cloning of a novel C or γ type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett* 360, 155-159.
- Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 9233-9237.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.
- Yuecheng Y, Xiaoyan X (2007) Stromal-cell derived factor-1 regulates epithelial ovarian cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2. *Eur J Cancer Prev* 16, 430-435.
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW (2006) Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 86, 1221-1232.
- Zhang J, Sarkar S, Yong VW (2005) The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis* 25, 2069-2077.
- Zhang S, Qi L, Li M, Zhang D, Xu S, Wang N, Sun B (2008) Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 27:62.
- Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW (2002) CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* 277, 49481-49487.
- Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Professor Dr. Rolf Mentlein bedanken, der mir das Thema für diese Dissertation zur Verfügung gestellt und mich stets in der bestmöglichen Weise betreut und unterstützt hat.

Auch an Professor Dr. M. Dittmar richtet sich mein Dank dafür, dass sie sich freundlicherweise das Koreferat für diese Arbeit übernommen hat.

Den Direktoren des Anatomischen Instituts, Professor Dr. Sievers, Professor Dr. Dr. Schünke und Professor Dr. Lucius danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Anatomischen Institut der Universität Kiel durchführen zu können. Mein Dank gilt auch Professor Dr. Wedel und Dr. Martina Böttner, die freundlicherweise ein Jahr lang die Finanzierung meiner Stelle übernahmen.

Ich möchte mich außerdem herzlich bei Professor Dr. Dr. Janka Held-Feindt aus der Klinik für Neurochirurgie bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt hat und insbesondere die Etablierung der Glioblastomsphären-Kulturen in ihrem Forschungslabor ermöglicht hat. Auch an den Direktor der Klinik für Neurochirurgie, Professor Dr. Mehdorn und die von ihm und seiner Familie ins Leben gerufene Familie Mehdorn-Stiftung richtet sich mein Dank für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ich möchte mich auch bei den technischen Angestellten des Anatomischen Instituts und der Klinik für Neurochirurgie bedanken, die mich nicht nur technisch unterstützt, sondern auch für ein hervorragendes Arbeitsklima gesorgt haben. Speziell erwähnen möchte ich an dieser Stelle Martina Burmester, Ulla Prange, Miriam Lemmer, Dagmar Freier-Patz, Inka Geurink, Rosi Sprang, Brigitte Rehmke, Ute Malkus-Coskun und Jörg Krause nennen. Darüberhinaus danke ich Clemens Franke für die Unterstützung bei der Erstellung der Grafiken und Otfried Frandsen für seine Hilfe bei zahlreichen Computer- und Mikroskopproblemen.

Schließlich danke ich meiner Familie und Manuel Koch für die beständige, liebevolle Unterstützung in jeder vorstellbaren Weise und zu jeder Zeit.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Hattermann
Vorname: Kirsten
Geburtsdatum: 07.06.1982
Geburtsort: Eutin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Privatanschrift: Waitzstraße 47, 24105 Kiel

SCHULE

1988-1992 Grund- und Hauptschule in Ahrensböök
1992-2001 Johann-Heinrich-Voß-Schule in Eutin
23.06.2001 Verleihung der Allgemeinen Hochschulreife

STUDIUM

2001-2006 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 2002 Vordiplom Botanik und Zoologie
April 2004 Vordiplom Biochemie, Anorganische Chemie, Organische Chemie und Physikalische Chemie
September 2005 Mündliche Diplomprüfungen im Hauptfach Biochemie / Molekularbiologie und den Nebenfächern Mikrobiologie, Pharmazeutische Chemie und Toxikologie
Oktober 2005-Juli 2006 Diplomarbeit mit dem Titel „Signaltransduktion und Effekte des CXC-Chemokinrezeptor CXCR6 im Zentralnervensystem“ am Anatomischen Institut der Universität Kiel
August 2006 Verleihung des Diploms, Gesamtnote „ausgezeichnet“

STIPENDIUM

2001-2003 Jubiläumstipendium des Verbandes der chemischen Industrie (VCI) mit der Höchstförderungsdauer von vier Semestern

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit 15.9.2006 Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Mentlein, Anatomisches Institut Kiel

WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE UND PREISE

Originalartikel

Koch M., May U., Kuhns S., Drechsler H., Adam N., **Hattermann K.**, Wirtz S., Rose-John S., Scheller J. (2007) Interleukin 27 induces differentiation of neural C6-precursor cells into astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 483-487.

Oxmann D., Held-Feindt J., Stark A., **Hattermann K.**, Yoneda T., Mentlein R. (2008) Endoglin expression in metastatic breast cancer cells determines their invasive phenotype. *Oncogene* **27**, 3567-3575.

Held-Feindt J., Rehmke B., Mentlein R., **Hattermann K.**, Knerlich F., Hugo H. H., Ludwig A., Mehdorn H. M. (2008) Overexpression of CXCL16 and its receptor CXCR6 / Bonzo promotes growth of human schwannomas. *Glia* **56**, 764-774.

Hattermann K., Ludwig A., Gieselmann V., Held-Feindt J., Mentlein R. (2008) The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6. *Mol Cell Neurosci.* **39**, 133-141.

Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. (2008) A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique of O6-methylguanine DNA methyltransferase promotor methylation analysis. *Anal. Biochem.* **377**, 62-71.

Mentlein R., Hemion C., **Hattermann K.**, Held-Feindt J. The serine matrix protease seprase / fibroblast activation protein- α (FAP- α) is expressed in human glioma cells and increases their invasion. *Am. J. Pathol.*, in Begutachtung.

Kranich S., **Hattermann K.**, Specht A., Lucius R., Mentlein R. VEGFR-3/ Flt-4 mediates proliferation and chemotaxis in glial precursor cells. *Neurochem. Int.*, in Begutachtung.

Hattermann K., Held-Feindt J., Lucius R., Mentlein R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates anti-apoptotic effects. *Oncogene*, eingereicht.

Held-Feindt J., **Hattermann K.**, Wedderkopp H., Knerlich-Lokoschus F. Ungefroren H., Mehdorn H.M., Mentlein R. CX3CL1/CX3CR1 promote recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *J. Neurooncol.*, eingereicht.

Poster und Vorträge

Hattermann K., Ludwig A., Held-Feindt J., Mentlein R. The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via PI3-kinase dependent signal transduction of its receptor CXCR6 / Bonzo. *Glial Cells in Health and Disease, The VIIIth European Meeting 2007, London, UK.* (Poster)

Held-Feindt J., Ma Y., Knerlich F., **Hattermann K.**, Mehdorn H.M., Mentlein R. Stem cell markers in astrocytomas. *Glial Cells in Health and Disease, The VIIIth European Meeting 2007, London, UK.* (Poster)

Hattermann K., Mentlein R., Mehdorn H.M., Schultka S., Held-Feindt J. Methylierungsspezifische Quantitative PCR (MSQP): eine Methode zur quantitativen Untersuchung des *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus. *Deutscher Krebskongress 2008, Berlin.* (Vortrag)

Hattermann K., Held-Feindt J., Lucius R., Mentlein R. Expression and fuction of the chemokine receptor CXCR7 in human gliomas. *Brain Tumor 2008, Berlin.* (Poster)

Preis

Förderpreis der Familie Mehdorn-Stiftung 2008 für das Projekt „Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung der Methylierung des *MGMT*-Promotors und deren Anwendung zur Chemotherapie-Diagnostik von humanen Hirntumoren“

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Diese Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an anderer Stelle für ein Promotionsverfahren vorgelegt.

Ferner erkläre ich, dass ich noch kein früheres Promotionsvorhaben ohne Erfolg beendet habe.

Kiel, den

.....
(Kirsten Hattermann)