

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

IL-18-exprimierende mesenchymale Stammzellen als syngenes Vehikelsystem zur Therapie des Neuroblastoms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Heinrich

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. N. Lode
2. Prof. Dr. R. Ladenstein
3. Prof. Dr. med. R. Erttmann

Datum der Promotion: 24.04.2009

1	Einleitung	1
1.1	Das Neuroblastom	1
1.2	Adulte mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes.....	4
1.3	Interleukin-18 in der Tumorthherapie	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Materialien und Methoden.....	18
2.1	Kultur und Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen	18
2.2	Herstellung von mL-18 exprimierenden Plasmiden.....	25
2.3	Generierung von mL-18 exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen	37
2.4	<i>In vivo</i> -Biofunktion von mL-18-exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen	45
2.5	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus	49
3.2	Herstellung von mL-18-exprimierenden Plasmiden.....	63
3.3	Generierung einer murinen mesenchymalen Stammzelllinie mit stabiler mL-18-Expression.....	66
3.4	<i>In vivo</i> -Biofunktion von mL-18-exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen	73
4	Diskussion.....	77
4.1	Mesenchymale Stammzellen aus der A/J-Maus	78
4.2	<i>In vivo</i> -Biofunktion von mL-18 exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen der A/J-Maus	82
4.3	Evaluation des Therapieansatzes	84
4.4	Möglichkeiten der neuen Therapiestrategie	89
5	Zusammenfassung.....	90
6	Anhang.....	92

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des neuroektodermalen sympathischen Nervensystems im Kindesalter und mit 8 % aller Malignome der häufigste extrakranielle solide Tumor und nach der akuten lymphatischen Leukämie mit 26,8% und dem Astrozytom mit 10,1% die dritthäufigste Neoplasie [1]. Neuroblastome sind, wie Nephroblastome und Keimzelltumoren, embryonale Tumoren. Daher sind das konzentrierte Auftreten im frühen Kindesalter und die an embryonale Vorläuferzellen erinnernde Zellmorphologie charakteristisch.

Neuroblastome können überall dort auftreten, wo sich sympathisches Gewebe findet, speziell im Nebennierenmark, am sympathischen Grenzstrang und in sympathischen Paraganglien. Typischerweise sind die Primärtumoren in Bauch-/Brustraum, Kopf-/Halsbereich oder Becken lokalisiert. Metastasen werden in regionalen und entfernten Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber oder Haut beobachtet, seltener in Zentralem Nervensystem oder in der Lunge.

Die Morphologie des Neuroblastoms wird durch das Nebeneinander von unreifen Zelltypen, den Neuroblasten, und unterschiedlich ausgereiften Ganglienzellen und Schwann-Zellen bestimmt. Diskutiert wird die reaktive Natur der Schwann-Zellen, da typische molekulargenetische Veränderungen der Neuroblasten in den Schwann-Zellen nicht nachweisbar sind. Die soliden, weichen Tumoren haben eine graurötliche Schnittfläche, auf der regressive Veränderungen in Form von Hämorrhagien, Nekrosen und Verkalkungsherden beobachtet werden können. Histologisch ist der Tumor von unregelmäßigen Bindegewebssepten durchzogen und besteht aus kleinen, nacktkernigen Zellelementen mit monotonen hyperchromatischen Kernen. Diese sind in eine neurofibrilläre Matrix eingebettet und bilden teilweise abortive Pseudorosetten, die Homer-Wright-Rosetten. Die herdförmige Ausdifferenzierung bis hin zu reifen Ganglienzellen wird durch Zellausläufer und deutliche Nukleolen in nicht hyperchromatischen Kernen erkennbar [2].

Der histologischen Einteilung der Tumoren dient das Grading nach Hughes. Allerdings zeigen sich biologische Verlaufsformen, welche histologisch nicht zu unterscheiden sind. Eine eindeutige und umfassende molekularbiologische Charakterisierung der verschiedenen Verlaufsformen ist bisher nicht abgeschlossen. Der Amplifikation des *MYNC*-Onkogens wird neben einem Diagnosealter jenseits des ersten Lebensjahres eine führende Rolle in der Definition von Hochrisiko-Neuroblastompatienten mit dem Potenzial zu Metastasierung und Progression zugeschrieben [3]. Sie gilt neben einer Deletion des Chromosoms 1 und einer fehlenden CD44-Überexpression als molekulargenetischer Risikomarker und wird in Studienprotokollen zur Einschätzung des Erkrankungsgrades genutzt.

Klinisch wird das Neuroblastom durch das International Neuroblastoma Staging System (INSS) in die Stadien 1-4 und das Sonderstadium 4S, welches nur bei Säuglingen vorkommt, eingeteilt. Kriterien sind die Größe des Tumors, das Vorhandensein und die Ausbreitung von Metastasen und die Resektabilität. Tumorstadium 1 beschreibt auf ihr Ausgangsorgan beschränkte Neuroblastome, in Stadium 2 sind regionale, in Stadium 3 entfernte Lymphknoten betroffen, bei Metastasierung in entfernte Organe spricht man von Stadium 4. Einen Sonderstatus nehmen Neuroblastome des Stadiums 4S ein. Bei einem Großteil ist hier eine Spontanremission von Tumor und Metastasen ohne chemotherapeutische Behandlung zu beobachten.

Etwa 45% der Kinder erkranken im ersten Lebensjahr, das mediane Diagnosealter liegt bei 1 Jahr und 3 Monaten, 88% der Patienten sind jünger als fünf Jahre. Die Inzidenz beträgt 1,2/100 000 Kinder, mit abnehmender Tendenz in zunehmendem Lebensalter. Jungen erkranken etwas häufiger als Mädchen am Neuroblastom (1,2:1). Ungefähr 40 % aller Neuroblastome werden im Stadium 4 mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von nur 31 % diagnostiziert [1,4]. Etwa die Hälfte aller Neuroblastome sind bei Diagnosestellung bereits metastasiert.

1.1.1 Neue Therapiestrategien und ihre Notwendigkeit

Kooperative Therapieoptimierungsstudien sind seit 1979 die Grundlage für die Therapie des Neuroblastoms. Den derzeitigen Therapiestandard definiert in Deutschland das Therapieprotokoll NB 2004. Abhängig von Tumorstadium und molekulargenetischen

schen Risikofaktoren umfasst das Therapiespektrum die alleinige Operation (Beobachtungspatienten), sowie die Kombination mit einer Polychemotherapie (Standardrisiko-Patienten) bzw. mit zusätzlicher Radio- und Immuntherapie (Hochrisiko-Patienten).

Die Prognose des Neuroblastoms konnte in den vergangenen 25 Jahren vor allem durch die Einführung der Hoch-Dosis-Chemotherapie, sowie die Optimierung der symptomatischen Versorgung der Patienten etwas verbessert werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate stieg von 52% (Diagnose 1980-1984) auf 62% (Diagnose 1990-1994) an, zeigt aber eine starke Stadienabhängigkeit. Patienten in den Stadien 1-3 und 4S haben eine relativ hohe Überlebensrate (98-75%), während die Prognose für Patienten in Stadium 4 mit 31% unbefriedigend bleibt. Insbesondere für diese Patientengruppe ist eine Verbesserung des Überlebens durch Entwicklung neuer Therapiestrategien von großer Bedeutung.

Eine mögliche Strategie ist die Induktion der Differenzierung der Neuroblasten des Tumorgewebes zu Ganglienzellen. Isotretinoin (13-cis-retinoic-acid) und Tretinoin (All-trans-retinoic-acid) sind bekannte Induktoren der Neuroblastendifferenzierung und hemmen darüber hinaus die Proliferation dieser Tumoren [5]. Eine prospektive randomisierte Studie der Children's Cancer Group zeigte eine Verbesserung des ereignisfreien Überlebens von Hochrisiko-Neuroblastompatienten auf $29\pm 7\%$ durch eine Differenzierungstherapie mittels Isotretinoin in Verbindung mit autologer Knochenmarkstransplantation nach Hoch-Dosis-Chemotherapie im Vergleich zu $11\pm 4\%$ in der Kontrollgruppe mit alleiniger Hoch-Dosis-Chemotherapie [6].

Neuroblastome induzieren Endothelproliferation und Angiogenese. Die *MYCN*-Onkogen vermittelte Hemmung von Endothelwachstumsinhibitoren und Steigerung angiogener Faktoren tragen dazu bei, dass Neuroblastome Tumoren mit schnellem Wachstum, starker Vaskularisierung und frühzeitiger Metastasierung sind [7,8]. Durch die Hemmung der tumorassoziierten Angiogenese ist es möglich, Wachstum, Invasion und Metastasierung des Neuroblastoms zu inhibieren. Die Typ I Interferone (IFN) α und β sind in der Lage, einen antiangiogenen Effekt auszulösen [9], und zeigen darüber hinaus auch direkte Zytotoxizität auf die Neuroblastomzellen [10] und

eine indirekte Immunmodulation [11]. Die kurze Halbwertszeit und die hohe Toxizität in hoher Dosierung komplizieren eine systemische Interferontherapie. Ein möglicher Ansatz für die gezielte Bereitstellung im Tumorbett ist die Gentherapie. In dem humanen Neuroblastommodell NB-1691 als Xenograft in SCID-Mäusen konnte der Anti-Tumoreffekt durch Anhebung der Apoptoserate von 27% auf 54%, eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und ein längeres Überleben durch i.v.-Gabe des AAV hIFN β Vektors gezeigt werden [12]. Gesteigert wurde der Effekt durch die simultane Therapie mit Cyclophosphamid.

Auch die komplette Tumorresektion ist bei Neuroblastompatienten im Stadium 4 eine Therapieoption, die trotz Hochrisikoeingriff nachweislich zur Verbesserung des Überlebens beiträgt und im Vergleich geringe postoperative Komplikationen aufweist [13].

1.2 Adulte mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotential. Sie tragen zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bändern, Sehnen und Fettgewebe bei. Darüber hinaus unterstützen sie Wachstum und Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen (HSC) im Knochenmark. Signalgeber für diese Regenerations- und Wachstumsprozesse sind Zell-Zell-Kontakte und die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Dabei spielen die Rezeptor-Ligandeninteraktion und an Integrin bindende Zelladhäsionsmoleküle wie Fibronectin, Vimentin und Laminin eine führende Rolle. Die umfassende *in vivo*-Funktion der MSC ist allerdings bislang ungeklärt.

Erstmals wurden MSC 1966 durch Friedenstein und Petrakova identifiziert [14], welche die Vorläuferzellen zunächst aus dem Knochenmark von Ratten, dann auch aus Milzgewebe und Thymus isolierten [15] und die Entwicklung der fibroblastenartigen Zellen in Knochen und Knorpel beschrieben.

Populationen von MSC sind nicht homogen, sondern bestehen aus Vorläufern mit variablen oder festgelegten Möglichkeiten zu Proliferation und Differenzierung. Multipotente MSC finden sich im Knochenmark und unterstützen MSC mit eingeschränktem Potential. Als möglicher Kandidat für eine Vorläuferzelle der MSC ist die multipo-

tente adulte Vorläuferzelle (MAPC) mit hoher Differenzierungskapazität und den MSC ähnlichen Eigenschaften beschrieben [16]. Allerdings konnte bisher weder *in vitro* noch *in vivo* ein Nachweis über den direkten Zusammenhang zwischen MSC und MAPC erbracht werden.

1.2.1 Isolierung mesenchymaler Stammzellen

Das Knochenmark ist das Kompartiment, welches aufgrund seines hohen Stammzellanteils sowie der guten Zugänglichkeit optimale Bedingungen für die Isolation von MSC bietet [17]. Weiterhin sind auch andere Organe und Gewebe wie z.B. Knochen und Knorpel, Fettgewebe, Muskel, die Leber, fetales Blut, Nabelschnurblut und Amnionflüssigkeit bekannte Reservoirs für MSC [18,19]. Eine Übersicht bietet Abbildung 1-1. Die gebräuchlichste Art, humanes Knochenmark zu gewinnen, ist die Aspiration aus dem Beckenkamm, aber auch aus Tibia und Femur. Murines Knochenmark gewinnt man durch Ausspülen der langen Röhrenknochen. Dabei können aus den Femur- und Tibiaknochen einer Maus $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen erwartet werden. Eine Hürde während der Isolation stellt die Kontamination durch HSC dar, mit denen sich die MSC das Kompartiment Knochenmark teilen. Die adhärenz Eigenschaften der MSC können ausgenutzt werden, um HSC, welche vorwiegend in Suspension wachsen, sukzessive durch Medienwechsel und Zellpassagen zu eliminieren.

Die *in vitro*-Kultur der MSC gelingt unter verschiedenen Bedingungen. Das Standardprotokoll für humane MSC empfiehlt die Kultur in Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium (DMEM), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und L-Glutamin bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Es sind weiterhin Varianten, wie Serumreduktion und Zusatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beschrieben [20,21]. Für murine MSC (mMSC) hingegen sind *in vitro*-Wachstum und Expansion unter Standardkulturbedingungen, wie auch für andere primäre Zelltypen, durch den zunehmenden Verlust an Proliferations- und Differenzierungspotential erschwert. Eine Methode speziell für die Kultivierung von mMSC konnte durch da Silva Meirelles *et al.* etabliert werden [22]. Sie ermöglicht die Expansion einer Zelllinie mit erhaltenem Differenzierungspotential in die adipogene und osteogene Richtung für über 50 Passagen. Auch werden die adhärenz Eigenschaften der MSC genutzt, um die hämatopoetischen Stammzellen aus der Kultur zu dezimieren.

Unter Kulturbedingungen können MSC lichtmikroskopisch beurteilt werden. Sie imponieren als adhärente, konfluente Einzelzellschicht spindelförmiger, fibroblastenartiger, ca. 90 µm großer Zellen.

1.2.2 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Die von MSC abgeleiteten Zelllinien sind nicht, wie Zelllinien aus HSC, strikt voneinander getrennt. Vielmehr sind Aktivierung oder Unterdrückung von Genen der Transkriptionsfaktoren verantwortlich für eine Plastizität der MSC und ihrer abgeleiteten Zelllinien hinsichtlich Charakteristik und Phänotyp [23]. Dieses Phänomen erklärt die weit gestreute Differenzierungskapazität der MSC; sowie die Möglichkeit der verschiedenen Gewebsvorläufer während Wachstum, Gewebeumbau oder Gewebshheilung in andere Gewebe auszudifferenzieren. Eine Übersicht über Möglichkeiten der *in vitro*- und *in vivo*-Differenzierung von MSC zeigt Abbildung 1-1.

Multipotente MSC können über viele Passagen *in vitro* kultiviert werden und liegen undifferenziert vor. Durch spezifische Stimulation haben sie aber *in vitro* und *in vivo* die Kapazität, funktionales Gewebe auszubilden. Sie unterstützen durch Bildung von Knochenmarksstroma die Hämatopoese oder differenzieren in die osteogene, chondrogene oder adipogene Richtung. Dabei enthalten Kulturen von MSC geringe Anteile von multipotenten Zellpopulationen und darüber hinaus vor allem bi- und unipotente Klone [20]. So zeigen Stammzellkulturen in ihrer Fähigkeit zur Expansion und Ausdifferenzierung oft unterschiedliches Potential; nicht alle Klone besitzen nach 40 Zellpassagen noch Differenzierungskapazität. Die Differenzierung der Vorläuferzellen entlang der verschiedenen Linien wurde lange Zeit als irreversibler, mehrstufiger, eindimensionaler Prozess angesehen. Es konnte aber gezeigt werden, dass ausdifferenzierte MSC in der Lage sind, sich in andere Gewebe zu entwickeln und somit ihren Phänotyp zu verändern. So entwickeln sich Zellen mit chondrogenem oder auch adipogenem Phänotyp in osteogene Zellen [24,25]. Diese Variabilität scheint eine Voraussetzung für das Wachstum verschiedener Gewebe und Organe zu sein, indem sie die Adaptation und auch die Koexistenz unterschiedlicher benachbarter Organe erlaubt. So zeigen mesenchymale Gewebe, welche von einer einzigen MSC abstammen, unterschiedliche phänotypische Merkmale, während sie alle zu einem Organ gehören. Weiterhin erlaubt die Plastizität, mit der sich MSC verändern können,

eine Anpassung an neuartige Umgebungsbedingungen und somit die Umbildung und das Wachstum von Organen [21].

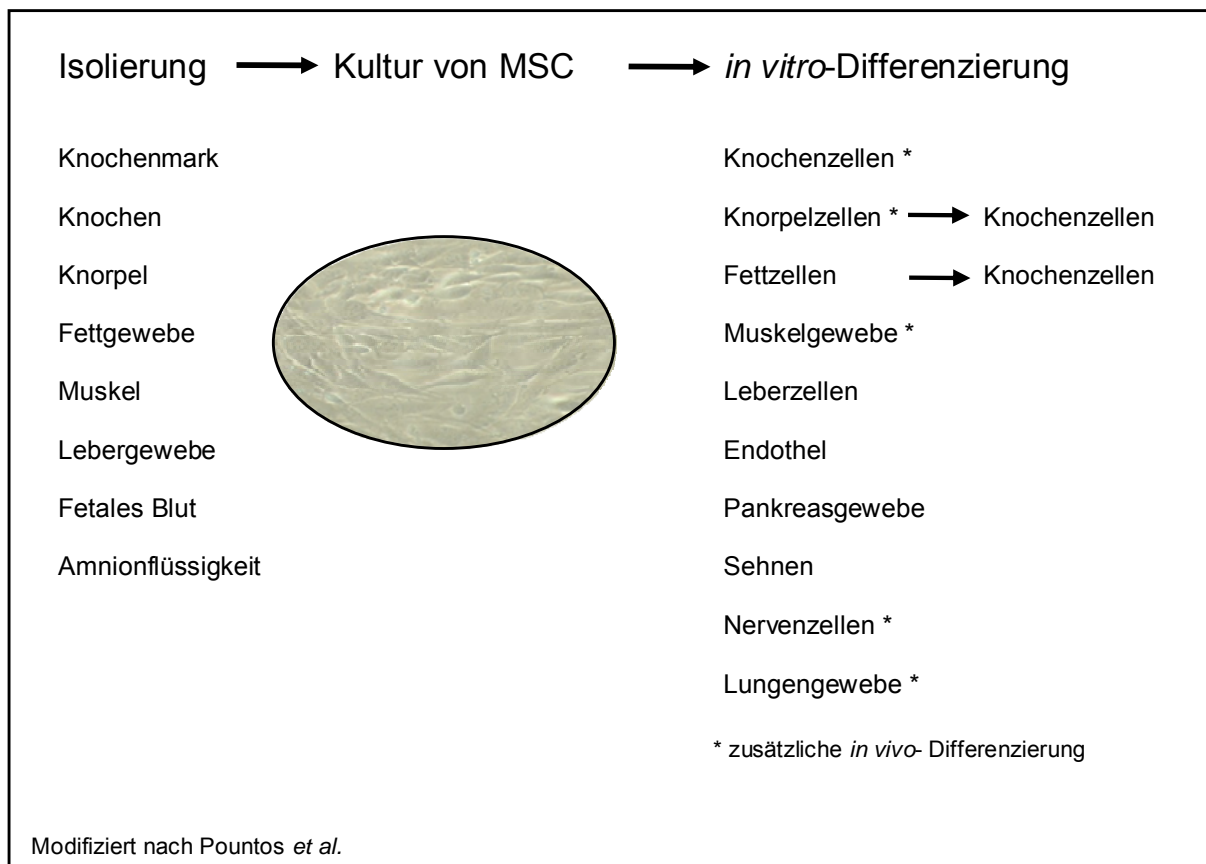


Abb. 1-1: Übersicht über Möglichkeiten der Isolierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.

Die zellulären und molekularen Mechanismen der Stammzelldifferenzierung entlang spezifischer Linien wurden zunächst in murinen Langzeitzellkulturen entdeckt [26] und erst später in Experimenten mit humanen MSC angewandt [27]. Verschiedene Systeme und spezielle Stimulantien wurden für die Differenzierung in verschiedene Richtungen etabliert. Hervorzuheben sind standardisierte Bedingungen für die Entwicklung in Knochen-, Knorpel- oder Fettzellen durch Zusätze im Kulturmedium [28]. Weiterhin konnte aber auch die Differenzierung in Muskelgewebe (Skelettmuskel, glattes Muskelgewebe und Herzmuskelgewebe), Endothel und Sehnen, sowie Hepatozyten und pankreatisches Gewebe *in vitro* nachgewiesen werden [16,29-33]. Löst man die adhärennten MSC von ihrer Kulturoberfläche und inkubiert sie mit Zytokinen, wie *fibroblast growth factor* (FGF) und *nerve growth factor*, differenzieren sie zu Nes-

tin-positiven Nervenstammzellen und bilden kugelige Aggregate [34]. Auch die *in vivo*-Ausdifferenzierung der verschiedenen Gewebearten, insbesondere Knochen, Knorpel, Muskel-, Nerven- und Lungengewebe konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden [35-38].

1.2.3 Phänotypisierung mesenchymaler Stammzellen

Die Charakterisierung des immunologischen Phänotyps der MSC ist ein wichtiges Werkzeug zur Kontrolle der Eliminierung der HSC in der Kultur zum einen und des erhaltenen Differenzierungspotentials zum anderen. Anders als HSC exprimieren MSC ein Muster unspezifischer Oberflächenmarker anstelle eines einzigen spezifischen Markers [39]. Informationen zum phänotypischen Muster der MSC stammen zumeist aus der Analyse von *in vitro*-Kulturen. Über den Phänotyp primärer mesenchymaler Vorläuferzellen *in vivo* ist wenig bekannt und bisher konnte kein spezifisches Antigen gefunden werden, welches die Isolation und Anreicherung der MSC durch einen spezifischen Antikörper ermöglichen würde. Das Muster zur Charakterisierung der MSC geht von der Abwesenheit von hämatopoetischen Markern, wie CD45, CD34, CD14 und CD117/c-kit und endothelialen Markern, wie CD34, CD31 und VWF aus [17,22,40]. Dabei kann CD34 auf direkt aus dem Knochenmark isolierten primären MSC exprimiert werden, geht aber im Laufe der *in vitro*-Expansion verloren [41]. Charakteristisch ist die Anwesenheit adhäsiver Moleküle wie CD29, CD44, CD90.2, Sca-1, CD106, Bindegewebsmarker wie SH-2, SH-3, SH-4 und den Zytokinrezeptoren IL-1R, TNF- α R [22,42-44]. Die Beseitigung verunreinigender HSC aus der Kultur mit Hilfe von Antikörpern gegen CD45, CD34 oder CD11b bietet daher eine Möglichkeit für die Isolation der MSC [42], während der Nachweis charakteristischer Marker zur Identifizierung und Kontrolle für Isolierung und Kultur der MSC beiträgt. Allerdings sind Marker wie CD44, CD29, CD90.2 und Sca-1 nicht exklusiv für MSC, sondern kommen auch in anderen Geweben und Zellarten vor. So kann also keiner der genannten Oberflächenmarker allein zur spezifischen Charakterisierung und Anreicherung der MSC verwendet werden.

Tabelle 1-1: Phänotypische Charakteristika von MSC zusammengestellt aus Baddoo *et al.* [42], da Silva Meirelles *et al.* [22], Kemp *et al.* [21] und Lu *et al.* [19]; CD34 und CD90.2 sind gleichermaßen als positiv und negativ exprimierte Oberflächenmarker beschrieben.

Positiv exprimierte CD	Negativ exprimierte CD
Sca-1	CD11b
CD29	CD14
	CD31
CD34	CD34
CD44	CD40
CD49	CD45
CD81	CD48
	CD80
	CD86
CD90.2	CD90.2
CD95	CD117/c-kit
CD105	CD135
CD106	CD152
CD166	

Morphologie, Genexpression und phänotypische Kriterien unterstützen die Hypothese, dass mesenchymale Vorläuferzellen in der Lage sind, auch in nicht-mesenchymale Gewebe zu differenzieren und somit bekannte Wege der Gewebeentwicklung zu verlassen. Angesichts dieses breit gefächerten Potentials bieten sich MSC einerseits für eine Vielzahl klinischer Applikationen an und bleiben andererseits im Fokus der Grundlagenforschung.

1.2.4 Therapeutischer Einsatz mesenchymaler Stammzellen

Durch ihre Vielfältigkeit bieten MSC ein breites Spektrum für die klinische Anwendung in vielen Bereichen. Während der Nutzen einer Stammzelltransplantation zur Unterstützung der Hämatopoese bei Knochenmarksdeprivation und Immunmodulation bei der Graft-versus-Host Disease (GvHD) in präklinischen und klinischen Studien bereits evaluiert ist, blieb die Aufklärung der Mechanismen von Gewebereparatur und Gentransfer durch MSC bisher Aufgabe der Grundlagenforschung.

1.2.4.1 Stammzelltransplantation

Bei der Stammzelltransplantation werden blutbildende Bestandteile aus dem Knochenmark oder – nach Stimulation – aus dem peripheren Blut übertragen. Zuvor wird durch Ganzkörperbestrahlung und/oder Hoch-Dosis-Chemotherapie das gesamte erkrankte Knochenmark des Patienten zerstört. Im durch Knochenmarkspunktion gewonnenen Transplantat enthaltene MSC werden dabei kotransplantiert. Die Fähigkeit der MSC, sich im Empfänger Knochenmark anzusiedeln und durch Differenzierung in Stromazellen die Blutbildung durch HSC zu unterstützen, wird kontrovers diskutiert [45,46].

Einen supportiven Effekt bieten in großer Zahl transplantierte MSC durch die T-Zell-Suppression. Die Immunmodulation durch *tumor necrosis factor* (TNF)- α - bzw. IFN- γ -Inhibition, sowie Interleukin (IL)-10-Stimulation ist ausschlaggebend für die Behandlung der GvHD, von Abstoßungsreaktionen und bei der Inflammationsregulation [47]. Die Transplantation von MSC unter anderem bei akuter GvHD im Stadium IV erzielt gute Ergebnisse hinsichtlich der Besserung der Symptome und der Überlebensrate der Patienten [48]. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass die GvHD nach Knochenmarktransplantation seltener auftritt, als nach peripherer Blutstammzell-Transplantation bei der keine MSC kotransplantiert werden.

1.2.4.2 Tissue engineering

Das breitgefächerte Potential der MSC zur Differenzierung sowohl in mesenchymale Gewebe als auch in andere, wie neurale, mesodermale, ektodermale und endodermale Gewebe, macht sie für Reparaturmechanismen in geschädigten Organen und das Tissue engineering interessant. Besonders für solche Gewebe und Organe, die

von Natur aus einer begrenzten Regenerations- und Reparaturfähigkeit unterliegen, wie das Zentrale Nervensystem und der Herzmuskel, aber auch für Knorpel und Sehnen können die Gewebereparaturmechanismen und das Differenzierungspotential der MSC von Nutzen sein.

Es wurde gezeigt, dass MSC zur Rückbildung funktionaler Ausfälle nach Hirnischämien in Rattenmodellen beitragen [34]. Als Ursache wurde unter anderem auch die Sekretion von Zytokinen durch die MSC vermutet. Verstärkt wurde dieser Effekt zusätzlich durch den Einsatz von mit dem *brain-derived neurotrophic factor* Gen transfizierten MSC [49].

Für den Prozess der Knochenheilung wurden gentherapeutische Ansätze unter Verwendung von MSC entwickelt. Humane MSC-Konstrukte sowie Konstrukte aus Ratten, die *bone morphogenetic protein 2* exprimierten, zeigten *in vivo* eine vermehrte Knochenneubildung [50].

1.2.5 Mesenchymale Stammzellen in der Tumortherapie

Der Zellumsatz in Stütz- und Bindegewebe ist unter physiologischen Bedingungen niedrig. Erst im Rahmen von Wundheilung und Regeneration kommt es zum Anstieg von undifferenzierten Vorläuferzellen, den MSC und zur Ausprägung ihrer hierarchischen Ordnung hinsichtlich Proliferation und Differenzierung. Auch Tumorwachstum benötigt, ähnlich wie Wundheilung, ein großes systemisches Angebot an MSC [51,52]. Hoher Zellumsatz und Umbauprozesse induzieren Signale für das Einwandern und die Proliferation von MSC, so dass sich angebotene MSC bevorzugt in Gegenwart maligner Zellen ansiedeln und als Fibroblasten des Bindegewebes in die Tumorarchitektur eingehen [53]. Zytokine wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), FGF, *tumor growth factors* (TGF), *platelet derived growth factors*, *monocyte chemoattractant protein1*, IL-8 und andere sind möglicherweise verantwortlich für diesen Effekt [54-57].

Diese Tatsache eröffnet die neuartige therapeutische Option, MSC als zelluläre Vehikel für antitumorale Wirkstoffe in den Tumor zu nutzen. In einem *in vivo*-Modell mit A375SM-Melanom tragenden Mäusen konnte die Inhibition des Tumorwachstums durch IFN- β -exprimierende humane MSC gezeigt werden, die sich bei systemischer

Applikation spezifisch im Tumorgewebe ansiedelten [58]. Im 9L-Gliommodell in Ratten zeigte sich die Migrationsfähigkeit IL-2-exprimierender MSC nach intrakranieller Injektion in Richtung der Neoplasie und ihrer Mikrosatelliten. Dabei und auch nach intratumoraler Injektion siedelten sich diese MSC spezifisch an der Grenze zwischen Tumorgewebe und gesundem Parenchym an und infiltrierten das Tumorgewebe. Ein antineoplastischer Effekt hinsichtlich Tumorwachstum und Überlebensrate wurde in diesem Gliommodell als kombinierter Effekt aus IL-2-Wirkung auf den Tumor und direkte MSC-Interaktion mit dem Tumor selbst nachgewiesen [59]. Der direkte anti-tumorale Effekt lässt sich auf die MSC-vermittelte Produktion von löslichen Zytokinen, in diesem Fall neurotrophische Faktoren wie *nerve growth factor* und angiogenetische Faktoren wie Angiopoetin-1, zurückführen, welche die Differenzierung anregen und das Größenwachstum inhibieren. Wachstumssuppression durch MSC selbst konnte auch in weiteren *in vivo*-Experimenten an verschiedenen Zelllinien gezeigt werden [60,61].

Im Gegensatz dazu existieren Arbeiten, welche die Induktion von Tumorwachstum im allogenen Mausmodell via Unterdrückung der Immunantwort durch MSC aufzeigen. Durch lienale Aktivierung sind MSC in der Lage, die T-Zell-Proliferation zu hemmen. Auch an diesem Effekt sind, wie bereits erwähnt (siehe 1.2.4.1), lösliche Zytokine beteiligt [62]. Durch MSC produzierte FGF und TGF können das Tumorwachstum fördern [54]. Die Stimulation von Osteoklasten in Knochenmetastasen des Neuroblastoms in der Maus konnte mit der Wirkung von IL-6, exprimiert durch native MSC, in Zusammenhang gebracht werden [63].

1.3 Interleukin-18 in der Tumorthherapie

IL-18 wurde erstmals 1989 von Nakamura *et al.* als IFN- γ -induzierendes Interleukin mit der Bezeichnung „IFN- γ -inducing factor“, IGIF beschrieben [64]. Durch strukturelle Ähnlichkeit mit der IL-1-Familie wurde es zunächst IL-1 γ genannt, später jedoch in IL-18 umbenannt, da es nicht an den IL-1-Rezeptor Typ I bindet [65].

IL-18 wird als Vorläuferprotein pro-IL-18 (24 kDa) mit geringer biologischer Aktivität gebildet, im Zytosol nah der Zellmembran durch Interleukin-1 β *converting enzyme*-Caspase-1 in die biologisch aktive Form mit einem Molekulargewicht von 18,3 kDa

umgewandelt und in den extrazellulären Raum sezerniert. Makrophagen sind ein wichtiger Ort der IL-18-Produktion, aber auch eine Vielzahl anderer mononukleärer Zellen sind in der Lage, IL-18 zu bilden und zu sezernieren [66].

1.3.1 Antitumorale Wirkmechanismen des Interleukin-18

Die Wirkung von IL-18 hinsichtlich einer TH1-Immunantwort scheint teilweise abhängig von synergistischen Effekten mit IL-12 zu sein. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine durch IL-18 induzierte Antitumorantwort unabhängig von IFN- γ bzw. IL-12 induziert wird [67]. Die antitumorale Wirksamkeit des multifunktionalen IL-18 ist in einen direkten Effekt auf die Zellen des Immunsystems und in eine zusätzliche, indirekte Wirksamkeit, welche vorwiegend durch IFN- γ vermittelt wird, einzuteilen. *In vitro* konnte nach alleiniger Applikation von IL-18 auf Tumorzellen kein Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen nachgewiesen werden, was einen Antitumoreffekt ohne sonstige Beteiligung von Zellen des Immunsystems *in vivo* ausschließt [68].

Direkt werden durch IL-18 die Aktivität der zytotoxischen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie die Proliferation von T-Zellen stimuliert. Dabei induziert IL-18 eine TH1-Immunantwort und favorisiert so das „Priming“ und die Proliferation von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen. Es stimuliert, unterstützt durch IL-12, die Bildung von IFN- γ und IFN- γ -*inducible protein* (IP)-10. Diese Sekundärmediatoren sind für den Antitumoreffekt entscheidend und verantwortlich für die indirekte IL-18-Wirkung [69].

IFN- γ induziert eine Hochregulierung von MHC-Klasse-I, also dem Liganden der T-Zell-Rezeptoren tumorspezifischer zytotoxischer CD8-positiver T-Zellen auf Tumorzellen. Das ist besonders für das Neuroblastom, das nur geringe Mengen von MHC-Klasse-I exprimiert und sich so der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entzieht, eine günstige Eigenschaft. IFN- γ steigert die Aktivität von Makrophagen, welche Tumorzellen töten und ihre Antigene T-Lymphozyten präsentieren. Generell trägt eine vermehrte Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf den Tumorzellen selbst und auf Zellen des Immunsystems und der Tumorumgebung zur besseren Erkennbarkeit des Tumors für das Immunsystem bei. Darüber hinaus induziert IFN- γ direkte zytostatische bzw. zytotoxische Effekte auf eine Reihe von Tumorzellen [70].

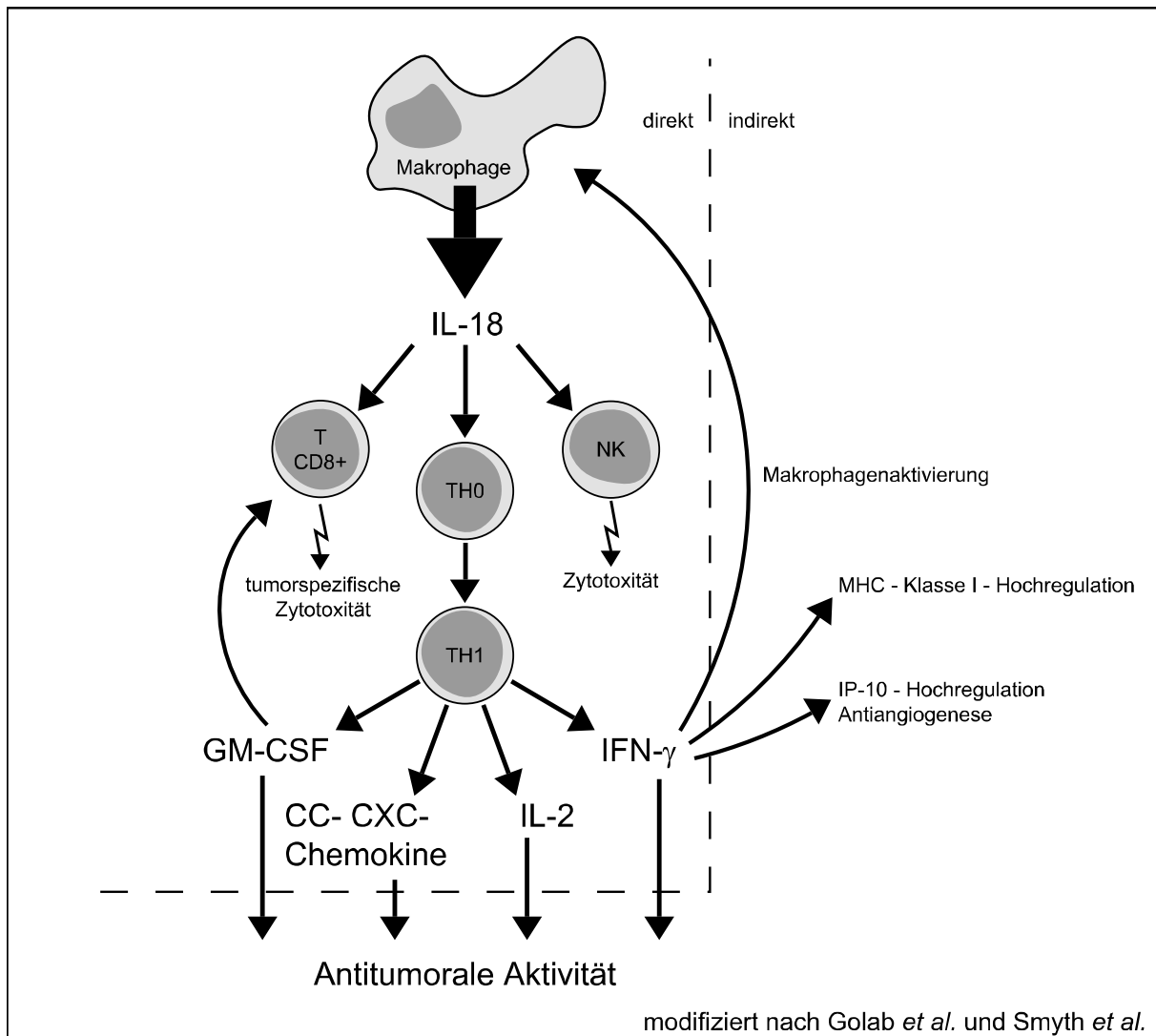


Abb. 1-2: Direkte und indirekte antitumorale Wirkmechanismen des Interleukin-18.

Im Sinne der Wirkung von IL-18 als TH1-Zytokin wird die Produktion von Granulozyten/Makrophagen-*Colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-2 und CC-, sowie CXC-Chemokinen stimuliert, welche eine antitumorale Antwort hervorrufen. Gleichzeitig wird die Produktion von TH2-Zytokinen, wie IL-10 und IL-4 inhibiert, welche für die Toleranz des Immunsystems gegenüber neoplastischem Gewebe verantwortlich sind. IL-18 scheint zunächst die unspezifische Immunabwehr über eine NK-Zell-Aktivierung zu stimulieren, die dann von einer sich entwickelnden spezifischen Immunantwort zytotoxischer T-Lymphozyten abgelöst wird. Über die rein immunologische Wirkung von IL-18 hinaus ist dieses Zytokin in der Lage, die tumorinduzierte Angiogenese zu hemmen [66]. Für diesen Effekt ist vornehmlich das Chemokin IP-10

verantwortlich [71]. Durch die Hemmung der Bildung von Blutgefäßen im Tumorbett kommt es zu einer Minderversorgung des neoplastischen Gewebes und zu einer konsekutiven Nekrose.

1.3.2 Antitumorale Effekte von Interleukin-18 in Mausmodellen

Signifikante antitumorale Effekte vermittelt durch IL-18 konnten in mehreren Maus-Modellen gezeigt werden. Der Effekt gegen ein intraperitoneal wachsendes murines Meth A Sarkom-Modell war von der Aktivität der NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten abhängig; nachweislich wurde eine Immunität gegen diese Tumorzellen induziert [69]. Synergistische Effekte von IL-18 und IL-12 wurden auf das Tumorstadium im murinen SCK-Mammakarzinom mit einer Regression von 70% erzielt. Hier war die Hemmung der Angiogenese ein wichtiger Faktor, wie sich in nachfolgenden histologischen Untersuchungen in ausgedehnten Nekroseherden zeigte [72]. Mit dem IL-18-Gen transfizierte Nierenzellkarzinome und K1735 Melanomzellen zeigten ein vermindertes Tumorstadium und die Entwicklung einer antitumoralen Immunität. Unter Depletion von CD4+-und CD8+-Zellen bzw. Blockade von IFN- γ mit monoklonalen Antikörpern waren diese Effekte nicht mehr erreichbar, während die alleinige Depletion von CD4+-Zellen keine Minderung der antitumoralen Antwort hervorrief [73]. In Versuchen mit CL8-1-Melanomzellen zeigte IL-18 antitumorale Effekte bei Gabe vor und/oder nach Tumorstadiuminokulation (80 bzw. 100% Wachstumshemmung). Nach NK-Zell-Depletion wurde das Tumorstadium nicht mehr inhibiert. Der Einsatz von IFN- γ - bzw. IL-12-*knock out*-Mäusen zeigte jedoch nur eine geringe Minderung der Tumorstadiuminhibition in diesem Versuch. Ein Antitumoreffekt war offensichtlich abhängig von NK- und CD4+-Zellen, nicht jedoch von einer IFN- γ - oder IL-12-Sekretion [67]. Das Wachstum vom MCA-Fibrosarkom, einem sehr aggressiven Tumor, im Mausmodell konnte ebenfalls durch IL-18 gehemmt werden. Allerdings kam es bei Kombination von IL-18 und IL-12 bei erfolgreicher Wachstumshemmung zu tödlichen toxischen Nebenwirkungen wie Diarrhoe, hämorrhagischer Kolitis und Gewichtsverlust bei Dosierungen von 1 μg und 0,1 μg genauso wie von 0,1 μg und 0,02 μg [67]. An der KG-1 myelomonozytischen Zelllinie zeigte IL-18 auch antileukämische Effekte. Dosisabhängig konnte die Induktion von Apoptose über die Steigerung der Fas-Liganden-gesteuerten Zytotoxizität nachgewiesen werden [74].

Der überwiegende Mechanismus der antitumoralen Aktivität von IL-18 bzw. von IL-18 in Kombination mit IL-12 in den verschiedenen Tumormodellen scheint also abhängig von der Art des Tumors zu sein. Das Zytokin ist in der Lage, auf verschiedenen Wegen effektive Minderungen des Tumorwachstums hervorzurufen und eine bleibende antitumorale Immunantwort zu induzieren. Als problematisch stellen sich die Toxizität des Zytokins und die dadurch induzierten Nebenwirkungen bei systemischer Gabe dar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mit neuen Therapieansätzen konnte die Prognose von Neuroblastompatienten in Stadium 4 des INSS nicht deutlich verbessert werden, so dass die Entwicklung neuer Therapiestrategien, wie effektiver immuntherapeutischer Ansätze, eine wichtige Option zur Prognoseverbesserung dieser Neoplasie darstellt. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz entwickelt, mesenchymale Stammzellen als Transporter für Interleukin-18 zur zielgerichteten Tumorimmuntherapie des Neuroblastoms herzustellen.

Die therapeutische Option, MSC als zelluläre Vehikel für antitumorale Wirkstoffe in den Tumor zu nutzen, ist bislang nur in Xenograft-Modellen untersucht worden [59,75]. In diesen Modellen sind immundefekte Nagetiere zum Einsatz gekommen, um in ihnen das Wachstum humaner Tumorzellen zu ermöglichen. Um eine realistischere Vorhersage über Wirkung und Mechanismus einer Immuntherapie für den Menschen zu treffen, müssen solche Versuche auch in syngenen, immunkompetenten Nagermodellen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird in dieser Arbeit das etablierte syngene Neuroblastommodell NXS2 für die A/J-Maus verwendet (Lode *et al.* [76]).

Ziel war es, für das existierende syngene Neuroblastommodell ein potentes mMSC-IL-18 Vehikel-System zu etablieren, um murines Interleukin-18 (mIL-18) mithilfe der mMSC direkt in den Tumor bringen zu können. Damit wird es möglich sein, neue Aussagen zur Effektivität einer zellulären Tumorimmuntherapie mit MSC zu treffen. Basierend auf der trifunktionalen Eigenschaft von IL-18, der Induktion einer TH1-Immunantwort, Hochregulierung von MHC-Klasse-I auf Tumorzellen und der Hem-

mung der tumorinduzierten Angiogenese, wurde das mL-18-Gen für die genetische Manipulation der MSC gewählt.

Um eine mMSC-Zelllinie für das syngene Neuroblastommodell zu etablieren, sollten die Zellen aus A/J-Mäusen isoliert und hinsichtlich ihres Verhaltens in der Kultur, ihres Phänotyps und ihrer Differenzierbarkeit charakterisiert werden. Für eine mL-18-Sekretion mussten funktionsfähige mL-18-exprimierende Vektoren hergestellt und MSC mittels Gentransfer modifiziert werden. Hierfür war die Etablierung verschiedener Methoden für die schwer transfizierbaren MSC nötig.

Für eine erste orientierende Einschätzung eines möglichen Antitumoreffektes des mMSC-IL-18 Konstruktes wurde ein Mausversuch mit NXS2-Tumorzellen durchgeführt.

- Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm², ventilierbare Kappe Falcon, USA
- Filtrationsset, 75 mm Filter, 500 ml Nalgene, USA
- Blue Max™ Zentrifugenröhrchen, 15 ml, konisch Falcon, USA
- Blue Max™ Zentrifugenröhrchen, 50 ml, konisch Falcon, USA
- Cryo Tube™ Vials, 1,8 ml Nunc, Dänemark
- Kanüle Microlance™ 3, 21 G Becton Dickinson, USA
- Spritze Injekt 2ml Braun, Deutschland
- Neubauerzählkammer Brand, Deutschland
- Zentrifuge Rotanta 460R Hettich Zentrifugen, Deutschland
- Reinstwasseranlage MilliQ-Plus Millipore, Deutschland
- CO₂-water jacked incubator Forma Scientific, USA
- Wasserbad Lauda E100 NeoLab, Deutschland
- Sterilarbeitsbank LaminAir HB2448 Heraeus Instruments, Deutschland
- Mikroskop Nikon TMS Nikon, Japan
- Tiefstkuhlschrank Ultra Low VIP™ Series -86°C Sanyo, Japan
- Stickstofftank Locator6+ Thermolyne, USA

2.1.1.2 Isolation der murinen mesenchymalen Stammzellen

Zur Isolation mesenchymaler Stammzellen wurde Knochenmark von 8-36 Wochen alten A/J-Mäusen gewonnen. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70% Ethanol desinfiziert. Unter einer Sicherheitswerkbank wurden Femur und Tibia der Mäuse präpariert, von konnektivem Gewebe befreit und an Hüft- und Sprunggelenk ohne Eröffnung des Markraumes abgesetzt. Nach Eröffnung des Markraumes wurde das Knochenmark aller vier Röhrenknochen eines Tieres mit 2 ml IMDM (2% FCS), einer 21 G-Kanüle und einer 2 ml-Spritze in eine Petrischale aus-

gespült. Der Vorgang wurde unter Verwendung desselben Mediums mehrmals wiederholt, um eine möglichst vollständige Entleerung des Markraumes zu erreichen. Durch vorsichtiges, wiederholtes Aspirieren der Zellsuspension mit der Kanüle und der Spritze wurde das Gewebe zerkleinert und so eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Suspension wurde aufgenommen, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen verbracht und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer erfolgte nach Trypanblau-Färbung; dabei kann zwischen lebenden und toten Zellen, die den Farbstoff inkorporieren, unterschieden werden. Erwartet werden für je zwei Femur- und Tibiaknochen einer Maus $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 10 min bei $400 \times g$ wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert und in einer Konzentration von $17,5 \times 10^6$ Zellen/well in die Vertiefungen (wells) einer 6-well-Platte ausplattiert. Bei geringer Zahl isolierter Zellen wurde die Zahl der ausplattierten Zellen auf $8,75 \times 10^6$ in 1,75 ml/well einer 12-well-Platte reduziert.

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 -Begasung kultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zur Eliminierung kontaminierender HSC in Suspension unter Ausnutzung der adhärenenten Eigenschaften der mMSC.

2.1.1.3 Kultur der murinen mesenchymalen Stammzellen

Grundsätzlich wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 -Begasung in 6-well-Platten, bzw. in 50 oder 75 cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde MesenCult Basal Medium unter Zusatz von Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) oder alternativ DMEM, dem 10% hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C) FCS, 3,7 g/l HEPES Puffer und 1% P/S (modifiziert nach da Silva Meirelles *et al.* [22]) zugesetzt wurde, verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage, Zellpassagen wurden bei mindestens 90% Konfluenz durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit HANKS' balanced salt solution wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/EDTA für 2 min inkubiert und durch sehr sanftes Klopfen von der Kulturoberfläche gelöst, die Zellsuspension wurde in Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen verbracht. Nach Zentrifugation für 6 min bei $400 \times g$ wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert, zur gewünschten Konzentration ver-

dünnt und ausplattiert. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet.

Bis zu Passage 4 erfolgten Mediumwechsel alle 3-4 Tage, Zellpassagen wurden nach 6-8 Tagen bei mindestens 90 % Konfluenz mit Verdünnungen von 1:2-1:5 durchgeführt. Danach erfolgten Zellpassagen alle 4 Tage mit steigendem Verdünnungsverhältnis bis maximal 1:25 bei steigender Kulturdauer.

2.1.1.4 Einfrieren und Auftauen der Stammzellen

Um Zellen zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden, wurden sie nach FACS-Analyse eingefroren. Dafür wurde 70% Kulturmedium (MesenCult Basal oder DMEM) mit 20% Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements oder FCS und 10% DMSO versetzt, ein Pellet von 10^6 - 10^7 mMSC in 1 ml dieses Gefriermediums resuspendiert und in Gefrier Röhrchen zunächst in -80°C verbracht. Die langfristige Lagerung der mMSC erfolgte in Flüssigstickstoff.

Bei Bedarf konnten die Zellen wieder aufgetaut werden. Das benötigte Kulturmedium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt und 10 ml davon in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Danach wurden gefrorene mMSC unter Schwenken im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut und vorsichtig in das 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, um eine Schädigung der Zellen durch das DMSO möglichst gering zu halten. Die Suspension wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, das entstandene Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm^2 -Kulturflasche verbracht.

2.1.2 Fibroblast Colony-forming unit Assay

2.1.2.1 Materialien

- PBS PAA Laboratories, Österreich
- Methanol Merck, Deutschland
- Giemsa Färbelösung Sigma-Aldrich, Deutschland

2.1.2.2 Durchführung

Für den Fibroblast colony-forming unit (CFU-F) Assay wurden frisch isolierte Zellen in einer Dichte von $4,5 \times 10^5$ in 2 ml Kulturmedium/well einer 6-well-Platte ausgesät. Am Tag 3 und 8 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. 14 Tage nach Aussähen der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS die Fixierung mit Methanol für 5 min, die Zellen wurden dann für 5 min mit Giemsa-Lösung gefärbt und abschließend mit H_2O gewaschen. Unter dem Mikroskop erfolgte das Auszählen der charakteristischen Kolonien. Als Kolonie wurde dabei eine aus mindestens fünf Zellen bestehende Formation gewertet.

2.1.3 Differenzierungsassay

2.1.3.1 Materialien

- Dexamethason Sigma, Deutschland
- Actrapid, Insulin-human Novo Nordisk A/S, Dänemark
- Ascorbinsäure Fluka, Deutschland
- β -Glycerol-Phosphat Sigma, Deutschland
- Formalin, säurefrei $\geq 37\%$ Roth, Deutschland
- Isopropanol Sigma, Deutschland
- Ammoniumhydroxid, NH_4OH Sigma, Deutschland
- Oil Red O Sigma, Deutschland
- Alizarin Red S Sigma, Deutschland
- pH-Meter, inoLab pH720 WTW GmbH, Deutschland

2.1.3.2 Durchführung

Das Aussähen von mMSC erfolgte in 6-well-Platten mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/2,5 ml Medium/well. Als Basismedium für die Negativkontrolle wurde DMEM unter Zusatz von 10% FCS, 3,7 g/l HEPES Puffer und 1% P/S modifiziert nach da Silva Meirelles *et al.* [22] verwendet. Diesem Medium wurden zur Induktion der adipogenen Differenzierung 10^{-8} mol/l Dexamethason und 5 μ l/ml Insulin, zur Induktion der

osteogenen Differenzierung 10^{-8} mol/l Dexamethason, 5 μ l/ml Ascorbinsäure und 10 mmol/l β -Glycerol-Phosphat zugesetzt. Diese Differenzierungsmedien wurden durch Filtration für Zellkulturbedingungen sterilisiert. Die Kultur der Zellen erfolgte über vier Wochen mit Mediumwechsel alle drei bis vier Tage und Zellpassagen bei mindestens 90% Konfluenz unter gleichen Bedingungen wie in der Zellkultur der murinen MSC.

Die Zellfärbung erfolgte vier Tage nach der letzten Passage. Die Färbelösungen wurden wie folgt hergestellt: 3,75% Oil Red O-Stammlösung wurde durch Mischen von Oil Red O mit Isopropanol hergestellt; 3 Teile Stammlösung wurden mit 2 Teilen Aqua dest. zur Arbeitslösung verdünnt und gefiltert; für 2% W/V-Alizarin Red S-Arbeitslösung wurde Alizarin Red S mit Aqua dest. gemischt und der pH 4,2 mit NH_4OH eingestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 10% Formalin fixiert. Die Färbung erfolgte für in die adipogene Richtung differenzierte Zellen mit Oil Red O-Lösung, für Zellen der osteogenen Differenzierung mit Alizarin Red S-Lösung für 20 min mit anschließendem Waschschrift mit Aqua dest. bis zur Entfärbung des Wassers. Dabei musste sehr vorsichtig gearbeitet werden, um die Monolayer der mMSC nicht zu zerstören. Nach dem Trocknen wurden die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert.

2.1.4 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

2.1.4.1 Materialien

- FITC-, PE-, APC-konjugierte Antikörper BD Biosciences, USA
- NaN_3 Sigma, Deutschland
- BSA Sigma, Deutschland
- FACS-Röhrchen, 5ml Polystyren Roundbottom Tubes, #2052 Falcon, USA
- FACScalibur Becton Dickinson, USA
- Analysesoftware CellQuest Pro Becton Dickinson, USA

2.1.4.2 Durchführung

Trypsinierte mMSC wurden in einem zentrifugalen Waschschrift für 6 min bei 400 x g bei 4°C unter Zugabe von 2 ml PBS in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gereinigt, gezählt und in FACS-Puffer (PBS versetzt mit 0,02% NaN₃ und 0,1% BSA) zu einer Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml resuspendiert. 10 Aliquots dieser Zellsuspension á 200 µl wurden in jeweils ein FACS-Röhrchen pipettiert, erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen nach der Übersicht in Tabelle 2-1 gefärbt.

Tabelle 2-1: Färbeschema für die Bestimmung des immunologischen Phänotyps der mMSC mittels FACS mit fluoreszierenden AK.

Probe	FITC-konjugierter Ak	PE-konjugierter Ak	APC-konjugierter Ak
1	blank	blank	Blank
2	Sca-1	blank	Blank
3	blank	CD 44	Blank
4	blank	blank	c-Kit
5	CD 45	CD 44	c-Kit
6	Sca-1	CD 44	c-Kit
7	CD 29	CD 44	Blank
8	CD 31	CD 34	c-Kit
9	CD 90.2	VEGF R2	c-Kit
10	CD 106	CD 34	c-Kit

Dabei wurden jeweils 0,8 µl jedes Antikörpers und 200 µl FACS-Puffer pro Röhrchen verwendet, durch Auf-und Abpipettieren wurde der Ansatz durchmischt und im Dunklen auf Eis für 60 min inkubiert.

Durch zwei zentrifugale Waschschriffe (400 x g, 6 min, 4°C) mit 500 µl FACS-Puffer, Entfernen des Überstandes und finale Resuspension in 800 µl FACS-Puffer wurden

die Zellen für die Messung vorbereitet und dabei stets im Dunklen und auf Eis gelagert.

Die Messung der Proben erfolgte an einem FACScalibur Gerät mit vier Lasern. Mit Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden die Größe der Zellen und ihre Granularität bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit den folgend aufgeführten Kombinationen aus Laser und Filtern angeregt und gemessen.

Tabelle 2-2: Übersicht für die in dieser Arbeit verwendeten Laser/Filter des FACScalibur und gemessenen Fluoreszenzen.

Farbstoffe	Laser (Anregung)	Kanal	Filter (Emission)
FITC	525 nm (grün)	FL1	530/30 nm
PE	575 nm (orange-rot)	FL2	585/42 nm
APC	660 nm (rot)	FL4	661/16 nm

Für die Einstellung des Gerätes wurden nicht gefärbte mMSC als Negativkontrolle verwendet und Vorwärts- sowie Seitwärtsstreulicht so eingestellt, dass sich die Zellpopulation deutlich im Zentrum des Dot-Plots befand. Die Fluoreszenzen FL-1 (grün), FL-2 (orange-rot), und FL-4 (rot) wurden in Histogrammen so eingestellt, dass sich die Negativkontrolle im Bereich $<10^1$ befand. Mit sicher positiven Proben für eine der beiden Fluoreszenzen FL-1 und FL-2 wurden Überschneidungen beider Fluoreszenzen im Density-Plot kompensiert. Nach der Messung wurden Fluoreszenzintensität und Anfärbungsmuster der einzelnen Proben mit der CellQuest Pro-Software ausgewertet.

2.2 Herstellung von mL-18 exprimierenden Plasmiden

2.2.1 Bakterienstamm und Plasmide

Zur chemischen Transformation von Plasmid-DNA wurden chemokompetente E. coli JM109 verwendet.

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstamm.

Plasmid	Charakteristika	Herkunft
Escherichia coli JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , (<i>lac-proAB</i>), ϕ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> q ZM15	Promega, Wisconsin, USA

Tabelle 2-4: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Charakteristika	Herkunft
pGEM [®] -T-Easy	Amp	enthält T-Überhang zur einfachen Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang	Promega, Madison, WI
pEGFP	Amp	enthält das Gen für das <i>Green Fluorescent Protein</i> , das mittels FACS gemessen werden kann	Clontech, CA, USA
pcDNA3.1	Amp, Zeo	Neo, Expressionsvektor	Invitrogen, USA
pcDNA3.1-mIL-18	Amp, Zeo	Neo, über die <i>XhoI</i> und <i>NotI</i> Schnittstellen der Expressionskassette von pcDNA3.1 wurde mIL-18 einkloniert	Prof. Dr. med Holger N. Lode, Charité Berlin
pPR1	Amp, Zeo	lentiviraler Transfervektor, enthält EGFP	Tronolab, Schweiz
pPR1-mIL-18	Amp, Zeo	in pPR1 wurde das mIL-18 über die <i>AscI</i> und <i>SacII</i> Schnittstellen einkloniert	diese Arbeit
pPRIEG7	Amp, Zeo	lentiviraler Transfervektor, enthält IRES-EGFP-Kozak-Kassette	Tronolab, Schweiz
pPRIEG7-mIL-18	Amp, Zeo	in pPRIEG7 wurde das mIL-18 über die <i>AscI</i> und <i>SacII</i> Schnittstellen einkloniert	diese Arbeit
pMD2.G		lentiviraler Hilfsvektor, Expression des Env-Proteins	Tronolab, Schweiz
pRSV-Rev		lentiviraler Hilfsvektor, Expression des Rev-Proteins	Tronolab, Schweiz
pMDLg/pRRE		lentiviraler Hilfsvektor, Expression von Gag- und Pol-Protein	Tronolab, Schweiz

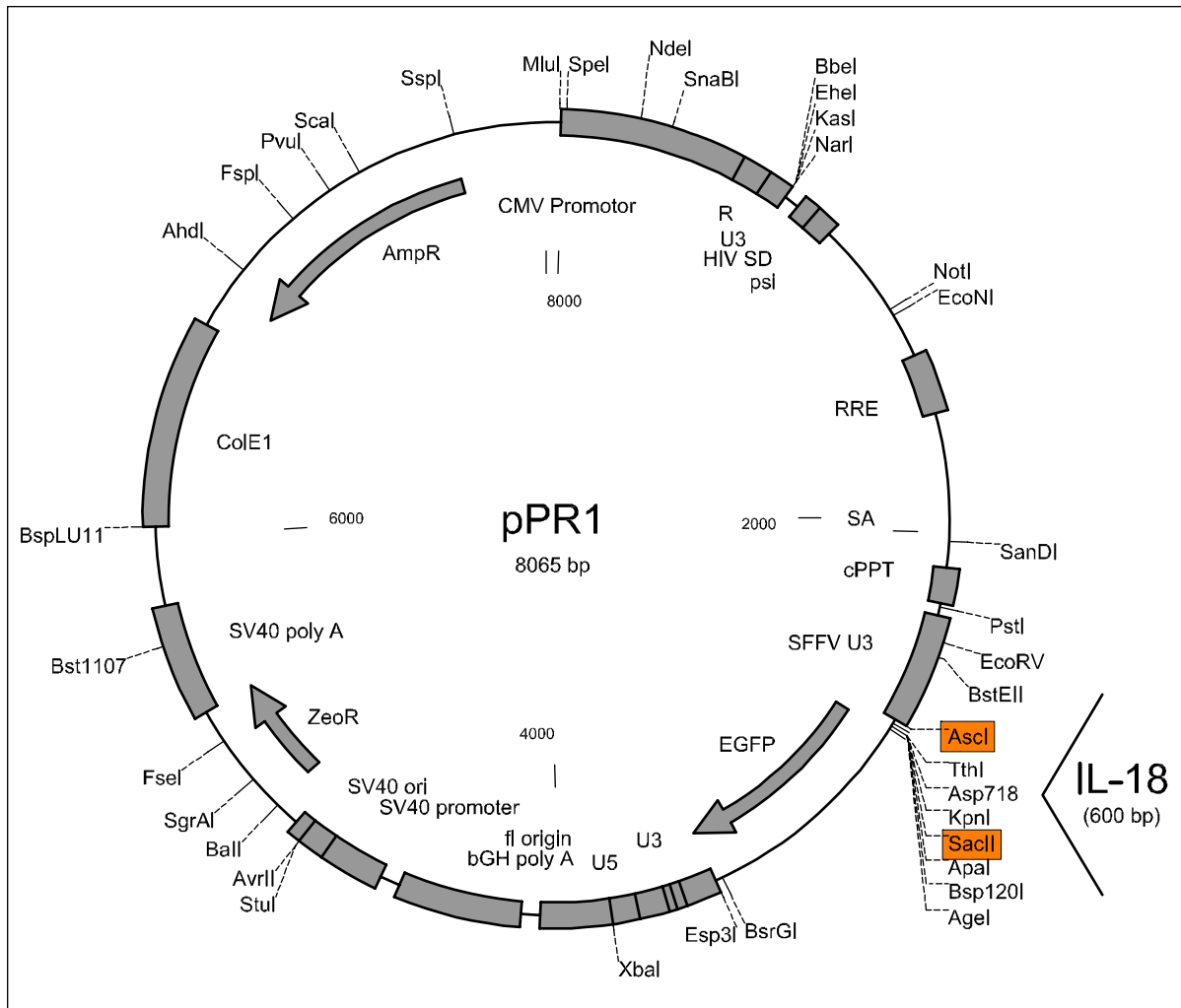


Abb. 2-1: Lentiviraler Transfervektor pPR1. Über die Schnittstellen *Ascl* und *SacII* wurde mIL-18 in den Vektor kloniert. Der Vektor pPR1-mIL-18 hat eine Gesamtgröße von 8665 bp.

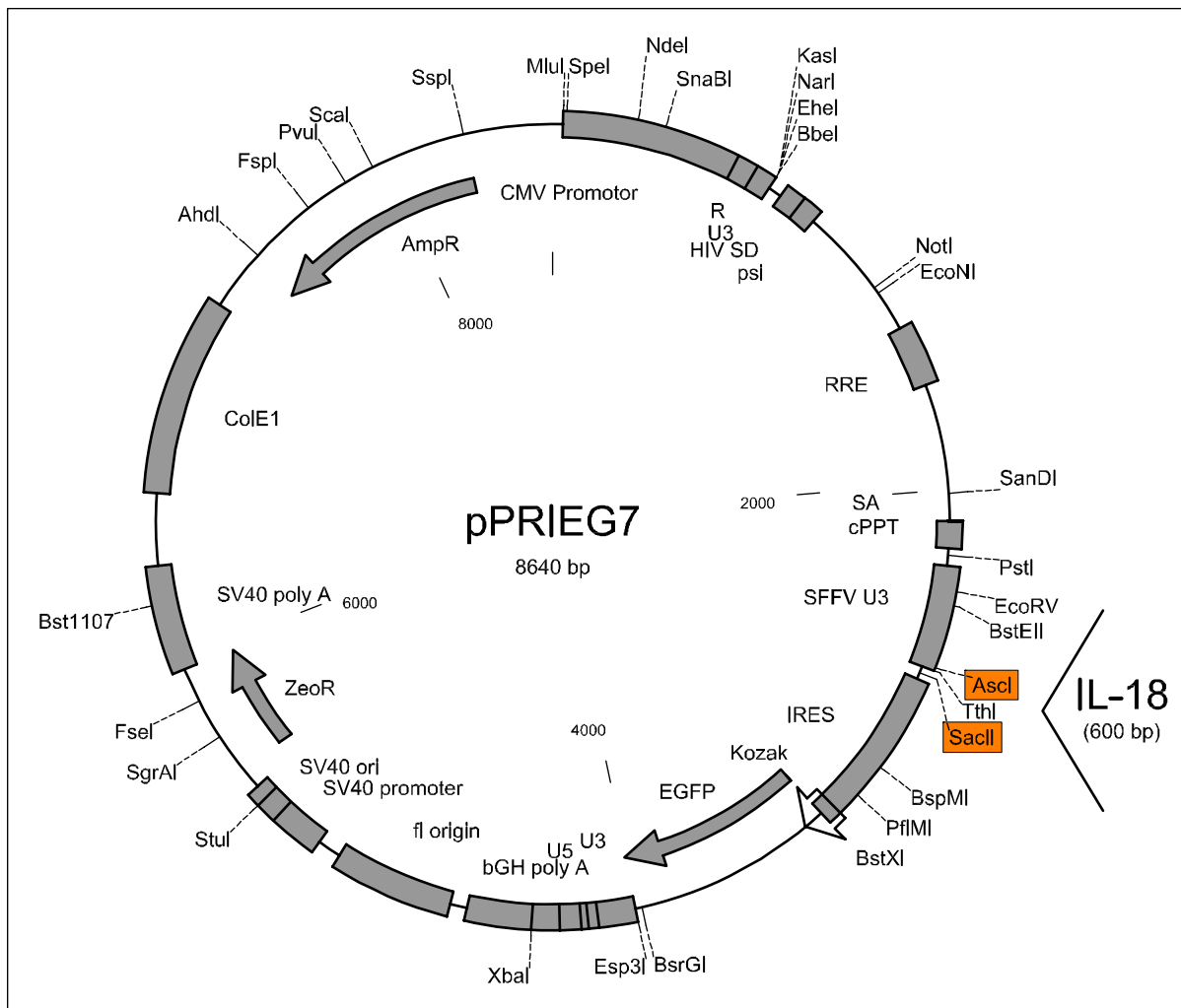


Abb. 2-2: Lentiviraler Transfervektor pPRIEG7. Über die Schnittstellen *Ascl* und *SacII* wurde mL-18 in den Vektor kloniert. Der Vektor pPRIEG7-mL-18 hat eine Gesamtgröße von 9240 bp.

2.2.2 PCR und Klonierung von PCR-Fragmenten

2.2.2.1 Materialien

- Primer TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Deutschland
- Taq-Polymerase, 5 u/µl Promega, USA
- dNTP-Mix, je 10 mM Promega, USA
- MgCl₂, 25 mM Promega, USA
- PCR-Puffer (10x) Promega, USA
- Ampicillin Sigma, Deutschland
- X-Gal Promega, USA
- IPTG Promega, USA
- LB-Agar (Lennox L Agar) GIBCO, Invitrogen, USA
- LB-Flüssigmedium LB Broth Base (Lennox L Broth Base) GIBCO, Invitrogen, USA
- Agarose, NEEO Roth, Deutschland
- Tris Acetat Sigma, Deutschland
- EDTA Sigma, Deutschland
- 1 kbp- und 100 bp-ladder, loading dye MBI Fermentas GmbH, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen, 1,5 ml Eppendorf, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen, 0,5 ml Eppendorf, Deutschland
- Küvette UVette Eppendorf, Deutschland
- NucleoSpin[®] Extract II Macherey-Nagel, Deutschland
- NucleoSpin[®] Plasmid Macherey-Nagel, Deutschland
- PCR Gerät, Mastercycler gradient Eppendorf, Deutschland
- BioPhotometer Eppendorf, Deutschland
- Schüttelinkubator Edmund Bühler, Deutschland

2.2.2.2 PCR mit mL-18 Templates

Mit mL-18 als Template wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt, um die für die Klonierung in die lentiviralen Transfervektoren pPR1 und pPRIEG7 benötigten Restriktionsschnittstellen einzufügen. Die beiden Schnittstellen *Ascl* und *SacII* wurden gewählt, da sie in beiden lentiviralen Plasmiden vorkommen. Das Design der ca. 30 Basen langen Primer wurde so bestimmt, dass ca. 24 Basen mit dem Template überlappten, während der Rest zur Synthese der Restriktionsschnittstelle diente. Die Primersequenzen sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 2-5: Primersequenzen für die Herstellung der mL-18-Fragmente für die Klonierung in die lentiviralen Transfervektoren pPR1 und pPRIEG7; unterstrichen sind die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen, kursiv die Überlappung mit der mL-18-Sequenz dargestellt.

Primer	Länge	Sequenz
<i>Ascl</i> -mL-18	30 bp	<u>GGCGCGCCAATGAGTGTGCCCACTCAGGTC</u>
<i>SacII</i> -mL-18	27 bp	<u>CCGCGGCTAACTTTGATGTAAGTTAGT</u>

Aus den lyophilisierten Primern wurde zunächst nach Herstellerangaben mit Aqua dest. eine 100 µM Stammlösung hergestellt, die bei -20°C gelagert wurde. Für die PCR wurde diese 1:10 verdünnt, so dass die Arbeitslösung eine Konzentration von 10 pmol/µl aufwies. Zur Herstellung des mL-18-Fragmentes mit den passenden Schnittstellen wurde eine PCR im Eppendorf Mastercycler nach folgendem Protokoll durchgeführt.

PCR-Programm:

95°C	2 min
95°C	30 s
63°C	45 s
72°C	1 min
30 Zyklen	
72°C	7 min
4°C	stand

Folgender 50 µl-Ansatz für diese PCR wurde in 0,5 ml-Röhrchen eingesetzt:

forward Primer	2 µl
reverse Primer	2 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ , 25 mM	3 µl
Template	ca. 50 ng
dNTP-Mix, je 10 mM	1 µl
Aqua dest.	ad 50 µl
Taq-Polymerase, 5 u/µl	1 µl

2.2.2.3 Aufreinigung und Ligation in den pGEM[®]-T Easy-Vektor

Die gesamten PCR-Ansätze wurden auf ein 1%iges Agarosegel, gelöst in 1x TAE-Puffer (50x TAE-Puffer pH 8,3 wurde durch das sorgfältige Mischen von Aqua dest. mit 2 M Tris Acetat und 50 mM EDTA hergestellt) mit 1 kbp- und 100 bp-Leitern aufgetragen und in Frage kommende Banden herausgeschnitten. Mit dem NucleoSpin Extract II-Kit wurden die Fragmente nach Herstellerangaben eluiert. Ihre Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt. Für die folgende Sequenzierung wurden ca. 50 ng des gereinigten PCR-Fragmentes in den pGEM[®]-T Easy-Vektor nach Herstellerangaben ligiert und 50 µl chemokompetente E. coli JM109 mit der Hälfte des Ligationsansatzes mittels Hitzeschock (42°C) transformiert. Mit dem pGEM[®]-T Easy-Vektor ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich, daher wurde auf die Amp-LB-Platten vor dem Ausplattieren der Bakteriensuspension 100 µl 100 mM IPTG und 20 µl 50 ng/ml X-Gal gegeben, bevor die E. coli-Suspension ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden mehrere weiße Kolonien gepickt und über Nacht in LB-Flüssigmedium mit 100 mg/ml Amp bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen. Die Plasmide wurden mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid-Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. 0,5 µg des Plasmids wurden zur Kontrolle mit spezifischen Restriktionsenzymen bei 37°C für 1 h verdaut (siehe Abschnitt 2.2.4.2) und zum Nachweis herausgeschnittener Fragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3 Fällung und Sequenzierung von Plasmid-DNA

2.2.3.1 Materialien

- Natriumacetat Sigma, Deutschland
- Zentrifuge Mikro 22R Hettich Zentrifugen, Deutschland
- Software zur Sequenzüberprüfung DNAsis

2.2.3.2 Durchführung

Zur Überprüfung der Sequenz von DNA-Fragmenten musste Plasmid-DNA, welche nach dem Verdau in Frage kommende Inserts enthielt, zunächst gefällt werden. 1 bis 2 µg DNA wurden mit 2,5 Volumina Ethanol und 0,1 Volumina 3M Natriumacetat versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Darauf folgend wurden diese Ansätze bei 24000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 100 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min und Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet.

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der Sequenzprimer M13uni (-21) und M13reverse (-29) durch die Firma MWG-Biotech.

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit der Software DNAsis.

2.2.4 Ligation und Restriktion von DNA

2.2.4.1 Materialien

- Restriktionsenzyme *Ascl*, *SacII*, *XhoI* und *NotI* New England Biolabs, USA
- NEB Puffer 3 und 4 New England Biolabs, USA
- BSA (10x) New England Biolabs, USA
- T4-DNA-Ligase (3 u/µl) New England Biolabs, USA

- T4-DNA-Ligase Puffer (10x) New England Biolabs, USA
- Vortexer Fisher Vortex Genie2™ Fisher Scientific, USA

2.2.4.2 Restriktion der mL-18-DNA-Fragmente

Für die Expression der mL-18-DNA-Fragmente mussten sie in die lentiviralen Transfervektoren subkloniert werden. Dafür wurden sie zuerst mit Hilfe der generierten Restriktionsschnittstellen aus dem Sequenzierungsvektor pGEM[®]-T Easy herausgeschnitten. Die Ansätze wurden wie folgt bei 37°C für 1 h inkubiert.

Restriktion der *Ascl*-*SaclI*- pGEM[®]-T Easy-mL-18-Vektoren:

DNA	x µl (20 µg)
<i>Ascl</i>	1 µl
<i>SaclI</i>	1 µl
NEB Puffer 4	3 µl
Aqua dest.	ad 30 µl

Der Restriktionsansatz wurde danach in einem 1%igen Agarosegel zusammen mit 1 kbp- und 100 bp-Leitern aufgetrennt, die betreffende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und im NucleoSpin Extract II-Kit extrahiert. Die Konzentration des Fragmentes wurde photometrisch bestimmt.

2.2.4.3 Linearisierung der Transfervektoren

Für die Klonierung der mL-18-Fragmente in die Vektoren pPR1 und pPRIEG7 mussten diese zunächst linearisiert werden. Dafür wurden 10 µg dieser Vektoren homolog zu den mL-18-Fragmenten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen bei 37°C für 2 h geschnitten.

Restriktion der pPR1- und pPRIEG7-Vektoren:

DNA	x μ l (10 μ g)
Ascl	1 μ l
SaclI	1 μ l
NEB Puffer 4	3 μ l
Aqua dest.	ad 30 μ l

Wieder wurde der Ansatz in einem 1%igen Agarosegel zusammen mit 1 kbp- und 100 bp-Leitern aufgetrennt, die betreffende Bande isoliert, im NucleoSpin Extract II-Kit extrahiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.4.4 Ligation der mL-18-DNA-Fragmente in die Vektoren pPR1 und pPRIEG7

Bei der Ligation der mL-18-DNA-Fragmente in die lentiviralen Transfervektoren pPR1 und pPRIEG7 wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt. Alle Reagenzien wurden vor Zugabe der T4-Ligase durch Vortexen gründlich gemischt und im Wasserbad für 5 min bei 42°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen für 1 min auf Eis wurde die T4-Ligase zugegeben und die Ligation bei 4°C über Nacht durchgeführt.

Ligation von Ascl-SaclI-pPR1 bzw. Ascl-SaclI-pPRIEG7 mit Ascl-SaclI-mL-18:

Ascl-SaclI-pPR1/-pPRIEG7	x μ l (50 ng)
Ascl-SaclI-mL-18	x μ l (150 ng)
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	2 μ l
T4-DNA-Ligase (3 u/ μ l)	1 μ l
Aqua dest.	ad 20 μ l

Mit der Hälfte des jeweiligen Ligationsansatzes wurden E. coli JM109 transformiert (siehe 2.2.5.2).

2.2.4.5 Restriktionsverdau von pcDNA3.1-mIL-18

Zur Überprüfung des korrekten Einbaus des mIL-18-Fragmentes in den Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde ein Restriktionsverdau mit den spezifisch schneidenden Enzymen *XhoI* und *NotI* durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert.

Restriktion des *XhoI-NotI*-pcDNA3.1-mIL-18-Vektors:

DNA	x µl (20 µg)
<i>XhoI</i>	1 µl
<i>NotI</i>	1 µl
NEB Puffer 3	3 µl
BSA (10x)	3 µl
Aqua dest.	ad 30 µl

Das Restriktionsprodukt wurde im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und hinsichtlich der erwarteten Banden überprüft.

2.2.5 Plasmidpräparation

2.2.5.1 Materialien

- SOC-Medium Invitrogen, USA
- Glycerol Sigma, Deutschland
- Nucleobond[®] PC500 Macherey-Nagel, Deutschland
- NucleoSpin[®] Finalizer Plus Macherey-Nagel, Deutschland
- EndoFree[®] Plasmid Maxi Qiagen, Deutschland
- Thermomixer comfort Eppendorf, Deutschland
- Wasserbad Haake Fisons C1 Haake, Deutschland

2.2.5.2 Chemische Transformation von *E. coli*

E. coli JM109 wurden mit der Hälfte eines Ligationsansatzes oder mit 2 µl vorhandener Plasmide chemisch transformiert. Dazu wurde die DNA vorsichtig einem 50 µl

Aliquot E. coli JM109 auf Eis hinzugefügt und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C im nicht mehr sprudelnden Wasserbad und eine Abkühlung der Bakterien auf Eis für 2 min. Nun wurden 200 µl SOC-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C und 500 rpm geschüttelt. 150 µl des Ansatzes wurden auf vorgewärmte LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.3 DNA-Plasmidisolierung

E. coli JM109-Kolonien von LB-Amp-Agarplatten wurden über Nacht in 4 ml LB-Flüssigmedium mit 100 mg/ml Amp bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen. Am nächsten Tag wurde die DNA aus den gewachsenen Kulturen isoliert und mittels Restriktionsverdau mit spezifisch schneidenden Enzymen der korrekte Einbau von Fragmenten bzw. korrekte Plasmidgröße im 1%igen Agarosegel nachgewiesen. Von Backup-Kolonien korrekter Klone wurden nun Kulturen in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 100 mg/ml Amp bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert und am nächsten Tag mit dem Nucleobond-Kit aufgereinigt.

Die Plasmidisolierung erfolgte generell mit Sets von Macherey-Nagel unter Beachtung des vom Hersteller gelieferten Protokolls. Die Isolation aller lentiviralen Transfektionsvektoren erfolgte mit dem EndoFree-Plasmidisolationskit von Qiagen zur Eliminierung von die Transfektionseffizienz erheblich beeinträchtigenden Endotoxinen.

Die Kits basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Bakterien werden mit einer SDS- und NaOH-haltigen Lösung lysiert. SDS denaturiert Proteine, NaOH denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA. Die Lösung wird unter Zugabe von saurem Kaliumacetat neutralisiert. Denaturierte Proteine, chromosomale DNA und hochmolekulare RNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfates. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und renaturiert. Nach Abtrennung der präzipitierten denaturierten Proteine, chromosomalen DNA und hochmolekularen RNA entweder durch einen Zentrifugationsschritt oder durch Filtration wird der Überstand auf eine Silica-Membran gegeben, an welche die Plasmid-DNA bindet. Nach darauffolgenden Waschschrritten wird die Plasmid-DNA in Aqua dest. eluiert.

Der DNA-Gehalt wurde für die Maxi-Präparation photometrisch, für die Mini-Präparation photometrisch und mittels Gelelektrophorese bestimmt.

2.2.5.4 Anlegen von Glycerol-Stocks

500 µl einer Bakteriensuspension von E. coli JM109, die einen Vektor mit korrekten Inserts enthielten, wurden durch sorgfältiges Mischen mit 500 µl 50%igem Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

2.3 Generierung von mL-18 exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen

2.3.1 Kultur von COS-7- und HEK293-Zellen

Adhärente COS-7- (ATTC CRL-1651) und HEK293-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM, versetzt mit 10% FCS und 1% P/S, bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 passagiert oder für Transfektionsexperimente geerntet. Dafür wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen 2 min mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit 3 ml Kulturmedium neutralisiert und ein Zehntel der Zellsuspension mit Kulturmedium aufgefüllt.

2.3.2 Transiente Transfektion von murinen mesenchymalen Stammzellen bzw. COS-7-Zellen

2.3.2.1 Materialien

- FuGene 6 Transfektionsreagenz Roche, Deutschland
- SuperFect Qiagen, Deutschland
- ExGene500 Fermentas, USA
- Lipofectamine 2000 Invitrogen, USA
- Elektroporationsküvetten 2 mm gap, 100 µl Volumen Eppendorf, Deutschland

- Human MSC Nucleofector[®] Kit Amaxa Biosystems, Deutschland
- Eppendorf Multiporator Eppendorf, Deutschland
- Nucleofector Gerät Amaxa Biosystems, Deutschland

2.3.2.2 Transfektion muriner mesenchymaler Stammzellen mit pEGFP

Um die Transfizierbarkeit für die schwer transfizierbaren mMSC zu evaluieren, wurde für erste Transfektionsversuche pEGFP-DNA verwendet. Mit pEGFP transfizierte Zellen exprimieren das *Green Fluorescent Protein*, welches mittels FACS gemessen werden kann.

Es wurden verschiedene Reagenzien für die Lipid-basierte Transfektion verwendet, bei der Lipidtröpfchen aus Transfektionsreagenz und DNA mit der Zielzelle fusionieren. Die mMSC wurden in definierten Zelldichten ausgesät und am nächsten Tag mit FuGene 6, SuperFect, ExGene 500 bzw. Lipofectamine 2000 mit folgenden Reagenz : DNA-Verhältnissen ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) nach Herstellerangaben transfiziert:

Transfektionsreagenz	Zelldichte	Reagenz (μl) : DNA (μg)
FuGene 6	2×10^5	6:1, 10:1
SuperFect	2×10^5	12:1, 15:1
ExGene 500	$0,6 \times 10^5$	5:1, 6:1, 7:1, 8:1
Lipofectamine 2000	1×10^5	2,5:1, 4:1, 5:1

Mit der Elektroporation wurde pEGFP-DNA durch Diffusion in mMSC verbracht. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung werden Poren in der Zellmembran der zu transfizierenden Zellen geöffnet und der Übergang der zu transfizierenden DNA ins Zellinnere wird ermöglicht. Es wurde der Eppendorf Multiporator verwendet und nach Herstellerangaben gearbeitet.

Weiterhin wurde die Amaxa Nucleofector-Technologie zur Transfektion der mMSC verwendet [77]. Dabei wird die Elektroporation mit speziellen Reagenzien kombiniert,

deren Zusammensetzung abhängig von der eingesetzten Zielzelle variiert. Es wurde das System für humane MSC verwendet und modifiziert, da kein spezielles Reagenz für mMSC angeboten wurde. Es wurden 5×10^5 Zellen aus 85 % konfluenten Kulturen geerntet und durch sorgfältiges Mischen eine Einzellzellsuspension hergestellt, um eine bessere Transfizierbarkeit zu erreichen. Die Zellen wurden mit dem Elektroporationsprogramm U-23, S-15 und S-16 transfiziert und sofort in Kulturmedium aufgenommen, um den Tod der Zellen zu verhindern.

2.3.2.3 Transfektion von COS-7-Zellen bzw. murinen mesenchymalen Stammzellen mit pcDNA3.1-mIL-18

Um die Expression von mIL-18 im pcDNA3.1-Vektor zu überprüfen, wurden zunächst COS-7-Zellen mit pcDNA3.1-mIL-18 mit FuGene 6 transfiziert. Die Transfektion wurde mit Reagenz : DNA-Verhältnissen ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) von 6:1 und 10:1 nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Transfektion von pcDNA3.1 bzw. pcDNA3.1-mIL-18 in mMSC erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Transfektionsversuche mit pEGFP mit Lipofectamin 2000 und der Amaxa Technologie. Für die Transfektion mit Lipofectamin 2000 wurden mMSC in einer Dichte von 1×10^5 ausgesät und am folgenden Tag mit Reagenz : DNA-Verhältnissen ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) von 2,5:1, 4:1, 5:1 transfiziert. Für die Transfektion mit der Amaxa Technologie wurden 5×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen unter Einsatz des Reagenz für humane MSC mit dem Programm U-23 elektroporiert.

2.3.3 Stabiler lentiviraler Gentransfer in murine mesenchymale Stammzellen

2.3.3.1 Materialien

- Calciumchlorid, CaCl_2 Sigma, Deutschland
- Natriumchlorid, NaCl Sigma, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 Merck, Deutschland
- Natriumhydroxid, NaOH Sigma, Deutschland

2.3.3.2 Durchführung

Der lentivirale Gentransfer in mMSC erfolgte in zwei grundsätzlichen Arbeitsschritten, der Transfektion einer Hilfszelllinie mit den lentiviralen Transfervektoren pPR1 bzw. pPR1-mIL-18 oder pPRIEG7 bzw. pPRIEG7-mIL-18 und den Helferplasmiden pMD2.G, pRSV-Rev und pMDLg/pRRE und der folgenden Transduktion der mMSC als Zielzelle mit, durch die Hilfszelllinie produzierten Viruspartikeln. Die Aufspaltung des lentiviralen Genoms gewährleistet die Sicherheit der Transfektionsmethode.

Zunächst werden alle 4 Vektoren in die Hilfszelle HEK293 kotransfiziert, in welcher die Virusproduktion stattfindet. Nur bei simultaner Expression aller vier lentiviralen Proteine in der Hilfszelle werden intakte Viruspartikel gebildet, die in der Lage sind die Zielzelle zu infizieren, also zu transduzieren. Während der Virusproduktion in der Hilfszelle gehen die Helferplasmide, die für den Aufbau des Virus notwendig sind, verloren. Im Überstand befinden sich Viren, die ausschließlich den Transfervektor tragen. Werden sie auf die Zielzellen, die mMSC gegeben, infizieren sie diese und die Transfervektoren werden ungerichtet in das Genmaterial der Zielzelle eingebaut. Durch den Verlust der Helferplasmide kann es nicht zur erneuten Virusproduktion kommen.

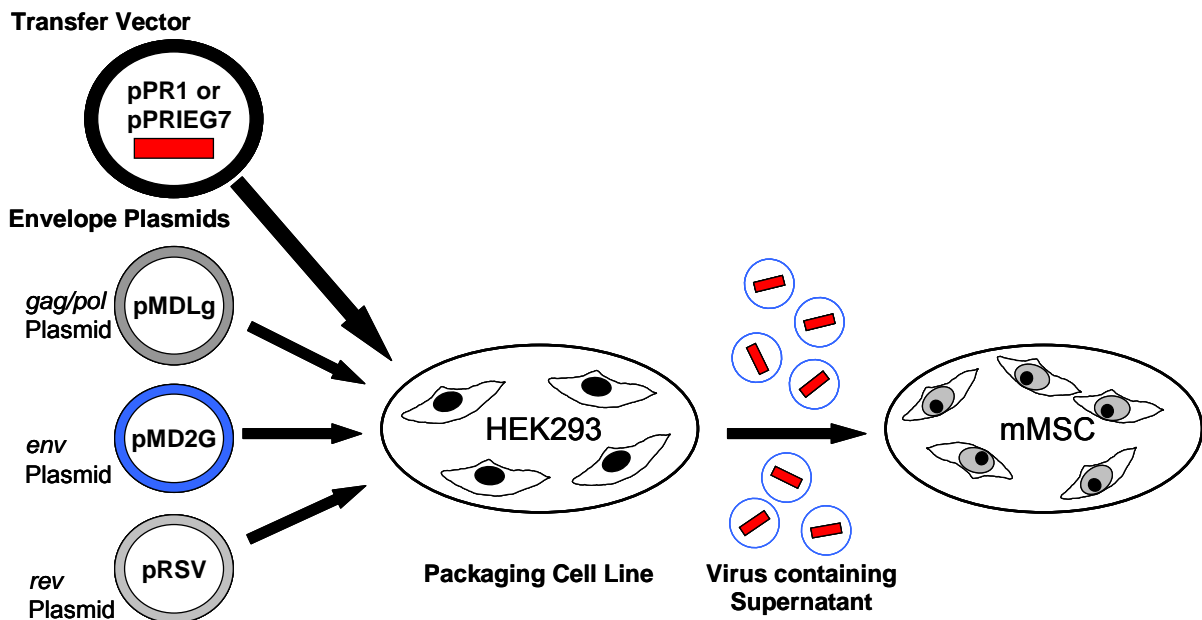


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des lentiviralen Gentransfers mit dem Transfervektor pPR1 oder pPRIEG7 und den drei Helferplasmiden pMDLg, pMD2G und pRSV.

Die verwendeten lentiviralen Transfervektoren enthalten neben Resistenzen gegen Zeocin und Ampicillin das *Green Fluorescent Protein*, welches eine Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS ermöglicht. Der Vektor pPRIEG7 enthält darüber hinaus die Kozak-Kassette, welche die Expression von Proteinen begünstigt.

An Tag 1 wurden HEK293-Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/2 ml DMEM, versetzt mit 10% FCS und 1% P/S in einer 6-well-Platte ausgesät, um am nächsten Tag eine Konfluenz von 50% zu erreichen. An Tag 2 wurden die HEK293-Zellen Lipid-basiert mit FuGene 6 entsprechend der Herstellerangaben mit Reagenz : DNA-Verhältnissen ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) von 3:1 und 6:1 kotransfiziert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen der Plasmide verwendet:

	1	2
pMD2.G	1 μg	1 μg
pMDLG/pRRE	2,5 μg	2 μg
pRSV-Rev	1 μg	1 μg
pPR1-mIL-18 bzw. pPRIEG7- mIL-18 oder mock-Vektoren	2 μg	4 μg

Alternativ dazu wurden HEK293-Zellen CaCl_2 -basiert mit den gleichen DNA-Verhältnissen kotransfiziert. Vorbereitend wurden die benötigte 0,5 molare CaCl_2 -Lösung und 2fach konzentrierte HeBS-Lösung hergestellt, die bei -80°C gelagert wurden und nach dem Auftauen bei 4°C bis zu 3 Monate gebrauchsfähig blieben.

2x HeBS-Lösung: 280 mM NaCl
 0,5 mM HEPES
 1,5 mM Na_2HPO_4
 Aqua dest. ad 800 ml
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt

HEPES-Puffer (Arbeitslösung aus 31,25 μ l HEPES und 12,5 ml Aqua dest.) wurde durch Vortexen gründlich mit den Plasmiden in Verhältnis 1 oder 2 (siehe oben) gemischt. Die gleiche Menge 0,5 molarer CaCl_2 -Lösung wurde zugegeben. Nun wurde unter ständigem Vortexen 2fach konzentrierte HeBS-Lösung hinzugegeben, um die Bildung von Plasmid- CaCl_2 -Tröpfchen zu unterstützen. Folgender Ansatz wurde für 2 wells pipettiert:

CaCl_2 -basierte Transfektion von HEK293-Zellen:

Plasmid-Mix 1 oder 2	x μ l
HEPES-Puffer	ad 250 μ l
CaCl_2	250 μ l
HeBS 2x	250 μ l

Von der entstandenen Lösung wurden 200 μ l in den Ansatz eines wells getropft.

Die kotransfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 -Begasung für 72 h inkubiert. Murine MSC wurden an Tag 4 in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/2 ml Kulturmedium in 6-well-Platten ausgesät. An Tag 5 wurde der Überstand von den HEK293-Zellen abgenommen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Auf das Filtern des Überstandes wurde verzichtet, um den Virustiter nicht herabzusetzen. Nun wurde 1 ml des Kulturmediums von den Zielzellen entfernt und durch 2 ml des virushaltigen Überstandes ersetzt. Die so transfizierten mMSC wurden bei 37°C und 5% CO_2 -Begasung für 48 h inkubiert.

2.3.4 Messung der Transfektionseffizienz mittels FACS

48 h nach dem Gentransfer wurden die transfizierten oder transduzierten Zellen mit Trypsin/EDTA von der Kulturoberfläche gelöst, ein Teil wurde weiter kultiviert, ein Teil wurde zur Messung jeweils einmal in PBS, sowie in FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde jedes Pellet in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACScalibur Gerät. Für die Einstellung des Gerätes wurden nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle verwendet und Vorwärts- sowie Seitwärtsstreulicht so eingestellt, dass sich die Zellpopulation deutlich im Zentrum des Dot-Plots befand.

Die erste, grüne Fluoreszenz FL-1 wurde so eingestellt, dass sich die Negativkontrolle im Bereich $<10^1$ befand. Nach der Messung wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben mit der CellQuest Pro-Software ausgewertet.

2.3.5 Bestimmung der mL-18-Konzentration mittels ELISA

2.3.5.1 Materialien

- Maxisorp 96-well ELISA Platten, round bottom Nunc, Dänemark
- BD Opt EIA™ Mouse IL-18 ELISA Set BD Biosciences, USA
- ELISA Plate Reader, MultiskanAscent Thermo Labsystems, Finnland
- Ascent Software Version 2.6 Thermo Labsystems, Finnland

2.3.5.2 Durchführung

Zur Bestimmung der mL-18-Konzentration wurde der Zellkulturüberstand 48 h nach dem Gentransfer von den transfizierten oder transduzierten Zellen abgenommen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Bis zur Messung wurde der Überstand bei -20°C gelagert.

Der ELISA wurde mit dem *mouse* IL-18 ELISA Set in 96-well ELISA Platten entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem MultiskanAscent Plate Reader, die Auswertung mit der Ascent Software.

2.3.6 Selektion transfizierter muriner mesenchymaler Stammzellen

2.3.6.1 Materialien

- Zeocin™ Invitrogen, USA
- Genitocin G418 Sigma, Deutschland
- Microtest™ U-Bottom Zellkulturplatte, 96 wells Falcon, USA

2.3.6.2 Antibiotika-Sensitivitäts-Assay

Für die Antibiotika Zeocin (Zeo) und das Neomycinanalogon Geniticin (G418) wurden die individuellen Hemmkonzentrationen für mMSC mittels eines Antibiotika-Sensitivitäts-Assays bestimmt. Damit wurde die Grundlage zur Selektion von erfolgreich mit Plasmiden, welche für die jeweiligen Antibiotikaresistenzen kodieren, transfizierten oder transduzierten mMSC geschaffen.

Durch Mischen von Zeo-Stammlösung mit Aqua dest. wurde eine 25 µg/µl-Arbeitslösung hergestellt. 2 Tage nach Aussaat von 1×10^5 Zellen/2 ml/well in 6-well-Platten wurde das Antibiotikum in zunehmender Konzentration (+50 µg/ml) in die wells hinzupipettiert. Die Konzentration variierte zwischen 50 µg/ml und 400 µg/ml bei insgesamt 8 Ansätzen. Die 50 µg/µl-Arbeitslösung für G418 wurde ebenfalls durch Verdünnung mit Aqua dest. hergestellt. Die Konzentration für G418 variierte zwischen 100 µg/ml und 450 µg/ml. Alle Ansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert und täglich unter dem Mikroskop hinsichtlich der Rate (%) der abgestorbenen Zellen beurteilt.

Die ermittelte günstige Hemmkonzentration war für Zeocin 200 µg/ml und für G418 250 µg/ml.

2.3.6.3 Selektion von mMSC-mIL-18 mittels Antibiotikaresistenz bzw. durch Einzelzellselektion

Nach Transfektion der mMSC mit pcDNA3.1-mIL-18 wurde den Ansätzen nach Entnahme der Zellkulturüberstände nach 72 h 200 µg/ml Zeo bzw. 250 µg/ml G418 zugesetzt. Nach Bestimmung der mIL-18-Konzentration in den Überständen wurden mIL-18-negative Kulturen verworfen. Bei lentiviraler Transduktion der mMSC mit GFP exprimierenden Transfervektoren wurde nach Bestimmung der Transfektionseffizienz GFP-positiven Kulturen 200 µg/ml Zeo bzw. 250 µg/ml G418 zugesetzt. Alle 6 Tage wurde ein Mediumwechsel mit Zugabe von Zeo bzw. G418 durchgeführt. Da nicht transfizierte Klone aufgrund der fehlenden Antibiotika-Resistenz sterben, wurden transfizierte Klone selektiert.

Aus GFP-positiven Kulturen lentiviral transduzierter mMSC wurden durch Verdünnung der Zellsuspension auf 1 Zelle/200 µl und Ausplattieren von je 200 µl in die Ver-

tiefungen von 96-well-Platten GFP-positive Klone selektiert. Diese Klone konnten zu Kulturen expandiert werden, deren GFP-Expression mittels FACS bestimmt und deren mL-18-Gehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen wurde.

2.4 *In vivo*-Biofunktion von mL-18-exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen

Um erste Aussagen über die *in vivo*-Biofunktion der mL-18-exprimierenden mMSC (mMSC-IL-18) treffen zu können, wurde ein Assay durchgeführt, bei dem das Wachstum von NXS2-Neuroblastomzellen und mMSC in A/J-Mäusen subkutan applizierten Matrigel-Plugs beobachtet wurde. Matrigel bietet durch Imitation von Basalmembran eine Matrix zur Begünstigung von Zellwachstum *in vivo*.

2.4.1 Kultur von NXS2-Zellen

Die adhärente Neuroblastomzelllinie NXS2 aus der A/J-Maus wurde für den *in vivo*-Versuch eingesetzt. Die Zellkultur erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM, versetzt mit 10% FCS und 1% P/S, bei 37°C und 5% CO₂-Begasung. Für das Passagieren der Zellen im Verhältnis 1:10 wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen 2 min mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit 3 ml Kulturmedium neutralisiert und ein Zehntel der Zellsuspension mit Kulturmedium aufgefüllt. Für den *in vivo*-Versuch wurden die NXS2-Zellen in zusatzfreiem DMEM aufgenommen.

2.4.2 A/J-Mäuse

Der Versuch wurde mit syngeneten weiblichen A/J-Mäusen, Alter 6-8 Wochen, Mindestgewicht 20 g, von Harlan-Winkelmann durchgeführt. Die Mäuse wurden im Spezifisch Pathogen-freien Bereich der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow-Klinikums gehalten und erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Nach einwöchiger Eingewöhnungszeit wurden die A/J-Mäuse nach Gewichtsüberprüfung in Gruppen zu 4 Mäusen aufgeteilt und mittels Ohrloch markiert. Am Tag vor der subkutanen Matrigelapplikation wurden die Mäuse im Bereich der linken Flanke rasiert. Nach Abschluss des Versuches wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Analyse zugeführt.

2.4.3 Subkutane Applikation von NXS2 und murinen mesenchymalen Stammzellen in Matrigel

2.4.3.1 Materialien

- Matrigel BD Bioscience, Deutschland
- Kanüle Microlance™ 3, 27 G Becton Dickinson, USA
- Spritze BD Plastipak 1 ml Becton Dickinson, USA

2.4.3.2 Durchführung

Am Vortag der subkutanen Applikation von NXS2 sowie mMSC in Matrigel wurden mMSC mit der Amaxa Technologie laut Protokoll mit pcDNA3.1-mIL-18 transfiziert. Matrigel wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut.

Für den Versuch wurden NXS2-Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in Kulturmedium ohne Zusätze in einer Konzentration von $1 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ resuspendiert. Murine MSC bzw. mMSC-IL-18 wurden ebenfalls trypsinisiert und nach einem Waschschrift mit HANKS' balanced salt solution in zusatzfreiem Kulturmedium in einer Konzentration von $5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ resuspendiert. Je 400 μl Matrigel wurde für jedes Tier der 3 Versuchsgruppen wie folgt mit Tumorzellen und mMSC vorbereitet:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Matrigel	400 μl	400 μl	400 μl
NXS2	50 μl	50 μl	50 μl
zusatzfreies MesenCult-Medium	50 μl		
mMSC		50 μl	
mMSC-IL-18			50 μl

Generell musste auf Eis und mit gekühlten Instrumenten gearbeitet werden, um das Polymerisieren von Matrigel bei über 4°C vor der Injektion zu vermeiden.

Jeder Maus wurden 500 µl des jeweiligen Matrigel-Ansatzes subkutan im Bereich der linken Flanke nahe der Mittellinie injiziert. Dafür wurde bei flachem Einstichwinkel durch vorsichtiges Heben und Senken der Nadelspitze eine Hautfalte gebildet und das gesamte Volumen appliziert. Bei korrekter Injektion wurde umgehend eine subkutane Raumforderung sichtbar. Das bis zur Injektion flüssige Matrigel polymerisiert durch die Temperaturerhöhung.

Zu Versuchsende an Tag 5 nach Injektion von Matrigel mit Tumorzellen und mMSC wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet. Die subkutanen Tumoren wurden entnommen und Proben für die histologische Untersuchung in Einbettmedium mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.4 Analyse von Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitten gefrorener Matrigel-Plugs

2.4.4.1 Materialien

- Hämatoxylin QS Vector Laboratories Inc., CA, USA
- Eosin Waldeck GmbH, Deutschland
- Einbettmedium für Gefrierschnitte Jung, Deutschland
- Kaiser's Glyceringelatine Merck, Deutschland
- Silane-prep Slides Sigma-Aldrich, Deutschland
- Deckgläser Menzel, Deutschland
- Kryostat HM 500 OM Microm Laborgeräte GmbH, Deutschland
- Mikroskop Axiostar plus Carl Zeiss Jena GmbH, Deutschland
- Kamera Powershot G3 Canon, Deutschland

2.4.4.2 Durchführung

Nach Versuchsende wurden Proben der subkutanen Matrigel-Plugs für die Histologie in Einbettmedium schockgefroren. Am Kryostat wurden 8 µm dicke Schnitte des Ma-

terials angefertigt und auf silanisierte Objektträger überführt. Bis zur Färbung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert, für die Färbung aufgetaut und getrocknet.

Mit Hämatoxylin wurde die Kernfärbung der Matrigel-Schnitte für 1-2 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Bläuen der Schnitte erfolgte unter fließendem H_2O für 5-10 min. Die anschließende Plasmafärbung wurde mit 2% Eosin für 5-10 s bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden wieder mit fließendem H_2O bis zur vollständigen Entfärbung des Wassers gewaschen. Nach kurzem Trocknen des Matrigel-Schnittes wurden die Präparate mit Glyceringelatine überschichtet und sofort mit einem Deckgläschen ohne Lufteinschlüsse abgedeckt. Hämatoxylin/Eosin (H/E)-gefärbte Schnitte können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Die Schnitte wurden am Durchlichtmikroskop beurteilt. Das Matrigel dominiert in rosa-gelblicher Färbung, Zytoplasma erscheint rosa bis rot, die Zellkerne sind violett angefärbt.

Für die Quantifizierung des Wachstums von NXS2-Tumorzellinseln wurden diese in zwei Schnitten/Versuchstier in jeweils zehn Gesichtsfeldern in 200facher Vergrößerung ausgezählt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der gewonnenen Daten von *in vitro*-Versuchen wurde mit Hilfe des Student's t-Testes untersucht. Für Beobachtungen in den 3 Gruppen im Mausversuch wurde die statistische Auswertung mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet wenn der P-Wert $< 0,05$ betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus

Der in dieser Arbeit hergestellte syngene mIL-18-Zelltransporter basiert auf erfolgreich isolierten und charakterisierten MSC aus der A/J-Maus. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beschreiben die Eigenschaften dieser Vorläuferzellen aus dem adulten Knochenmark.

3.1.1 Isolation und Kultur muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus

Ziel war es, mMSC aus dem Knochenmark zu gewinnen, durch ihre adhärenen Eigenschaften und geeignete Kulturbedingungen von HSC zu isolieren und für weiterführende Experimente zugänglich zu machen. Die Reduktion der HSC konnte zunächst lichtmikroskopisch beobachtet werden. 24 Stunden nach Isolation waren nur vereinzelt adhärenente fibroblastenartige Zellen in der Kultur vorhanden (Abb. 3-1a). Ein Großteil der Zellen wuchs in Suspension, in der Mehrzahl am ehesten Zellen hämatopoetischer Herkunft. Daneben waren bei der Isolierung des Knochenmarks entstandene Zelltrümmer zu sehen. 72 Stunden nach Isolation konnten deutlich Kolonien hämatopoetischer Zellen als größere Zellhaufen in Suspension wachsend, aber auch lose adhärenent in Gegenwart von mMSC-Kolonien beobachtet werden (Abb. 3-1b-c). Die von Zellen in Suspension und Trümmern verdeckten und im Vergleich wenigen adhärenenten fibroblastenartigen mMSC waren nach einem Mediumwechsel 72 Stunden nach Isolation, wie in Abbildung 3-1d zu sehen ist, deutlich in Kolonien wachsend erkennbar. Ein Großteil der in Suspension wachsenden Zellen konnte mit diesem Mediumwechsel entfernt werden, einige Zellen verblieben und wurden im weiteren Kulturverlauf sukzessive eliminiert. Diese Reduktion war lichtmikroskopisch nur noch schwer nachvollziehbar und wird in den FACS-Analysen der mMSC-Kulturen deutlich (siehe 3.1.4).

In der frühen Kultur sind mMSC als gedrungene adhärenente Zellen mit plumpen Zellausläufern und granuliertem Nukleus erkennbar, wie die Abbildung 3-2a vor der ers-

ten Passage deutlich macht. Im Kulturverlauf entwickelten sich die mMSC zu spindelförmigen, flachen, fibroblastenartigen Zellen mit prominentem, granuliertem Nukleus und feinen Zellausläufern. Abbildung 3-2b zeigt eine typische Kultur von mMSC der A/J-Maus vor der zehnten Passage.

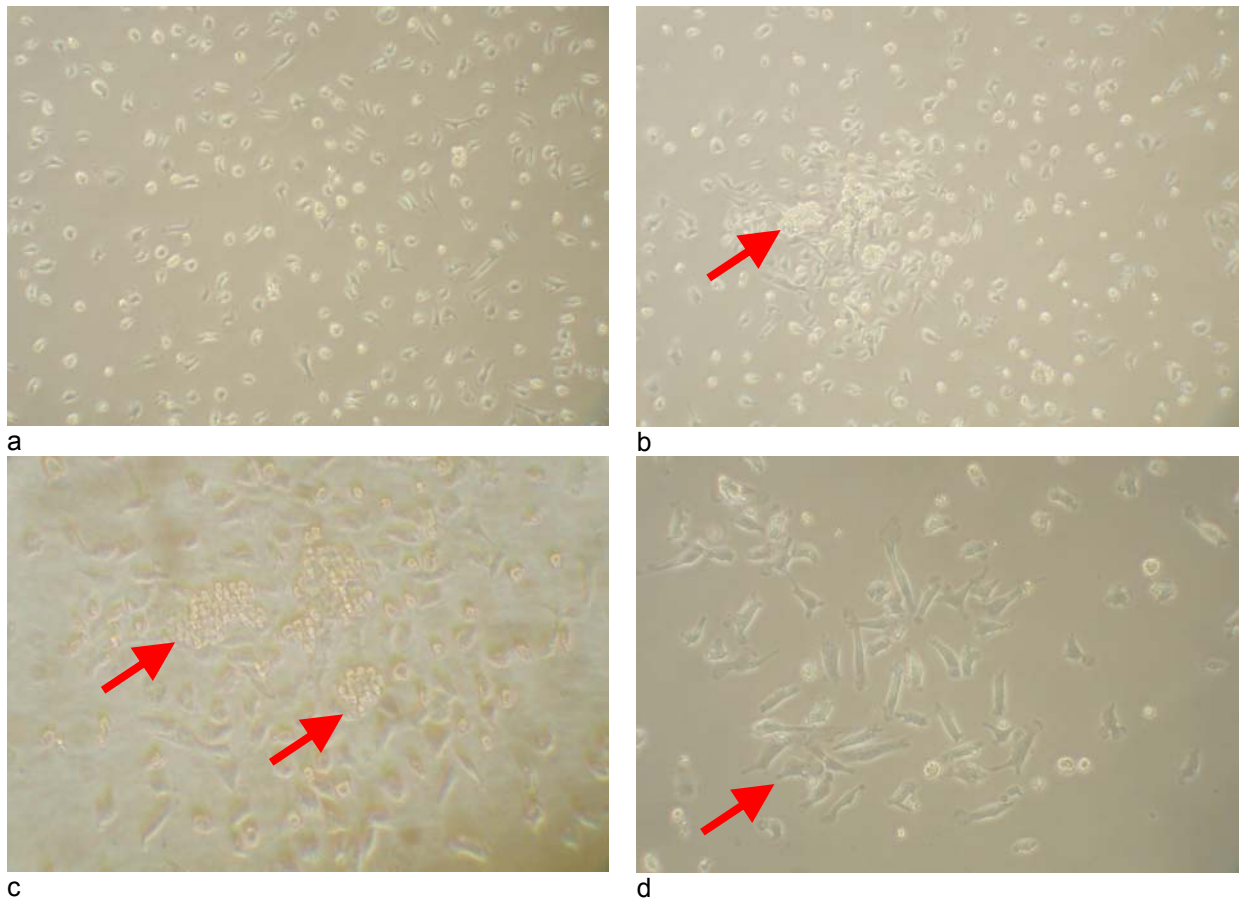
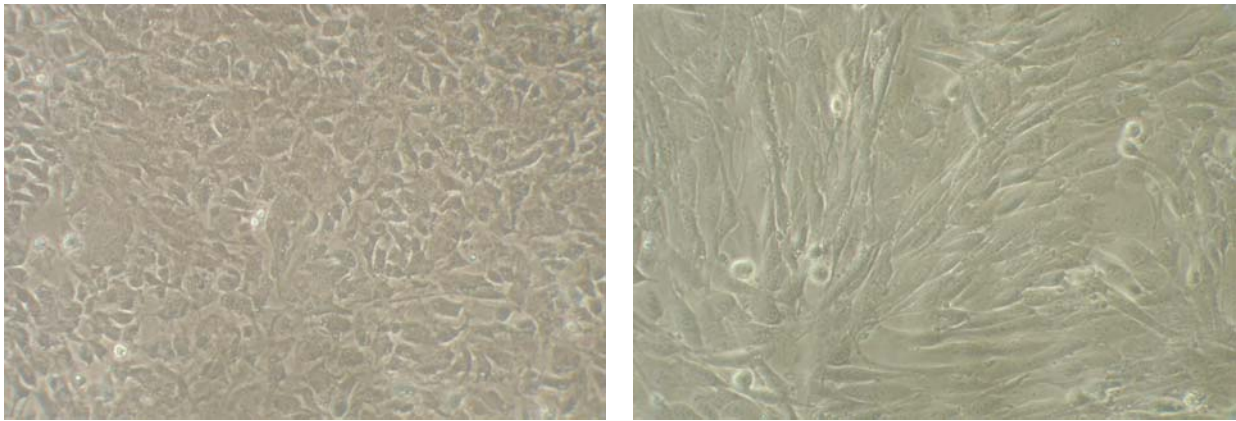


Abb. 3-1: a) Kultur 24h nach Isolation in 100facher Vergrößerung, vereinzelte adhären wachsende fibroblastenartige Zellen sind neben einer Vielzahl von Zellen in Suspension und Zelltrümmern zu unterscheiden; b)+c) Kultur 72h nach Isolation vor Mediumwechsel in 100facher (b) und 200facher Vergrößerung (c), in Suspension wachsende HSC bilden deutliche Zellhaufen (Pfeile) und überdecken adhären fibroblastenartige Zellen die vereinzelt und in Kolonien wachsen; d) Kultur 72h nach Isolation nach Mediumwechsel in 200facher Vergrößerung, nach Entfernen von Zellen in Suspension und Zelltrümmern werden die in Kolonien wachsenden mMSC deutlich (Pfeil).



a
Abb. 3-2: a) Kultur vor Passage 1 in 200facher Vergrößerung, gedrungene adhärenente mMSC mit plumpen Zellausläufern als dichte Einzelschicht; b) Kultur vor Passage 10 in 200facher Vergrößerung, fibroblastenartige mMSC mit feinen Zellausläufern und granuliertem Nukleus als dichte Einzelschicht.

Insgesamt wurden neun Klone von mMSC aus dem Knochenmark von vier Tieren isoliert. Für je zwei Femur- und Tibiaknochen einer Maus wurden laut StemCell Technologies, Hersteller des MesenCult Mediums $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen erwartet. Die Zahl isolierter Zellen betrug jedoch zwischen 1×10^7 und 3×10^7 . Aus einem 36 Wochen und einem sechs Wochen alten Tier wurden je 1×10^7 Zellen isoliert, im Knochenmark eines zehn und eines sechs Wochen alten Tieres dagegen je 3×10^7 Zellen (siehe Tabelle 3-1).

Im Vergleich konnten Kulturen von mMSC, welche mit MesenCult Basal Medium wuchsen, höhere Passagen von >100 erreichen, als Zellkulturen, die in DMEM modifiziert nach da Silva Meirelles *et al.* [22] kultiviert wurden und bis zu Passage 35 proliferierten (Daten nicht gezeigt).

Eingefrorene mMSC konnten zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut, kultiviert und zu weiterführenden Experimenten verwendet werden. Die Kulturen zeigten keine Änderungen in morphologischen oder phänotypischen Charakteristika, wie insbesondere in den FACS-Analysen deutlich wird (siehe 3.1.4).

3.1.2 Nachweis von Fibroblast-Colony forming units

Eine charakteristische Eigenschaft der MSC ist die Kolonienbildung während des Wachstums auf Kulturoberflächen. Mit dem CFU-F Assay konnte dieses Potential für die mMSC aus der A/J-Maus nachgewiesen werden und Rückschlüsse auf die Quantität von mMSC im Knochenmark von A/J-Mäusen gezogen werden. Abbildungen 3-3a und b zeigen typische Formationen in unterschiedlichen Vergrößerungen, Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht der gewonnenen Daten.

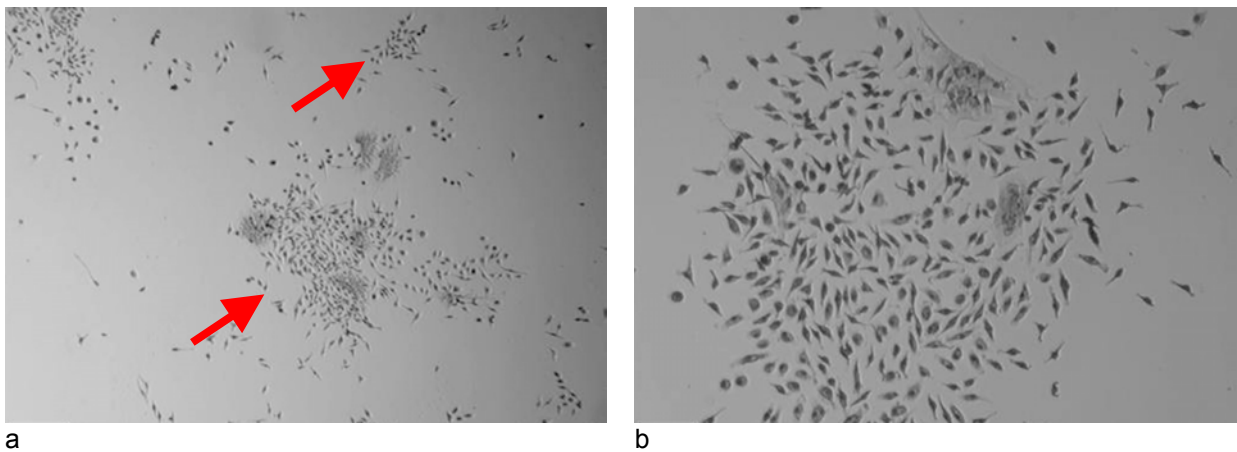


Abb. 3-3: a) Typisches Wachstum der mMSC in Kolonien (Pfeile) in einem CFU-F-Assay nach Giemsa-Färbung in 100facher Vergrößerung und b) eine Kolonie der mMSC des CFU-F Assay in 200facher Vergrößerung.

Die initiale Zelldichte von $4,5 \times 10^5$ für den CFU-F-Assay erwies sich am günstigsten für die Auswertung der Untersuchung, da die Kolonien gut voneinander abgegrenzt auszählbar waren. Die Zahl der gewachsenen Kolonien differierte zwischen den einzelnen 6-10 Wochen alten Tieren von 20-32 Kolonien bei $4,5 \times 10^5$ anfänglich ausplattierten Zellen. Bei dem 36 Wochen alten Tier wurden bei 5×10^5 anfänglich ausplattierten Zellen 35 Kolonien ausgezählt. Das daraus ermittelbare Verhältnis von mMSC zu den Zellen des Knochenmarkes lag zwischen 1 : 14 000 und 1 : 22 500. Rückschlüsse auf den Anteil der mMSC an den Zellen des Knochenmarkes haben durch die kleine Zahl untersuchter Tiere und deren unterschiedliches Alter eine nur geringe Aussagekraft.

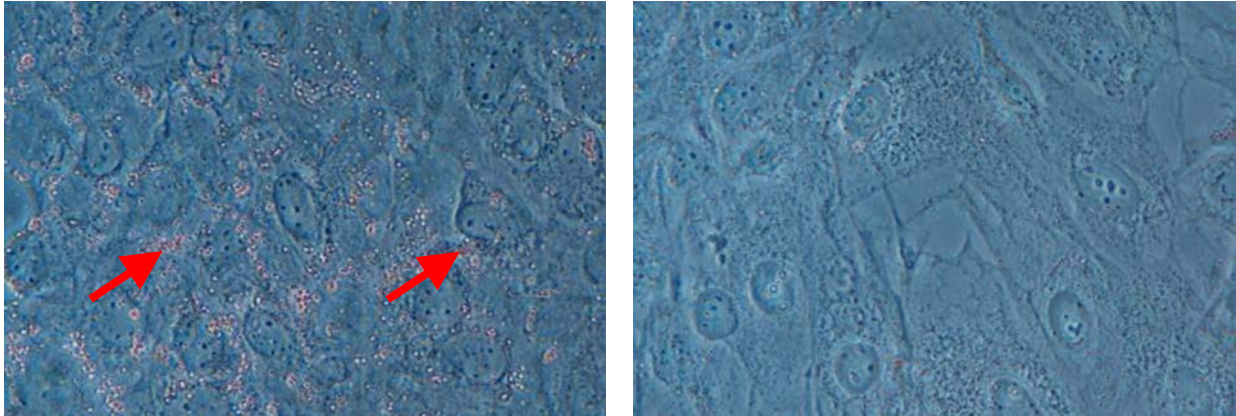
Tabelle 3-1: Übersicht über Alter der Spendertiere, Anzahl isolierter Zellen aus dem Knochenmark und Ergebnisse für durchgeführte CFU-F-Assays

	Alter (Wochen)	Anzahl isolierter Zellen	CFU-F-Assay		
			Anzahl ausplattierter Zellen	gewachsene Kolonien	mMSC : Knochenmarkszelle
1	36	1×10^7	5×10^5	35	1 : 14 300
2	6	3×10^7	$4,5 \times 10^5$	32	1 : 14 000
3	6	1×10^7	$4,5 \times 10^5$	20	1 : 22 500
4	10	3×10^7	$4,5 \times 10^5$	29	1 : 15 500

3.1.3 Adipogene und osteogene Differenzierung muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus

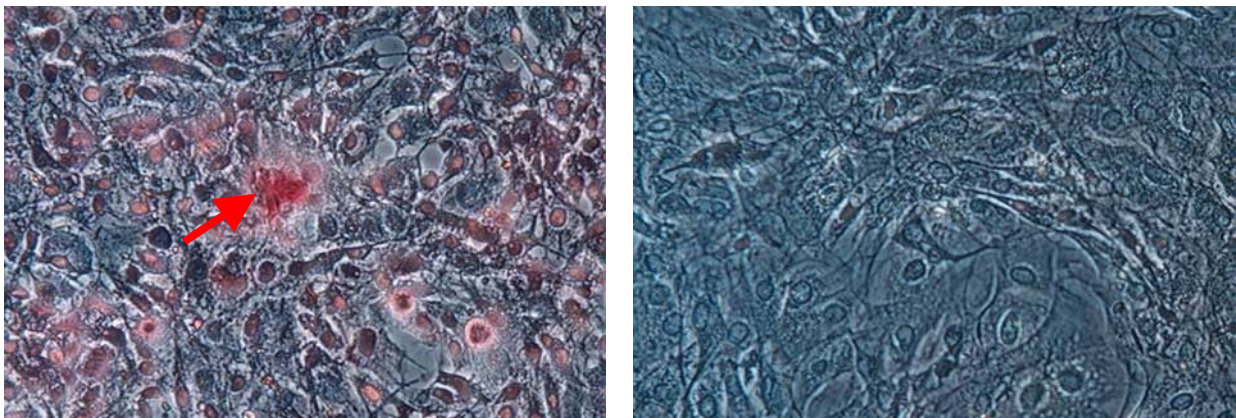
MSC sind Vorläuferzellen mit hohem Differenzierungspotential. Der Nachweis dieses Potentials ist unter geeigneter Stimulation *in vitro* möglich. An 6 Klonen isolierter mMSC aus der A/J-Maus wurde die Differenzierung in die osteogene und adipogene Richtung zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgreich gezeigt.

Nach Aussaat von mMSC und Kultur in speziellem Induktionsmedium für 30 Tage wurde die stattgefundenene Differenzierung mittels Färbung mit Oil Red O bzw. Alizarin Red S sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle dienten mMSC, die in Kulturmedium ohne Stimulation kultiviert wurden. Lichtmikroskopisch sichtbare, rot angefärbte Fettvakuolen der adipogen stimulierten Kultur sind in Abbildung 3-4 dargestellt. In Abbildung 3-5 bestätigt die Anfärbung von Calciumkristallen die erfolgreiche Differenzierung der mMSC in Osteoblasten.



a
b

Abb. 3-4: Positiv- und Negativkontrolle für die adipogene Differenzierung der mMSC bei 200facher Vergrößerung a) Charakteristische Darstellung einer mit Oil Red O gefärbten Einzelzellschicht nach spezifischer Stimulation über 30 d, rot angefärbte Fettvakuolen (Pfeile) als Ergebnis der Differenzierung der mMSC in Adipozyten; b) in der Einzelzellschicht der Negativkontrolle werden nach Oil Red O-Färbung keine roten Fettvakuolen sichtbar.



a
b

Abb. 3-5: Positiv- und Negativkontrolle für die osteogenen Differenzierung von mMSC in 200facher Vergrößerung a) Charakteristisches Bild nach osteogener Stimulation über 30 d, nach Färbung mit Alizarin Red S werden spezifische Calciumplugs (Pfeil) der Osteoblasten rot angefärbt; b) in der Negativkontrolle werden nach gleichem Färbeprotokoll keine dieser Formationen detektiert.

3.1.4 Phänotypisierung muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus

Die morphologische Homogenität von mMSC-Kulturen zeigte sich ab Passage 9/10 in einer charakteristischen Abbildung der Zellen im Dot-Plot der FACS-Analyse. In Abbildung 3-6 sieht man ebenfalls die erhaltene charakteristische Darstellung der Zellen sechs Passagen nach dem Einfrieren und Auftauen zu Passage 24.

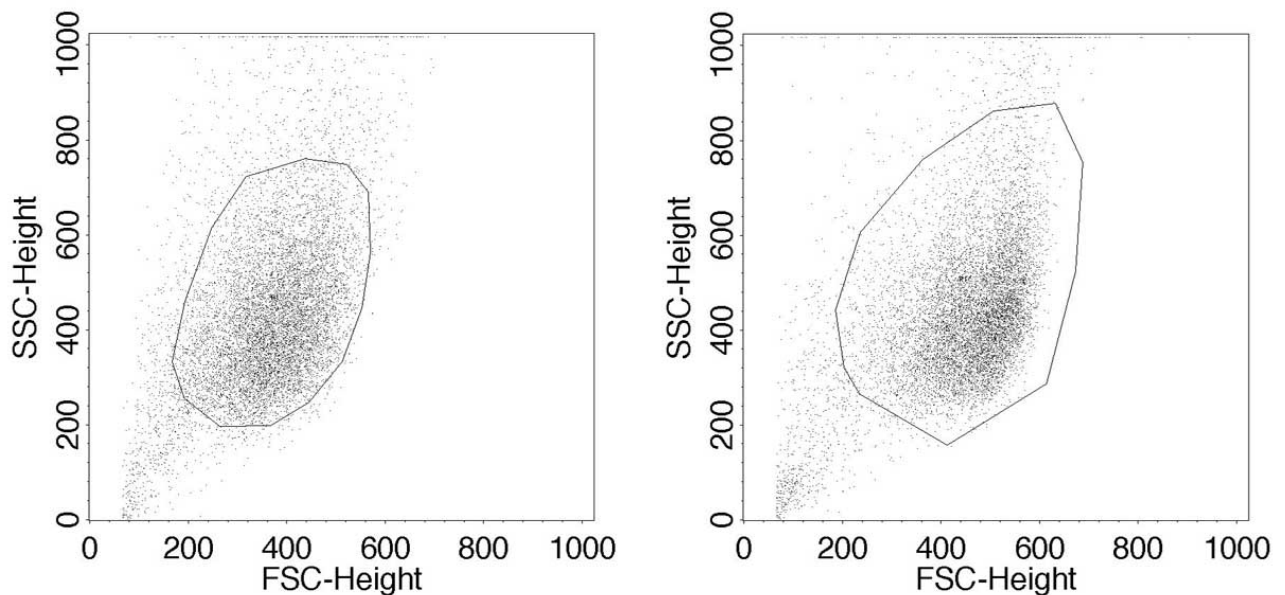


Abb. 3-6: Dot-Plots von FACS-Analysen der mMSC aus der A/J-Maus zeigen eine charakteristische Darstellung dieser Zellen während Passage 9 der Kultur (links) und bei Passage 6 nach dem Auftauen gefrorener Zellen in Passage 24 (rechts); auf der Abszisse ist jeweils die Zellgröße im Vorwärtsstreulicht, auf der Ordinate die Granularität der Zellen im Seitwärtsstreulicht dargestellt.

Mittels FACS-Analysen in Abständen von ca. 10 Passagen, wurde nach anfänglichen Veränderungen in der Expression von Oberflächenmarkern ein stabiler immunologischer Phänotyp beobachtet, welcher wiederum während langer Kulturdauer verloren ging. Der immunologische Phänotyp von mMSC aus der A/J-Maus konnte durch die Gegenwart und Abwesenheit typischer Marker charakterisiert werden, die in Tabelle 3-2 aufgelistet sind.

Tabelle 3-2: Aufstellung der in dieser Arbeit bestimmten Oberflächenmarker, welche den immunologischen Phänotyp der mMSC aus der A/J-Maus charakterisieren.

Oberflächenmarker für mMSC aus der A/J-Maus

Positiv	Negativ
Sca-1	CD45
CD29	CD117/c-kit
CD44	CD31
CD34	CD90.2 (nicht gezeigt)
CD106 (nicht gezeigt)	VEGF-R2 (nicht gezeigt)

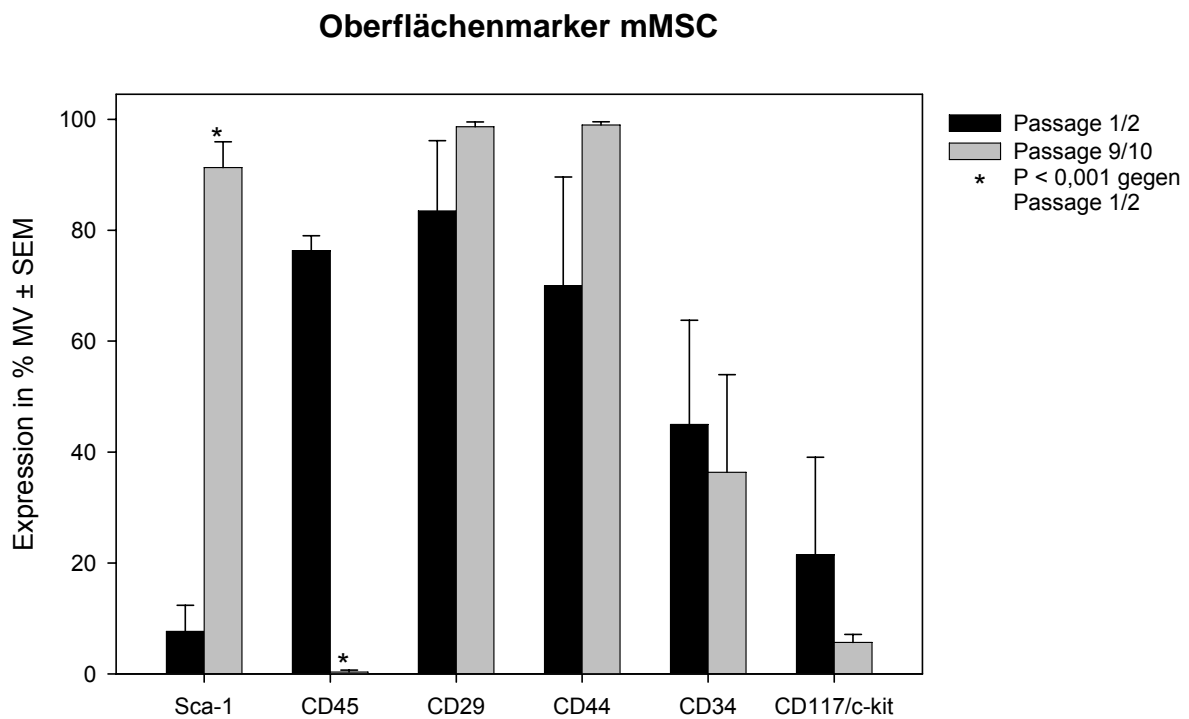


Abb. 3-7: Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern während Passage 1/2 und Passage 9/10 in % als Mittelwert ± Standardfehler, n = 3. Signifikante Zunahme der Sca-1- und Abnahme der CD 45-Expression mit P < 0,001.

Der immunologische Phänotyp der MSC ist über die Gegenwart bzw. Abwesenheit dieser Oberflächenmarker charakterisiert. Die Bestimmung dieses Musters von Oberflächenmarkern erlaubt die Kontrolle der Kultur von mMSC hinsichtlich der Kontamination mit hämatopoetischen Stammzellen und des Vorliegens multipotenter MSC.

Während in der frühen Zellkultur mit 8% nur wenige Sca-1-positive Zellen nachweisbar waren, stieg ihr Anteil bis zu den Passagen 9/10 auf 91% an. Diese Änderung der Oberflächenmerkmale in der Kultur ist signifikant ($P < 0,001$). Ebenfalls signifikant ist die Abnahme des Oberflächenantigens CD45 von Passage 1/2 zu Passage 9/10 ($P < 0,001$). Nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark gilt die mit 76% deutliche Population CD45-positiver Zellen als Ausdruck hämatopoetischer Kontamination, welche ab Passage 9/10 mit 0% nicht mehr nachweisbar war. Der schon zu Kulturbeginn hohe Anteil CD29- (84%) und CD44-positiver Zellen (70%) erhöhte sich bis Passage 9/10 auf jeweils 99%. Die Expression von CD34 auf der Zelloberfläche in der Kultur war zum Kulturbeginn mit 45% positiv und nahm bis Passage 9/10 auf 36% ab. Eine weitere Abnahme war über längeren Kulturverlauf sichtbar. Der mit 22% positive Marker CD117/c-kit nahm im Mittel bis Passage 9/10 auf 6% ab. Diese Tendenz setzte sich in den weiteren Passagen fort. Die Zellkulturen waren homogen positiv für den Oberflächenmarker CD106 und negativ für die Proteine CD90.2 und VEGF-R2 (Daten nicht gezeigt).

Die vergleichende Darstellung der FACS-Diagramme für die einzelnen Oberflächenproteine (Abb. 3-8) zeigt exemplarisch die deutliche Abnahme des Signals für Sca-1 auf 44% in der 62. Passage. Dabei entstanden keine Subpopulationen, vielmehr verschob sich das Signal der gesamten Zellpopulation in den negativen Meßbereich. Die gemessenen Werte für alle anderen Oberflächenmarker waren für diesen Zeitpunkt der Zellkultur im Vergleich zu Passage 9/10 stabil. Der hämatopoetische Marker CD45 blieb stabil negativ, CD29 und CD44 waren gleich bleibend positiv messbar, die Abnahme der Oberflächenmarker CD34 und CD117/c-kit setzte sich fort.

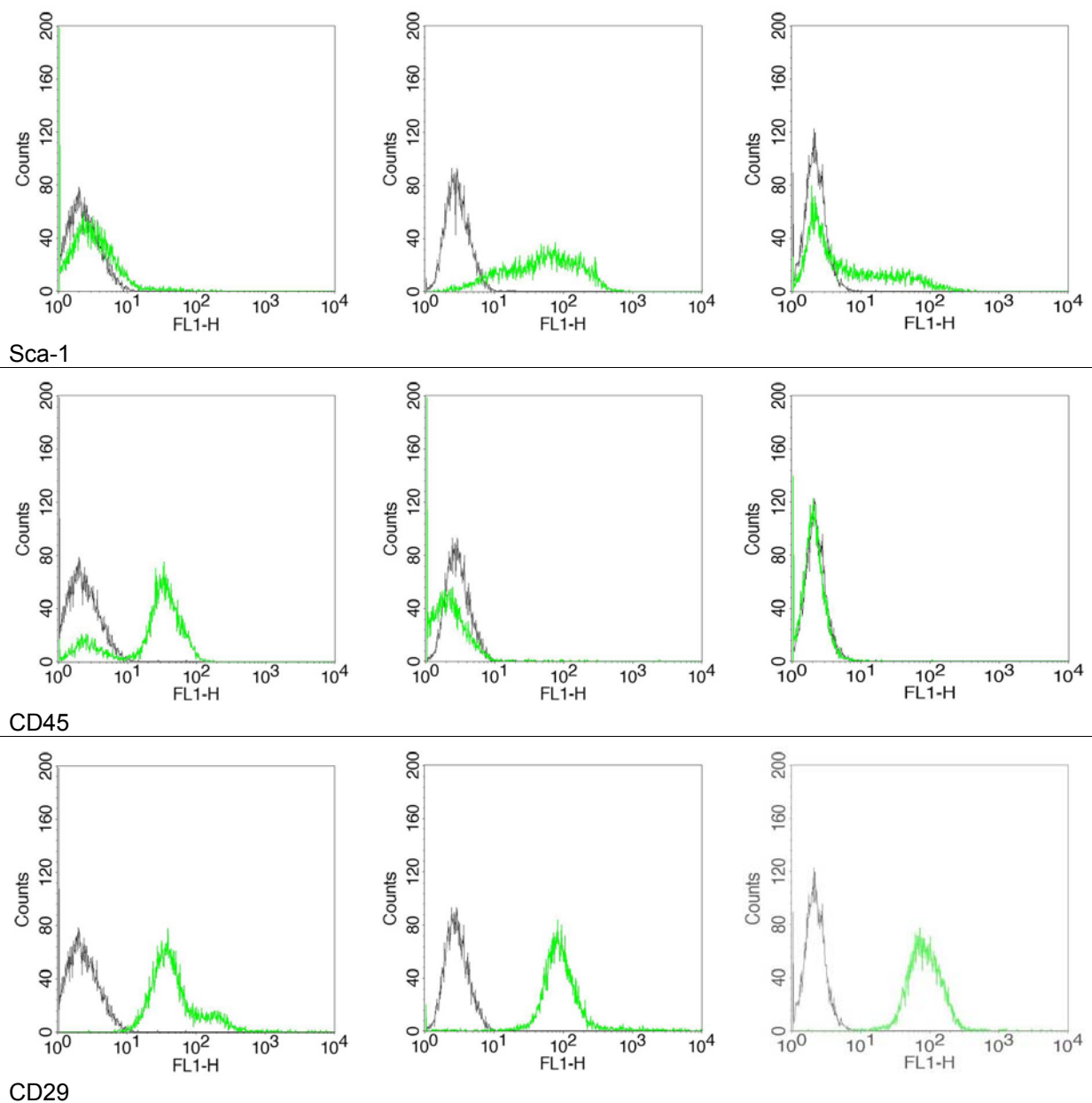
In der Darstellung der Dichte der Zellpopulationen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten in Abbildung 3-9 wird besonders die Teilung der Population im Anfangsstadium in die CD45-positive und die CD45-negative Population deutlich. CD45-positive Zellen

waren ebenfalls positiv für die Oberflächenmarker CD117/c-kit und CD44, sowie negativ für Sca-1. Das Signal für Sca-1 war sehr schwach während der ersten Passage, es wurde jedoch deutlich, dass die wenigen Sca-1-positiven Zellen negativ für CD117/c-kit waren. Im Kulturverlauf kam es zur Ausbildung einer homogenen, größtenteils Sca-1-positiven Population, die immer negative Anteile aufwies, jedoch nicht in Subpopulationen zerfiel. Prägnant sieht man die negative Entwicklung für das Oberflächenprotein CD34 im Kulturverlauf. Auch sichtbar wird ein sehr geringer Anteil CD31-positiver Zellen, der während der Langzeitkultur verloren ging.

Passage 1

Passage 9

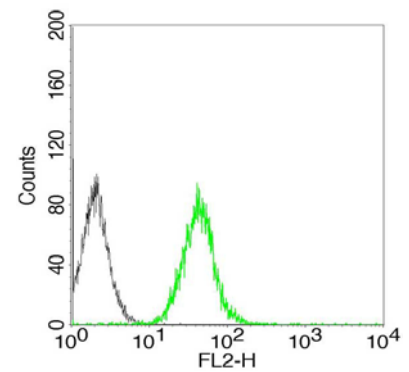
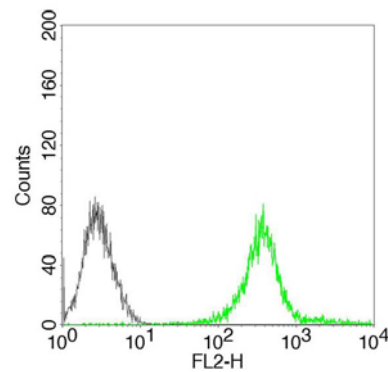
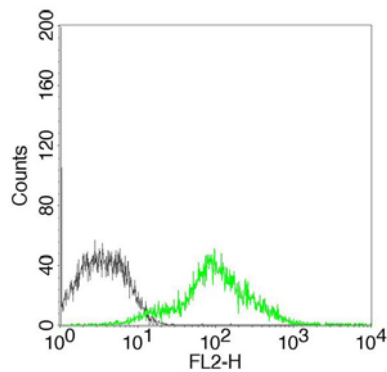
Passage 62



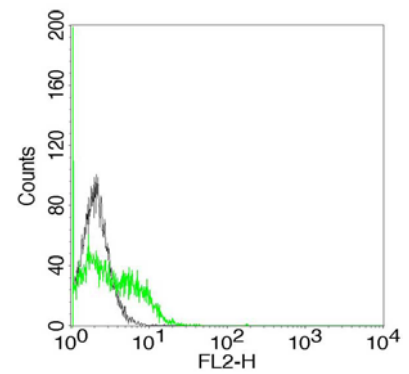
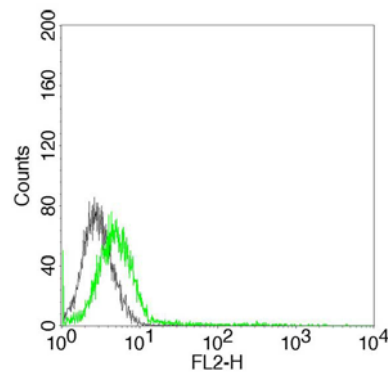
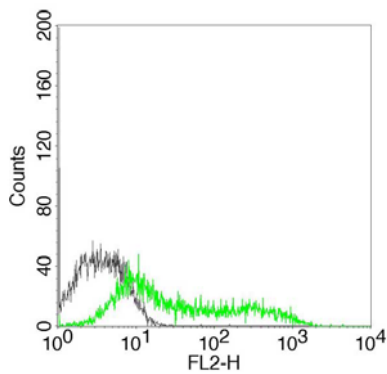
Passage 1

Passage 9

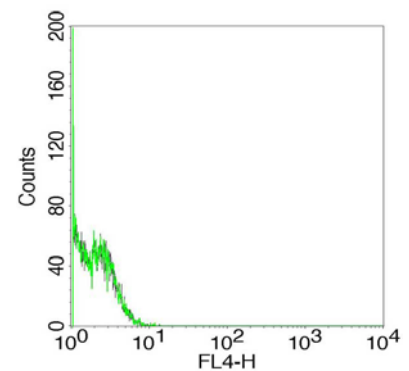
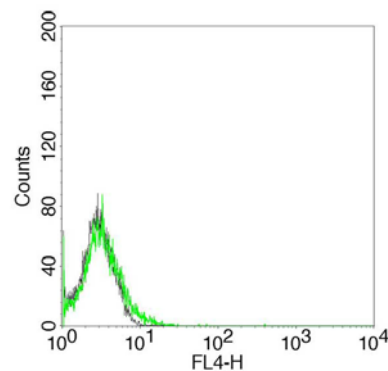
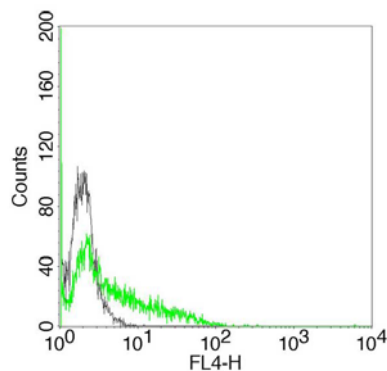
Passage 62



CD44



CD34



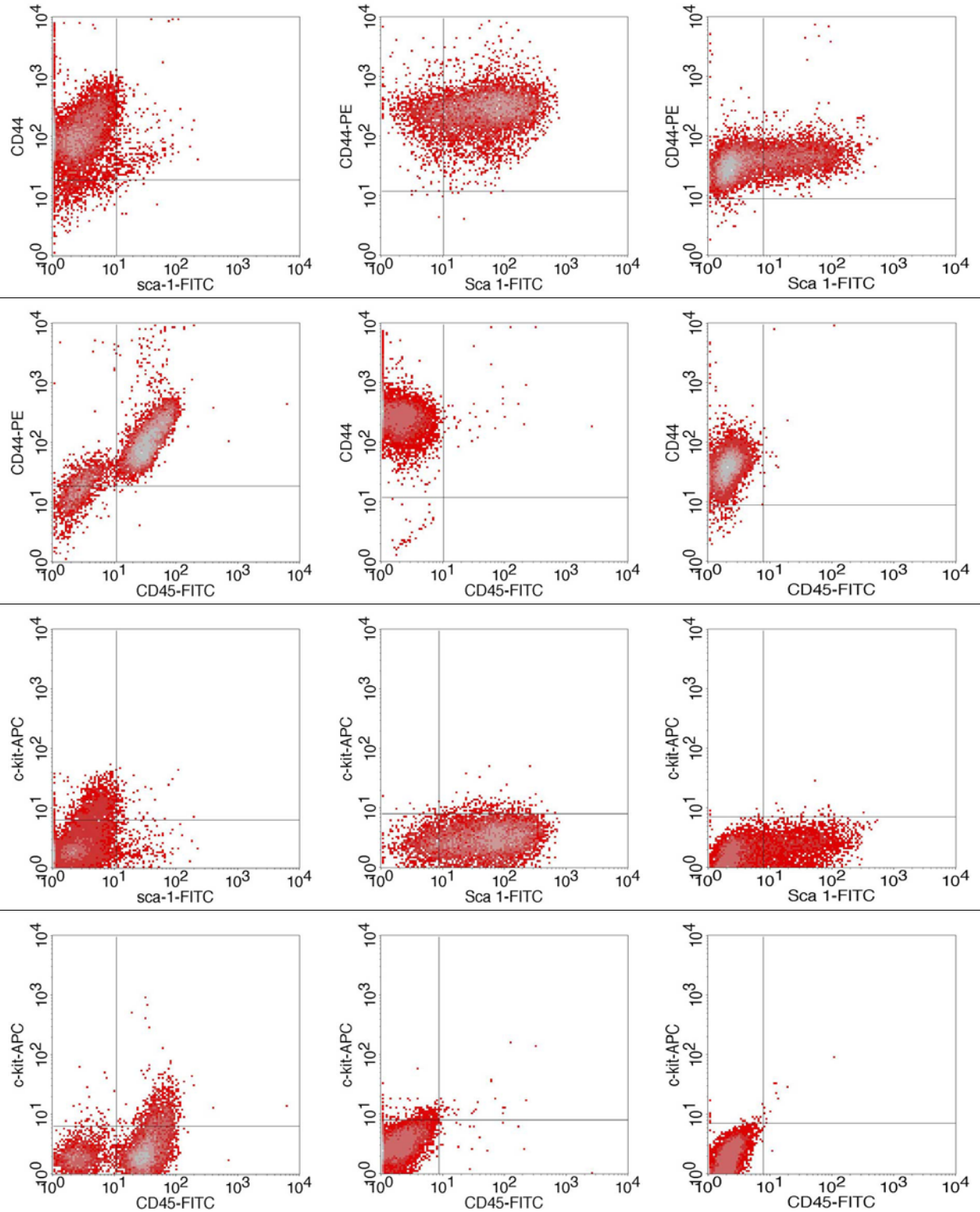
CD117/c-kit

Abb. 3-8: Expression der Oberflächenmarker Sca-1, CD45, CD29, CD44, CD34 und CD117/c-kit in der Zellkultur; ab Passage 9 exprimierten 91% der Zellen Sca-1, mit langer Kulturdauer war das Signal für Sca-1 rückläufig; CD45 exprimierende Zellen waren ab Passage 9 nicht mehr detektierbar; spezifisch gefärbte Zellen (grün) gegen die Negativkontrolle (schwarz) im Histogramm zu den Passagezeitpunkten 1, 9 und 62; auf der Abszisse ist jeweils die Fluoreszenzintensität der Oberflächenmarker, auf der Ordinate die Zellzahl dargestellt.

Passage 1

Passage 9

Passage 62



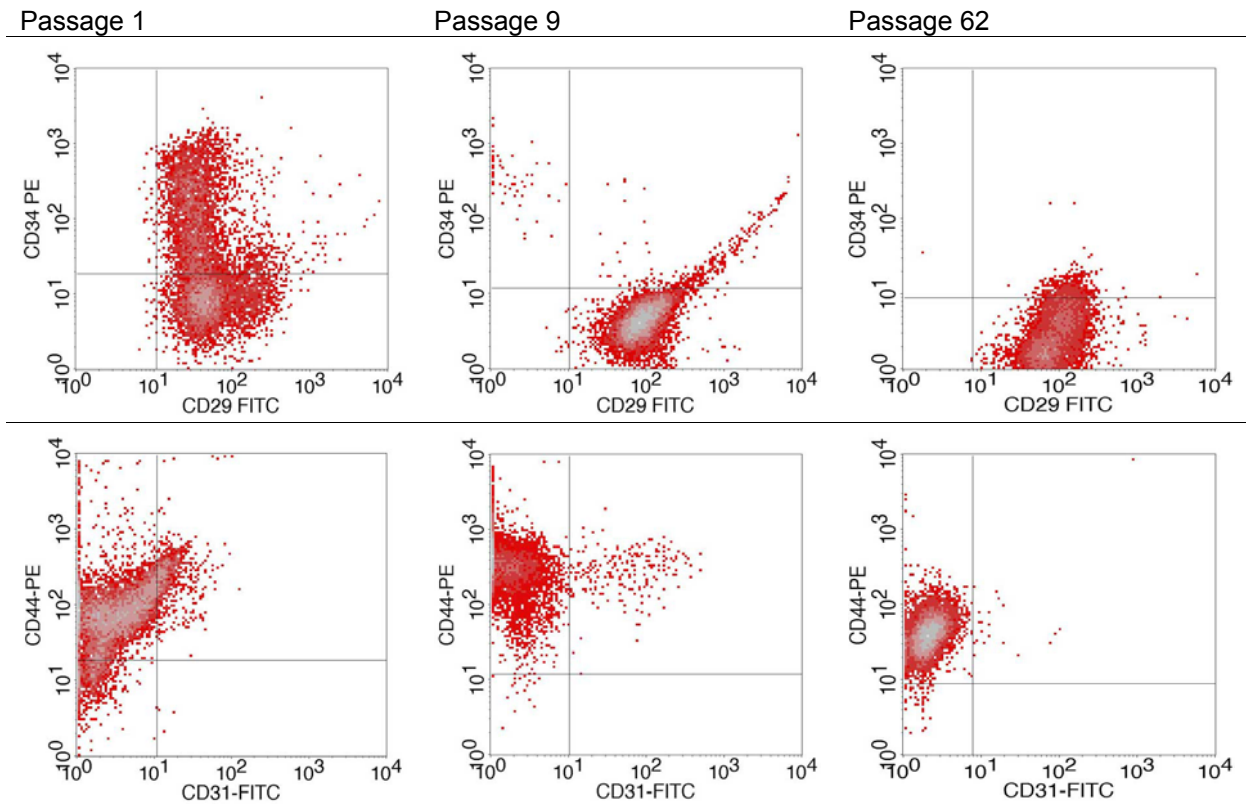


Abb. 3-9: Expressionsmuster der Oberflächenmarker Sca-1, CD45, CD29, CD44, CD34, CD31 und CD117/c-kit in der Zellkultur; ab Passage 9 exprimierten die Zellen Sca-1 und CD44, mit langer Kulturdauer war das Signal für Sca-1 rückläufig; CD45 exprimierende Zellen waren zu Passage 1 ebenfalls positiv für CD117/c-kit und CD44; spezifisch gefärbte Zellen im Density Plot zu den Passagezeitpunkten 1, 9 und 62.

Wie bereits erwähnt, konnten mMSC aus der A/J-Maus erfolgreich eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut werden. In Abbildung 3-10 und 3-11 sind Diagramme für Messungen der oben beschriebenen Oberflächenmarker für Passage 6 nach dem Kryokonservieren der Zellen nach Passage 24 gezeigt. Die Messungen für die gezeigten Oberflächenproteine differieren nicht im Vergleich zu den Messungen während Passage 9.

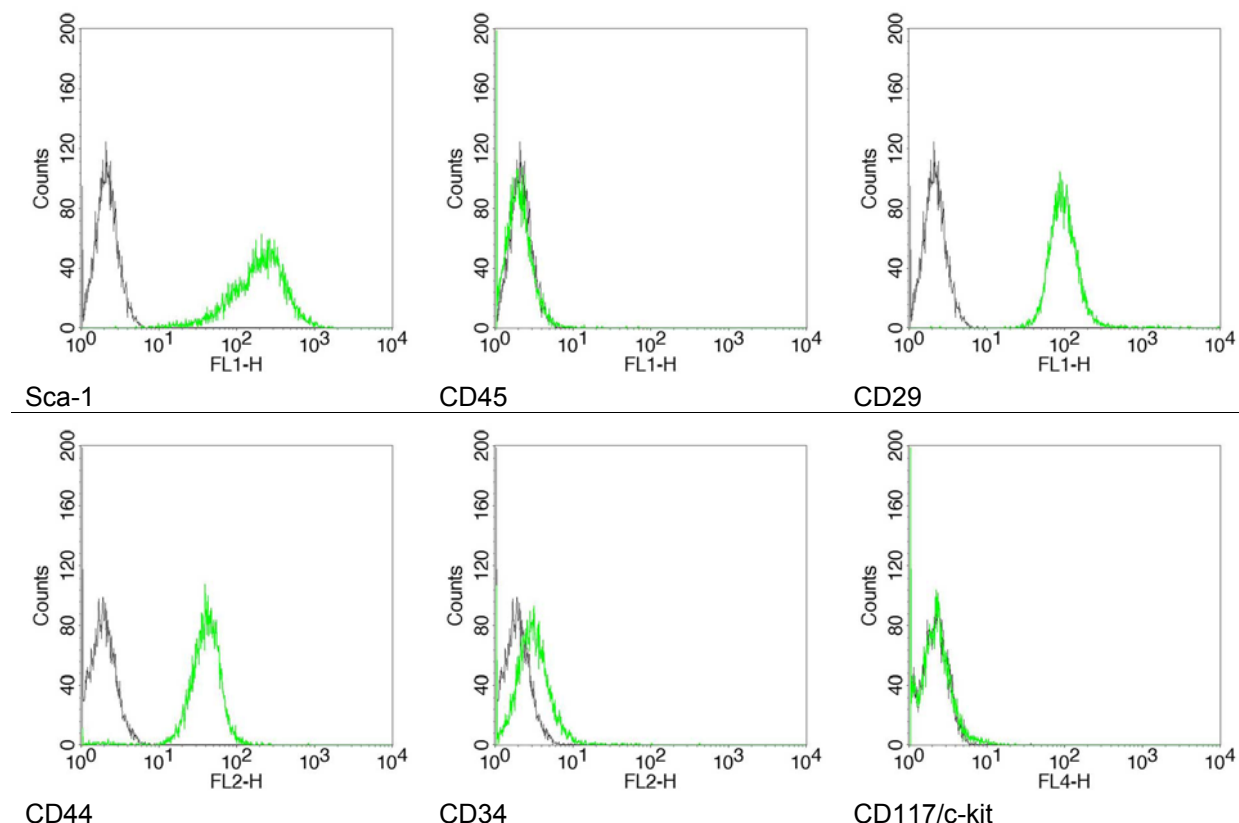


Abb. 3-10: Expression der Oberflächenmarker Sca-1, CD45, CD29, CD44, CD34 und CD117/c-kit in der Zellkultur; spezifisch gefärbte Zellen (grün) gegen die Negativkontrolle (schwarz) im Histogramm zeigen 6 Passagen nach Auftauen gefrorener mMSC eine mit Passage 9 vergleichbare Oberflächenproteinexpression; auf der Abszisse ist jeweils die Fluoreszenzintensität der Oberflächenmarker, auf der Ordinate die Zellzahl dargestellt.

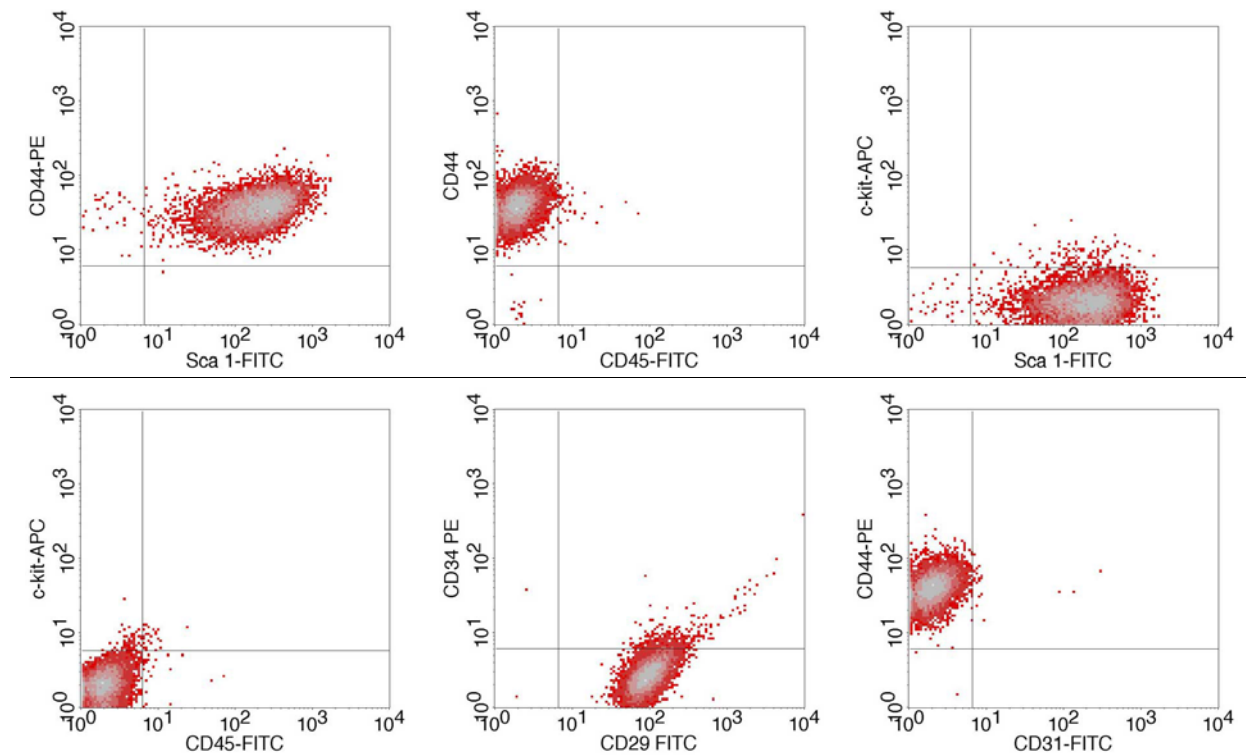


Abb. 3-11: Expressionsmuster der Oberflächenmarker Sca-1, CD45, CD29, CD44, CD34, CD31 und CD117/c-kit in der Zellkultur; spezifisch gefärbte Zellen im Density Plot zu Passage 6 nach Auftauen gefrorener mMSC zeigen eine mit Passage 9 vergleichbare Oberflächenproteinexpression.

3.2 Herstellung von mIL-18-exprimierenden Plasmiden

Die Etablierung einer mIL-18 produzierenden mesenchymalen Stammzelle erforderte zunächst die Herstellung eines mIL-18-Expressionsvektors. In mehreren Arbeitsschritten wurden Restriktionsschnittstellen für den Einbau von mIL-18 in die lentiviralen Transfervektoren erstellt und mIL-18 in die Vektoren subkloniert. Die Ergebnisse der einzelnen Herstellungsschritte sind im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Konstruktion von Restriktionsschnittstellen für mL-18 mittels PCR

In einer PCR-Reaktion mit mL-18 als Template konnten die für die Klonierung in die lentiviralen Vektoren pPR1 und pPRIEG7 benötigten Restriktionsschnittstellen angefügt werden (Primersequenzen für *Ascl* und *SaclI* in Tabelle 2-5). Abbildung 3-12 bestätigt das Vorliegen von DNA der erwarteten Größe von ca. 600 bp in allen PCR-Ansätzen 1-10. Ansatz 6 wurde für das weitere Procedere ausgewählt.

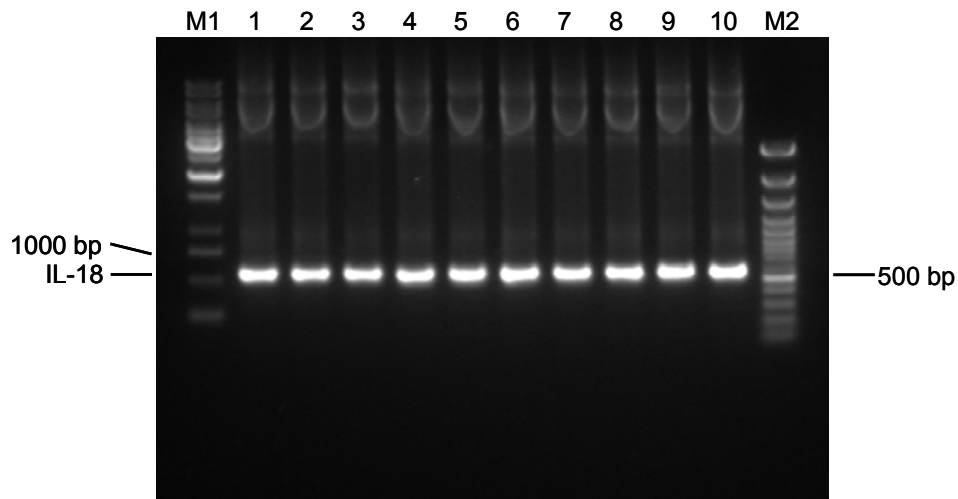


Abb. 3-12: PCR-Produkte für *Ascl*-*SaclI*-mIL-18. Alle 10 Ansätze enthalten das ca. 600 bp große DNA-Fragment; M1: 1 kbp-Leiter, M2: 100 bp-Leiter.

Mittels blau-weiß Selektion konnten 8 Klone des Sequenzierungsvektors pGEM[®]-T Easy mit einkloniertem PCR-Produkt ausgewählt werden. Nach spezifischem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Ascl* und *SaclI* waren Banden der gewünschten Größe in 7 von 8 Proben detektierbar. Diese in Abbildung 3-13 gezeigten Proben 1-4 und 6-8 wurden der Sequenzanalyse zugeführt.

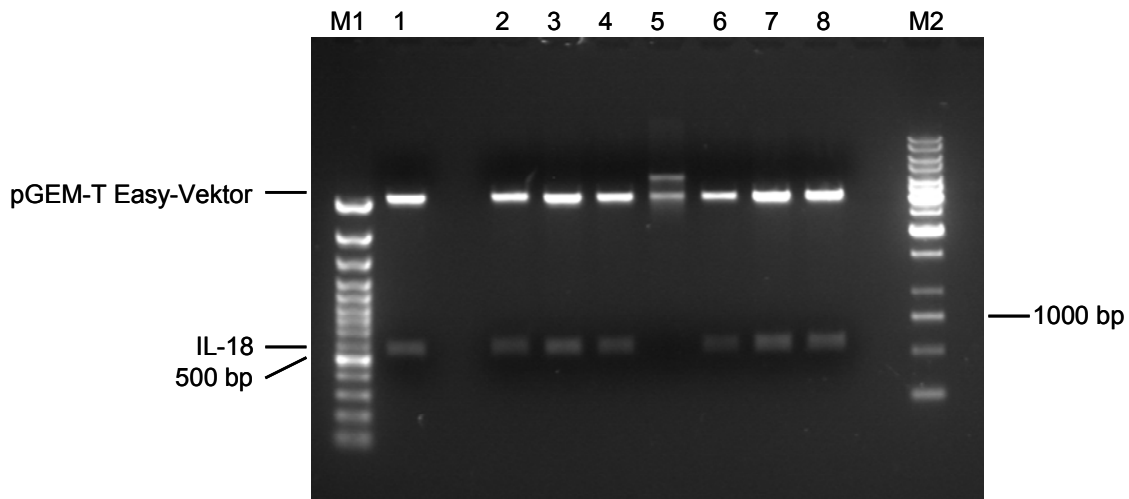


Abb. 3-13: Restriktionsverdau von pGEM[®]-T Easy-Ascl-SaclI-mIL-18 mit Ascl und SacII. In den Proben 1-4 und 6-8 waren ein ca. 600 bp großes DNA-Fragment sowie der 3015 bp große Vektor pGEM[®]-T Easy nachweisbar; M1: 100 bp-Leiter, M2: 1 kbp-Leiter.

3.2.2 Subklonierung von mIL-18 in die lentiviralen Transfervektoren pPR1 und pPRIEG7/ Kontrolle von pcDNA3.1-mIL-18

In Probe 2 konnte die korrekte Sequenz für das mIL-18-Konstrukt bestätigt werden. Das mIL-18-Fragment wurde mit Hilfe der generierten Restriktionsschnittstellen aus dem pGEM[®]-T Easy-Vektor herausgeschnitten und in die mit Ascl und SacII linearisierten lentiviralen Transfervektoren pPR1 und pPRIEG7 subkloniert.

Nach Anzucht in *E. coli* JM109 wurden der korrekte Einbau der ca. 600 bp große mIL-18-Fragmente sowie die korrekte Plasmidgröße für die lentiviralen Plasmide pPR1 (8065 bp) und pPRIEG7 (8640 bp) (siehe Abb. 3-15) und den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (5428 bp) (siehe Abb. 3-14) mittels Restriktionsverdau mit den spezifisch schneidenden Enzymen und Auftrennung des Ansatzes im 1%igen Agarosegel bestätigt. Für die Verwendung der Plasmide in Transfektionsexperimenten wurde Klon 1 für pcDNA3.1-mIL-18, Klon 2 für pPR1-mIL-18 und Klon 7 für pPRIEG7-mIL-18 gewählt.

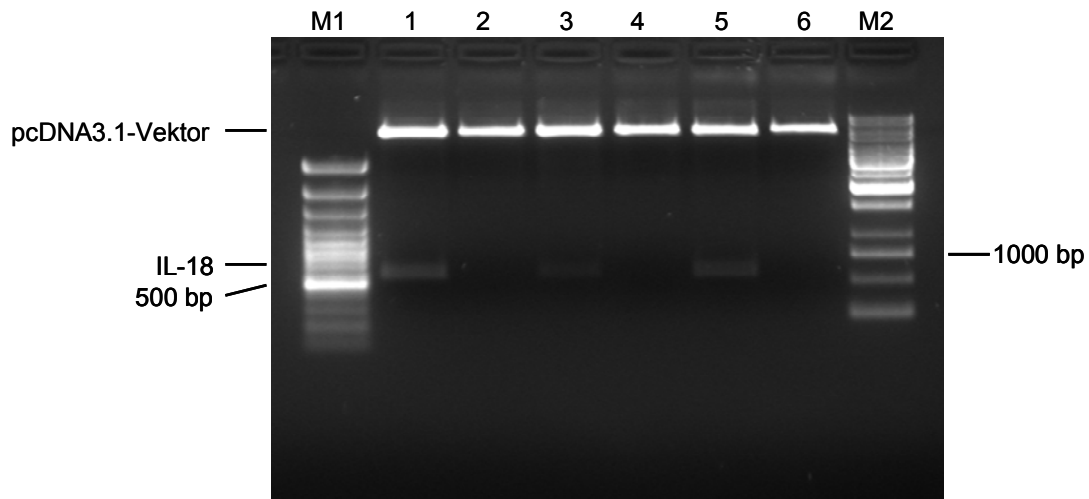


Abb. 3-14: Restriktionsverdau des Expressionsvektors pcDNA3.1-mIL-18 mit *XhoI* und *NotI*. In den Proben 1, 3 und 5 sind das 600 bp große mIL-18-Fragment und der 5428 bp großen pcDNA3.1-Vektor nachweisbar. Für weiterführende Experimente wurden Plasmide aus Probe 1 gewählt; M1: 100 bp-Leiter, M2: 1 kbp-Leiter.

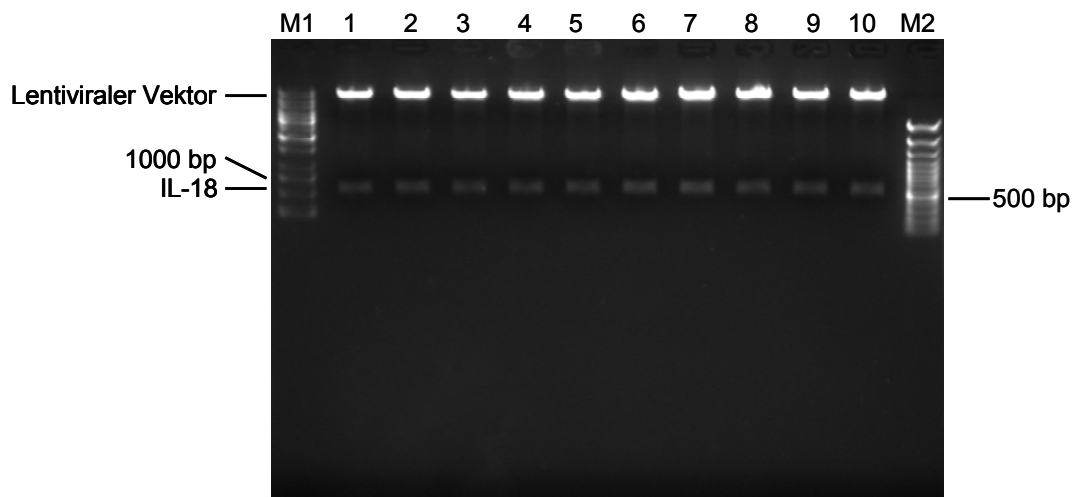


Abb. 3-15: Restriktionsverdau der lentiviralen Vektoren pPR1-mIL-18 und pPRIEG7-mIL-18 mit *AscI* und *SacI*. Es lassen sich ca. 600 bp großen mIL-18-Fragmente in pPR1 (8065 bp) in Probe 1-6 und pPRIEG7 (8640 bp) in Probe 7-10 nachweisen. Für Transfektionsexperimente wurden die Plasmide 2 und 7 gewählt; M1: 1 kbp-Leiter, M2: 100 bp-Leiter.

3.3 Generierung einer murinen mesenchymalen Stammzelllinie mit stabiler mIL-18-Expression

Ziel dieser Arbeit war es, eine mIL-18 produzierende MSC-Zelllinie herzustellen, um damit die Wirkung von IL-18 im Tumormilieu untersuchen zu können. Im folgenden

Abschnitt wird der mL-18-Gentransfer in MSC beschrieben und die unterschiedlichen Methoden verglichen. Die Expression von mL-18 durch die mMSC-IL-18 wurde mittels IL-18-ELISA nachgewiesen.

3.3.1 Transiente Transfektion muriner mesenchymaler Stammzellen

Für die Evaluation der Transfizierbarkeit der mMSC, wurden erste Transfektionsversuche mit pEGFP-DNA durchgeführt. Das exprimierte *Green Fluorescent Protein* konnte mittels FACS nachgewiesen werden, nicht transfizierte Zellen der gleichen mMSC-Kultur dienten als Negativkontrolle.

Folgende Transfektionsmethoden wurden initial angewandt und die Effizienzen miteinander verglichen:

Lipid-basierte Transfektion

Transfektionsmethode	Reagenz (µl) : DNA (µg)	Transfektionseffizienz (%)
FuGene 6	6:1	27
	10:1	30
SuperFect	12:1	19
	15:1	21
ExGene 500	5:1	29
	6:1	36
	7:1	45
	8:1	51
Lipofectamine 2000	2,5:1	46
	4:1	55
	5:1	57

Amaxa Nucleofector Technologie

Amaxa-Programm	Transfektionseffizienz (%)
U-23	49
S-15	27
S-16	38

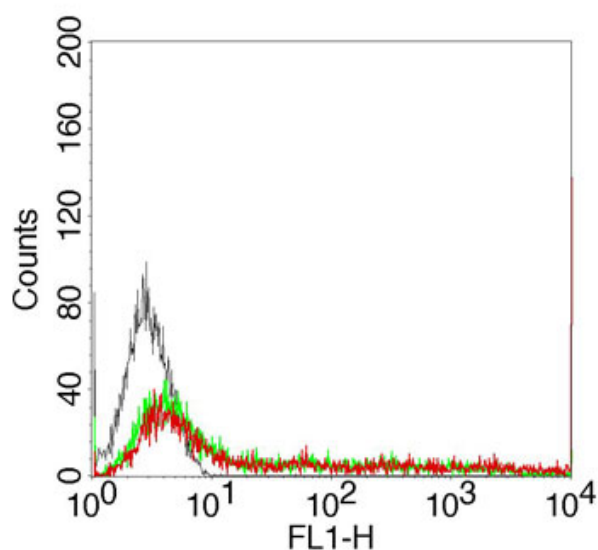


Abb. 3-16: FACS-Ergebnisse für Transfektionsversuche mit mMSC und pEGFP mit Lipofectamin 2000 (rot), Reagenz:DNA-Verhältnis 5:1 und Amaxa (grün) Programm U-23 gegen Negativkontrolle (schwarz); Transfektionseffizienz nach 24 Stunden, auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität des EGFP, auf der Ordinate die Zellzahl dargestellt.

Am effizientesten waren Transfektionen mit Lipofectamin 2000 (Transfektionseffizienz von 57%) und mit der Amaxa Nucleofector Technologie (Transfektionseffizienz von 49%). Die Transfektion von mMSC mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-mIL-18 bzw. mit pcDNA3.1 als Kontrolle erfolgte daher mit diesen beiden Methoden. Da der pcDNA3.1 kein Fluoreszenzprotein kodiert, war eine Messung der Transfektionseffizienz im FACS nicht möglich. Die Bestimmung eines erfolgreichen Gentransfers erfolgte daher ausschließlich mittels IL-18-ELISA mit dem Zellkulturüberstand transfizierter Zellen (siehe 3.3.3).

3.3.2 Stabile lentivirale Transduktion muriner mesenchymaler Stammzellen aus der A/J-Maus

Durch Transduktion von mMSC aus der A/J-Maus mit lentiviralen Partikeln, welche die Transfervektoren pPR1-mIL-18 und pPRIEG7-mIL-18 enthielten, konnten stabil mIL-18 exprimierende Zelllinien generiert werden.

Die Transfektion lentiviraler Plasmide erfolgte mit FuGene 6 und CaCl₂ in die Hilfszellen (siehe Abschnitt 2.3.3). Als Kontrollen dienten nicht transfizierte mMSC. Die Ergebnisse der Messungen der GFP-Expression im FACS wurden zunächst für beide Leertransfervektoren pPR1 und pPRIEG7 für die Transfektionsmethoden miteinander verglichen:

FuGene 6 transfizierte HEK293-Zellen

Transfervektor	Reagenz : DNA-Verhältnis (µl/µg)	Plasmidkonzentration	Transfektionseffizienz (%)
pPR1	3:1	1	42
		2	74
	6:1	1	42
		2	41
pPRIEG7	3:1	1	21
		2	25
	6:1	1	30
		2	18

CaCl₂-basierte Transfektion der HEK293-Zellen

Transfektor	Plasmidkonzentration	Transfektionseffizienz (%)
pPR1	1	9
	2	57
pPRIEG7	1	4
	2	3

Als am effizientesten erwies sich die Transfektion mit Fugene 6 (Reagenz : DNA-Verhältnis ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) 3:1, Plasmidkonzentration 2) mit 74%. Auf dieser Grundlage wurden weiterführende Experimente mit FuGene 6 durchgeführt. Die FACS-Analyse der transduzierten mMSC erfolgte 48 Stunden nach dem Gentransfer und zeigte eine Effizienz von ca. 48% für pPR1-mIL-18 und ca. 24% für pPRIEG7-mIL-18 (Abb. 3-17).

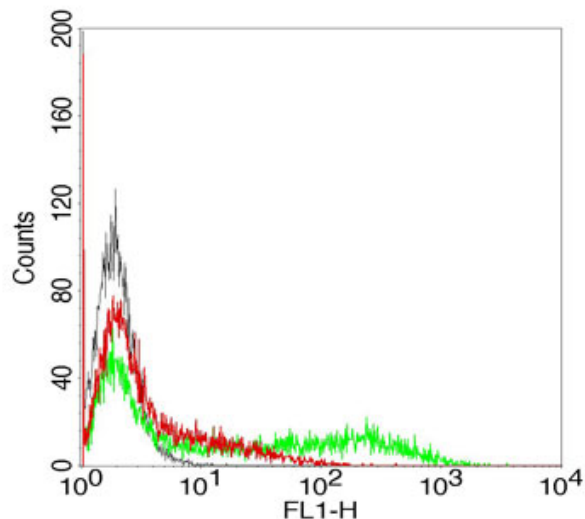


Abb. 3-17: FACS-Ergebnisse für Transduktionsversuche mit mMSC und lentiviralem System, Vergleich von Transfektoren pPR1-mIL-18 (grün) und pPRIEG7-mIL-18 (rot) gegen Negativkontrolle (schwarz); Transfektionseffizienz nach 48 Stunden; auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität des EGFP, auf der Ordinate die Zellzahl dargestellt.

Die Rate EGFP-positiver mMSC konnte durch Einzelzellselektion und Zugabe von Zeo zur Zellkultur auf 97% für pPR1-mIL-18 und ca. 95% für pPRIEG7-mIL-18 angehoben werden (Abb. 3-18). Diese Kulturen waren über lange Kulturdauer stabil positiv für die grüne Fluoreszenz.

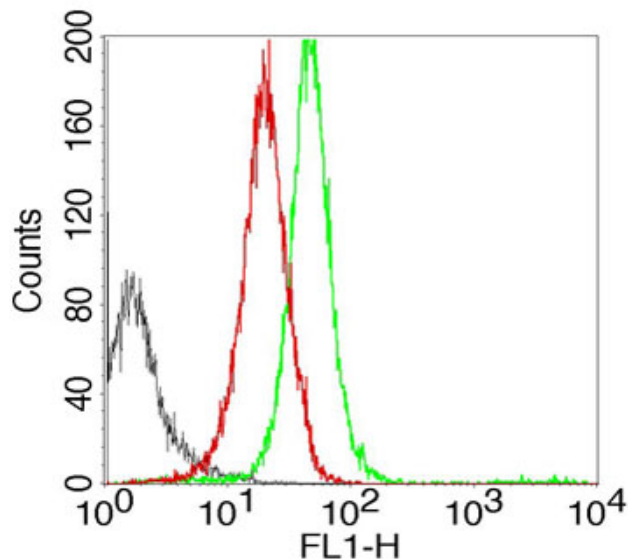


Abb. 3-18: FACS-Ergebnisse für selektierte Kulturen von lentiviral transduzierten mMSC, Vergleich von pPR1-mIL-18 (grün) und pPRIEG7-mIL-18 (rot) gegen Negativkontrolle (schwarz); auf der Aszisse ist die Fluoreszenzintensität des EGFP, auf der Ordinate die Zellzahl dargestellt.

3.3.3 Nachweis der Expression von mIL-18 durch murine mesenchymale Stammzellen

3.3.3.1 Transiente mIL-18-Expression in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit pcDNA3.1-mIL-18 Lipid-basiert transfiziert (pcDNA3.1, nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle), um die Expression von mIL-18 in pcDNA3.1 im Sinne einer Positivkontrolle zu bestätigen. Mit einem IL-18-ELISA mit Zellkulturüberständen der transfizierten Zellen, abgenommen 24 Stunden nach Transfektion, wurde die mIL-18-Expression im Vektor nachgewiesen. Der mIL-18-Nachweis in den Zellkulturüberständen pcDNA3.1-mIL-18-transfizierter COS-7-Zellen war positiv, während in Negativkontrollen kein mIL-18 detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.2 mL-18-Expression in murinen mesenchymalen Stammzellen

Die Expression von mL-18 durch den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1-mL-18 in mMSC aus der A/J-Maus war transient mit den durchgeführten IL-18-ELISA von Zellkulturüberständen nachweisbar. Mit den lentiviralen Transfervektoren pPR1-mL-18 und pPRIEG7-mL-18 konnten stabile mMSC-IL-18-Kulturen generiert werden. Durch Selektion lentiviral transfizierter Zellen mit dem Antibiotikum Zeocin war es möglich, stabile und sehr reine mMSC-IL-18-Kulturen zu etablieren. Für das eukaryotische Transfektionssystem war dies nicht möglich.

Für die Transfektion von mMSC mit pcDNA3.1-mL-18 mit der Amaxa-Technologie wurden anhand der Standardkurve nach 3 Transfektionsversuchen mittlere Konzentrationen von 139 pg/ml (24 Stunden nach Transfektion), 36 pg/ml (48 Stunden nach Transfektion) und 47 pg/ml (96 Stunden nach Transfektion) bestimmt (siehe Abb. 3-19). In den Überständen aller Negativkontrollen wurde kein mL-18 nachgewiesen (0 pg/ml). Nach 24 Stunden fand ein Mediumwechsel statt. Die Ergebnisse für die Zeitpunkte 48 und 96 Stunden nach Transfektion rangierten zwischen 19 und 62 bzw. 0 und 118 pg/ml und machten den transienten Charakter der Transfektion deutlich. Eine hohe Zelltodrate bei einigen der Transfektionsversuche erhöhte die Unzuverlässigkeit dieser Transfektionsmethode weiterhin.

Nach Transfektion mit Lipofectamin 2000 war kein mL-18 im Überstand messbar (Daten nicht gezeigt).

Für lentiviral transfizierte mMSC wurden ebenfalls IL-18-ELISA mit Zellkulturüberständen durchgeführt. Diese wurden methodisch bedingt nicht nach 24 Stunden, aber nach 48 und 96 Stunden gewonnen. Nach 48 Stunden wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Die mittlere Konzentration von mL-18 im Zellkulturüberstand betrug nach 48 bzw. 96 Stunden für pPR1-mL-18 160 bzw. 23 pg/ml und für pPRIEG7-mL-18 172 bzw. 67 pg/ml. Die Produktion war in drei Transfektionsversuchen stabil nachweisbar, während in den Negativkontrollen kein mL-18 gemessen wurde.

mIL-18 Gehalt im Zellkulturüberstand

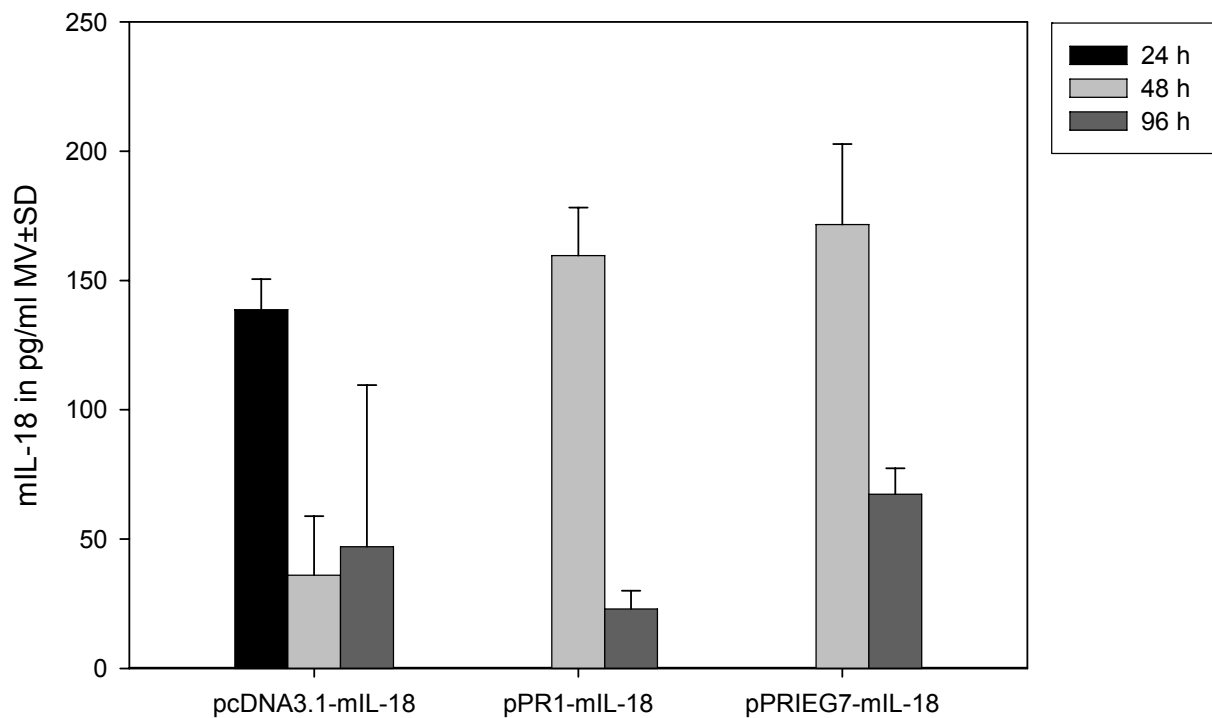


Abb. 3-19: Detektion von mIL-18 in Kulturüberständen nach Gentransfer in mMSC. Die Produktion von löslichem mIL-18 wurde durch einen IL-18-ELISA mit Zellkulturüberständen nach 24 Stunden (nur für pcDNA3.1-mIL-18), 48 und 96 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus je drei Transfektionsversuchen mit Mediumwechsel nach 24 h für pcDNA3.1-mIL-18 bzw. nach 48 h für pPR1-mIL-18 und pPRIEG7-mIL-18. In den Überständen der Negativkontrollen war kein mIL-18 detektierbar (0 pg/ml).

Durch Einzelzellselektion und Antibiotikaselektion sollten stabile mMSC-IL-18 aus lentiviral transduzierten Zellkulturen generiert werden. Im Kulturverlauf waren im IL-18-ELISA von Kulturüberständen dieser Kulturen stabile mIL-18-Konzentrationen nachweisbar.

3.4 *In vivo*-Biofunktion von mIL-18-exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen

In einem ersten, orientierenden *in vivo*-Versuch wurde A/J-Mäusen Matrigel mit NXS2-Tumorzellen und mMSC-IL-18 (Gruppe 3) subkutan injiziert und fünf Tage belassen, um erste Erkenntnisse über einen möglichen Effekt des etablierten mMSC-IL-

18 Vehikel-Systems zu gewinnen. Als Negativkontrolle dienten die Mäuse der Gruppe 1, denen ausschließlich NXS2-Tumorzellen appliziert wurden. Zur Kontrolle des alleinigen Effektes von mMSC wurden den Mäusen der Gruppe 2 NXS2-Tumorzellen und native mMSC injiziert. In H/E-gefärbten Schnitten der Matrigel-Plugs konnten deutliche Unterschiede im Wachstum der NXS2-Tumorzellen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von mMSC gezeigt werden.

3.4.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Schnitten gefrorener Matrigel-Plugs

In den H/E gefärbten Schnitten der Matrigel-Plugs aller Versuchsgruppen sind deutlich die starkviolett gefärbten Inseln von NXS2-Tumorzellen eingebettet in rosafarbenem angefärbtem Matrigel zu erkennen. NXS2-Tumorzellen sind rundliche Zellen ohne Zellausläufer, mit großem prominentem Nukleus und wachsen in festen kolonienartigen Verbänden. In Schnitten der Versuchsgruppe 2 und 3 sieht man darüber hinaus mMSC im gesamten Plug angefärbt. Diese Zellen stellen sich im Vergleich zu den NXS2-Zellen kleiner und länglich dar, haben ebenfalls violette dominante Zellkerne und violett-rosa gefärbte fibroblastenartige Zellausläufer. Die mMSC zeigen in der Matrigelmatrix ein lockeres Wachstum in länglichen Formationen.

Schon auf den ersten Blick zeigen sich zwei markante Unterschiede zwischen der Gruppe 1 und den beiden Versuchsgruppen mit mMSC-Beteiligung. Die NXS2-Zellinseln sind in diesen beiden Gruppen deutlich kleiner ausgeprägt, während sie in Gruppe 1 prägnant größer wachsen. NXS2-Kolonien aus Gruppe 1 bestehen aus zehn und mehr Tumorzellen, in den anderen beiden Gruppen sind einzeln wachsende Tumorzellen und Kolonien von bis zu fünf NXS2-Zellen zu sehen. Zudem sind deutlich weniger Tumorzellinseln in Gruppe 2 und 3 zu sehen.

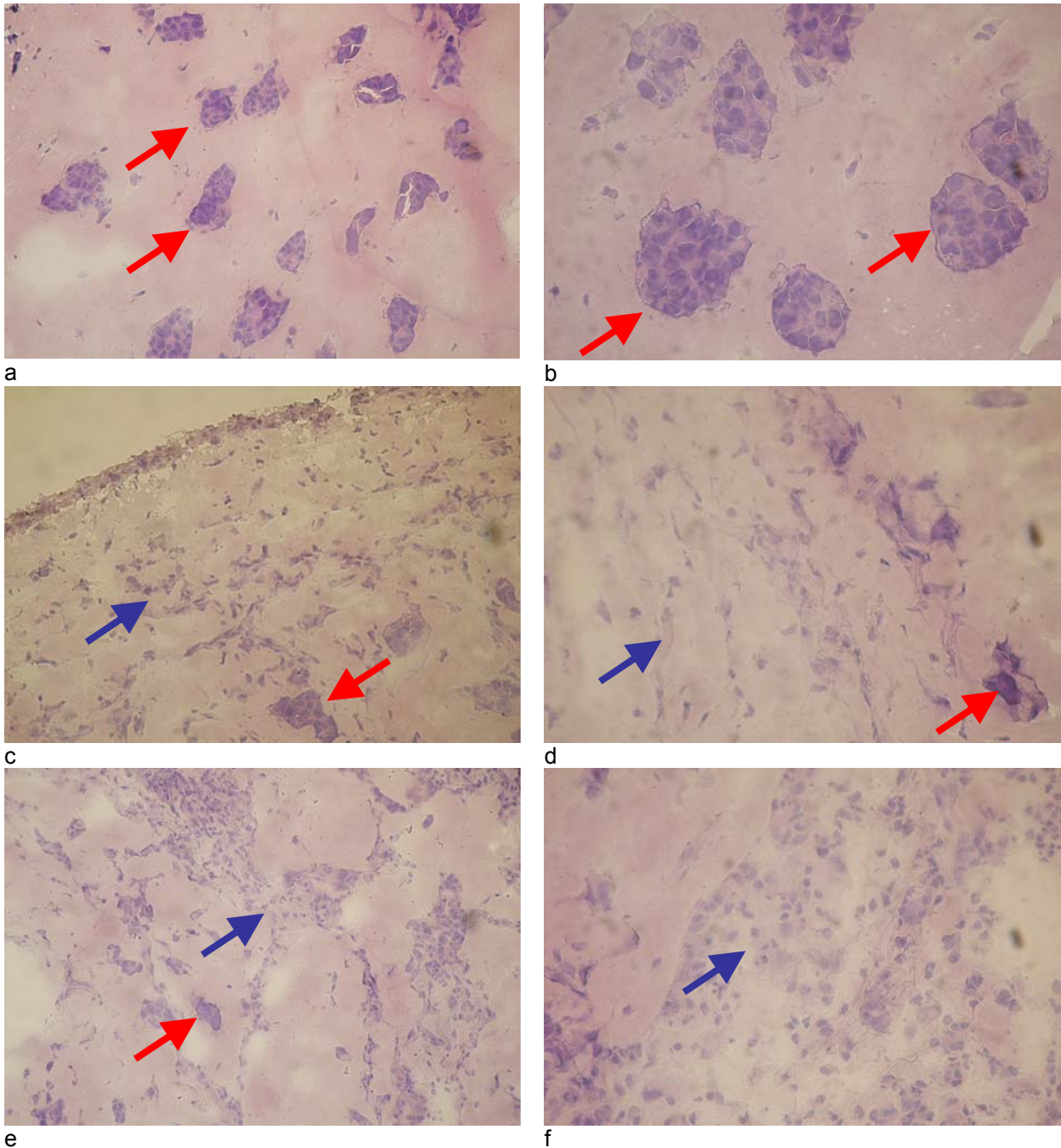


Abb. 3-20: Histologie der NXS2-Tumorschnitte. H/E-gefärbte Gefrierschnitte der Matrigel-Plugs aller 3 Versuchsgruppen in verschiedenen Vergrößerungen: a) Gruppe 1 nur NXS2 200fach und b) 400fach vergrößert, rote Pfeile zeigen auf starkviolett gefärbte Kolonien der NXS2-Tumorzellen; c) Gruppe 2 NXS2 mit nativen mMSC 200fach und d) 400fach vergrößert, rote Pfeile zeigen auf im Vergleich kleinere NXS2-Tumorzellinseln, blaue Pfeile auf Formationen von fibroblastenartig wachsenden mMSC; e) Gruppe 3 NXS2 mit mMSC-IL-18 200fach und f) 400fach vergrößert, roter Pfeil auf NXS2-Tumorzelle, blaue Pfeile auf helleren violetten mMSC, die in lockeren Formationen wachsen.

Beim Auszählen der Tumorzellinseln in je zwei Schnitten eines Tumors jeder Maus der Versuchsgruppen standen im Mittel zehn NXS2-Tumorzellinseln/Gesichtsfeld in Gruppe 1, nur fünf NXS2-Tumorzellinseln in Gruppe 2 und zwei in Gruppe 3 gegenüber. Die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und den Gruppen 2 und 3 sind dabei ebenso signifikant (je $P < 0,001$), wie der Unterschied zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 ($P < 0,001$).

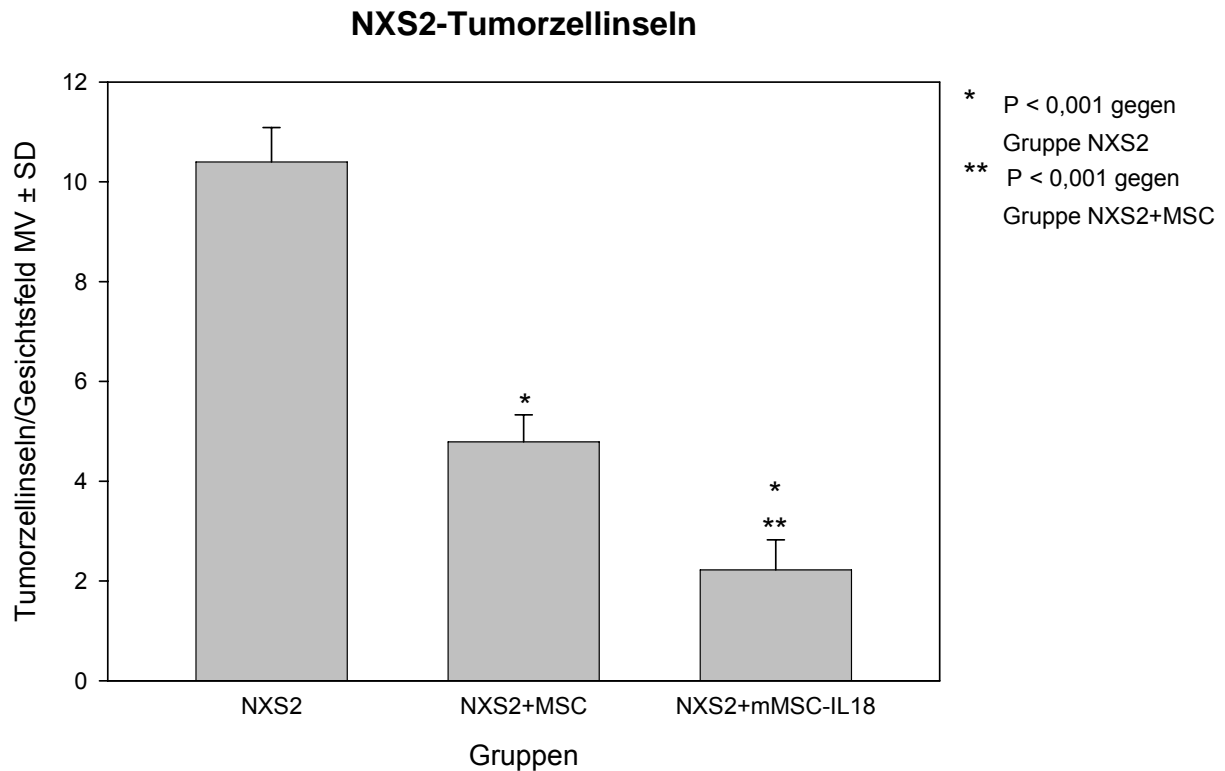


Abb. 3-21: Statistische Analyse der NXS2-Tumorschnitte. In den Gefrierschnitten der Matrigel-Plugs wurde die Anzahl von NXS2-Tumorzellinseln/Gesichtsfeld in 200facher Vergrößerung für alle Tiere der drei Versuchsgruppen quantifiziert. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung für 10 Gesichtsfelder in je 2 Tumorschnitten jeder Maus. Die Unterschiede zwischen den Tieren aller Gruppen sind mit $P < 0,001$ signifikant.

4 Diskussion

Am Beginn dieser Arbeit stand die Idee, mesenchymale Stammzellen als Vehikel-System zur Immuntherapie des Neuroblastoms einzusetzen. Die Prognose des Neuroblastoms konnte in den vergangenen 25 Jahren für Patienten in Stadium 4-INSS auch nach Einführung der Hoch-Dosis-Chemotherapie nur wenig verbessert werden. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 31% bleibt diese Patientengruppe im Fokus der aktuellen Entwicklung neuer Therapiestrategien. Diese Arbeit zeigt die erfolgreiche Etablierung und Charakterisierung muriner MSC, die genetisch manipuliert zur Produktion von mIL-18 befähigt wurden sowie deren Wirksamkeit in einem syngenem Neuroblastom Mausmodell.

Dafür wurden zunächst MSC aus dem Knochenmark von A/J-Mäusen gewonnen, in Kultur gebracht und charakterisiert. Zwei verschiedene Kulturmedien wurden für die Langzeitkultur der Vorläuferzellen getestet. Im CFU-F Assay wurde die Fähigkeit der MSC, in typischen Kolonien zu wachsen, gezeigt. Es erfolgte ein Nachweis ihrer Differenzierungsfähigkeit in die adipogene und in die osteogene Richtung nach Kultur in spezifischem Induktionsmedium über vier Wochen. Da für MSC bisher kein spezifischer Oberflächenmarker bekannt ist, wurde mithilfe der Fluozytometrie ein Muster von Oberflächenproteinen bestimmt, welches die MSC der A/J-Maus charakterisiert.

Für die Expression von mIL-18 wurden die charakterisierten MSC mit dem mIL-18-Gen transfiziert. Zuerst erfolgten Transfektionen mit pEGFP-DNA, um die effizienteste Transfektionsmethode zu ermitteln. Verglichen wurden lipid-basierte Transfektionsmethoden mit FuGene 6, SuperFect, ExGene 500 und Lipofectamine 2000 und die Amaxa Nucleofector-Technologie, welche sich als die effizienteste erwies. Nach Transfektion mit dem eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1, welcher das mIL-18-Gen enthielt, konnte eine transiente Expression von mIL-18 gezeigt werden. Für den Einsatz in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten zur Evaluation von Wirkmechanismus und Antitumor-Effekt waren die transient mIL-18-produzierenden mMSC nur bedingt geeignet, da die kurze Zeitspanne der mIL-18 Expression keine lange Versuchsdauer zuließ.

Daher wurde der lentivirale Gentransfer unter Verwendung von pPR1 bzw. pPRIEG7 als Transfervektoren und den Helferplasmiden pMDLg, pRRE und pRSV für die MSC aus der A/J-Maus etabliert. Das mIL-18-Gen musste dafür in die Transfervektoren kloniert werden. Die Transfervektoren enthielten darüber hinaus das EGFP-Gen, wodurch die Bestimmung der Transfektionseffizienz möglich wurde. Nach lentiviraler Transduktion der MSC wurden im Laufe der Kultur stabile Mengen von mIL-18 mittels ELISA in den Zellkulturüberständen bestimmt, die FACS-Analysen zeigten die Expression von EGFP.

Ein erstes *in vivo*-Experiment in A/J-Mäusen mit Matrigel zur orientierenden Einschätzung des Einflusses von mMSC und mMSC-IL-18 zeigte eine deutliche Hemmung des Wachstums von NXS2-Tumorzellen in Quantität und Qualität ihres Wachstumsmusters.

4.1 Mesenchymale Stammzellen aus der A/J-Maus

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten Zellen aus dem Knochenmark von A/J-Mäusen zeigten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu beschriebenen Stammzelllinien anderer Spezies, die hier erläutert werden.

4.1.1 Isolation von mesenchymalen Stammzellen der A/J-Maus

Die verbreitete Methode, MSC durch Ausspülen des Knochenmarks aus den langen Röhrenknochen der unteren Extremität aus Maus-Spezies zu gewinnen, wurde bereits von da Silva Meirelles *et al.* beschrieben [22] und nun in dieser Arbeit erstmals erfolgreich für die A/J-Maus angewendet. Kontaminierende HSC wurden durch die Kulturbedingungen in kommerziell erhältlichem MesenCult Medium bzw. modifiziertem DMEM, durch Medienwechsel und die Ausnutzung der adhärenen Eigenschaften der mMSC eliminiert. In der Lichtmikroskopie der nativen Zellkultur wurde das zunächst sehr heterogene morphologische Bild mit zunehmender Kulturdauer homogener; hämatopoetische Zellkolonien bildeten sich zurück. In FACS-Analysen wurden charakteristische Oberflächenmarker der HSC wie CD45, CD34 und CD117 routinemäßig bestimmt. Kontaminierende HSC waren nach 10 Passagen der Zellkultur nicht mehr nachweisbar.

Im Unterschied dazu beschreibt die Arbeit von Phinney *et al.* das Persistieren von hämatopoetischen Vorläufern – nachgewiesen durch eine fortbestehende Expression von CD11b und CD45 in Immunfluoreszenzversuchen – in Stammzellkulturen, welche ebenfalls durch die Adhärenz der Zellen auf der Kulturoberfläche isoliert wurden [78]. Diese Tatsache ist möglicherweise auf die Zusammensetzung des von Phinney *et al.* gewählten Kulturmediums zurückzuführen, welches keine spezifischen Zusätze zur Unterstützung der Proliferation der mMSC, wie L-Glutamin oder HEPES Puffer enthält. Auch scheint die Wahl eines 75 µm-Filters für das initiale Filtern der gewonnenen Zellen aus dem Knochenmark bei einer angenommenen Zellgröße von 90 µm für die mMSC ungünstig. Weiterhin ist eine Schädigung der sehr empfindlichen MSC-Fraktion durch den Gebrauch von 0,25% Trypsin/EDTA mit einer Einwirkzeit von 5 min und das Lösen der Zellen mittels Zellschaber denkbar. Als wahrscheinlich wird auch eine Kontamination mit Zellen des Oberschenkelgewebes während der Isolation der Zellen aus dem Knochenmark durch unsauberes Arbeiten bei der Präparation der Knochen diskutiert [79].

Andere Ansätze, die Reinheit der Zellkultur herzustellen, wie die Negativselektion durch Immundepletion mit Antikörpern gegen CD11b, CD 34 und CD45 durch Baddoo *et al.* oder die Positivisolierung mittels Antikörpern gegen Sca-1 und Weizenkeim-Agglutinin im FACS durch Van Vlasselaer *et al.*, erfordern die Verfügbarkeit aufwändigen und kostspieligen technischen Gerätes und manipulieren die empfindliche Zellfraktion. Die Immundepletion beeinträchtigt die Wachstumsrate der MSC durch Downregulation von Genen der Zellproliferation, auch das Sortieren von Zellen im Durchflusszytometer wirkt sich negativ auf die Vitalität der MSC aus und beeinträchtigt die Differenzierbarkeit der isolierten Zellen [42,80]. Analog zu den Erkenntnissen von Silva Meirelles *et al.* wurde in der vorliegenden Arbeit eine besondere Sensitivität der mMSC hinsichtlich ihrer Proliferation in der ersten Kulturperiode beobachtet, die besonders von Einflüssen wie der initialen Zelldichte und dem Verdünnungsverhältnis erster Zellpassagen, aber auch von dem Einsatz von Trypsin und der Wahl des Kulturmediums abhängig schien.

Die Wahl des Standardmediums für weiterführende Versuche dieser Arbeit fiel auf das kommerziell erhältliche MesenCult Medium, da für dieses Medium bessere Er-

gebnisse für die Proliferation der mMSC erzielt wurden. Leider sind genaue Angaben der Zusammensetzung dieses Mediums hinsichtlich der zugesetzten Wachstumsfaktoren und anderen supportiven Bestandteilen nicht erhältlich. So ist es schwierig, die günstigen Bedingungen für die Proliferation der mMSC in der Kultur diese Zusätze betreffend näher zu charakterisieren.

Um die Schädigung der mMSC während Zellpassagen zu verringern, wurde die Inkubationszeit des 0,05% Trypsin/EDTA mit max. 2 min so kurz wie möglich gehalten, die Verdaureaktion in jedem Falle mit Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen vor dem erneuten Ausplattieren gewaschen. Auch wurden die Zellen nach Inkubation mit Trypsin/EDTA durch sanftes Klopfen von der Kulturoberfläche gelöst, um die Einwirkzeit zu verringern. Auf den Einsatz weiterer mechanischer Hilfsmittel, wie einem Zellschaber, wurde in dieser Arbeit verzichtet, um die Schädigung der mMSC zu minimieren.

Analog zu den Arbeiten von Silva Meirelles *et al.* und Baddoo *et al.* schwankte die Zahl der isolierten Zellen aus dem Knochenmark der A/J-Maus sowie die Anzahl der gebildeten CFU-F-Kolonien und schien einzig abhängig vom Alter der verwendeten Tiere [22,42]. Das Wachstum der isolierten mMSC glich der Kinetik der von Silva Meirelles *et al.* isolierten mMSC: zu Beginn der Kultur wuchsen die Zellen sehr langsam, nach raschem Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit stabilisierten sich Teilungsraten auf einem hohen Niveau [22]. Diese Eigenschaften gilt es in der frühen Kultur zu respektieren. Initiale Verdünnungsraten von 1:3 und 1:4 in der Arbeit von Phinney *et al.* erscheinen in diesem Zusammenhang als zu hoch und kontraproduktiv bei der Etablierung einer homogenen Kultur mesenchymaler Stammzellen.

Mit konventionellen Methoden lassen sich mMSC aus der A/J-Maus isolieren und in Kultur bringen. Besonders wichtig ist dabei der behutsame Umgang in der Anfangsphase der Zellkultur.

4.1.2 Charakteristika mesenchymaler Stammzellen der A/J-Maus

Die isolierten Zellen zeigten die typische beschriebene Morphologie spindelförmiger, flacher fibroblastenartiger Zellen mit prominentem granuliertem Nucleus und wuchsen im CFU-F in charakteristischen Kolonien. Die Ergebnisse des CFU-F-Assays

lassen weiterhin vermuten, dass der Anteil der MSC im Knochenmark auch bei A/J-Mäusen mit steigendem Lebensalter abnimmt, die Qualität ihrer Eigenschaften ist jedoch unvermindert stabil. Diese Erkenntnisse sind kongruent zu Aussagen von Caplan, der die Anzahl von gewonnenen MSC aus adultem Knochenmark abhängig von Alter und Allgemeinzustand der Spender sah und feststellte, dass ihre Anzahl bei steigendem Lebensalter abnimmt [81].

Ein sicherer Nachweis des Vorliegens von mMSC der A/J-Maus gelang in dieser Arbeit durch die Differenzierung der Zellen in adipogen und osteogen stimulierten Kulturen. Die durch Kobune *et al.* für humane MSC und durch Silva Meirelles *et al.* für murine MSC standardmäßig beschriebenen Methoden zur Differenzierung von MSC konnten hier erstmals für mMSC aus der A/J-Maus erfolgreich angewendet werden [22,28].

Die Differenzierung der mMSC in weitere mögliche Richtungen war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Aus unserer Sicht konnte die Plastizität der multipotenten mMSC, sich entlang verschiedener Linien zu entwickeln, ihre Charakteristika zu verändern und die Kapazität, funktionales Gewebe auszubilden, durch die adipogene und osteogene Differenzierung hinreichend nachgewiesen werden. Unabhängig von der Zielstellung der vorliegenden Arbeit wäre der Nachweis ihrer vielfältigen Kapazität der dynamischen Differenzierung auch in die chondrogene oder myogene Richtung besonders für den Aspekt einer möglichen Anwendung der mMSC aus der A/J-Maus im Bereich des Tissue engineering interessant.

Auch die Immunophänotypisierung der Zellkulturen der A/J-Maus bestätigte das Vorliegen von mMSC. Wie bereits erwähnt, ist für MSC bisher kein spezifischer phänotypischer Oberflächenmarker benannt worden [39]. So wurde auch in dieser Arbeit durchflußzytometrisch ein für mMSC der A/J-Maus charakteristisches Muster von Oberflächenmarkern bestimmt. Die Ergebnisse sind vereinbar mit denen von Silva Meirelles *et al.* und Wieczorek *et al.* für mMSC [22,82], aber auch mit der Arbeit von Kemp *et al.* über humane MSC [21]. Auch die von Baddoo *et al.* charakterisierten mMSC zeigten, unabhängig von der verwendeten Isolationsmethode ein vergleichbares Muster von Oberflächenmarkern [42].

Die Expression der für die Zelladhäsion verantwortlichen Oberflächenmoleküle CD29, CD44, Sca-1, CD106 [22,42-44] war nachweisbar, hämatopoetische Marker wie CD45, CD117/c-kit und CD31 [17,22,40] hingegen nicht. Das in der Literatur gleichermaßen als positiv- und negativ-exprimiert beschriebene Molekül CD90.2 war in den FACS-Analysen dieser Arbeit in allen mMSC-Kulturen negativ. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Baddoo *et al.*, welche die Expression dieses Antigens auf ihren durch Immundepletion gewonnenen mMSC von FVB/N-Mäusen zeigten [42]. Auch vier von fünf untersuchten Zellkulturen von da Silva Meirelles *et al.* aus C57B1/6- bzw. BALB/c-Mäusen wurden negativ für CD90.2 getestet, nicht jedoch die fünfte mMSC-Kultur, in der CD90.2 exprimiert wurde [22]. Da darüber hinaus keine Unterschiede in der Wachstumskinetik oder der Zelldifferenzierung gefunden wurden, wird eine Heterogenität des Phänotyps von mMSC in diesem Merkmal vermutet. Ob diese phänotypische Heterogenität gleichbedeutend mit einer funktionalen Heterogenität der mMSC ist, wurde bislang nicht untersucht. Ebenso wie CD90.2 wird auch CD34 als Antigen beschrieben, das eine Heterogenität in seiner Expression zeigt. In den Arbeiten von Waller *et al.* und Copland *et al.* wird die mögliche Expression von CD34 auf der Oberfläche direkt aus dem Knochenmark isolierter MSC beschrieben [41,83], wohingegen in Arbeiten von Baddoo *et al.* oder da Silva Meirelles *et al.* keine Expression von CD34 beobachtet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde der endotheliale Marker CD34 zu Kulturbeginn auf der Oberfläche der mMSC exprimiert. Diese Expression war im Kulturverlauf rückläufig.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturen zeigen Charakteristika, die eine Klassifikation als MSC erlauben. Damit sind mMSC aus dem Knochenmark der A/J-Maus in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

4.2 *In vivo*-Biofunktion von mIL-18 exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen der A/J-Maus

Für eine mIL-18-Sekretion wurden funktionsfähige mIL-18-exprimierende Vektoren hergestellt und mMSC mittels Transfektion genetisch modifiziert. Dafür wurden verschiedene Methoden für die schwer transfizierbaren MSC evaluiert. Hierbei wurde schnell deutlich, dass die erforderliche Stabilität, den antitumoralen Wirkstoff zu exprimieren, mit konventionell transfizierten mMSC nicht gewährleistet werden konnte.

Obwohl in einer kurzen Phase nach der Transfektion eine positive mL-18-Expression gemessen wurde, ging diese nach 24 Stunden bereits zurück und war nach 4 Tagen nicht mehr nachweisbar. Daher wurde auf die lentivirale Transduktion als weitere Methode des Gentransfers für die mMSC zurückgegriffen.

Darüberhinaus wurde die Wirkung von mL18-produzierenden mMSC in einem *in vivo*-Versuch nachgewiesen.

4.2.1 Antitumorale Aktivität von mMSC-IL-18 gegen die NXS2-Neuroblastomzelllinie

In subkutanen Tumoren beeinträchtigten mMSC-IL18 das Wachstum von NXS2-Tumorzellen in Matrigel signifikant hinsichtlich der Qualität ihres Wachstumsmusters und der Quantität der ausgezählten Tumorzellinseln. Diese Differenzen waren zwischen den Tieren der Negativkontrolle und den Tieren mit injizierten mL-18-exprimierenden mMSC zu beobachten, deutlich aber auch in der Gruppe mit nativen mMSC.

Diese mit $P < 0,001$ signifikanten Ergebnisse legen einen direkten antitumoralen Effekt durch mMSC gegen die Neuroblastomzelllinie NXS2 nahe und bestätigen damit Ergebnisse von Nakamura *et al.*, die eine Hemmung des Wachstums von 9L-Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* durch native MSC in Ratten zeigen konnten [59]. Die Hemmung von primärem Tumorwachstum und der Entwicklung von Lungenmetastasen eines Lewis-Lungenkarzinoms *in vivo* durch die nicht näher charakterisierte adhärenz Zelfraktion des Knochenmarkes wurde durch Maestroni *et al.* gezeigt [61]. Darüberhinaus kam es zu einer Wachstumsminde rung dieser Tumorzellen auch *in vitro* und zu einer Minderung in der Ausbildung von Lungenmetastasen eines B16-Melanommodells *in vivo*. In Experimenten von Khakoo *et al.* mit der Kaposi-Sarkomlinie KSIMM wanderten intravenös injizierte MSC spezifisch in subkutane Tumoren und unterdrückten dort dosisabhängig das Wachstum [84]. Die Wirkung wird auf Mechanismen zurückgeführt, die den direkten Zellkontakt bedürfen, wie die E-Cadherin abhängige Inhibierung der Akt-Phosphorylierung. Hombauer *et al.* beschrieb die antitumorale Aktivität der mMSC gegen epitheliale Tumoren [60].

Der stärkste Effekt gegen das Wachstum der NXS2-Tumorzellen war in der Gruppe 3 mit mMSC-IL-18 zu beobachten und war signifikant (je $P < 0,001$) gegenüber den Ergebnissen in den beiden anderen Versuchsgruppen. Diese Beobachtung kann auf die Effektivität von mL-18 gegen die murine Neuroblastomzelllinie NXS2 hinweisen. Die Ergebnisse sind kongruent mit Ergebnissen für die Neuroblastomzelllinien TBJ, C1300 und Neuro2a, welche bereits sensitiv für eine Therapie mit IL-18 getestet wurden. Redlinger *et al.* kombinierten das Zytokin mit niedrig dosiertem IL-2 und erzeugten mit peritumorale Injektion rekombinanten Zytokins in 57% der Tiere eine komplette Tumoreradikation gegenüber 42% in der Gruppe mit IL-18 einfach therapierten Tieren [85]. Dagegen unternahm Iinuma *et al.* Therapieversuche mit einer Fusionsvakzine Dendritischer Zellen und Tumorzellen, welche IL-12 und/oder IL-18 exprimierte [86]. Komplette protektive und signifikante therapeutische Effekte im C1300 Neuroblastom und den Lebermetastasen traten bei der Kombination beider Zytokine in der Fusionsvakzine auf. Ino *et al.* erzielten eine gute antitumorale Aktivität gegen die Neuro2a-Neuroblastomzelllinie durch intratumorale Injektion IL-18 exprimierender Herpes simplex Viren. Auch in den Experimenten von Ino *et al.* waren Herpes simplex Viren mit den kombinierten Zytokinen IL-12 und IL-18 in ihrer onkolytischen Aktivität überlegen, eine nochmals gesteigerte Wirksamkeit wurde durch Kombination mit B7-1, einen membranständigen kostimulierenden Faktor erreicht [87]. In weiteren Tumoren, wie dem Fibrosarkom [88], Osteosarkom [89], Hepatom [90] und K-BALB- sowie CT26-Tumoren [91] konnten ebenfalls Antitumoreffekte durch IL-18 gezeigt werden.

Für weiterführende Versuche, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, wurden lentiviral stabil mL-18-exprimierende mMSC produziert. Mit ihnen wird es möglich sein, den Antitumoreffekt für das Neuroblastom und seine Mechanismen näher zu betrachten.

4.3 Evaluation des Therapieansatzes

Die antineoplastische Substanz IL-18 wurde bereits erfolgreich *in vivo* eingesetzt. Die Idee, eine neue effiziente Therapiestrategie gegen das Neuroblastom auf der Basis dieses Interleukins zu entwickeln, war maßgeblich durch die Eigenschaften von IL-18 bestimmt. Die drei wichtigen Charakteristika – Induktion der TH1-Immunantwort,

Hochregulation von MHC-Klasse-I auf Neuroblastomzellen und Hemmung der tumor-induzierten Angiogenese – sollen einen gezielten Angriff auf den Tumor bedingen.

Das Neuroblastom ist ähnlich wie humanes Nervengewebe und viele neuronale Zelllinien durch eine geringe Expression von MHC-Klasse-I gekennzeichnet, welche die Tumorzellen vor Interaktionen mit dem Immunsystem schützt [92]. Möglicherweise steht dieser momentane Zustand der Oberflächenstruktur von Neuroblastomzellen im Zusammenhang mit der Überexpression des *MYCN*-Onkogens [93]. Das bedeutet jedoch nicht, dass Neuroblastomzellen nicht in der Lage sind, das Protein in größerem Umfang zu exprimieren. Drew *et al.* zeigten die Hochregulierung der Expression von MHC-Klasse-I auf Neuroblastomzellen durch IFN- γ , dieser Effekt ist auch entscheidend im Zusammenhang mit der Wirkweise des IL-18 [94]. In Experimenten von Sykulev *et al.* führte eine geringfügige Stimulation der MHC-Klasse-I-Expression bereits zu einer erhöhten zytolytischen T-Zell-Antwort [95].

Auch die verminderte Expression von Endothelwachstumsinhibitoren und die erhöhte Expression angiogener Faktoren in Neuroblastomen ist *MYCN*-Onkogen vermittelt [7,8]. So zählt das Neuroblastom zu den gut durchbluteten Tumoren, die im fortgeschrittenen Stadium zu Hämorrhagien neigen. Daher liegt es nahe, die Angiostase als mögliche effektive Therapiestrategie in Betracht zu ziehen.

4.3.1 Immunangiostase durch IP-10 induziert durch IL-18

Die Hemmung der vermehrten Angiogenese in der Neoplasie ist neben der Aktivierung von mononukleären Zellen und ihrer Migration in das Tumorbett sowie der Induktion einer tumorspezifischen Immunität, ein wichtiger Teilaspekt einer antitumoralen Immuntherapie.

Das CXC Chemokin IP-10 konnte als ein wichtiger Faktor für die Induktion der Tumorregression identifiziert werden. Es wird im Rahmen der TH-1 Immunantwort gebildet und ist assoziiert mit der Expression von IL-18 und IFN- γ [96]. Die ausgelöste Immunangiostase ist ein wichtiger Faktor für einen effizienten Antitumoreffekt. Die Rückbildung humaner Lymphome im Mausmodell war mit der erhöhten Expression dieser Faktoren im Tumorgewebe assoziiert, intratumorale Injektion von IP-10 in dieses aggressiv wachsende Lymphom-Modell führten zur Tumornekrose in der Arbeit

von Sgadari *et al.* [71]. Chikkanna-Gowda *et al.* beschreiben ausgedehnte Areale avaskulärer, suppurativer Nekrosen mit Fibrinthromben und Hämorrhagien nach intratumoraler Behandlung von K-BALB- und CT26-Tumoren mit IL-18-exprimierenden Semliki Forest Viruspartikeln [91]. Die antiangiogene Wirkung des IP-10 auf ein SCK-Mammakarzinom unter Einfluß von IL-18 im syngenem Mausmodell benennen Coughlin *et al.* als einen der Hauptmechanismen des Zytokins, verweisen jedoch auf weitere antitumorale Mechanismen des IL-18 vor dem Hintergrund der nur bedingt erfolgreichen Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren mit Angiogeneseinhibitoren wie Angiostatin oder Endostatin [72].

Diese Beobachtungen verdeutlichen die Charakteristika der antiangiogenen Wirkung des IL-18 bzw. durch induzierte CXC-Chemokine und machen einen Therapieerfolg beim Neuroblastom wahrscheinlich.

4.3.2 Nebenwirkungen von TH1-Zytokinen/neue Strategien zur IL-Gabe

Die systemische Anwendung von IL-18 im Tierversuch verursacht unerwünschte Wirkungen. Besonders gravierend sind Nebenwirkungen, welche bei Therapieversuchen mit IL-18 in Kombination mit anderen TH1-Zytokinen, wie z.B. IL-12 oder IL-2 auftreten. Neben den angestrebten verbesserten antineoplastischen Effekten kommt es besonders bei Kombination mit intravenös injiziertem IL-12 zu Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust, Diarrhoe und fettiger Leberdegeneration bis hin zu fatalen systemischen Entzündungsreaktionen, endotoxischem Schock und erhöhter Letalität. Diese extremen Effekte werden durch Carson *et al.* auf die Induktion von IFN- γ durch Natürliche Killerzellen und die Makrophagenaktivierung durch IFN- γ zurückgeführt, wichtige Aspekte der TH1-Immunantwort [97].

Dagegen wurde in der klinischen Phase-I-Studie von Robertson *et al.* mit intravenös appliziertem, rekombinantem humanen IL-18 (Dosierung 3-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bei therapie-refraktärer, fortgeschrittener Tumorerkrankung nur ein Patient von achtundzwanzig mit limitierenden Nebenwirkungen auffällig, die zum Abbruch der Studienmedikation führten [98]. Tägliche intravenöse Infusionen über fünf Tage wurden allgemein gut toleriert, beeinträchtigende Nebenwirkungen wie Schüttelfrost, Fieber, Übelkeit,

Kopfschmerz und Hypotonie waren erwartungsgemäß zu beobachten. Veränderungen der Laborparameter betrafen in erster Linie die Lebertransaminasen und hämatologische Faktoren. Jedoch kam es in nur zwei Fällen zu späten Tumorregressionen drei bzw. fünf Monate nach Therapieende, ein möglicherweise immunvermittelter Antitumoreffekt. Da in der Studie keine Maximaldosis bestimmt wurde, bleibt Raum für die Erhöhung von Dosierung, Verlängerung und Wiederholung von Therapiezyklen zugunsten des antitumoralen Therapieerfolges. Dies dürfte negative Auswirkungen auf die Nebenwirkungsrate einer Therapie mit IL-18 mit sich bringen.

Daher ist die Suche nach alternativen Möglichkeiten einer sichereren IL-18-Applikation notwendig, die es einerseits ermöglichen, systemische Dosen zu reduzieren, oder andererseits eine Alternative zur intravenösen Gabe und der resultierenden systemischen Verfügbarkeit des Zytokins bieten. Wichtig sind Versuche durch die direkte – zum Beispiel peritumorale, intratumorale oder intracranielle – Applikation in Tumornähe, die Dosisreduktion bei gleich bleibender antitumoraler Wirkung bewerkstelligen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer neuartiger Ansatz verfolgt, den Antitumorwirkstoff direkt an den Wirkort zu bringen. Dabei bilden spezifisch eingewanderte MSC den Wirkstoff direkt in der Umgebung der Neoplasie und die systemische Wirkung kann reduziert werden.

4.3.3 Mesenchymale Vorläufer als zelluläres Transportsystem

Die Fähigkeit des gezielten Einwanderns an Orte sowohl entzündlichen als auch neoplastischen Geschehens macht MSC zu einem geeigneten Instrument für die zelluläre Immuntherapie. Zahlreiche Anwendungen von MSC als Vehikel für verschiedene Zytokine belegen den Erfolg der Therapiestrategie gegen Gliome [59], Melanome [75,99] und Mammakarzinome [58]. Auch ein Einsatz von mMSC als Hilfszellen für eine antitumorale Gentherapie solider Tumoren wird von Silva *et al.* diskutiert [100]. Die große physiologische Signifikanz der mMSC für die Entwicklung einer Neoplasie verspricht den Verbleib der Zellen im Zielgebiet und somit eine Verbesserung der Distribution antitumoraler Wirkstoffe bzw. Vektoren.

Wichtige Grundlage für die Verwendung von MSC als zelluläre Transporter ist der Nachweis ihrer Migration ins Tumorbett. *In vivo* bieten verschiedene Methoden die

Möglichkeit, die Migration von MSC im Empfängerorganismus zu verfolgen, *in vitro* sind Marker in Gewebeschnitten fluoreszenzmikroskopisch und immunhistochemisch nachweisbar. Durch Transduktion von MSC mit Herpes simplex Typ I-Thymidinkinase ist die Markierung für die Micro-Positronen-Emissions-Tomografie möglich [101]. Markierte MSC wanderten in Versuchen mit humanen Kolonkarzinomzelllinien nachweislich in die subkutanen Herde ein und trugen in erheblichem Maße zur Stromabildung bei. Mikroskopische Untersuchungen von Tumorschnitten dieser Versuche zeigten die Ansiedlung der MSC vorwiegend im Gefäßsystem und Bindegewebe der Tumoren. Darüber hinaus fanden sich markierte MSC in angrenzender Haut und insbesondere in Haarfollikeln. Khakoo *et al.* verfolgten intravenös injizierte MSC, markiert mit magnetischen Eisenoxid-Partikeln mittels Magnet-Resonanz-Tomografie in die Tumorperipherie [84]. In der Ganzkörperbildgebung waren markierte MSC auch in der Lunge und dem reticuloendothelialen System detektierbar, nicht aber in anderen gut durchbluteten Organen wie dem Herz, Gehirn, Nieren oder Skelettmuskel. Auch biologische Leuchtstoffe wie Luciferasen bieten die Möglichkeit der *in vivo* Bildgebung [102]. Viele als Marker exprimierte Fremdproteine bergen jedoch das Risiko einer Immunreaktion im Empfängerorganismus. So birgt auch der Gebrauch von GFP diese Gefahr und verstärkt zum Beispiel in Neuroblastomzelllinien durch Induktion von Zellstress die Toxizität einer Vielzahl antitumoraler Wirkstoffe [103,104]. In therapeutischen Ansätzen sollten solche Störfaktoren vermieden werden, sobald der Verbleib der mMSC im Empfängerorganismus aufgeklärt ist.

4.3.4 MSC und das Neuroblastom

Die von Riede und Schaefer beschriebene Morphologie des Neuroblastoms mit dem Nebeneinander von unreifen und reifen Zellelementen, den Bindegewebssepten und den regressiven Veränderungen legt ein Einwandern von MSC zur Unterstützung der Prozesse im Tumorbett nahe [2]. Durch den hohen Zellumsatz und die Umbauprozesse im Tumor und seiner Umgebung werden entzündungsgleiche Signale induziert, die für das Einwandern und die Proliferation von MSC verantwortlich sind [53].

Die Knochen sind, nach dem Knochenmark der zweithäufigste Ort für Metastasen des Neuroblastoms. Die Signaltransduktion zur Aktivierung der Osteoklasten, welche die Pathogenese der Metastasierung des Neuroblastoms in die Knochen maßgeblich

bestimmen, verläuft vielfältig [105]. Ein wichtiger Pathway ist die direkte Aktivierung der Osteoklastendifferenzierung über RANKL, ein anderer die indirekte Stimulation der Osteoklasten durch IL-6. Dieses Zytokin ist ein im Tumormilieu sezernierter Osteoklastenaktivierungsfaktor, der an tetra- und hexamerische Rezeptorenkomplexe aus dem ubiquitären gp130-Rezeptor und Rezeptoren der IL-6-Familie bindet, welche auf Osteoklasten exprimiert werden und diese hochsensibel für die Zytokinaktivierung machen. In *in vitro*-Koinkubationsexperimenten mit Neuroblastomzellen und Osteoklastenvorläufern konnte keine Aktivierung der Vorläuferzellen beobachtet werden. Durch zugesetzte MSC konnte diese Osteoklastenaktivierung durch die nachweisliche Sekretion großer Mengen IL-6 gezeigt werden [63]. Aus dem nahen Milieu des Knochenmarkes angezogene MSC könnten auch *in vivo* eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Knochenmetastasen des Neuroblastoms erfüllen und bieten sich dadurch auch hier als therapeutisches Ziel an.

4.4 Möglichkeiten der neuen Therapiestrategie

Die Idee, mesenchymale Stammzellen als Vehikel zu benutzen, um Zytokine mit antitumoralen Eigenschaften in das Tumormilieu zu schleusen, lässt sich auf viele Neoplasien anwenden. Wie bereits erwähnt, haben 40 % aller Neuroblastompatienten durch späte Diagnosestellung eine schlechte Prognose, die bisher nicht oder nur wenig durch neue Therapieansätze beeinflusst werden kann. Der Einsatz muriner mesenchymaler Stammzellen als syngener Zelltransporter für Interleukin-18 zur zielgerichteten Tumor-Immuntherapie kann – nach langjähriger Stagnation der Verbesserung des Patientenoutcomes – einen wichtigen Meilenstein in der Therapie des Neuroblastoms darstellen.

Weiterhin könnte dieser Ansatz auch für andere Tumorentitäten in Zukunft von Bedeutung werden. Das Neuroblastom steht hier stellvertretend für alle Tumoren, welche mesenchymale Stammzellen benötigen, um sich ideale Proliferationsbedingungen zu schaffen.

5 Zusammenfassung

Beim Neuroblastom handelt es sich mit 8% um den dritthäufigsten Tumor im Kindesalter; trotz intensiver Forschung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in INSS-Stadium 4 – in dem sich etwa 40% aller Patienten bei Diagnosestellung befinden – bei lediglich 31%. Die gezielte, intratumorale Applikation antineoplastischer Zytokine wie IL-18 mittels mesenchymaler Stammzellen stellt einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz dar, der in der Lage ist typische Probleme der Chemotherapie wie einen geringen und unspezifischen Antitumoreffekt sowie hohe Toxizität zu umgehen. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung einer IL-18-produzierenden MSC-Zelllinie für die zelluläre Immuntherapie sowie die Untersuchung ihrer Wirkung im syngenem Neuroblastommodell.

Als Grundvoraussetzung wurden zunächst erstmals MSC aus dem Knochenmark von A/J-Mäusen gewonnen und charakterisiert. Das kommerziell erhältliche MesenCult-Medium wurde dabei als optimales Medium für die Langzeitkultur dieser Zellen ermittelt. Die spindelförmigen, flachen, fibroblastenartigen mMSC mit prominentem granuliertem Nucleus zeigten im CFU-F Assay das Wachstum in typischen Kolonien; der Anteil der MSC im Knochenmark nahm auch bei A/J-Mäusen mit steigendem Lebensalter ab, während die Qualität ihrer Eigenschaften stabil blieb. Die Differenzierung der mMSC in adipogene und osteogene Zelllinien nach spezifischer Stimulation zeugte von ihrer Pluripotenz. Die Immunophänotypisierung ergab mit MSC anderer Spezies vergleichbare Ergebnisse: die adhäsiven Oberflächenmoleküle CD29, CD44, Sca-1, CD106 waren nachweisbar, hämatopoetische Marker wie CD45, CD117/c-kit und CD31 hingegen nicht. Für die beiden Marker CD90.2 und CD34, für die eine phänotypische Heterogenität beschrieben wird, waren die Signale negativ bzw. erst positiv und dann rückläufig.

Durch lipid-basierte Transfektionsmethoden und die Amaxa Nucleofector-Technologie konnten mMSC mit dem mL-18-Gen im eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert und eine transiente Expression von mL-18 gezeigt werden. Der transiente Charakter der Transfektion und die dadurch bedingte kurze Zeitspanne der mL-18-Expression ließen keine langen Versuchsdauern in *in vitro*- und *in vi-*

vo-Experimenten zur Evaluation von Wirkmechanismus und Antitumor-Effekt zu. Daher erfolgte der erfolgreiche lentivirale Gentransfer der MSC mit pPR1-mIL-18 bzw. pPRIEG7-mIL-18 als Transfervektoren und den Helferplasmiden pMDLg, pRRE und pRSV. Im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen konnte mittels ELISA 96 h nach Transfektion ein mittlerer mIL-18 Gehalt von 23 pg/ml für pPR1-mIL-18 bzw. 67 pg/ml für pPRIEG7-mIL-18 gemessen werden. Die Transfervektoren enthielten neben dem mIL-18-Gen auch das EGFP-Gen, wodurch die Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS und das Verfolgen transfizierter mMSC *in situ* möglich wurden. Mit Zeocin selektierte Einzelzellkulturen lentiviral transfizierter mMSC waren über lange Kulturdauer mit 97% für pPR1-mIL-18 bzw. 95% für pPRIEG7-mIL-18 stabil positiv für die grüne Fluoreszenz.

In einem ersten *in vivo*-Experiment mit einem NXS2-Tumormodell in A/J-Mäusen zur orientierenden Einschätzung des Einflusses von mIL-18-exprimierenden mMSC wurde eine signifikante Hemmung des Wachstums von NXS2-Tumorzellen in Quantität und Qualität ihres Wachstumsmusters gezeigt.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit die prinzipielle Wirksamkeit von IL-18-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen zur zielgerichteten und spezifischen Therapie der dritthäufigsten Neoplasie des Kindesalters – des Neuroblastoms.

6 Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU-F	<i>Fibroblast-colony forming unit</i>
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescent Absorbent Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
G418	Genitacin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen- <i>Colony-stimulating factor</i>
GvHD	Graft-versus-Host Disease
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HeBS	HEPES- <i>buffered saline solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IP-10	IFN- γ - <i>inducible protein-10</i>
LB-Agar/Medium	Luria Bertani Agar/Medium
MAPC	multipotente adulte Vorläuferzelle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mIL-18	murines Interleukin-18
MSC	mesenchymale Stammzelle
mMSC	murine mesenchymale Stammzelle
mMSC-IL-18	mIL-18 exprimierende mMSC
MV	Mittelwert
<i>MYCN</i>	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
P/S	Penicillin/Streptomycin
Sca	<i>Stem cell antigene</i>

SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SOC-Medium	modifiziertes SOB (<i>Super optimal broth</i>)- <i>catabolite repression</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VWF	von-Willebrand-Faktor
Zeo	Zeocin

B Literaturverzeichnis

1. Deutsches Kinderkrebsregister (Hrsg). Jahresbericht 2006 des Deutschen Kinderkrebsregisters, Mainz. 2006. www.kinderkrebsregister.de
2. Riede U-N, Schaefer H-EH. Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme; 1999.
3. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313(18):1111-1116.
4. Informationsportal der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) und des Kompetenznetzes Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (Hrsg). Informationen zu Krebs- und Blutkrankheiten bei Kindern und Jugendlichen. 2007. www.kinderkrebsinfo.de
5. Sidell N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1982;68(4):589-596.
6. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999;341(16):1165-1173.
7. Ribatti D, Alessandri G, Vacca A, Iurlaro M, Ponzoni M. Human neuroblastoma cells produce extracellular matrix-degrading enzymes, induce endothelial cell proliferation and are angiogenic in vivo. *Int J Cancer* 1998;77(3):449-454.
8. Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rossler J, Hatzi E, Schwab M, Schweigerer L. Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *Eur J Biochem* 1999;263(3):757-764.
9. Dvorak HF, Gresser I. Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(7):497-502.
10. Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M, Almasan A. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 2001;98(7):2183-2192.
11. Kirkwood JM, Richards T, Zarour HM, Sosman J, Ernstoff M, Whiteside TL, Ibrahim J, Blum R, Wieand S, Mascari R. Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon alpha2b in patients with high-risk resected melanoma: the E2690 laboratory corollary of intergroup adjuvant trial E1690. *Cancer* 2002;95(5):1101-1112.

12. Streck CJ, Ng CY, Zhang Y, Zhou J, Nathwani AC, Davidoff AM. Interferon-mediated anti-angiogenic therapy for neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228(1-2):163-170.
13. Escobar MA, Grosfeld JL, Powell RL, West KW, Scherer LR, III, Fallon RJ, Rescorla FJ. Long-term outcomes in patients with stage IV neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006;41(2):377-381.
14. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-390.
15. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-274.
16. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615-2625.
17. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.
18. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S8-S12.S8-S12.
19. Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J Lab Clin Med* 2005;146(5):271-278.
20. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107(2):275-281.
21. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma* 2005;46(11):1531-1544.
22. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123(4):702-711.
23. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002;20(3):205-214.
24. Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda FD, Bianco P, Cancedda R. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Miner Res* 1994;9(8):1239-1249.

25. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991;99(Pt 1):131-139.
26. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977;91(3):335-344.
27. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(8):4756-4759.
28. Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H, Sasaki K, Dehari H, Uchida H, Honmou O et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol* 2003;31(8):715-722.
29. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40(6):1275-1284.
30. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;10(20):3016-3020.
31. Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2(4):309-320.
32. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18(12):1417-1426.
33. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105(1):93-98.
34. Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* 2004;1007(1-2):1-9.
35. Nilsson SK, Dooner MS, Weier HU, Frenkel B, Lian JB, Stein GS, Quesenberry PJ. Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. *J Exp Med* 1999;189(4):729-734.
36. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19):10711-10716.
37. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demon-

- strate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6(11):1282-1286.
38. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(11):4857-4861.
 39. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13(1):69-80.
 40. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176(1):57-66.
 41. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR, Tersappen L. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 1995;85(9):2422-2435.
 42. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89(6):1235-1249.
 43. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265(1):134-139.
 44. Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(2):519-524.
 45. Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, Brendel C. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 2005;84(11):722-727.
 46. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001;29(2):244-255.
 47. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-1822.
 48. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third

- party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363(9419):1439-1441.
49. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther* 2004;9(2):189-197.
 50. Tsuda H, Wada T, Ito Y, Uchida H, Dehari H, Nakamura K, Sasaki K, Kobune M, Yamashita T, Hamada H. Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol Ther* 2003;7(3):354-365.
 51. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
 52. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315(26):1650-1659.
 53. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860-867.
 54. Tille JC, Pepper MS. Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 2002;280(2):179-191.
 55. Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002;7(2):113-117.
 56. Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):49-59.
 57. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 1999;250(2):485-498.
 58. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(21):1593-1603.
 59. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004;11(14):1155-1164.

60. Hombauer H, Minguell JJ. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Cancer* 2000;82(7):1290-1296.
61. Maestroni GJ, Hertens E, Galli P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(4):663-667.
62. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102(10):3837-3844.
63. Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolta JA, DeClerck YA. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(4):1129-1135.
64. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* 1989;57(2):590-595.
65. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996;156(11):4274-4279.
66. Golab J. Interleukin 18--interferon gamma inducing factor--a novel player in tumour immunotherapy? *Cytokine* 2000;12(4):332-338.
67. Osaki T, Peron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 1998;160(4):1742-1749.
68. Micallef MJ, Yoshida K, Kawai S, Hanaya T, Kohno K, Arai S, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M et al. In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol Immunother* 1997;43(6):361-367.
69. Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res* 1997;57(20):4557-4563.
70. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004;202:275-93.275-293.
71. Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, Vanguri P, Burd PR, Sheikh N, Gupta G et al. Interferon-inducible protein-10 iden-

- tified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):13791-13796.
72. Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM. Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998;101(6):1441-1452.
 73. Tan J, Crucian BE, Chang AE, Aruga E, Aruga A, Dovhey SE, Tanigawa K, Yu H. Interferon-gamma-inducing factor elicits antitumor immunity in association with interferon-gamma production. *J Immunother (1997)* 1998;21(1):48-55.
 74. Ohtsuki T, Micallef MJ, Kohno K, Tanimoto T, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin 18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells. *Anticancer Res* 1997;17(5A):3253-3258.
 75. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62(13):3603-3608.
 76. Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(21):1586-1594.
 77. Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004;22(4):531-543.
 78. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72(4):570-585.
 79. Wang QR, Yan ZJ, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 1990;18(4):341-347.
 80. Van VP, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 1994;84(3):753-763.
 81. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429-435.
 82. Wieczorek G, Steinhoff C, Schulz R, Scheller M, Vingron M, Ropers HH, Nuber UA. Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis. *Cell Tissue Res* 2003;311(2):227-237.
 83. Copland I, Sharma K, Lejeune L, Eliopoulos N, Stewart D, Liu P, Lachapelle K, Galipeau J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp Hematol* 2008;36(1):93-103.

84. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006;203(5):1235-1247.
85. Redlinger RE, Jr., Mailliard RB, Lotze MT, Barksdale EM, Jr. Synergistic interleukin-18 and low-dose interleukin-2 promote regression of established murine neuroblastoma in vivo. *J Pediatr Surg* 2003;38(3):301-307.
86. Iinuma H, Okinaga K, Fukushima R, Inaba T, Iwasaki K, Okinaga A, Takahashi I, Kaneko M. Superior protective and therapeutic effects of IL-12 and IL-18 gene-transduced dendritic neuroblastoma fusion cells on liver metastasis of murine neuroblastoma. *J Immunol* 2006;176(6):3461-3469.
87. Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H, Todo T. Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):643-652.
88. Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 1999;6(5):808-815.
89. Okamoto T, Yamada N, Tsujimura T, Sugihara A, Nishizawa Y, Ueda H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Futani H, Maruo S et al. Inhibition by interleukin-18 of the growth of Dunn osteosarcoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(3):161-167.
90. Shiratori I, Suzuki Y, Oshiumi H, Begum NA, Ebihara T, Matsumoto M, Hazeki K, Kodama K, Kashiwazaki Y, Seya T. Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model. *Cancer Sci* 2007;98(12):1936-1942.
91. Chikkanna-Gowda CP, McNally S, Sheahan BJ, Fleeton MN, Atkins GJ. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18. *Oncol Rep* 2006;16(4):713-719.
92. Murphy C, Nikodem D, Howcroft K, Weissman JD, Singer DS. Active repression of major histocompatibility complex class I genes in a human neuroblastoma cell line. *J Biol Chem* 1996;271(48):30992-30999.
93. van 't Veer, Beijersbergen RL, Bernards R. N-myc suppresses major histocompatibility complex class I gene expression through down-regulation of the p50 subunit of NF-kappa B. *EMBO J* 1993;12(1):195-200.
94. Drew PD, Lonergan M, Goldstein ME, Lampson LA, Ozato K, McFarlin DE. Regulation of MHC class I and beta 2-microglobulin gene expression in human neuronal cells. Factor binding to conserved cis-acting regulatory sequences

- correlates with expression of the genes. *J Immunol* 1993;150(8 Pt 1):3300-3310.
95. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 1996;4(6):565-571.
 96. Setsuda J, Teruya-Feldstein J, Harris NL, Ferry JA, Sorbara L, Gupta G, Jaffe ES, Tosato G. Interleukin-18, interferon-gamma, IP-10, and Mig expression in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis and posttransplant lymphoproliferative disease. *Am J Pathol* 1999;155(1):257-265.
 97. Carson WE, Dierksheide JE, Jabbour S, Anghelina M, Bouchard P, Ku G, Yu H, Baumann H, Shah MH, Cooper MA et al. Coadministration of interleukin-18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice: critical role of natural killer cell interferon-gamma production and STAT-mediated signal transduction. *Blood* 2000;96(4):1465-1473.
 98. Robertson MJ, Mier JW, Logan T, Atkins M, Koon H, Koch KM, Kathman S, Pandite LN, Oei C, Kirby LC et al. Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(14 Pt 1):4265-4273.
 99. Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol* 2006;15(11):865-874.
 100. Silva FH, Nardi NB. From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors. *Med Hypotheses* 2006;67(4):922-925.
 101. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 2005;11(21):7749-7756.
 102. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward WA, Munshi A, Meyn RE, Cox JD, Andreeff M, Marini FC. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2007;67(24):11687-11695.
 103. Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V, Kenniston T, Steitz J, Tuting T, Robbins PD, DeLeo AB. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 2000;7(23):2036-2040.
 104. Goto H, Yang B, Petersen D, Pepper KA, Alfaro PA, Kohn DB, Reynolds CP. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and en-

hanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2(9):911-917.

105. Sohara Y, Shimada H, DeClerck YA. Mechanisms of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228(1-2):203-209.

C Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

D Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Stefanie Heinrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚IL-18 exprimierende mesenchymale Stammzellen als syngenes Vehikelsystem zur Therapie des Neuroblastoms‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 02.06.2008

Stefanie Heinrich

E Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit der Forschung im Labor für Experimentelle Onkologie der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Charité sowie die Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Holger N. Lode und Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Gaedicke.

Großer Dank gilt allen meinen Laborkollegen und involvierten Kollegen aus anderen Forschungsgruppen für die wichtigen Erfahrungen, die sehr freundschaftliche Unterstützung und den Austausch in der Zeit des experimentellen Arbeitens.

Den ICE-Zügen danke ich für die produktive Atmosphäre und die Steckdosen an den Sitzplätzen, ohne die das Schreiben dieser Arbeit zunächst nicht begonnen hätte. In diesem Zusammenhang soll auch der schönste begrünte Balkon auf Erden erwähnt werden, der in Augsburg zu finden ist.

Mr. Jörg sei für die Bereitstellung seines wunderschönen Büros auf der UCBP-Site in Bale, Äthiopien gedankt. Dort nahm die Schreibearbeit – unterstützt von Kaffee erster Güte aus erster Hand – seinen Lauf.

Ich danke Henryk, da ich in seiner Küche meine italienischen Kochkünste beweisen durfte und ganz nebenbei aus dem Geschriebenen eine richtige Doktorarbeit wurde.

Für die kurzfristige Aushilfe mit einem funktionierenden Bildschirm in allerletzter Minute sei Sven gedankt.

Ich danke Ingo für die Hilfe in allen Stilfragen zu jeder Zeit, für die Stärkung mit und ohne Schweinebackennudeln und die Gewissheit, dass wir auch noch eine zweite Doktorarbeit überstehen können.

Ein großen Dank all jenen, die mich immer wieder bestärkt haben weiterzumachen und insbesondere denen, die mir dabei geholfen haben.