



MEDIZINISCHE
FAKULTÄT



Institut für Neuropathologie & Institut für Biochemie und Zellbiologie

Tabea Steffen

Mesenchymale Stammzellmarker in Meningeomen

vorgelegt von Tabea Steffen
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Magdeburg 2019

DOKUMENTATIONSBLATT

Bibliographische Beschreibung

Steffen, Tabea:

Mesenchymale Stammzellmarker in Meningeomen

2019, 85 Bl., 13 Abb., 7 Tab.

Magdeburg, Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Dissertation

Kurzreferat:

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Zellen mit immunmodulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften. Für den Nachweis von MSC sind Adhärenz an Plastikoberflächen, mesenchymale Differenzierbarkeit und die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 entscheidend. Meningeome sind in Bezug auf MSC bisher wenig erforscht. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Adhärenz von Primärkulturen eines meningoethelialen und eines fibroblastischen Meningeoms sowie die zweier etablierter Meningeom-Zelllinien im Differenzierungsmedium erhalten blieb und dieses Medium auch morphologische Veränderungen induzierte, gelang die geforderte adipogene Differenzierung nicht, sodass keine funktionellen MSC nachgewiesen werden konnten. Der ubiquitäre Nachweis von CD73, CD90 und CD105 in 34 Meningeomproben unterschiedlichen WHO-Grades, 8 Proben von Meningen sowie zwei Primärkulturen und den Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 mittels der real-time RT-PCR lieferte jedoch den Verdacht, dass diese Proteine in meningealen Zellen und daraus abgeleiteten Tumoren eine Rolle spielen. Obwohl sich keine signifikante Abhängigkeit der mRNA-Level von Tumor-Status, WHO-Grad oder histologischem Tumor-Subtyp fand, zeigte sich eine positive lineare Korrelation (Pearson-Koeffizient 0,55, $p \leq 0,05$) zwischen der mRNA des für Meningeome eminent wichtigen Tumorsuppressors NF2 und CD73. Ein Regulationszusammenhang beider Gene wurde außerhalb der Doktorarbeit inzwischen zusammen mit Teildaten der Doktorarbeit publiziert. Eine denkbare Rolle von CD73 als 5'-Ecktonukleotidase in Meningeomen wird diskutiert.

Schlüsselwörter:

Meningeom, MSC, CD73, CD90, CD105

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 MENINGEOME	1
1.1.1 <i>Einteilung</i>	1
1.1.2 <i>Genetik</i>	3
1.1.3 <i>Immunhistochemie</i>	4
1.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN (MSC)	5
1.2.1 <i>Humane MSC</i>	5
1.2.2 <i>Eigenschaften humaner MSC</i>	7
1.2.3 <i>Humane MSC in Tumoren</i>	9
1.3 OBERFLÄCHENMARKER HUMANER MSC UND IHRE AMBIVALENTE ROLLE IN TUMOREN	12
1.3.1 <i>CD73</i>	12
1.3.2 <i>CD90</i>	13
1.3.3 <i>CD105</i>	14
1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELE	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 ZELLKULTUREN	17
2.1.1 <i>Zellkulturlinien</i>	17
2.1.2 <i>Primärkulturen</i>	17
2.2 CHEMIKALIEN	18
2.2.1 <i>RT-PCR-Primer</i>	18
2.2.2 <i>Antikörper und Fluoreszenz-markierte Farbstoffe</i>	19
2.2.3 <i>Feinchemikalien, Puffer, Lösungen</i>	19
2.3 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	22
2.3.1 <i>Geräte</i>	22
2.3.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	23
2.4 ZELLINIEN UND PRIMÄRKULTUREN	23
2.4.1 <i>Kultivierungsbedingungen</i>	24
2.4.2 <i>Nachweis der Adhärenz potentieller MSC an Polystyrol-Oberflächen</i>	24
2.4.3 <i>Adipogene Differenzierung</i>	25
2.4.4 <i>Immunhistochemische und histochemische Evaluation der Meningeomzellen sowie Färbung mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin</i>	26
2.4.5 <i>Fotodokumentation, konfokalmikroskopische Dokumentation</i>	28
2.5 DARSTELLUNG RELATIVER EXPRESSIONSLEVEL VON MSC-MARKERN PER PCR	28
2.5.1 <i>Probengewinnung aus der Zellkultur</i>	28
2.5.2 <i>Probengewinnung aus humanem Tumormaterial</i>	29
2.5.3 <i>Extraktion von RNA und reverse Transkription in cDNA</i>	29
2.5.4 <i>Darstellung relativer Expressionslevel per real-time RT-PCR</i>	30

2.6	STATISTIK UND ETHIKVOTUM	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	MSC-NACHWEIS IN MENINGEOM-ZELLKULTUREN	33
3.1.1	<i>Meningeomzellen wachsen adhärent</i>	33
3.1.2	<i>Morphologische Reaktion auf adipogenes Differenzierungsmedium</i>	34
3.1.3	<i>Färbung der differenzierten Zellen mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin</i>	38
3.2	DARSTELLUNG RELATIVER EXPRESSIONSLEVEL VON MSC-MARKERN PER REAL-TIME RT-PCR	40
4	DISKUSSION	46
4.1	DISKUSSION DER ERGEBNISSE – SUCHE NACH MSC IN MENINGEOMEN	46
4.1.1	<i>Das erste Kriterium der ISCT – Adhärenz der Zellen</i>	46
4.1.2	<i>Das zweite Kriterium der ISCT – Differenzierbarkeit</i>	47
4.1.3	<i>Das dritte Kriterium der ISCT – Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105</i>	48
4.2	DISKUSSION DER ANGEWENDETEN METHODE	49
4.3	VIelfältig diskutierte Funktionen humaner MSC in Tumoren	50
4.4	DIE POTENZIELLE ROLLE VON CD73, CD90 UND CD105 IN MENINGEOMEN	52
4.4.1	<i>Fehlende Assoziation mit biologischer Aggressivität</i>	52
4.4.2	<i>Positive Assoziation von CD73 (NT5E) mit NF2/Merlin</i>	53
4.5	MÖGLICHE FUNKTIONELLE BEZIEHUNG ZWISCHEN CD73 (NT5E) UND MERLIN	55
4.5.1	<i>Hinweise zu einer Rolle von NT5E für Malignität, Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakte</i>	55
4.5.2	<i>NF2-Suppression hemmt NT5E-Expression in Meningeom- und meningealen Zellen</i>	57
4.6	FAZIT	59
4.7	AUSBLICK	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	PUBLIKATIONEN	75
8	DANKSAGUNGEN	76
9	EHRENERKLÄRUNG	78
10	CURRICULUM VITAE	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
CAF	Karzinom-assoziierte Fibroblasten
CSC	Karzinomstammzellen
CD73	Ecto-5'-Nukleotidase, NT5E
CD90	Thymuszellantigen-1
CD105	Endoglin
Dkk-1	Dickkopf-1
END	Endoglin, CD73
EndMT	endothelial to mesenchymal transition
EMA	epithelial membrane antigen
EMT	epithelial to mesenchymal transition
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
IFN- β	Interferon- β
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1	insulin-like growth factor-1
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LOH	loss of heterozygosity

MSC	mesenchymale Stammzellen
<i>NF2</i>	Neurofibromatose Typ 2
<i>NF2</i> -Gen	Neurofibromatose 2-Gen
NT5E	Ecto-5'-Nukleotidase
PGE-2	Prostaglandin-2
RT	Raumtemperatur
SDF-1	stromal derived factor-1
STC-1	Stanniocalcin-1
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
TIC	Tumor-induzierende Zellen
TGF- β	transforming growth factor- β
Thy-1	Thymuszellantigen-1, CD90
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 EINLEITUNG

1.1 MENINGEOME

Meningeome sind mit 35,8 % die häufigsten primär intrakraniellen Tumore. Sie haben eine jährliche Inzidenz von 7,44/100 000 Einwohner und werden im Mittel mit 64 Jahren diagnostiziert [1]. Mit zunehmendem Alter wird eine steigende Inzidenz beobachtet. Nur 1,5-2 % aller Meningeome sind bei Kindern zu finden [2]. In 3 % der Fälle werden Meningeome zufällig bei der Obduktion entdeckt [3]. Frauen sind von Meningeomen häufiger betroffen als Männer. Insgesamt liegt das Verhältnis von Frauen zu Männern bei 2:1 [4].

Meningeome leiten sich aus den arachnoidalen Deckzellen ab. Sie zeigen ein mesenchymales und/oder ein epitheliales Erscheinungsbild. Das mesenchymale Erscheinungsbild ist vor allem gekennzeichnet durch das häufige Auftreten von Spindelzellen und die Produktion von kollagenem Stroma. Im Gegensatz dazu findet man bei epithelialen Meningeomen vor allem runde oder polygonale Zellen, viele interzelluläre Junctionen und drüsenähnliche sekretorische Funktionen. Während mesenchymale Eigenschaften vor allem bei fibroblastischen oder metaplastischen Subtypen der Meningeome zu beobachten sind, findet man epitheliale Eigenschaften vor allem bei meningothelialen und sekretorischen Meningeomen [5].

1.1.1 Einteilung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt Meningeome in drei verschiedene Grade ein, wobei ungefähr 80 % der Meningeome langsam wachsende benigne Tumore sind und dem WHO-Grad I entsprechen. 20 % der Meningeome sind atypische oder anaplastische Meningeome, die den WHO-Graden II und III entsprechen, ein aggressiveres Verhalten zeigen und mit stärkerer Morbidität und Mortalität in Verbindung gebracht werden.

Benigne Meningeome (Grad I) zeigen keine Invasion in das Hirnparenchym. Wachsen benigne Meningeome hirninvasiv, dann ist dieses Verhalten vergesellschaftet mit einem Rezidiv. Nach vollständiger Resektion haben sie ein geringes Rezidivrisiko mit 5 % innerhalb von 5 Jahren [6]. Bei den benignen Meningeomen werden acht Subtypen unterschieden - siehe Tabelle 1. Zu den häufigsten Subtypen zählen die meningotheliale, die fibroblastische und die transitionale Meningeome. Während meningotheliale Meningeome durch polygonale oder epitheloide Zellen mit runden bis ovalen Nuclei gekennzeichnet sind, zeigen fibroblastische Meningeome spindelförmige Tumorzellen mit einem elongierten Nucleus und starker Kollagenbildung. Transitionale Meningeome zeigen eine Mischung des meningothelialen und fibroblastischen Typs mit Kalzifikationen. Sie entstehen meistens thorakal bei älteren Frauen.

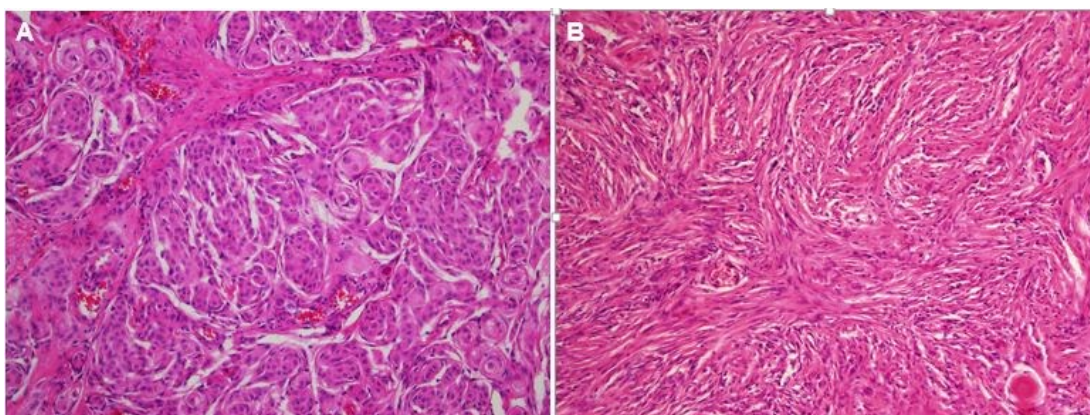


Abb. 1: Darstellung meningothelialer und fibroblastischer Meningeomzellen in HE-Färbung als Übersichtsaufnahme in der 10er Vergrößerung

- A) meningotheliale Meningeomzellen
- B) fibroblastische Meningeomzellen

Atypische Meningeome gehören zum WHO-Grad II und nehmen einen Anteil von ungefähr 15-20 % ein. Sie haben eine erhöhte mitotische Aktivität und zeigen spontane Nekrosen, flächenförmiges Wachstum, eine erhöhte Zelldichte, prominente Nucleoli oder schmale Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation. Atypische Meningeome wachsen häufig hirninvasiv. Sie sind häufig bei jüngeren Patienten in der hinteren Schädelgrube zu finden und haben ein höheres Rezidivrisiko. Nach vollständiger Resektion haben sie ein 5-Jahres-Rezidivrisiko von 40 % [6].

Meningeome, die zum WHO-Grad III gehören, machen ungefähr 1-3 % der Meningeome aus und haben mehr als 20 Mitosen pro 10 zusammenhängende Gesichtsfelder oder

alleinstehende Anaplasien, wie man sie auch bei Karzinomen, Melanomen oder Sarkomen finden kann. In 50-80 % der Fälle findet man bei anaplastischen Meningeomen Rezidive [6].

WHO-Grad	Histopathologischer Subtyp
I	Meningothelial
	Fibroblastisch
	Transitional
	Psammomatös
	Angiomatös
	Mikrozystisch
	Sekretorisch
	Lymphoplasmazellreich
	Metaplastisch
II	Chordoid
	Klarzellig
	Atypisch
	Hirninvasiv
III	Papillär
	Rhabdoid
	Anaplastisch

Tabelle 1: Darstellung der histologischen Subtypen abhängig vom WHO-Grad

1.1.2 Genetik

Die häufigste genetische Veränderung liegt bei Meningeomen im Neurofibromatose 2-Gen (*NF2*-Gen) auf Chromosom 22 (22q12.2) und betrifft das bedeutsamste Tumorsuppressorgen der Meningeome. Allelverluste (LOH, loss of heterozygosity) finden sich in 50-60 % der sporadischen und bei der Mehrheit der *NF2*-assoziierten Meningeome [7]. Die häufigsten weiteren Mutationen sind kleine Insertionen, Deletionen oder Nonsense-Mutationen, die die Spliceregion betreffen. Das *NF2*-Genprodukt wird auch als Merlin oder

Schwannomin bezeichnet. Merlin gehört zur Familie der Strukturproteine 4.1, die eine Verbindung zwischen Membranproteinen und dem Zytoskelett herstellt. Durch negative Regulation der Zellproliferation und Induktion der Apoptose führt es zur Tumorsuppression [8]. Außerdem kann es durch Bindung von CD44 die Zellproliferation vermindern, da CD44 dann nicht mehr an Hyaluronsäure gebunden werden kann [9, 10]. Merlin ist bei Meningeomen mit positiven Allelverlusten verkürzt oder funktionslos. Veränderungen des *NF2*-Gens sind bei fibroblastischen und transitionalen Meningeomen häufiger vertreten als bei meningothelialen Meningeomen [11].

Auch bei der Progression der Meningeome von geringgradigen Tumoren zu höhergradigen Tumoren spielen genetische Veränderungen eine Rolle. Zumindest gibt es chromosomale Alterationen, welche die höheren WHO-Grade auszeichnen und somit ein genetisches Korrelat zu einer postulierten Weiterentwicklung innerhalb eines Tumors darstellen. Wichtig sind bei dieser Entwicklung Verluste der Chromosomenabschnitte 1p, 6p, 9p, 10, 14q und 18q und Amplifikationen oder Zugewinne von 1q, 9q, 12q, 15q, 17q und 20q. Diese Veränderungen sind alle mit höhergradigen, also atypischen und anaplastischen Meningeomen assoziiert. Besonders wichtig zu nennen sind die Verluste von 1p und 14q, die nicht nur mit der Progression zu höhergradigen Meningeomen in Verbindung gebracht werden, sondern auch mit der Entstehung von Rezidiven [12]. Bei Deletionen der 9p21-Region in atypischen und anaplastischen Meningeomen verkürzt sich die mittlere Überlebenszeit betroffener Patienten. Diese Deletion betrifft die Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* [13, 14]. Auch bei benignen Meningeomen findet man nach kompletter Resektion die Entstehung von Rezidiven, die hier vor allem mit einer Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) in Verbindung gebracht werden [15].

1.1.3 Immunhistochemie

Um Meningeome zuverlässig von anderen Tumoren, wie zum Beispiel Schwannomen, Sarkomen, Karzinomen oder Melanomen unterscheiden zu können, spielt nicht nur die Histologie eine entscheidende Rolle, sondern auch die Immunhistochemie der Tumoren. Von allen Meningeomen werden das *epithelial membrane antigen* (EMA) und Vimentin exprimiert [16].

EMA, auch MUC1 oder CD227 genannt, ist ein Membran-assoziiertes Muzin, das bei Zell-Zell-Adhäsionen und Zell-Matrix-Adhäsionen interferiert und eine Rolle bei der

transmembranen Signaltransduktion spielt [17]. Es ist ein Glykoprotein, das vor allem für Gewebe typisch ist, die epithelialen Ursprungs sind oder epitheliale Merkmale tragen [18].

Vimentin ist ein Typ III-Intermediärfilament, das im Zytoplasma mesenchymaler Gewebe vorkommt. Es steht in Kontakt mit dem Nucleus, dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien und organisiert die Position der Organellen [19].

Weitere Proteine, die in Meningeomen nachgewiesen werden können, sind die Proteine S-100 und das Zytokeratin. Bei diesen Proteinen differieren die Häufigkeiten der Nachweise allerdings sehr stark. Die S-100-Proteine sind kalziumbindende Proteine, die typischerweise in chondroiden Tumoren, Gliomen, Melanomen oder Nervenscheidentumoren zu finden sind. In 8 % bis 100 % von Meningeomen konnten sie nachgewiesen werden [20, 21]. Keratine lassen sich zu 4 % bis 53 % in Meningeomen nachweisen [18, 22]. Der häufigste Nachweis von Keratinen gelingt in sekretorischen Meningeomen. Bewährt haben sich hier die Keratine CK7, CK8 und CK19 [23].

1.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN (MSC)

Stammzellen im Allgemeinen sind definiert als sich klonende und sich selbst erneuernde Progenitorzellen, die einen oder mehrere spezielle Zelltypen bilden können [24]. Mesenchymale Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells) sind Stammzellen, die sich in Richtung mesodermaler und nicht-mesodermaler Linien differenzieren lassen, aber nicht mehr in die der hämatopoetischen Linie.

1.2.1 Humane MSC

Humane MSC wurden zum ersten Mal in den 1970er Jahren aus dem Knochenmark isoliert [25]. Sie sind multipotente Zellen, die eine fibroblastenähnliche Morphologie zeigen, sich selbst erneuern und in verschiedene Zelltypen differenzieren können [26]. Neben ihrem Ursprung im Knochenmark [27] lassen sich MSC in mesodermalen (Knochen, Synovia, Knorpel, Fett, Muskel, Tonsillen [26, 28, 29]), endodermalen (Thymus [30]), ektodermalen (Haut [31], Haarfollikel [32], Dura mater [33], Zahnpulpa [34]) und prä- bzw. perinatalen

Gewebe (Nabelschnur [35], Nabelschnurblut [36], Plazenta [37]) finden. MSC konnten aus fast allen Geweben isoliert werden. Daher lässt sich vermuten, dass sie in allen postnatalen Geweben bzw. Organen zu finden sind [38]. Mit zunehmendem Alter nimmt allerdings die Präsenz der MSC ab. Während bei der Geburt noch 1 MSC pro 10^4 Mononuklearzellen des Knochenmarks zu finden ist, vermindert sich der Anteil der MSC auf 1 MSC pro 2×10^6 Mononuklearzellen des Knochenmarks bei einem 80-jährigen Menschen [39].

Zur Identifikation der MSC müssen drei Mindestkriterien der International Society for Cellular Therapy (ISCT) erfüllt sein.

- unter Standardbedingungen muss eine Adhärenz der Zellen zu Plastik gezeigt werden.
- sie müssen spezifische Oberflächenantigene exprimieren.
- sie müssen eine multipotente Differenzierung in Richtung von Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zeigen [40].

MSC exprimieren zu mehr als 95 % die Oberflächenantigene CD73 (NT5E, Ecto-5'-Nucleotidase), CD90 (THY1, Thymuszellantigen) und CD105 (END, Endoglin). Diese drei Oberflächenantigene stellen ein Minimal-/Consensuspanel dar, das in jeder MSC-Kultur exprimiert sein sollte. Hierbei muss nicht jede MSC alle drei Oberflächenantigene exprimieren, da MSC nicht homogen sein müssen. Sie können sich durch eine Wechselwirkung untereinander ergänzen, wodurch die immunsuppressiven bzw. immunmodulatorischen Eigenschaften zustande kommen. Zu weniger als 2 % exprimieren MSC CD34, CD45, CD14 oder CD11b und CD79 α oder CD19 und HLA-DR. Der Oberflächenmarker CD34 findet sich auf Stamm- und Progenitorzellen, CD45 ist ein Pan-Leukozyten-Antigen, CD14 und CD11b sind vor allem auf Monozyten und Makrophagen zu finden, CD79 α und CD19 sind auf B-Zellen zu finden, HLA-DR findet sich nur auf Zellen, die zum Beispiel durch Interferon- γ (IFN- γ) stimuliert sind.

1.2.2 Eigenschaften humaner MSC

Humane MSC haben nicht nur die Eigenschaften, sich selbst zu erneuern, zu proliferieren und zu differenzieren, sondern sie unterstützen diese Eigenschaften auch bei anderen Zellen, insbesondere bei den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks. Besonders nach einer Chemotherapie oder Radiatio unterstützen MSC die Regeneration der hämatopoetischen Zellen. Auch autologe oder allogene Infusionen von MSC nach myeloablativer Therapie konnten die Regeneration und Qualität der hämatopoetischen Zellen steigern [41, 42, 43].

Neben der Differenzierung der MSC in mesodermale Gewebe wie Fett, Knochen oder Knorpel [28] lassen sich MSC auch in nicht-mesodermale Gewebe differenzieren wie Abbildung 2 zeigt. Zu den nicht-mesodermalen Geweben zählen die Haut [44], Neurone [45] (ektodermal) und Hepatozyten [46], Lungenzellen oder Muskelzellen (endodermal). Obwohl sich MSC damit in Gewebe aller drei Keimblätter differenzieren lassen, zählen die MSC nur zu den multipotenten Stammzellen. Es gibt aber Hinweise darauf, dass zumindest einige von ihnen sogar Pluripotenz aufweisen [47, 48].

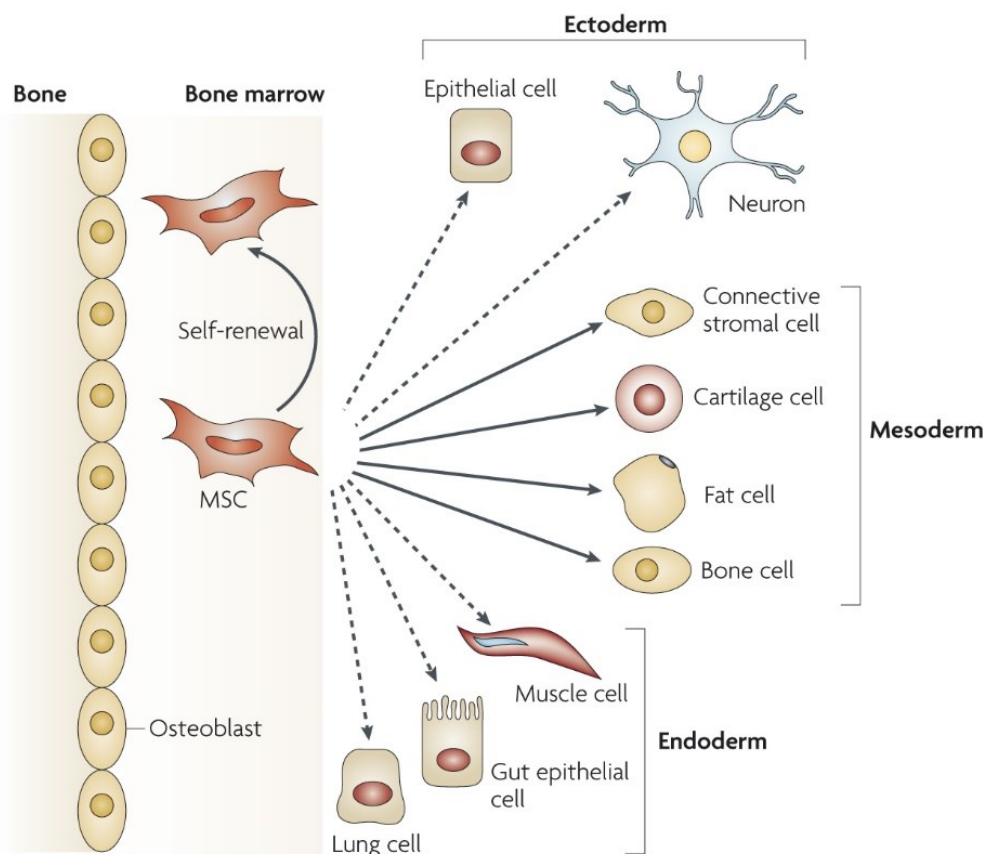


Abb. 2: Darstellung des Potenzials der MSC zur Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung nach Uccelli et al. (2008) [49]

Weiterhin zeigt Abbildung 2 das Potenzial der MSC, sich selbst zu erneuern. Sowohl das Potenzial sich selbst zu erneuern, als auch das Potenzial sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren möchte man sich therapeutisch zu Nutze machen. Die Regulation zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung ist durch intrinsische und extrinsische Faktoren bedingt. Intrinsische Faktoren beziehen sich auf die Genetik der MSC, während die extrinsischen Faktoren die Mikroumgebung des jeweiligen Gewebes und mechanische Einflüsse betreffen [50, 51, 52]. Gerät die Regulation zwischen der Selbsterneuerung und der Differenzierung aus dem Gleichgewicht, kann es zu einem unkontrollierten Zellwachstum kommen. Therapeutisch möchte man die Differenzierbarkeit für die Gentherapie und Gewebsreparaturen nutzen. Hierfür ist das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix notwendig. Verbesserungen durch die Therapie mit MSC konnten für viele Erkrankungen festgestellt werden, wie z.B. bei Leberschäden [46], akutem Myokardinfarkt [53], Diabetes, Schlaganfall oder Morbus Crohn [45, 54]. Somit wirken MSC immunmodulatorisch. Des Weiteren haben MSC anti-inflammatorische Eigenschaften

auf verletztes Gewebe. Sie erreichen eine Reparatur des verletzten Gewebes, indem sie eine Mikroumgebung schaffen. Sie sezernieren lösliche Faktoren, zu denen sowohl proliferative (SDF-1, stromal derived factor 1 [45], IGF-1, insulin-like growth factor-1 [55]) und anti-apoptotische (STC-1, Stanniocalcin-1 [56]) Faktoren zählen, als auch Faktoren, die die Immunantwort (TGF- β 1, transforming growth factor- β 1 [57], iNOS, induzierbare NO-Synthase [58], PGE-2, Prostaglandin-2 [59]) und die Angiogenese (VEGF, vascular endothelial growth factor [60]) beeinflussen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der MSC ist das Homing. Homing bedeutet, dass Zellen in ein Gewebe wandern und sich einfügen, um anschließend vor Ort zu wirken. Häufig findet man Homing von MSC in ischämische oder verletzte Gewebe. Durch eine Kommunikation der MSC mit dem verletzten Gewebe, Endothelzellen oder auch Tumorzellen wird das Homing möglich. Dazu exprimieren MSC Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. Ein Beispiel hierfür ist die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, der SDF-1 bindet [61]. Eine weitere Rolle dabei spielen Integrine, Endothelzellen und proteolytische Enzyme [62, 63].

1.2.3 Humane MSC in Tumoren

Aufgrund der immunsuppressiven und immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC, mit Hilfe derer sie die lokale Umgebung hinsichtlich Regeneration und Reparatur beeinflussen können, wurden MSC bei Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) oder anderen eingesetzt und haben gute immunsuppressive Eigenschaften gezeigt [64]. MSC können aber auch negative Wirkung für den Menschen haben. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, werden MSC nicht nur von verletztem Gewebe oder Endothelzellen angelockt, sondern auch durch Tumorzellen. Entscheidend dafür sind die gleichen endokrinen und parakrinen Signale, die auch das Homing der MSC in verletzte Gewebe beeinflussen, wie z.B. SDF-1. MSC werden zunächst zum Tumor gelockt, proliferieren anschließend in der Umgebung der Tumorzellen und werden zuletzt in den Tumor aufgenommen. Beispielsweise wurden MSC in Mäuse mit einem Glioblastom injiziert. Sie wanderten allein in die Hemisphäre, die den Tumor enthielt und akkumulierten dort [65]. In der Tumorumgebung können sich MSC in aktivierte fibroblastenähnliche Zellen differenzieren, die Tumor-assoziierte Fibroblasten

(TAF, tumor associated fibroblasts) oder Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF, carcinoma associated fibroblasts) genannt werden [66], während in gesundem Gewebe keine TAF gefunden werden konnten. Weitere Ursprünge der TAF sind lokale Fibroblasten [67], endotheliale Zellen, epitheliale Zellen und die Transition von epithelialen oder endothelialen zu mesenchymalen Zellen (EMT, epithelial to mesenchymal transition, EndMT, endothelial to mesenchymal transition) [68, 69]. In Magenkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass mindestens 20 % der TAF durch Differenzierung von MSC entstehen [70]. Nach dem Homing der MSC in den Tumor proliferieren diese und nehmen den TAF-Phänotyp an [71]. Mit Hilfe der TAF können Tumorwachstum, Metastasierung, Angiogenese und Wiederauftreten des Tumors beeinflusst werden. Die Tumorangiogenese spielt eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum. Weil Tumorwachstum ohne einsprossende Gefäße eine wachstumshemmende Hypoxie und Mangelversorgung generiert, sind solide Tumoren bald auf die Neovaskularisation angewiesen. Funktioniert die Angiogenese des Tumors, können die Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden und können proliferieren. So konnte nachgewiesen werden, dass TAF einen wichtigen Teil zur Angiogenese des Kolonkarzinoms beitragen. Native MSC führten nicht zu einer verstärkten Angiogenese des Kolonkarzinoms. Nachdem die MSC jedoch durch die inflammatorischen Zytokine IFN- γ und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) angeregt wurden, produzierten und sezernierten diese VEGF [72]. VEGF ist ein sehr wichtiges Zytokin für die Angiogenese, da es nicht nur selber pro-angiogenetisch wirkt, sondern auch mit Proteinen interagiert, die die Angiogenese weiter fördern. MSC konnten mehrfach mit der Angiogenese von Tumoren in Verbindung gebracht werden. Dieses Verhalten konnte durch die morphologische und molekulare Ähnlichkeit von MSC und mesenchymalen Tumorzellen, die pro-angiogenetisch wirken, bestätigt werden [73]. Aber nicht nur über die Angiogenese kann das Tumorwachstum gefördert werden. MSC können auch immunsuppressiv wirken. Über eine Inhibition der Apoptose von Tumorzellen und die daraus resultierende Vermehrung überlebensfähiger Tumorzellen kommt es außerdem zum Tumorwachstum. Das konnte nach simultaner subkutaner und intrakranieller Injektion von Tumorzellen der Zelllinien U87MG (Zelllinie eines Glioms) und H460 (Zelllinie eines Lungenkarzinoms) und MSC, die aus humanem Fett isoliert wurden, gezeigt werden [74]. Aber nicht nur das Tumorwachstum wird durch MSC beeinflusst. Durch MSC kann es auch zur Tumorneubildung kommen. Ein Beispiel hierfür ist die Injektion von Melanomzellen mit und ohne gleichzeitige Injektion von MSC. Während es bei der Injektion von Melanomzellen und MSC in Mäuse zum Auftreten von Melanomen kam, konnten diese

bei Injektion von Melanomzellen ohne MSC signifikant seltener entstehen. Hierfür werden die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC verantwortlich gemacht [75]. Des Weiteren können MSC die Metastasierung von Tumoren verstärken. Mit Hilfe von parakrinen Signalen führen sie zu verbesserter Motilität, Invasivität und Metastasierung, wie es sich am Beispiel des Mammakarzinoms zeigte [76, 77]. Mit Hilfe der Sekretion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren schafften es endogene MSC sogar, eine Chemotherapieresistenz zur Platin-basierten Chemotherapie hervorzurufen [78]. Weiterhin führte der Einsatz von MSC als Kotransplantat bei allogener Stammzelltransplantation zur Vermeidung der GvHD dazu, dass Rezidive früher auftraten als in der Kontrollgruppe [79].

Auf der anderen Seite zeigen MSC, dass sie das Tumorwachstum und die Metastasierung auch inhibieren können. Am Beispiel von MCF-7 Mammakarzinomzellen wurde gezeigt, dass MSC über die Sekretion des Tumorsuppressors Dickkopf-1 (Dkk-1) eine Tumorzellinhibition erreichen konnten [80]. Weitere Mechanismen zur Reduktion der Tumorzellzahl durch MSC können die Induktion der Apoptose und ein G₀/G₁-Phasen-Arrest der Tumorzellen sein. Die Apoptoseinduktion durch MSC scheint abhängig von der Höhe der MSC-Zahl zu sein. Erst bei einem Verhältnis von MSC zu Endothelzellen von 1:1 oder 3:1 konnte die Apoptoseinduktion und Inhibition der Angiogenese nachgewiesen werden. Bei einer geringeren Anzahl von MSC sezernierten diese weiterhin Wachstumsfaktoren und förderten die Angiogenese [81].

In vitro konnte die Abhängigkeit der anti-kanzerogenen Wirkung von der MSC-Zahl nachgewiesen werden [82]. Diese antikanzerogenen Effekte der MSC versucht man sich therapeutisch zu Nutze zu machen, indem man Therapeutika mit MSC assoziiert oder sie gleich von MSC produzieren lässt und dann das Homing von MSC hin zum Tumor zielgerichtet als Transportweg nutzt. Beispielsweise wurden MSC, die das immunmodulatorische Chemokin CX3CL1 exprimieren, mit dem Fluoreszenzprotein GFP beladen und in Mäuse mit multiplen Metastasen eines Lungenkarzinoms injiziert. Über das GFP konnte ihr Homing verfolgt werden. Sie reicherten sich im Tumor an, inhibierten das Wachstum der Lungenmetastasen und verlängerten somit die Lebenszeit [83]. Ein weiteres Beispiel ist die Therapie des Pankreaskarzinoms mit Hilfe von Interferon- β (IFN- β)-sezernierenden MSC, die ebenso zur Inhibition des Tumorwachstums führte. Dieser Effekt wurde allerdings durch eine zusätzliche Therapie des Pankreaskarzinoms mit dem anti-inflammatorischen Bardoxolon-Methyl (CDDO-ME) geschmälert, da die IFN- β -MSC dadurch an der Migration zum Tumor gehindert wurden [84]. Da das Homing der MSC auch bei Hirntumoren beobachtet wurde, wurden sie ebenfalls für Gliome eingesetzt und

konnten auch hier das Wachstum inhibieren und die Überlebenszeit verlängern [65, 85, 86].

1.3 OBERFLÄCHENMARKER HUMANER MSC UND IHRE AMBIVALENTE ROLLE IN TUMOREN

In diesem Abschnitt soll kurz dargestellt werden, was über die vielfältigen Funktionen der drei Membranproteine bekannt ist, die das minimale Consensus-Panel humaner MSC-Marker darstellen. Besonders soll dabei hingewiesen werden auf ihre ambivalente Rolle in humanen Tumoren, die teils eine das Tumorstadium unterstützende und teils eine hemmende ist. Dies soll untermauern, dass die Analyse dieser Membranproteine bei Meningeomen auch unabhängig von ihrer definitiven Zuordnung zu mesenchymal differenzierbaren MSC von hohem Interesse ist.

Oberflächenmarker sind Proteine, die sich auf der Zelloberfläche befinden und spezielle Zellen oder Gruppen von Zellen charakterisieren. Oft sind Oberflächenmarker Glykoproteine. Humane MSC werden durch die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 charakterisiert. Diese müssen nachgewiesen werden, damit man von humanen MSC sprechen kann.

1.3.1 CD73

Der Oberflächenmarker CD73, auch Ecto-5'-Nucleotidase oder NT5E genannt, ist ein 70 kDa schweres membrangebundenes Protein, das außer auf MSC auch auf T- und B-Lymphozyten, dendritischen, endothelialen und epithelialen Zellen zu finden ist [87]. CD73 dephosphoryliert Mononucleotide zu bioaktiven Mononucleosiden. Bevorzugt dephosphoryliert CD73 Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin [88]. Zusammen mit CD39 kann CD73 aber auch Adenosintriphosphat (ATP) zu AMP und Adenosin dephosphorylieren [89]. Die Funktionen von CD73 sind sehr vielfältig. Nicht nur in Bezug auf physiologische Funktionen, wie der Ionentransport durch intakte Membranen oder die Regulation von Gewebsbarrieren, ist CD73 wichtig, sondern es spielt auch in hypoxisch geschädigtem oder entzündlichem Gewebe und Tumoren eine große Rolle [90]. Sowohl für

MSC als auch für CD73 konnten wichtige Funktionen in Tumoren nachgewiesen werden. Erhöhte Expressionsraten von CD73 konnten beispielsweise in soliden Tumoren, Mamma- [91], Kolon-, Lungen- und Pankreaskarzinomen [92] und Glioblastomen [93] gezeigt werden. Über die Stimulation von Krebszellen führt CD73 durch die Freisetzung von Adenosin zu verstärkter Proliferation, Adhäsion und Chemotaxis und fördert die Invasion von Tumorzellen, die Metastasierung von Tumoren und verkürzt die mittlere Überlebenszeit der Patienten [92, 94]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit einem erhöhten Expressionslevel von CD73 in Glioblastomen die Rezidivrate erhöht war [95]. Auf CD73 bezogene Therapien sind bisher schlecht erforscht. Da die Wirkungen von CD73 durch die Freisetzung von Adenosin zustande kommen und CD73 dadurch eine regulatorische Komponente ist, bestehen mögliche Therapieansätze darin, die Freisetzung von Adenosin durch Hemmung von CD73 zu regulieren oder den Adenosinrezeptor über Agonisten oder Antagonisten zu beeinflussen.

1.3.2 CD90

Das Thymuszellantigen 1, auch Thy-1 oder CD90 genannt, ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Oberflächenprotein, das ursprünglich bei der Herstellung von Antiseren gegen Leukämiezellen von Mäusen entdeckt wurde. Das 25-37 kDa schwere Protein wurde auf verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Hierzu zählen nicht nur MSC, sondern auch Fibroblasten, hämatopoetische Zellen, endotheliale Zellen und Neurone [96, 97]. Zu den Funktionen von CD90 zählt zum Beispiel die Inhibition der Neuronentwicklung, Stabilisierung von Synapsen und die Hemmung neuronaler Reparaturmechanismen [98]. Weitere Funktionen von CD90 sind die Adhäsion von Thymozyten und die Regulation der Apoptoseinduktion von Thymozyten [99]. Durch die Hilfe bei der Adhäsion kann CD90 beispielsweise auch die Metastasierung von Melanomzellen begünstigen. Induziert durch TNF- α und VEGF sind erhöhte Expressionen von CD90 auf aktivierten Endothelzellen und Leukozyten möglich. Über Adhäsion kann es infolgedessen zur hämatogenen und lymphogenen Metastasierung der Melanomzellen kommen [100]. Des Weiteren konnte CD90 als prognostischer Marker für höhergradige Gliome und auf Tumorstammzellen (CSC, cancer stem cells) in Gliomen nachgewiesen werden [101]. CSC haben ähnliche Eigenschaften wie MSC. Sie haben die Möglichkeit, sich selbst zu erneuern, sich zu differenzieren und sie sind verantwortlich für die

Tumorgnese. Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, dass CD90 bei dem Ovarialkarzinom und dem nasopharyngealen Karzinom als Tumorsuppressor fungiert [102, 103].

1.3.3 CD105

Das Protein CD105, das auch Endoglin oder END genannt wird, ist ein transmembranes Glykoprotein und ein Oberflächenmarker für humane MSC. CD105 wurde in den 1980er Jahren mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 44G4 identifiziert, der gegen die prä-B-leukämische Zelllinie HOON gerichtet war [104]. Exprimiert wird CD105 unter anderem auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, Makrophagen, Fibroblasten und auf Endothelzellen [105, 106]. Dabei werden besonders hohe Expressionsraten auf proliferierenden Endothelzellen nachgewiesen [104]. Das Molekulargewicht von CD105 beträgt 180 kDa. Es existieren 2 Isoformen von CD105, die sich in der Länge der intrazellulären Domäne unterscheiden. Während die L-Isoform die häufigere ist und eine intrazelluläre Domäne, bestehend aus 47 Aminosäuren, hat, sind es bei der S-Isoform nur 14 Aminosäuren [107]. Die Gemeinsamkeit beider Isoformen besteht darin, dass sie Korezeptoren für den TGF- β -Rezeptor sind. TGF- β reguliert die Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Adhäsion und Migration von Zellen [108]. CD105 wirkt bei der Proliferation und Angiogenese regulierend auf TGF- β ein. Während die Proliferation und Angiogenese in Anwesenheit von CD105 gesteigert sind, hemmt TGF- β beides in Abwesenheit von CD105 oder bei dessen Inhibition [109]. Das spielt zum Beispiel eine Rolle bei der Psoriasis [110], der rheumatoiden Arthritis [111] oder in infarziertem Gewebe [112]. Bei allen Beispielen ist CD105 stark exprimiert. Des Weiteren kann man eine hohe Expression von CD105 auf den proliferierenden Endothelzellen der peri- und intratumoralen Gefäße von soliden Tumoren [113], dem Mammakarzinom [114], dem kleinzelligen Lungenkarzinom [115] und dem Prostatakarzinom [116] finden. CD105 kann aber ebenso auf Tumorzellen des gastrointestinalen Stromatumors (GIST) [117] und auf tumorinduzierenden Zellen (TIC, tumor-initiating cells) von rhabdoiden Meningeomen [118] nachgewiesen werden. Bei nachgewiesener Tumorerkrankung findet man außerdem eine Erhöhung des löslichen CD105. Die erhöhten Serumwerte von CD105 korrelieren mit verstärkter Metastasierung, einer schlechteren Prognose und einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten [114, 119, 120]. Demzufolge scheint CD105 das Tumorwachstum und die

Metastasierung durch Proliferation der Endothelzellen und Angiogenese zu fördern. An dieser Stelle versucht man therapeutisch einzugreifen. Monoklonale Antikörper gegen CD105, wie zum Beispiel TRC105, wirken anti-angiogenetisch und können die Tumorgenese inhibieren [121]. Die Inhibition von CD105 bei dem epithelialen Ovarialkarzinom führte zur Apoptoseinduktion, zur Induktion von DNA-Schäden in den Tumorzellen, zur verminderten Beweglichkeit dieser und zur erhöhten Sensibilität der Tumorzellen auf platinhaltige Chemotherapeutika [122]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass CD105 in den Tumorzellen des Ovarialkarzinoms vor allem im Zytoplasma lokalisiert war. Nur 5-6 % von CD105 waren an der Zelloberfläche lokalisiert [122]. Dieses Ergebnis legt nahe, dass CD105 unabhängig von TGF- β weitere Funktionen haben muss.

1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELE

Meningeome sind in Bezug auf MSC im strengen Sinne (Adhäsion, Differenzierbarkeit, Oberflächenmarker) und auch generell bezüglich der Expression der genannten Membranproteine kaum erforscht.

Zunächst ist der Nachweis funktioneller, d.h. auch spezifisch differenzierbarer, MSC von Interesse, denn die unterschiedlichen Eigenschaften der MSC machen sie für die Therapie verschiedener Erkrankungen und insbesondere von Tumoren interessant. Auch für Meningeome könnten sich durch MSC neue Therapiemöglichkeiten ergeben. Damit man MSC therapeutisch nutzen kann, müssen ihre Präsenz in Meningeomen und ihre Eigenschaften nachgewiesen werden.

Daneben ist jedoch wichtig, ob eines der drei MSC-spezifischen Membranproteine – CD73, CD90 und CD105 – unabhängig von den MSC-Eigenschaften der Zellen mit höheren Tumorgraden oder einem spezifischen histologischen Subtyp assoziiert ist. Besonders interessant wäre dabei, ob eine Expression signifikant davon abhängig ist, ob der Tumor ein meningotheliales oder fibroblastisches Erscheinungsbild bietet, d.h. aus elongierten Zellen mit potenziell verminderten Zell-Zell-Kontakten und potenziell erhöhter Invasionsneigung besteht. Dabei war die Rolle des für Meningeome bekannten Tumorsuppressors NF2/Merlin zu beachten, weil Merlin eine molekulare Brücke darstellt zwischen Membranproteinen und kortikalem Aktin-Zytoskelett und eine genetische

Inaktivierung dieses Tumorsuppressors in den fibroblastischen Tumoren häufiger vorkommt.

Aus Sicht der molekularen Wirkungsmechanismen der MSC-Membranproteine wäre speziell CD73 ein wichtiger Kandidat für eine direkte Beeinflussung von Meningeomzellen wegen seiner extrazellulären Freisetzung von Adenosin, das als wichtiges Signalmolekül in zahlreichen anderen Tumorentitäten diskutiert wird, u.a. in Bezug auf Migration und Invasion.

Daher stellen sich folgende Fragen.

- (i) In wie weit kommen funktionelle (differenzierbare) MSC in Meningeomen vor?
- (ii) Werden die Membranproteine CD73, CD90 und CD105 in Meningeomen exprimiert?
- (iii) Sind diese Proteine mit histologischen Meningeomvarianten, dem Tumorgrad oder mit Merlin assoziiert?
- (iv) Erweisen daraus Hypothesen zu einer Funktion dieser Proteine im Tumor gegebenenfalls auch unabhängig von MSCs?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLKULTUREN

2.1.1 Zellkulturlinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturlinien finden sich in Tabelle 2.

Art der Zellen	Name	Herkunft	Bezugsquelle
Meningeom-Zelllinien	BenMen-1	Mittels hTERT immortalisierte Zelllinie aus humanem Meningeom Grad I	Prof. Dr. Paulus, Institut für Neuropathologie, Universität Münster, Münster, Deutschland
	IOMM-Lee	Zelllinie aus intraossärem Meningeom Grad III	Prof. Dr. Gutmann, Institut für Neurologie, Washington University of Medical School, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Zellkulturlinien

2.1.2 Primärkulturen

Die Primärkulturen entstammen meningotheelialen und fibroblastischen Meningeomen, die im Institut für Neurochirurgie (Magdeburg) operativ entfernt und im Institut für Neuropathologie (Magdeburg) kultiviert und untersucht wurden.

2.2 CHEMIKALIEN

2.2.1 RT-PCR-Primer

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten RT-PCR-Primer entsprechen den in Tabelle 3 genannten. Diese sind zusätzlich mit der zugehörigen Amplicon-Länge sowie der genutzten Primer-Bindungstemperatur aufgeführt.

Primer	Sequenz (5' – 3')	Fragmentlänge	Schmelztemperatur
NT5E-1201-F (CD73)	TATTGCACTGGGACATTTCG	173bp	55 °C
NT5E-1373-R (CD73)	CCCATCATCAGAAGTGAATATG		
THY-1-2-4981-F (CD90)	GAGGACCTTCATGTTGTATTTG	151bp	55 °C
THY1-2-5131-R (CD90)	CCATGAGAATACCAGCAGTTC		
END-1383-F (CD105)	ATGACCCTGGTACTAAAGAAAG	238bp	55 °C
END-1620-R (CD105)	TGTCCATGTTGAGGCAGTG		
NF2-ex1-2-F	AAGCAACCCAAGACGTTTAC	106bp	55 °C
NF2-ex1-2-R	GGCACACCAAATCAAAGAGG		
β2MG-quant F	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	220bp	55 °C
β2MG-quant R	GATGCTGCTTACATGTCTCG		
GAPDH-161-F	AGGGCTGCTTTTAACTCTGG	161bp	55 °C
GAPDH-R-2	GGGATTTCCATTGATGACAAG		

Tabelle 3: Primersequenzen, Fragmentlängen und Schmelztemperaturen der genutzten Primer

2.2.2 Antikörper und Fluoreszenz-markierte Farbstoffe

Im Folgenden sind in Tabelle 4 alle Antikörper und Fluoreszenz-markierte Farbstoffe aufgeführt, die für die immunhistochemischen bzw. histochemischen Färbungen eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Alexa fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1:100
Anti-Vimentin, monoklonal, Maus	Dako, Santa Clara, CA, USA	1:100
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Serva, Heidelberg, Deutschland	1:40.000
Phalloidin – Alexa fluor 546	Invitrogen	1:26,7

Tabelle 4: für Immun-/Histochemie genutzte Substanzen

2.2.3 Feinchemikalien, Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Abkürzung/ Summenformel/ Trivialname	Bezugsquelle
2-Cyclohexylaminoethylsulfonsäure	Chess	Serva
5-fach Puffer für reverse Transkriptase		Bioline, Luckenwalde, Deutschland
α -Medium		Biochrom, Berlin, Deutschland
Acrylamid (30 %)		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampullenwasser	Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Aqua dest.		

Bezeichnung	Abkürzung/ Summenformel/ Trivialname	Bezugsquelle
Dexamethason		Sigma, München, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth
dNTPs		Sigma-Aldrich
Dubelcco´s modifiziertes Eagle Medium	DMEM, <i>high glucose</i>	PAA
Essigsäure (20 %)		Roth
Ethanol	EtOH	Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	PAN, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum	FCS	PAA
Glycerin	Propan-1,2,3-triol	Roth
Hämatoxylin		Merck
HPLC-Wasser		Merck
3-Isobutyl-1-methyl-xanthin	IBMX	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Indomethazin		Sigma
Insulin		Sigma

Bezeichnung	Abkürzung/ Summenformel/ Trivialname	Bezugsquelle
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg
L-Glutamin		PAN
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Merck
Paraformaldehyd	PFA	Sigma
Penicillin/Streptomycin	P/S	PAN
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	PAN
Random-Primer (25 µg/µl Hexanukleotide)		Bioline
Reverse Transkriptase		Bioline
Rinderserumalbumin	BSA	Roche, Berlin, Deutschland
Salpetersäure (2 %)		Roth
Silbernitrat		Roth
Sudanrot 7B	Fettrot 7B	Serva
SensiMix SYBR Hi-Rox	SYBR-Green	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tris		Serva
Triton X 100		Sigma
Trizol®		Invitrogen
Trypsin		PAN
Tween® 20		Merck

Tabelle 5: Feinchemikalien, Puffer, Lösungen

2.3 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

2.3.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Amplifikator	ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Brutschränke	CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
	Galaxy B	Nunc, Waltham, Massachusetts, USA
Einfriergefäß	Mr. Frosty™	Nalgene®, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence, Osaka, Japan
Heizblock	Rotilab® Block-Heater H250	Roth
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Gerät	Modell	Hersteller
Photometer	BIOPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	REAX-Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Stickstoff-Tank	CryoFreezer 350	Id Ingenieursdienst
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellzähler	Cellometer™ Auto T4	Peqlab
Zentrifugen	Multifuge X1R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Mikro 22R	Hettich, Kirchlingern, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
96 well Platten (steril)	Nunclon™ Surface	Nunc
Cryo-Röhrchen	2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalzählkammern	SD 100	Peqlab
Einmalzellschaber		TPP, Trasadingen, Schweiz
Keramikkügelchen	Precellys Keramikkügelchen 1,4 mm	Peqlab
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen	1 µl – 5000 µl	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Falcon, Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturflaschen (steril)	75 cm ²	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

2.4 ZELLINIEN UND PRIMÄRKULTUREN

Den Untersuchungen dieser Arbeit liegen die Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 und zwei Primärkulturen zugrunde. Die benigne Zelllinie BenMen-1 wurde von Prof. Werner Paulus (Institut für Neuropathologie, Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Ursprünglich stammt diese von einem meningotheialen Meningeom des WHO-Grades I ab. Durch Transfektion mit hTERT wurde sie immortalisiert [123]. Die maligne Zelllinie IOMM-Lee wurde von Prof. D. H. Gutmann (Institut für Neurologie, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) zur Verfügung gestellt und stammt ursprünglich von einem intraossären malignen Meningeom [124]. Die Primärkulturen entstammen meningotheialen und fibroblastischen Meningeomen, die im Institut für Neurochirurgie (Magdeburg) operativ entfernt und im Institut für Neuropathologie (Magdeburg) kultiviert und untersucht wurden.

2.4.1 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung aller Zelllinien und Primärkulturen erfolgte in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin (10 mg/ml, P/S) versetzt wurde und im Folgenden als DMEM-Vollmedium bezeichnet wird. Die Kulturen wurden in T-75-Zellkulturflaschen im Brutschrank unter Normalbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Zum Einfrieren wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium gegeben, das mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt war. Die Zellen wurden zunächst langsam auf -70 °C gekühlt und anschließend in Flüssigstickstoff (-196 °C) gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in 37 °C warmem Wasser erwärmt und anschließend in einer T75-Zellkulturflasche in 15 ml DMEM-Vollmedium eingesät. Nach Anheften der Zellen am Flaschenboden erfolgte ein Mediumwechsel, um das zelltoxische Lösungsmittel DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage passagiert. Nach dem Entfernen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit 5 ml steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline) gewaschen und nach Zugabe von 2 ml Trypsin (0,5 mg/ml) 2 min bei 37 °C inkubiert. Trypsin degradiert Mukoproteine, die Teil der extrazellulären Matrix sind und die Zellen an der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen haften lassen. Nach Lösung der Zellen vom Flaschenboden wurden diese in 5 ml PBS aufgenommen und bei 1000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in 10 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension in die dafür vorgesehenen Zählkammern pipettiert und die Zellzahl mit Hilfe des Cellometer™Auto bestimmt. Abschließend wurden die Zellen in der gewünschten Dichte erneut ausgesät und das Volumen des DMEM-Vollmediums auf 15 ml ergänzt.

2.4.2 Nachweis der Adhärenz potentieller MSC an Polystyrol-Oberflächen

Zur Identifikation der MSC müssen drei Mindestkriterien nach der International Society for Cellular Therapy (ISCT) erfüllt sein. Demnach muss unter Standardkulturbedingungen eine Adhärenz der Zellen zu unbeschichteten Plastikoberflächen gezeigt werden, sie müssen spezifische Oberflächenantigene exprimieren und sie müssen eine multipotente Differenzierung in Richtung von Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zeigen [40].

Zum Nachweis des ersten Kriteriums der ISCT, der Adhäsion von MSC an unbeschichteten Plastikoberflächen, wurden Zellen entsprechend der Anleitung in 2.4.1 kultiviert und die Adhärenz der Zellen an die Wand der aus dem durchsichtigen Kunststoff Polystyrol bestehenden Zellkulturflaschen mit Hilfe der AxioCam ICm1 am Mikroskop Axiovert 40 CFL dokumentiert.

2.4.3 Adipogene Differenzierung

Die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung der MSC ist ein weiteres Minimalkriterium der ISCT, mit Hilfe dessen auf die Anwesenheit der MSC geschlossen werden kann [40]. In der vorliegenden Arbeit wurde die adipogene Differenzierung überprüft, da diese technisch am einfachsten durchführbar ist.

Die adipogene Differenzierung wurde an den beiden Primärkulturen (WHO-Grad I) durchgeführt, mit dem Ziel zu überprüfen, ob das Operationsmaterial der benignen Meningeome nachweisbare Anteile von MSC enthält. Die beiden etablierten Zelllinien wurden jedoch als Referenz mitgeführt, die theoretisch einen reinen Tumorzellklon der WHO-Grade I bzw. III darstellen sollte. Es sollte überprüft werden, ob sich eventuelle Verschiebungen der genannten Oberflächenmarker im Zuge der Kultivierung in Differenzierungsmedium gegebenenfalls auch bei diesen reinen Tumorzellklonen finden ließen.

Dazu wurden die Zellen in α -Medium, das mit 10 % FCS, 1 % P/S (10 mg/ml), 2 mM L-Glutamin, 0,5 μ M 3-Isobutyl-1-methyl-wanthin, 5 μ g/ml Insulin, 200 μ g/ml Indomethazin und 10 nM Dexamethason versetzt wurde und im Folgenden als Differenzierungsmedium bezeichnet wird, kultiviert. Die Differenzierung wurde über 10 Tage durchgeführt. Zur Kontrolle dienten die Primärkulturen und Zelllinien der gleichen Passage, die über die 10 Tage in DMEM-Vollmedium kultiviert wurden. Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zelllinien und Primärkulturen wurden an Tag 0 in 37 °C warmem Wasser aufgetaut und in T75-Zellkulturflaschen entweder in DMEM-Vollmedium oder in Differenzierungsmedium gesät. Die Inkubation erfolgte unter Normalbedingungen. Nachdem sich die Zellen angeheftet hatten, erfolgte wiederum ein Mediumwechsel zur Beseitigung des DMSO (s.o). Pro Gruppe (zu differenzierende Primärkultur und Zelllinie und entsprechende Kontrollen) wurden zwei T75-Zellkulturflaschen angesetzt. An den Tagen 2, 5 und 10 wurden aus einer Flasche je Gruppe ohne vorheriges Passagieren jeweils

Proben für die quantitative real-time PCR entnommen. Die jeweils andere T75-Zellkulturflasche wurde fortlaufend zur Differenzierung benutzt und die Zellen am 2., 5. und 10. Tag passagiert. Das Passagieren erfolgte wie in 2.4.1 beschrieben.

2.4.4 Immunhistochemische und histochemische Evaluation der Meningeomzellen sowie Färbung mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin

Im Anschluss an die adipogene Differenzierung wurden differenzierte und undifferenzierte Primärkulturen auf je einen Objektträger (Chamber Slides) gegeben. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde diese 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin, anti-Vimentin-Antikörpern, 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) und Phalloidin gefärbt.

Färbung mit anti-Vimentin-Antikörpern

Vimentin ist ein Typ III-Intermediärfilament, das von Meningeomen exprimiert wird [16]. Zur Färbung mit anti-Vimentin-Antikörpern wurde zunächst eine Blockierungslösung aus 2 % bovinem Serumalbumin (BSA), 1 % FCS und 0,1 % Tween® 20 hergestellt. Die Proben wurden 10 min in der Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Proteine zu maskieren und so eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Proben dreimal je 5 min in PBS gewaschen und danach für 1 h bei 37 °C in einer 1:100 anti-Vimentin-Verdünnung inkubiert. Der anschließende 5-minütige Waschschrift in PBS wurde dreimal durchgeführt. Auch der sekundäre Antikörper (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG) wurde in einer 1:100-Verdünnung auf die Proben gegeben und ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben erneut dreimal für 5 min in PBS gewaschen.

Färbung mit DAPI

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich vor allem in den Adenin-Thymin-reichen Regionen der DNA in der kleinen Furchen an [125]. Zur Herstellung der DAPI-Gebrauchslösung wurden in 100 ml Mc Ilvaine's Puffer 2,5 µl DAPI-Stammlösung pipettiert. Die nun entstandene DAPI-Gebrauchslösung wurde in eine Küvette gegeben und der zu färbende Objektträger 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Anschließend wurde dieser zweimal je 5 min in PBS gewaschen und mit Vectashield eingedeckelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln.

Färbung mit Phalloidin

Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes. Das Cyclopeptid bindet irreversibel an F-Actin, welches ein Teil des Zytoskeletts einer Zelle ist. An einen Fluoreszenzfarbstoff gebundenes Phalloidin wird verwendet, um das Zytoskelett einer Zelle darzustellen [126]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff war Alexa fluor 546.

Die fixierten Kulturen wurden dreimal à 5 min in PBS gewaschen, bevor 0,15 % Triton X-100 auf die Zellen gegeben wurde. Unspezifische Bindungen wurden wieder mit 1 %igem BSA geblockt. Danach wurden 200 µl einer Färbelösung, bestehend aus 8,75 µl Phalloidin und 224,5 µl 1 %iger BSA-Lösung auf die Objektträger pipettiert und die Proben inkubierten für 1 h. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und 10 min in 4 % PFA postfixiert. Die Objektträger wurden abschließend mit einem Deckgläschen versehen (siehe oben) und im Dunkeln gelagert.

Färbung mit Sudanrot 7B und Hämalan

Der Farbstoff Sudanrot 7B (N-ethyl-1-[(4-phenyldiazenyl)phenyl]diazenyl]naphthalen-2-amine) gehört zur Gruppe der Sudane und wird genutzt, um Lipide in pflanzlichem und tierischem Gewebe sichtbar zu machen.

Zunächst wurde aus 0,5 g Sudanrot 7B und 100 ml Isopropanol die Sudanrot 7B-Stammlösung hergestellt. Zur Herstellung der Sudanrot 7B-Gebrauchslösung wurden 60 ml der Sudanrot 7B-Stammlösung mit 40 ml Aqua dest. versetzt, für 24 h ruhen gelassen und anschließend filtriert.

Die fixierten Kulturen wurden jeweils 3 min in 30 %igen Alkohol und danach in 50 %igen Alkohol gegeben. Anschließend erfolgte die 20-minütige Inkubation der Zellen in der Sudanrot 7B-Gebrauchslösung, bevor sie erneut in Alkohol gewaschen wurden. Dieses Mal wurden sie 3 min in 50 %igem Alkohol und anschließend 3 min in 30 %igem Alkohol gewaschen. Nach dem Spülen der Zellen mit Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit

Hämatoxylin nach Mayer, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Nachdem die Zellen für 1 min in dem Farbstoff Hämatoxylin inkubiert, wurden sie gebläut. Zum Abschluss wurden die Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckelt.

2.4.5 Fotodokumentation, konfokalmikroskopische Dokumentation

Eine Fotodokumentation erfolgte an den Tagen 1 bis 10 mit der AxioCam ICm1 und dem Programm Axiovision 4 (ZEISS). Dokumentiert wurden jeweils die differenzierten Primärkulturen und Zelllinien und die Kontrollen. Eine konfokalmikroskopische Dokumentation von den mit Phalloidin gefärbten differenzierten Primärkulturen und den Kontrollen erfolgte nach abgeschlossener Differenzierung mit einem Fluoreszenzmikroskop (LEICA).

2.5 DARSTELLUNG RELATIVER EXPRESSIONSLEVEL VON MSC-MARKERN PER PCR

2.5.1 Probengewinnung aus der Zellkultur

Zur RNA-Gewinnung aus adhärenenten Zellen wurde das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 1 ml Trizol® versehen. Hierdurch wurden die Zellen lysiert und die RNA in Lösung gebracht. Die in Trizol® gelöste RNA wurde dann in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entweder umgehend zur RNA-Isolierung verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Für die RNA-Isolation aus suspendierten Zellen wurden diese bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert, in 1 ml PBS aufgenommen und erneut für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Trizol® resuspendiert in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und weiterbearbeitet oder bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Probengewinnung aus humanem Tumormaterial

Insgesamt 20 der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 34 Meningeome wurden von Prof. C. Mawrin (Institut für Neuropathologie, Magdeburg) zur Verfügung gestellt. Weitere 14 Tumorproben stammen aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie (Jena). Das Material wurde bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung von RNA wurden von den Kryoproben ca. 30 mg entnommen und in 2 ml Reaktionsröhrchen überführt, in denen sich Homogenisatorkügelchen von 1,4 mm Durchmesser (precelly keramik-Kügelchen) befanden. Nach Zugabe von 1 ml Trizol® wurden die Gewebeproben mit Hilfe des Gewebehomogenisators Precellys24 zweimal bei 5000 rpm für jeweils 20 s homogenisiert. Für alle weiteren Reaktionsschritte wurde die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.5.3 Extraktion von RNA und reverse Transkription in cDNA

Nach 5-minütiger Inkubation der RNA-haltigen Trizol®-Lysate aus Zellen oder Geweben bei RT wurden 300 µl Chloroform zur Probe dazugegeben, diese dann für 15 s geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Bei der folgenden 15-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C wurde die RNA von der DNA, den Proteinen und den Lipiden getrennt. Es entstanden drei Phasen, die obere RNA-haltige wässrige Phase, die proteinhaltige Interphase und die untere Phenol-Chloroform-Phase. Die obere wässrige Phase wurde zur weiteren Bearbeitung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 700 µl Isopropanol und 10 min Inkubation bei RT erfolgte die RNA-Fällung und durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C die Trennung der RNA von der wässrigen Lösung. Das Pellet wurde nun mit 500 µl eiskaltem Ethanol/Diethylpyrocarbonat-Wasser (EtOH/DEPC-H₂O) zweimal gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet. Danach erfolgte die Resuspension des RNA-Pellets in RNase-freiem Wasser (DEPC-H₂O) durch 10-minütige Erwärmung auf 55-65 °C im Thermoblock. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte nach dem Auftauen der RNA bei 64 °C. Sie wurde photometrisch (BioPhotometer) entweder in einer 1:69 Verdünnung oder in einer 1:13 Verdünnung mit Aqua dest. bestimmt. Die Extinktion wurde bei einer

Wellenlänge von 260 nm gemessen und automatisch in die RNA-Konzentration umgerechnet. Die Reinheit der RNA wurde durch Bestimmung der OD-Quotienten 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm gesichert.

Bei der reversen Transkription wird RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Synthese von 40 µl cDNA wurden 2 µg RNA mit 8 µl Random-Primer (25 µg/µl Hexanukleotide) versetzt und anschließend mit DEPC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Vor der Bildung eines RNA-DNA-Hybridstranges durch die Reverse Transkriptase wurden die Proben zunächst 10 min bei 70 °C erhitzt und danach 5 min auf Eis gekühlt, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzubrechen. Für den nächsten Schritt wurde für jede RNA-Probe folgender Mastermix hergestellt.

- 8 µl 5-fach Puffer
- 0,8 µl dNTPs
- 0,25 µl Reverse Transkriptase
- 10,95 µl DEPC-H₂O

Dieser wurde zu der 20 µl RNA-Probe pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben im Thermocycler für 55 min bei 42 °C und für 15 min bei 70 °C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.4 Darstellung relativer Expressionslevel per real-time RT-PCR

Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel für die Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105 und *NF2*/Merlin. Verwendet wurden 34 Meningeomproben unterschiedlichen WHO-Grades (WHO-Grad I 15 Proben, WHO-Grad II 14 Proben, WHO-Grad III 5 Proben), 8 Proben von Meningen, die als Kontrolle dienten, zwei Primärkulturen von Meningeomen und die Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1.

Die real-time RT-PCR (qRT-PCR), auch quantitative real-time PCR genannt, basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Bei der qRT-PCR erfolgt jedoch zeitgleich die Quantifizierung der Produktmenge [127, 128]. In Abhängigkeit der Produktmenge wird Fluoreszenzlicht emittiert. Zur Messung produktabhängiger Fluoreszenzen ist ein

Fluoreszenzfarbstoff nötig, der in die doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. In der vorliegenden Arbeit wurde SYBR-Green genutzt. SYBR-Green bindet an der kleinen Furche der dsDNA [129, 130]. Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge von 480 nm wird eine Fluoreszenz erzeugt und die PCR-Produkte werden sichtbar gemacht.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde für je 1 µl cDNA folgender Mastermix hergestellt:

- 8,26 µl SensiMix SYBR Hi-Rox
- 1 µl Forward-Primer
- 1 µl Reverse-Primer
- 5,3 µl HPLC-H₂O

Die Amplifikation erfolgte im ABI Prism 7000 SDS.

Die Reinheit der Proben wurde anhand von Schmelzkurven analysiert. Dies erfolgte nach 40 Zyklen. Der Grenzwert (threshold cycle, C_t-Wert) wurde an dem Zyklus festgelegt, an dem das Fluoreszenzsignal den Grenzwert von 0,05 über der Grundlinie überschreitet. Die Bestimmung der relativen Expressionslevel der einzelnen mRNAs einer Probe erfolgte auf der Basis des logarithmischen Zusammenhangs zwischen Kopienzahl einer mRNA und der C_t-Werte. Die Berechnung der C_t-Werte erfolgte automatisch durch die ABI Prism SDS 7000-Software. Wegen der Abhängigkeit der Kopienzahl von der Menge der eingesetzten cDNA und von der cDNA-Synthese-Effizienz muss ein Referenzgen zur Normierung benutzt werden. Im vorliegenden Fall wurde als Referenz das House-Keeping-Gen β2-Mikroglobulin bei den Tumoren und GAPDH bei den Primärkulturen und Zelllinien herangezogen. Diese Referenzgene wurden gewählt, weil sie erfahrungsgemäß als Haushaltsgene der Zelle eine konstante Expression zeigen. Zur Ermittlung der relativen mRNA-Expression (E_r) eines gegebenen Zielgens wurde zunächst die Differenz ΔC_t berechnet zwischen den C_t-Werten des Zielgens (Z) und des Referenzgens (R): ΔC_t = C_{t(Z)} - C_{t(R)}. Anschließend wurde die auf das Referenzgen normierte relative Expression des Zielgens bestimmt gemäß der Beziehung: $E_r = 1/2^{\Delta C_t}$.

Das Temperaturregime für alle PCR-Reaktionen war dabei identisch. Nach einer initialen Aktivierung der Hot-Start-Polymerase (10 min, 95 °C) erfolgten 40 PCR-Zyklen mit Denaturierung für 30 s bei 95 °C, Primerbindung für 30 s bei 55 °C und Polymerisation für 45 s bei 72 °C.

Alle verwendeten Primer sind unter 2.2.1 in Tabelle 3 dargestellt.

Zur zusätzlichen visuellen Qualitätskontrolle der real-time RT-PCR-Ergebnisse wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Elektrophoresekammern (Multiphor II) unter Verwendung eines 8 %igen Polyacrylamidgels. Aufgetragen wurden Probenvolumina von 7 μ l.

Die Färbung der Gele erfolgte durch eine Silberfärbung. Hierzu wurden die Gele zunächst 3 min in 2-3 %iger Salpetersäure geschwenkt und nach mehrmaligem Spülen mit Aqua dest. für 20 min in einer 0,2 %igen Silbernitratlösung geschwenkt. Nach mehrfachem Spülen in A. dest. wurden sie zur Entwicklung der Silberfärbung mit einer Natriumcarbonatformalinlösung (2,9 % Natriumcarbonat + 0,05 % einer 37 %igen Formalinlösung) mehrfach gespült bis zum Erscheinen brauner Banden und anschließend kurz in 10 %iger Essigsäure zum Stoppen der Reaktion geschwenkt. Zum Haltbarmachen der sonst schnell spröde werdenden Gele wurden diese für mindestens 5 min in 5 %iges Glycerol gegeben.

2.6 STATISTIK UND ETHIKVOTUM

Der Vergleich der relativen Expressionslevel zweier Gruppen erfolgte mit dem unabhängigen t-Test, während der Vergleich der relativen Expressionslevel mehrerer Gruppen mit dem ANOVA und nachfolgendem Tukey-post-hoc Test durchgeführt wurde. Die mRNA Expressionslevel wurden auf das jeweilige Referenzgen normiert. Lineare Korrelationen wurden mit dem Pearson Koeffizienten evaluiert. Signifikanzen wurden für $p \leq 0,05$ festgestellt. Alle Tests wurden mit der Software SPSS (Version 18.0) gefertigt und alle Diagramme mit Microsoft Excel.

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg hat die vorliegende Arbeit als Addendum zum Aktenzeichen 180/14 registriert.

3 ERGEBNISSE

3.1 MSC-NACHWEIS IN MENINGEOM-ZELLKULTUREN

3.1.1 Meningeomzellen wachsen adhärent

Das erste Kriterium der ISCT zum Nachweis von MSC verlangt den Nachweis einer Adhärenz der Zellen an unbeschichteten Plastikoberflächen. Grundsätzlich ist bekannt und konnte in dieser Arbeit nachvollzogen werden, dass Meningeom-Zelllinien und auch Primärkulturen humaner Meningeome adhärent wachsen. Damit ist eine Grundvoraussetzung erfüllt, dass sie MSC enthalten könnten.

Der formale Nachweis der Adhärenz der in dieser Arbeit genutzten Zellkulturen erfolgte über Kultivierung der Primärkulturen und Zelllinien mit entsprechender Fotodokumentation. Bereits nach einem Tag waren die Zellen angewachsen und es zeigte sich eine Adhärenz der Zellen zur unbeschichteten Polystyroloberfläche der T75-Zellkulturflaschen (Abb. 3). Wichtig war zudem, dass diese Adhärenzeigenschaft der Zellen unter der unten beschriebenen Behandlung mit lipogenem Differenzierungsmedium erhalten blieb (Abb. 4).

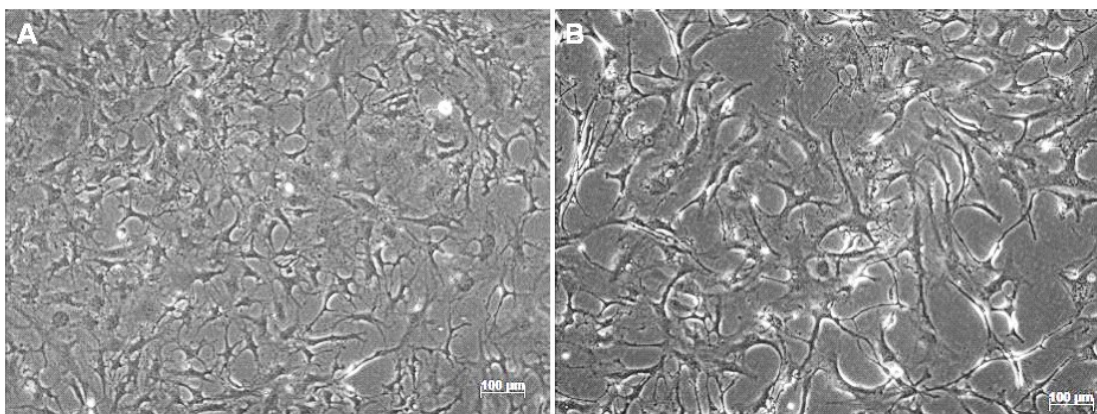


Abb. 3: Adhärenz der Zellen einer Primärkultur aus einem meningothelialen (A) und einem fibroblastischen (B) Meningeom in phasenkontrastmikroskopischer Darstellung

3.1.2 Morphologische Reaktion auf adipogenes Differenzierungsmedium

Anschließend erfolgte die Behandlung der Kulturen mit dem Differenzierungsmedium mit zwei Zielen. Zunächst sollten morphologische Veränderungen des Zytoskeletts dokumentiert werden, um eine generelle morphogenetische Wirksamkeit des Differenzierungsmediums zu belegen. Sofern diese bestätigt werden konnte, sollten in solchen morphologisch reagierenden Kulturen Lipidtröpfchen im Phasenkontrast oder nach Sudanfärbung nachgewiesen werden, als Beweis für Fettzellen, die im Zuge der induzierten Lipogenese aus MSC entstanden sind. Obwohl die benutzten Primärkulturen aus den beiden häufigsten histologischen Subtypen benigner Meningeome stammten und diese endogen keine Zonen lipomatöser Differenzierung aufwiesen, wurden in den späteren Lipidfärbungen auch immer Kulturen im Normalmedium als Kontrolle mitgeführt.

Bei den etablierten Zelllinien ist anzunehmen, dass diese einen einzelnen, besonders proliferationsaktiven Zellklon darstellen. Falls MSC als eigenständige, kleine Zellpopulation humane Meningeome begleiten, so sollten diese bereits nach wenigen Passagen verloren gegangen sein. Aus einem einzelnen Literaturhinweis konnte jedoch die Spekulation abgeleitet werden, dass zuweilen auch die eigentliche maligne und in Mäusen tumorigene Major-Komponente eines Meningeoms MSC-Eigenschaften besitzen könnte [118]. Aus diesem Grund sprach eine Ratio dafür, den Differenzierungsprozess auch an den verfügbaren etablierten Zelllinien zu versuchen.

Hierzu wurden die adhärenenten Zelllinien und Primärkulturen im Differenzierungsmedium kultiviert. Mit zunehmender Differenzierung änderte sich die Morphologie der Zellen, was somit eine prinzipielle morphogenetische Wirksamkeit der Behandlung anzeigte. Obwohl spätere konfokalmikroskopische Aufnahmen die Veränderungen deutlicher zeigten, waren moderate Effekte des Differenzierungsmediums bereits im Phasenkontrast erkennbar. Wie in Abbildung 4 dargestellt, bildeten die behandelten Zellen der Primärkulturen mehr Fortsätze aus. Des Weiteren fiel eine anfänglich verstärkte Proliferation der Zellen im Differenzierungsmedium im Vergleich zur Kontrolle auf. Trotz dieser anfänglichen Proliferationsförderung durch das Differenzierungsmedium kam es ab Passage 7 (P7) zu einer generellen Abschwächung der Proliferation sowohl bei Zellen im Differenzierungsmedium als auch bei den Kontrollen. Diese Proliferationshemmung ab P7 war zu erwarten, da das Zellteilungspotenzial mit P8 ausgeschöpft war und damit eine weitere Kultivierung sowohl im DMEM-Vollmedium als auch im Differenzierungsmedium

unmöglich wurde. Somit konnte die Kultivierung der Primärkulturen – wie erwartet – nur bis P7 durchgeführt werden. Um für die Differenzierung zu Adipozyten genügend Zellen zu generieren, wurden die Zellzahlen daher früh über parallele Kultivierung mehrerer Flaschen niedriger Passagezahl vermehrt. Aus diesen Gründen erfolgte die adipogene Differenzierung der Primärkulturen von P4 bis P7.

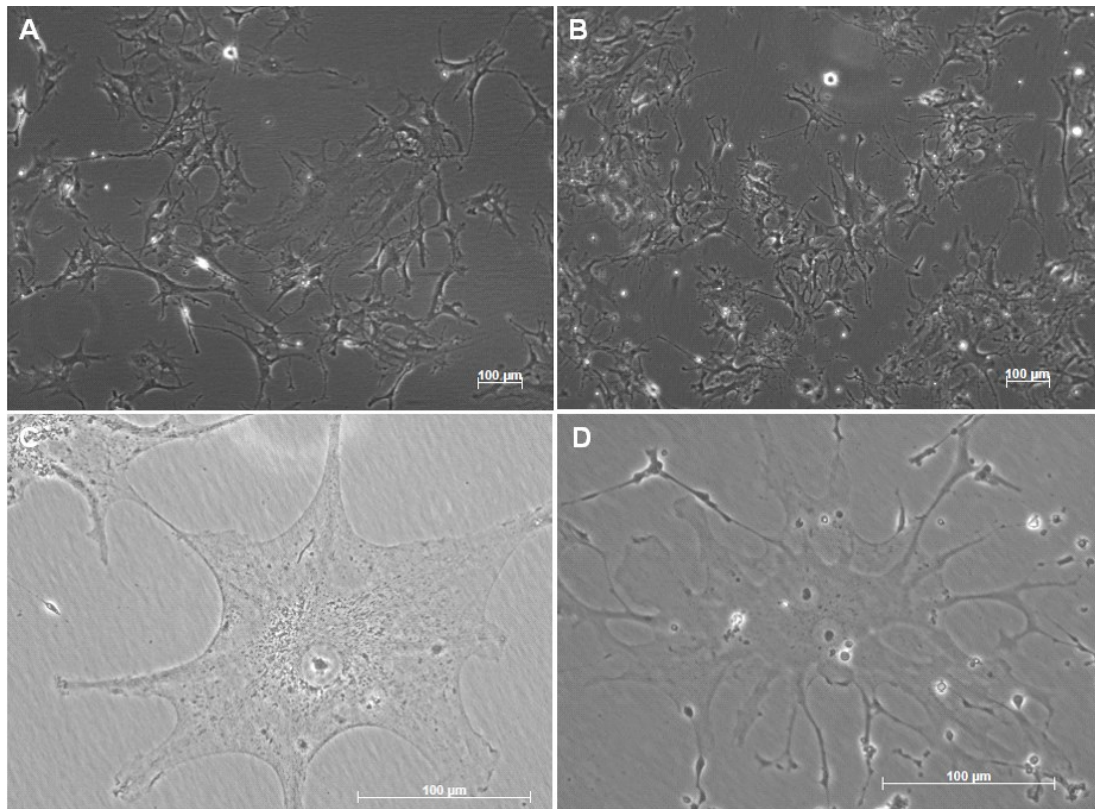


Abb. 4: morphologische Veränderungen einer meningealen Primärkultur vor und nach adipogener Differenzierung in phasenkontrastmikroskopischer Darstellung

- A) undifferenzierte Zellen
- B) differenzierte Zellen
- C) undifferenzierte Zelle
- D) differenzierte Zelle

Auch bei den Zelllinien ließen sich morphologische Veränderungen feststellen (Abb. 5). Mit zunehmender Differenzierung nahmen die Zellen eine länglichere Form an und begannen, mehr Fortsätze auszubilden. Im Gegensatz zu den Primärkulturen fielen bei den Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 mit zunehmender Differenzierung und Passagierung keine Veränderungen des Proliferationspotenzials auf. Sowohl die Zellteilungsrate als auch das Zellwachstum blieben auch unter der adipogenen Differenzierung stabil. Die Kultivierung und Passagierung konnten problemlos durchgeführt werden.

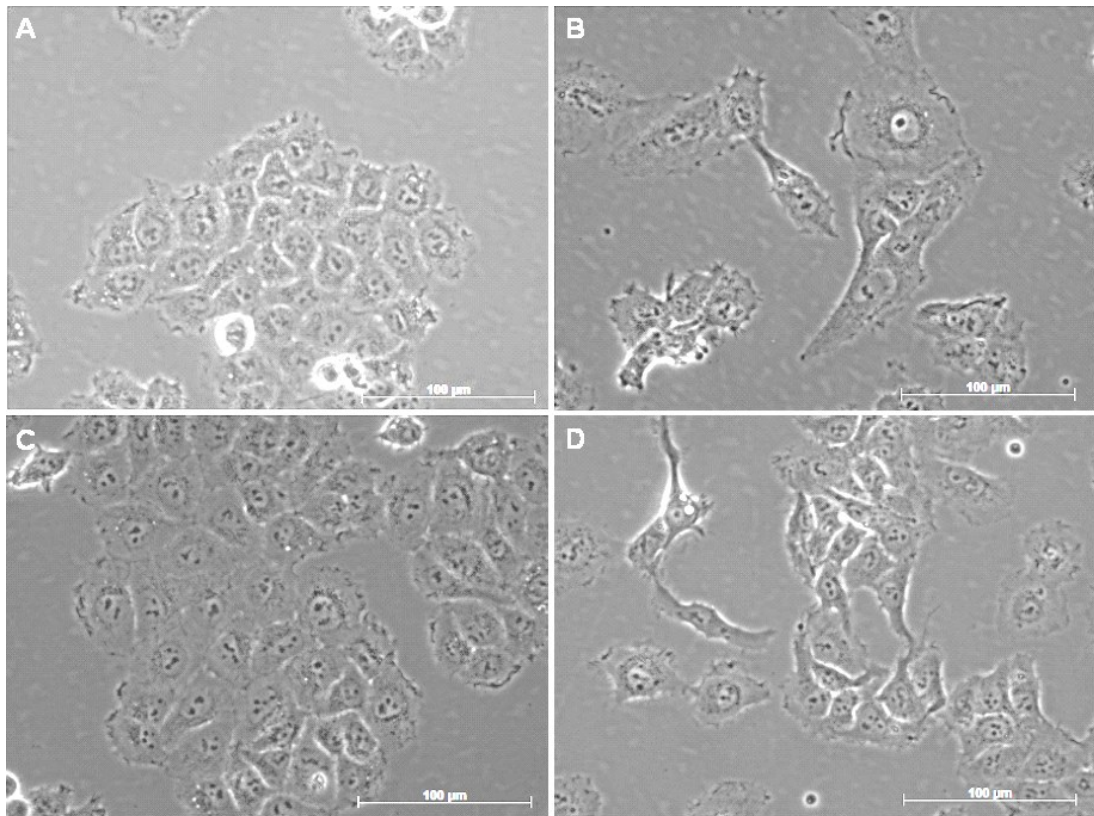


Abb. 5: morphologische Veränderungen bei IOMM-Lee und BenMen-1 vor und nach adipogener Differenzierung in phasenkontrastmikroskopischer Darstellung

- A) BenMen-1 vor adipogener Differenzierung
- B) BenMen-1 nach adipogener Differenzierung
- C) IOMM-Lee vor adipogener Differenzierung
- D) IOMM-Lee nach adipogener Differenzierung

Im Anschluss an die adipogene Differenzierung erfolgten die immunhistochemische Evaluation mit anti-Vimentin-Antikörpern und DAPI und die konfokalmikroskopische Dokumentation nach Anfärbung mit Phalloidin.

Immunhistochemische Evaluation mit anti-Vimentin-Antikörpern und DAPI

Das Typ III-Intermediärfilament Vimentin wird von allen Meningeomzellen exprimiert. Aus diesem Grund wurde es herangezogen, um nachzuweisen, dass die angelegten Primärkulturen der relevanten Passagen Meningeomzellen enthielten und nicht z.B. durch Stromaelemente wie Fibroblasten übernommen worden waren. Dies ist ein reales Risiko aufgrund der nur moderaten und schnell abklingenden Zellteilungspotenz benigner Meningeomzellen, solange diese nicht artifiziell immortalisiert wurden. DAPI diente zur Kenntlichmachung des Zellkernes der Meningeomzellen. Gefärbt wurden die differenzierten

und undifferenzierten Zellen der meningoethelialen und der fibroblastischen Primärkultur. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ließen sich die Zellen problemlos anfärben. Des Weiteren zeigen sich auch hier die unter 3.1.2 beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zellen im Zuge der adipogenen Differenzierung.

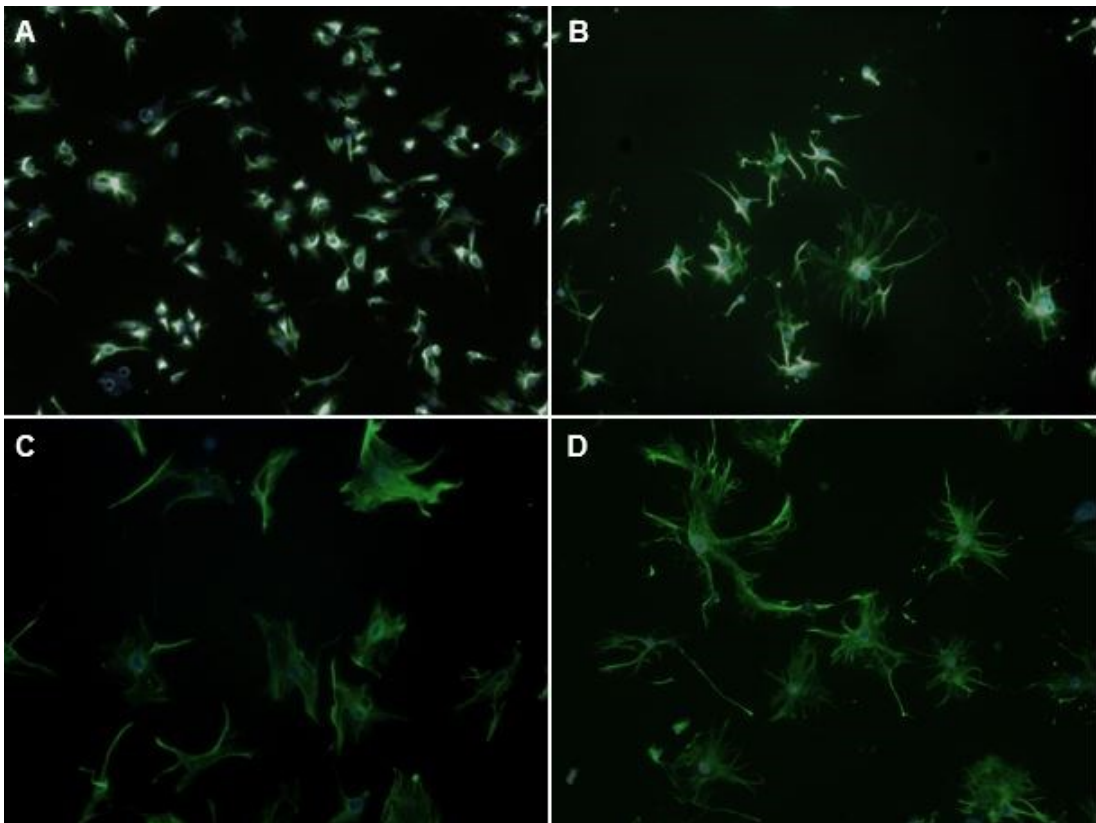


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer meningoethelialen und fibroblastischen Primärkultur nach Färbung mit Vimentin und DAPI vor und nach adipogener Differenzierung in der 40er Vergrößerung

- A) undifferenzierte meningoetheliale Primärkultur
- B) differenzierte meningoetheliale Primärkultur
- C) undifferenzierte fibroblastische Primärkultur
- D) differenzierte fibroblastische Primärkultur

Konfokalmikroskopische Darstellung nach Färbung mit Phalloidin

Zur Darstellung der morphologischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, die im Zuge der adipogenen Differenzierung auftraten, erfolgten die Färbung mit einem fluoreszierenden Phalloidin-Konjugat und ihre konfokalmikroskopische Dokumentation. Phalloidin bindet F-Aktin und wird zur Exploration des Zytoskeletts verwendet.

Abbildung 7 zeigt die morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts, die nach der adipogenen Differenzierung sichtbar waren. Während die Zellen vor der Differenzierung eine eher kompakte Form aufwiesen und wenige Fortsätze hatten, war das Zytoskelett nach der Differenzierung verändert. Die Zellen hatten mehr Fortsätze ausgebildet und ihre kompaktere Form in eine länglichere Form gewandelt. Sehr gut erkennbar waren vor allem das vermehrte Auftreten langer und zum Teil verzweigter Zytoplasmafortsätze mit entsprechenden F-Aktin-Fasern, sowie das vermehrte Auftreten von flachen Filopodien an den Kontaktstellen zur Plastikoberfläche. Dies zeigte eine grundsätzliche Responsivität der zuvor in der Vimentin-Immunfärbung als Meningeomzellen identifizierten Zellen auf das Differenzierungsmedium.

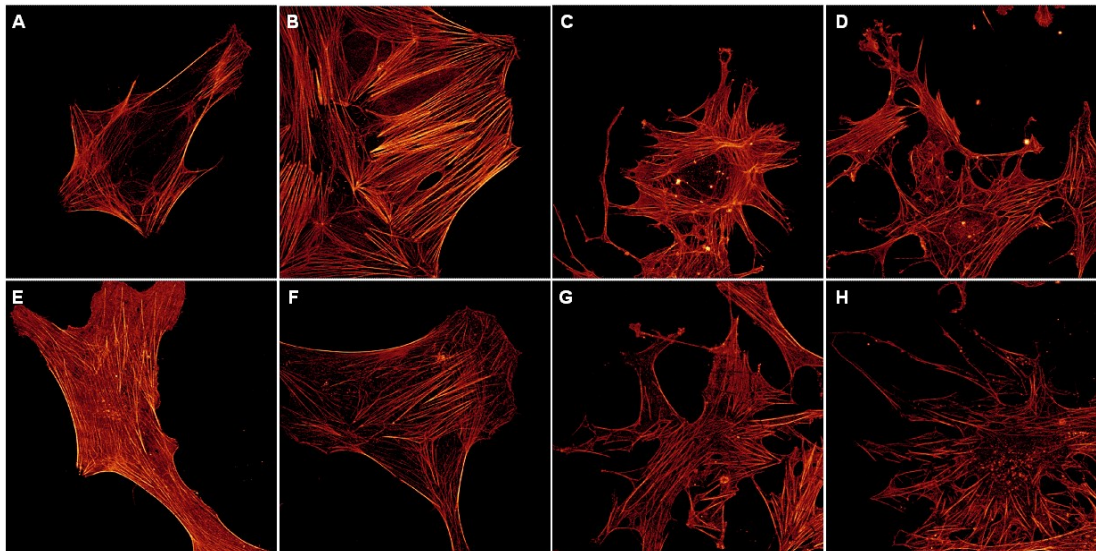


Abb. 7: Morphologische Veränderungen einer meningoethelialen und fibroblastischen Primärkultur nach Abschluss der adipogenen Differenzierung und Färbung mit Phalloidin in konfokalmikroskopischer Darstellung in der 40er Vergrößerung

- A, B) undifferenzierte meningoetheliale Primärkultur
- C, D) differenzierte meningoetheliale Primärkultur
- E, F) undifferenzierte fibroblastische Primärkultur
- G, H) differenzierte fibroblastische Primärkultur

3.1.3 Färbung der differenzierten Zellen mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin

Abschließend erfolgte die Färbung der differenzierten Primärkulturzellen und ihrer Kontrollen mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin mit dem Ziel, Lipidtröpfchen in den differenzierten Primärkulturzellen darzustellen und hiermit Adipozyten nachzuweisen.

Wie Abbildung 8 exemplarisch zeigt, konnten nach der adipogenen Differenzierung keine Lipidtröpfchen nachgewiesen werden.

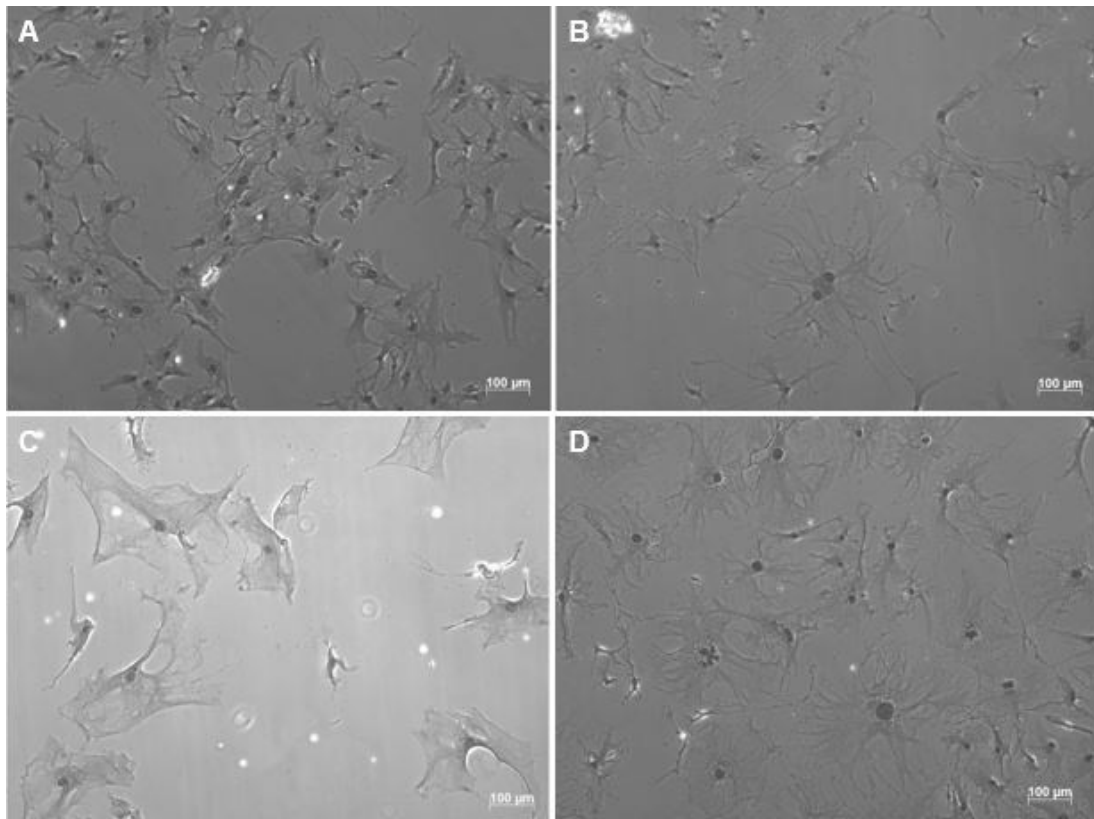


Abb. 8: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer meningothelialen und einer fibroblastischen Primärkultur nach Färbung mit Sudanrot 7B und Hämatoxylin vor und nach adipogener Differenzierung

- A) Undifferenzierte meningotheliale Primärkultur
- B) Differenzierte meningotheliale Primärkultur
- C) Undifferenzierte fibroblastische Primärkultur
- D) Differenzierte fibroblastische Primärkultur

In der Zusammenschau kann daher festgestellt werden, dass die dem Differenzierungsmedium ausgesetzten Primärkulturen aus morphologisch reagierenden Meningeomzellen bestanden, sich unter diesen Zellen jedoch keine Adipozyten entdecken ließen. Ein Nachweis funktioneller MSC war daher nicht möglich. Dennoch konnte in der real-time RT-PCR der Nachweis der Expression aller drei Consensus-Membranproteine für MSC erbracht werden. Da die quantitative Evaluierung weniger Zellkulturen unerheblich ist, wurden die quantitativen Daten hier nicht dargestellt. Der Nachweis der Expression aller drei Marker auf meningealen Zellkulturen und Meningeom-Zellkulturen ist jedoch auch einer Publikation zu entnehmen, die zugleich die im Folgenden beschriebenen PCR-Daten aus humanen Geweben enthält [131]. Dies untermauerte, dass die im weiteren

Verlauf der Arbeit detailliert untersuchte mRNA dieser Membranproteine in humanem Meningeomgewebe tatsächlich auch aus den Tumorzellen stammt und nicht ausschließlich aus kontaminierenden Lymphozyten oder Stromakomponenten.

3.2 DARSTELLUNG RELATIVER EXPRESSIONSLEVEL VON MSC-MARKERN PER REAL-TIME RT-PCR

Obwohl der Versuch des Nachweises funktioneller MSC in den beiden häufigsten Subtypen benigner Meningeome negativ verlaufen war, wurden nun die relativen Expressionslevel der relevanten Membranproteine an einer größeren Zahl von Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade und Subtypen genauer untersucht (publiziert in [131]), weil diese Proteine auch unabhängig vom MSC-Charakter der Zellen in humanen Tumoren von Bedeutung sind (Einleitung, 1.2.3).

Tumore aller WHO-Grade versus (tumorfreie) Hirnhaut

Mit dem Ziel, das Expressionslevel der drei Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 in Meningeomen zu bestimmen, wurden zunächst 20 Meningeome und 7 Hirnhautproben, die als Kontrolle dienten, analysiert, um eventuelle Expressionsunterschiede zwischen Tumorzellen und Ausgangszellen bzw. zwischen den Tumorgaden zu finden. Nach der Extraktion von RNA und der Transkription in cDNA wurde die real-time RT-PCR durchgeführt.

Zunächst erfolgte ein Vergleich der Expressionslevel in den Meningeomen und den Kontrollen. Wie in Abbildung 9a dargestellt, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wobei aber die Tendenz festgestellt werden konnte, dass die Oberflächenantigene CD90 und CD105 in den Meningeomen weniger stark exprimiert sind als in den Kontrollen. Des Weiteren erfolgte der Vergleich der Expressionslevel der drei Oberflächenantigene anhand der drei verschiedenen WHO-Grade (Abb. 9b). Auch bei Aufschlüsselung der Tumore in die drei WHO-Grade blieb die Tendenz zu einer moderat erniedrigten Expression von CD90 und CD105 in den Tumoren im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewebe (Kontrolle) bestehen, welche jedoch wiederum keine statistische Signifikanz erreichte. Ein Unterschied der

Expressionslevel innerhalb der verschiedenen WHO-Grade konnte aber weder für CD90 noch für CD73 oder CD105 festgestellt werden.

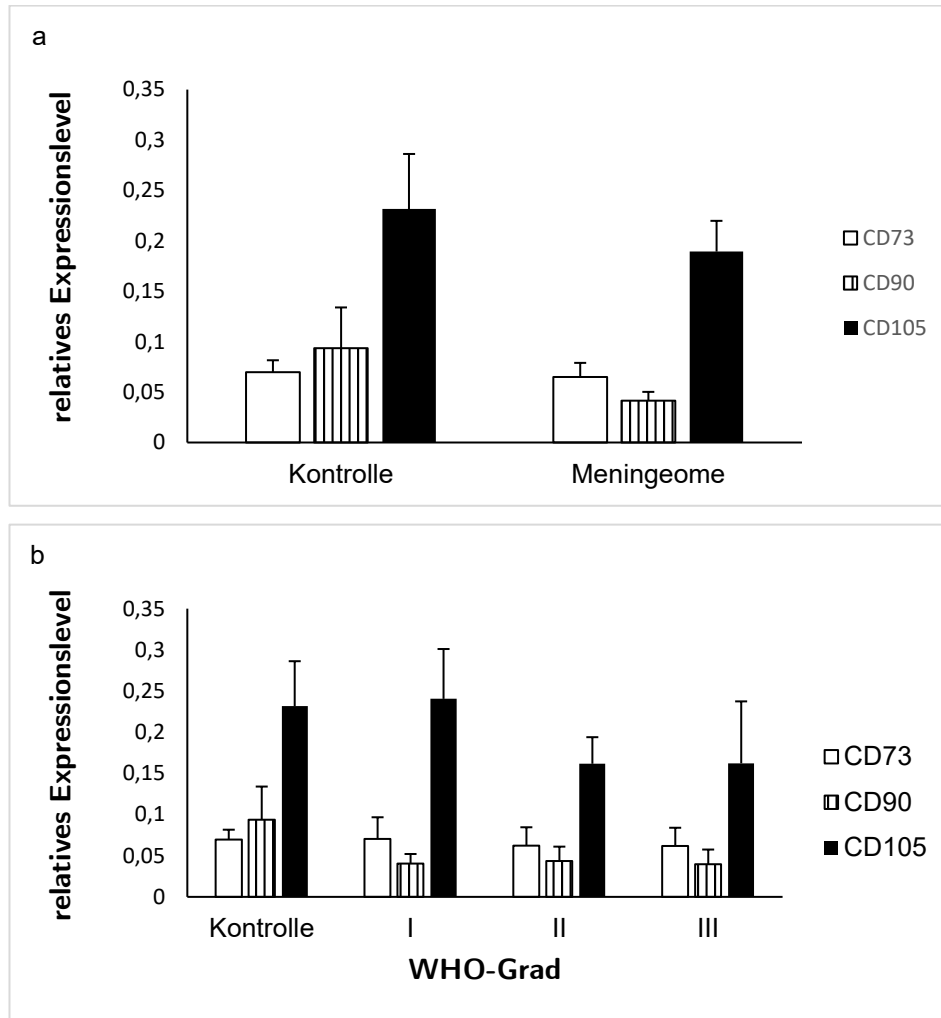


Abb. 9: Darstellung der Expressionslevel von CD73, CD90 und CD105
 a) in der Kontrolle und den Meningeomen insgesamt
 b) in der Kontrolle und den WHO-Graden I, II und III von Meningeomen
 Die relative Expression wurde normiert auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin.

Abhängigkeit der Membranproteine vom NF2-LOH-Status

NF2/Merlin ist der bedeutsamste Tumorsuppressor in Meningeomen und in ungefähr der Hälfte dieser Tumoren inaktiviert. Um der Frage nachzugehen, ob es auch einen Unterschied der Expressionslevel der Oberflächenantigene zwischen Meningeomen mit und ohne LOH gibt, wurden weitere 14 Tumorproben untersucht, deren LOH-Status im Gen *NF2* bekannt war. Von diesen 14 Tumorproben gehörten 8 WHO-Grad I Meningeomen an und 6 WHO-Grad II Meningeomen.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Expression der *NF2*-mRNA in Abhängigkeit des *NF2*-LOH-Status (Abb. 10). Es zeigte sich – wie erwartet – eine signifikant geringere Expression der mRNA in der Tumorgruppe mit LOH, was die Funktionalität dieses LOH untermauerte.

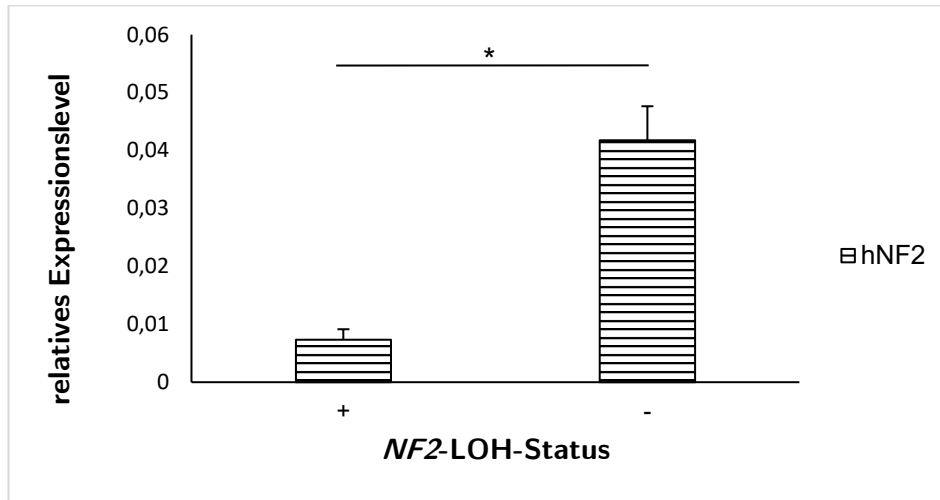


Abb. 10: Darstellung der Expressionslevel der Oberflächenantigene in Abhängigkeit vom *NF2*-LOH-Status

Die relativen Expressionslevel waren normiert auf β_2 -Mikroglobulin.

Als nächstes wurden nun die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 analysiert. Wie in Abbildung 11 dargestellt, schien CD105 zwar in Tumoren mit *NF2*-LOH höher exprimiert zu werden, jedoch erreichte diese Differenz bei der verfügbaren Anzahl von Tumoren mit bekanntem LOH-Status keine statistische Signifikanz. Ebenfalls keine Signifikanz erreichte die sich andeutende erniedrigte Expression von CD73 und CD90 in der LOH-positiven Gruppe. Auch zeigte sich über alle analysierten Tumore hinweg keine signifikante lineare Korrelation, ob positiv oder invers, zwischen der mRNA-Expression der genannten Membranproteine und derjenigen von *NF2*/Merlin. Insgesamt ließ sich damit nicht zweifelsfrei eine Assoziation zwischen *NF2*/Merlin und den Membranproteinen nachweisen.

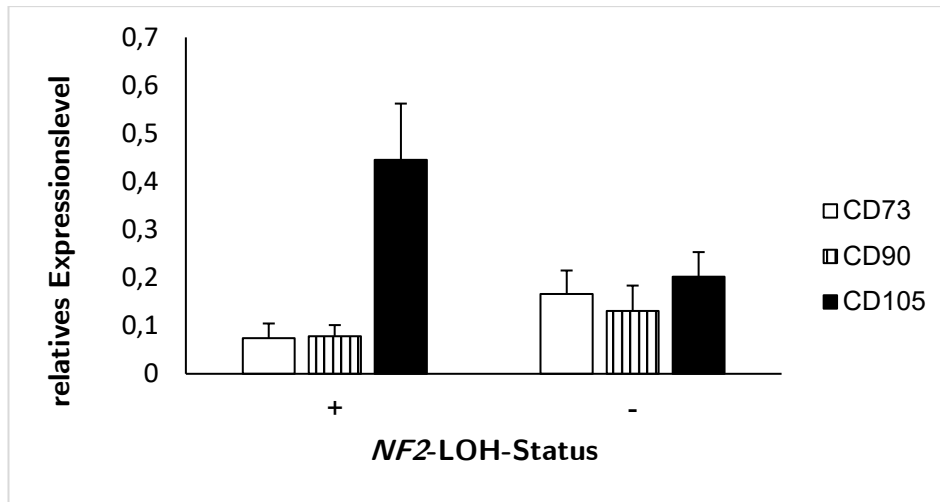


Abb. 11: Darstellung der Expressionslevel der Oberflächenantigene in Abhängigkeit vom *NF2*-LOH-Status, unterteilt nach CD73, CD90 und CD105
Die relativen Expressionslevel waren normiert auf β_2 -Mikroglobulin.

Synchroner Verlust von CD73 und NF2/Merlin in fibroblastischen Meningeomen

Wegen der auffälligen morphologischen Unterschiede zwischen den beiden histologischen Hauptgruppen innerhalb des WHO-Grades I, den meningotheelialen und fibroblastischen Meningeomen, sowie aufgrund der diskutierten höheren Migrations- und Invasionsneigung der letztgenannten wurde ein präziserer Vergleich dieser beiden Subtypen aus den bereits vorhandenen PCR-Daten berechnet.

Dazu wurden selektiv meningotheziale und fibroblastische Meningeome hinsichtlich der Expressionslevel für *NF2*/Merlin, CD73, CD90 und CD105 miteinander verglichen (Abb.12). Bei dem meningothezialen Subtyp waren die Expressionslevel für *NF2*/Merlin, CD73 und CD90 höher, wobei der Unterschied für *NF2*/Merlin signifikant war (Abb.12a). Für CD105 zeigte sich ein marginal höheres Expressionslevel bei dem fibroblastischen Subtyp, jedoch ohne Signifikanz (Abb.12b).

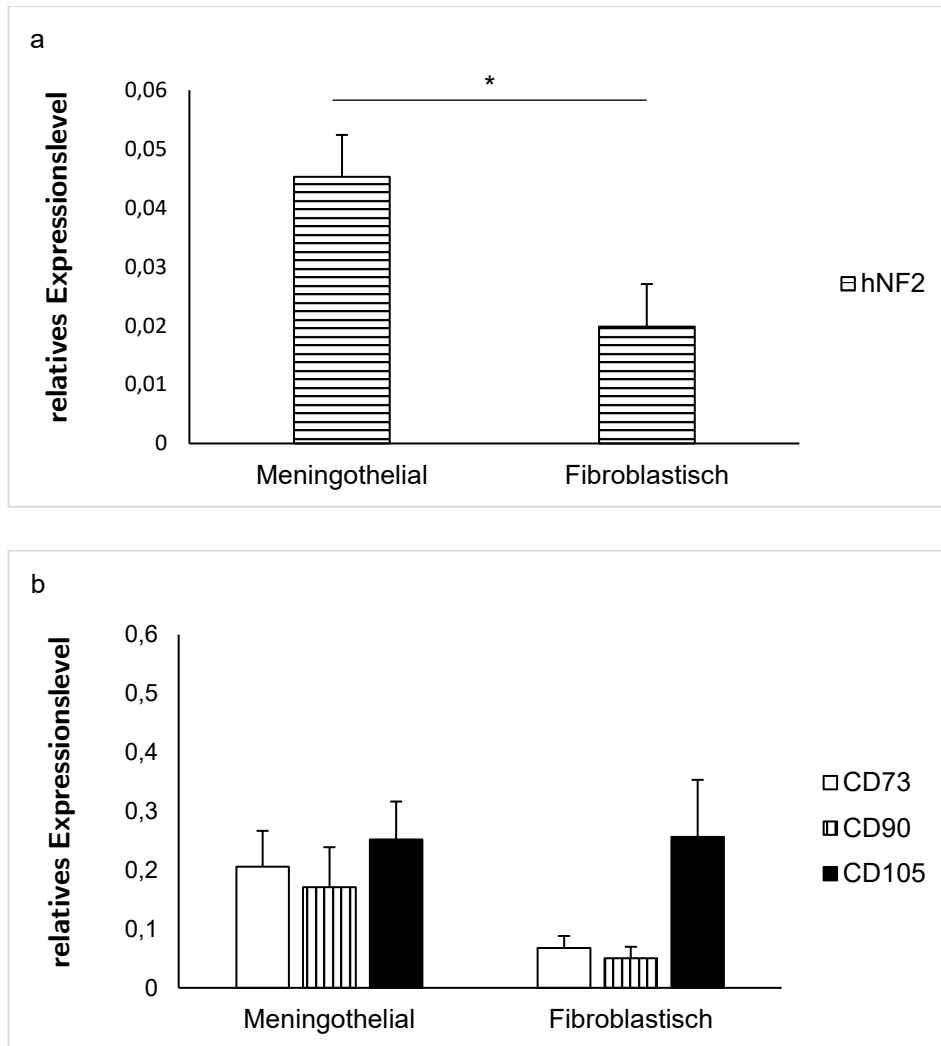


Abb. 12: Darstellung der Expressionslevel der Oberflächenantigene in meningothelialen und fibroblastischen Meningeomen

a) *NF2*/Merlin

b) CD73, CD90 und CD105

Die relativen Expressionslevel waren normiert auf β_2 -Mikroglobulin.

Das signifikante Absinken der mittleren Expression von Merlin-mRNA im fibroblastischen Subtyp verbunden mit der allerdings nicht signifikanten Abnahme von mRNA für CD73 und CD90 erweckte den Verdacht einer Beziehung zwischen diesen Proteinen. Es wurde daher selektiv für diese beiden häufigsten Subgruppen der benignen Meningeome (und damit der Meningeome insgesamt) überprüft, ob eine positive Korrelation zwischen diesen mRNA-Spezies bestand. Während dies für CD90 nicht zutraf, zeigte CD73 eine signifikante lineare Korrelation nach Pearson mit *NF2*/Merlin (Koeffizient 0,55, $p < 0,05$ Abb. 13). *NF2*/Merlin und CD73 verhalten sich also offenbar synchron beim Übergang vom meningothelialen zum aus stärker elongierten Zellen bestehenden fibroblastischen Subtyp.

Eine gleichgerichtete Funktion bei Zell-Zell-Kontakten und Migration kann diskutiert werden (Diskussion 4.3.3), bedarf aber weiterer experimenteller Überprüfung.

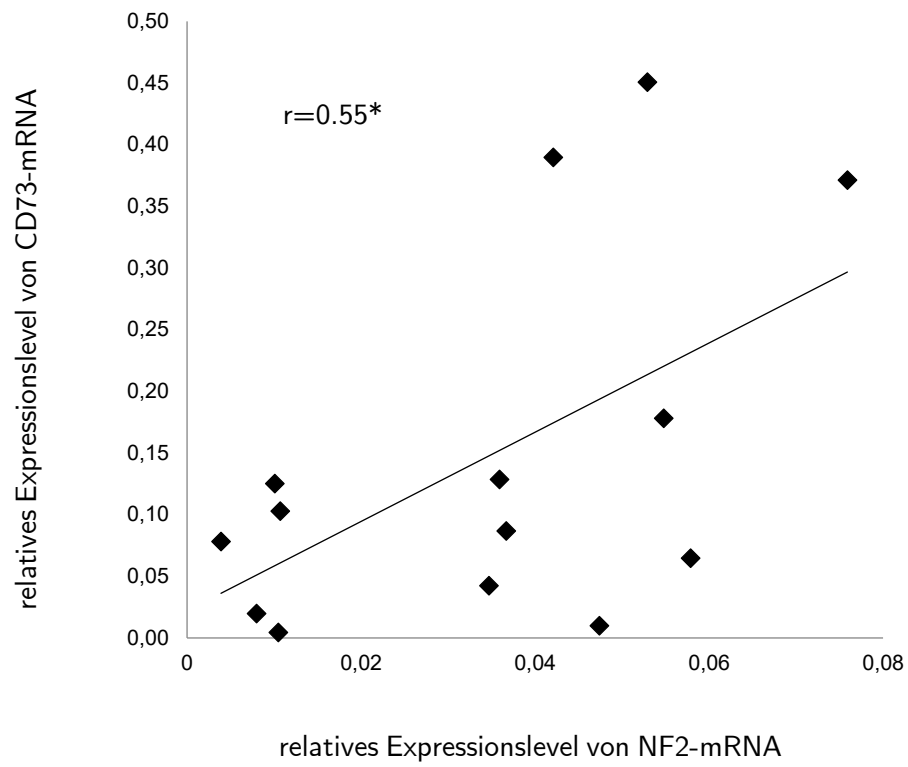


Abb. 13: Darstellung der Korrelation der Expressionslevel von CD73 und *NF2*-mRNA

4 DISKUSSION

Ein erstes Ziel der Arbeit war es, zu prüfen, ob sich funktionelle, das heißt den Kriterien der ISCT gehorchende, MSC in humanen Meningeomen der beiden häufigsten Subtypen, also in meningothehialen und fibroblastischen Tumoren des WHO-Grades I nachweisen lassen. Ein zweites Ziel war die genauere Analyse der Expression der drei Membranproteine CD73, CD90 und CD105 in Abhängigkeit vom WHO-Grad und dem genauen histologischen Subtyp.

4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE – SUCHE NACH MSC IN MENINGEOMEN

4.1.1 Das erste Kriterium der ISCT – Adhärenz der Zellen

Zunächst galt es, MSC in Meningeomen nachzuweisen. Nach den ISCT-Kriterien gilt die Adhärenz an unbeschichteten Plastikoberflächen als leicht nachzuweisende, für MSC aber zwingend notwendige Eigenschaft, weshalb sie von uns zuerst getestet wurde. Es zeigte sich, dass die bei Meningeomzellen übliche Adhärenz an Plastikoberflächen auch unter dem lipogenen Differenzierungsmedium nicht verloren ging, sodass von dieser Seite die Grundvoraussetzung für MSC erfüllt war und in diesen Kulturen dann sinnvoll nach der Expression der Oberflächenantigene und nach Fettzellen gesucht werden konnte. Da zwar alle Membranantigene, jedoch keine Adipozyten gefunden wurden, ließen sich somit keine funktionellen MSC nachweisen. MSC sind nach diesem Befund zumindest keine regelhaften Komponenten der beiden häufigsten Meningeomgruppen. Allein basierend auf den Befunden der vorliegenden Arbeit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zum Beispiel seltene Subgruppen MSC enthalten.

Bisher haben sich nur wenige Studien mit dem Nachweis der Existenz von MSC in Meningeomen beschäftigt [118, 132, 133]. Auch die Studie von Lim et al. (2013) konnte die Adhärenz der MSC-ähnlichen Zellen zeigen. Hier wurde die Spindelzellmorphologie der MSC-ähnlichen Zellen zur Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen herangezogen [133].

Da Meningeome Tumore mit mesenchymalen Charakteristika sind, die per se einen hohen Anteil an Spindelzellen aufweisen, erscheint das Kriterium der Spindelzellmorphologie in diesem Fall wenig diskriminierend. Die Spindelzellform von MSC oder MSC-ähnlichen Zellen kann jedoch wichtige Hinweise zur morphologischen Unterscheidung von MSC und z.B. Zellen der hämatopoetischen Reihe im Knochenmark liefern, da letztere eher rund sind. Außerdem konnte bereits nachgewiesen werden, dass mesenchymale Tumorzellen und MSC eine hohe phänotypische sowie molekulare Ähnlichkeit zeigen, weshalb die Spindelzellmorphologie der Meningeome hypothetisch durch die Spindelzellform der MSC hervorgerufen sein kann [73]. Beide Tatsachen erhärten den Verdacht auf die Anwesenheit von MSC oder MSC-ähnlichen Zellen in Meningeomen. MSC-ähnliche Zellen, die Lim et al. (2013) in ihrer Untersuchung in 20 % der WHO-Grad II Meningeome nachweisen konnten, sind für die Autoren Zellen, die den MSC, die aus dem Knochenmark stammen, ähnlich sind und in der Tumorzellumgebung, hier in Meningeomen, zu finden sind.

4.1.2 Das zweite Kriterium der ISCT – Differenzierbarkeit

Die anschließend durchgeführte adipogene Differenzierung der Primärkulturen und Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 erfolgte zur Überprüfung eines weiteren Kriteriums der ISCT. Während der Differenzierung konnten morphologische Veränderungen der Zellen festgestellt werden, wie etwa eine Elongation und die vermehrte Bildung konfokalmikroskopisch gut erfassbarer dünner, teils verzweigter Zytoplasmaausläufer und die vermehrte Bildung von Filipodien an den Zellrändern. Lipidtröpfchen konnten nach Färbung mit Sudanrot 7B allerdings nicht dargestellt werden. Damit konnte dieses Minimalkriterium für den MSC-Nachweis nicht erbracht werden.

Immerhin kann aus der Zusammenschau der vorliegenden Arbeit mit derjenigen von Lim et al. (2013) abgeleitet werden, dass MSC wahrscheinlich in den besonders häufigen histologischen Formen der Meningeome des WHO-Grades I nicht regelhaft vorkommen [133, 134], denn die Studie von Lim et al. (2013) konnte allen Minimalkriterien der ISCT genügende MSC nur in ca. 20 % der Meningeome des WHO-Grades II nachweisen. Diese Zellen werden in der genannten Studie als MSC-ähnliche Zellen beschrieben, da MSC aus anderen Geweben den MSC, die aus dem Knochenmark stammen und gewonnen werden, ähnlich sind [134].

4.1.3 Das dritte Kriterium der ISCT – Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105

Die Expression aller drei mRNAs der MSC-relevanten Oberflächenmarker konnte in der vorliegenden Arbeit in Primärkulturen (WHO-Grad I) und auch in etablierten Meningeomzelllinien gewonnen aus Tumoren der WHO-Grade I und III nachgewiesen werden. Aufgrund des fehlenden Nachweises lipogener Differenzierbarkeit war der Nachweis einer Co-Lokalisation dieser Proteine in der Plasmamembran der gleichen Zellen verzichtbar. Auch ist die Co-Lokalisation in allen Zellen kein zwingendes MSC-Kriterium, sondern nur das gleichzeitige Auftreten der Antigene in der Kultur. Zudem konnte für 2 % der Meningeom-Zellkulturen das synchrone Auftreten aller drei MSC-typischen Oberflächenantigene schon per Immunfluoreszenz-Färbung und nachfolgender FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie) in der Arbeitsgruppe des Instituts für Neuropathologie gezeigt werden [135].

Da alle drei relevanten Oberflächenantigene (CD73, CD90 und CD105) von Lim et al. [133] und in der vorliegenden Arbeit auch in den quantitativ vorherrschenden Meningeomen des WHO-Grades I gefunden werden konnten, scheint eine Rolle dieser Membranproteine für diese Tumorentität auch außerhalb von MSC denkbar. Die Oberflächenantigene CD90 und CD105 konnten bereits in höhergradigen Meningeomen nachgewiesen werden. Während CD90 in atypischen Meningeomen sowie deren Metastasen nachgewiesen werden konnte, ist CD105 in rhabdoiden Meningeomen des WHO-Grades III detektierbar [118, 132]. Während MSC also bei den insgesamt relativ seltenen, aber aggressiven Tumoren des WHO-Grades II zu 20 % nachgewiesen wurden [133] und bei den ebenfalls selteneren und aggressiven Meningeomen des WHO-Grades III bislang nicht vollständig nach allen Kriterien der ISCT untersucht wurden, gibt es bislang keinen überzeugenden Hinweis für ihr Auftreten in den meisten verbreiteten Formen des Meningeoms. Von Interesse wäre vor allem eine gründlichere Untersuchung des WHO-Grades III, um zu klären, ob MSC vielleicht grundsätzlich mit steigender Malignität häufiger aus Meningeomen isolierbar sind oder ob atypische Meningeome einen Sonderfall darstellen.

4.2 DISKUSSION DER ANGEWENDETEN METHODE

Es ist nicht völlig auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von MSC in den verbreiteten Meningeomformen auch an technischen Fallstricken gescheitert sein könnte. So gestaltete sich die Differenzierung der Zellen in den Primärkulturen schwierig, da das Wachstumspotenzial mit zunehmender Passagenzahl rasch abnahm. Aus der Notwendigkeit zur initialen Generierung einer hinreichenden Zellzahl für die Differenzierungsversuche resultierte der Zwang zu recht hohen Teilungsverhältnissen bei den ersten Aufteilungen der Primärkulturen auf neue Flaschen noch vor der Differenzierungsphase, die mit P4 begann. Daher könnten die eventuell enthaltenen MSC bereits so viele Zellteilungen vor Umsetzen in das Differenzierungsmedium durchlaufen haben, dass ihre Differenzierungsfähigkeit schon eingeschränkt oder erloschen war, wie dies auch bei MSC aus anderen Quellen bei zu spät einsetzender Differenzierung geschehen kann.

So konnte im Rahmen der adipogenen Differenzierung von MSC aus dem Knochenmark neben einer Verlangsamung des Wachstumsverhaltens zusätzlich eine verkürzte Überlebenszeit der zu differenzierenden Zellen im Differenzierungsmedium festgestellt werden [134]. Hier betrug die längste Überlebenszeit der Zellen bei der adipogenen Differenzierung 22 Verdopplungen der Zellzahl, was laut Banfi et al. [134] der P3 entspricht.

Die Erfahrungen von Banfi et al. [134] decken sich mit den Ergebnissen meiner Arbeit. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei der Differenzierung der Primärkulturen eine Verlangsamung des Wachstumsverhaltens festgestellt werden. Die Differenzierung erfolgte hier allerdings erst von P4 bis P7, da zunächst eine für die Differenzierung ausreichende Zellzahl generiert werden musste. Es gibt demnach das grundsätzliche Problem, dass bei Verwendung von Geweben, die keine reichen Quellen von MSC sind, wie zum Beispiel Knochenmark, der Zwang zur initialen Proliferation der Primärkulturen leicht dazu führen kann, dass das passende Zeitfenster für eine Differenzierung verpasst wird. Tatsächlich in geringer Zahl im Explantat vorhandene MSC können so leicht übersehen werden.

Nach Banfi et al. (2000) war z.B. ab der dritten Passage nicht nur das Proliferationspotenzial ausgeschöpft, sondern auch die Differenzierbarkeit hatte abgenommen und eine Differenzierung war zum Schluss nicht mehr möglich. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Primärkulturen trotz allem MSC

enthalten, diese aber aufgrund des späten Differenzierungsbeginns nicht differenziert werden konnten. Daneben besteht außerdem die Möglichkeit, dass die MSC in den Primärkulturen enthalten sind, aber aufgrund des geringen prozentualen Anteils in den Primärkulturen durch die stärker vertretenen Zellpopulationen überwachsen wurden.

Lim et al. (2013) gelang es bei 30 % der Meningeome des WHO-Grades II, eine osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung zu erreichen. Auch in dieser Studie gestaltete sich die adipogene Differenzierung schwierig, denn das einzige zu diesem Zeitpunkt noch möglicherweise MSC enthaltende Meningeom des WHO-Grades I konnte nicht adipogen differenziert werden [133]. Obwohl sich die Autoren selbst nicht weitergehend zu diesem Punkt äußern, lässt sich vermuten, dass dies dem häufigen Passagieren der Kultur geschuldet sein könnte. Nach Abschluss aller Untersuchungen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass sich in 20 % der WHO-Grad II Meningeome MSC-ähnliche Zellen, wie Lim et al. (2013) alle MSC nennen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, nachweisen ließen. Dies entspricht der gleichen Menge, die die gleiche Arbeitsgruppe auch in WHO-Grad II Gliomen nachweisen konnte [136].

Letztendlich bleibt die Möglichkeit bestehen, dass MSC oder MSC-ähnliche Zellen auch in Meningeomen des WHO-Grades I zu finden sind, diese durch den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsaufbau aber nicht nachweisbar waren.

4.3 VIELFÄLTIG DISKUTIERTE FUNKTIONEN HUMANER MSC IN TUMOREN

Eine interessante Frage ist es, ob Zellen mit vollständigem oder partiellem MSC-Charakter selbst für die Proliferation eines mesenchymalen Tumors wesentlich sein könnten. Im Tierexperiment wäre daher nach ihrer Tumorigenität als Xenotransplantat zu fragen.

Lim et al. (2013) injizierten daher ihre aus humanem Meningeomgewebe des WHO-Grades II gewonnenen MSC-ähnlichen Zellen als Xenotransplantate in den rechten Frontallappen von Mäusen. Nach 200 Tagen erfolgte die histologische und immunhistochemische Untersuchung der Hirne. Es wurden keine Meningeome nachgewiesen. Kritisch könnte angemerkt werden, dass diese Art der Xenotransplantation in das Hirngewebe nicht ideal

ist. Potenziell Meningeome auslösende Zellen sollten idealerweise subarachnoidal platziert werden, das heißt, nur zwischen Unterseite der Kalotte und der Hirnoberfläche, da dieser Ort eher orthotop für Meningeome ist. Diese Vorgehensweise ist praktikabel und zum Beispiel in der Arbeitsgruppe des Instituts für Neuropathologie etabliert [137, 138]. Aufgrund der eingegengten Platzverhältnisse im Schädel wählten aber einige Autoren auch für Meningeom-Xenotransplantate die Injektion in das Hirngewebe, um eine Kaverte zu schaffen, die auch ohne Druckausgleich höhere Volumina, also mehr Zellen, aufnehmen kann. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass dieses Vorgehen ein negatives Ergebnis beeinflusst haben kann. Zum anderen besitzen selbst maligne Meningeomzellen des WHO-Grades III eine dramatisch unterschiedliche Proliferationspotenz im Schädel von Mäusen [138] und benigne Meningeomzellen wachsen nach Erfahrung der Arbeitsgruppe grundsätzlich nicht in Mäusen an, zumindest nicht ohne artifizielle Immortalisierung der Zellen, sodass zunächst eine stabile Zelllinie entsteht (wie bei BenMen-1), die dann auch gegebenenfalls als Xenotransplantat in immundefizienten Mäusen wächst. [139] Aus diesem Grund liefert der Negativbefund von Lim et al. (2013) ein nur äußerst schwaches Argument gegen eine Rolle der MSC-ähnlichen Zellen bei Zellerneuerung und Größenwachstum der Tumore.

Die Funktion von MSC ist genauso wie deren Anwesenheit in Meningeomen Gegenstand der Forschung. Man kann nicht ohne weiteres davon ausgehen, dass MSC in Meningeomen nicht tumorigen sind, wie es beispielsweise MSC aus dem Knochenmark sind. Die Eigenschaften der MSC sind vielfältig. Neben Regeneration und Reparatur sind MSC in manchen Tumorentitäten ebenfalls in der Lage, als TAF Tumorwachstum, Metastasierung, Angiogenese und Wiederauftreten von Tumoren zu beeinflussen. Als TAF besitzen MSC tumorigene Eigenschaften und sind nicht mehr als MSC nachweisbar, da sie, wie bereits oben erwähnt, durch das Homing den TAF-Phänotyp annehmen können [71]. In Magenkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass 20 % der TAF durch Differenzierung von MSC entstanden sind [70]. Sowohl bei Regeneration und Reparatur als auch als TAF sind MSC in den Tumoren enthalten, die aufgrund der phänotypischen Veränderung bzw. der Differenzierung in TAF nicht mehr durch adipogene Differenzierung nachweisbar sind. Auch in Meningeomen besteht die Möglichkeit, dass MSC enthalten sind, die aufgrund phänotypischer Veränderungen nicht nachweisbar sind. Ohne das zusätzliche Kriterium der fehlenden Tumorigenität hätten Lim et al. (2013) in 30 % der WHO-Grad II Meningeome MSC-ähnliche Zellen nachgewiesen [133]. Weiterhin wird vermutet, dass MSC ihre

Funktion an ihre Mikroumgebung anpassen können. Es konnte gezeigt werden, dass MSC in Glioblastomen die Wirkung der TAF sogar verstärkt haben [140]. Im Zusammenhang mit Melanomzellen wurden MSC für die Tumorneubildung verantwortlich gemacht [75] und ebenso für die Metastasierung bei einem Mammakarzinom [76]. Die fehlende Tumorigenität von MSC kann also nicht als Kriterium für oder gegen das Vorhandensein von MSC genutzt werden.

Bisher konnten MSC nur in höhergradigen Tumoren detektiert werden, sodass die Vermutung nahe liegt, dass sie tatsächlich ausschließlich in höhergradigen Tumoren zu finden sind. Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis von CD105 in der aggressiveren, das heißt im Xenotransplantat deutlich besser tumorigenen Zellfraktion von rhabdoiden Meningeomen des WHO-Grades III sowie durch den Nachweis der Expression von CD90 in atypischen Meningeomen und deren Metastasen [118, 132]. Es besteht also die Möglichkeit, dass die höheren Rezidiv- und Metastasierungsraten höhergradiger Tumoren (WHO-Grad II und III) im Zusammenhang mit MSC stehen [34].

4.4 DIE POTENZIELLE ROLLE VON CD73, CD90 UND CD105 IN MENINGEOMEN

4.4.1 Fehlende Assoziation mit biologischer Aggressivität

Aufgrund der eindeutigen mRNA-Präsenz aller drei Membranproteine in allen humanen Meningeomgeweben ($n = 34$) und allen kultivierten Meningeomzellen in der vorliegenden Arbeit blieb die Vermutung einer funktionellen Rolle für die Tumoren bestehen, die unabhängig ist vom MSC-Charakter der Zellen. Diese Vermutung erhärtete sich umso mehr, da sich echte MSC offenbar nur in einer kleinen Teilmenge der seltenen höhergradigen Meningeome fanden [133]. Aus diesem Grund wurde die quantitative Verteilung der drei mRNAs in verschiedenen Meningeom-Subtypen genauer analysiert. Zunächst wurde analysiert, ob entweder die Tumorbildung selbst oder die Entwicklung eines Tumors höheren Grades das Expressionsmuster verändert. Hierzu wurden 20 WHO-Grad I, II und III Meningeome mit 8 Proben von Meningen mittels einer real-time RT-PCR verglichen. In allen Proben konnten alle Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Expressionslevel.

Das lässt darauf schließen, dass die biologische Aggressivität des Tumors in keiner Weise mit dem relativen Expressionslevel dieser Antigene assoziiert ist.

Für CD73 liegt das relative Expressionslevel bei Normierung auf β_2 -Mikroglobulin sowohl für die Kontrolle als auch für alle WHO-Grade bei rund 0,07 und für CD90 bei allen WHO-Graden bei 0,04. Allein CD105 zeigt ein diskret höheres relatives Expressionslevel bei den WHO-Grad I Meningeomen mit 0,24 im Vergleich zu den WHO-Grad II und III Meningeomen mit 0,16, wobei diese Differenz nicht signifikant ist.

4.4.2 Positive Assoziation von CD73 (NT5E) mit *NF2*/Merlin

Die häufigste genetische Veränderung ist bei Meningeomen im *NF2*-Gen zu finden. In 50-60 % der sporadischen und bei der Mehrheit der *NF2*-assoziierten Meningeome findet sich ein LOH. Ein positiver *NF2*-LOH-Status tritt in Meningeomen aller WHO-Grade auf, wobei er deutlich häufiger in fibroblastischen Meningeomen als in meningoethelialen Meningeomen zu finden ist [7]. Die Mutation des *NF2*-Gens stellt einen molekularen Subtyp der Meningeome dar und kann zur Entstehung der Meningeome beitragen. Man kann folglich *NF2*-abhängige von *NF2*-unabhängigen Meningeomen unterscheiden. Andere Mutationen, wie Mutationen in TRAF7, KLF4, AKT1 und SMO treten fast ausschließlich in *NF2*-unabhängigen Meningeomen auf und finden sich vergleichsweise selten [141], sieht man von der erstaunlichen Dominanz von AKT1-Mutationen bei einer bestimmten Tumorlokalisation, der Schädelbasis, ab [142]. Der LOH kann daher einen Meningeomgeneseweg darstellen, was unterstützt wird dadurch, dass die Progression von Meningeomen mit einem positiven *NF2*-LOH-Status im Mausmodell gezeigt werden konnte [143]. Weiterhin können Meningeome durch lokalen meningealen Knockout des Gens *NF2* in Mäusen induziert werden, was auch tierexperimentell die essentielle Bedeutung dieses Gens bei der Meningeomgenese beweist [144].

Daher war es interessant, der Frage nachzugehen, ob ein Zusammenhang zwischen dem *NF2*-LOH-Status oder der Expression von *NF2*/Merlin-mRNA und dem Expressionslevel der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 besteht bzw., ob es eine Abhängigkeit der Expressionslevel der Oberflächenantigene von dem histologischen Subtyp der Meningeome des WHO-Grades I gibt, die sich in der Häufigkeit von *NF2*-LOH unterscheiden.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass *NF2* in Meningeomen mit positivem *NF2*-LOH-Status ein signifikant niedrigeres Expressionslevel als in Meningeomen mit negativem *NF2*-LOH-Status hat. Gerade dieses Ergebnis zeigt die gute Eignung der einfach durchführbaren real-time RT-PCR zur funktionellen Beurteilung des Gens *NF2*, wenn der LOH-Status in einer Tumorprobe unbekannt ist oder per PCR technisch schwer bestimmbar (etwa aufgrund besonders ähnlicher Allele der zum LOH-Nachweis nutzbaren flankierenden DNA-Repeats). Zudem ist die Quantifizierung der *NF2*-mRNA auch allein deshalb ein gutes zusätzliches Kriterium, weil die epigenetische Regulation eine Rolle spielen kann, inklusive einer Promotor-Methylierung [145, 146]. Auch auf DNA-Ebene finden sich neben Monosomie für Chromosom 22 bzw. Stückverlusten 22q, also der Heterozygotieverlust (LOH) am *NF2*-Locus in ungefähr der Hälfte der Tumore, häufig auch kleinere Mutationen des zweiten Allels, wie kleine Insertionen, Nonsense-Mutationen, kleine Deletionen oder Splice-Mutationen [7, 147], wobei die funktionelle Inaktivierung des Merlins proliferationsfördernd und apoptosehemmend wirkt.

Weiterhin konnte bestätigt werden, dass fibroblastische Meningeome ein signifikant niedrigeres Expressionslevel für *NF2* haben im Vergleich zu meningotheleialen. Sowohl der gefundene Zusammenhang zwischen LOH-Status und mRNA als auch die verminderte Genexpression im fibroblastischen Subtyp bestätigen bereits bekannte Ergebnisse [7].

In Abbildung 12 (3.2, S. 41) hat es den Anschein, dass auch die mRNA der Membranproteine CD73 und CD90 in diesem Subtyp erniedrigt ist, wenngleich diese bei der verfügbaren Zahl von Tumoren dieser Histologie nicht statistisch gesichert wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden (Abb. 13, S. 42), dass innerhalb der häufigen Tumore des WHO-Grades I (meningotheleiale und fibroblastische Meningeome) die mRNA-Level von CD73 und *NF2*/Merlin linear positiv korreliert sind (Koeffizient 0,5, $p < 0,05$). Dies erlaubt zumindest die Spekulation, dass hier ein in Tumor-Signalprozesse bekanntermaßen involviertes Membranprotein – CD73 in seiner Funktion als 5'-Ectonukleotidase (NT5E) – und Merlin als molekulare Brücke zwischen kortikalem Aktin-Zytoskelett und Membranproteinen eine Funktionsbeziehung haben könnten. Ihre synchrone Herabregulation könnte gemeinsam morphogenetische Prozesse beeinflussen, die eine fibroblastische Morphologie begünstigen. Es wäre besonders zu überlegen, ob ein gemeinsames Agieren dieser beiden Proteine in Bezug auf Zell-Zell-Kontakte und Migrationsfähigkeit denkbar wäre.

4.5 MÖGLICHE FUNKTIONELLE BEZIEHUNG ZWISCHEN CD73 (NT5E) UND MERLIN

4.5.1 Hinweise zu einer Rolle von NT5E für Malignität, Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakte

NT5E gehört zu einer Familie von Membranglykoproteinen, die normalerweise eine eher gleichmäßige Verteilung in der Plasmamembran aufweisen und von daher nicht augenscheinlich mit Zell-Zell-Kontakten assoziiert sind. Oftmals wurde in Tumoren eine erhöhte Expression [91, 92, 93] oder eine positive Assoziation mit höheren Tumorgraden und Metastasierung gefunden [92]. Allerdings ist die Datenlage uneinheitlich, da es auch durchaus umgekehrt einige Tumorentitäten gibt, bei denen ein relativer Verlust von NT5E in den höhergradigen Tumoren mit kürzerer medianer Überlebenszeit gefunden wurde. Dies gilt auch für die beiden von Bowser et al. (2016) untersuchten Entitäten, das Endometriumkarzinom und einen Subtyp des Ovarialkarzinoms [148]. Es wurde über vielfältige Funktionen des von NT5E generierten extrazellulären Adenosins in Tumoren diskutiert, die über die am besten bekannte immunmodulatorische Funktion hinausgehen und stattdessen direkt Eigenschaften von Tumorzellen betreffen [148]. Dazu gehört auch zum Beispiel die Metastasierung von Karzinomen. Da in den bislang im Hinblick auf NT5E hauptsächlich analysierten Tumoren Merlin keine wesentliche Rolle zu spielen scheint, bestand in der Literatur bislang wenig Anlass, nach einer möglichen Verbindung beider Proteine zu fragen. Es fällt jedoch auf, dass das in Meningeomen sehr wichtige Merlin in seiner bekanntesten Funktion eine enge Assoziation zur Plasmamembran hat, obwohl es selbst kein Membranprotein ist. Allerdings heftet es an in der Peripherie der Zelle liegende subkortikale F-Aktin-Filamente und an der zytoplasmatischen Seite von Membranproteinen an [149]. Es bildet somit eine für morphologische Transformationsprozesse wichtige Brücke zwischen Membran und Zytoskelett. Dies ist eine der am längsten bekannten Funktionen. Ihr Verlust wird in Meningeomen mit dem Verlust strukturierter Zell-Zell-Kontakte (Adherens, Junctions, Desmosomen) in Verbindung gebracht [150].

In Endometriumkarzinomen wurden kürzlich interessante Befunde zu NT5E3 erhoben [148], die möglicherweise von Belang für seine Diskussion im Meningeom sind. Mit vielfältig sich ergänzenden und einander stützenden methodischen Ansätzen gelang den Autoren der Nachweis, dass diese Ecto-Nukleotidase eine wesentliche Rolle für Zell-Zell-Kontakte und das F-Aktin-Zytoskelett besitzt. Damit rückt ein denkbarer

gemeinsamer Wirkungsort für NT5E und Merlin deutlicher in den Fokus. Der in der vorliegenden Arbeit berichtete synchrone Verlust beider Proteine im fibroblastischen Subtyp bzw. generell ihre positive Korrelation erscheinen demnach in neuem Licht. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt jedoch noch offen, ob die im Endometriumkarzinom gemachten Beobachtungen gegebenenfalls einen Spezialfall der NT5E-Funktion darstellen, der so nicht auf andere Tumorzellen übertragbar ist. Hier bleibt die weitere Forschung abzuwarten. Immerhin ist die Datenlage an diesen speziellen Zellen überzeugend.

Die Autoren fanden zunächst eine unerwartete Konzentration von NT5E-Protein und entsprechender Ecto-Nucleotidase-Aktivität auf Zell-Zell-Kontakte in ihren kultivierten Tumorzellen. Diese Konzentration auf Membranzonen innigen Zell-Zell-Kontaktes oder zumindest die Expression von NT5E auch in diesen Bereichen wurde in der vorliegenden Arbeit bzw. insgesamt in der Arbeitsgruppe des Instituts für Neuropathologie am Meningeom noch nicht untersucht. Dies wäre in Zukunft mittels Immunfluoreszenz nachzuholen, ebenso wie eine Analyse der verschiedenen Klassen im ZNS ubiquitärer Adenosin-Rezeptoren in den Meningeom-Subtypen. Bislang wurde in der Arbeitsgruppe nur – wie erwähnt – per FACS-Analyse die Co-Expression der drei MSC-Marker nachgewiesen, d. h. an trypsinisierten und isolierten Meningeomzellen, nicht jedoch die Verteilung in Primärkulturen oder humanen Meningeomgeweben. Im Falle der Endometriumkarzinomzellen fanden die Autoren eine Expression von NT5E im Bereich der interzellulären Filipodien bzw. Membranzipper [148].

Des Weiteren zeigten funktionelle Experimente, dass das von NT5E generierte extrazelluläre Adenosin über Adenosin-A1-Rezeptoren positiv in die Polymerisation des F-Aktins in diesen interzellulären Kontaktzonen eingriff. Dadurch war eine plausible Indizienkette generiert, auf welche Weise hier ein Verlust von NT5E zu einem beobachtbaren Verlust von Zell-Zell-Kontakten führte.

Wenngleich viele Fragen offenbleiben, wäre dennoch eine genauere Analyse eines potenziellen Zusammenhangs von NT5E, Adenosinrezeptoren, Merlin und F-Aktin in Meningeomen angezeigt. Für eine Reihe von Tumorentitäten mit Verlust von NT5E könnte folgende Hypothese aufgestellt werden: Die resultierende Abnahme an lokal verfügbarem, extrazellulärem Adenosin führt über die verminderte Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf den Tumorzellen selbst zu einem Eingriff in das Aktin-Zytoskelett über unterschiedliche Signalkaskaden, der Zell-Zell-Kontakte inhibiert und Migration fördert. Die Förderung

eines stärker migratorischen und invasiven Phänotyps konnten Bowser et al. (2016) [148] auch an ihrem Modell zeigen, da ein Knockdown von NT5E Migrations- und Invasionsfähigkeit von Endometriumzellen induzierte. Sehr interessant wäre es somit, ob künftig eine Brücke geschlagen werden kann von dem oben geschilderten Komplex zu Merlin. Denn es ist bekannt, dass auch die funktionelle Ausschaltung von Merlin in Meningeomzellen nicht nur zu einem Verlust der Kontaktinhibition führt, sondern die Zellen in diesen Foci auch einen Verlust der geordneten Zell-Zell-Kontakte zeigen, nebst einem mehr fibroblastischen, elongierten Erscheinungsbild und einem gestörten Aktin-Zytoskelett [150].

4.5.2 NF2-Suppression hemmt NT5E-Expression in Meningeom- und meningealen Zellen

Die in der vorliegenden Doktorarbeit vorgestellten Expressionsdaten auf mRNA-Ebene zu CD73, CD90 und CD105 wurden zwischenzeitlich publiziert [131] und dabei um einige Daten auf Proteinebene ergänzt. Gewebe-Microarrays (tissue microarrays, TMA) aus in Paraffin eingebetteten Stenzen zahlreicher Spenderblöcke (n=50) mit Meningeomgeweben aus Operationsgut bestätigten im Wesentlichen den Befund der Doktorarbeit auf Proteinebene, dass die drei Membranproteine in allen WHO-Graden ubiquitär exprimiert werden. Dabei waren in dem Gewebe-Mikroarray auch seltenere histologische Subtypen vertreten, wie atypische, angiomatöse und anaplastische Meningeome. Eine Auflistung der qualitativen Nachweisbarkeit der Immunpositivität nach Tumorgrad erbrachte eine Positivität aller Proteine in der großen Mehrheit der Tumore (69 % - 100 %), ohne klare Tendenz nach WHO-Grad (Tabelle 1 der Publikation [131]). Die zuweilen fehlende Immunpositivität ist leicht durch mangelnde Sensitivität der Immunhistochemie im Vergleich zur quantitativen RT-PCR zu erklären. Western Blots konnten nur anekdotisch die Expression der drei Membranproteine in den Tumorgraden I und II bestätigen, aus Mangel an Fällen besonders höherer Grade mit Verfügbarkeit genügender Gewebemengen. Obwohl eine präzise quantitative Analyse auf Proteinebene somit nicht durchführbar war, konnte zumindest das ubiquitäre Vorkommen der Proteine bestätigt werden [131].

Von besonderem Interesse sind jedoch die Ergebnisse zur Beziehung zwischen den mRNA-Leveln von NF2 und NT5E (CD73) an Zellkulturen. NT5E wurde nicht nur – wie NF2 – in einer Linie immortalisierter meningealer Zellen (AC, [151]) und in drei

Meningeom-Linien gefunden, sondern reagierte vor allem auffällig auf einen shRNA-vermittelten, stabilen knockdown von NF2 (vgl. Abb. 2A, [131]). Von der in-vitro durch Telomerase und das Papillomvirus-Onkogen E6/E7 immortalisierten meningealen Zelllinie AC und von der ebenso immortalisierten Meningeom-Zelllinie Men [151] waren per shRNA-Transfektion stabile Knockdowns der NF2-mRNA generiert worden (vgl. Abb. 2A, [131]), die auch im Western Blot reproduzierbar erniedrigte Merlin-Signale zeigten im Vergleich zu den Kontrolltransfektionen. Somit standen zwei Paare weitgehend syngener Zellen meningealen Ursprungs zur Verfügung mit moderatem, aber deutlichem Unterschied in der NF2-mRNA zwischen den jeweiligen shNF2- und den Kontrollzellen (jeweils ca. Faktor 2).

Überraschend zeigte sich nicht nur in beiden Zellpaaren ein klarer Zusammenhang zwischen den mRNAs von NF2 und NT5E, sondern die Expression von NT5E brach in den Zellen mit NF2-Knockdown fast vollständig zusammen auf Werte von jeweils weniger als 0,1 % des Ausgangswertes (jeweils $p \leq 0,001$) bei Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH [131]. Dieses Resultat wurde im Wesentlichen bei Normierung auf das ebenfalls mitgeführte Referenzgen β_2 -Mikroglobulin bestätigt. Es schien somit nicht durch Artefakte der PCR beeinflusst, zumal die Schmelzkurven einwandfrei waren. Da Transfektionen zweier unabhängiger Zelllinien meningealen Ursprungs diesen Effekt gezeigt hatten, sind auch zufällige Off-Target-Effekte der Transfektion weitgehend ausgeschlossen. Die Resultate erwecken den Anschein, als sei eine direkte Regulation der NT5E-Expression durch das Protein Merlin denkbar, welche dann auf einfache Weise die in der Doktorarbeit gefundene statistische Korrelation beider mRNAs in den humanen Tumoren erklären könnte. Das Protein Merlin hat viele Facetten und die molekularen Mechanismen seiner Tumorsuppressor-Wirkung sind weit weniger klar, als die bloße Tatsache seines Tumorsuppressor-Status. Möglicherweise könnte beim hier beobachteten Effekt die diskutierte Rolle von Merlin im Zellkern eine Rolle spielen [152]. Merlin in seiner dephosphorylierten und tumorsuppressiven Form ist in der Lage, in den Zellkern zu wandern und dort vor allem die CRL4^{DCAF1} E3 Ubiquitin-Ligase zu binden und zu inhibieren, auch mit Wirkung auf die Genexpression [152]. Trotz unstrittiger Tumorsuppressor-Funktion des Merlins wurde sein molekularer Mechanismus in 25 Jahren der Forschung nicht befriedigend aufgeklärt und die Bedeutung der Nukleus-Translokation ist weitgehend unklar. Der für Meningeome so bedeutsame Verlust funktionellen Merlins könnte via NT5E zusätzlich die Aktin-Polymerisation und Stabilität von Zell-Zell-Kontakten beeinflussen, denn die Verbindung von NT5E zu diesen Prozessen wurde von

Bowser und Kollegen [148] an anderen Tumorzellen recht lückenlos dargestellt. In jedem Falle erscheint eine weitere Analyse des möglichen Regulationszusammenhanges beider Gene in Meningeomzellen sinnvoll.

4.6 FAZIT

Der Nachweis von MSC erfordert die Erfüllung der Kriterien der ISCT.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst die Adhärenz von Zellen auch nach Transfer primärer Meningeomkulturen in Differenzierungsmedium gezeigt werden, womit das erste Kriterium der ISCT erfüllt werden konnte.

Im zweiten Schritt gelang der Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 in Meningeomen mit Hilfe der real-time RT-PCR. Diese konnte bestätigen, dass in den Meningeomen aller WHO-Grade sowie in den wichtigsten histologischen Subtypen alle drei MSC-typischen Oberflächenantigene vorkommen. Dass es keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der relativen Expressionslevel der Oberflächenantigene gibt, zeigt, dass die biologische Aggressivität der Meningeome unabhängig von den MSC-typischen Oberflächenantigenen zu sein scheint.

Die zur Erfüllung des dritten Kriteriums der ISCT durchgeführte adipogene Differenzierung gelang nicht. Morphologische Veränderungen sowie eine Verlangsamung des Wachstums der Primärkulturen und der Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 konnten beobachtet werden. Beides wurde bereits durch Banfi et al. (2000) beschrieben [134]. Wegen des notwendigen häufigen Passagierens der Primärkulturen zur Generierung einer ausreichenden Zellzahl waren die Bedingungen für die Differenzierung deutlich erschwert. Weiterhin verlangt die ISCT nicht nur die adipogene Differenzierung, sondern auch die osteogene und chondrogene. Da aber bereits die adipogene Differenzierung nicht erfolgreich war, war es nicht sinnvoll, die beiden zuletzt genannten Differenzierungen durchzuführen.

Insgesamt ließen sich demnach keine echten MSC nachweisen.

Zwar zeigte sich keine statistisch signifikante Abhängigkeit eines der drei MSC-Oberflächenantigene vom Tumorgrad, jedoch fand sich eine bemerkenswerte

Assoziation zwischen NT5E (CD73) und *NF2*/Merlin. In den mit Abstand häufigsten histologischen Subtypen, nämlich den meningotheelialen und fibroblastischen Meningeomen des WHO-Grades I, bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden mRNAs. Die synchron niedrigere Expression dieser beiden mRNAs im fibroblastischen Subtyp erlaubt die Vermutung eines gemeinsamen Wirkortes in der Zelle mit morphogenetischem Potenzial. Aufgrund jüngster Literaturdaten zu NT5E an Tumorzellen bietet sich die Hypothese an, dass beide Proteine gemeinsam beteiligt sein könnten an der Auflösung geordneter Zell-Zell-Kontakte, der Generierung einer fibroblastischen Morphologie und einem erhöhten Migrationspotenzial der Zellen. Der Zusammenhang beider Gene wurde nach Abschluss der hier dargestellten Experimente weiter gestützt durch den Nachweis eines fast vollständigen Zusammenbruchs der NT5E-Expression nach sh-Knockdown von *NF2* in Meningeom- oder meningealen Zellen [131].

4.7 AUSBLICK

MSC in Meningeomen stellen nach wie vor ein sehr interessantes Thema dar, das einer weiteren intensiven Forschung bedarf. Bisher konnten MSC-ähnliche Zellen in 20 % der WHO-Grad II Meningeome nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, dass sich MSC auch in den anderen WHO-Graden befinden, besteht weiterhin, da ihre Anreicherung bei geringem Anteil an der Gesamtzellzahl schwierig sein kann. Da die atypischen Meningeome des WHO-Grades II kein Bindeglied zwischen den Meningeomen des WHO-Grades I und III darstellen und bei Meningeomen somit keine für viele Tumoren typische Progressionsreihe vorliegt, ist es auch denkbar, dass diese atypischen Meningeome in Bezug auf MSC ebenfalls ein atypisches Verhalten zeigen. Ein besonderes Interesse liegt in der Erforschung der Funktion der MSC in Meningeomen. Vielfältig konnten immunmodulatorische, immunsuppressive, anti-tumorigene und tumorigene Eigenschaften der MSC in verschiedenen Geweben festgestellt werden. Bisher war es aber nicht möglich, zu klären, welche Funktion MSC in Meningeomen haben. Erst, wenn nachgewiesen wurde, welche Funktion MSC in Meningeomen einnehmen, können diese entweder genutzt oder verändert werden. MSC könnten in Meningeomen zum Beispiel auch als Träger für Substanzen wie Medikamente eingesetzt werden, was in anderen Tumoren, wie z.B. Metastasen eines

Lungenkarzinoms oder dem Pankreaskarzinom bereits gezeigt werden konnte und vollkommen neue Therapiemöglichkeiten eröffnen kann.

Unabhängig von der Diskussion um MSC spricht die in dieser Arbeit als statistische Korrelation gefundene und danach auch durch genetische Experimente gestützte Beziehung zwischen NF2 und CD73 (NT5E) für eine potenzielle funktionelle Verbindung zwischen letztgenanntem Gen und dem wichtigsten Tumorsuppressor bei Meningeomen, die einer gesonderten Evaluierung bedarf.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mesenchymale Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells) sind multipotente Zellen, die in mesodermalen, endodermalen, ektodermalen und prä- bzw. perinatalen Geweben zu finden sind und entlang mesenchymaler und nicht-mesenchymaler Linie, aber nicht mehr hämatopoetisch differenzierbar sind. MSC haben immunmodulatorische und immunsuppressive Eigenschaften. In Tumoren spielen sie eine wichtige Rolle, da man ihnen hier vorwirft, die Tumorgenese zu fördern. Für den Nachweis von MSC sind unter anderem die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 entscheidend. Insbesondere CD73 wird ebenfalls mit immunmodulatorischen Eigenschaften und der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Meningeome sind in Bezug auf MSC bisher wenig erforscht. Die häufigste genetische Veränderung liegt bei Meningeomen im Neurofibromatose 2-Gen (*NF2*-Gen) und betrifft das bedeutsamste Tumorsuppressorgen der Meningeome. Allelverluste (LOH, loss of heterozygosity) finden sich in 50-60 % der sporadischen und in der Mehrheit der *NF2*-assoziierten Meningeome.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 sowie die Primärkulturen eines meningoethelialen und eines fibroblastischen Meningeoms hinsichtlich ihrer Adhärenz zu Plastikoberflächen in Differenzierungsmedium und ihrer adipogenen Differenzierbarkeit untersucht. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Evaluation der Meningeomzellen und Färbung mit Sudanrot 7B und Hämtoxylin. Weiterhin erfolgte eine Analyse der Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105 und *NF2*/Merlin in 34 Meningeomproben unterschiedlichen WHO-Grades, 8 Proben von Meningen, die als Kontrolle dienten, sowie zwei Primärkulturen und den Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 mittels der real-time RT-PCR.

Die Adhärenz der Meningeomzellen zu Plastikoberflächen in Differenzierungsmedium konnte gezeigt werden. Im Rahmen der adipogenen Differenzierung gelang der Nachweis von Lipidzellen nicht. Die Meningeomzellen veränderten allerdings ihr Zytoskelett und bildeten deutlich mehr und verlängerte sowie zum Teil verzweigte Zytoplasmafortsätze aus. Der Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 mittels real-time RT-PCR konnte erfolgreich erbracht werden.

Meningeome mit Heterozygotieverlust (LOH) im wichtigen Tumorsuppressor NF2 zeigten auch eine signifikant geringere Expression der *NF2*-mRNA in der Tumorgruppe mit LOH, wodurch die Funktionalität des LOH untermauert wurde. Ein ebenfalls signifikant vermindertes Expressionslevel für *NF2* war im fibroblastischen Subtyp zu finden. Dieses war verbunden mit dem allerdings nicht signifikant verminderten Expressionslevel von CD73 und CD90. Daraufhin über die Gesamtheit aller meningothelialen und fibroblastischen Meningeome durchgeführte Korrelationsanalysen ergaben jedoch für CD73 eine positive lineare Korrelation nach Pearson mit NF2 (Koeffizient 0,55, $p < 0,05$), sodass von einem synchronen Verhalten von *NF2*/Merlin und CD73 beim Übergang vom meningothelialen zum fibroblastischen Subtyp ausgegangen werden muss.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology* 2013; 15(suppl 2):ii1-ii56. doi: 10.1093/neuonc/not151.
2. Gao X, Zhang R, Mao Y, Wang Y. Childhood and juvenile meningiomas. *Childs Nerv Syst* 2009; 25(12):1571–80. doi: 10.1007/s00381-009-0964-x.
3. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJPE, Hofman A, Krestin GP et al. Incidental Findings on Brain MRI in the General Population. *N Engl J Med* 2007; 357(18):1821–8. doi: 10.1056/NEJMoa070972.
4. Li X, Zhao J. Intracranial meningiomas of childhood and adolescence: report of 34 cases with follow-up. *Childs Nerv Syst* 2009; 25(11):1411–7. doi: 10.1007/s00381-009-0949-9.
5. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 2010; 99(3):379–91. doi: 10.1007/s11060-010-0342-2.
6. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999; 85(9):2046–56.
7. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M et al. Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10(2):122–30.
8. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2005; 8(1):27–36. doi: 10.1038/ncb1339.
9. Morrison H. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes & Development* 2001; 15(8):968–80. doi: 10.1101/gad.189601.
10. Bai Y, Liu Y-j, Wang H, Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. Inhibition of the hyaluronan-CD44 interaction by merlin contributes to the tumor-suppressor activity of merlin. *Oncogene* 2006; 26(6):836–50. doi: 10.1038/sj.onc.1209849.
11. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K et al. *BMC Genomics* 2007; 8(1):16. doi: 10.1186/1471-2164-8-16.
12. Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A. Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001; 60(6):628–36.
13. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P et al. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am. J. Pathol.* 2001; 159(2):661–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61737-3.
14. MD AP, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A Role for Chromosome 9p21 Deletions in the Malignant Progression of Meningiomas and the Prognosis of Anaplastic Meningiomas. *Brain Pathology* 2002; 12(2):183–90. doi: 10.1111/j.1750-3639.2002.tb00433.x.

15. Kim Y-J, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel W-I, Feiden W. Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. *Virchows Arch.* 2006; 449(5):529–38. doi: 10.1007/s00428-006-0285-3.
16. Winek RR, Scheithauer BW, Wick MR. Meningioma, meningeal hemangiopericytoma (angioblastic meningioma), peripheral hemangiopericytoma, and acoustic schwannoma. A comparative immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13(4):251–61.
17. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Mod Pathol* 2003; 17(2):180–8. doi: 10.1038/modpathol.3800032.
18. Schnitt SJ, Vogel H. Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986; 10(9):640–9.
19. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biology of the Cell* 1990; 68(2):139–46. doi: 10.1016/0248-4900(90)90299-I.
20. Halliday WC, Yeger H, Duwe GF, Phillips MJ. Intermediate filaments in meningiomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1985; 44(6):617–23.
21. Theaker JM, Gatter KC, Esiri MM, Fleming KA. Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: an immunohistological study. *Journal of clinical pathology* 04.1986; 39(4):435–9.
22. Hitchcock E, Morris CS. Immunocytochemistry of intracranial meningiomas. *J Neuro-Oncol* 1987; 5(4):357–68. doi: 10.1007/BF00148393.
23. Miettinen M, Paetau A. Mapping of the keratin polypeptides in meningiomas of different types: an immunohistochemical analysis of 463 cases. *Hum Pathol* 2002; 33(6):590–8.
24. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7(4):393–5. doi: 10.1038/86439.
25. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3(4):393–403.
26. Bari C de, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8):1928–42. doi: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.
27. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2006; 34(11):1604–5. doi: 10.1016/j.exphem.2006.07.014.
28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143–7.
29. Janjanin S, Djouad F, Shanti RM, Baksh D, Gollapudi K, Prgomet D et al. Human palatine tonsil: a new potential tissue source of multipotent mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(4):R83. doi: 10.1186/ar2459.
30. Rzhainova AA, Gornostaeva SN, Goldshtein DV. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139(1):134–40.
31. Shih DT-b, Lee D-C, Chen S-C, Tsai R-Y, Huang C-T, Tsai C-C et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005; 23(7):1012–20. doi: 10.1634/stemcells.2004-0125.

32. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 1990; 61(7):1329–37.
33. Petrie C, Tholpady S, Ogle R, Botchwey E. Proliferative capacity and osteogenic potential of novel dura mater stem cells on poly-lactic-co-glycolic acid. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(1):61–71. doi: 10.1002/jbm.a.31367.
34. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang F-C, Byers MA, Chu T-MG et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14(2):149–56. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0031.
35. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23(2):220–9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166.
36. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 2000; 109(1):235–42.
37. Yen BL, Huang H-I, Chien C-C, Jui H-Y, Ko B-S, Yao M et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005; 23(1):3–9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0098.
38. da Silva Meirelles, Lindolfo, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 11):2204–13. doi: 10.1242/jcs.02932.
39. FIBBE WE, NOORT WA. Mesenchymal Stem Cells and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 996(1):235–44. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03252.x.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315–7. doi: 10.1080/14653240600855905.
41. Whetton AD, Dexter TM. Influence of growth factors and substrates on differentiation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5(6):1044–9.
42. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81(10):1390–7. doi: 10.1097/01.tp.0000214462.63943.14.
43. Sergeevicheva V, Kruchkova I, Chernykh E, Shevela E, Kulagin A, Gilevich A et al. Rapid Recovery from Chronic PRCA by MSC Infusion in Patient after Major ABO-Mismatched alloSCT. *Case Rep Med* 2012; 2012:862721. doi: 10.1155/2012/862721.
44. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008; 180(4):2581–7.
45. Tsai M-J, Tsai S-K, Hu B-R, Liou D-Y, Huang S-L, Huang M-C et al. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats. *J Biomed Sci* 2014; 21:5. doi: 10.1186/1423-0127-21-5.
46. Du Z, Wei C, Cheng K, Han B, Yan J, Zhang M et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J Surg Res* 2013; 183(2):907–15. doi: 10.1016/j.jss.2013.02.009.

47. Simerman AA, Perone MJ, Gimeno ML, Dumesic DA, Chazenbalk GD. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripotent stem cells in human adult tissues. *Expert Opin Biol Ther* 2014. doi: 10.1517/14712598.2014.900538.
48. Adegani FJ, Langroudi L, Arefian E, Shafiee A, Dinarvand P, Soleimani M. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep* 2013; 40(5):3693–703. doi: 10.1007/s11033-012-2445-7.
49. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9):726–36. doi: 10.1038/nri2395.
50. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen, Andre J, Stein JL, Croce CM et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(37):13906–11. doi: 10.1073/pnas.0804438105.
51. McMahon LA, Reid AJ, Campbell VA, Prendergast PJ. Regulatory effects of mechanical strain on the chondrogenic differentiation of MSCs in a collagen-GAG scaffold: experimental and computational analysis. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(2):185–94. doi: 10.1007/s10439-007-9416-5.
52. Wang C-H, Wang T-M, Young T-H, Lai Y-K, Yen M-L. The critical role of ECM proteins within the human MSC niche in endothelial differentiation. *Biomaterials* 2013; 34(17):4223–34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.062.
53. Fidelis-de-Oliveira P, Werneck-de-Castro, J P S, Pinho-Ribeiro V, Shalom, B C M, Nascimento-Silva JH, Costa e Souza, R H et al. Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts. *Cell Transplant* 2012; 21(5):1011–21. doi: 10.3727/096368911X623916.
54. Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes* 2010; 59(12):3139–47. doi: 10.2337/db10-0542.
55. Granero-Molto F, Myers TJ, Weis JA, Longobardi L, Li T, Yan Y et al. Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-I (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in *Irs1* knockout mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. *Stem Cells* 2011; 29(10):1537–48. doi: 10.1002/stem.697.
56. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* 2009; 27(3):670–81. doi: 10.1002/stem.20080742.
57. Di Nicola M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10):3838–43. doi: 10.1182/blood.V99.10.3838.
58. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109(1):228–34. doi: 10.1182/blood-2006-02-002246.
59. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4):1815–22. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
60. Tille J-C, Pepper MS. Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 2002; 280(2):179–91.

61. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004; 104(9):2643–5. doi: 10.1182/blood-2004-02-0526.
62. Kumar S, Ponnazhagan S. Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB J* 2007; 21(14):3917–27. doi: 10.1096/fj.07-8275com.
63. Becker A de, van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, Wever J de, Waele M de et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 2007; 92(4):440–9.
64. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371(9624):1579–86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.
65. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005; 65(8):3307–18. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1874.
66. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; 68(11):4331–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0943.
67. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Briloff S et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007; 171(5):1608–18. doi: 10.2353/ajpath.2007.060661.
68. Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E et al. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol* 2003; 162(2):391–402. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63834-5.
69. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007; 67(21):10123–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
70. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang, Sophie S W, Takashi S et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 2011; 19(2):257–72. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020.
71. Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, Gavriliuc OI, Rosca A, Gruia AT et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med* 2011; 15(3):635–46. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x.
72. Liu Y, Han Z-p, Zhang S-s, Jing Y-y, Bu X-x, Wang C-y et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem* 2011; 286(28):25007–15. doi: 10.1074/jbc.M110.213108.
73. Galiè M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V et al. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene* 2008; 27(18):2542–51. doi: 10.1038/sj.onc.1210920.
74. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 2008; 17(3):463–73. doi: 10.1089/scd.2007.0181.

75. Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10):3837–44. doi: 10.1182/blood-2003-04-1193.
76. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162):557–63. doi: 10.1038/nature06188.
77. Muehlberg FL, Song Y-H, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 2009; 30(4):589–97. doi: 10.1093/carcin/bgp036.
78. Roodhart, Jeanine M L, Daenen, Laura G M, Stigter, Edwin C A, Prins H-J, Gerrits J, Houthuijzen JM et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 2011; 20(3):370–83. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.010.
79. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008; 22(3):593–9. doi: 10.1038/sj.leu.2405090.
80. Qiao L, Xu Z-L, Zhao T-J, Ye L-H, Zhang X-D. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett* 2008; 269(1):67–77. doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.032.
81. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 2009; 113(18):4197–205. doi: 10.1182/blood-2008-09-176198.
82. Lu Y-r, Yuan Y, Wang X-j, Wei L-l, Chen Y-n, Cong C et al. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2):245–51.
83. Xin H, Sun R, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Mizuguchi H et al. Intratracheal delivery of CX3CL1-expressing mesenchymal stem cells to multiple lung tumors. *Mol Med* 2009; 15(9-10):321–7. doi: 10.2119/molmed.2009.00059.
84. Kidd S, Caldwell L, Dietrich M, Samudio I, Spaeth EL, Watson K et al. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy* 2010; 12(5):615–25. doi: 10.3109/14653241003631815.
85. Balyasnikova IV, Ferguson SD, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma. *PLoS One* 2010; 5(3):e9750. doi: 10.1371/journal.pone.0009750.
86. Yong RL, Shinjima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res* 2009; 69(23):8932–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3873.
87. Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens* 1990; 35(1):9–19.

88. Shah T, Webster AD, Peters TJ. Kinetic properties of 5' nucleotidase in blood lymphocytes from healthy subjects, immunodeficient patients and cord blood. *Clin Exp Immunol* 1984; 57(1):149–54.
89. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204(6):1257–65. doi: 10.1084/jem.20062512.
90. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, Ding Z, Romio M, Viethen C et al. Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2011; 92(2):338–47. doi: 10.1093/cvr/cvr218.
91. Canbolat O, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, Ozturk S. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37(2):189–93.
92. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(3):365–72. doi: 10.1007/s00432-007-0292-z.
93. Bardot V, Dutrillaux AM, Delattre JY, Vega F, Poisson M, Dutrillaux B et al. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. *Br J Cancer* 1994; 70(2):212–8.
94. Hausler, Sebastian F M, Montalban del Barrio, Itsaso, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Honig A et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(10):1405–18. doi: 10.1007/s00262-011-1040-4.
95. Ludwig HC, Rausch S, Schallock K, Markakis E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res* 1999; 19(3A):1747–52.
96. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993; 177(5):1331–42.
97. Saalbach A, Wetzig T, Haustein UF, Anderegg U. Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res* 1999; 298(2):307–15.
98. Tiveron MC, Barboni E, Pliego Rivero, F B, Gormley AM, Seeley PJ, Grosveld F et al. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 1992; 355(6362):745–8. doi: 10.1038/355745a0.
99. Chen C-H, Wang S-M, Yang S-H, Jeng C-J. Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. *J Cell Biochem* 2005; 94(4):684–94. doi: 10.1002/jcb.20341.
100. Schubert K, Gutknecht D, Koberle M, Anderegg U, Saalbach A. Melanoma cells use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *Am J Pathol* 2013; 182(1):266–76. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.003.
101. He J, Liu Y, Zhu T, Zhu J, Dimeco F, Vescovi AL et al. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(6):10744. doi: 10.1074/mcp.M111.010744.

102. Abeysinghe HR, Pollock SJ, Guckert NL, Veyberman Y, Keng P, Halterman M et al. The role of the THY1 gene in human ovarian cancer suppression based on transfection studies. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 149(1):1–10. doi: 10.1016/S0165-4608(03)00234-6.
103. Lung HL, Bangarusamy DK, Xie D, Cheung, Arthur Kwok Leung, Cheng Y, Kumaran MK et al. THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2005; 24(43):6525–32. doi: 10.1038/sj.onc.1208812.
104. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265(15):8361–4.
105. Cho SK, Bourdeau A, Letarte M, Zuniga-Pflucker JC. Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood* 2001; 98(13):3635–42.
106. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 1994; 134(6):2645–57. doi: 10.1210/endo.134.6.8194490.
107. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 1993; 23(9):2340–5. doi: 10.1002/eji.1830230943.
108. Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 2000; 267(17):5550–60.
109. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14(1):55–64.
110. Rulo HF, Westphal JR, van de Kerkhof, P C, de Waal, R M, van Vlijmen, I M, Ruitter DJ. Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. *J Dermatol Sci* 1995; 10(2):103–9.
111. Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R et al. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76(2):187–94.
112. Tian F, Zhou A-X, Smits AM, Larsson E, Goumans M-J, Heldin C-H et al. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392(3):283–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.170.
113. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995; 1(12):1623–34.
114. Davidson B, Stavnes HT, Forsund M, Berner A, Staff AC. CD105 (Endoglin) expression in breast carcinoma effusions is a marker of poor survival. *Breast* 2010; 19(6):493–8. doi: 10.1016/j.breast.2010.05.013.
115. Takase Y, Kai K, Masuda M, Akashi M, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract* 2010; 206(11):725–30. doi: 10.1016/j.prp.2010.05.015.
116. Romero D, O'Neill C, Terzic A, Contois L, Young K, Conley BA et al. Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. *Cancer Res* 2011; 71(10):3482–93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2665.

117. Gromova P, Rubin BP, Thys A, Cullus P, Erneux C, Vanderwinden J-M. ENDOGLIN/CD105 is expressed in KIT positive cells in the gut and in gastrointestinal stromal tumours. *J Cell Mol Med* 2012; 16(2):306–17. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01315.x.
118. Hu D, Wang X, Mao Y, Zhou L. Identification of CD105 (endoglin)-positive stem-like cells in rhabdoid meningioma. *J Neurooncol* 2012; 106(3):505–17. doi: 10.1007/s11060-011-0705-3.
119. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999; 59(4):856–61.
120. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H et al. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3):524–32.
121. Liu Y, Starr MD, Brady JC, Dellinger A, Pang H, Adams B et al. Modulation of circulating protein biomarkers following TRC105 (anti-endoglin antibody) treatment in patients with advanced cancer. *Cancer Med* 2014. doi: 10.1002/cam4.207.
122. Ziebarth AJ, Nowsheen S, Steg AD, Shah MM, Katre AA, Dobbin ZC et al. Endoglin (CD105) contributes to platinum resistance and is a target for tumor-specific therapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(1):170–82. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1045.
123. Püttmann S, Senner V, Braune S, Hillmann B, Exeler R, Rickert CH et al. Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest* 2005; 85(9):1163–71. doi: 10.1038/labinvest.3700307.
124. Lee WH. Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery* 1990; 27(3):389.
125. Krishan A. DAPI Fluorescence in Nuclei Isolated from Tumors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; 53(8):1033–6. doi: 10.1369/jhc.4B6563.2005.
126. Barden JA, Miki M, Hambly BD, Dos Remedios, C G. Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur. J. Biochem.* 1987; 162(3):583–8.
127. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 1993; 11(9):1026–30.
128. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27(2-3):95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
129. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ et al. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *J Fluoresc* 2012; 22(4):1189–99. doi: 10.1007/s10895-012-1059-8.
130. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997; 22(1):130.
131. Kirches E, Steffen T, Waldt N, Hebert E, Pachow D, Wilisch-Neumann A et al. The expression of the MSC-marker CD73 and of NF2/Merlin are correlated in meningiomas. *J Neurooncol* 2018; 138(2):251–9. doi: 10.1007/s11060-018-2807-7.
132. Scognamiglio G, D'Antonio A, Rossi G, Cavazza A, Camerlingo R, Pirozzi G et al. CD90 expression in atypical meningiomas and meningioma metastasis. *Am J Clin Pathol* 2014; 141(6):841–9. doi: 10.1309/AJCP8Y0EBQMKWQEI.

133. Lim H-Y, Kim KM, Kim BK, Shim J-K, Lee J-H, Huh Y-M et al. Isolation of mesenchymal stem-like cells in meningioma specimens. *Int J Oncol* 2013; 43(4):1260–8. doi: 10.3892/ijo.2013.2053.
134. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000; 28(6):707–15.
135. Koschmidder E. Characterization of MSC-marker positive cells in human meningiomas [Master's Thesis]. Master's Thesis, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg; Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg; (2012).
136. Kim YG, Jeon S, Sin G-Y, Shim J-K, Kim B-K, Shin H-J et al. Existence of glioma stroma mesenchymal stemlike cells in Korean glioma specimens. *Childs Nerv Syst* 2013; 29(4):549–63. doi: 10.1007/s00381-012-1988-1.
137. Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, Andrae N, Wilisch-Neumann A, Kirches E et al. miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells. *Oncogene* 2013; 32(39):4712–20. doi: 10.1038/onc.2012.468.
138. Pachow D, Andrae N, Kliese N, Angenstein F, Stork O, Wilisch-Neumann A et al. mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clin Cancer Res* 2013; 19(5):1180–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1904.
139. Burns SS, Akhmametyeva EM, Oblinger JL, Bush ML, Huang J, Senner V et al. Histone deacetylase inhibitor AR-42 differentially affects cell-cycle transit in meningeal and meningioma cells, potently inhibiting NF2-deficient meningioma growth. *Cancer Res* 2013; 73(2):792–803. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1888.
140. Kong BH, Shin H-D, Kim S-H, Mok H-S, Shim J-K, Lee J-H et al. Increased in vivo angiogenic effect of glioma stromal mesenchymal stem-like cells on glioma cancer stem cells from patients with glioblastoma. *Int J Oncol* 2013; 42(5):1754–62. doi: 10.3892/ijo.2013.1856.
141. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 2013; 339(6123):1077–80. doi: 10.1126/science.1233009.
142. Yesilöz Ü, Kirches E, Hartmann C, Scholz J, Kropf S, Sahm F et al. Frequent AKT1E17K mutations in skull base meningiomas are associated with mTOR and ERK1/2 activation and reduced time to tumor recurrence. *Neuro-Oncology* 2017; 19(8):1088–96. doi: 10.1093/neuonc/nox018.
143. Peyre M, Stemmer-Rachamimov A, Clermont-Taranchon E, Quentin S, El-Taraya N, Walczak C et al. Meningioma progression in mice triggered by Nf2 and Cdkn2ab inactivation. *Oncogene* 2013; 32(36):4264–72. doi: 10.1038/onc.2012.436.
144. Kalamarides M, Stemmer-Rachamimov AO, Niwa-Kawakita M, Chareyre F, Taranchon E, Han Z-Y et al. Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* 2011; 30(20):2333–44. doi: 10.1038/onc.2010.609.
145. Wang B, Cui Z, Zhong Z, Sun Y, Yang G-Y, Sun Q et al. The role and regulatory mechanism of IL-1 β on the methylation of the NF2 gene in benign meningiomas and leptomeninges. *Mol Carcinog* 2016; 55(12):2268–77. doi: 10.1002/mc.22467.

146. Torres-Martín M, Lassaletta L, Campos JM de, Isla A, Pinto GR, Burbano RR et al. Genome-wide methylation analysis in vestibular schwannomas shows putative mechanisms of gene expression modulation and global hypomethylation at the HOX gene cluster. *Genes Chromosomes Cancer* 2015; 54(4):197–209. doi: 10.1002/gcc.22232.
147. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K et al. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007; 8:16. doi: 10.1186/1471-2164-8-16.
148. Bowser JL, Blackburn MR, Shipley GL, Molina JG, Dunner K, JR, Broaddus RR. Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J Clin Invest* 2016; 126(1):220–38. doi: 10.1172/JCI79380.
149. James MF, Manchanda N, Gonzalez-Agosti C, Hartwig JH, Ramesh V. The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J* 2001; 356(Pt 2):377–86.
150. James MF, Lelke JM, Maccollin M, Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V et al. Modeling NF2 with human arachnoidal and meningioma cell culture systems: NF2 silencing reflects the benign character of tumor growth. *Neurobiol Dis* 2008; 29(2):278–92. doi: 10.1016/j.nbd.2007.09.002.
151. Striedinger K, VandenBerg SR, Baia GS, McDermott MW, Gutmann DH, Lal A. The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP. *Neoplasia* 2008; 10(11):1204–12.
152. Cooper J, Giancotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett* 2014; 588(16):2743–52. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.001.

7 PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zum Teil Bestandteil der folgenden Publikation:

Kirches E, Steffen T, Waldt N, Hebert E, Pachow D, Wilisch-Neumann A, Keilhoff G, Schneider T, Braunsdorf WEK, Warnke JP, Mawrin C.

The expression of the MSC-marker CD73 and of *NF2*/Merlin are correlated in meningiomas.

Journal of Neuro-Oncology 2018; 138(2):251-259. doi: 10.1007/s11060-018-2807-7

8 DANKSAGUNGEN

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

9 EHRENERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Mesenchymale Stammzellmarker in Meningeomen

im Institut für Neuropathologie

mit Unterstützung durch das Institut für Biochemie und Zellbiologie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 08.10.2019

10 CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.