

Bericht für die Anni-Hofmann-Stiftung über die wissenschaftlichen Aktivitäten im Förderungszeitraum: 4 / 2015 bis 9 / 2015.

Projekt: Mesenchymale Stammzellen modulieren die Gliom-Progression

Prof. Dr. Rainer Glaß, Leiter der Neurochirurgischen Forschung, Klinik für Neurochirurgie, Klinikum der Universität München, Marchioninistr. 15 81377 München.
Email: rainer.glass@med.uni-muenchen.de

Zusammenfassung:

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind eine zelluläre Komponente im Glioblastom (GBM) deren pathologische Bedeutung weitgehend ungeklärt ist. Dennoch wird der Einsatz von MSC für klinische Anwendungen (in Diagnostik und Therapie) bereits diskutiert. Daher untersuchen wir die tumorfördernden und tumorunterdrückenden Eigenschaften von Faktoren, die aus MSC freigesetzt werden in einem systematischen Ansatz. Im vorangegangenen Berichtszeitraum haben wir unsere Daten zur protumorigenen Rolle von löslichen Molekülen aus MSC vorgestellt. Für den aktuellen Berichtszeitraum haben wir nun einen weiteren, bedeutsamen Signalweg bei MSC aufgeklärt: Wir zeigen das MSC Mikrovesikel freisetzen, die eine tumorunterdrückende Funktion nach Modulierung der Genexpression für "Quaking" (QKI) und für "EprinA3" (EFNA3) bewirken. Für beide Gene haben wir die Signaltransduktionsprozesse untersucht, die mit der jeweiligen Genfunktion assoziiert sind. QKI ist als ein Molekül beschrieben, dass als Tumorsuppressor fungiert der (teils) p53 abhängig ist und die Bildung neuartiger mRNA Elemente (zirkuläre RNA) bewirkt. Unsere Daten belegen eine Tumorsuppressorrolle von QKI bei Gliomstammzellen, die aber unabhängig von der p53-Expression oder der Bildung zirkulärer RNA ist. Eine quantitative Analyse der EFNA3 Expression im GBM, in GBM-Zellen nach Stimulation mit MSC-konditioniertem Medium sowie der Mikrovesikel aus MSC zeigte: MSC verpacken die Boten-RNA (mRNA) für EFNA3 in Vesikel, die freigesetzt und in GBM-Zellen aufgenommen werden wo sie die Expressionsrate für EFNA direkt erhöhen. Funktionelle Studien belegen, dass EFNA3 im GBM als Tumorsuppressor fungiert. Insgesamt haben wir die Ziele unseres Projektplans erreicht und einzelne Moleküle identifiziert (QKI und EFNA3), die für pathologisch relevante Aspekte der MSC-GBM Interaktion verantwortlich sind. Wir leisten auch einen wichtigen Beitrag zur Bewertung der klinischen Einsatzmöglichkeiten von MSC. Eine Implantation von MSC beim GBM-Patienten ist aus unserer Sicht durch die tumorunterstützende Funktion der löslichen MSC-sekretierten Faktoren kontraindiziert. Eine Verwendung der Mikrovesikel aus MSC (wie sie für klinische Anwendungen ebenfalls bereits in der Diskussion ist) können wir unterstützen und die benefiziellen Effekte der MSC-Vesikel auch auf der molekularen Ebene belegen.

Wissenschaftlicher Hintergrund:

Das Glioblastom: Tumore, die aus Zellen des Rückenmarks und des Gehirns hervorgehen, beinhalten einige der aggressivsten Krebsformen, die beim Menschen auftreten (Westphal and Lamszus, 2011). Diese Tumore werden zusammenfassend als primäre Gehirntumore (Gliome) bezeichnet. Hinsichtlich ihres Verlaufs lassen sich

grundsätzlich zwei Formen von aggressiven Gliomen (Glioblastomen) unterscheiden, das primäre und das sekundäre Glioblastom (Ohgaki and Kleihues, 2007). Das Primäre Glioblastom (GBM) ist, mit 90% der Fälle, der häufigste aggressive (hochgradige) Gliomtyp. Bei der Behandlung von Glioblastomen wird folgende Strategie verfolgt: Das Tumorgewebe wird chirurgisch möglichst vollständig entfernt (Kreth et al., 2013), das betroffene Gehirnareal wird bestrahlt und die eventuell im zentralen Nervensystem (ZNS) verbliebenen Tumorzellen werden zusätzlich mittels Chemotherapie bekämpft. Bei der Chemotherapie werden DNA-alkylierende, Blut-Hirnschranken-gängige Nitroso-Harnstoffe (Temozolomid) eingesetzt, die vornehmlich stark proliferative Tumorzellen abtöten (Stupp et al., 2005). Trotz dieser kombinierten Therapie sind primäre und sekundäre Glioblastome nicht heilbar, alle genannten Verfahren zusammen erhöhen die mittlere Lebenserwartung der Patienten um etwa 6 bis 7 Monate (im Vergleich zur Überlebensrate bei Verzicht auf jegliche Therapie).

Glioblastomzellen mit Stammzeleigenschaften

Krebs ist ein mikroevolutionärer Prozess, bei dem aus einer wenig mutierten (und wenig malignen) Ausgangszelle über viele konsekutive Mutationsschritte (und die Selektion dieser Mutanten) eine Population hochaggressiver Zellen entsteht (Alberts et al., 2002; Hanahan and Weinberg, 2000). Die (genetisch und morphologisch) heterogenen Tumorzellen repräsentieren verschiedene Stadien dieses evolutionären Prozesses, bei dem einige Zellen mehr/andere Mutationen akquiriert haben als andere. Darüber hinaus zeigt sich aber, dass es bei Leukämien und soliden Tumoren eine Subpopulation von Tumorzellen mit besonderen Eigenschaften geben kann, die unter Umständen für die Progression und die Rezidivbildung der gesamten Tumormasse verantwortlich sind. In dieser neuen Vorstellung (dem hierarchischen Tumormodell) wird, im Gegensatz zum klassischen/ stochastischen Modell, die Krebsentwicklung durch die sogenannten Tumorstammzellen vorangetrieben. Solche Tumorstammzellen lassen sich dadurch charakterisieren, dass sie sowohl neue Tumorstammzellen (Fähigkeit zur Selbsterneuerung) als auch differenziertere Abkömmlinge (Fähigkeit zur Aufrechterhaltung einer zellulären Hierarchie) hervorbringen und ein viel größeres Potential haben neue Tumor zu bilden, als ihre differenzierteren Nachkommen (Jordan, 2009; Jordan et al., 2006; Shackleton et al., 2009). Das Vorhandensein von Tumorstammzellen hat, wenn sich die vorhergesagten Eigenschaften dieser Krebszellen bestätigen, hohe therapeutische Relevanz. Wenn nur (oder vor allem) die Tumorstammzelle für die Bildung von Tumormasse und Rezidiven verantwortlich ist, muss jede effiziente Tumorthherapie auf die Subpopulation der hochaggressiven Tumorstammzellen abzielen. Es besteht die Möglichkeit, dass bei konventionellen Therapien zunächst ein Effekt auf die Tumormasse (aus differenzierten Krebszellen) zu beobachten ist, dass aber die Tumorstammzellen durch die klassischen Therapien nicht beeinträchtigt werden und in relativ kurzer Zeit neue Tumore bilden.

Das Tumorphenchym:

In den vergangenen beiden Jahrzehnten hat die Krebsforschung an einer ganzen Reihe von Neoplasien gezeigt, dass die soliden Tumore ihre Pathogenität nicht nur aus den

tumoreigenen Mutationen und aberranten Signalwegen schöpfen, sondern auch in vielfacher Hinsicht durch das Tumorparenchym unterstützt werden (Hanahan and Weinberg, 2011). Die Untersuchung des organartigen Aufbaus der soliden Tumore und der mannigfaltigen Wechselwirkungen mit den physiologischen Zellen des Organismus ist schnell zu einem eigenständigen Forschungsfeld gewachsen. Darüber hinaus zeigte sich, dass einzelne Komponenten des Parenchyms auch tumorunterdrückende Eigenschaften haben. Insgesamt sehen wir nun therapeutische Ziele für adjuvante Therapien, die eine tumorsupportive Funktion des Parenchyms unterdrücken können sowie körpereigene Faktoren, die der Tumorabwehr dienen und für therapeutische Maßnahmen adaptiert werden können. Dies alles finden wir exemplarisch bei den Glioblastomen, die einen engen Verbund mit einer Vielzahl von Zellen eingehen (Glass and Synowitz, 2014; Westphal and Lamszus, 2011) einige Beispiele sind: Zellen der Vaskulatur (die beispielsweise den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen), Immunzellen (vor allem myeloide Zellen) oder mesenchymale Stammzellen, für die sowohl pro- als auch anti-tumorigene Eigenschaften im GBM beschrieben wurden.

Mesenchymale Stammzellen

Die Existenz von Gewebstammzellen, die zum Teil Reparaturfunktionen wahrnehmen oder die Koordination von entzündungs- und regenerativen Prozessen koordinieren, ist erst seit relativ kurzer Zeit gut etabliert (Caplan and Correa, 2011). Diese sogenannten mesenchymalen Stammzellen (MSC) kommen in allen bisher untersuchten Geweben vor und können beispielsweise zur Heilung nach Verletzung an Muskeln und Bindegewebe beziehungsweise zur Erweiterung des Fettgewebes dienen. Bemerkenswert ist die Fähigkeit der MSC Regionen mit pathologischen Veränderungen zu besiedeln und dort Botenstoffe zu sekretieren, die eine Wiederherstellung physiologischen Gewebes beschleunigen (Caplan and Correa, 2011). Zusätzlich ist gut belegt, dass sich MSC auch in soliden Tumoren, wie dem GBM, anreichern (Cooper et al., 2012; Kong et al., 2013; Motaln et al., 2012; Schichor et al., 2012). Die genauen Funktionen von MSC im GBM sind noch in der Diskussion. Dennoch wird bereits eine Verwendung von MSC in der Hirntumorthherapie und Diagnostik von einzelnen Autoren vorgeschlagen (siehe Abb.1; unten).

Experimentelle Modelle

Für die MSC existiert derzeit kein Modell zur direkten Visualisierung der Zellpopulation. Dieser Zelltyp lässt sich daher nur in vitro mittels Nachweis einer ganzen Reihe von Oberflächenmolekülen (CD-Marker) und mittels des Differenzierungsverhaltens bestimmen (Dominici et al., 2006). Dies haben wir für GBM Biopsien getan und hier MSC purifiziert, die sich in vitro auch gut expandieren lassen und sich genomisch vom GBM klar unterscheiden. Zusätzlich verwenden wir für unsere experimentellen Fragestellungen konditionierte Medien aus MSC des Knochenmarks von Maus und Mensch.

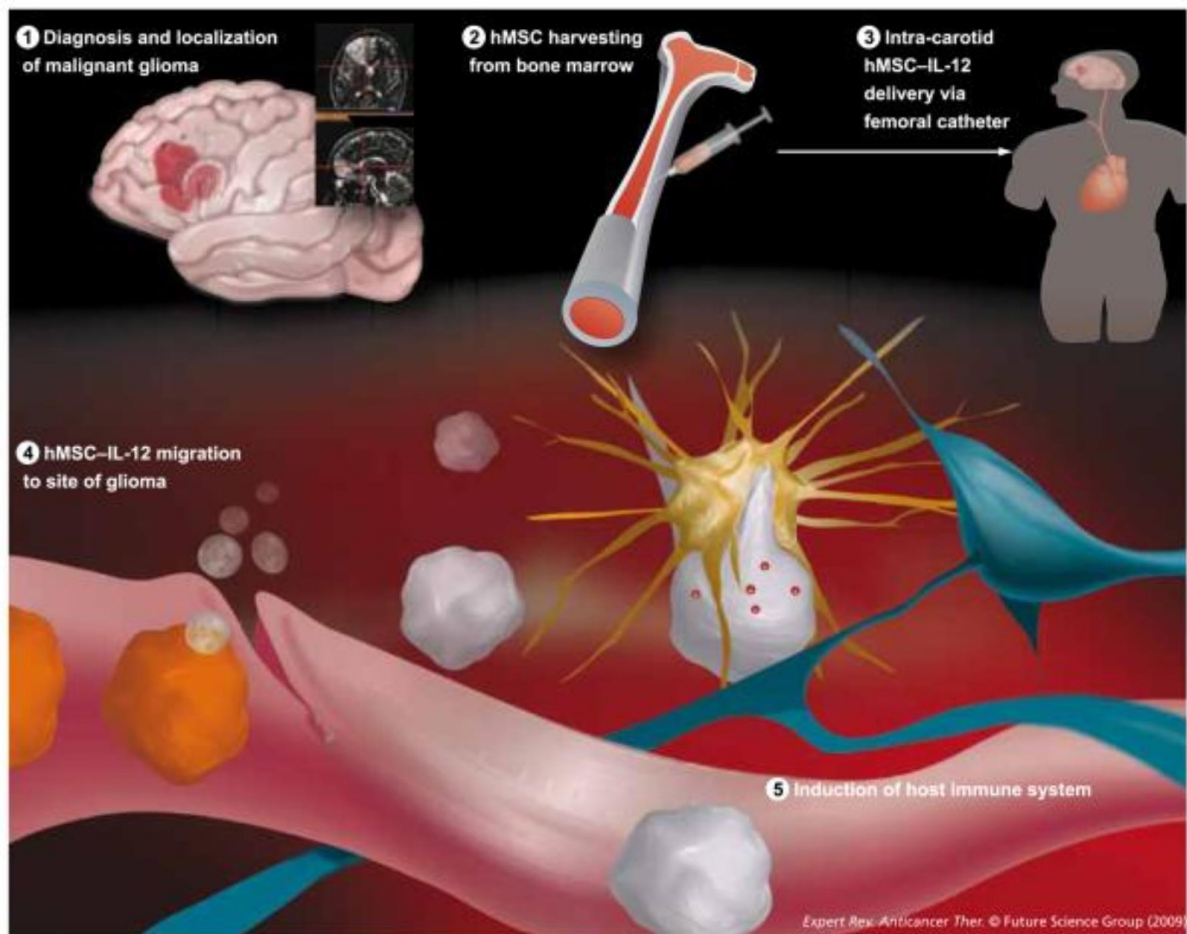


Abbildung-1. Der natürliche Tropismus von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zum GBM wird in Pionierarbeiten für klinische Anwendungen untersucht. MSC, beispielsweise aus dem Knochenmark, übernehmen diverse Aufgaben zur Wundheilung nach Verletzung. Zytokine (die eine zielgerichtete Wanderung von MSC zu einer Wunde ermöglichen) steuern auch die Migration zu Gliomen, die z.T. ähnliche Botenstoffe freisetzen. Diese zielgerichtete Wanderungsbewegung der MSC zum GBM wird in experimentellen Verfahren der Neuroonkologie wie folgt genutzt: (1) Markierte MSC reichern in GBM an und können die molekulare Bildgebung beim GBM unterstützen. (2) Humane MSC (hMSC) lassen sich mit klinisch gut etablierten Verfahren gewinnen, (3) diese MSC können auch (re-)transplantiert werden, werden beispielsweise durch Interleukin-12 zum Tumoren geleitet (5) und können unter anderem die Immunantwort im GBM modulieren.

Die MSC-konditionierten Medien (also Zellkulturmedien in denen MSC gezüchtet wurden und in die sie eine große Zahl von Faktoren sekretieren) vermitteln wichtige tumorunterstützende /tumorunterdrückende Eigenschaften (siehe Abb.2; unten). Wir konnten belegen, dass die tumorsupportive Rolle der MSC von löslichen Faktoren des konditionierten Mediums bewirkt wird. Unsere aktuellen Daten zeigen die tumorunterdrückende Rolle von Signalstoffen, die in Mikrovesikel verpackt und aus den MSC ausgeschleust werden.

Unsere Modelle:

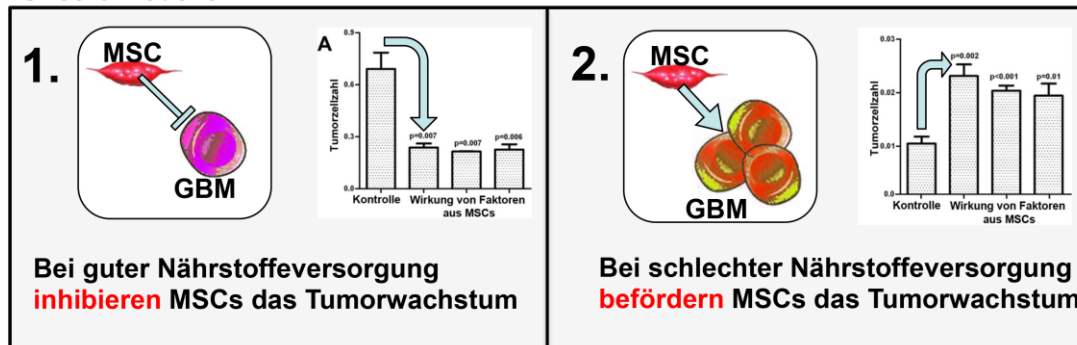


Abbildung-2. Endogene MSC haben verschiedene Effekte im GBM. MSC wurden in einer Reihe von Studien aus humanen GBM aufgereinigt. Zellkulturexperimente und Untersuchungen an Maus-Tumormodellen zeigten, dass MSC sowohl tumorunterstützende als auch anti-tumorigene Eigenschaften haben. Diese pro-tumorigenen und tumor-supprimierenden Eigenschaften konnten wir, für eine Reihe von GBM, in einem einfachen in vitro Modell nachahmen. Hier konnte der pro- bzw. anti-Tumor Effekt jeweils durch die Gabe von Serum (bzw. die Kultur in serumfreien Bedingungen) im Zellkulturmilieu gesteuert werden.

Zusätzlich zu den oben skizzierten MSC Kulturen nutzen wir eine ganze Reihe molekularbiologisch charakterisierter humaner, primärer GBM-Stammzellkulturen (abgekürzt als GBM-1 bis GBM-29), die im undifferenzierten (besonders malignen) Zustand als Sphäroide wachsen und nach Differenzierung (die mit einem weitgehenden Verlust der Tumorigenität einhergeht) als adhärenente und elongierte Zellpopulation sichtbar sind. Diese morphologischen Eigenschaften, sowie die pathologischen Charakteristika der GBM-Kulturen (beispielsweise Tumorigenität nach Implantation in das Mausgehirn) und deren Marker-Profile (z.B. die Expression von stammzellspezifischen Genen) zeigten uns bereits das große tumormodulierende Potenzial der MSC und der Mikrovesikelfraktion aus MSC-konditionierten Medien: (1) Im Tiermodell konnten (ko-implantierte) MSC das Überleben einer Gruppe von tumorinjizierten Mäusen verlängern (im Vergleich zu Tieren ohne MSC); (2) MSC-isolierte Vesikel konnten die Level für Stammzellgene reduzieren und (3) eine morphologisch abgrenzbare Differenzierungsreaktion bei Tumorstammzellen bewirken (siehe Abbildung 3; unten).

Der Nachweis für den tumorsupprimierenden Effekt der Mikrovesikel aus MSC ist dann besonders überzeugend, wenn einzelne Tumorsuppressoren identifiziert werden können, die spezifisch in Vesikeln aus MSC vorkommen und nicht in Kontroll-GBM Zellen vorhanden sind. Zusätzlich sollten diese tumorunterdrückenden Moleküle nach Stimulation von GBM Zellen mit MSC-Vesikeln nachgewiesen werden können. Diese Indizienkette lässt sich sehr eindeutig für genetische Botenmoleküle (mRNA) aufstellen, nicht aber für andere bioaktive Moleküle. Die mRNA ist außerhalb bestimmter Kompartimente (wie einer intakten Zelle oder wie einem Mikrovesikel) extrem kurzlebig (da sie schnell enzymatisch abgebaut wird), innerhalb diese

membranhüllten Räume aber vor Degradation geschützt. Somit ist gewährleistet, dass mRNA in Vesikeln und in den Zielzellen der Vesikel direkt identifiziert und quantifiziert werden kann. Wogegen lösliche Moleküle zum Teil ebenfalls an Vesikel binden können (oder in Vesikeln angereichert werden können), diese löslichen Faktoren können ihre Wirkung aber oft genauso gut auch ohne die Mikrovesikel erfüllen.

GBM Zellen stimuliert mit:

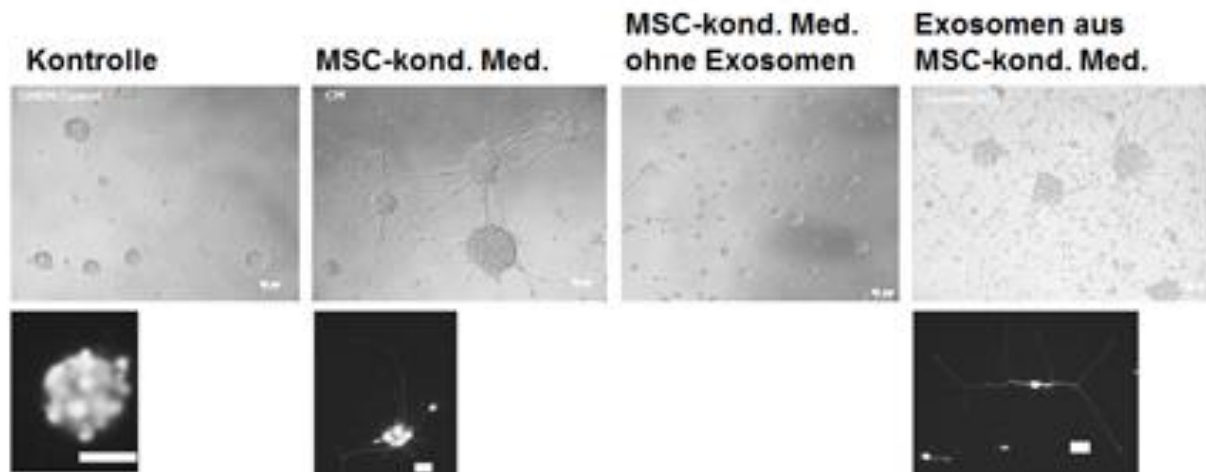


Abbildung-3. Erkenntnisse über die biochemische und molekularbiologische Grundlage der pro- und anti-tumorigenen Mechanismen von MSC auf GBM-Zellen zum Stand des letzten Berichts an die Anni Hofmann Stiftung. Im vergangenen Berichtszeitraum hatten wir Daten präsentiert, die zeigen dass MSC-konditioniertes Medium einerseits mittels löslicher Faktoren und andererseits mittels Signalmolekülen aus Mikrovesikeln (Exosomen) physiologische Veränderungen in GBM-Zellen hervorruft. Die löslichen Faktoren hatten in den Tumorzellen viabilitätssteigernde Effekte, während die Mikrovesikel zellmorphologische Veränderungen und Differenzierung bewirkten: GBM Zellen wachsen als Sphäroide (**Kontrolle; im** Phasenkontrastbild, oberen, oder im Fluoreszenzbild, unten); nach Applikation von MSC-konditioniertem Medium werden die Sphäroide adhärenz und bilden Fortsätze aus, dies wird durch Depletion der Mikrovesikel verhindert und durch aufgereinigte Mikrovesikel befördert.

Zusammenfassend aus den oben angestellten Überlegungen und als Quintessenz unserer bereits in den vergangenen Berichtszeiträumen dargestellten Arbeiten haben wir die folgende experimentelle Strategie zur Identifikation von Tumorsuppressoren aus Mikrovesikeln von MSC erarbeitet: Das mRNA-Profil aus Vesikeln von MSC, Kontroll-GBM Zellen und von Vesikel-stimulierten GBM-Zellen wird erforscht; mRNA-Sequenzen, die in verstärkt in Vesikeln aber auch in stimulierten GBM (im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-GBM) nachweisbar sind, werden als Kandidaten für die Vermittlung des anti-Tumor Effekts identifiziert (siehe Abb. 4). Die hieraus resultierenden Daten sind in den Abbildungen 13 und Folgende wiedergegeben.

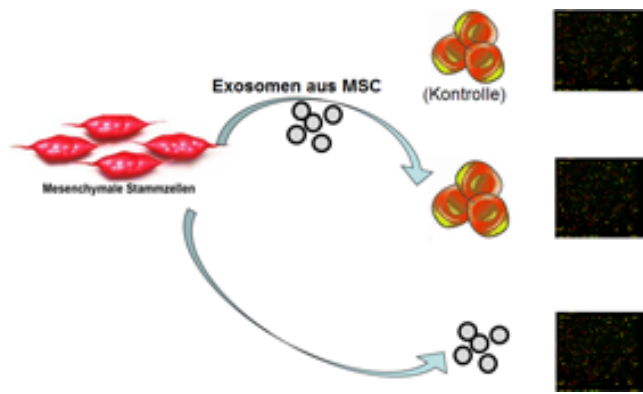


Abbildung-4. Versuchsablauf für die Analyse von Exosomen-vermittelten Signalen. Exosomen werden, aufgereinigt; GBM Zellen werden entweder mit diesen Exosomen stimuliert oder nicht (Kontrolle); diese GBM Zellen und die Exosomen selbst werden mittels RNA-Sequenzierung auf Genexpressionsänderungen und mRNA bzw. miRNA untersucht.

Ein Befund aus den Experimenten die wir im letzten Rapport zusammengefasst hatten ist, dass der Faktor QKI in GBM nach Gabe von MSC-konditioniertem Medium heraufreguliert wird. Für QKI wurde in bereits publizierten Arbeiten am GBM bereits eine tumorunterdrückende Wirkung nachgewiesen (siehe Abb. 5). In den hier beschriebenen Arbeiten untersuchen wir nun die Rolle von QKI bei der MSC-vermittelten Tumorsuppression anhand folgender Fragestellungen: (1) Ist der anti-tumorigene Effekt von QKI in der GBM-Stammzelle abhängig von der funktionellen Expression von p53 (wie in der Literatur diskutiert)? (2) Vermittelt QKI im GBM bestimmte (kürzlich erst entdeckte) Eigenschaften der mRNA - wie beispielsweise die Bildung zirkulärer RNA (hier ist eine Rolle von QKI in anderen Zellen bereits postuliert worden)? Bestimmt QKI das Differenzierungsverhalten von Glioblastomstammzellen? Wird die mRNA für QKI in Mikrovesikeln aus MSC transportiert?

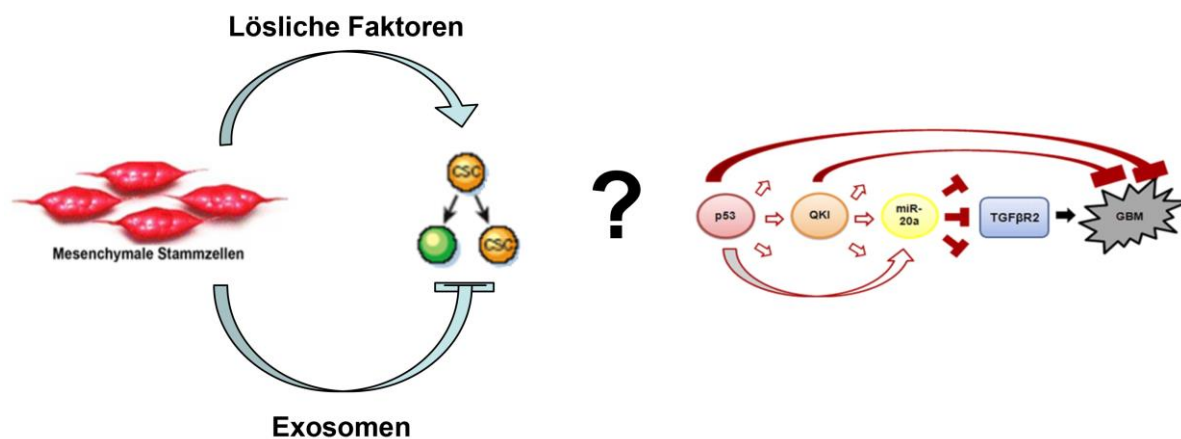


Abbildung-5. Erkenntnisse über die biochemische und molekulare Grundlage der pro- und anti-tumorigenen Mechanismen von MSC auf GBM-Zellen zum Stand des letzten Berichts an die Anni Hofmann Stiftung. Exosomen oder lösliche Faktoren aus MSC-konditioniertem Medium wirken unterschiedlich auf GBM-Zellen. Unsere Expressionsanalysen von GBM-Zellen, die mit MSC-konditioniertem stimuliert wurden zeigten eine Induktion eines Moleküls namens Quaking (QKI), das beispielsweise durch den Tumorsuppressor p53 in GBM-Zellen aktiviert wird und hemmende Wirkung für das GBM hat. Offen blieb die Frage ob QKI im GBM durch die Mikrovesikel der MSC induziert wird.

Aktuelle Ergebnisse:

Die Expression des Tumorsuppressors QKI kann durch p53 bewirkt werden, hier untersuchen wir in p53defizienten Zellen (Mausgliom mit p53 knockout und primäre humane GBM mit p53-Mutation) und in GBM Zellen mit p53 Wild-Typ (cdkn2a-defiziente Mausgliome oder humane GBM ohne p53 Mutation) die differenzierende Wirkung im Langzeitversuch (über 2 bis 3 Wochen). Es zeigt sich, daß Tumore ohne p53 (siehe Abb. 6) im Langzeitversuch keine wesentliche Änderung der Gesamtzellzahl nach Stimulation mit MSC-konditionierten Medien oder mit Kontrollmedien durchmachen (wogegen eine kurzfristige Viabilitätssteigerung durch das MSC-Medium zu beobachten war).

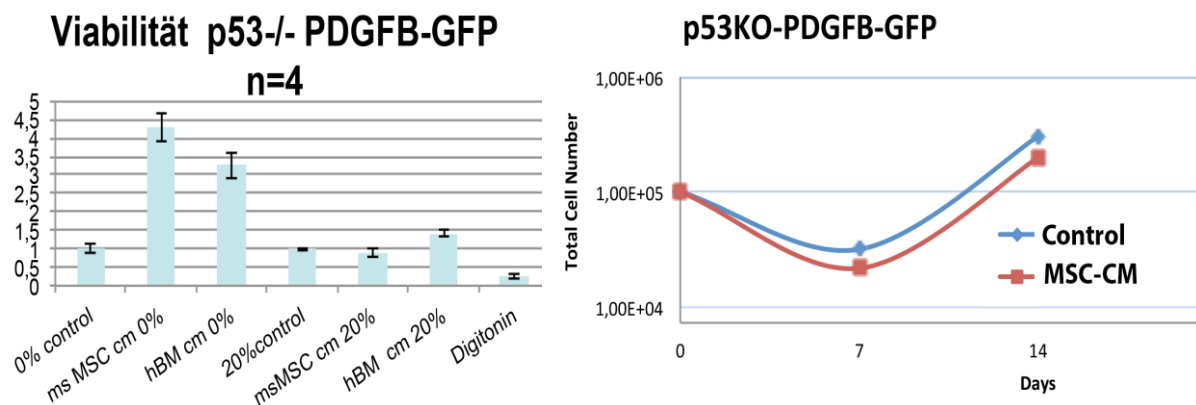


Abbildung-6. Neue Daten zur Persistenz des protumorigenen Effekts von MSC-konditioniertem Medium in transgenen Maus-Gliomzellen. (Linke Abbildung) Unsere bereits präsentierten Daten zeigten eine viabilitätsfördernde Funktion von MSC-konditioniertem Medium in Mausgliomen, die p53-defizient sind und den Wachstumsfaktor PDGF-B überexprimieren. (Rechte Abbildung) Die wachstums- und viabilitätssteigernden Effekte von MSC-konditioniertem Medium im Mausgliom sind nicht nachhaltig, denn im Vergleich zu einer Kontrolle (blaue Kurve) wird der Zellanzuwuchs durch das konditionierte Medium (rote Kurve) nicht erhöht. Dies steht im Gegensatz zur Situation bei humanen Zellen, GBM-13 in Abbildung-7 (siehe unten).

Das in Abbildung-6 gezeigte Ausbleiben eines Differenzierungseffekts nach Gabe von MSC-konditionierten Medien ist jedoch nicht auf die Funktionalität des p53 Tumorsuppressors zurückzuführen. In weiteren Versuchen an humanen und transgenen Mausgliomzellen konnten wir beweisen, dass eine dauerhafte Zunahme (oder keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe) der Anzahl an GBM Zellen unabhängig vom p53-Status des Tumor ist. So war beispielsweise beim GBM-13, einem p53-Wild-Typ Tumor, die Anzahl der GBM Zellen nach Stimulierung mit MSC-sekretierten Faktoren dauerhaft erhöht (siehe Abb. 7) - bei cdkn2a-defizienten Mausgliomen (die ebenfalls einen p53 Wild-Typ haben) ist dies jedoch nicht der Fall (hier nicht gezeigt). Insgesamt ist also persistierende Wirkung von MSC konditioniertem Medium (oder deren Ausbleiben) nicht mit der Funktion von p53 korreliert und daher lässt sich rückschließen, dass es auch keine längerfristigen pro-oder anti-tumorigenen Effekte von p53 auf QKI gibt. Insgesamt deuten unsere Daten also darauf hin, dass wesentliche

MSC-induzierte pathologische Effekte in GBM durch andere Signalwege (als p53) hervorgerufen werden.

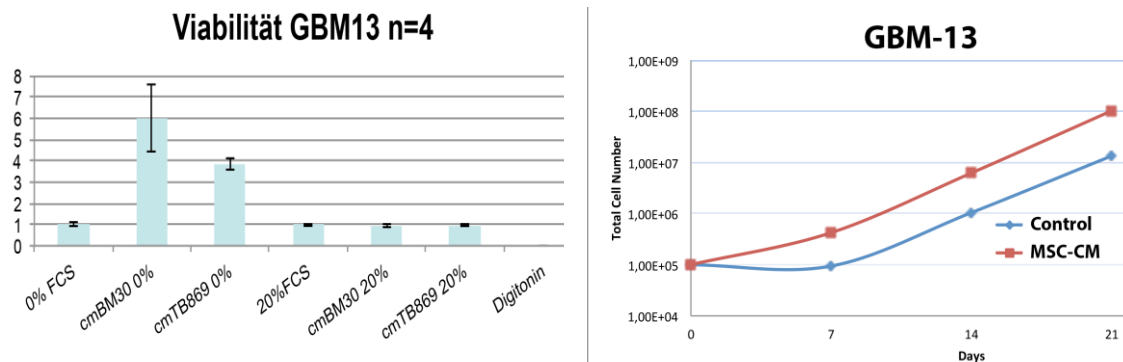


Abbildung-7. Neue Daten zur Persistenz des protumorigenen Effekts von MSC-konditioniertem Medium in humanen primären GBM-Zellen. (Linke Abbildung) Wie bereits dokumentiert steigert MSC-konditioniertem Medium die Viabilität primärer humaner Gliome. (Rechte Abbildung) Dieser Effekt ist dauerhaft, denn im Vergleich zu einer Kontrolle (blaue Kurve) ist die Zellzahl nach Stimulation mit MSC-konditioniertem Medium (rote Kurve) über drei Wochen erhöht (die Erhöhung geschieht um den Faktor 10; wie in der semilogarithmischen Darstellung angezeigt).

Um direkte Rückschlüsse auf die Funktion von QKI im GBM ziehen zu können haben wir humane primäre GBM Zellen mit lentiviralen Vektoren zur Expression von shRNA für QKI transduziert. Hierdurch wird der knock-down von QKI im GBM vermittelt, die Expressionsrate von QKI wird also dauerhaft und stark vermindert. Als Kontrolle für die Transduktionseffizienz in den Tumorzellen wird im knockdown Vektor grün-fluoreszierendes Protein (GFP) mit-exprimiert, so dass die weitreichende genetische Veränderung in unseren Kulturen direkt sichtbar gemacht werden kann (siehe Abb. 8). Hier kann nun beobachtet werden, welche physiologischen Effekte eintreten / ausbleiben wenn die GBM-Zellen, bei denen QKI fehlt, mit MSC-konditioniertem Medium stimuliert werden. Dies lässt sich in Abbildung-8, A verfolgen: Hier wurden die GBM Zellen mit MSC-konditioniertem Medium behandelt, aber im QKI-defizienten GBM bleibt die morphologisch identifizierbare Differenzierungsreaktion aus (im Vergleich zu Abb. 3 oder Abb.9).

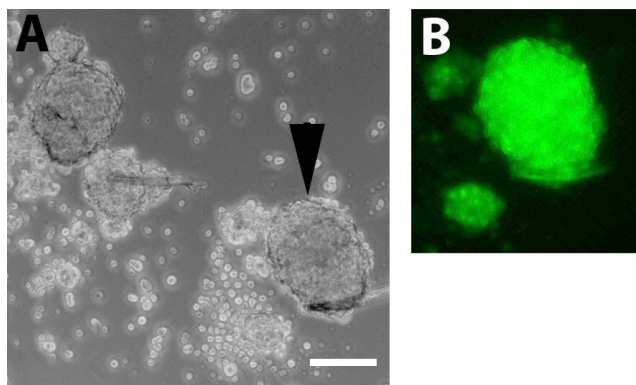


Abbildung-8. Neue Daten zur genetischen Manipulation von QKI in humanen GBM-Zellen. (Linke Abbildung) In GBM-Zellen mit einem QKI-knockdown sind kaum morphologische Veränderungen (einen Vergleich bieten Abb.-3 und -9) nach Applikation von MSC-konditioniertem Medium zu sehen, d.h. der Differenzierungseffekt bleibt aus. (Rechte Abbildung) Der QKI knockdown Vektor bewirkt die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP; siehe Text).

Um die Spezifität der in Abbildung-8 dargestellten Ergebnisse zu untersuchen haben wir unsere GBM-Kulturen auch mit Kontrollvektoren (zur Expression unspezifischer shRNAs) transduziert. In Abbildung-9 zeigt sich, dass solche Kontrollzellen (wie auch nicht-transduzierte Zellen, in Abb. 3) morphologische Veränderungen nach Stimulation mit MSC-Faktoren durchmachen. Insgesamt zeigen diese Versuche, dass QKI die morphologisch sichtbare, MSC-induzierte Differenzierung steuert. Eine erste molekulare Komponente des Signalwegs der MSC-GBM Interaktion ist damit von uns gefunden worden.

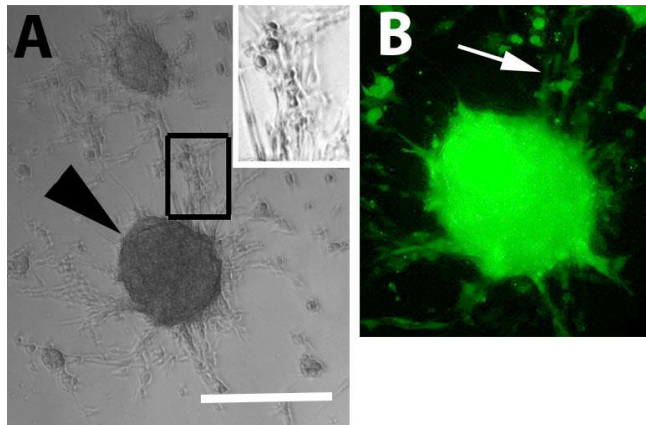


Abbildung-9. Neue Daten; Kontrollen zum knock-down von QKI in humanen GBM-Zellen. (Linke Abbildung) GBM-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor, der keinen QKI-knockdown bewirkt, transduziert. In dieser Kontrolle bleibt die differenzierende Wirkung des MSC-konditionierten Mediums bestehen; differenzierende Zellen (Rahmen) wurden vergrößert dargestellt. (Rechts) Differenzierende GBM-Zellen exprimieren den Kontrollvektor, was durch GFP-Expression sichtbar ist (Pfeil).

Die in den Abbildungen-8 und -9 beschriebenen Phänomene haben wir quantifiziert und zeigen in Abbildung-10, dass eine Blockade der QKI-Expression in GBM Zellen sehr weitreichend die MSC-vermittelte Gliomstammzeldifferenzierung unterbindet.

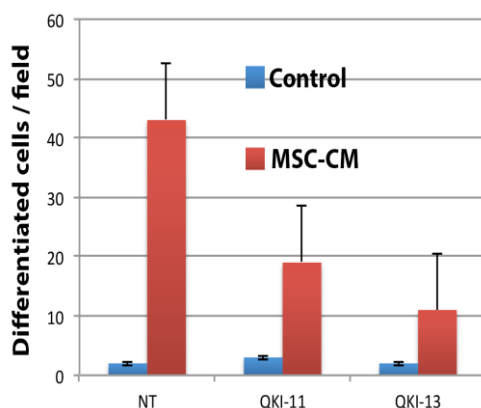


Abbildung-10. Neue Daten zum molekularen Mechanismus der MSC-induzierten Differenzierung von human primären GBM-Zellen: QKI steuert die Differenzierung. Primäre humane GBM-Zellen mit einem Kontrollvektor (NT) oder 2 unterschiedlichen QKI-knockdown Konstrukten wurden mit Kontrollmedium (blaue Balken) oder MSC-konditioniertem Medium (rote Balken) stimuliert. Im Vergleich zur NT-Kontrolle kann das konditionierte Medium bei den knock-down Zellen nur deutlich geringere Differenzierungsraten bewirken.

In der Literatur sind verschiedene Wege beschrieben, auf denen QKI seine physiologische Wirkung entfaltet. QKI kann beispielsweise direkt als Transkriptionsfaktor die Expression einer größeren Zahl an Genen steuern, die für die Reifung von Oligodendrozyten verantwortlich sind. Darüber hinaus wurde berichtet, dass QKI auch für das Auftreten neuer und (in ihrer Bedeutung) noch weitgehend

ungeklärter Phänomene ursächlich ist. So bewirkt QKI beispielsweise die Formation von zirkulärer RNA, die zwar recht stabil ist aber nicht mehr in Proteine umgeschrieben wird (unter Umständen also eine nicht-funktionelle Form gespeicherter RNA darstellt). Auf diesem Wege (nämlich der Generierung zirkulärer RNA) lassen sich Genexpressionsmuster global modifizieren wodurch auch eine fundamentale Wirkung erzielt werden kann. Aus diesem Grunde haben wir diesen Regelkreis experimentell näher untersucht. Hierfür haben wir das Gesamte RNA-Profil unserer Zellen gemessen (Abbildung. 11) und differentiell die Menge an zirkulärer RNA in GBM Zellen vor und nach Gabe von MSC-konditionierten Medien bestimmt (Abbildung-12).

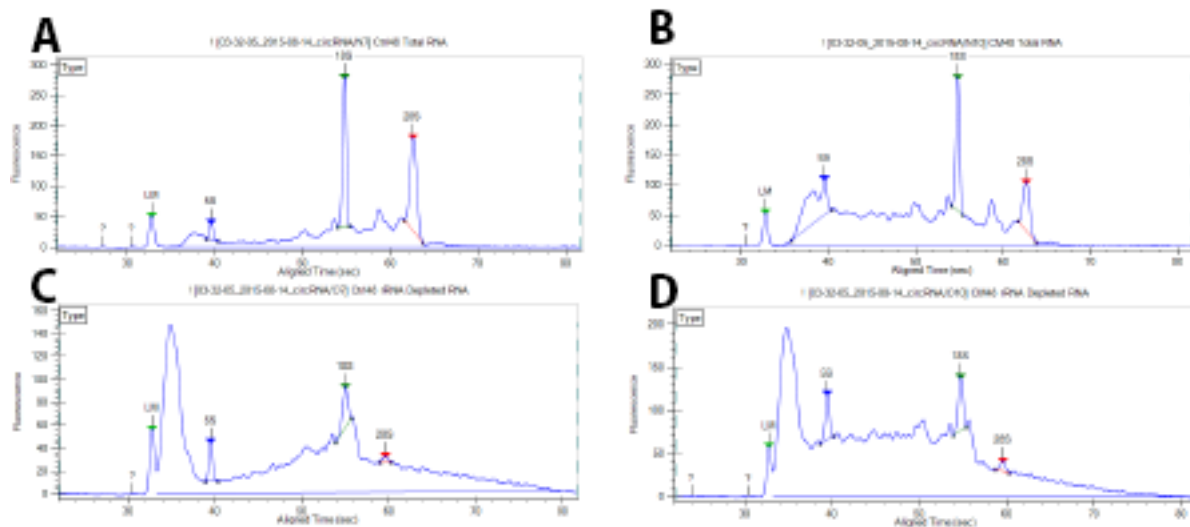


Abbildung-11. Erstellung eines RNA Profils aus GBM Zellen mit und ohne Stimulation durch MSC-konditioniertes Medium. Das gesamte zelluläre RNA-Spektrum wurde in einer Mikrofluid-Kammer (Perkin-Elmer LabChip) chromatographisch separiert und die RNA-Konzentration (**Y-Achse**) wurde gegen die Größe der RNA-Fragmente aufgetragen (**X-Achse**), dies wurde für GBM Zellen unter Kontrollbedingungen (**A und B**) bzw. für GBM-Zellen stimuliert mit MSC-konditioniertem Medium durchgeführt (**C und D**). Um die Menge an zirkulärer RNase abzuschätzen wurde dieses Verfahren auch für Proben durchgeführt, bei denen die lineare RNA mittels RNase-R Verdau abgebaut war (**B und D**).

Die Veränderungen des RNA Profils entwickeln sich nach MSC-Stimulation jedoch anders als postuliert. Eine erhöhte QKI-Expression sollte eine vermehrte Bildung von zirkulärer RNA bewirken - die zeigen unsere Ergebnisse aber nicht (siehe Abbildung-12).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass QKI ein wichtiger MSC-induzierter Tumorsuppressor in GBM-Zellen ist (Abbildung 10). QKI entfaltet diese Wirkung jedoch nicht durch den p53 Signalweg oder durch die Formation von zirkulären RNA-Elementen. Im Folgenden wird untersucht inwieweit eine Induktion von QKI direkt durch die (tumordifferenzierenden) Mikrovesikel erreicht wird. Zusätzlich zeigt dieser neue und systematische Ansatz andere Tumorsuppressormoleküle in Vesikeln der MSC.

Number	Sample	Abb.	c [ng/μl]	vol [μl]	m [ng]
1	GBM13 Control 24h	Ctrl24	11,0	10	110
2	GBM13 Control 48h	Ctrl48	12,3	10	123
4	GBM13 MSC-CM 24h	CM24	9,5	10	95
5	GBM13 MSC-CM 48h	CM48	9,5	10	95

Abbildung-12. Quantifizierung zirkulärer RNA in GBM Zellen mit und ohne Stimulation durch MSC-konditioniertes Medium. Die Menge an zirkulärer RNA (Differenz aus den in Abbildung 11 dargestellten Proben: A versus B bzw. C versus D) wurde mittels eines Fluoreszenzverfahrens (Qbit) ermittelt. Die Gesamtmenge an zirkulärer RNA in den stimulierten Proben (4 und 5) hat im Vergleich zu den Kontrollen (1 und 2) abgenommen.

Wie in Abbildung-4 einleitend dargestellt wurde in dieser experimentellen Serie das Genexpressionsprofil des Tumors ohne und mit Stimulierung durch MSC-Vesikel sowie der Gehalt an mRNA in den Vesikeln bestimmt (mittels next generation sequencing). Die Anzahl an Genexpressionsänderungen zwischen diesen Gruppen wurde zunächst statistisch betrachtet (siehe Abbildung-13).

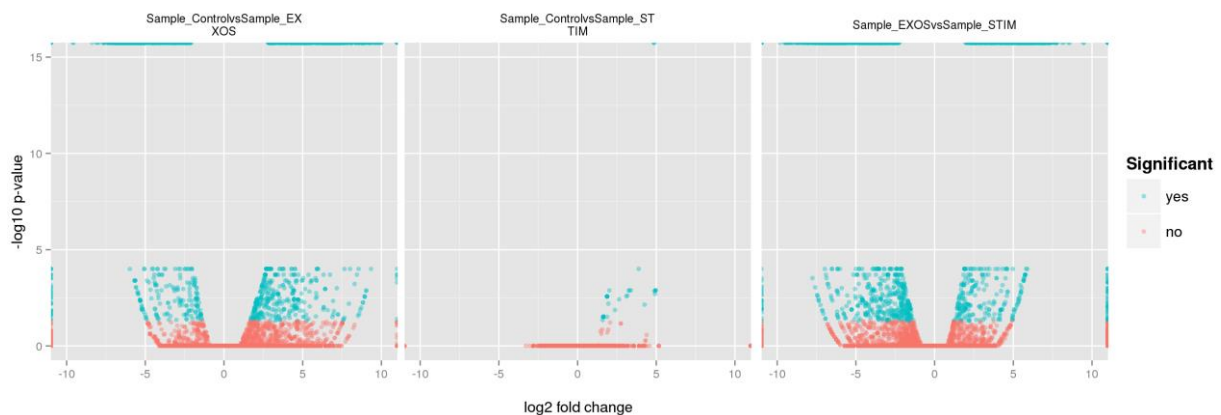


Abbildung-13. Graphische Darstellung der globalen Genexpressionsänderungen in MSC-stimulierten GBM-Zellen, die durch RNA aus Exosomen hervorgerufen werden. (Linke Graphik) In einem "volcano-plot" wurden die Expressionsänderungen einzelner Gene (X-Achse) zwischen den Proben "Kontrolle" (unstimulierte GBM-Zellen) und Exos (Exosomenfraktion) ermittelt und gegen die Wahrscheinlichkeit für eine statistische signifikante Änderung (Y-Achse) aufgetragen. Signifikante Genexpressionsänderungen sind in blau dargestellt und damit visuell von Änderungen ohne statistische Signifikanz unterschieden. **(Mitte)** Die Änderung des Genexpressionsmusters zwischen Kontrollproben und Exosomen-stimulierten Proben ist gezeigt; es gibt nur eine kleiner Anzahl statistisch signifikant regulierter Gene. **(Rechte Graphik)** Das Genexpressionsmuster zwischen stimulierten GBM Zellen und der Exosomenfraktion unterscheidet sich (wie wir dies auch erwarten würden).

Innerhalb diese Gruppe differentiell exprimierter Gene konnten wir Sequenzen detektieren für die unser Postulat für eine pathologische Relevanz zutrifft: Die mRNA des Gens ist in stimulierten GBM deutlich stärker vertreten als in Kontroll-GBM und die mRNA ist in den Vesikeln deutlich angereichert (so dass die Vesikel aus MSC die Expressionsänderung in den GBM auch vermitteln können). Ein solches Molekül, für das alle genannten Bedingungen zutreffen, ist beispielsweise ein Ephrin-Ligand namens EphrinA3 (das korrespondierende Gen ist EFNA3; siehe auch Abbildung-14).

EFNA3	Stim vs. Ctrl:	Exosome vs CTRL.:	p-Value
	1.8987779	6.984538244	0.0153

Abbildung-14. Die Differentielle Expression des Ephrin-Liganden EFNA3 in GBM Zellen kann durch Exosomen aus MSC hervorgerufen werden. Nur eine kleine Gruppe von Genen zeigt signifikant erhöhte Expressionsraten sowohl in Exosomen (aus MSC) als auch in Exosomen-stimulierten GBM Zellen. Nur für bestimmte Gene aus dieser kleinen Gruppe ist die physiologische Bedeutung (Daten zugänglich aus der Fachliteratur) bereits experimentell erschlossen. Der Ephrin-A3 Ligand (EFNA3) ist, gegenüber unstimulierten GBM Zellen, in MSC-Exosomen deutlich erhöht (6.98-fach auf einer log₂ Skala). Die Exosomen-stimulierten GBM Zellen exprimieren ebenfalls wesentlich mehr EFNA3 als nicht stimulierte GBM Zellen (1.89-fach auf einer log₂ Skala).

Nach der Identifikation von EFNA3 als ein Kandidaten-Gen, dass die anti-tumorigenen Effekte der MSC-sekretierten Mikrovesikel direkt vermitteln könnte haben wir die Expression dieses Gens in GBM Zellen moduliert, um zu testen ob EFNA3 direkt für eine vermehrte Differenzierung bzw. eine verringerte Expansionsfähigkeit von MSC-Vesikeln stimulierten GBM-Zellen verantwortlich sein kann. Hierzu wurde ein Transkript für humanes EFNA3 in humanen primären GBM Zellen exprimiert (und in der Kontrollgruppe wurden GBM Zellen mit einem Kontrollvektor behandelt). Unsere in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass EFNA3 in humanen GBM als Tumorsuppressor fungiert und die Zellvermehrung persistent einschränkt.

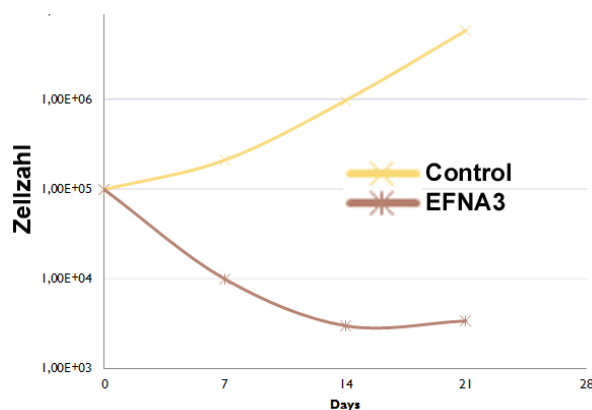


Abbildung-15. Die forcierte Expression von EFNA3 in GBM Zellen vermindert die Tumorzellexpansion. Ein Vektor zur Expression von EFNA3 (braune Kurve) oder ein Kontrollvektor (gelbe Kurve) wurden stabil in GBM Zellen transfiziert und die Zellzahl der genetisch manipulierten GBM-Zellkulturen wurde über die Zeit aufgetragen (drei Wochen). Die erhöhte Expression von EFNA3 vermindert die GBM-Expansion in vitro deutlich.

Um zu untersuchen, ob es sich bei EFNA3 tatsächlich um ein Gen mit pathologischer Relevanz für Patienten handelt, haben wir die Korrelation der EFNA3 Expression mit der relativen Überlebenswahrscheinlichkeit in einem Patientenkollektiv analysiert. Mittels der Datenbank des "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) können solche statistischen Beziehungen ermittelt werden. In der TCGA Datenbank sind klinische Parameter für einzelne Patienten und genomweite Genexpressionsprofile von Tumoren dieser Patienten gespeichert. Unsere Untersuchung zeigt, dass eine vermehrte Expression von EFNA3 mit einer verbesserten Überlebensrate beim GBM assoziiert ist (Abbildung 16).

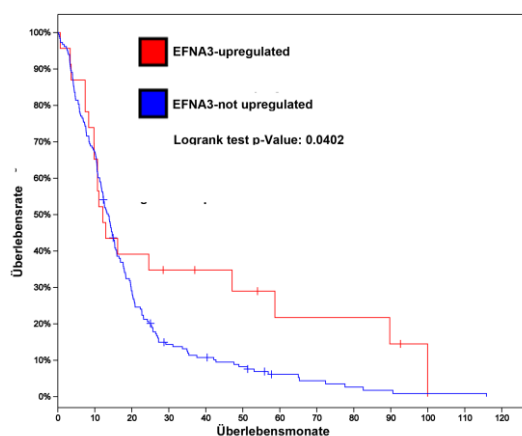


Abbildung-16. Die MSC-Exosomen induzierte Expression von EFNA3 in GBM Zellen ist ein pathologisch relevanter Faktor, der die anti-Tumor Effekte von MSC-Exosomen vermitteln kann. GBM-Patienten wurde hinsichtlich der Genexpressionsmuster in Tumor-Biopsien untersucht (TCGA-Datenbank); die relative Überlebenswahrscheinlichkeit von GBM-Patienten mit hoher (rote Kurve) oder nicht-erhöhter (blaue Kurve) Expressionsrate für EFNA3 wurde verglichen.

Insgesamt können wir im vorliegenden Bericht also auf ein erfolgreiches Projekt zurückblicken. Wir haben einen zellulären Signalweg, die Sekretion von Mikrovesikeln und Exosomen in denen Botenstoffe enthalten sind, aufgeklärt mittels dessen MSC die Tumorigenität von GBM-Stammzellen reduzieren (Abbildung 17).

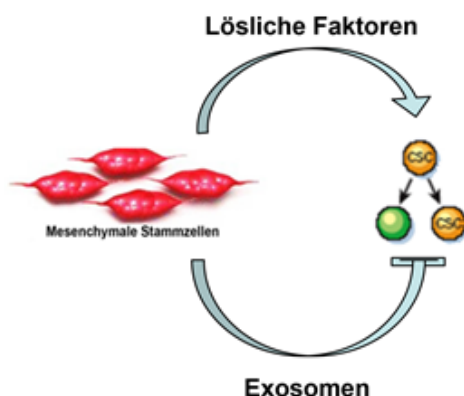


Abbildung-17. Molekulare Mechanismen der anti-Tumor Effekte von MSC-Exosomen beim GBM. Im vergangenen Berichtszeitraum zeigten wir, dass lösliche Faktoren aus MSC die GBM-Tumorigenität befördern. Im aktuellen Bericht zeigen wir zwei Signalwege, EFNA3 und QKI, mittels derer MSC-Exosomen das Tumorwachstum reduzieren und die Tumorzell-differenzierung bewirken können. Für EFNA3 konnten wir einen direkten RNA-Transport in MSC-Exosomen nachweisen.

Dies erklärt die profunden anti-tumorigene Effekte, die wir in den in vivo Modellen (Überlebensstudien bei tumorinokulierten Mäusen) bereits in vergangenen Berichten gezeigt hatten. Insbesondere haben wir hier die Rolle von zwei Molekülen gezeigt, die diesen anti-Tumor Effekt vermitteln: QKI und EFNA3. Für EFNA3 könnten wir einen

MSC-induzierte Signaltransduktionskaskade aufklären. Die Boten-RNA (mRNA) für EFNA3 wird in MSC synthetisiert, in Mikrovesikel verpackt, die anschließend in GBM-Zellen aufgenommen werden und zur hoch-Regulation von EFNA3 im GBM führen. Vermehrte EFNA3 Expression vermittelt einen anti-tumorigenen Prozess mit klinischer Relevanz. Unsere Studie beleuchtet auch einen wichtigen Punkt bei der zukünftigen klinischen Nutzung von MSC. Die Verwendung von Mikrovesikeln aus MSC für therapeutische Ansätze, wie sie bereits für periphere Tumore angedacht ist, sollte auch für das GBM vorangetrieben werden. Die Nutzung von implantierten MSC birgt jedoch Gefahren, da MSC lösliche tumorsupportive Substanzen freisetzen. Wir freuen uns, dass wir mit Hilfe der Unterstützung durch die Anni-Hofmann-Stiftung, hier einen sichtbaren Beitrag zur klinischen Applikation von MSC beim GBM und zur Etablierung innovativer Therapieverfahren leisten konnten.

Würdigung der Förderung durch die Anni-Hofmann-Stiftung:

Den hervorragenden Beitrag der Anni-Hofmann Stiftung zur präklinischen neuroonkologischen Forschung konnten wir nun auch in einer Publikation herausstellen:

Albrecht V, Richter A, Pfeiffer S, Gebauer M, Lindner S, Gieser E, Schüller U, Schichor C, Gildehaus FJ, Bartenstein P, Tonn JC, Skerra A, Glass R. Anticalins directed against the fibronectin extra domain B (ED-B) as diagnostic tracers for glioblastomas: *Int. J. Cancer: in press*. **Acknowledgements:** Funding by the Anni-Hofmann Stiftung (for RG) is gratefully acknowledged.

Referenzen

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York and London: Garland Science).
- Caplan, A.I., and Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* 9, 11-15.
- Cooper, L.A., Gutman, D.A., Chisolm, C., Appin, C., Kong, J., Rong, Y., Kurc, T., Van Meir, E.G., Saltz, J.H., Moreno, C.S., *et al.* (2012). The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *The American journal of pathology* 180, 2108-2119.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Glass, R., and Synowitz, M. (2014). CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta neuropathologica* 128, 347-362.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Jordan, C.T. (2009). Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell stem cell* 4, 203-205.
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *The New England journal of medicine* 355, 1253-1261.

- Kong, B.H., Shin, H.D., Kim, S.H., Mok, H.S., Shim, J.K., Lee, J.H., Shin, H.J., Huh, Y.M., Kim, E.H., Park, E.K., *et al.* (2013). Increased in vivo angiogenic effect of glioma stromal mesenchymal stem-like cells on glioma cancer stem cells from patients with glioblastoma. *International journal of oncology* 42, 1754-1762.
- Kreth, F.W., Thon, N., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Nikkhah, G., Hentschel, B., Reifenberger, G., Pietsch, T., Weller, M., *et al.* (2013). Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24, 3117-3123.
- Motaln, H., Gruden, K., Hren, M., Schichor, C., Primon, M., Rotter, A., and Lah, T.T. (2012). Human Mesenchymal Stem Cells Exploit the Immune Response Mediating Chemokines to Impact the Phenotype of Glioblastoma. *Cell transplantation*.
- Schichor, C., Albrecht, V., Korte, B., Buchner, A., Riesenberger, R., Mysliwicz, J., Paron, I., Motaln, H., Turnsek, T.L., Jurchott, K., *et al.* (2012). Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Experimental neurology* 234, 208-219.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822-829.
- Stupp, R., van den Bent, M.J., and Hegi, M.E. (2005). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports* 5, 198-206.
- Westphal, M., and Lamszus, K. (2011). The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12, 495-508.