

Distinkte Populationen von Tumorstammzellen determinieren
das Tumorwachstum und die metastatische Aktivität im
humanen Pankreaskarzinom

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Patrick Christian Hermann

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der Ludwig-
Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch

**Distinkte Populationen von Tumorstammzellen determinieren
das Tumorwachstum und die metastatische Aktivität im
humanen Pankreaskarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Patrick Christian Hermann

aus

München

Jahr

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christopher Heeschen

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Thomas Mussack

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Marion Subklewe

Prof. Dr. Josef Mueller-Hoecker

Dekan:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2009

**To my loving family,
especially my mother.**

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	8
3. Materialien und Methoden	10
3.1 Humane Pankreaskarzinomzellen und Kulturbedingungen	10
3.2 Prospektive Isolation der möglichen CSCs	11
3.3 Antikörper	11
3.4 Migrationsassay	12
3.5 Zellzyklusanalyse	12
3.6 Tiermodell und orthotope Implantation der Tumorzellen	12
3.7 Histologische Auswertung	13
4. Ergebnisse:	14
4.1 Identifikation und Charakterisierung humaner Pankreas-CSCs	14
4.2 In vitro Expansion von humanen Pankreas-CSCs	23
4.3 Resistenz humaner Pankreas-CSCs gegenüber Standard-Chemotherapie	26
4.4 Rolle der humanen Pankreas-CSCs in der Metastasierung von Tumoren	29
5. Diskussion	36
6. Literaturverzeichnis	40
Curriculum Vitae	Error! Bookmark not defined.

1. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist weltweit zurzeit die vierthäufigste krebisbedingte Todesursache. Stammzellen wurden zwar bereits mit dem Wachstum von Pankreastumoren in Verbindung gebracht, aber die genaue Rolle dieser Tumorstammzellen in der Tumorbologie und insbesondere ihre Rolle bei der Metastasierung ist nach wie vor unbekannt.

Wir konnten zeigen, dass humane Pankreaskarzinome solche Tumorstammzellen enthalten, die CD133 exprimieren, und alleine tumorigen, sowie hochresistent gegen Standard-Chemotherapie sind. Im Bereich der invasiven Front von Pankreastumoren konnte eine distinkte Subpopulation von CD133⁺ CXCR4⁺ Tumorstammzellen identifiziert werden, die den metastatischen Phänotyp des individuellen Tumors determiniert. Durch die Depletion der Tumorstammzellen für diese migratorischen Tumorstammzellen konnte der metastatische Phänotyp der Pankreastumoren praktisch aufgehoben werden, hatte jedoch keinen Einfluss auf deren tumorigenes Potenzial.

Zusammenfassend zeigen wir, dass eine Subpopulation migratorischer CD133⁺ CXCR4⁺ Tumorstammzellen von essentieller Bedeutung für die Metastasierung von Tumoren ist. Somit könnten Strategien, die modulierend in die SDF-1/CXCR4 Achse eingreifen, wichtige klinische Anwendungen zur Inhibition der Metastasierung von Tumorstammzellen hervorbringen.

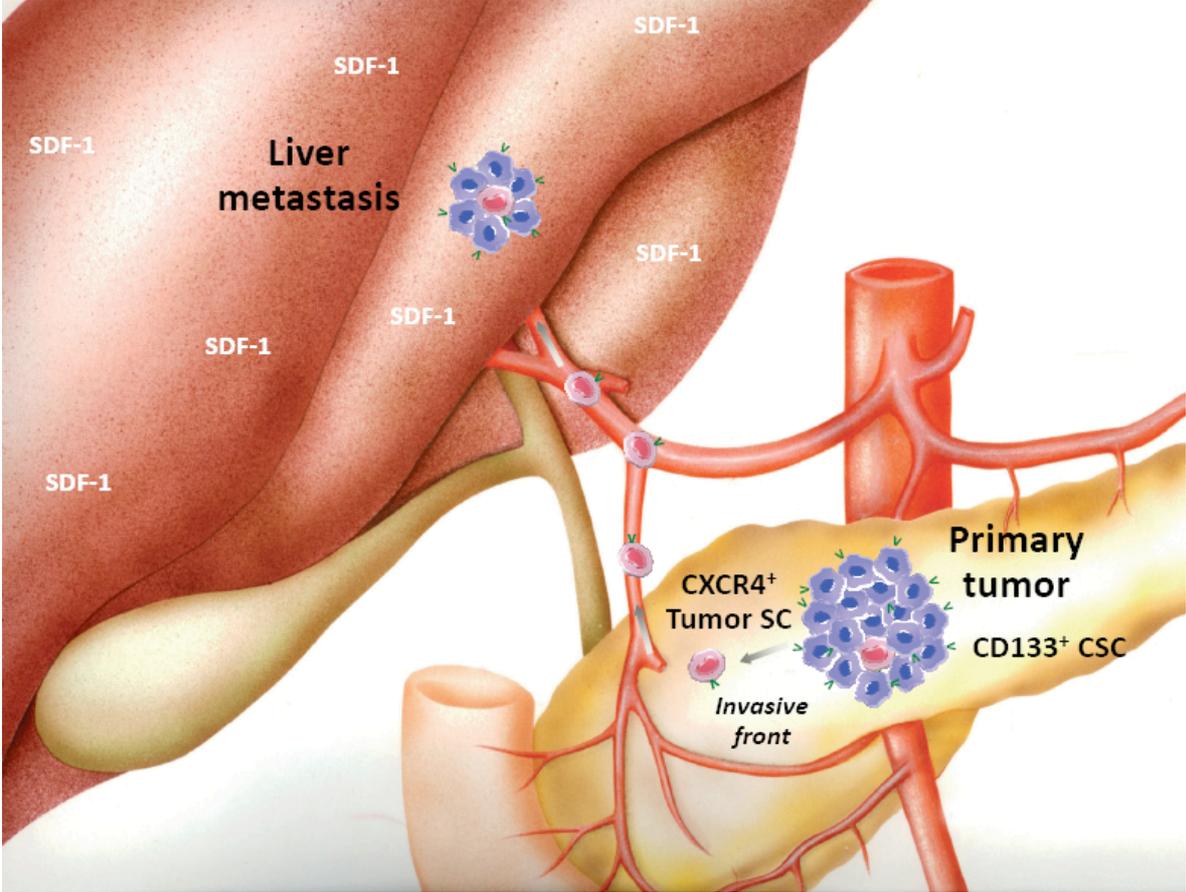
2. Einleitung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist weltweit zurzeit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache. Die Sterberate liegt aufgrund der hohen Metastasierungsrate und durch die ausgeprägte Resistenz der Tumoren gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie bei fast 100%. Trotz zunehmender Fortschritte in der Tumorbiologie ist die Effizienz der Behandlung von Pankreaskarzinomen nicht signifikant gestiegen. Obwohl die First-Line-Therapie Gemcitabine durch Reduktion von Schmerzen und durch Gewichtszunahme zu einer klinischen Verbesserung geführt hat (Matano et al., 2000), bleibt die Prognose äußerst schlecht mit einer 5 Jahres-Überlebens-Rate von 1%-4% und einer medianen Überlebenszeit von 4-6 Monaten (Ahlgren et al., 1996; Jemal et al., 2004; Rosenberg et al., 1997, Rothenberg et al., 1996; Warshaw and Fernandez-Castillo et al., 1992).

Erst seit kurzer Zeit gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass Stammzellen nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Entstehung komplexer mutizellulärer Organismen, sondern auch bei der Entwicklung und Progression von Tumoren spielen (Clarke et al., 2006; Jordan et al., 2006). Zellen mit Stammzell-Eigenschaften könnten also einen integralen Bestandteil in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung verschiedener Krebsarten beim Menschen darstellen (Al-Hajj et al., 2003; Kim et al., 2005; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004). Die gültige Definition beschreibt eine Tumorstammzelle (Cancer Stem Cell, CSC) als eine Zelle innerhalb eines Tumors, die in der Lage ist sich selbst zu erneuern und die heterogenen Zellarten, aus denen ein Tumor besteht, zu produzieren (Clarke et al., 2006). Die Anwendung dieses Konzepts erklärt auch den Gebrauch alternativer Bezeichnungen in der Literatur wie „tumorinitiierende Zelle (tumor-initiating cell)“ und „tumorigene Zelle (tumorigenic cell)“, um mutmaßliche CSCs zu beschreiben (Al-Hajj et al., 2003; Kim et al., 2005; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004).

Allerdings sollten CSCs nicht nur mit der Tumorinitiation und dem Tumorwachstum in Verbindung gebracht werden, sie könnten darüber hinaus auch eine entscheidende Rolle in der Metastasierung von Tumoren spielen. Wenn CSCs die einzige Zellpopulation mit der Fähigkeit zur Tumorinitiation darstellen, könnte man vermuten, dass ausschließlich CSCs zur Erzeugung von Metastasen in der Lage sind. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten wir zeigen, dass CSCs im

Pankreaskarzinom nicht nur eine exklusive Tumorigenität aufweisen, sondern insbesondere eine distinkte Subpopulation von migrierenden CSCs das metastatische Potential eines Pankreaskarzinoms definieren.



Bedeutung der Pankreas-Tumorstammzellen bei Tumorwachstum und Metastasierung (aus Hermann et al. 2008)

3. Materialien und Methoden

3.1 Humane Pankreaskarzinomzellen und Kulturbedingungen

Wir verwendeten eine hochmetastatische Zelllinie (L3.6pl), die durch fortlaufende Selektionszyklen in Nacktmäusen isoliert wurde (Bruns et al., 1999). Die ursprüngliche COLO 357 humane Pankreaskarzinomzelllinie, die aus der coeliacalen Lymphknotenmetastase eines differenzierten, mucinhaltigen Pankreaskarzinoms etabliert wurde, wurde in die Milz von Nacktmäusen injiziert um Lebermetastasen (L3.3 Linie) zu initiieren, und anschließend zu isolieren. Anschließend wurden die L3.3 Zellen orthotop in das Pankreas von athymischen Mäusen implantiert, Lebermetastasen isoliert, und als L3.4pl (pancreas-liver) bezeichnet. Nach zwei weiteren orthotopen Injektions-Selektionszyklen wurden die L3.6pl Zellen isoliert, die mit einer deutlich höheren Inzidenz zu Lebermetastasen führten als die ursprünglichen COLO 357 Zellen (hier: FG Zellen). Die verwendeten Tumorzellen wurden in DMEM Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit folgenden Zusätzen gehalten: 12% fetales Rinderserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), Glutamax (Invitrogen), Natrium Pyruvat, nichtessentielle Aminosäuren und ein Penicillin-Streptomycin-Mix (alle: PAN, Aidenbach, Deutschland). Adhärenz Monolayer-Kulturen wurden in Plastikflaschen (Nunc, Langenselbold, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und weniger als 6 Wochen nach dem Auftauen kultiviert.

Um die CSC-Fraktion der Tumorzellen zu vermehren, wurden Kulturbedingungen gewählt, die die Proliferation undifferenzierter Zellen begünstigen. Um die Adhäsion, und die resultierende Differenzierung der CSCs zu vermeiden, wurden die Zellen wie vorbeschrieben als hängende Tropfen bei einer Konzentration von 10³ Zellen in 25µl Medium (Denham et al., 2006) für mindestens 14 Tage bis zur Bildung von Spheres kultiviert. Hierzu wurde ein NS-A serum-freies Basalmedium (Euroclone, Irving, UK) mit 2mM L-Glutamin, 0,6% Glukose, 9,6 µg/ml Putreszin, 6,3 ng/ml Progesteron, 5,2 ng/ml Natriumselenit, 0,025 mg/ml Insulin, 0,1mg/ml Transferrin Natriumsalz (alle Sigma, St Louis, MO, USA), und 10 ng/ml FGF-2 (Peprotech EC, London, UK). Kulturen differenzierter Tumorzellen wurden nach Entfernung der Wachstumsfaktoren und Zugabe von 5% FCS gewonnen und für 7 Tage kultiviert.

3.2 Prospektive Isolation der möglichen CSCs

Die CSCs wurden durch magnetic bead sorting mithilfe eines MidiMACS Systems (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) isoliert. Zu diesem Zweck wurden Einzelzellsuspensionen solider Tumoren durch mechanische Dissoziation und einstündiger Inkubation mit Kollagenase Typ IV (Sigma) bei kontinuierlicher Rotation hergestellt. In anderen Experimenten wurden die kultivierten Tumorzellen trypsiniert, gewaschen und in PBS (Invitrogen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem MicroBead beladenen monoklonalen CD133 Antikörper (Miltenyi) 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Die CD133⁺ Zellen wurden mittels eines MidiMACS Magneten und MS-Säulen (Miltenyi) angereichert. Alle MACS Prozeduren wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie mit einem APC-markierten Antikörper gegen humanes CD133/2 (Klon 293C3) analysiert; sie betrug im Durchschnitt über 90%. Für Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurden die Zellen mit einem CD133-APC Antikörper markiert und an einem modularen MoFlo Gerät mit Summit Software sortiert (Zellsortierservice, Institut für Molekulare Immunologie am Helmholtz-Zentrum München).

3.3 Antikörper

Um Pankreas-CSC zu charakterisieren, wurden folgende Antikörper verwendet: Anti-CD133/1-APC (Klon AC133) zur Zellisolation und -charakterisierung und Anti-CD133/2-APC (Klon 293C3; beide von Miltenyi) zur Evaluation der Reinheit der isolierten Zellen; Anti-c-Met-FITC, Anti-CD24-FITC, Anti-CD31-PE, oder Anti-CD44-PE (alle von ebiosciences, San Diego, CA, USA); Anti-CD45-PE, Anti-Zytokeratin [5, 6, 8, 17, 19]-FITC (beide von Dako, Hamburg, Deutschland); Anti-CXCR4-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); Anti-ESA-APC (biomeda, Foster City, CA, USA); oder entsprechende Isotyp-Kontrollantikörper. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie an einem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), analysiert und die Daten mittels CELLQuest Pro Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

3.4 Migrationsassay

Insgesamt 5×10^3 isolierte Tumorzellen wurden in 250 ml DMEM mit 1% FCS resuspendiert und im oberen Teil einer modifizierten Boyden Chamber mit Matrigel (BioCoat invasion Assay, 8mm Porengröße, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, MA, USA) ausgebracht. Die obere Kammer wurde in einer 24-well Kulturschale mit 500 µl des oben beschriebenen Mediums mit Zusatz von 100 ng/ml SDF-1 (PeproTech EC) platziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C wurden die transmigrierten Zellen gesammelt und mithilfe einer Neubauerkammer gezählt.

3.5 Zellzyklusanalyse

L3.6pl Zellen wurden unter den oben angegebenen Normalbedingungen kultiviert. Gemcitabine wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml für 24 h zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 2 h mit BrdU (BD) gepulst. In einigen Experimenten wurde das Medium mit Gemcitabine Medium nach 24 Stunden durch Standardkulturmedium ersetzt, und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Zellzyklusanalyse wurde mit einem BrdU Flow Cytometry Kit (BD) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.6 Tiermodell und orthotope Implantation der Tumorzellen

Athymische 8 bis 10 Wochen alte Mäuse (NMRI-nu/nu) wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) gekauft und unter speziellen apathogenen Bedingungen in Umluftkäfigen gemäß der Vorschriften der Regierung von Oberbayern gehalten. Entsprechend den Richtlinien des Institutes wurden Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Zur Erzeugung orthotoper Tumore wurden Suspensionen von Einzelzellen mit >90% Viabilität in das Pankreas injiziert, wie bereits beschrieben (Bruns et al., 1999). Die Größe und das Gewicht der primären Pankreaskarzinome, die Inzidenz regionaler (zoeliakal und para-aortal) Lymphknotenmetastasen, sowie die Anzahl der Lebermetastasen wurden dokumentiert. Das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms wurde histopathologisch bestätigt. In einigen Experimenten wurden die Tiere 7 Tage nach der Implantation der Tumorzellen in das Pankreas jeweils einer Behandlungsgruppe zugewiesen, in der sie 21 Tage lang 2x wöchentlich

Injektionen mit Gemcitabine intraperitoneal in einer Dosierung von 125 mg/kg oder nur die Trägersubstanz erhielten.

3.7 Histologische Auswertung

Zur histologischen Analyse der Tumoren wurde jeweils ein Teil des Gewebes in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Ein weiterer Teil wurde in O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) eingebettet, gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Lebermetastasen wurden nach einer Färbung der Leberschnitte für Zytokeratin 5, 6, 8, 17, 19 (Dako) und Hämalun (Sigma) gezählt. Zum Nachweis der CSCs wurden Doppelfärbungen mit einem APC-markierten monoklonalen CD133 Antikörper (Miltenyi) und mit Antikörpern entweder gegen Zytokeratin oder gegen CXCR4 durchgeführt. Zellkerne wurden durch DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) identifiziert. Die Häufigkeit der CSCs wurde als die Anzahl der CD133⁺ Zellen pro Mikroskop-Sichtfeld definiert. Alle Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 Meta konfokalen Lasermikroskop aufgenommen.

4. Ergebnisse:

4.1 Identifikation und Charakterisierung humaner Pankreas-CSCs

Unser erstes Ziel war es, Pankreas-CSCs in Gewebeproben von humanen Patienten mit einem Pankreaskarzinom zu identifizieren.

Pat #	Date of birth	Diagnosis	Preop. chemo	Staging	CD133 content	CXCR4 content
81	Nov 7, 1935	head & corpus adeno ca	No	pT3, pN1 (1/21 LK), pM0, G3, R1	2.32	26.9
84	Dec 5, 1952	head adeno ca	No	pT3, pN1 (1/16 LK), cM0, G3, R0	1.56	12.1
91	Feb 20, 1935	head & corpus anapl. ca	No	pT3, pN0 (0/12 LK), pM0, G4, R0	1.09	n.a.
92	Jul 6, 1942	head adeno ca	No	pT2, pN1 (7/23 LK), cM0, G3, R0	3.21	25.7
95	Jul 11, 1939	head adeno ca	No	pT4, pN1 (3/9 LK), cM0, G3, R2	n.a.	n.a.
101	Dec 18, 1938	head low diff. ca	No	PT3, PN0 (0/11 LK) pMx, G3, R0	1.45	12.1
103	Nov 3, 1955	head low diff. ca	No	pT3, pN0 (0/10 LK), pM0, G3, R1	0.68	9.5
107	Jan 21, 1938	head adeno ca	No	pT4, pN1 (4/10 LK), cM0, G3, R1	2.58	16.8
108	Jul 2, 1932	ductal adeno ca	No	pT3, pN 0 (0/29 LK), pMx, G2, R0	n.a.	n.a.
111	Nov 17, 1931	tail adeno ca	No	pT3, pN0 (0/5 LK), pM0, G3, R0	1.07	9.2
122	Mar 5, 1937	head adeno ca	No	pT3, pN1 (3/7 LK), cM0, G3, R0	1.87	15.2
Mean	64.7±8.8 y				1.8±0.8	15.9±6.9

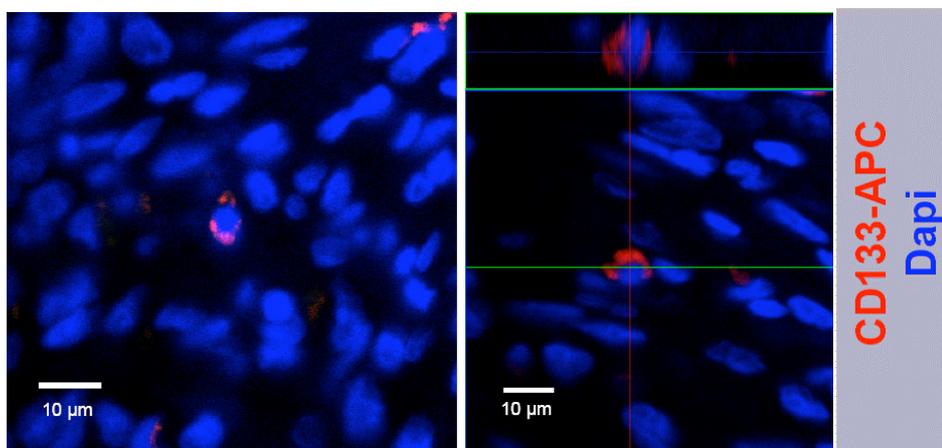
Pat = patient, y = years, ca = carcinoma, anapl. = anaplastic

CD133 content = percentage of CD133⁺ cells relative to the total number of tumor cells

CXCR4 content = percentage of CD133⁺ cells expressing CXCR4

Tab. 1: Charakteristika der untersuchten Patienten

Die CSCs wurden durch den Oberflächenmarker CD133 identifiziert, der auf normalen und auf malignen Stammzellen des neuralen, hämatopoetischen, epithelialen und endothelialen Systems exprimiert wird (Fargeas et al., 2003; Yin et al., 1997). Mittels Durchflusszytometrie konnte eine seltene CSC Population nachgewiesen werden. Die histologische Analyse zeigte, dass CD133⁺ CSCs in der Haupttumormasse lokalisiert waren (Abb. 1A).



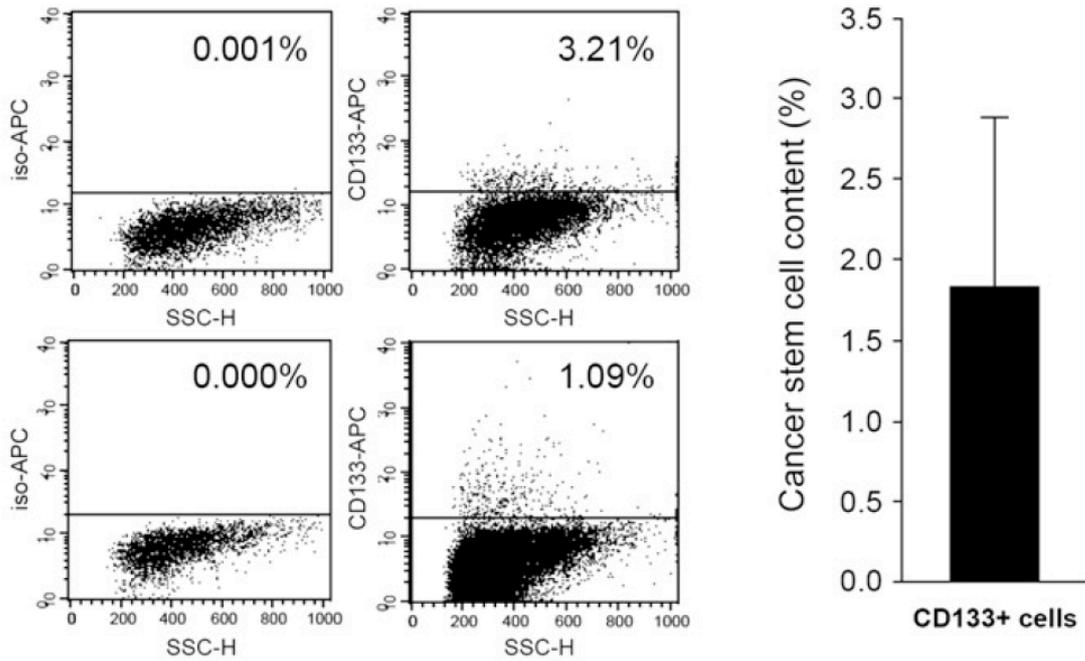


Abb. 1A: Um die Zahl der CD133⁺ Zellen zu messen, wurden verdaute Gewebeproben entweder für CD133 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert, oder Paraffinschnitte wurden für CD133 (rot) und Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Repräsentative Ergebnisse der Primärtumoren zweier Patienten sind abgebildet für Durchflusszytometrie (links) und Histologie (oben). Die Quantifizierung (n=5 untersuchte Patienten) der durchflusszytometrischen Daten ist unten rechts, eine dreidimensionale Rekonstruktion des histologischen Schnittes ist rechts oben abgebildet.

Um die CD133⁺ Zellen in der invasiven Grenzzone der Gewebeproben genauer zu untersuchen, analysierten wir die invasive Front in seriellen Tumorschnitten durch eine Zytokeratinfärbung. Die invasive Front enthält charakteristischerweise disseminierte Zytokeratin-positive Tumorzellen (Abb. 1B).

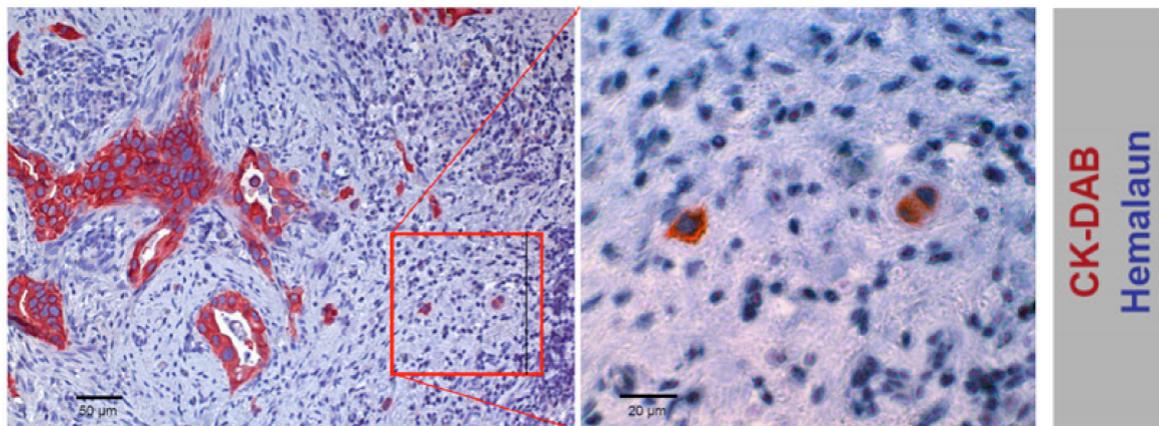


Abb. 1B: Immunohistochemische Färbung für den epithelialen Marker Zytokeratin (dunkelrot) und Gegenfärbung mit Hämalaun zeigt die invasive Front in einem Patienten mit

Pankreaskarzinom. Einzelne Zytokeratin-positive Zellen sind rechts in hoher Vergrößerung dargestellt.

In allen sieben Gewebeproben der Pankreaskarzinompatienten konnten reproduzierbar diese CD133⁺ Zellen in diesen Gebieten mit histologischem Nachweis für Zelldissemination gezeigt werden (Abb. 1C).

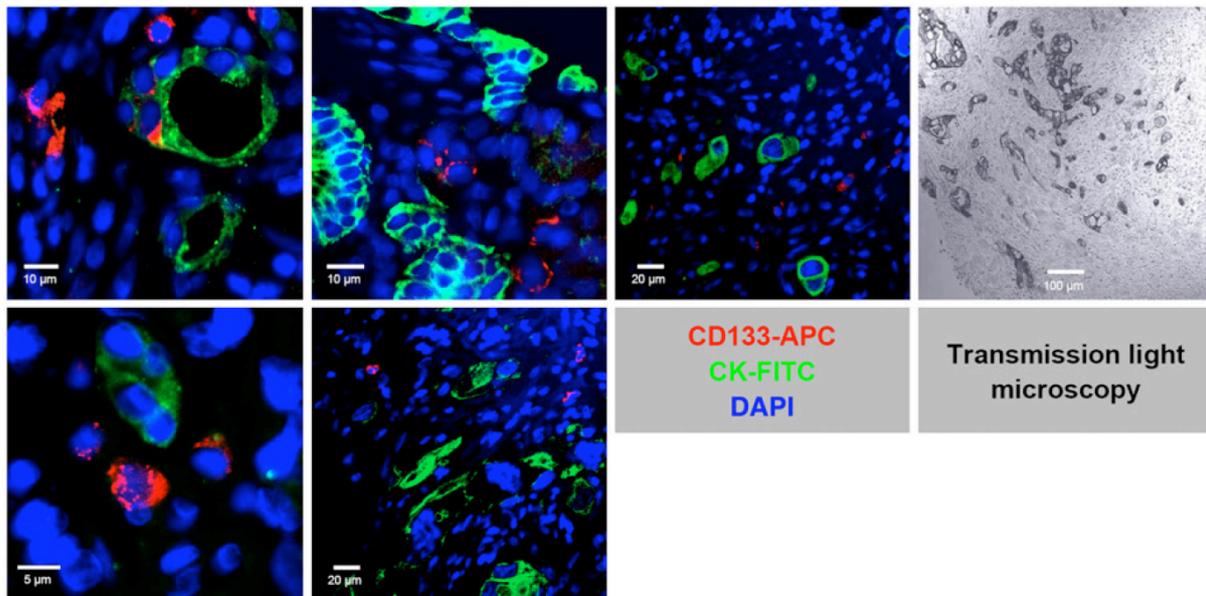


Abb. 1C: Ein Überblick über den analysierten Schnitt wurde mittels Durchlichtmikroskopie gewonnen. Detaillierte Analyse von CSCs in dieser repräsentativen invasiven Front: Eine Doppelfärbung für Zytokeratin (grün) und CD133 (rot) zeigt eine große Anzahl von CD133⁺ Zellen in der Grenzzone des Tumors, die kaum in Strukturen mit epithelialer Differenzierung, sondern als Einzelzellen im infiltrierten Stromagewebe nachweisbar sind.

In Patientengewebe konnte ebenfalls ein klonales Wachstum CD133 positiver Tumorstammzellen (s.u.) nachgewiesen werden.

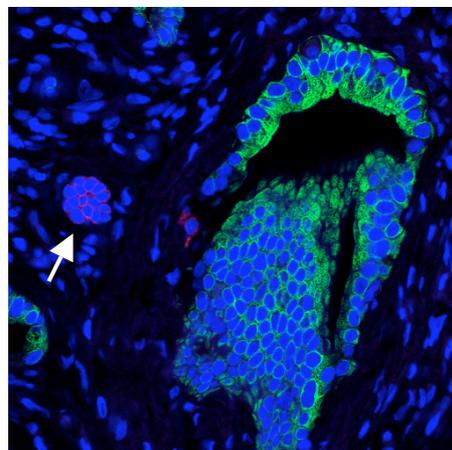


Abb. 1D: Klonales *in vivo* Wachstum CD133 positiver Zellen (rot).

Die CD133⁺ Zellen wurden oft in direkter Nähe zu differenzierteren Epithelzellen gefunden, zeigten selbst jedoch keine Expression des epithelialen Markers Zytokeratin (Moll et al., 1998). Im Gegensatz hierzu war die CD133 Expression in gesunden Pankreasgeweben äußerst selten (kaum nachweisbar in extensiven Analysen histologischer Schnitte mit durchschnittlich 0.27 ± 0.52 Zellen pro Gesichtsfeld [= 0.021 mm²] im Vergleich zu Tumorgewebe (3.60 ± 2.58 Zellen pro Gesichtsfeld) (Abb. 1E).

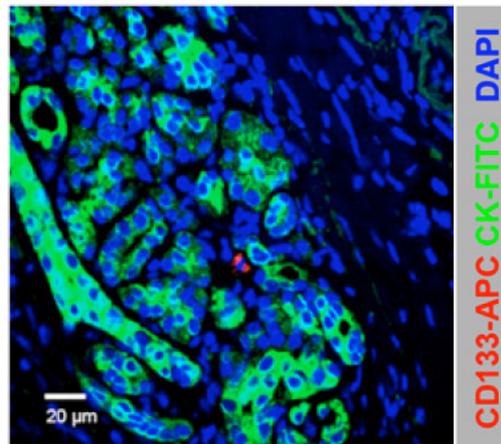


Abb. 1E: Normales Pankreasgewebe enthält sehr wenige CD133⁺ Zellen. Eine Doppelfärbung für CD133 (rot) und Zytokeratin (grün) zeigte eine Stammzelle nur in jedem dritten Gesichtsfeld.

Die höhere Anzahl von CD133⁺ Zellen in Tumorgewebe resultiert am wahrscheinlichsten aus ihrer onkogenen Transformation. Disseminierte Tumorzellen spielen eine essentielle Rolle in der Tumormetastasierung, und migrierende CSCs könnten eine spezifische CSC-Unterart darstellen. Da stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) ein wichtiger Mediator bei der Migration von Zellen ist, untersuchten wir die Expression des spezifischen Rezeptors CXCR4 bei CSCs.

Tatsächlich zeigten Doppelfärbungen für CXCR4, dass CD133⁺ Zellen in der invasiven Front stark CXCR4 exprimieren, während eine CXCR4 Expression auf CD133⁺ Zellen im Bereich des Haupttumors kaum nachweisbar war (Abb. 1F). Diese Ergebnisse suggerieren bereits eine mögliche Rolle der CXCR4⁺ CSCs bei der Dissemination von Tumoren.

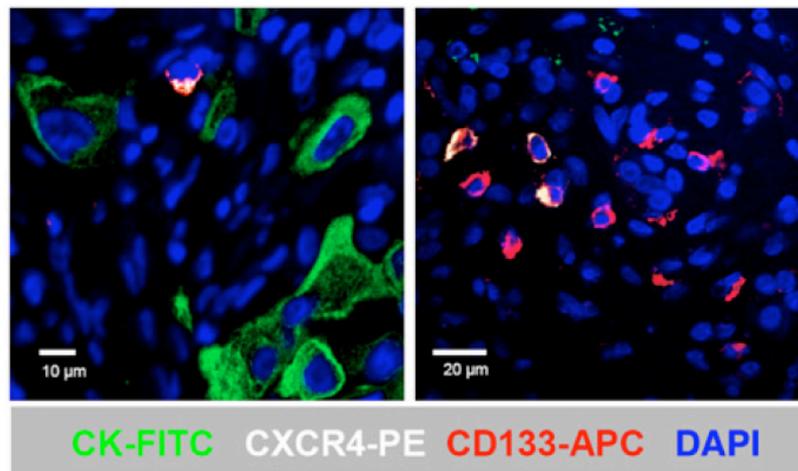


Abb. 1F: Eine Dreifachfärbung für CD133 (rot), CXCR4 (weiß), und Zytokeratin (grün) identifiziert eine distinkte CSC-Subpopulation in der invasiven Front.

In einem weiteren Schritt untersuchten wir das tumorigene Potential von isolierten CD133⁺ Pankreas-CSCs, bzw. die Fähigkeit von aus Tumoren gewonnenen CD133⁺ und CD133⁻ Zellen, orthotop anzuwachsen und Pankreastumoren in athymischen Mäusen hervorzurufen. CD133⁺ CSCs wurden durch Zellisolation mit magnetischen Antikörpern (magnetic bead sorting) isoliert, was zu einer deutlichen Anreicherung von CD133⁺ Zellen (Reinheit > 90%) und, noch wichtiger, einer hocheffizienten Negativselektion (Reinheit > 99.8%) von CD133⁻ Zellen führte (Abb. 2A).

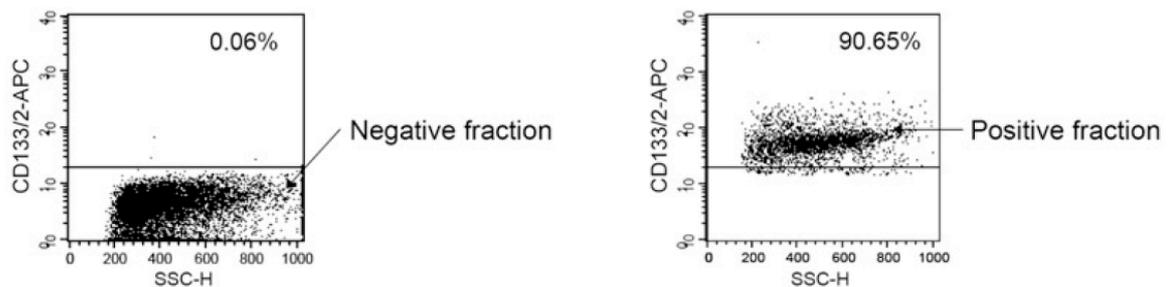


Abb. 2A: CD133⁺ Zellen wurden aus frisch resezierten Tumoren durch magnetic bead sorting mit dem CD133/1 Antikörper isoliert und anschließend mit dem CD133/2 Antikörper gefärbt und mit Durchflusszytometrie analysiert. Dies ergab eine exzellente Depletion für CD133⁺ CSCs in der negativen Fraktion (links), sowie eine hohe Anreicherung für CD133⁺ CSCs in der positiven Fraktion (rechts).

Eine potentielle Kontamination der CD133⁺ Zellpopulation durch hämatopoetische oder endotheliale Progenitorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie ausgeschlossen. Die CD133⁺ Zellen exprimierten nur selten panhämatopoetischen Marker CD45 (<0.5%), und weniger als 2% waren CD31⁺ endotheliale Progenitoren.

(Abb. 2B, links). CD133⁺ Zellen zeigten keine Expression des epithelialen Differenzierungsmarkers Zytokeratin (Abb. 2B, rechts).

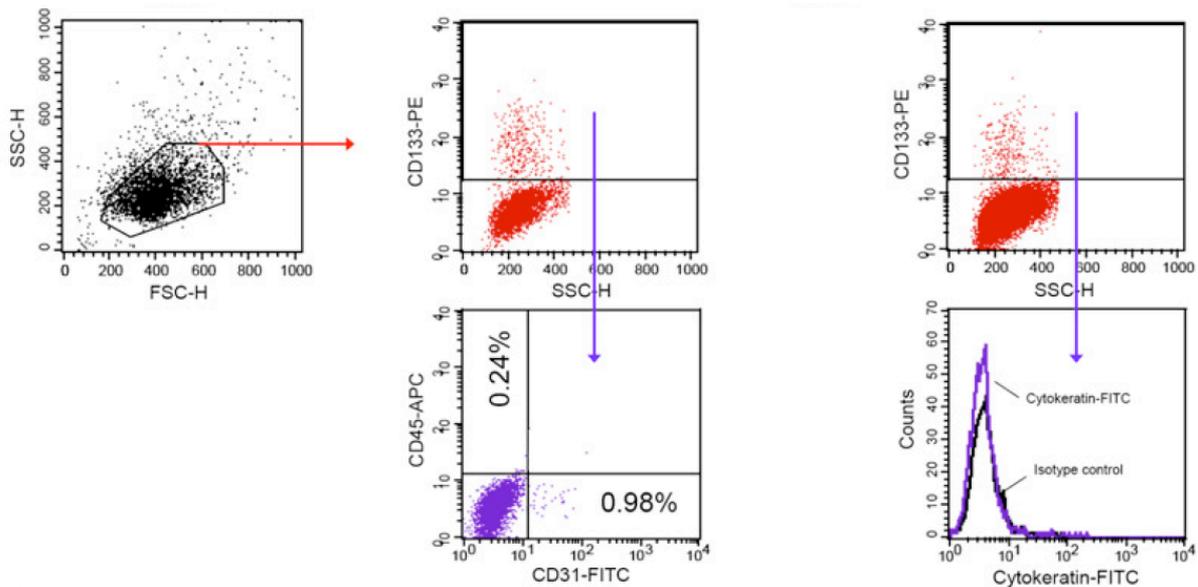


Abb. 2B: Durchflusszytometrie für den pan-endothelialen Marker CD31 und den pan-Leukozytenmarker CD45 wurde durchgeführt, um potentielle Kontamination der isolierten Zellen durch endotheliale oder hämatopoetische Progenitoren zu detektieren (links). Zytokeratinexpression war in CSCs nicht nachweisbar (rechts). Die Experimente wurden jeweils zweimal durchgeführt.

In einem murinen Pankreaskarzinommodell konnten selbst 10^6 CD133⁻ aus Patienten gewonnene Pankreaskarzinomzellen keinen Tumor induzieren. Im Gegenteil dazu generierten 10^6 ungetrennte, bzw. nur 5×10^2 CD133⁺ in Matrigel resuspendierte Zellen sichtbare Tumoren innerhalb von 3 Wochen (Abb. 2C).

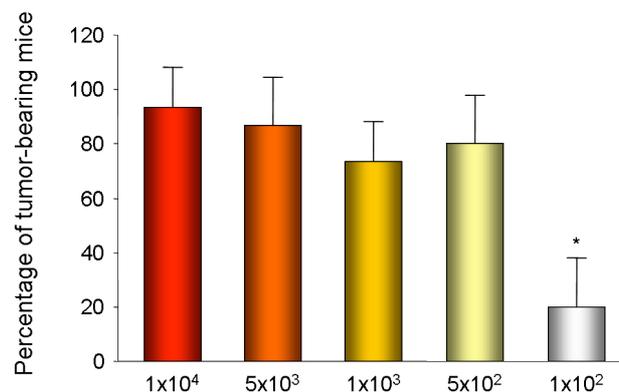


Abb. 2C: Ansteigende Konzentrationen frisch isolierter humaner CD133⁺ Pankreaskarzinomzellen wurden orthotop in athymische NMRI nu/nu Mäuse implantiert. Ein Minimum von 5×10^2 Zellen ist notwendig um in mindestens 50% der Tiere einen Tumor zu induzieren.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Zellen, die in der Lage sind ein Pankreaskarzinom hervorzurufen, eine hoch angereicherte CD133⁺ Zellpopulation enthalten. Trotz der höheren Anzahl von CD133⁺ Zellen in 10⁶ ungetrennten Zellen (durchschnittlich 1.8 x 10⁴ Zellen), war interessanterweise die Tumorformation nach der Injektion von aufgereinigten CD133⁺ Zellen schneller und effizienter als die Tumorformation mit der Gesamtpopulation der Pankreskarzinomzellen (Abb. 2D).

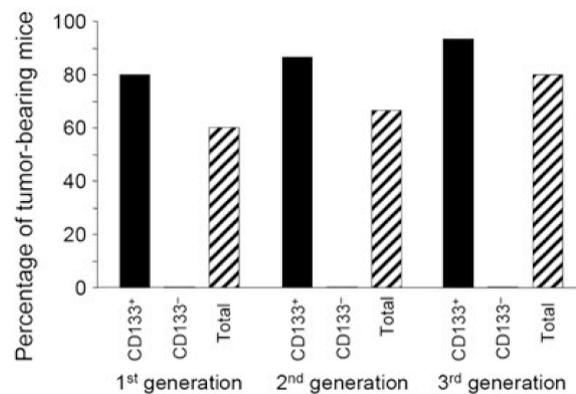


Abb. 2D: Nach einer MACS Isolation der Pankreaskarzinomzellen der ersten Generation implantierten wir orthotop CD133⁺, CD133⁻, oder die unfraktionierten Zellen in das Pankreas von NMRI nu/nu Mäusen. Nur CD133⁺ und die gesamte Tumorzellpopulation waren in der Lage, eine Tumorbildung zu induzieren. Die Isolation von Tumorzellen der zweiten und dritten Generation aus den transplantierten Mäusen zeigte ähnlich Ergebnisse (n = 7 analysierte Patienten; Experimente wurden jeweils 3 x durchgeführt).

Wir beobachteten eine enge Korrelation zwischen dem Anteil der durchflusszytometrisch gemessenen CD133⁺ Zellen im Primärtumor und der Tumorigenität der unfraktionierten Zellen (r = 0.92; p < 0.05) (Abb. 2E).

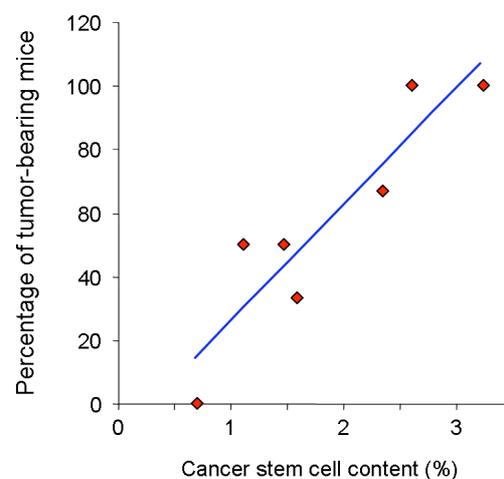


Abb. 2E: Der CSC-Gehalt als Prozentsatz CD133⁺ Tumorzellen ist aufgetragen gegen das tumorigene Potential unfraktionierter Tumorzellen (Prozentsatz der Mäuse, die nach der orthotopen Implantation von 10⁶ frisch isolierten Zellen einen Tumor entwickelten (n=7

analysierte Patientenproben). Jede Patientenprobe wurde in mindestens drei Mäuse implantiert.

Außerdem konnte durch immunhistochemische und mikroskopische Analyse gezeigt werden, dass aus CD133⁺ Zellen entstandene Tumor-Xenografts auf histologischem Level durchwegs den Primärtumor reproduzieren konnten (Abb. 2F). Somit ist die tumorigene Population im Pankreaskarzinom auf CD133⁺ Zellen beschränkt, die den originalen Tumor in toleranten Empfängern reproduzieren können.

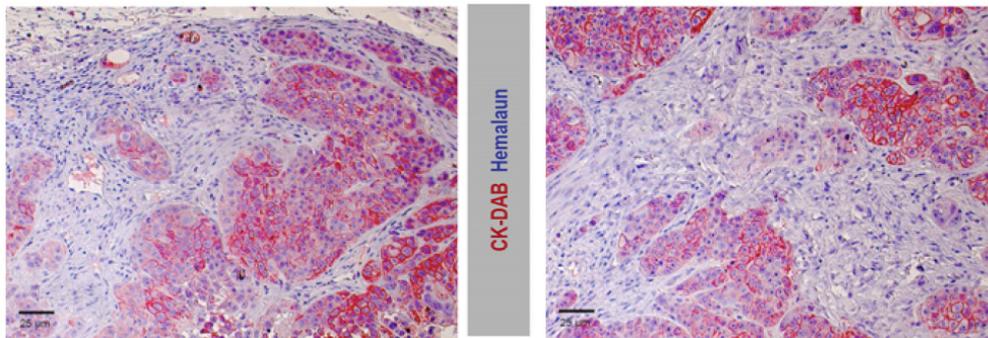


Abb. 2F: Histologische Analyse von Tumoren der ersten (links) und der dritten Generation (rechts) mittels Zytokeratin- und Hämalaunfärbung zeigte, dass - obwohl die implantierten CSCs kein Zytokeratin exprimierten - die entstehenden Tumoren Zytokeratin-positive differenzierte Tumorzellen als Tochterzellen enthalten.

Um zu erforschen, ob CD133⁺ Pankreastumorzellen langzeit-tumorigenes Potential aufweisen, untersuchten wir deren Fähigkeit, nach seriellen Transplantationen Tumoren zu generieren. Zu diesem Zweck wurden 5×10^2 CD133⁺ oder 10^6 CD133⁻ Zellen aus primären Xenografts in Mäuse re-transplantiert. Tatsächlich wuchsen die injizierten CD133⁺ Tumorzellen an und bildeten Tumoren, die schnell wuchsen und die Tötung der Maus innerhalb von 3 Wochen notwendig machte (Abb. 2D). Anschließend wurden CD133⁺ Tumorzellen, die aus CD133⁺-abgeleiteten sekundären Xenografts in Empfängermäuse der dritten Generation transplantiert. Die implantierten CSCs exprimierten kein Zytokeratin, während die entstandenen Tumoren Zytokeratin-positive differenzierte Tumorzellen als Tochterzellen enthielten (Abb. 2F). Zudem ließ sich die Tumormorphologie nicht von der von Tumoren unterscheiden, die durch unfraktionierte Zellen hervorgerufen werden. Während der in vivo Passagierung verloren CD133⁺ Zellen nicht ihr tumorigenes Potential, vielmehr nahmen sie sogar noch an Aggressivität zu, was durch schnelleres Tumorstadium gekennzeichnet war (Abb. 2G).

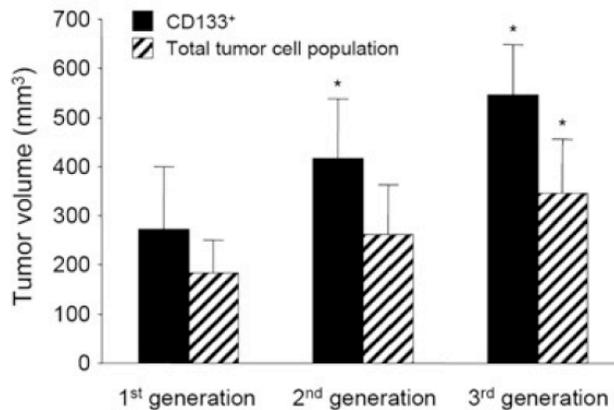


Abb. 2G: Die TumorgroÙe nahm mit späteren Generationen von Tumorzellen zu, gleichgültig ob isolierte CSCs oder die gesamte Tumorzellpopulation injiziert wurde. Die Experimente wurden mindestens 2x durchgeführt. Asteriske bedeuten $p < 0.05$ vs. erste Generation.

Dies lag nicht an einem höheren Gehalt an CD133⁺ CSCs. es könnte aber mit der in vivo Selektion einer hoch-tumorigenen Subpopulation von CD133⁺ Zellen zusammenhängen (Abb. 2H).

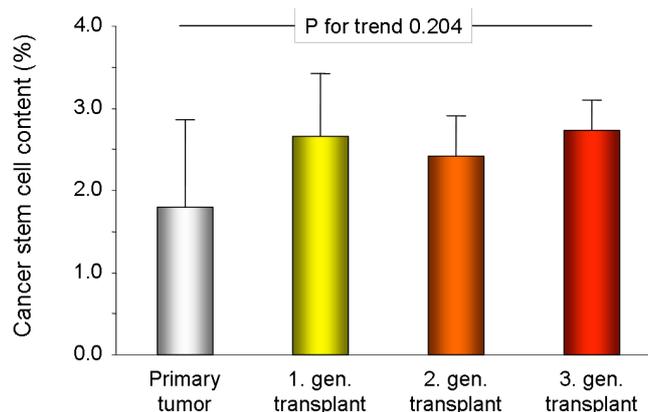


Abb. 2H: Der CSC-Gehalt in isolierten Tumoren veränderte sich nicht signifikant während der in vivo Passagen. Die Primärtumoren wurden aus Patienten gewonnen, dissoziiert und als CD133⁺ Zellen in athymen Nacktmäuse implantiert. Bei der Tötung der Tiere wurden die Tumoren wiederum dissoziiert und die CD133⁺ Zellen in primäre, sekundäre und tertiäre Empfänger implantiert.

Demnach ist die in der Tumormasse von Pankreaskarzinomen enthaltene CD133⁺ Zellpopulation in der Lage serielle Xenografts zu generieren; sie zeigt dabei ein praktisch unlimitiertes Wachstumspotential.

4.2 In vitro Expansion von humanen Pankreas-CSCs

Um die Zellbiologie von CSCs genauer studieren zu können untersuchten wir, ob humane Pankreaskarzinomzelllinien ebenfalls CSCs enthalten, welche die Eigenschaften von primären, aus Patienten gewonnenen Zellen rekapitulieren. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die hochaggressive humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl ebenfalls eine stabile Zahl von CD133⁺ CSCs enthält (Abb. 3A).

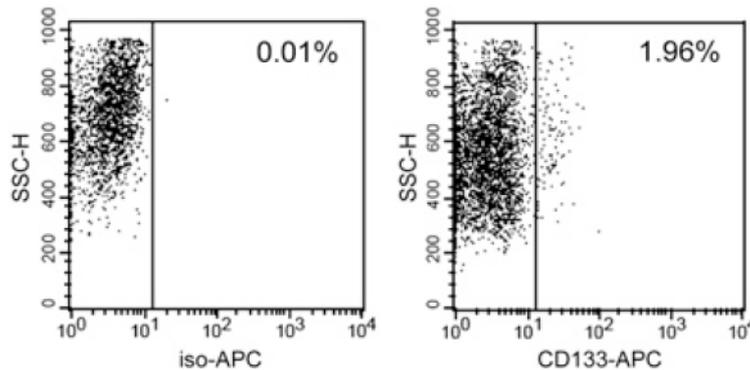


Abb. 3A: Die etablierte humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl enthält unter Standard-Kulturbedingungen ebenfalls eine distinkte Population CD133⁺ Zellen, die durchflusszytometrisch etwa 1% bis 2% der Gesamtpopulation ausmacht (rechte Abbildung). Unspezifische Bindung wurde mittels Isotypkontrollen ausgeschlossen (linke Abbildung). Die Experimente wurden 3x durchgeführt.

Eine orthotope Implantation der MACS-isolierten Zellen zeigte, dass lediglich 10³ CD133⁺ L3.6pl Zellen zu einer Tumorbildung führten (Abb. 3B), während sogar 10⁶ CD133⁻ L3.6pl Zellen dies nicht bewirken konnten.

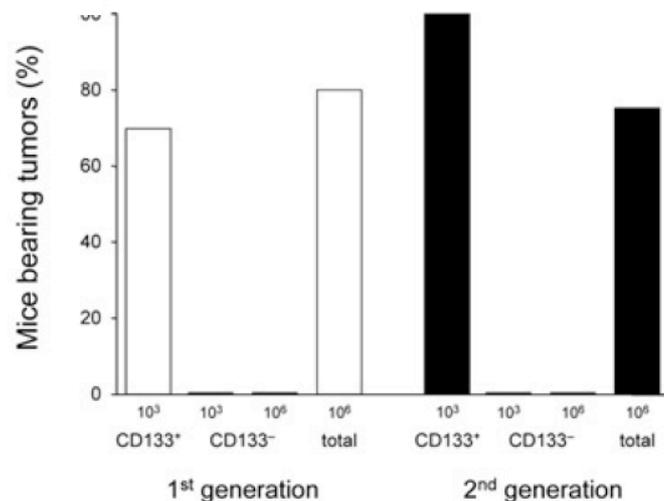


Abb. 3B: Nach MACS-Isolation von L3.6pl Zellen aus der ersten Empfängergeneration implantierten wir orthotop entweder CD133⁺ oder CD133⁻ Zellen in das Pankreas von

Mäusen. Ausschließlich CD133⁺ Zellen bzw. die gesamte Tumorzellpopulation konnten eine Tumorbildung induzieren ($n \geq 6$). Die Isolation von L3.6pl Zellen aus der zweiten Empfängergeneration ergab ähnliche Ergebnisse bei CD133⁻ Zellen (0%), verursachte jedoch eine Tumorinduktion bei allen Mäusen, die CD133⁺ Zellen erhielten ($n \geq 4$).

Die Re-Transplantation der isolierten Tumorzellen resultierte ebenfalls in einer reproduzierbaren Tumorbildung in sekundären Empfängern. Diese Ergebnisse zeigen, dass die L3.6pl Zelllinie ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Pankreas-CSCs darstellt.

Da sowohl normale als auch neoplastische Stammzellen aus neuralen und epithelialen Organen als kugelige Zellaggregate (Spheres) in Serum-freiem Medium nach Zugabe von EGF und FGF-2 expandiert werden können (Dontu et al., 2003; Singh et al., 2004), kultivierten wir die L3.6pl Pankreaskarzinomzellen unter Bedingungen (Kulturschalen mit ultra-niedriger Zelladhäsion), die die Proliferation undifferenzierter Zellen fördern. Innerhalb von 2 bis 3 Wochen erhielten wir Pankreas-CSC-Spheres aus klonal expandierten, undifferenzierten CD133⁺ Zellen (Abb. 3C).

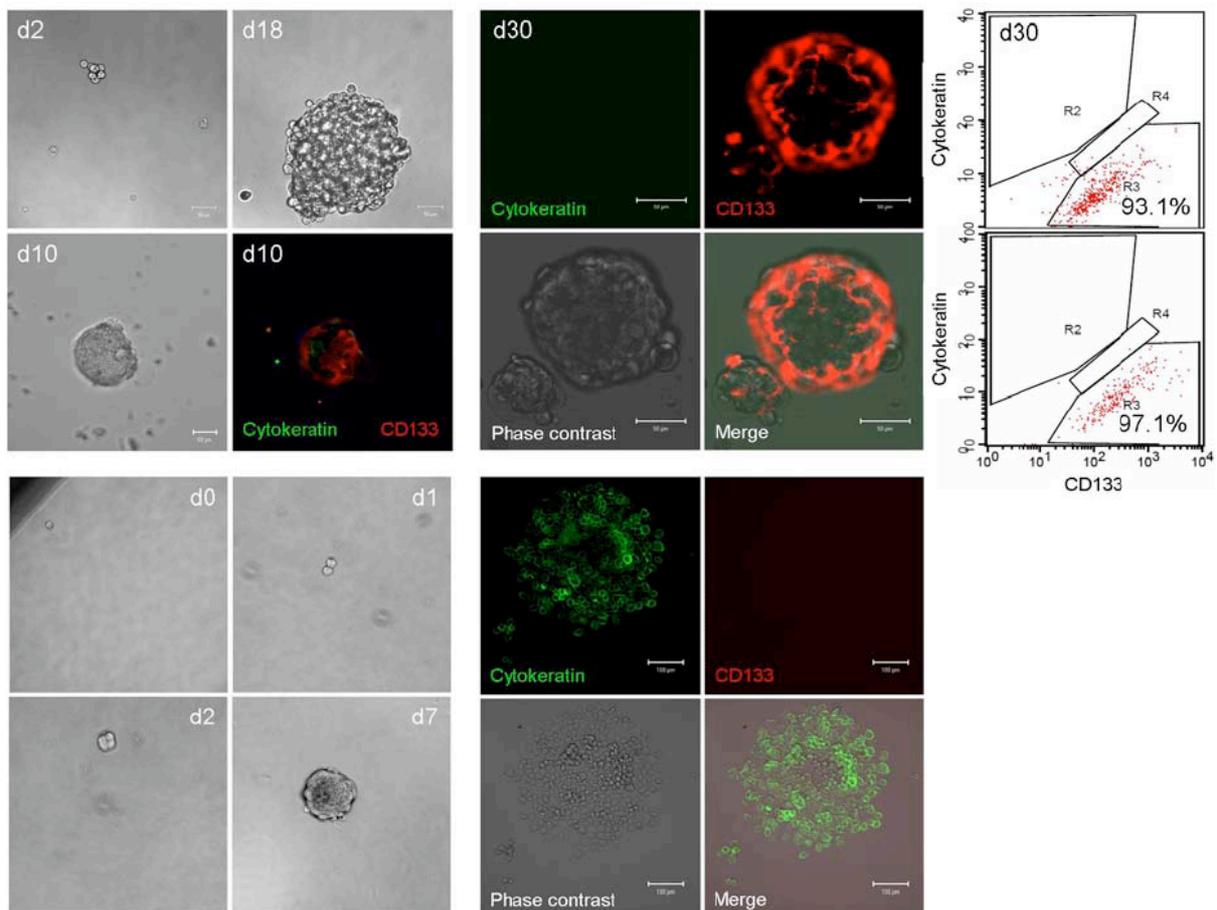


Abb. 3C: Die Kultur von L3.6pl Zellen unter Bedingungen, die das Überleben und die Expansion von Stammzellen fördern resultierte in einer klonalen Expansion einer seltenen Zellpopulation (oben links). Die Immunphenotypisierung der entstandenen Spheres am Tag 10 ergab, dass die Mehrheit der Zellen CD133 exprimiert und nur eine kleine Fraktion den epithelialen Differenzierungsmarker Zytokeratin exprimiert. Nach 50 Tagen (Passage 7) waren die Zellen immunhistochemisch komplett negativ für den epithelialen Marker Zytokeratin (oben mittig). Die schwache Färbung in der Mitte des nicht dissoziierten Spheres hängt wahrscheinlich mit der limitierten Gewebepenetration des Antikörpers zusammen. Tatsächlich waren über 90% der Zellen durchflusszytometrisch CD133 positiv (oben rechts). Die Einzelzellkultur der dissoziierten Spheres demonstrierte deren Fähigkeit, klonal zu expandieren (unten links). Die Zugabe von 10% Serum und das Entfernen von EGF und bFGF führte zur Differenzierung in große, adhärenente Zellen, dem Verlust der CD133 Expression (rot), und erhöhter Expression von Zytokeratin (grün) (unten rechts).

CD133⁻ Pankreaskarzinomzellen starben ausnahmslos unter diesen Serum-freien Kulturbedingungen, konnten aber mehrere Wochen lang in Medium mit Serum wachsen. Die Standardkultur unfraktionierter Zellen gestattete die Persistenz der CD133⁺ Population in niedriger Menge (Durchschnitt $0.8 \pm 0.3\%$). Bei der Kultur von CD133⁺ Zellen als sogenannte Pankreas-CSC-Spheres blieben diese Zellen CD133 positiv und exprimierten wenig bis kein Zytokeratin, während im Gegensatz dazu Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, eine Zytokeratinexpression aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Aus dissoziierten Spheres gewonnene Einzelzellen konnten wiederum klonal expandiert werden. Um das Differenzierungspotential dieser CD133⁺ Zellen zu untersuchen, wurden Pankreas-CSC-Spheres nun ohne EGF und FGF-2, jedoch mit 10% Serum kultiviert. Nach mehreren Tagen in Kultur differenzierten die Zellen in große, adhärenente Zellen (Abb. 3C). Nach der Differenzierung exprimierten diese Pankreastumorzellen Zytokeratin und erlangten eine Morphologie, die der großen Mehrheit der Pankreastumorzellpopulation sehr ähnlich war. Die Fähigkeit des exponentiellen Wachstums, die fehlende Zytokeratinexpression, sowie das tumorigene Potential legen somit nahe, dass CD133⁺ Pankreas-CSC-Spheres Aggregate primitiver Tumorzellen sind.

4.3 Resistenz humaner Pankreas-CSCs gegenüber Standard-Chemotherapie

Pankreaskarzinome sind extrem resistent gegenüber einer Chemo- oder Radiotherapie, da die malignen Zellen die Therapie überleben. Da CSCs eine essentielle Rolle im Zusammenhang mit dieser Resistenz spielen könnten, führten wir durchflusszytometrisch Zellzyklusanalysen durch. Sowohl CD133⁺ als auch CD133⁻ Zellen wurden dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabine ausgesetzt. Wir fanden heraus, dass CD133⁺ Zellen im Gegensatz zu autologen CD133⁻ Zellen eine dramatische Resistenz gegen Gemcitabine aufwiesen (Abb. 4A und 4B).

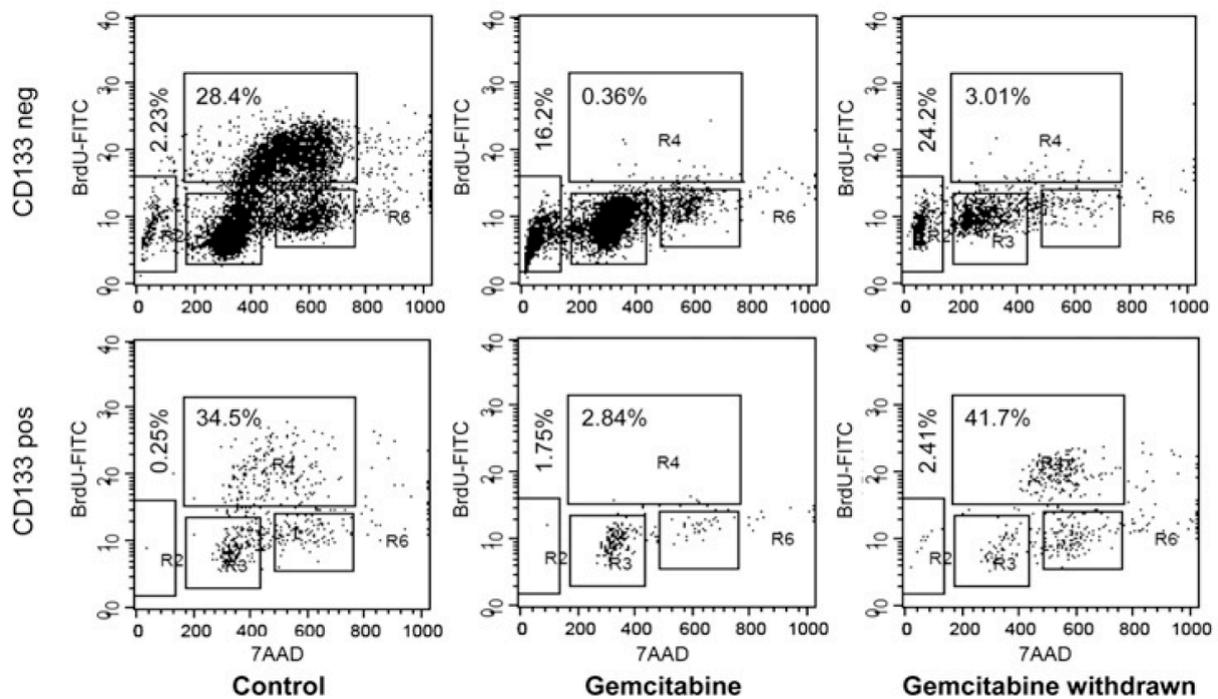


Abb. 4A: Mittels Durchflusszytometrie wurde eine Zellzyklusanalyse von CD133⁺ und CD133⁻ L3.6pl Zellen vor und nach Gemcitabineexposition angefertigt. Die Zellen wurden mit 7-AAD als Apoptosemarker und mit BrdU als Marker für die DNA-Synthese gefärbt. Zellen in der S Phase sind in Gate R4 dargestellt, apoptotische Zellen in Gate R2. Baseline Werte sind links dargestellt. Anschließend wurden die Zellen mit Gemcitabine für 24 h (mittig) behandelt, gefolgt von 24 h Erholungsphase nach der Entfernung von Gemcitabine (rechts).

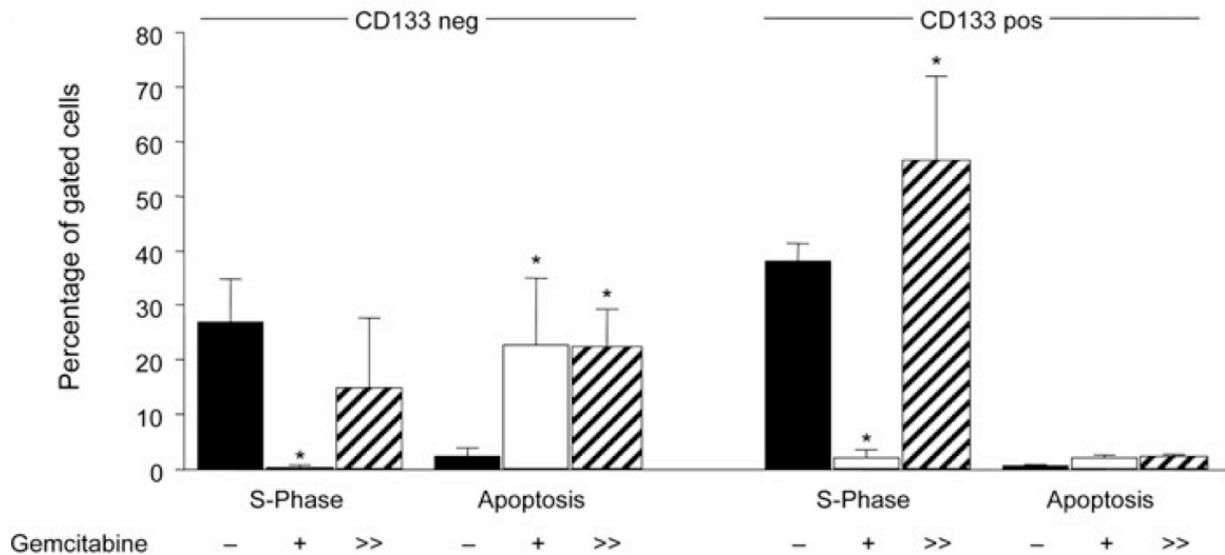


Abb. 4B: Quantifizierung der Zellzyklusanalyse. >> bedeutet Entfernung von Gemcitabine für 24 h. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Asterisk bedeutet $p < 0.01$ versus Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Längere Therapie mit Gemcitabine begünstigte das Überleben der CSCs, sodass nach 5 Tagen ca. 50% der kultivierten Zellen CSCs waren (Abb. 4C).

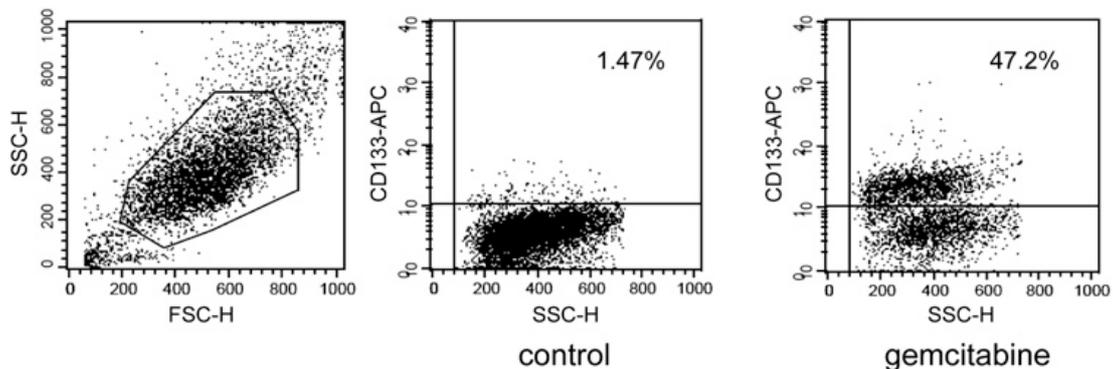


Abb. 4C: Langzeitbehandlung von L3.6pl Zellkulturen mit Gemcitabine begünstigte das Überleben von CD133+ CSCs und resultierte in einem Anteil von bis zu 50% CD133+ Zellen an der Gesamtzellzahl (n=4).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen auch primäre Tumorzellen von Patienten mit einem Pankreaskarzinom eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Gemcitabine (Abb. 4D).

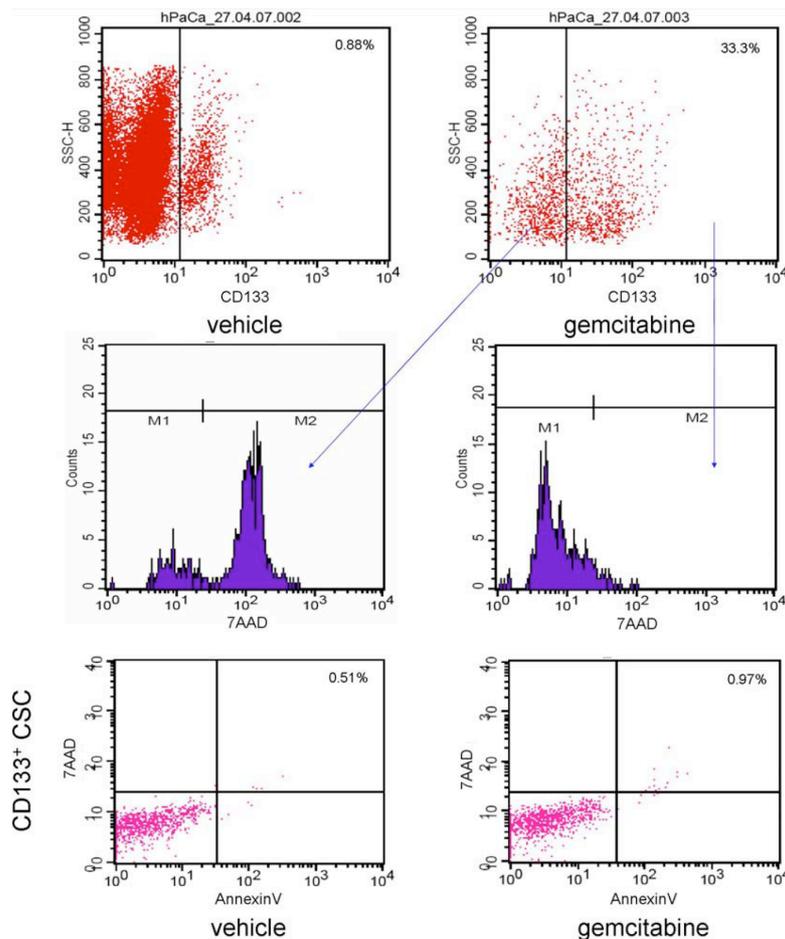


Abb. 4D: Patienten mit Pankreaskarzinom – Ex Vivo Gemcitabine Therapie

Tumorzellen eines Patienten mit einem Pankreaskarzinom wurden dissoziiert und für CD133 gefärbt. Durchflusszytometrisch exprimieren 0.88% der Patiententumorzellen CD133. Nach 48 h Therapie mit Gemcitabine war die CD133⁺ Population dramatisch verringert (oben rechts), da die meisten dieser Zellen 7-AAD aufnahmen und somit starben (Mitte links). Im Gegensatz dazu überlebte die Mehrheit der CD133⁺ Zellen die Therapie mit Gemcitabine, und nur ein kleiner Prozentsatz dieser Zellen war nekrotisch (Mitte rechts). Bei einem anderen Patienten mit Pankreaskarzinom bestätigte die Doppelfärbung für 7-AAD und AnnexinV, dass die Mehrheit der CD133⁺ CSCs eine Resistenz gegen Gemcitabine aufwies (unten).

Um die Relevanz dieser Ergebnisse auch in vivo zu demonstrieren, analysierten wir Pankreastumoren von Mäusen, nach der Injektion von 10⁶ L3.6pl Zellen und Behandlung mit entweder Vehikel oder Gemcitabine (2x wöchentlich 125 mg/kg i. p. für die Dauer von 21 Tagen). Obwohl die Tumoren signifikant kleiner waren als in der Vehikelgruppe (100.5 ± 36.4 vs. 183.8 ± 66.9 mm³; p < 0.05), kam es zu einer deutlichen Anreicherung von CD133⁺ CSCs (Abb. 4E).

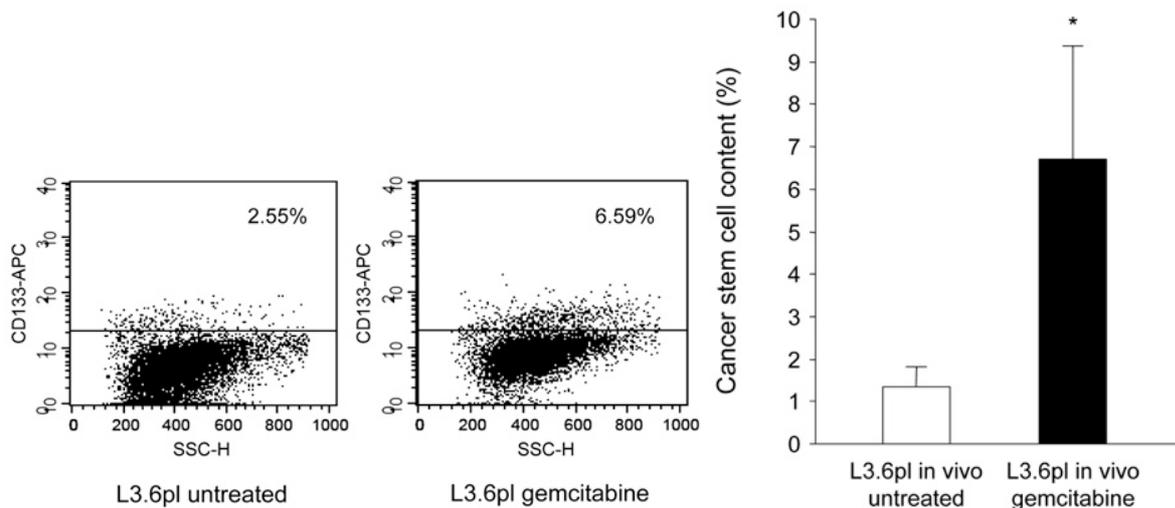


Abb. 4E: *In vivo* L3.6pl Tumor-Xenograft-Experimente zeigten, dass Gemcitabine zu einer signifikanten Anreicherung von CD133⁺ Zellen führt. Die Behandlung mit Gemcitabine (2x wöchentlich 125 mg/kg i.p.) oder Vehikel wurde 9 Tage nach der orthotopen Tumorzellimplantation begonnen. Der CSC-Gehalt wurde nach 3 Wochen Therapie durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative FACS Bilder (links) und die quantitative Auswertung (rechts) sind abgebildet. Asterisk bedeutet $p < 0.01$ versus Kontrolle; $n \geq$ drei Tiere pro Gruppe). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

4.4 Rolle der humanen Pankreas-CSCs in der Metastasierung von Tumoren

Auf der Grundlage des gezeigten histologischen Nachweises von CXCR4⁺ CSCs in der invasiven Front von humanen Tumoren (Abb. 1F), stellten wir die Hypothese auf, dass eine spezifische Population CXCR4⁺ und CD133⁺ CSCs eine elementare Rolle in der Metastasierung von Tumoren spielt. Zu diesem Zweck verwendeten wir ein Modell mit zwei verwandten humanen Pankreaskarzinomzelllinien mit gegensätzlicher metastatischer Aktivität. L3.6pl Zellen wurden aus ihren Parentalzellen (FG) durch multiple *in vivo* Zyklen, die für hochmetastatische Zellen selektionierten, gewonnen (Bruns et al., 1999). Während quantitative Unterschiede zwischen diesen beiden verwandten Zelllinien im CSC-Gehalt nur unter bestimmten Kulturbedingungen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), waren die qualitativen Unterschiede in den Charakteristika der CSCs höchst konstant und bemerkenswert. Während aus L3.6pl gewonnene CD133⁺ CSCs eine starke migratorische Aktivität aufwiesen, zeigten die aus FG Zellen gewonnenen CD133⁺ CSCs eine signifikant niedrigere invasive Aktivität. Interessanterweise exprimierten aber in erster Linie die

CD133⁺ CSCs aus L3.6pl den CXCR4 Rezeptor, und ihre starke migratorische Aktivität war primär durch CXCR4 mediiert (Abb. 5A).

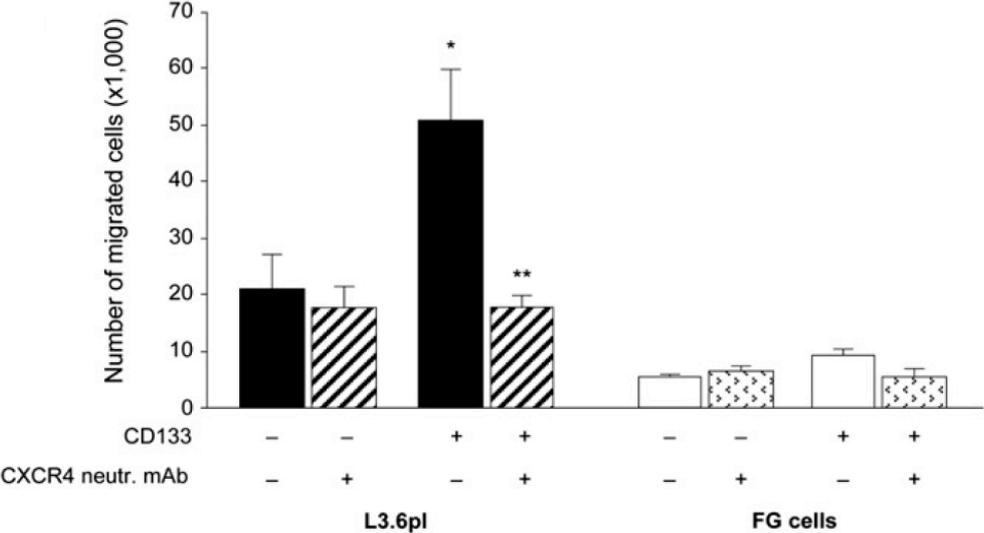


Abb. 5A: Die migratorische Kapazität von L3.6pl und FG Zellen wurde mit einem modifizierten Boyden Chamber Assay gemessen. Vor dem Experiment wurden die Zellen mittels MACS Isolation in CD133⁺ und CD133⁻ Zellen getrennt. Die Beteiligung des CXCR4 Rezeptors wurde durch gleichzeitige Zugabe des CXCR4 neutralisierenden Antikörpers untersucht. Asterisk bedeutet $p < 0.01$ versus CD133⁻ Zellen. Doppel-Asterisk bedeutet $p < 0.01$ versus kein CXCR4 neutralisierender Antikörper.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei verschiedenen anderen Pankreastumorzelllinien und bei Patienten mit Pankreas- und Kolonkarzinomen gemacht (Abb. 5B).

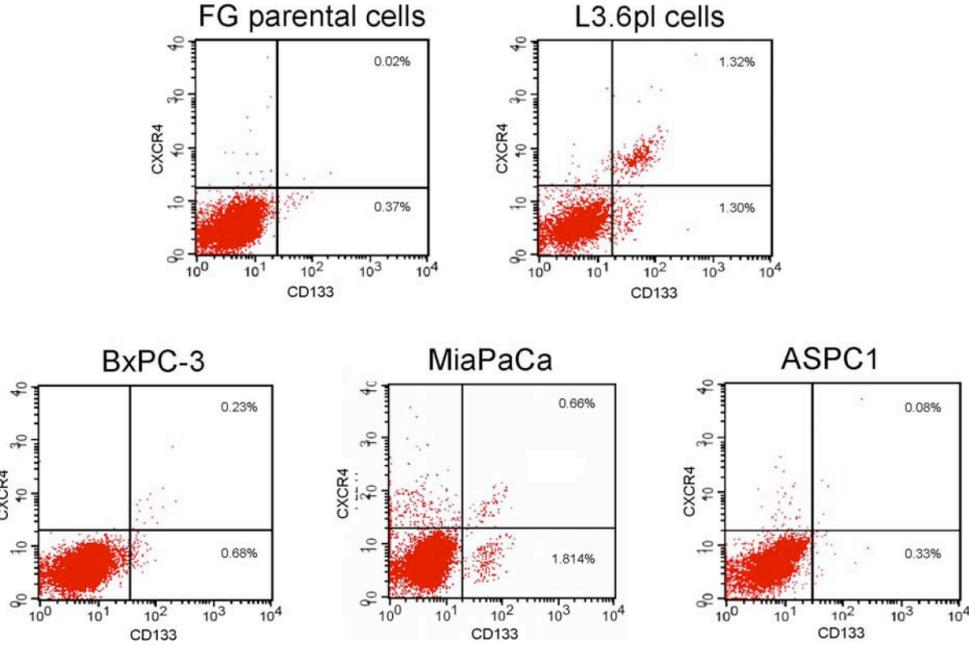


Abb. 5B: Die zwei verwandten Zelllinien FG und L3.6pl, sowie drei andere unverwandte Zelllinien wurden auf den Gehalt von CD133⁺ CXCR4⁻ tumorigenen Tumorstammzellen und CD133⁺ CXCR4⁺ migratorischen Tumorstammzellen untersucht.

MiaPaCa Zellen, eine Zelllinie mit sehr invasivem Wachstum, enthielten ebenfalls eine distinkte Subpopulation migratorischer CSCs, und die migratorische Aktivität dieser Zellen war eindeutig abhängig von CXCR4 (Abb. 5C).

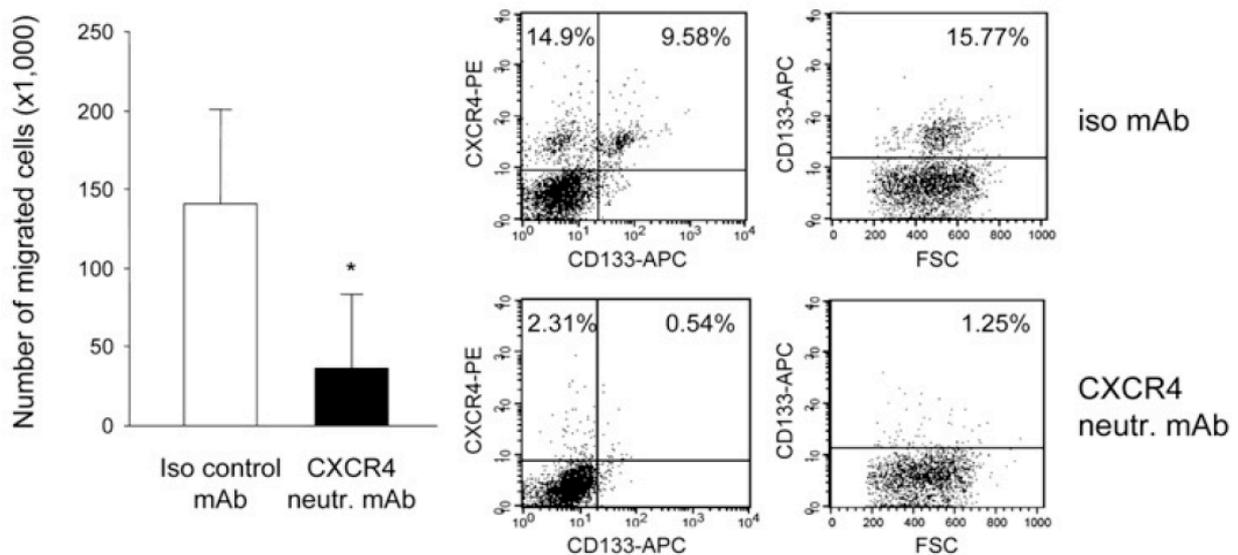


Abb. 5C: Die migratorische Aktivität von MiaPaCa Zellen in An- bzw. Abwesenheit CXCR4 neutralisierender Antikörper ist links abgebildet. In der unteren Boyden Chamber konnte ein dramatischer Anstieg der CXCR4⁺ migratorischen CSCs beobachtet werden (rechts oben), der in Anwesenheit von CXCR4 neutralisierenden Antikörpern aufgehoben wurde (rechts unten). Asterisk bedeutet $p < 0.05$ versus iso Kontroll-mAb. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Tatsächlich war SDF-1 als spezifischer Ligand des CXCR4 Rezeptors der potenteste Aktivator für die Migration CD133 positiver CSCs, während c-Met, das durch den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) aktiviert wird, auf Pankreaskarzinomzellen nicht nachweisbar war (Abb. 5D) und im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Induktion der Zellmigration zeigte (Daten nicht gezeigt).

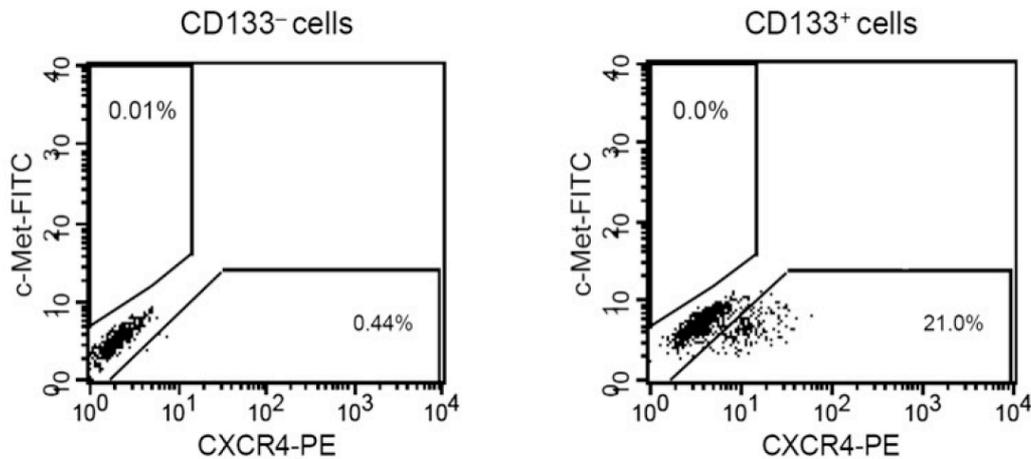


Abb. 5D: Expression des Hepatocyte Growth Factor Rezeptors c-Met und des SDF-1 Rezeptors CXCR4 auf CD133⁻ (links) und CD133⁺ L3.6pl Zellen (rechts).

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Migration CD133 positiver Zellen in erster Linie durch das SDF-1/CXCR4 System mediiert wird.

Auf der Grundlage dieser Daten stellten wir die Hypothese auf, dass die phänotypischen Unterschiede zwischen den metastatischen L3.6pl Zellen und den FG Parentalzellen in erster Linie auf die Anwesenheit hochinvasiver CD133⁺ CXCR4⁺ CSCs in der L3.6pl Tumorzellpopulation zurückzuführen sind. Um diese Hypothese zu evaluieren, isolierten wir aus L3.6pl Zellen sowohl CD133⁺ CXCR4⁺ Zellen, als auch CD133⁺ CXCR4⁻ Zellen in hoher Reinheit mittels Hochgeschwindigkeits-FACS (Abb. 6A).

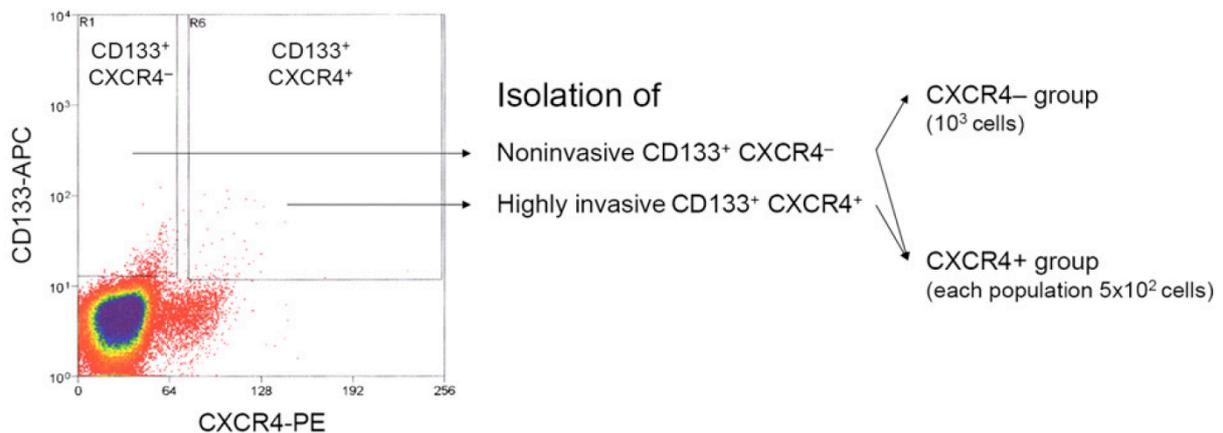


Abb. 6A: Mittels High-Speed FACS wurden CD133⁺ L3.6pl CSCs für die distinkte Population CD133⁺ CXCR4⁺ migrierenden CSCs (Gate R6) depletiert. Anschließend wurde entweder der komplette CSC-Pool oder für CD133⁺ CXCR4⁺ depletierte CSCs orthotop in das Pankreas von NMRI nu/nu Mäusen implantiert.

Anschließend wurden entweder 5×10^2 Tumor-initiierende $CD133^+ CXCR4^-$ Zellen, zusammen mit 5×10^2 migratorischen $CD133^+ CXCR4^+$ Zellen ($CXCR4^+$ Gruppe), oder nur 10^3 tumor-initiierende $CD133^+ CXCR4^-$ Zellen ($CXCR4^-$ Gruppe) orthotop in athyme Mäuse injiziert. Beide Gruppen zeigten eine ähnliche Tumorentwicklung auf (262 ± 64 versus $256 \pm 73 \text{mm}^2$; $p = 0.75$). Die durchflusszytometrische Analyse von Portalvenenblutproben nach der Tumorentwicklung zeigte, dass nur in der $CXCR4^+$ Gruppe eine reproduzierbare Population von zirkulierenden $CD133^+ CXCR4^+$ CSCs nachweisbar war (0.04 ± 0.03 der Zellen im Gate) (Abb. 6B), während in der $CXCR4^-$ Gruppe keine $CD133^+$ CSCs, weder $CXCR4^+$ noch $CXCR4^-$ in der Blutbahn nachgewiesen werden konnten.

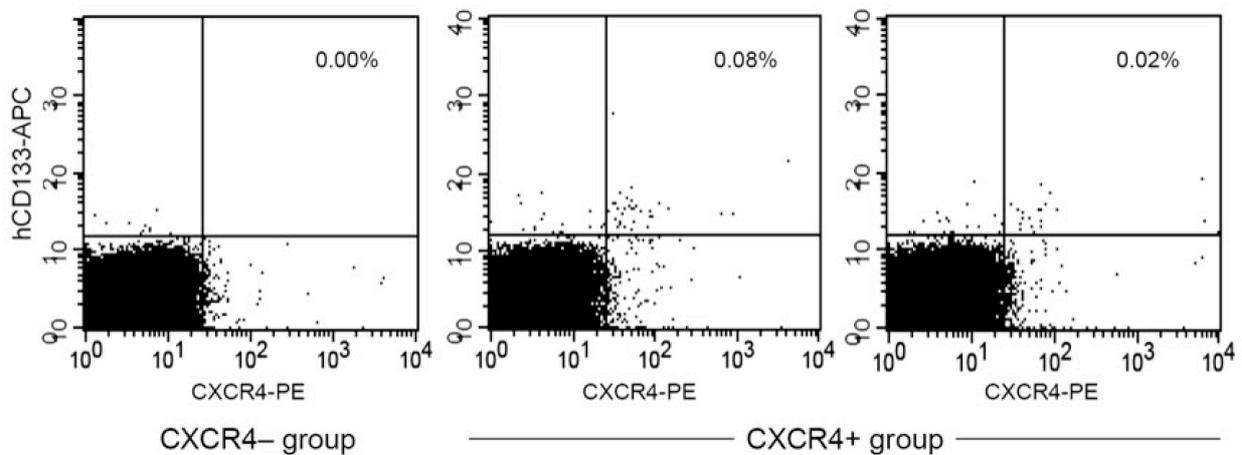


Abb. 6B: Portalvenenblut wurde auf die Anwesenheit von zirkulierenden migratorischen L3.6pl CSCs durchsucht, die durch Doppelfärbung von CD133 and CXCR4 charakterisiert sind.

Diese Daten untermauern die Hypothese, dass $CXCR4^+ CD133^+$ CSCs eine distinkte, invasive Population darstellen, und nicht aus $CD133^+ CXCR4^-$ CSCs hervorgehen können. Die Tumoren wurden durch Teilresektion des Pankreas und komplette Splenektomie entfernt, um ein weiteres Wachstum der Metastasen zu ermöglichen. Nach weiteren 2 Wochen konnte nach gründlicher makroskopischer und mikroskopischer Analyse der Lebern gezeigt werden, dass ausschließlich Mäuse der $CXCR4^+$ Gruppe Lebermetastasen entwickelten, während Mäuse, die $CD133^+ CXCR4^-$ Zellen erhalten hatten, keinerlei Anzeichen für Lebermetastasen zeigten (Abb. 6C).

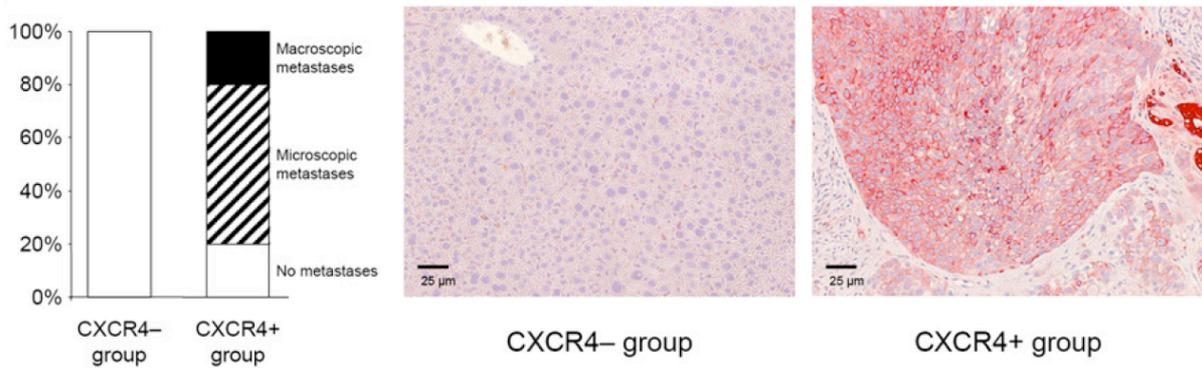


Abb. 6C: Die histologische Auswertung der Leber im Bezug auf metastatische Läsionen wurde durch Färbung für Zytokeratin (rot) und Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Der Metastasenstatus der Mäuse in den beiden Gruppen ist separat dargestellt für makroskopisch (schwarz) und mikroskopisch (schraffiert) nachweisbare Metastasen (links) ($n=5$ pro Gruppe). Abgebildet sind repräsentative Bilder einer Maus mit für $CD133^+$ $CXCR4^+$ migratorischen CSCs depletierten $CD133^+$ L3.6pl CSCs, sowie einer Maus, die zusätzlich $CD133^+$ $CXCR4^+$ migratorische CSCs erhielt (rechts).

Um weitere Belege dafür zu liefern, dass die Inhibition von $CXCR4^+$ CSCs die Metastasierung aufhebt, führten wir ein Experiment mit kontinuierlicher pharmakologischer Inhibition des $CXCR4$ Rezeptors und damit der permanenten Inhibition der Tumor(stamm)zell-Migration mittels AMD3100 durch. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass eine gleichzeitige Behandlung mit AMD3100 die Metastasierung signifikant reduzierte (Abb. 6D).

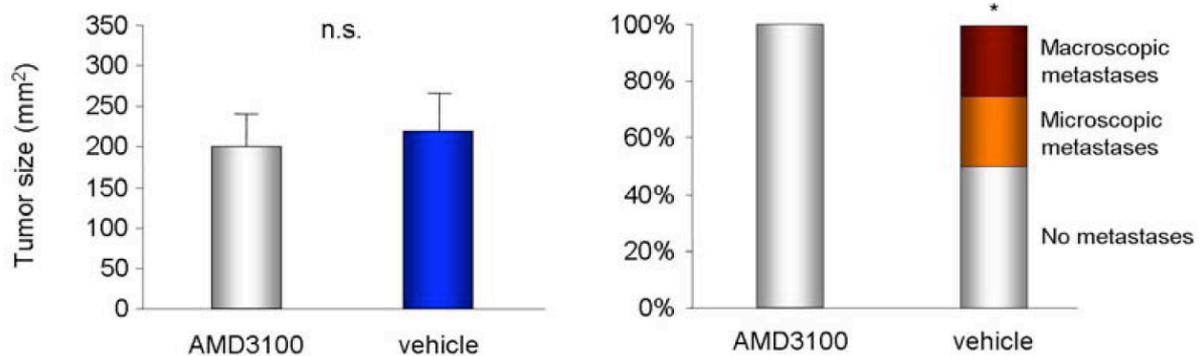


Abb. 6D: L3.6pl Zellen wurden orthotop in athyme NMRI nu/nu Mäuse implantiert. Nach 5 Tagen wurden die Mäuse für Behandlung mit AMD3100 (1.25 mg/kg 2x / Woche subkutan) oder Vehikel randomisiert. Nach 3 Wochen wurde die Tumorgöße gemessen und anschließend eine Splenektomie und partielle Pankreasresektion durchgeführt. Nach weiteren 2 Wochen wurden die Lebern entnommen und histologisch auf Metastasen untersucht. Asterisk bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu mit AMD3100 behandelten Mäusen ($n \geq 7$ pro Gruppe).

Um die klinische Relevanz unserer experimentellen Ergebnisse zu unterstreichen, führten wir zusätzliche Untersuchungen in Patienten mit Pankreaskarzinom durch. Interessanterweise stellte sich heraus, dass Tumorzellen mit einem hohen Anteil an CXCR4+ CSCs eine deutlich höhere migratorischen Aktivität zeigten und dass diese Patienten unter einer weiter fortgeschrittenen Erkrankung litten (Abb. 6E).

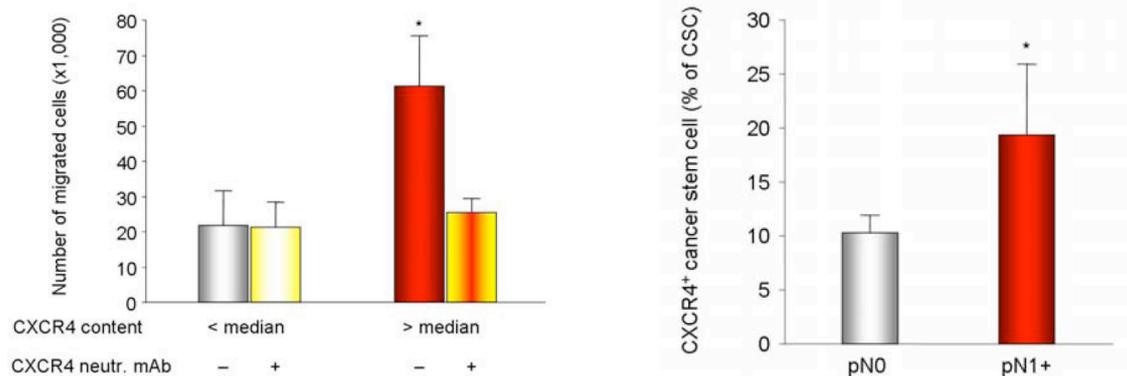


Abb. 6E: Links: Aus Primärgewebe gewonnene CD133+ Tumorstammzellen mit niedrigem (<13%) oder hohem (> Median von 13%) CXCR4+ CSC-Anteil wurden mit einem modifizierten Boyden chamber assay auf ihre invasive Kapazität hin untersucht. In Übereinstimmung mit den Daten, die für die hochmetastatische L3.6pl Zellen generiert wurden, wiesen auch Patientenzellen mit einem hohen Anteil an CXCR4+ CSCs eine deutlich größere migratorische Aktivität auf als Patientenzellen mit einem niedrigen CXCR4+ CSC-Anteil. Die gesteigerte migratorische Aktivität von Patientenzellen mit einem hohen CXCR4+ Anteil wurde durch gleichzeitige Therapie mit einem CXCR4 neutralisierenden Antikörper aufgehoben (n=4 Patienten).

Rechts: Patienten mit metastasierter Erkrankung (pN1+) wiesen einen signifikant höheren Anteil migratorischer CXCR4+ Tumorstammzellen auf, was als der Prozentsatz CXCR4+ CSCs im Verhältnis zum gesamten Anteil CD133+ CSCs dargestellt ist. Asterisk bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Patienten mit pN0 (n=8 Patienten).

5. Diskussion

Wir zeigen in dieser Studie, dass tumorigene Pankreaszellen in einer seltenen Population undifferenzierter Zellen enthalten sind, die CD133 exprimieren (Fargeas et al., 2003; Yin et al., 1997). Frisch isolierte, aus Patienten gewonnene CD133⁺ Pankreas-CSCs waren hoch tumorigen, und lediglich 500 Zellen waren nötig, um eine orthotope Tumorbildung in athymen Mäusen zu induzieren. Im Gegensatz dazu führten selbst 10⁶ CD133⁻ Tumorzellen nicht zu einer Tumorbildung. Das wichtigste Ergebnis ist jedoch, dass CSCs keine homogene Population tumorinitiierender Zellen sind. Stattdessen definieren wir eine Subpopulation von migratorischen CSCs, die durch die Expression des CXCR4 Rezeptors charakterisiert, und elementar an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind. Tatsächlich führte die Elimination dieser CSC-Subpopulation praktisch zur Aufhebung der metastatischen Aktivität von Pankreaskarzinomzellen.

Unsere Daten passen gut zur CSC-Hypothese, nach der Tumoren durch eine kleine Untergruppe von undifferenzierten Zellen generiert und aufrechterhalten werden, die sich durch die Fähigkeit auszeichnen, sich selbst zu erneuern, und sich in die verschiedenen Zellpopulationen der Haupttumormasse differenzieren zu können (Clarke et al., 2006; Dalerba et al., 2007; Dick, 2005; Kim et al., 2005; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004). Wie auch in anderen Entitäten wie Leukämie, Brust-, Hirn-, und Kolontumoren scheinen auch beim Pankreaskarzinom Stamm- und frühe Progenitorzellen das Ziel der onkogenen Transformation zu sein. Sicher ist es denkbar, dass CSCs durch Mutationen aus normalen Stammzellen hervorgehen. Andererseits deutet vieles darauf hin, dass CSCs ebenfalls aus mutierten Progenitorzellen entstehen könnten (Passegue et al., 2003; Prindull, 2005). Um zu einer CSC zu werden, muss eine Progenitorzelle jedoch Mutationen erlangen, die zur Wiedererlangung der Eigenschaft der Selbsterneuerung führen. Tatsächlich haben viele Studien gezeigt, dass die Expression von stammzellartigen Eigenschaften in Tumorzellen nicht notwendigerweise bedeutet, dass diese Zellen von Stammzellen abstammen. Unter experimentellen Bedingungen kann die Expression von kooperierenden Onkogenen in Linien-beschränkten Progenitorzellen Tumoren mit den zytopathologischen Charakteristika von hochmalignen Tumoren hervorbringen (Barnett et al., 1998). Diese Studien lassen vermuten, dass CSCs nicht notwendigerweise von echten gewebespezifischen Stammzellen abstammen

müssen, sondern vielmehr von einer prä-determinierten Progenitorzelle abstammen, die im Verlauf der onkogenen Transformation stammzellartige Eigenschaften wiedererlangt hat. Das Wissen über gewebeständige Stammzellen und Progenitorzellen im Pankreas muss jedoch noch deutlich erweitert werden um einen direkten Vergleich dieser Zellpopulationen zu gestatten, bevor diese Frage beantwortet werden kann.

CD133 wird von normalen gewebeständigen Stammzellen sowie von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Peichev et al., 2000; Uchida et al., 2000; Yin et al., 1997). Wie bereits für hämatopoetische und endotheliale Progenitoren gezeigt, wird CD133 auch auf frühen Progenitoren exprimiert, ist jedoch im Verlauf der Differenzierung nicht mehr nachweisbar (Peichev et al., 2000). Bei Tumorzellen wurde CD133 für die Identifikation einer Subpopulation hochtumorigener Zellen verwendet, wie für Nervenzelltumoren und, erst kürzlich, auch für Kolonkarzinome gezeigt wurde (O'Brien et al., 2007; Singh et al., 2004). Es wird jedoch nicht auf Tumorzellen nach deren Differenzierung exprimiert. Daher sind die aktuellen Ergebnisse aus dem Pankreaskarzinom gut zu vereinbaren mit diesen früheren Untersuchungen, da wir eine Subpopulation CD133⁺ Zellen identifizierten, die die Kapazität zur Selbsterneuerung haben, da sie klonal expandiert werden können, die alleinig tumorigen sind, und die sich in CD133⁻ Tumorzellen differenzieren können. Eine sehr neue Studie zum Pankreaskarzinom verwendete eine Markerkombination von CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ zur Identifizierung von CSCs (Li et al., 2007). Mittels Durchflusszytometrie zeigten wir, dass diese zwei Populationen sich zwar überschneiden, aber nicht identisch sind.

Wahrscheinlich durchlaufen CSCs symmetrische und asymmetrische Teilungen in vivo, was zu einer Expansion der tumorigenen Zellpopulation führt, während ebenso eine Nachkommenschaft differenzierterer Zellen entsteht, die die Hauptpopulation der Tumorzellmasse darstellt (Dalerba et al., 2007). Es wird zunehmend klar, dass Tumortherapien, die CSCs nicht eliminieren, ein Rezidiv zulassen könnten. Tatsächlich gibt es für Fälle, in denen die Haupttumormasse ausgelöscht und eine Chemotherapie gegeben wurde, nur um von einem Rezidiv gefolgt zu werden, eine plausible Erklärung, dass nämlich die CSCs nicht restlos zerstört wurden. In den vorliegenden Experimenten fanden wir eine substantielle Resistenz der Pankreas-CSCs gegenüber der Standardchemotherapie. Sogar sehr hohe Konzentrationen von Gemcitabine in vitro (bis zu 100 µg/ml) führten nicht signifikant zu Apoptose und/oder

Zelltod in CSCs, während praktisch alle anderen Tumorzellen innerhalb weniger Tage einer Therapie mit Gemcitabine abgetötet wurden. In Übereinstimmung hierzu führte die in vivo Administration von Gemcitabine in einem murinen orthotopen Pankreaskarzinommodell zu einer deutlichen relativen Anreicherung von Pankreas-CSCs, da primär nicht-tumorigene CD133⁻ Zellen eliminiert wurden. Daher wird die weitere molekulare Charakterisierung der tumorigenen CD133⁺ Pankreastumorstammzellen, die wir in dieser Studie identifizieren konnten, von essentieller Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien sein, um diese Herausforderung in der Zukunft meistern zu können. Wichtig ist hierfür insbesondere, dass die gezeigte Möglichkeit Pankreas-CSCs in vitro zu expandieren, große Bedeutung für die Evaluation der Effizienz neuer Medikamente haben wird. Die Möglichkeit, tumorigene Pankreaskarzinomzellen in vitro nicht nur erhalten, sondern sogar expandieren zu können, sollte für weiterführende klinische Studien ausgenutzt werden.

Das Tumorstammzellkonzept wird jedoch die Existenz zweier Arten von CSC in der Progression von Tumoren berücksichtigen müssen: einer stationären sowie einer invasiven CSC. Die stationären CSCs sind noch in das epitheliale Gewebe eingebettet und vermutlich bereits in benignen Vorläuferläsionen aktiv (He et al., 2007); diese stationären CSCs können jedoch nicht disseminieren. Im Gegensatz dazu sind invasive CSCs in erster Linie in der Grenzzone zwischen Tumor und Wirt lokalisiert. Diese invasiven CSCs, die zwei der entscheidenden Merkmale, „Stemness“ und Invasivität kombinieren, spielen eine Schlüsselrolle für das Verständnis der Tumorprogression. Diese Zellen wurden ebenfalls als „migrating CSC“ bezeichnet, und tatsächlich zeigen wir hier Beweise für deren Existenz im Pankreaskarzinom und ihre wichtige Rolle bei der Metastasierung. Die Invasion und die Metastasierung sind keine zufälligen Prozesse, sondern sind sehr organspezifisch und pathophysiologisch organisiert, da multiple Schritte und zahlreiche Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem Wirt erforderlich sind. Die SDF-1/CXCR4 Achse wurde ursprünglich in Leukozyten entdeckt, wo sie für den Verkehr und das „Homing“ von hämatopoetischen Progenitorzellen verantwortlich sind (Loetscher et al., 2000). Homozygote, CXCR4-defiziente Mäuse sind lethal und zeigen verschiedenste Deformitäten auf (Zou et al., 1998). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass CXCR4 durchaus ein Schlüsselregulator der Invasivität von Tumoren sein könnte, der zur lokalen Progression und zur Metastasierung führt

(Burger and Kipps, 2006). Die Überexpression des Hypoxia-Inducible Factors (HIF-1) bzw. der funktionelle Verlust des HIF-supprimierenden pVHL-Proteins (von Hippel-Lindau-Protein) führen zur Expression von CXCR4 im Nierenzellkarzinom, was eine potentielle Rolle gesteigerter CXCR4-Expression bei der Ausbreitung von Tumoren weiter unterstützt (Staller et al., 2003; Zagzag et al., 2005). Aus der klinischen Perspektive ist eine gesteigerte CXCR4-Expression mit einem schlechten Prognose beim Nierenzellkarzinom assoziiert (Zagzag et al., 2005). SDF-1, der spezifische Ligand von CXCR4, wird stark in Lunge, Leber, Knochenmark und Lymphknoten exprimiert, also in Organen, die häufig von Metastasen eines Pankreaskarzinoms betroffen sind. Analog zum gerichteten Homing von Leukozyten könnten diese SDF-1 Gradienten Tumorzellen anlocken, die Proliferation und Invasion an spezifischen Metastasierungsorten regulieren (Bachelder et al., 2002; Muller et al., 2001; Schneider et al., 2002), was für das Pankreaskarzinom in einem murinen experimentellen Metastasierungsmodell bereits gezeigt werden konnte (Saur et al., 2005). Dieses SDF-1/CXCR4 System scheint ebenfalls die Metastasierung anderer Entitäten zu regulieren, darunter Kolon-, Lungen- und Brustkrebs (Kucia et al., 2005; Muller et al., 2001; Zeelenberg et al., 2003). Passend hierzu zeigen wir, dass die Migration invasiver CSCs primär durch eine Aktivierung des CXCR4-Rezeptors mediiert wird. Es ist äußerst faszinierend, dass in einem orthotopen in vivo Pankreaskarzinommodell die Implantation einer CSC-Population, die für diese migratorischen (CD133⁺ CXCR4⁺) CSCs depletiert wurde, praktisch zur Aufhebung der metastatischen Aktivität der entstanden Tumoren führte. Die vorliegenden Daten zeigen zum ersten Mal, dass in dem verwendeten in vivo System eine spezifische CD133⁺ CXCR4⁺ CSC Subpopulation die allein verantwortliche Population für die Metastasierung eines Tumors ist. Diese Ergebnisse und der Blick auf Daten aus anderen Tumorentitäten generieren somit ein großes Interesse am gezielten Targeting von CSCs und ihrer Eradikation (Clarke et al., 2006; Dalerba et al., 2007).

6. Literaturverzeichnis

Ahlgren, J.D. (1996). Chemotherapy for pancreatic carcinoma. *Cancer* 78, 654–663.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3983–3988.

Bachelder, R.E., Wendt, M.A., and Mercurio, A.M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* 62, 7203–7206.

Barnett, S.C., Robertson, L., Graham, D., Allan, D., and Rampling, R. (1998). Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells transformed with c-myc and H-ras form high-grade glioma after stereotactic injection into the rat brain. *Carcinogenesis* 19, 1529–1537.

Bruns, C.J., Harbison, M.T., Kuniyasu, H., Eue, I., and Fidler, I.J. (1999). In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1, 50–62.

Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761–1767.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66, 9339–9344.

Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* 58, 267–284.

Denham, M., Huynh, T., Dottori, M., Allen, G., Trounson, A., and Mollard, R. (2006). Neural stem cells express non-neural markers during embryoid body coculture. *Stem Cells* 24, 918–927.

Dick, J.E. (2005). Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1044, 1–5.

Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17, 1253–1270.

Fargeas, C.A., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2003). AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells* 21, 506–508.

He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., et al. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat. Genet.* 39, 189–198.

Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13; 1(3): 313-23.

Hermann P.C., Huber S.L., Heeschen C. (2008) Metastatic cancer stem cells: a new target for anti-cancer therapy? *Cell Cycle.* 2008 Jan; 7(2): 188-93.

Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., and Thun, M.J. (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* 54, 8–29.

Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 355, 1253–1261.

Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823–835.

Kucia, M., Reza, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23, 879–894.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.

Loetscher, P., Moser, B., and Baggiolini, M. (2000). Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv. Immunol.* 74, 127–180.

Matano, E., Tagliaferri, P., Libroia, A., Damiano, V., Fabbrocini, A., De Lorenzo, S., and Bianco, A.R. (2000). Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study. *Br. J. Cancer* 82, 1772–1775.

Moll, R. (1998). Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell. Biochem.* 31, 205–262.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110.

Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (Suppl 1), 11842–11849.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., and Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952–958.

Prindull, G. (2005). Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp. Hematol.* 33, 738–746.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111–115.

Rosenberg, L. (1997). Treatment of pancreatic cancer. Promises and problems of tamoxifen, somatostatin analogs, and gemcitabine. *Int. J. Pancreatol.* 22, 81–93.

Rothenberg, M.L., Abbruzzese, J.L., Moore, M., Portenoy, R.K., Robertson, J.M., and Wanebo, H.J. (1996). A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 78, 627–632.

Saur, D., Seidler, B., Schneider, G., Algul, H., Beck, R., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., and Schmid, R.M. (2005). CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 129, 1237–1250.

Schneider, G.P., Salcedo, R., Dong, H.F., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., and Howard, O.M.Z. (2002). Suradista NSC 651016 inhibits the angiogenic activity of CXCL12-stromal cell-derived factor 1{alpha}. *Clin. Cancer Res.* 8, 3955–3960.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E.J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307–311.

Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14720–14725.

Warshaw, A.L., and Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 326, 455–465.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012.

Zagzag, D., Krishnamachary, B., Yee, H., Okuyama, H., Chiriboga, L., Ali, M.A., Melamed, J., and Semenza, G.L. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res.* 65, 6178–6188.

Zeelenberg, I.S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. (2003). The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 63, 3833–3839.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595–599.