

**Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof Dr. med. V. Tronnier**

**Stammzellähnliche Tumorzellen aus malignen
Gliomen: phänotypische Unterschiede und
Sensitivität gegenüber Temozolomid (TMZ)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -**

**vorgelegt von
Laura Bähr
geboren in Bremerhaven**

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Diether Ludwig

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.08.2019

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hirneigene Tumoren.....	1
1.2	Diagnostik und Standardtherapie des GBMs.....	3
1.3	Temozolomid.....	5
1.4	Resistenz gegenüber der Chemotherapie.....	6
1.5	Tumorstammzellen des GBM.....	9
1.6	Marker für stammzellähnliche Gliomzellen (SLGCs).....	15
1.7	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Tumormaterial.....	20
2.1.2	Tiermodell.....	20
2.1.3	Zellkulturmedien.....	22
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	22
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Zellkultur.....	24
2.2.2	Tierexperimente.....	26
2.2.3	Expressionsanalyse auf RNA-Ebene (RT-PCR).....	28
2.2.4	Immunzytochemische Analysen.....	33
2.2.5	Analysen zur Proliferation und Vitalität.....	36
2.2.6	Expressionsanalyse auf Proteinebene.....	38
2.2.7	MSP-Assay.....	41
2.2.8	Durchflusszytometrie.....	45
2.2.9	Statistik.....	47

3	Ergebnisse.....	49
3.1	Vorspann.....	49
3.2	Tumoren T1467 und T1469 und abgeleitete Zellkulturen.....	49
3.3	Tumorigenität von SLGC-Linien	51
3.4	TMZ-Sensitivität von SLGC-Linien.....	56
3.4.1	TMZ-Resistenzmechanismen	57
3.4.2	Effekte auf Proliferation und Vitalität	64
3.4.3	Einfluss auf die Expression von Sox2 und den Anteil CD133-positiver Zellen	77
4	Diskussion.....	84
4.1	Vorspann.....	84
4.2	Charakterisierung von hirneigenen Tumorzellen	85
4.3	Beeinflussende Faktoren der TMZ-Sensitivität von SLGCs	89
4.3.1	Der variierende Einfluss von TMZ auf die Proliferation und Vitalität von SLGCs.....	92
4.3.2	Expression von Sox2 und Anteil CD133-positiver Zellen	95
4.3.3	Fazit und Ausblick auf zukünftige Forschung und Therapieoptionen.....	97
5	Zusammenfassung	98
6	Abkürzungsverzeichnis.....	100
7	Tabellenverzeichnis	104
8	Abbildungsverzeichnis	106
9	Literaturverzeichnis	108
10	Anhang.....	119
11	Danksagung	125
12	Lebenslauf.....	126

1 Einleitung

1.1 Hirneigene Tumoren

Die hirneigenen Tumoren werden nach der WHO Klassifikation in Gliome, Meningeome und mesenchymale nicht-meningotheliale Tumore, sowie embryonale Tumoren und Neurinome eingeteilt (Louis et al., 2007, 2016). Gliome sind mit über 70% die häufigsten hirneigenen Tumoren, wobei das Glioblastoma multiforme (GBM) etwa 65% aller Gliome ausmacht (Ohgaki und Kleihues, 2005). Man unterscheidet Tumoren des Grades I bis IV, abhängig von der Malignität. Das Glioblastoma multiforme zählt zu den diffus astrozytären und oligodendroglialen Tumoren und fällt in die Kategorie der Grad IV-Tumoren. Diese sind charakterisiert durch ihre hohe mitotische Aktivität und die Neigung zu Nekrosen, sowie ein schnelles prä- und postoperatives Fortschreiten der Erkrankung mit schließlich tödlichem Ausgang. In der aktuellen Klassifikation wurden erstmals auch molekulargenetische Eigenschaften der Tumoren berücksichtigt. So unterscheidet man bei den Glioblastomen zwischen solchen mit einem IDH (Isocitratdehydrogenase)-Wildtyp und solchen mit einem mutierten IDH-1-Gen. Das IDH-1-Gen kodiert für die zytosolische Isocitrat-Dehydrogenase 1, die im Zytoplasma NADP-abhängig Isocitrat in α -Ketoglutarat umwandelt (Xu et al., 2004). Auch eine mitochondriale Form dieses Enzyms (IDH-2), die eine Rolle im Citrat-Zyklus spielt, kann betroffen sein. Insgesamt liegen in ca. 10-12% der Glioblastome IDH-Mutationen vor (Parsons et al., 2008; Louis et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass GBM-Patienten mit mutierter IDH eine bessere Prognose haben (Yan et al., 2009). Zu den Glioblastomen mit einem IDH-Wildtyp gehören die primären Glioblastome mit den Subtypen des Riesenzellglioblastoms, des epitheloiden Glioblastoms und des Gliosarkoms. Zu den Glioblastomen mit IDH-Mutation gehören die sekundären Glioblastome. Zusätzlich gibt es noch die Gruppe der nicht weiter spezifizierten Glioblastome (Louis et al., 2016). Weitere in die WHO-Klassifikation eingegangene Kriterien sind die Aktivierung der Telomerase (TERT), die Amplifikation oder Überexpression des EGFR (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor), sowie der funktionelle Verlust der Tumorsuppressoren PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) und TP53 (Louis et al., 2016).

Im Rahmen der Forschungen des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) Konsortiums (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) konnte aufgrund molekularer

Analysen eine weitere Unterteilung der GBMs in 4 Subtypen etabliert werden. Es wird zwischen klassischen, mesenchymalen, sowie proneuralen und neuronalen GBMs unterschieden (Brennan et al., 2009; Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010). Dabei zeichnet sich das klassische (proliferative) GBM durch eine Überaktivierung des EGFR-Signalwegs und einen Verlust von PTEN aus. Das mesenchymale GBM ist durch den Verlust mehrerer Tumorsuppressoren (TP53, PTEN und NF-1 [Neurofibromin-1]) und die Expression mesenchymaler Marker charakterisiert. Das neurale GBM zeigt eine neurale Signatur bei dereguliertem EGFR-Signalweg. Der proneurale GBM-Subtyp weist neben der erwähnten IDH-Mutation den Verlust der Tumorsuppressoren TP53 und PTEN, sowie die Amplifikation des Gens für den PDGF-R α (engl. *platelet-derived growth factor receptor alpha*) und die Expression proneuraler Marker auf (Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010). Das sekundäre GBM zeichnet sich nach den Untersuchungen des TCGA-Konsortiums durch starke Ähnlichkeiten zum proneuralen GBM aus (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Des Weiteren erfolgte die Unterscheidung zwischen einem „*glioma-CpG Island Methylator*“ Phänotyp (GCIMP) und einem „*non glioma-CpG Island Methylator*“ Phänotyp (non-GCIMP) (Noushmehr et al., 2010). Die GCIMP Tumore lassen sich in die Gruppe der proneuralen GBMs einordnen.

Die aufgeführten GBM-Klassifikationen werden derzeit weniger zur Auswahl der Therapieoptionen, sondern primär zur Abschätzung der Prognose genutzt. Weitere klinisch wichtige Kriterien sind der Gesundheitszustand und das Alter des Patienten (Scott et al., 1999). Um den Allgemeinzustand des Patienten zu objektivieren wird der Karnofsky-Index genutzt. Hier wird auf einer prozentualen Skala angegeben inwieweit die Erkrankung den Patienten in seinen Aktivitäten und seiner Selbstständigkeit einschränkt und gibt so einen Anhaltspunkt für die Lebensqualität des Patienten (Karnofsky et al., 1948).

Wie oben erwähnt, wird zwischen primären und sekundären Glioblastomen unterschieden. Die sekundären Glioblastome sind mit 5-13% aller GBMs selten und entwickeln sich aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen (Ohgaki und Kleihues, 2013). Histopathologisch gibt es bisher keine sicheren Unterscheidungsmerkmale zwischen den primären und sekundären GBMs. Die Tumoren lassen sich jedoch über ihre genetischen und epigenetischen Eigenschaften voneinander abgrenzen und es gibt Hinweise, dass sich die primären und sekundären GBMs aus unterschiedlichen neuronalen

Vorläuferzellen entwickeln (Ohgaki und Kleihues, 2013). Klinisch sind die Patienten mit primären Glioblastomen älter (Durchschnittsalter 55 Jahre) als diejenigen mit sekundären Glioblastomen (Durchschnittsalter 40 Jahre). Das klinisch relevante Unterscheidungsmerkmal ist die Prognose. Patienten mit einem sekundären GBM haben ohne Therapie eine mittlere Überlebenszeit von 7,8 Monaten. Bei Patienten mit einem primären GBM sind es 4,7 Monate (Ohgaki und Kleihues, 2013). Durch Anwendung der verschiedenen Therapieoptionen kommt es hier jeweils zu einer mäßigen Verlängerung der mittleren Überlebenszeit (siehe Kapitel 1.2). In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus primären Glioblastomen untersucht, ohne eine Einteilung der Herkunftsgewebe in die zuvor genannten Subtypen vorzunehmen.

Zu Kontrollzwecken wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Zelllinie analysiert, die sich von einem Meningeom ableitet. Meningeome gehen von der Arachnoidea aus und zeigen nur in Ausnahmefällen einen malignen Verlauf. Nach der WHO-Klassifikation unterscheidet man verschiedene Typen von Meningeomen des Grades I bis II, sowie das anaplastische Grad III Meningeom (Louis et al., 2016). Etwa 90% der Meningeome sind benigne Grad I Tumoren (Claus et al., 2005).

1.2 Diagnostik und Standardtherapie des GBMs

Klinisch zeigen Patienten mit malignen Gliomen Symptome wie Kopfschmerzen, epileptische Anfälle und Hemiparesen. Grundsätzlich können Hirntumoren jegliche neurologische Störung verursachen, wobei die Symptomatik jeweils abhängig von der Tumorlokalisation ist (Hanif et al., 2017). Die Diagnose erfolgt nach der Anamnese und der klinischen Untersuchung vor allem über bildgebende Verfahren. Das Mittel der Wahl ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittelgabe. Alternativ kann auch eine Computertomographie (CT) durchgeführt werden. Das typische Erscheinungsbild eines GBM ist eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung mit zentral geminderter Signalintensität. Des Weiteren zeigt sich häufig ein ausgedehntes Perifokalödem (Linn et al., 2011). Zur Sicherung der Diagnose wird eine stereotaktische Biopsie vorgenommen. Die entnommene Probe wird histopathologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch auf verschiedene Merkmale getestet. Unter anderem, wird die Expression des glialen Markers GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*) bestimmt. Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität wird die

Markierungsrate für das proliferationsassoziierte nukleäre Antigen Ki-67 mit Hilfe des MIB1-Antikörpers bestimmt (Johannessen und Torp, 2006). Es wird weiterhin die Kodeletion der Chromosomenarme *1p* und *19q* bestimmt (Zhao et al., 2014) und der oben beschriebene Mutationsstatus der IDH ermittelt. Zusätzlich erfolgt die Bestimmung des MGMT-Status, da dieser Auskunft darüber gibt, ob das Reparaturenzym MGMT (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) exprimiert wird (siehe Kapitel 1.4).

Die derzeitige Therapie von malignen Gliomen ist zunächst die chirurgische Tumorentfernung, wenn die Tumorlokalisierung und der Allgemeinzustand des Patienten dies zulassen. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Patienten von einer möglichst ausgedehnten Resektion profitieren (Lacroix et al., 2001; Stummer et al., 2006; Li et al., 2016). Da keine kurative Resektion möglich ist, hat die Aufrechterhaltung neurologischer Funktionen Priorität gegenüber der operativen Radikalität (Hanif et al., 2017). Ein weiteres Problem ist, dass das GBM häufig über die in der Bildgebung sichtbaren Grenzen das Gehirn infiltriert. So konnte in einer Studie mittels Autopsien von GBM-Patienten gezeigt werden, dass etwa die Hälfte der Tumoren einen Gehirnlappen überschritten hatten, etwa 25% eine gesamte Gehirnhälfte betrafen und weitere 25% bereits auf die andere Gehirnhälfte übergreifen hatten (Salazar und Rubin, 1976). Wenn eine operative Tumorsektion aufgrund des Allgemeinzustandes des Patienten nicht möglich ist, sollte zur Abschätzung der Prognose und Auswahl der Therapieoptionen zumindest die Diagnosesicherung mittels stereotaktischer Biopsie erfolgen (Grasbon-Frodl et al., 2007).

An die Resektion schließt sich eine Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion und eine adjuvante Chemotherapie mit einem alkylierenden Agens an. Die Strahlentherapie sollte eine Gesamtdosis von 54-60 Gy erreichen, wobei die Bestrahlung typischerweise fraktioniert mittels Einzeldosen von 1,8-2,0 Gy erfolgt (Laperriere, 2002). Bei Patienten mit einer schlechten Prognose kann bei nicht zu erwartenden Spätschäden eine akzelerierte Strahlentherapie zur Verkürzung der Therapiedauer in Betracht gezogen werden (Roa et al., 2004). Die Chemotherapie mittels eines alkylierenden Agens erfolgt begleitend zur Strahlentherapie. Es konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit bei Anwendung der kombinierten Radiochemotherapie gezeigt werden. Die durchschnittliche Überlebensdauer von GBM-Patienten, die mit einer kombinierten Radiochemotherapie behandelt werden liegt bei 14,6 Monaten. Bei alleiniger

Radiotherapie sind es 12,1 Monate (Stupp et al., 2005). Die Verlängerung der durchschnittlichen Überlebensdauer durch die Chemotherapie beträgt somit nur 2-3 Monate. Für die Behandlung eines Rezidivs ist bisher keine Standardtherapie definiert, die erneute Anwendung aller vorhandenen Therapieoptionen muss geprüft werden (van Linde et al., 2017). Die Behandlung von Gliosarkomen erfolgt analog zum GBM, obwohl nicht abschließend geklärt ist, ob es sich beim Gliosarkom um eine GBM-Variante oder eine eigenständige Tumorentität handelt (Han et al., 2010).

1.3 Temozolomid

In der medikamentösen Therapie des GBM hat sich das alkylierende Agens Temozolomid (TMZ) durchgesetzt. Seit der Publikation der Daten von Stupp et al. (2005), welche eine verlängerte durchschnittliche Überlebensdauer nach kombinierter Radiochemotherapie zeigen konnten, ist TMZ Bestandteil der Standardtherapie des GBM. Die Verträglichkeit von TMZ ist insgesamt gut. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit und Erbrechen. Des Weiteren zählen Alopezie und Hautausschläge zum Nebenwirkungsprofil. Dosislimitierend sind die hämatologischen Nebenwirkungen Leukozytopenie und Thrombozytopenie (Newlands et al., 1992). Die Chemotherapie mit TMZ erfolgt begleitend zur Strahlentherapie mit 150-200 mg/m² Körperoberfläche (KOF) an 5 Tagen pro Woche für insgesamt 4 Wochen (Wick et al., 2009).

TMZ gehört zur Gruppe der Imidazotetrazine. Das Medikament wird oral verabreicht und hat eine Bioverfügbarkeit von nahezu 100% (Newlands et al., 1992). TMZ ist ein Prodrug und konvertiert bei physiologischen pH-Werten spontan zum alkylierenden Agens Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid (MTIC). Durch die nicht-enzymatische Konversion lassen sich kaum interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik nachweisen (Tsang, 1991). MTIC zerfällt in den methylierenden Anteil Methyldiazonium und einen inaktiven Anteil, das 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid (AIC). Die Ausscheidung von AIC erfolgt vor allem über die Nieren (Tsang, 1990). Die Zytotoxizität wird durch die Methylierung der O⁶-Position der Base Guanin erreicht (Ostermann et al., 2004). Es kommt auch zu einer Alkylierung in der N⁷-Position von Guanin und der N³-Position von Adenin, diese scheinen jedoch keine Rolle bezüglich der Zytotoxizität zu spielen (Wick et al., 2009). Durchlaufen die Tumorzellen nun den Zellzyklus, wird am G₂-Kontrollpunkt die Veränderung in der

DNA bemerkt. Diese wird entweder behoben oder die Apoptose eingeleitet. Eine weitere Option ist, dass die Zelle in die G₀-Phase, das heißt in den Zellzyklusarrest, eintritt wodurch mehr Zeit für die DNA-Reparatur zur Verfügung steht. Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, können durch TMZ nicht geschädigt werden (Hirose et al., 2001).

Die „*Area under the curve*“, welche die Bioverfügbarkeit eines Pharmakons, hier die von TMZ in der cerebrospinalen Flüssigkeit, ausdrückt, beträgt etwa 20% der systemischen TMZ-Konzentration (Ostermann et al., 2004). Die maximalen Konzentrationen von TMZ im Plasma liegen bei $5,5 \pm 3,2$ µg/ml, in der cerebrospinalen Flüssigkeit bei $0,6 \pm 0,3$ µg/ml (Portnow et al., 2009). Die höchsten Plasmalevel erreicht TMZ 30-90 Minuten nach der Einnahme (Brada et al., 1999). Durch eine intakte Blut-Hirn-Schranke kommt es zu einem Konzentrationsabfall von TMZ im Bereich des Tumors. Im Zentrum des Tumors ist die Blut-Hirn-Schranke meistens vollständig zerstört, in der Peripherie und damit im Bereich des Tumorwachstums kann die Blut-Hirn-Schranke jedoch intakt sein (Wei et al., 2013). Dies ist eine der diskutierten Erklärungen für eine Therapieresistenz gegenüber TMZ. Eine Reihe weiterer Resistenzmechanismen, darunter das TMZ-Dosierungsschema, die Expression detoxifizierender Proteine wie MGMT (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) und ABCG2 (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*), das hypoxische Milieu im Tumor, sowie die Eigenschaften stammzellähnlicher Tumorzellen wurden beschrieben (Beier et al., 2011).

1.4 Resistenz gegenüber der Chemotherapie

Eine wichtige Determinante für die Wirksamkeit von TMZ ist die Aktivität des *mgmt*-Gens. Das *mgmt*-Gen kodiert für ein DNA-Reparaturenzym, welches die Alkylgruppe an der O⁶-Position des Guanins entfernt (Pegg, 1990). Es konnte in vielen Tumoren eine verminderte Expression des *mgmt*-Gens nachgewiesen werden. Diese beruht auf einer Hypermethylierung der CpG Inseln in der Promotor-Region des Gens, welche zum „*Gene-silencing*“ führt (Watts et al., 1997; Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2005). Diese Hypermethylierung konnte in 45-70% aller höhergradigen Gliome nachgewiesen werden (Ostermann et al., 2004; Wick et al., 2009). Entsteht durch die Einnahme von TMZ O⁶-Methylguanin kommt es während der Replikation zur Basenfehlpaarung von

O⁶-Methylguanin mit Thymin. Es resultiert der Austausch des Basenpaares Guanin-Cytosin gegen Adenin-Thymin. Ist der *mgmt*-Promotor hypermethyliert und dadurch die MGMT-Proteinexpression unterdrückt, kann die Demethylierung des O⁶-Methylguanins in der geschädigten DNA nicht stattfinden. Wenn der Promotor de- oder hypomethyliert ist, wird die Methyltransferase exprimiert und überträgt die Alkygruppe von der O⁶-Position des Guanins auf einen Cysteinylnrest in ihrem katalytischen Zentrum, wobei sich die Transferase inaktiviert (Pegg, 1990). Die Wirksamkeit von alkylierenden Medikamenten wie TMZ kann also direkt über die Syntheserate von MGMT-Molekülen in der Tumorzelle beeinflusst werden (Esteller et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebenszeit von Patienten mit methyliertem *mgmt*-Promotor nach einer Radiochemotherapie mit TMZ, verglichen mit einer Patientengruppe mit unmethyliertem *mgmt*-Promotor, signifikant verlängert ist. Die mediane Überlebenszeit betrug bei den Patienten mit methyliertem *mgmt*-Promotor 21,7 Monate, bei den Patienten mit unmethyliertem *mgmt*-Promotor 12,7 Monate (Hegi et al., 2005). Außerdem wurde festgestellt, dass die Gruppe der Patienten mit unmethyliertem *mgmt*-Promotor keinen Überlebensvorteil von einer kombinierten Radiochemotherapie mit TMZ gegenüber einer alleinigen Radiotherapie hatte (Hegi et al., 2005). Der Methylierungs-Status des *mgmt*-Promotors kann also als prognostischer Faktor genutzt werden. Aus den Ergebnissen der Studien NOA-08 und *Nordic Trial* wurde die Empfehlung abgeleitet, die Therapie bei älteren Patienten über 60 Jahren an den MGMT-Status anzupassen. Patienten mit unmethyliertem *mgmt*-Promotor oder unbekanntem MGMT-Status sollten eine alleinige hypofraktionierte Strahlentherapie erhalten. Bei methyliertem *mgmt*-Promotor profitieren die Patienten hingegen von einer Monotherapie mit einem alkylierenden Agens wie TMZ oder einer kombinierten Radiochemotherapie (Malmström et al., 2012; Wick et al., 2012).

Ein weiterer Faktor, der für die Reparatur von DNA eine Bedeutung hat, ist die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP). Es wurden bisher 16 verschiedene PARP Enzyme identifiziert, wobei nur PARP-1 und PARP-2 eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen (Schreiber et al., 2006). PARP-1 und PARP-2 erkennen DNA-Einzelstrangbrüche und leiten die Reparatur ein (Dantzer et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von PARP in verschiedenen Tumoren erhöht ist (Ossovskaya et al., 2010). Daraufhin wurden PARP-Inhibitoren entwickelt, diese wurden bisher an GBM-Zelllinien und im Tiermodell getestet (Cheng et al., 2005; Tentori et al., 2014). Die PARP-Inhibitoren sollen die Sensitivität der GBM-Zellen

gegenüber TMZ steigern. Wie oben beschrieben, erzeugt TMZ O⁶-Methylguanin, aber auch N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin. Die Methylierungen an der N⁷- und N³-Position können ohne PARP nicht repariert werden. N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin, die sonst keinen zytotoxischen Effekt haben, da sie durch das Basenexzisionsreparatur-System sofort behoben werden, führen durch Inhibition von PARP zu einer erhöhten DNA-Schädigung (Tentori und Graziani, 2009). Diese DNA-Schädigung führt dann zur Apoptose der Zelle oder zum Zellzyklusarrest.

Des Weiteren spielen verschiedene molekulare Transporter für die Chemoresistenz eine Rolle. Vermutlich sind bestimmte Transportproteine in der Lage das verabreichte TMZ, sobald es in die Zelle gelangt, wieder herauszutransportieren. Die Gruppe der ABC-Transporter steht hier im Fokus des Interesses. ABC-Transporter sind eine große Familie von Membranproteinen welche als Gemeinsamkeit eine ATP-bindende Kasette (engl. *ATP-binding cassette*; ABC) aufweisen (Higgins, 1992). Alle ABC-Transporter im menschlichen Organismus sind Exporter und befördern Substrate aktiv aus der Zelle. Man findet die ABC-Transporter im gesunden menschlichen Gehirn vorrangig an der Blut-Hirn-Schranke und den zerebralen Blutgefäßen, um das Gehirn vor toxischen Substanzen zu schützen (Zhang et al., 2003). Eine herabgesetzte Expression oder gestörte Funktion könnte also zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener ABC-Transporter in einer Subpopulation von Glioblastomzellen, den sogenannten SLGCs (engl. *stem like glioma cells*) erhöht ist. Die erhöhte Expression führt zu einer herabgesetzten Sensitivität gegenüber TMZ und anderen Chemotherapeutika (Martin et al., 2013). Für den gut erforschten Transporter ABCG-2 (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*; auch BCRP, engl. *breast cancer resistance protein*) wurde beobachtet, dass TMZ wahrscheinlich kein Substrat ist (Bleau et al., 2009). Es wird trotzdem vermutet, dass die ABC-Transporter eine entscheidende Rolle in der Wirksamkeit von TMZ spielen. Für den Transporter ABCC-1 (auch MRP1; engl. *multi-drug-resistance protein 1*) wurde ein spezifischer Inhibitor entwickelt. *In vitro* führt die Inhibition von ABCC-1 zu einem vermehrten Zelltod von GBM-Zellen unter einer Chemotherapie mit Vincristin und Etoposid, die Wirksamkeit von TMZ konnte jedoch nicht gesteigert werden (Tivnan et al., 2015). Bronger et al. (2005) untersuchten verschiedene ABC-Transporter auf Proteinebene, die Transporter ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3 und ABCC-6 ließen sich jedoch nicht in menschlichen Gliomen nachweisen. Die Bedeutung vieler ABC-Transporter für die Chemoresistenz von GBM-Zellen ist

bisher nicht endgültig geklärt. Es ist außerdem unklar, für welche Transporter TMZ als Substrat fungiert.

1.5 Tumorstammzellen des GBM

Bereits in den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass obwohl sich Tumoren von einzelnen Zellen ableiten, diese aus heterogenen Zellpopulationen zusammengesetzt sind (Park et al., 1971). Diese Beobachtung wurde mit zwei Modellen erklärt, dem stochastischen Modell und dem Tumorstammzellmodell (siehe Abb. 1). Geht das stochastische Modell davon aus, dass jede Tumorzelle die Fähigkeit hat eine Tochterzelle zu erzeugen und das Tumorstammzellmodell eine hierarchische Organisation der Tumorzellen, mit der Tumorstammzelle (engl. *cancer stem cell*; CSC) an der Spitze der Hierarchie (Clarke et al., 2006; Regenbrecht et al., 2008; Visvader und Lindeman, 2008; Welte et al., 2010). Das zweite Modell beruht somit auf der Vorstellung, dass es in der Masse der Tumorzellen eine kleine Subpopulation von Zellen gibt, die CSCs, welche Eigenschaften von Stammzellen aufweist und alle Typen von Tumorzellen generieren kann. CSCs besitzen das Potenzial zur Selbsterneuerung und Differenzierung, sie sind im Mausmodell tumorigen und exprimieren bestimmte Marker, darunter Proteine die man ansonsten nur in den korrespondierenden Stammzellen findet. Obwohl CSCs eine Minderheit unter den Tumorzellen ausmachen, sind sie für das Wachstum des gesamten Tumors verantwortlich und spielen eine Rolle bei der Metastasierung (Clarke et al., 2006; Regenbrecht et al., 2008; Schonberg et al., 2014).

Weiterhin teilen sich CSCs seltener als die Masse der Tumorzellen. Die derzeitigen onkologischen Therapieansätze zielen primär auf sich schnell teilende und wachsende Zellen ab und haben daher keinen Effekt auf CSCs (Regenbrecht et al., 2008). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass CSCs im GBM die Reparatur von DNA-Schäden besser induzieren als weiterdifferenzierte Zellen (Bao et al., 2006). Die Herkunft der CSCs ist nicht endgültig geklärt. Einerseits ist es möglich, dass sie sich aus somatischen Stammzellen oder Vorläuferzellen ableiten, die Mutationen anreichern. Andererseits könnten auch differenzierte Zellen durch Mutationen und den Erwerb von Stammzeleigenschaften zu Tumorstammzellen werden (Regenbrecht et al., 2008).

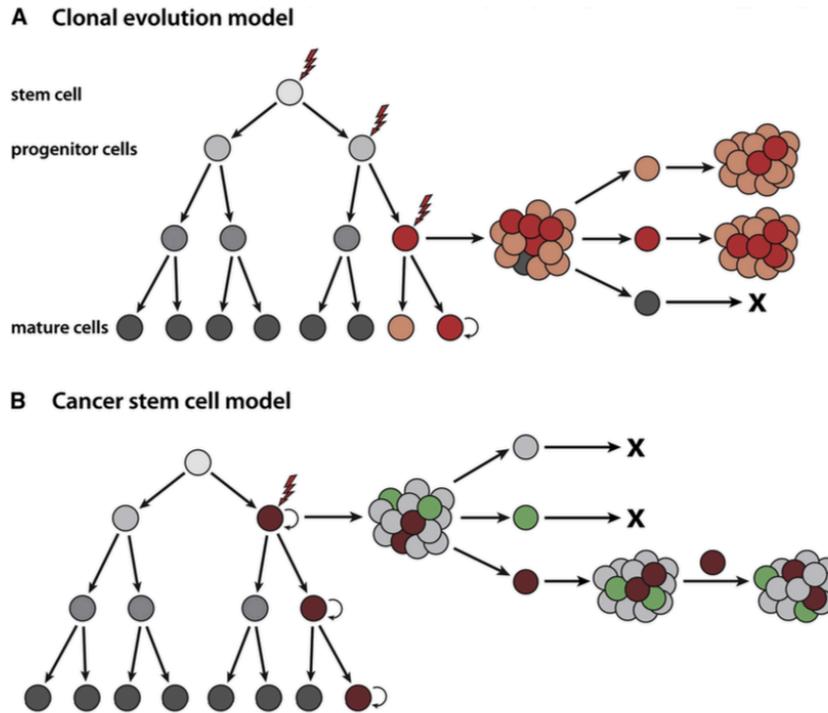


Abb. 1. Schematische Darstellung des stochastischen Modells und des Tumorstammzellmodells.

(A) Das stochastische Modell ist ein nicht-hierarchisches Modell, in dem Mutationen in Tumorzellen zu einem Wachstumsvorteil führen können. Die Abbildung zeigt eine rote Zelle, die verschiedene Mutationen entwickelt hat und aus der ein dominanter Klon entsteht. Die Tumorzellen (rot und orange) die aus diesem Klon entstehen haben ähnliche tumorigene Eigenschaften. Anderen Tumorzellen (grau) können diese Eigenschaften fehlen. Die Heterogenität eines Tumors entsteht durch die verschiedenen Zelltypen in der Tumormasse.

(B) Das Tumorstammzellmodell zeigt eine hierarchische Organisation der Zellen, in der eine kleine Subpopulation von Zellen die Eigenschaften der Selbsterhaltung und der Tumorigenität besitzt. Durch die Differenzierung der Zellen entsteht ein heterogener Tumor. In der Abbildung hat eine Mutation in einer Vorläuferzelle (braun) dazu geführt, dass diese Stammzeleigenschaften besitzt. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und aus ihnen entstehen verschiedene Typen von Tumorzellen (grau und grün). (Quelle: Visvader und Lindeman, 2012)

CSCs wurden erstmals in Leukämiepatienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) identifiziert und aus diesen isoliert. Inzwischen wurden aus den meisten soliden Tumoren CSCs isoliert und charakterisiert (Regenbrecht et al., 2008; Visvader und Lindeman, 2008). In zahlreichen Untersuchungen von primären GBMs konnten CSCs nachgewiesen werden (Überblick in Schonberg et al., 2014). In der Literatur werden diese Zellen als *brain tumor stem cells* (BTSCs), *glioma stem cells* (GSCs) oder auch als *stem like glioma cells* (SLGCs) bezeichnet. In unserer Arbeitsgruppe wird der Begriff SLGC verwendet. Der Grund dafür ist, dass Glioblastomzellen nicht nur im Tumor hierarchisch organisiert sind, sondern auch in *in vitro* Kulturen eine zelluläre Hierarchie ausbilden. Evidenzen hierfür wurden von Chen et al. (2010) publiziert. Diese

Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Gliomzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (engl. *self-renewal*) und Differenzierung aufweisen. An der Spitze dieser Hierarchie steht die CD133-negative Gliomstammzelle (Typ I-Zelle), die sich selbst erneuert oder in eine weiter differenzierte CD133-positive Typ II-Zelle differenziert. Die Typ II-Zelle wiederum kann sich ebenfalls selbst erneuern oder in einer weiterdifferenzierte CD133-negative Typ III-Zelle differenzieren. Auch die Typ III-Zelle kann sich noch selbst erneuern oder weiterdifferenzierte Tochterzellen erzeugen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung nicht mehr besitzen. Sowohl die Typ I-, als auch die Typ II- und Typ III-Zellen generieren nach Xenotransplantation in immunsupprimierte Mäuse orthotope Tumoren. Dabei unterscheiden sich die Tumoren hinsichtlich ihres Proliferationsindex und Wachstumsverhaltens. Wurden Typ I-Zellen xenotransplantiert zeigten die Tumoren ein invasives Verhalten und einen hohen Proliferationsindex. Mit zunehmender Differenzierung der transplantierten Zellen wurden die orthotopen Tumoren zunehmend benigner (Chen et al., 2010). Dabei ist zu beachten, dass eine Population mit Typ I-Zellen auch stets wechselnde Anteile an Typ II- und Typ III-Zellen aufwies. Die höchste Homogenität weisen die Zellpopulationen auf, die primär Typ III-Zellen enthalten, da die von diesen Zellen ausgehenden weiterdifferenzierten Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben (siehe Abb. 2).

Die Arbeiten von Chen et al. (2010) belegen nicht nur eine zelluläre Hierarchie von Gliomzellen *in vivo* und *in vitro*, sondern zeigen wie problematisch die Identifizierung geeigneter Marker für Gliomstammzellen ist. Nahezu alle früheren Arbeiten mit Gliomstammzellen nutzten Zellpopulationen, die mit Hilfe des Oberflächenproteins CD133/Prominin-1 und der Methode FACS (engl. *fluorescence-assisted cell sorting*) aus GBM-Biopsien isoliert wurden (Singh et al., 2004; Bao et al., 2006). Später zeigte sich, dass auch CD133-negative Zellen orthotope Tumoren in Mausmodellen generieren (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010). Analysen zur Therapiesensitivität wurden ebenfalls mit FACS-sortierten CD133-positiven Zellen durchgeführt. Insbesondere hinsichtlich der Sensitivität gegenüber TMZ kam es hierbei zu widersprüchlichen Ergebnissen. So beschrieben Beier et al. (2008), dass primär CD133-positiv Zellen durch die TMZ-Behandlung eliminiert werden, während andere Autoren eine relative Therapieresistenz von CD133-positiven Zellen beobachteten (Liu et al., 2006; Murat et al., 2008; Gaspar et al., 2010; Chen et al., 2012). Betreffend der Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen wurden die Analysen ebenfalls mit CD133-positiven

Zellpopulationen durchgeführt und diese CD133-negativen Zellpopulationen gegenübergestellt (Bao et al., 2006). Aus diesen Analysen wurde eine relative Radiotherapieresistenz CD133-positiver Zellen abgeleitet, die auf einer effizienteren Aktivierung von DNA-Reparatursystemen beruht (Bao et al., 2006).

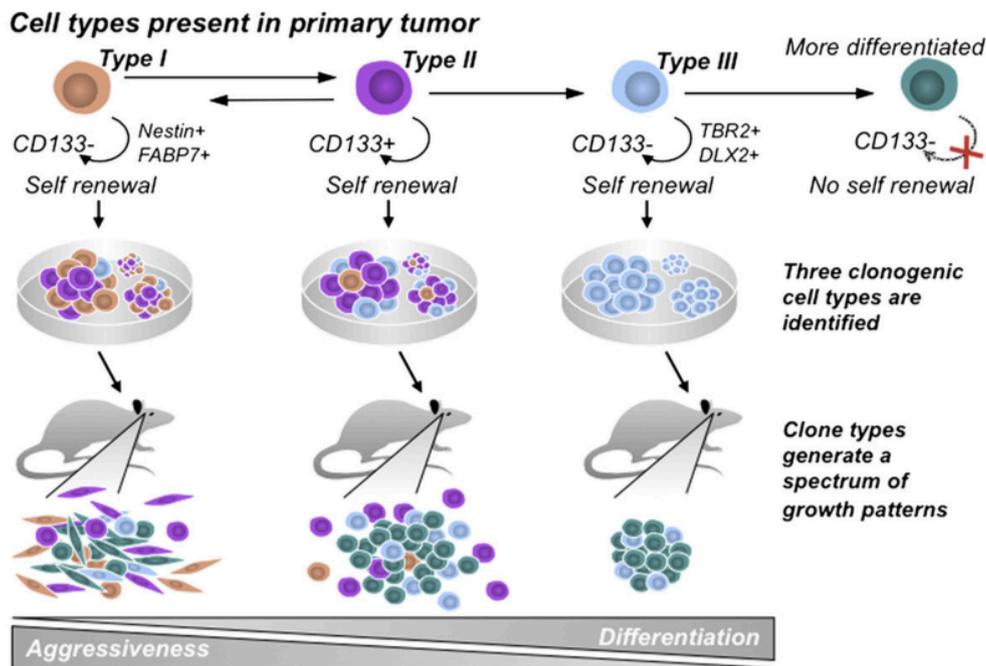


Abb. 2. Modell der hierarchischen Organisation von Typ I-, Typ II- und Typ III-Zellen im GBM.

Das dargestellte Modell zeigt die hierarchische Organisation klonaler Subtypen von SLGCs einer humanen GBM-Zelllinie. In Tumoren von GBM-Patienten ist eine analoge Hierarchie vorstellbar. CD133, engl. *cluster of differentiation* oder auch Prominin-1; FABP7, engl. *fatty acid binding protein*; TBR2, engl. *T-box brain protein 2*; DLX2, engl. *distal less homeobox protein 2*. (Quelle: Chen et al., 2010)

In unserer Arbeitsgruppe wurden die Beobachtungen von Chen et al. (2010) weitestgehend bestätigt (Hirsland, 2017). Dabei nutzen wir für das Anlegen der Gliomstammzellkulturen eine von der FACS-Sortierung abweichende, anerkannte Methode (Dirks, 2010). Bei dieser Methode werden alle Zellen einer Gliombiopsie in ein serumfreies Medium verbracht, das für neurale Stammzellen entwickelt wurde und die Wachstumsfaktoren EGF (engl. *epidermal growth factor*) und bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) enthält. Die Selektion auf bestimmte Zelltypen erfolgt dabei über das Medium, da nur Gliomzellen mit Eigenschaften ähnlich derer neuraler Stammzellen in diesem Medium proliferieren (Galli et al., 2004; Dirks, 2010). Generell werden auch die über FACS angereicherten CD133-positiven Zellen in serumfreiem Medium mit den identischen Komponenten expandiert. Gliomzellen die unter

serumfreien Bedingungen expandiert werden, zeigen den Phänotyp der korrespondierenden Zellen im Ursprungstumor, während serumhaltiges Medium eine Differenzierung induziert (Lee et al., 2006). Eine dritte Methode zur Gewinnung von Gliomstammzellen nutzt deren Autofluoreszenz in Kombination mit der FACS-Technologie. Obwohl sich mit dieser Methode Gliomzellen gewinnen lassen, die Stammzeleigenschaften aufweisen, differenzieren und orthotope Tumoren generieren (Clément et al., 2010) hat diese Methode im Gegensatz zur (a) CD133-basierten Zellsortierung und (b) Selektion über Medium kaum Eingang in die Praxis gefunden. Die Konsequenz der ersten Methode ist die Anreicherung von CD133-positiven Typ II-Zellen für Analysen, wobei die Gliomstammzelle (Typ I-Zelle) verloren geht. Häufig werden in Publikationen CD133-positive Kulturen CD133-negativen Kulturen gegenübergestellt ohne die Heterogenität der CD133-negativen Fraktion zu berücksichtigen. Dies erklärt möglicherweise die Widersprüche der oben beschriebenen Analysen zur TMZ-Resistenz und zeigt, dass es nötig ist, die Sensitivität von Gliomzellen für die gesamte Population der Gliomstammzellen (Typ I-, Typ II-, Typ III-Zellen) zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit wurde die TMZ-Sensitivität von Kulturen untersucht, die über Medium-Selektion gewonnen wurden und somit Typ I, II- und III-Zellen, also alle stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs), enthalten.

Phänotypisch gibt es zwischen SLGCs aus verschiedenen Patienten Unterschiede (Choschzick et al., 2014; Hirsland, 2017). Wurde in den initialen Experimenten mit Gliomstammzellen postuliert, dass SLGCs in serumfreien Kulturen grundsätzlich Sphäroide bilden, so zeigte sich später, dass das Tumorsphären-Assay nicht zur sicheren Identifizierung von SLGCs geeignet ist (Überblick in Schonberg et al., 2014). Außer SLGC-Kulturen mit Sphäroiden lassen sich solche mit semi-adhären Aggregaten und, seltener, adhärenem Wachstum identifizieren (Choschzick et al., 2014; Choschzick, 2015; Hirsland, 2017). Dabei ist der Grad an Stammzeleigenschaften, gemessen an der Expression des Pluripotenz-Faktors Sox2 (engl. *sex determining region Y(SRY)-box 2*) in Kulturen aller drei Wachstumsformen ähnlich (Choschzick et al., 2014). Der Transkriptionsfaktor Sox2 ist in Typ I-Zellen am höchsten exprimiert, in Typ II- und Typ III-Zellen etwas geringer vorhanden und in differenzierten Gliomzellen herunterreguliert (Chen et al., 2010). Es existieren noch weitere Evidenzen dafür, dass Sox2 der Schlüsselfaktor für die Determinierung des Stammzellcharakters von SLGCs ist (siehe Kapitel 1.6). Zur Expression der Pluripotenzfaktoren Nanog und insbesondere Oct3/4 in SLGCs gibt es widersprüchliche Daten. Während einige Arbeitsgruppen eine

Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4 in Gliomzellen beschreiben und diese mit der Tumorigenität der Zellen korrelieren (Guo et al., 2011; Ikushima et al., 2011), beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine Hypermethylierung des Oct3/4 Promotors in allen SLGC-Linien. Dabei waren noch geringe Oct3/4 mRNA Level in den Zellen nachweisbar, das Oct3/4 Protein jedoch nicht (Choschzick et al., 2014).

Stammzellähnliche Gliomzellen wurden auch aus Gliosarkomen, Astrozytomen (WHO Grad II und III) und Oligodendrogliomen (WHO Grad II und III) isoliert (Rebetz et al., 2008; deCarvalho et al., 2010; Choschzick et al., 2014; Raju, 2015). Während deCarvalho et al. (2010) den Eindruck gewannen, dass SLGCs aus Gliosarkomen kein CD133 exprimieren, beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine CD133-positive Subpopulation in Kulturen die sich von Gliosarkomen ableiten (Choschzick et al., 2014). Außerdem exprimieren SLGCs aus GBMs und Gliosarkomen das Intermediärfilament Nestin (Phillips et al., 2006; Veselska et al., 2006; Chen et al., 2010). Die Expression des sauren glialen Faserproteins GFAP ist nicht in allen SLGC-Linien nachweisbar, obwohl das GBM-Gewebe meist positiv für GFAP ist (Oh und Prayson, 1999; Goyal et al., 2015). In unserer Arbeitsgruppe konnten GFAP-positive SLGC-Linien in GBMs und Gliosarkomen nachgewiesen werden (Choschzick et al., 2014; Raju, 2015; Hirsland, 2017).

Obwohl die eindeutige Identifizierung von SLGCs und daher auch die Einordnung der Ergebnisse der Behandlungen mit TMZ und anderen Agenzien schwierig sind, besteht Einigkeit darüber, dass SLGCs eine wichtige Bedeutung für die Therapieresistenz und die Rezidiv-Bildung haben. So zeigt eine *live imaging* Analyse von Lathia et al. (2011), dass im Mausmodell die Bildung der orthotopen Tumoren von den SLGCs ausgeht, obwohl diese nur einen kleinen Teil der transplantierten Zellen ausmachen. In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass TMZ die weiter differenzierten Gliomzellen eliminierte und die Rezidiv-Bildung von Zellen ausging, die Stammzellmarker exprimieren (Chen et al., 2012). Weiterhin wurden Korrelationen zwischen der klinischen Prognose und dem Anteil von CD133-positiven Gliomzellen gefunden. Zeppernick et al. (2008) untersuchten Gliomzelllinien auf die Expression von CD133 und verglichen die Ergebnisse mit dem klinischem Verlauf der zugehörigen Patienten. So konnte ein niedrigerer Anteil von CD133-positiven Gliomzellen mit einem langsameren Fortschreiten des Tumorwachstums und auch einer insgesamt

verlängerten Überlebenszeit in Zusammenhang gebracht werden (Zeppernick et al., 2008).

1.6 Marker für stammzellähnliche Gliomzellen (SLGCs)

Bisher existiert kein universeller Marker für SLGCs (Schonberg et al., 2014). Außer den oben genannten Faktoren CD133/Prominin-1, Nestin und Sox2, werden weitere Proteine als mögliche SLGC-Marker diskutiert. Dazu zählen der ABC-Transporter ABCG2 (Bleau et al., 2009), der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 (Anido et al., 2010), das Zelladhäsionsmolekül L1CAM (Bao et al., 2008), das Integrin $\alpha 6$ /CD49f (Lathia et al., 2010), das RNA-bindende Protein Musashi (Thon et al., 2010), sowie SSEA1/CD15 (Son et al., 2009). Ob diese Marker in der Tat für die Identifizierung von SLGCs geeignet sind, kann nur beantwortet werden, wenn eine ausreichend große Anzahl verschiedener SLGC-Linien untersucht wurde. Dies gilt auch für die Proteine, die in Typ I-, Typ II- bzw. Typ III-Zellen differentiell exprimiert sind. Neben dem Fettsäurebindenden Protein FABP7 ist dies vor allem CD133 (Chen et al., 2010) (siehe Abb. 2). Marker, welche in zahlreichen publizierten Analysen relevant waren, sind CD133/Prominin-1, der Pluripotenzfaktor Sox2, sowie die Intermediärfilamente Nestin und GFAP.

Der am häufigsten genutzte SLGC-Marker ist weiterhin, trotz aller Einschränkungen, CD133/Prominin-1. Welche Bedeutung CD133 für die SLGC-Forschung hat, wird evidenzbasiert festzulegen sein. Aus diesem Grund wurde die Expression von CD133 auch in dieser Arbeit untersucht. Zwei Proteine die häufig in der SLGC-Forschung genutzt und in Typ I, II- und III-Zellen exprimiert werden, sind Nestin und Sox2 (Chen et al., 2010). Deren Eigenschaften und Bedeutung für SLGCs sollen im Folgenden genauer erklärt werden. Abschließend soll die Signifikanz des sauren glialen Faserproteins GFAP für die SLGC-Forschung besprochen werden.

Nestin ist ein Intermediärfilament (IF) welches während der Embryogenese und auch im adulten Gehirn in neuralen Stammzellen und Vorläuferzellen produziert wird. In differenzierten neuralen Zellen ist Nestin herunterreguliert. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Re-Expression in bestimmten pathologischen Situationen, wie Ischämie, Entzündungen und Tumorwachstum stattfindet. Nestin scheint unter anderem eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts, in der

Signaltransduktion der Zelle und im Zellmetabolismus zu spielen (Ehrmann et al., 2005). Nestin lässt sich außerdem in primären Gehirntumoren nachweisen, so auch im GBM (Dahlstrand et al., 1992). Im Kontext des GBMs scheint Nestin in den SLGCs lokalisiert zu sein (Chen et al., 2010; Phillips et al., 2006; Veselska et al., 2006). Es wird daher mit dem Stammzellcharakter dieser Zellen in Zusammenhang gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass Nestin-positive Tumorzellen das Potenzial zur Migration und invasivem Wachstum haben (Rutka et al., 1999).

CD133 ist ein glykosyliertes Protein mit fünf transmembranen Domänen. Zuerst wurde es als Oberflächenmarker auf hämatopoetischen Stammzellen identifiziert (Yin et al., 1997). CD133 wird häufig als Marker für Stammzellen eingesetzt, darunter neurale Stammzellen und auch SLGCs (Bidlemaier et al., 2008). Eine frühe Studie mit Gliomstammzellen zeigte, dass mit hundert CD133-positiven Tumorzellen Tumoren in immunsupprimierten Mäusen erzeugt werden konnten (Singh et al., 2004). Diese Studie legte die Vermutung nahe, dass Gliomstammzellen CD133 positiv sein müssen. Wie oben beschrieben ist diese Hypothese kritisch zu sehen. Zudem zeigten Wang und Kollegen, dass auch mit CD133-negativen Zellen orthotope Tumore erzeugt werden können (Wang et al., 2008). *In vivo* wiesen die aus CD133-negativen Zellen entstandenen Tumoren eine geringere Proliferationsrate im Vergleich zu den Tumoren auf, die sich von CD133-positiven Zellen ableiten (Beier et al., 2007). Basierend auf dem oben beschriebenen Hierarchiemodell von Chen et al. (2010) wäre nur die CD133-negative Typ I-Zelle als Gliomstammzelle einzuordnen. In Kombination mit dem Marker Nestin und dem Expressionslevel des Pluripotenzfaktors Sox2 können möglicherweise Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob es sich bei CD133-negativen Zellen um Gliomstammzellen/Typ I-Zellen oder um Typ III-Zellen oder noch weiter differenzierte Derivate handelt (siehe Abb. 2).

Das Gen *sox2* (engl. *sex determining region Y(SRY)-box 2*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der während der Embryogenese und im Rahmen von Zellschicksalsentscheidungen essenzielle Aufgaben übernimmt. Das Genprodukt ist einer von vier Faktoren mit denen aus differenzierten Fibroblasten pluripotente Zellen, sogenannte iPS (engl. *induced pluripotent stem cells*) gewonnen werden können (Takahashi und Yamanaka, 2006). Daher wird Sox2 in die Gruppe der Pluripotenzfaktoren eingeordnet. Im Gehirn von Säugetieren wird Sox2 benötigt um die Funktionen neuraler, adulter Stammzellen aufrechtzuhalten. Weiterhin können neurale

Stammzellen aufgrund der hohen endogenen Sox2-Level effizienter in iPS umprogrammiert werden als andere Zelltypen (Kim et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die *sox2*-Expression in Gliomen erhöht ist. Die Inaktivierung des *sox2* Gens führte zu einer eingeschränkten Proliferation und dem Verlust der Tumorigenität von SLGCs (Gangemi et al., 2009). Des Weiteren führte die *sox2* Inaktivierung zu einer herabgesetzten Migrationsfähigkeit und einem vermindertem invasiven Wachstum (Alonso et al., 2011). Damit übereinstimmend bewirkte die erhöhte Expression von *sox2* in Gliomzellen eine Steigerung von Migration und Invasivität, sowie ein gesteigertes Potenzial zur Selbsterneuerung und Proliferation (Garros-Regulez et al., 2016a). Somit ist davon auszugehen, dass Sox2 der kritische Pluripotenzfaktor in SLGCs ist. Dies wird auch durch die oben beschriebenen Arbeiten von Chen et al. (2010) zur zellulären Hierarchie bestätigt, da die Expression von Sox2 (und Nestin) in Typ I-Zellen am höchsten ist und mit zunehmender Differenzierung abnimmt (Chen et al., 2010).

Das saure gliale Faserprotein GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*) ist wie Nestin ein Intermediärfilament und wird in differenzierten Astrozyten exprimiert. GFAP ist aber nicht nur ein Marker für differenzierte Astrozyten, sondern wird auch in adulten neuronalen Stammzellen exprimiert (Doetsch et al., 1999; Robel et al., 2011). Die Funktion von GFAP in Astrozyten ist nicht endgültig geklärt. Experimente mit Mäusen, deren GFAP Expression supprimiert wurde, zeigten, dass die Funktion von GFAP sich je nach Lokalisation der Astrozyten im Gehirn unterscheidet (Brenner, 2014). So scheint GFAP in einigen Regionen des Gehirns einen wichtigen Einfluss auf die Anordnung der Astrozyten zu haben, in anderen Regionen scheint es eine Rolle bei der Reaktion der Astrozyten nach Verletzungen zu spielen (Wilhelmsson et al., 2004; Brenner, 2014). In den früheren Analysen zur Charakterisierung von Gliomstammzellen wird GFAP typischerweise als Differenzierungsmarker genutzt, der nach der Behandlung der Zellen mit Serum nachweisbar wird (Galli et al., 2004). Die Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass GFAP in einer Subgruppe von SLGC-Linien vorhanden ist, während es in anderen erst nach Induktion der Differenzierung nachweisbar ist (Choschzick et al., 2014; Raju, 2015; Hirseland, 2017). Somit muss im Einzelfall entschieden werden, ob GFAP in einer SLGC-Linie den undifferenzierten oder differenzierten Zustand anzeigt.

1.7 Zielsetzung

Wichtige Ursachen der hohen Morbidität und Mortalität des GBMs sind die molekulare und zelluläre Heterogenität. Die molekulare Heterogenität wird durch die Mutationen und Deregulierung von Signalwegen bedingt (siehe Kapitel 1.1). Die zelluläre Heterogenität beruht auf der Anwesenheit von SLGCs und weiter differenzierten Tumorzellen (siehe Kapitel 1.5). Unklar ist, inwieweit die molekulare Heterogenität die Eigenschaften der Tumorstammzellen beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden in einem ersten Schritt Zellen aus einer GBM-Tumorbiopsie (T1467) isoliert und hinsichtlich der Expression von Markern charakterisiert. Die Zelllinie wurde in einem serumfreien Medium mit den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF kultiviert und über mehrere Passagen hinweg untersucht. Dabei wurde primär auf die Parameter Sphärenbildung, sowie Expression von Sox2, Nestin und GFAP geachtet (Immunzytochemische Analysen, Western Blot-Analysen). Zum Vergleich wurde aus einem Meningeom (T1469) eine Zelllinie angelegt und als Kontrolle bearbeitet. Die Ursprungstumoren (T1467, T1469) wurden zudem immunhistologisch untersucht. Nach Abschluss der Charakterisierung wurden diese Zelllinien, sowie weitere im Labor verfügbare Zelllinien aus GBMs (T1440, T1442, T1522, T1524, T1549, T1556) bzw. einem Gliosarkom (T1371), ausgewählt und in das Gehirn immunsupprimierter Mäuse inokuliert. Die untersuchte Tumorigenität stellt ein wichtiges Kriterium für die Arbeiten mit SLGCs dar. Um Unterschiede zwischen SLGCs aus verschiedenen Patienten zu ermitteln wurden in der Arbeitsgruppe >70 SLGC-Linien angelegt, von denen jedoch nur ca. ein Drittel stabil proliferierende Kulturen ergaben (Raju, 2015). Acht dieser SLGC-Linien, sowie eine Meningeom-Linie (T1469) wurden in dieser Arbeit auf ihre Fähigkeit orthotope Tumoren zu erzeugen, untersucht. Weitere SLGC-Linien oder Klone dieser wurden von den Kollegen im Labor untersucht (Choschzick et al., 2014; Raju, 2015; Hirseland, 2017; Loy, 2018). Um zu prüfen, ob sich der Phänotyp der SLGCs aufgrund der Passage durch das Mausgehirn ändert, sollten von makroskopisch sichtbaren orthotopen Tumoren ebenfalls Zellkulturen angelegt werden.

Als zweiter Themenkomplex wurde in der vorliegenden Arbeit die Sensitivität von im Mausmodell untersuchten SLGC-Linien auf die Behandlung mit Temozolomid (TMZ) untersucht. Da verschiedene Faktoren für die TMZ-Sensitivität relevant sein können, wurden mehrere experimentelle Strategien genutzt. Erstens wurde mittels MSP (engl. *methylation specific PCR*) der Methylierungsstatus des *mgmt*-Promotors ermittelt.

Zweitens wurde mittels BrdU-ELISA (engl. *5-Bromo-2'-deoxy-uridine-Enzyme-linked immunosorbent Assay*), MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) und einem Zytotoxizitäts-Assay die Wirkung von steigenden Dosen von TMZ auf die Proliferation und Vitalität der Zelllinien untersucht. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Stammzellcharakter der Zelllinien und der TMZ-Sensitivität zu ermitteln, wurde weiterhin der Anteil an CD133-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie und das Sox2-Expressionslevel mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Zusätzlich wurde eine Zellzyklus-Analyse der mit TMZ behandelten Zelllinien mittels Propidium-Jodid-Markierung und anschließender Durchflusszytometrie, sowie eine Messung der Induktion der PARP- (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) Spaltung mittels Western Blot durchgeführt. Die Polymerase PARP ist ein Zielprotein der Caspase 3 und deren Spaltung somit ein Indiz für die Aktivierung von Apoptose (Porter und Jänicke, 1999).

Da eine relative TMZ-Resistenz auch auf der Expression bestimmter ABC-Transporter beruhen kann, wurde die Expression der ABC-Transporter ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden semi-quantitative RT-PCRs mit Zellen aus TMZ-behandelten Kulturen und Kontrollen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumormaterial

Das Tumormaterial entstammt chirurgisch resezierten Gehirntumoren, die Operationen fanden in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) statt. Die Patienten wurden über die Verwendung des Tumorgewebes aufgeklärt und stimmten danach der Verwendung des Tumormaterials für Forschungszwecke schriftlich zu. Für den Einsatz des Tumormaterials zu Forschungszwecken liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Votum 08-070 vom 27.06.2008). Das entnommene Gewebe wurde zur Beurteilung einem Pathologen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) vorgelegt. Die Tumoren wurden nach den WHO-Kriterien (Louis et al., 2007) klassifiziert. Die Gewebeproben wurden anonymisiert. Sie werden im Weiteren mit einem "T" und einer fortlaufenden Nummerierung benannt. Die Tabelle 1 zeigt die verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft und wichtige Eigenschaften.

2.1.2 Tiermodell

Die Tierversuche wurden gemäß der EU-Richtlinie 86/609/EWG und dem nationalen Tierschutzgesetz mit Zustimmung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (Versuchsvorhaben 30/q/08- V242-72241.122-13 (77-8/08)). Für die Xenotransplantation von Tumorstammzellen wurde die Mausrasse „SCID Hairless Outbred Mouse“ (SHO-PrkdcSCIDHrhr) ausgewählt (Charles River Research Laboratories, Sulzfeld, D). Diese Rasse ist die Kreuzung einer SCID-Mausrasse (engl. *severe combined immunodeficiency*) und einer haarlosen Mausrasse. Diese Mäuse haben einen Immundefekt und besitzen keine funktionierenden T- und B-Zellen. So kommt es bei Xenotransplantationen nicht zu einer Abstoßungsreaktion. Tabelle 2 zeigt die Rahmenbedingungen des Experiments.

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Tumor	Nestin	GFAP	mgmt
T1371	w, 76 J.	Gliosarkom	pos.*	(pos.)*	u*
T1440	m, 58 J.	Gliom	pos.*	pos.*	m*
T1442	m, 65 J.	GBM	pos.*	(pos.)*	m/u*
T1467	m, 50 J.	GBM-Rezidiv	pos.#	pos.#	u/m#
T1467-SCID	SCID-Maus	orthotop	pos.#	pos.#	u/m#
T1469	w, 48 J.	Meningeom	neg.#	pos.#	u#
T1495	w, 70 J.	GBM	pos.*	pos.*	m/u*
T1522	m, 67 J.	GBM	pos.*	(neg.)*	u/m*
T1524	w, 63 J.	GBM	pos.*	n.d.	u/m*
T1549	m, 56 J.	GBM	pos.*	n.d.	u/m*
T1556	w, 71 J.	GBM	pos.*	n.d.	n.d.
T1564	w, 22 J.	Astrozytom Grad III	pos.*	n.d.	n.d.

Im Fall der mgmt-Promotormethylierung wurde der MGMT-Status der vorliegenden Passage untersucht bzw. eine Erstbestimmung vorgenommen. Die ausgeprägtere Bande bei der Ermittlung des MGMT-Status wird zuerst genannt. Grenzwertige Ergebnisse des GFAP-Status sind in Klammern gesetzt. # markiert eigene Daten, * markiert Daten der Kollegen in der Arbeitsgruppe. GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*; mgmt, O₆-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; m, männlich; w, weiblich; J., Jahre; SCID, engl. *severe combined immunodeficiency*; GBM, Glioblastoma multiforme, u, unmethyliert; m, methyliert; n.d., nicht durchgeführt.

Tabelle 2. Rahmenbedingungen für die Inokulationen von Zellen in SCID-Mäuse.

Rasse	SCID Hairless Outbred Mouse (SHO-Prkdc ^{SCID} Hr ^{hr})
Alter	6-8 Wochen
Gewicht	mindestens 20g
Geschlecht	weiblich
Züchter	Charles River Research Laboratories (Sulzfeld, D)
Haltung	maximal 4 Mäuse pro Käfig
Futter	Vollfutterpellets (Altromin Spezialfutter GmbH, Lippe, D), Leitungswasser
Observation	3 Mal pro Woche

SCID, engl. *severe combined immunodeficiency*. Die Angaben für Alter und Gewicht beziehen sich auf den Zeitpunkt der Inokulation.

2.1.3 Zellkulturmedien

Tabelle 3. Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Medium	Zusammensetzung	Anwendung
Basismedium	DMEM/Ham's F-12 (96%), L-Glutamin 200 mM (2%), Penicillin/Streptomycin (1%), Amphotericin (1%)	N-Medium, Stoppmedium
Serumfreies Stammzellmedium (N-Medium)	Basismedium (80%), BIT-9500 (20%), hu-rEGF (20 ng/ml), hu-rbFGF (20 ng/ml)	Kultivierung von Tumorzellen
Medium für die Zelllinie U87MG	DMEM (89%), FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (1%)	Kultivierung der Zelllinie U87MG
Medium für die Zelllinie CaCo ₂	DMEM (79%), FCS (20%), Penicillin/Streptomycin (1%)	Kultivierung der Zelllinie CaCo ₂
Stoppmedium	Basismedium (90%), FCS (10%)	Inaktivierung von Trypsin/EDTA

L-Glutamin, Antibiotika, Fungizide, sowie die Wachstumsfaktoren wurden von PromoCell (Heidelberg, D) bezogen, das BIT-9500 von PelloBiotech (Martinsried, D). DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom, Berlin, D); FCS, fetales Kälberserum (Gibco BRL, Karlsruhe, D); EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; bFGF, basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor; U87MG, Uppsala 87 malignes Gliom.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4. Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
BrdU-ELISA-Fixierlösung	70 ml 100% Ethanol, 23 ml Aqua bidest., 6,7 ml 25% HCl
BrdU-ELISA-Waschlösung	DMEM + 10% FCS
Coomassie-Entfärber	7,5 % Essigsäure 25% Ethanol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie R 250, 10% Essigsäure, 50% Ethanol

FACS-Puffer	1x PBS, 0,5% FCS, 2 mM EDTA
JLB-Puffer	50 mM Tris-Hcl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% Triton-X100
Laemmli Puffer	25 ml Sammelgelpuffer, 40 ml 10% SDS, 20 ml 85% Glycerol, 10 ml β - Mercaptoethanol, 5 ml 2,5% Bromphenolblau
MOPS-RNA-Laufpuffer	20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
MTT-Lösung	5 mg MTT in 1 ml 1x PBS
MTT-Stopplösung	50 ml Aqua dest., 50 ml N,N Dimethylformamid, 10 g SDS
PBS (10x) pH 7,4	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
PI/FACS-Mix	950 μ l 1x PBS, 40 μ l Propidium-Jodid, 10 μ l RNase
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	30 g Tris-Base und 144 g Glycin in 1,8 l Aqua dest. lösen, 100 ml 10% SDS, mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g Tris-Base in 160 ml Aqua dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 6,8 einstellen, 2 ml 10% SDS, mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

SDS-PAGE Trenngelpuffer	36,3 g Tris-Base in 160 ml Aqua dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 8,8 einstellen, 2 ml 10% SDS, mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen
TE-Puffer für MSP-Assay	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA
Western Blot Blocking-Puffer	1% Trockenmilch in 1x PBS
Western Blot Transferpuffer	5,8 g Tris-Base, 2,9 g Glycin, 10% SDS, zu 800 ml Aqua dest., 200 ml Methanol
Western Blot Waschpuffer	1000 ml 1x PBS, 500 µL Tween-20

Sofern nicht anders angegeben wurden die Salze und Lösungen von Roth (Karlsruhe, D) und J.T. Baker (Deventer, NL) bezogen. BrdU-ELISA, engl. *5-Bromo-2'-deoxy-uridine-Enzyme-linked immunosorbent Assay*; HCl, Salzsäure; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom, Berlin, D); FCS, fetales Kälberserum (Gibco BRL, Karlsruhe, D); FACS, engl. *fluorescence-assisted cell sorting*; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; Tris, Tris-aminomethan; NaCl, Natriumchlorid; SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*; MOPS, Morpholinopropansulfonsäure; MTT, Dimethylthiazol-diphenyltetrazoliumbromid; KCl, Kaliumchlorid; Na₂HPO₄, Dinatriumhydrogenphosphat; KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat; PI, Propidium-Jodid; SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; MSP, engl. *methylation-specific-PCR*.

Weitere Angaben zu Materialien, Geräten, Puffern und Lösungen befinden sich in den Beschreibungen der jeweiligen Methoden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Um die Tumorzellen in Kultur zu bringen, wurden verschiedene Arbeitsschritte durchgeführt. Das Tumormaterial wurde in eine 6-Loch-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) mit kaltem PBS überführt und zunächst Blutgefäße und andere Anhaftungen entfernt. Danach wurde der Tumor mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in die nächste Vertiefung der Platte überführt und mit EBSS (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D) gewaschen. Dann wurde das Tumormaterial in eine weitere Vertiefung überführt, die 4 ml PBS plus 1 ml

Trypsin/EDTA (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D) enthielt und für 10 – 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Je nach Gewebekonsistenz wurde die Dauer der enzymatischen Dissoziation auf 40 min verlängert. Zum Abschluss wurde mit einer 5 ml Einmal-Plastikpipette (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) mechanisch dissoziiert und das Trypsin/EDTA durch Zugabe von 5 ml fetalem Kälberserum (FCS) (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D) gestoppt. Die Suspension wurde anschließend für 5 min bei 250 x g zentrifugiert (Rotina 380R, Hettich AG, Tuttlingen, D). Das Pellet wurde in 1 ml N-Medium resuspendiert, danach weitere 4 ml Medium dazugegeben und in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhause, D) überführt.

Für die Gliomzellen wurde serumfreies Medium (N-Medium, siehe Tabelle 3) benutzt. Für die CaCO₂-Zelllinie, welche einem kolorektalen Adenokarzinom entstammt und Kontrollzwecken diente (siehe Kapitel 2.2.8.1), wurde ein serumhaltiges Medium verwendet (siehe Tabelle 3). Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus Hera Cell, Heraeus, Hanau, D) bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert.

Ein Drittel des Mediums wurde zweimal pro Woche erneuert. Sobald adhärente und/oder semi-adhärente Zellen sichtbar wurden, wurden diese passagiert. Generell wurden adhärente Zellen passagiert, sobald eine Konfluenz von etwa 80-90% erreicht war. Jene Zelllinien, die als Sphäroide wuchsen, wurden passagiert sobald im Inneren der Sphäroide bräunliche Verfärbungen auftraten. Die Verdünnung der Zellen in der Passage wurde abhängig vom Wachstum der jeweiligen Zelllinie vorgenommen, meist lag diese für Primärkulturen zwischen 1:2 und 1:5.

Zum Passagieren der Zellen wurde bei den adhären Kulturen zunächst das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden abzulösen bzw. Sphären zu dissoziieren, wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %, Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D) verwendet. Nach 2 bis 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und mechanischem Dissoziieren wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 ml „Stoppmedium“ (siehe Tabelle 3) beendet. Danach wurden die abgelösten Zellen in ein steriles 10 ml Einmal-Plastikröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) überführt und für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge: Rotina 380R; Hettich AG, Bäch, CH). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 1 ml 1x PBS oder Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in ausreichend hoher Anzahl in frische Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2 Tierexperimente

2.2.2.1 *Xenotransplantation*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert und in PBS resuspendiert. Um die Zellzahl für die Inokulation zu berechnen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Roth, Karlsruhe, D) vermischt und mittels Neubauer Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, D) die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden so resuspendiert, dass sich 50.000 Zellen in 1 µl befanden.

Die SCID-Mäuse wurden mit einer Mischung aus 0,8 ml Rompun (Wirkstoff: Xylazine, Bayer HealthCare, Leverkusen, D), 1,2 ml Ketavet (Wirkstoff: Ketamin, Pfizer, Berlin, D) und 8,0 ml NaCl (Avantor, Center Valley, PA, USA) betäubt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit 7-10 µl pro g Körpergewicht. Die betäubten Mäuse wurden für die Inokulation der Zellen in einem stereotaktischen Rahmen (TSE Systems, Bad Homburg, D) fixiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Hamiltonspritze (Gastight 1705 RN µl 22S/51/2, Hamilton, Bonaduz, CH) aufgezogen und am stereotaktischen Rahmen befestigt. Die Kopfhaut wurde mittels Skalpell über der Medianlinie des Schädels inzidiert. Es wurde das Bregma aufgesucht, dies ist der Punkt an dem sich die Kranznaht (Sutura coronalis) und die Pfeilnaht (Sutura sagittalis) treffen. 3 mm rechts lateral des Bregmas und 1 mm occipital wurde der Schädelknochen vorsichtig mit einer 27 Gauge Kanüle durchbohrt. Durch das Loch wurde die Kanüle der Hamiltonspritze eingeführt, 3mm tief ins Gehirn vorgeschoben und dann langsam die Zellsuspension injiziert. In der Regel wurden 50.000 Zellen in 1 µl, 150.000 in 3 µl oder 250.000 in 5 µl injiziert. Im Falle von Wiederholungen des Experiments oder Nachtstungen wurden 100.000 und/oder 200.000 Zellen eingesetzt. Das Loch im Schädelknochen wurde mit Knochenwachs (Braun, Melsungen, D) verschlossen und die Haut mit nicht-resorbierbaren Einzelknopfnähten (Ethilon II blau, Stärke 3-0, Ethicon, Norderstedt, D) adaptiert. Als Positivkontrolle und zur Etablierung des Prozederes wurde die etablierte Glioblastom-Zelllinie U87MG eingesetzt, die auf die Fähigkeit zur Tumorbildung im Mausgehirn selektiert wurde (persönliche Mitteilung PD Dr. rer. nat. C. Zechel).

Die Versorgung der Mäuse mit Futter und Trinkwasser, sowie die Reinigung der Käfige wurden vom Personal der gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck (Leitung: Dr. med. B. Schmelting) übernommen. Die Mäuse wurden dreimal pro Woche untersucht. Dabei wurde auf motorische Störungen und äußerliche Auffälligkeiten

geachtet. Zusätzlich wurde das Gewicht der Mäuse kontrolliert, da ein Gewichtsverlust im Tiermodell häufig mit einem Tumorwachstum einhergeht. Zeigte ein Tier Auffälligkeiten oder einen Gewichtsverlust von 10% des Körpergewichts innerhalb einer Woche wurde es geopfert. Spätestens nach 12 Wochen wurden alle Mäuse nach Anweisungen des Verantwortlichen Leiters der gemeinsamen Tierhaltung getötet.

2.2.2.2 *TMZ-Behandlung der SCID-Mäuse*

Gliomzellen, die tumorigen im Mausmodell waren, wurden für weitere Tierexperimente selektiert. Dabei wurde eine definierte konstante Zellzahl implantiert und eine Temozolomid (TMZ) Behandlung der inokulierten Mäuse angeschlossen.

Das Temozolomid (TMZ, Temodal®, MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, D) wurde oral über das Trinkwasser der Mäuse verabreicht. Die Zielkonzentration wurde analog zum Therapieregime in der Klinik auf 150 mg/m² Körperoberfläche festgelegt. Die Berechnung der Körperoberfläche (KOF) wurde mit der Mosteller-Formel (Mosteller, 1987) durchgeführt:

$$\text{KOF [m}^2\text{]} = \sqrt{(\text{Gewicht [kg]} \times \text{Größe [cm]}) \div 3600}$$

Bei einem durchschnittlichen Gewicht der Mäuse von 25 g und einer durchschnittlichen Größe von 10 cm ergibt sich eine KOF von 0,00833 m².

Für die Herstellung der TMZ-Lösung wurde der Inhalt von 5 mg TMZ-Kapseln in Leitungswasser mit einem Rührstab (IKA, Staufen, D) auf einem Magnetrührer (Ikamag Rec-G, IKA, Staufen, D) aufgelöst. In der Tierhaltung wurde in jede Trinkflasche 200 ml der TMZ-Lösung gefüllt und die Lösung 3 Mal pro Woche gewechselt.

2.2.2.3 *Sektion der SCID-Mäuse und histopathologische Analyse*

Die getöteten Mäuse wurden einer Sektion unterzogen. Der Schädel wurde mit einer Schere eröffnet und das Gehirn im Ganzen entfernt. Das Gehirn wurde für 24 h in 4% Paraformaldehyd (Roth, Karlsruhe, D) fixiert und anschließend in 70% Ethanol (Roth, Karlsruhe, D) aufbewahrt. Zusätzlich wurden die inneren Organe der Mäuse auf Anzeichen für pathologische Veränderungen untersucht.

Für die histopathologische Analyse wurden die fixierten Gehirne durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und gehärtet, durch Xylol entfettet und in Paraffin eingebettet. Das Einbetten erfolgte durch das Institut für Dermatologie des

Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) im Gerät ASP300 S (Leica, Bensheim, D) nach folgendem Programm:

Formalin für 2 h bei 40 °C → 70%-Ethanol für 0,5 h bei 40 °C → 80%-Ethanol für 1 h bei 40 °C → 96%-Ethanol für 1 h bei 40 °C → 96%-Ethanol für 1 h bei 40 °C → 100%-Ethanol für 1 h bei 40 °C → 100%-Ethanol für 1,5 h bei 40 °C → 100%-Ethanol für 1,5 h bei 40 °C → Xylol für 1 h bei 40°C → Xylol für 1 h bei 45 °C → Paraffin für 1 h bei 62 °C → Paraffin für 1 h bei 62 °C → Paraffin für 1 h bei 62 °C.

Zum Schneiden der Präparate wurde ein Mikrotom (Leica RM 2245, Leica Biosystems, Nussloch, D) benutzt. Die Gehirne wurden mit einem koronaren Schnitt etwas occipital der Einstichstelle der Inokulationsnadel geteilt. Es wurden 4,5 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgebracht und bis zur Färbung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die H.E.-Färbung wurden die Schnitte in der unten aufgelisteten Reihenfolge in die genannten Reagenzien getaucht.

1. Xylol (10 min) → Xylol (10x) → 2x Ethanol 100% (je 10x) → 2x Ethanol 96% (10x)
2. → 2x Ethanol 70% (je 10x) → 2x Ethanol 50% (je 10x)
3. → Aqua demi. (eintauchen bis das Wasser nicht mehr abperlt)
4. → Hämatoxylin (10-15 min) → Bläuen (max. 15 min) → Eosin (1-2 min)
5. → Leitungswasser (1x) → Ethanol 70% (1x) → 2x Ethanol 96% (je 1x)
6. → 2x Ethanol 100% (je 1x) → Xylol (1x) → Xylol (min. 10 min)

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt (O.Kindler GmbH, D) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (BZ 8000, Keyence, Neu-Isenburg, D) wobei die Schnitte in unterschiedlichen Vergrößerungen fotografiert wurden.

2.2.3 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene (RT-PCR)

Die RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wurde durchgeführt, um die Expression bestimmter Gene zu untersuchen. Es wurden die Expressionen von mRNAs analysiert, die für die ABC-Transporter (engl. *ATP-binding cassette*) ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 kodieren. Des Weiteren wurde die

Expression von CD133/Prominin-1 auf RNA-Ebene ermittelt. Als Referenz diente *gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 5. Primer für die RT-PCR.

Primer	Sequenz	Temp. [°C]
gapdh	V: 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT -3'	60
	R: 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT-3'	
ABCC-1	V: 5'-GAG ACA GCT CAG CAG CTC-3'	56
	R: 5'-GAG TAG CCA AAC ACG GCG ATC-3'	
ABCC-2	V: 5'-CAG AGA CAG CTC AGC AGC TC -3'	62
	R: 5'-GAT CGC CGT GTT TGG CTA CTC C-3'	
ABCC-3	V: 5'-TGC CAT GGC TGC TCC CTA C-3'	60
	R: 5'-TGG ACA CCC CCA CAA GCT C-3'	
ABCC-6	V: 5'-CTG TCT CCA AGC CAT TGG GC-3'	62
	R: 5'-AGC CAC CAG TCG CGG GAA AC-3'	
ABCG-2	V: 5'-AAA GCG CTG CCT CCG AGC-3'	60
	R: 5'-GGT CAT TGG AAG CTG TCG C-3'	
CD133	V: 5'-GCA TTG GCA TCT TCT ATG GTT-3'	56
	R: 5'-CGC CTT GTC CTT GGT AGT GT-3'	

Alle Primer waren für die humane Sequenz spezifisch. Temp., Anlagerungstemperatur; V, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer; A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin; gapdh, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ABC, engl. *ATP-binding cassette*; CD, engl. *cluster of differentiation*.

2.2.3.1 RNA-Isolation und DNase I-Behandlung

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) verwendet. Das Verfahren wurde dem Herstellerprotokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology“ entsprechend ausgeführt. Es wurden ausschließlich RNase-freie Materialien verwendet. Abhängig von der Größe des benutzten Zellpellets wurden 350 µl ($\leq 5 \times 10^6$ Zellen) bzw. 600 µl ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen) Puffer RLT hinzugegeben. Das Zelllysat wurde mit Hilfe einer 21 Gauge-Kanüle (Braun, Melsungen, D) homogenisiert und die DNA geschert. Es folgte die Aufreinigung der RNA indem 350 µl (bzw. 600 µl) 70%iger Ethanol hinzupipettiert wurden und die Probe auf eine Säule („RNeasy spin column“) gegeben wurde. Nach der

Zentrifugierung (1 min, 8000 x g, Raumtemperatur) wurde die Säule erst mit 700 µl Puffer RW1 und anschließend mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Danach wurde die Säule trocken zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Zuletzt wurde zur Eluierung der RNA 50 µl RNase-freies Wasser (Ambion, Darmstadt, D) auf die Säule pipettiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1 min bei 8000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

Nach der RNA-Extraktion, sowie vor und nach der DNase I-Behandlung und Phenol/Chloroform-Extraktion fand eine Überprüfung der Integrität der RNA Präparationen mittels denaturierender Agarosegele (siehe unten) statt. Es wurden 1,2%ige Agarosegele hergestellt.

Um die RNA von eventuell vorhandener genomischer DNA zu reinigen, wurde eine DNase I-Behandlung durchgeführt. Hierzu wurde die eluierte RNA in 1x DNase-Puffer mit 1 µl (2 Units) DNase I (Ambion, Darmstadt, D) für 30 min bei 37°C im Heizblock (MBT, ETG, Ilmenau, D) behandelt. Zur Entfernung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion nach Standardprotokoll (Green und Sambrook, 2012) vorgenommen. Hierzu wurde 1 Volumenteil (VT) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, Roth, Karlsruhe, D) zu den Proben pipettiert, gevortext und anschließend die Phasen durch Zentrifugieren (5 min, 5000 x g, Raumtemperatur) getrennt. Die organische Phase wurde abpipettiert und die wässrige Phase mit 1 VT Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde danach in ein nukleasefreies Reaktionsgefäß (Ambion, Darmstadt, D) überführt.

Zur Fällung der RNA wurden 3 M nukleasefreies Natrium-Acetat (Endkonzentration 0,4 M, Ambion, Darmstadt, D) und 2,5 VT 100% Ethanol zugegeben und gevortext. Die Proben wurden für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert, um die Präzipitation zu vervollständigen. Danach wurde für 15 min bei 18000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 90% Ethanol gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 18000 x g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 50 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion, Darmstadt, D) gelöst. Vor der weiteren Verwendung der RNA-Proben wurden eine elektrophoretische Analyse auf Formaldehyd-Gelen und eine photometrische Konzentrationstestung durchgeführt.

Das denaturierende Agarosegel enthält Formaldehyd (Honeywell, Seelze, D) in einer Endkonzentration von 2,2 M sowie 1x MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)-RNA-Laufpuffer (siehe Tabelle 4) und Agarose (Biozym, Oldendorf, D). 5 µl der extrahierten RNA wurden mit je 15 µl Formaldehyd-Ladepuffer (Ambion, Darmstadt, D) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-RNA-Laufpuffer bei 100 V. Anschließend wurde das Gel durch eine 20 minütige Inkubation in Ethidiumbromidhaltiger 0,1 M NH₄-Acetat-Lösung gefärbt und dann mehrfach in 0,1 M NH₄-Acetat entfärbt. Zur Darstellung der RNA wurde das Gel im ChemiDoc XRS (BioRad, München, D) unter UV-Licht fotografiert. Typischerweise weisen intakte RNA-Präparate starke Banden für die 28s und 18s rRNA in einem definierten Verhältnis auf (Green und Sambrook, 2012). Zusätzlich zur Gelelektrophorese wurde eine Konzentrationsbestimmung der RNA am Photometer (Helios Omega UV-Vis, Thermo Scientific, Schwerte, D) durchgeführt. Die Absorptionsmessung fand bei λ 260 nm statt. Die Messungen wurden mit je 1,5 µl Probe und einer Nanoküvette (Thermo Scientific, Schwerte, D) vorgenommen.

2.2.3.2 *Synthese der cDNA*

In einem ersten Schritt wurde ein Aliquot (10 µl) der RNA-Proben mit RNase-freiem Wasser auf 250 ng/µl eingestellt. Waren innerhalb einer Versuchsgruppe Proben mit geringerer Konzentration vorhanden wurden alle Proben auf 100 ng/µl eingestellt. Die RNA-Proben wurden in PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym, Oldendorf, D) im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, USA) denaturiert um Sekundärstrangbildungen aufzulösen. Dabei wurden die Proben für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend innerhalb von wenigen Sekunden auf 4 °C heruntergekühlt. Für die cDNA-Synthese wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche, Mannheim, D) verwendet und ein Mastermix angesetzt, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6. Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Volumen pro Reaktion [µL]	Konzentration
DEPC-behandeltes Wasser	7,2	-
Random Primer *	2,0	0,08 A ₂₆₀ units
MgCl ₂ *	4,0	5 mM
dNTPs *	2,0	1 mM
10x RT-Puffer *	2,0	1x
RNAsin *	1,0	50 units
AMV-Reverse-Transkriptase *	0,8	≥ 20 units

Die mit * gekennzeichneten Reagenzien entstammen dem „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche, Mannheim, D). DEPC, Diethylpyrocarbonat; MgCl₂; Magnesiumchlorid; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat; RT, Reverse-Transkriptase.

Jeweils 18 µl des Mastermix wurden mit je 2 µl der denaturierten RNA-Proben in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. In der PCR-Maschine erfolgte dann die reverse Transkription, hierzu wurde das in Tabelle 7 dargestellte Programm ausgewählt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 7. Schritte der reversen Transkription.

Dauer	Temp. [°C]	Funktion
20 min	25	Anlagerung der Primer
60 min	42	reverse Transkription
5 min	94	Enzyminaktivierung
unbegrenzt	4	Kühlung

2.2.3.3 *Semiquantitative PCR*

Zur Testung der synthetisierten cDNA wurde eine semiquantitative PCR mit *gapdh*-spezifischen Primern (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Haushaltsgen) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8. Zusammensetzung des Mastermixes für die semiquantitative PCR.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen pro Reaktion [µl]	Konzentration im Ansatz
DEPC-behandeltes Wasser	-	12,5	-
Vorwärtsprimer	10 pmol/µl	2,0	0,2 µM
Rückwärtsprimer	10 pmol/µl	2,0	0,2 µM
dNTPs	10 mM	0,4	0,2 mM
10x Taq-Puffer	-	2,0	1x
Taq-Polymerase	5 Units/µl	0,2	2,5 Units / 100 µl

Taq-Polymerase, Taq-Puffer und dNTPs wurden über Peqlab (Erlangen, D) bezogen, das DEPC-behandelte Wasser über Ambion (Darmstadt, D). DEPC, Diethylpyrocarbonat; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat.

Pro Ansatz wurden 19 µl des Mastermixes und 1 µl der cDNA in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Thermocycler wurde das in Tabelle 9 dargestellte Programm ausgeführt. Es wurde ein „pseudo hot start“ durchgeführt, das heißt, die Proben wurden direkt von 4 °C in den bereits auf 94 °C vorgewärmten Block gestellt. Die Anlagerungs-Temperatur und die Anzahl der Zyklen ist durch den jeweiligen Primer definiert. Die in Tabelle 9 angegebenen Werte gelten für den *gapdh* Primer. Die Anlagerungs-Temperaturen für die weiteren verwendeten Primer sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden nachfolgend auf einem TBE-Agarosegel analysiert. Nach Überprüfung der cDNA-Synthese mittels des *gapdh* Primers, wurden die Proben für weitere PCR-Analysen genutzt.

Tabelle 9. Schritte der RT-PCR mit *gapdh*-spezifischem Primer.

Schritt	Dauer	Temp. [°C]	Funktion
1. Initiale Denaturierung	3 min	94	Denaturierung
2. Zyklus	30 sek	94	Denaturierung
3. Zyklus	30 sek	60	Annealing
4. Zyklus	30 sek	72	Synthese
5. Extension	7 min	72	Extension
6.	unbegrenzt	4	Kühlung

Die Schritte 2.-4. wurden, je nach Primertyp, 20-40 mal wiederholt. Temp., Temperatur.

Die Schritte 2.-4. wurden 20-25 mal (*gapdh*) bzw. 30-40 mal (andere Primer) wiederholt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1,4%igen 1x TBE-Agarosegel, das mit Ethidiumbromid (2 µl/100 ml, BioRad, München, D) versetzt wurde. Je 20 µl der PCR-Produkte wurden mit je 4 µl 6x Orange DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific, Schwerte, D) vermischt und 12 µl dieser Proben aufgetragen. Als Marker wurden 10 µl des GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Schwerte, D) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Laufpuffer bei 120 V für 45 - 60 min. Zur Darstellung der Banden wurde das Gel im ChemiDoc XRS (BioRad, München, D) unter UV-Licht fotografiert.

2.2.4 Immunzytochemische Analysen

Die immunchemischen Analysen wurden durchgeführt, um die Expression von Nestin und GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*) in den Zellen zu ermitteln. Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, welches als Marker für neurale Stammzellen und unreife neural differenzierte Zellen genutzt wird (Lendahl et al., 1990; Veselska et al., 2006).

Das gliale saure Faserprotein GFAP wird von reifen Astrozyten, aber auch von neuronalen, adulten Stammzellen exprimiert (Doetsch, 2003).

2.2.4.1 *Plattieren und Fixieren der Zellen*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsinisiert und anschließend auf Fibronectin- (4 µg/ml, PromoCell, Heidelberg, D) beschichtete Deckgläser in einer 24-Loch-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhause, D) ausgesät. Die Beschichtung erfolgte mit einer 1:1000 (v:v) Fibronectin-1x PBS-Mischung. Zur Beschichtung inkubierten die Deckgläser für 24 h im Brutschrank, bevor sie dreimal mit 1x PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden je nach Teilungsrate in einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² bis 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät und im Brutschrank inkubiert. An den folgenden Tagen wurde die Konfluenz der Zellen auf den Deckgläsern beurteilt. Waren die Deckgläser zu 70-80% bewachsen, wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die Deckgläser aus der 24-Loch-Platte herausgenommen und sofort mit 1x PBS überschichtet. Danach wurden die Deckgläser für 7 min bei -20 °C mit Ethanol/Eisessig 95:5 (v:v) fixiert. Es folgten ein kurzer sowie zwei 10 minütige Waschschrte mit 1x PBS. Gelagert wurden die fixierten Deckgläser in 1xPBS in einer 24-Loch-Platte bei +4 °C.

2.2.4.2 *Immunfluoreszenzfärbung*

Zur Färbung der Zellen wurden die in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführten Antikörper eingesetzt. Die Analyse erfolgte im Triplikat.

Tabelle 10. Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

Primäre Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
αNestin (MAB5326)	Maus	Milipore, Schwalbach, D	1:100
αGFAP (AB5804)	Kaninchen	Milipore, Schwalbach, D	1:250

α, anti (Symbol für die Kennzeichnung von Antikörpern); GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*.

Tabelle 11. Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

Sekundäre Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
αMaus FITC	Ziege	Caltag Laboratories, Hamburg, D	1:50
αKaninchen Texas Red	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA	1:300

α, anti (Symbol für die Kennzeichnung von Antikörpern); FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

Die Deckgläser wurden mit jeweils 40 µl Antikörper-Mix beschichtet und für 90 min (primäre Antikörper) bzw. 60 min (sekundäre Antikörper) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zusammensetzung der Antikörper-Mixe zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12. Zusammensetzung der Antikörper-Mixe für die Immunfluoreszenzfärbung.

Reagenz	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
1x PBS	89%	89%
FCS	10%	10%
Natrium-Azid (4 µg/ml)	1%	1%
Nestin	1:100	
GFAP	1:250	
FITC		1:50
Texas Red		1:300

PBS, engl. *phosphate buffered saline*; FCS, fetales Kälberserum; GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Deckgläser dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden jeweils 50 µl des Sekundär-Antikörper-Mixes auf die Deckgläser pipettiert und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser erneut dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Es schloss sich eine Kernfärbung mit DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) an. Dazu wurden die Präparate für 10 min bei Raumtemperatur mit einer 1:200 Verdünnung der DAPI-Stammlösung (50 µg/µl, Roth, Karlsruhe, D) inkubiert. Danach wurden die Deckgläser dreimal für jeweils 10 min mit 1xPBS gewaschen und mit Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) eingedeckt. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei -20 °C.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz/Immunzytologie wurde am Fluoreszenzmikroskop (Biozero BZ-8000, Keyence, Neu-Isenburg, D) durchgeführt. Detektiert wurden die drei Kanäle blau (DAPI), grün (Nestin), rot (GFAP) und zusätzlich wurde eine Überlagerung aller drei Kanäle fotografiert. Die Belichtungszeiten für die verschiedenen Antikörper wurden im Labor empirisch ermittelt, wozu Vergleichspräparate mit positiven und negativen Kontrollen genutzt wurden. Diese Werte waren mir vor der Analyse bekannt.

Zusätzlich wurden eigene Positiv- und Negativkontrollen parallel zu den Analysen angefertigt, auf die in den Ergebnissen nicht näher eingegangen wird. Als Negativkontrollen dienten Präparate ohne Antikörper (Autofluoreszenz) bzw. mit Sekundär-Antikörper allein (Hintergrundsignal). Als Positivkontrolle dienten Präparate neuronaler Stammzellen von Maus und Ratte, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.5 Analysen zur Proliferation und Vitalität

Die Analyse zur Proliferation erfolgte mittels BrdU-ELISA (engl. *5-Bromo-2'-deoxy-uridine-Enzyme-linked immunosorbent Assay*), die Vitalität wurde mittels MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ermittelt. Zusätzlich wurde ein kommerzielles Zytotoxizitäts-Assay eingesetzt.

Der ELISA „enzyme-linked immunosorbent assay“ ist ein antikörperbasiertes Verfahren, das auf dem Prinzip der Enzym-vermittelten Änderung einer Färbung beruht. Im vorliegenden Fall wurde die Inkorporation von BrdU mittels ELISA ermittelt. Das MTT-Assay, sowie der Zytotoxizitätstest sind kolorimetrische Methoden, welche die Bildung von Formazan bestimmen. Für alle drei Verfahren wurden 96-Loch-Platten identisch behandelt. Die Platten wurden analog zu den Deckgläsern 1:1000 mit Fibronectin beschichtet (siehe Kapitel 2.2.4.1). Die Analysen erfolgten parallel und wurden mindestens einmal wiederholt, bei nicht konklusiven Daten mehrfach.

Für die Analyse wurden Zellen in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/cm² in N-Medium in einer mit Fibronectin-beschichteten 96-Loch-Platte ausgesät und im Brutschrank inkubiert (Tag d-1). Am ersten Tag nach dem Aussäen der Zellen (Tag d0) fand die Behandlung mit aufsteigenden TMZ-Konzentrationen statt. Die Konzentrationen in den Behandlungen betragen 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM und 400 µM. Aufgrund einer zuvor beobachteten hohen Sensitivität gegenüber TMZ wurde bei der Zelllinie T1440 bereits mit einer Konzentration von 6,25 µM als niedrigste Dosierung begonnen. Die TMZ-Verdünnungen für die Behandlungen wurden durch Verdünnung der TMZ-Stammlösung (500 µM) mit DMSO (Sigma-Aldrich, München, D) hergestellt. Die finale DMSO-Konzentration in den Proben betrug dabei 1%. Da DMSO zytotoxisch wirken kann, wurden mit 1% DMSO behandelte, sowie unbehandelte Proben als Kontrollen mitgeführt. Die Analysen mittels BrdU-ELISA, MTT-Test und Zytotoxizitäts-Assay fanden jeweils am Tag d3 und Tag d5 nach TMZ-Zugabe statt. Für BrdU-ELISAs, MTT- und Zytotoxizitäts-Assays wurden mindestens zwei unabhängige Datensätze erhoben, in einigen Fällen mehr. Aufgrund von Qualitätsunterschieden der Zellpräparationen und insbesondere Aggregatbildung sind nur die Einzelwerte einer Serie miteinander vergleichbar. Die Werte einer Serie (jeweils 8 Einzelwerte pro TMZ-Konzentration) wurden statistisch verglichen. Für die einzelnen Serien wurden die EC50-Werte mittels „nicht-linearer, sigmoidaler Methode“ ermittelt. Für die Angabe der EC50-Werte wurden die

Ergebnisse mehrerer Analysen kombiniert, daher sind in einigen Fällen Grenzwerte angegeben, nicht die in einer Serie errechneten Werte (s. Tabelle 22).

2.2.5.1 BrdU-ELISA

Der BrdU-ELISA wurde mit dem „BrdU Labeling und Detection Kit III“ (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Für den BrdU-ELISA wurde am Tag d0, 4 h vor der TMZ-Zugabe, die BrdU-Lösung in einer 1:90 (v:v) Verdünnung mit 1x PBS zugegeben. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wird während der Replikation in die DNA eingebaut. An den Tagen d3 und d5 wurden die Proben gemäß des Herstellerprotokolls für die Messungen vorbereitet. Dazu wurden die Zellen zweimal mit ELISA-Waschlösung (siehe Tabelle 4) gewaschen. Danach wurde mit Fixierlösung (siehe Tabelle 4) für 30 min bei -20 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschlösung bei Raumtemperatur. Dann wurde die Nukleaselösung in einer 1:100 Verdünnung mit Inkubationspuffer (Komponente des Kits) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut drei Mal mit ELISA-Waschlösung gewaschen und der BrdU-Antikörper (anti-BrdU-POD, Verdünnung 1:500) zugefügt, der ebenfalls für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Antikörper bindet das inkorporierte BrdU. Um diesen Vorgang messbar zu machen, ist der BrdU-Antikörper mit einer Peroxidase (POD) gekoppelt. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit 1x ELISA-Waschlösung gewaschen. Dann wurde ABTS (2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat), das Substrat für die Peroxidase zugegeben. Die Peroxidase setzt das Substrat ABTS in ein grünes Radikalkation um, dessen Extinktion bei λ 405 nm (Referenzwellenlänge λ 492 nm) im ELISA-Reader (ELISA reader UVM350, LKB Biochrom) gemessen wurde. Die Messung erfolgte 10 und 60 min nach ABTS-Zugabe und dann alle 30 min, bis die Extinktion nicht weiter anstieg. Die Daten wurde mit der Software MikroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D) erfasst und mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.5.2 MTT-Assay

Die 96-Loch-Platten wurden identisch zum BrdU-ELISA mit Zellen bestückt und mit TMZ behandelt. Die Messungen erfolgte wiederum am Tag d3 und Tag d5. Im ersten Schritt wurden in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte jeweils 10 μ l MTT-Lösung (siehe Tabelle 4) pipettiert. Dieser Arbeitsvorgang erfolgte unter Abdunkelung. Nach der Zugabe wurde die Platte in Alufolie eingewickelt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 100 μ l Stopplösung (siehe Tabelle 4) pro Vertiefung. Nach 20

min und 40 min wurde die optische Dichte (OD) im ELISA-Reader (ELISA reader UVM350, LKB Biochrom) bei der Wellenlänge λ 570 nm (Referenzwellenlänge λ 655 nm) bestimmt und die Daten mit der MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D) ausgewertet. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel genutzt.

2.2.5.3 Zytotoxizitäts-Assay (LDH-Freisetzung)

Der kommerzielle Zytotoxizitäts-Assay misst die Freisetzung der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Es wurde das CytoTox-Kit („CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay“, Promega, Madison, USA) verwendet. Die 96-Loch-Platten wurden analog zum BrdU-ELISA und MTT-Assay mit Zellen bestückt und mit TMZ behandelt. Die Messungen erfolgten an Tag d3 und Tag d5. Die 96-Loch-Platte wurde zunächst für 5 min bei 4 °C und 250 x g zentrifugiert. Anschließend wurden pro Vertiefung 50 µl des Überstandes abgenommen und in eine neue, komplementäre 96-Loch-Platte pipettiert. Zu den 50 µl Überstand wurden 50 µl Substrat-Mix (Komponente des Kits) gegeben und die Platte für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 50 µl Stopplösung (Komponente des Kits) zugegeben. Es folgte eine einmalige Messung im ELISA-Reader (ELISA reader UVM350, LKB Biochrom) bei der Wellenlänge λ 490 nm (Referenzwellenlänge λ 690 nm) mit der MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D). Zur Auswertung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel genutzt.

2.2.6 Expressionsanalyse auf Proteinebene

Zur Analyse der Proteinexpression in den untersuchten Zelllinien wurden Western Blots durchgeführt. Die Zelllinien wurden hinsichtlich der Expression der Proteine Sox2 (engl. *sex-determining-region Y (SRY)-box 2*) und PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) untersucht. Es wurden sogenannte „whole cell extracts“ (WCE) von Zelllinien untersucht, die die Gesamtheit aller Proteine der Zellen enthalten.

2.2.6.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden Zellpellets verwendet, die zuvor mit Trypsin/EDTA dissoziiert und danach mit 1x PBS gewaschen wurden. Die Zellpellets wurden in JLB-Puffer (siehe Tabelle 4) resuspendiert. Dem Puffer wurden vor dem Gebrauch PIC

(Proteinaseinhibitorcocktail, 2 µl/ml Puffer (Roche, Mannheim, D)) und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 µl/ml Puffer (Merck, Darmstadt, D)) hinzugefügt. Die Menge des benötigten Puffers wurde empirisch bestimmt. Jedoch wurden mindestens 50 µl JLB-Puffer hinzugegeben. Die resuspendierten Zellen inkubierten für 25 min auf Eis. Anschließend wurde für 10 min bei 18000 x g und 4 °C zentrifugiert, um das Zelldebris zu entfernen. Die WCEs wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der WCEs wurde ein Bradford-Assay nach Standardmethoden (Green und Sambrook, 2012) durchgeführt. Hierzu wurden 800 µl 1x PBS mit 2 µl Protein und 200 µl 5x Bradford-Reagenz (BioRad, München, D) vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei λ 595 nm photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer mit Serumalbumin erstellten Eichkurve graphisch ermittelt.

2.2.6.2 SDS-PAGE

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Proteinextraktion wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Laemmli (Green und Sambrook, 2012) aufgetrennt. Für die Gelelektrophorese wurden ein Trenngel und ein Sammelgel hergestellt, die Zusammensetzung zeigt Tabelle 13. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Protean III SDS-PAGE System (BioRad, München, D). Es wurden analytische (Integritätskontrolle WCE) und präparative (Western Blot) SDS-PAGEs durchgeführt.

Tabelle 13. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.

Reagenz	Trenngel 10%ig	Sammelgel 4%ig
Aqua dest.	2,00 ml	1,8 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8) (s. Tabelle 4)	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8) (s. Tabelle 4)	-	750 µl
10% SDS	50 µl	30 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	1,66 ml	400 µl
10% APS	50 µl	15 µl
TEMED	3 µl	4 µl

SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*; APS, Ammoniumpersulfat; TEMED, Tetramethylethyldiamin.

a) Analytische SDS-PAGE

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese denaturiert. Dazu wurden 5 µl WCE mit 5 µl PBS und 10 µl 2x Laemmli Puffer (siehe Tabelle 4) vermischt und für 5

min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte mit SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 4), der Probenauftrag mittels Hamilton-Spritze. Zusätzlich wurden in die erste Geltasche 5 µl eines Protein-Längenstandards (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas/Thermo Scientific, Schwerte, D) gegeben. Die Gelelektrophorese fand bei 200 V statt. Danach wurden die Gele für mindestens 15 min mit Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 4) gefärbt und danach 3 Mal für 15 min mit Coomassie-Entfärber (siehe Tabelle 4) entfärbt. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (GFL, Burgwedel, D) statt. Die gefärbten Gele wurden mit 5 ml 10% Glycerol in Plastikfolie eingeschweißt und bei +4 °C aufbewahrt.

b) Präparative SDS-PAGE

Es wurden 10% SDS-Gele mit 12 µg WCE pro Spur beladen. Die Herstellung der Proben erfolgte mit 2x Laemmli Puffer (siehe Tabelle 4) und 1x PBS. Zum Blotten wurden die Gele nach der Gelelektrophorese für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Western Blot Transferpuffer (siehe Tabelle 4) inkubiert. Für den Proteintransfer auf ein Nitrocellulosefilter (BioRad, München, D) wurde das Semi-Dry-Verfahren (Blotkammer, BioRad, München, D) angewendet. Die Proteine wurden für 60 min bei 12 V transferiert. Anschließend wurde das Nitrocellulosefilter für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Western Blot Blocking-Puffer (siehe Tabelle 4) inkubiert. Die Lagerung des Nitrocellulosefilters erfolgte bei -20 °C. Das Gel wurde zur Kontrolle nach dem Blotten, wie oben beschrieben, mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

2.2.6.3 *Antikörper und Chemilumineszenz*

Das Nitrocellulosefilter wurde in Plastikfolie eingeschweißt und der Primärantikörper nach Herstellerangabe in Western Blot Blocking-Puffer (siehe Tabelle 4) verdünnt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei +4 °C mit dem Nitrocellulosefilter inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Nitrocellulosefilter für 3 x 10 min in Western Blot Waschpuffer (siehe Tabelle 4) gewaschen. Das Nitrocellulosefilter wurde dann wie oben beschrieben mit dem Sekundärantikörper in Plastikfolie eingeschweißt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Es folgten wieder 3 x 10 min in Western Blot Waschpuffer.

Tabelle 14. Primärantikörper für den Western Blot.

Primärantikörper	Hersteller	Herkunft	Verdünnung	Proteinbanden
α pan-Aktin	Chemicon	Maus	1:2000	42 kDa
α GAPDH	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	37 kDa
α SOX2	Millipore	Kaninchen	1:1000	34 kDa
α PARP	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	89 und 116 kDa

α , anti (Symbol für die Kennzeichnung von Antikörpern); GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; SOX2, engl. *sex-determining-region Y (SRY)-box 2*; PARP, Poly(ADP-ribose)-Polymerase.

Tabelle 15. Sekundärantikörper für den Western Blot.

Sekundärantikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Goat-Anti-Mouse Peroxidase (GAMPO)	Ziege	Beckman Coulter	1:5000
Goat-Anti-Rabbit Peroxidase (GARPO)	Ziege	Beckman Coulter	1:5000

GAMPO, Goat-Anti-Mouse-Peroxidase; GARPO, Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase

Um die Proteinbanden zu detektieren wurden 800 μ l des „*Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*“ (Thermo Scientific, Schwerte, D) auf jedes Nitrocellulosefilter aufgebracht. Die Chemilumineszenz wurde mittels ChemiDoc XRS (BioRad, München, D) und der Software „Quantity One“ (Version 4.6.2, BioRad, München, D) detektiert. Die „Quantity One“ Software wurde ebenfalls zur Quantifizierung der Banden verwendet. Um die relative Expression von Sox2 und PARP zu bestimmen, wurde die Signalstärke dieser Banden durch die Signalstärke der Ladekontrollen Aktin und GAPDH dividiert. Aufgrund der zum Teil geringen Mengen der WCEs, insbesondere im Fall von behandelten Kulturen, konnten die Western Blot Analysen meist nur ein- oder zweimal durchgeführt werden.

2.2.7 MSP-Assay

Der MSP (engl. *methylation-specific-PCR*)-Assay wurde eingesetzt, um den Methylierungs-Status des Promotors des *mgmt*-Gens festzustellen, das für das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) kodiert.

2.2.7.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem “Purification of Total DNA from Animal Tissue” Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt. Vom Tumormaterial wurden jeweils 10-30 mg Gewebe eingesetzt. Um das Tumormaterial zu lysieren wurden 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K hinzupipettiert. Die Inkubation fand über Nacht bei 56 °C im Heizblock statt. Zum lysierten Gewebe wurden 200 µl Puffer AL und 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben. Die Reagenzien wurden mittels Vortexer (Vortex Genie 2, Bender&Hobein AG, Zürich, CH) vermischt. Anschließend wurde die Mischung auf eine “DNeasy mini spin column” aufgetragen und für 1 min bei 8000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte das Waschen mit 500 µl Puffer AW1, wobei für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert wurde. Im nächsten Schritt wurden 500 µl Puffer AW2 hinzugegeben und für 3 min bei 18000 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die DNA von der Säule eluiert. Hierzu wurden 200 µl Puffer AE direkt auf die Membran pipettiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Um die erfolgreiche Durchführung der Extraktion der genomischen DNA und deren Fragmentlänge zu überprüfen wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt sowie ein analytisches 0,5%iges 1x TBE Agarosegel (siehe 2.2.3.1) angefertigt. Die Messungen am Photometer fanden mittels einer Nanoküvette statt.

2.2.7.2 DNA-Modifizierung

Die DNA-Modifizierung wurde nach dem Protokoll “CpGenome™ Fast DNA Modification Kit” (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Um das Methylierungsmuster des *mgmt*-Promotors in der sich anschließenden MSP sichtbar zu machen, erfolgte zunächst eine DNA-Modifizierung. Unmethylierte Cytosine werden dabei über eine Bisulfit-Modifizierung in Uracile umgewandelt, die methylierten Cytosine blieben hingegen unverändert. Die Sequenz der modifizierten DNA unterscheidet sich nun von der Sequenz der ursprünglichen DNA. Die in der nachfolgenden PCR verwendeten Primer können so jeweils nur an die zuvor „methylierten“ oder „unmethylierten“ DNA-Stränge binden und diese amplifizieren.

Für die Modifizierung wurden je 1 µg der extrahierten genomischen DNA mit 100 µl DNase-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt, D) und 7 µl 3M NaOH (vor Gebrauch frisch angesetzt) vermischt und für 10 min bei 50 °C im Heizblock inkubiert. Es wurden 550 µl “DNA Modification Reagent” (Komponente des Kits, vor Gebrauch frisch

angesetzt) zugefügt und über Nacht bei 50 °C im Heizblock inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5 µl „DNA Modification Reagent III“ („Glasmilch“) und 750 µl „DNA Modification Reagent II“ (vor Gebrauch frisch angesetzt) zur DNA Lösung hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugierung bei 5000 x g für 10 sek. Der Überstand wurde verworfen. Zum Pellet wurden 1 ml 70% Ethanol hinzugefügt, gevortext, für 10 sek bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Dann wurden 50 µl 20 mM NaOH/90% Ethanol hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen des Pellets mit 1 ml 90% Ethanol, der Überstand wurde jeweils verworfen. Zuletzt wurde das Pellet bei hoher Drehzahl (10000 x g) für 3 min zentrifugiert und der Überstand möglichst komplett entfernt. Das Pellet („Glasmilch“ mit gebundener DNA) wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden, um die DNA von der „Glasmilch“ zu eluieren, je 25 µL TE-Puffer (siehe Tabelle 4) hinzugefügt und die Proben wurden für 15 min bei 50 °C inkubiert. Die Proben wurden danach für 3 min bei 13000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Um häufiges Einfrieren und Auftauen der modifizierten DNA zu vermeiden, wurden die Proben in Aliquots zu je 12 µl bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7.3 *Methylierungsspezifische PCR (MSP)*

Die MSP wurde wie im Protokoll „CpG WIZ® MGMT Amplification Kit“ (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) beschrieben durchgeführt. Es wurden Primerpaare eingesetzt, die spezifisch die „methylierte“ (M) bzw. „unmethylierte“ (U) Promotorregion erkennen. Die Primersequenzen leiten sich von dem von Beier et al. (2008) publizierten Sequenzen ab und sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Primer für die MSP.

Primer	Sequenz
Primerpaar U	V: 5'-TGT GTT TTT AGA ATG TTT TGT GTT TTG AT-3' R: 5'-CTA CCA CCA TCC CAA AAA AAA ACT CCA-3'
Primerpaar M	V: 5'-GTT TTT AGA ACG TTT TGC GTT TCG AC-3' R: 5'-CAC CGT CCC GAA AAA AAA CTC CG-3'

U, unmethyliert; M, methyliert; V, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer .

Das U-Primerpaar bindet an die unmethylierte DNA, nachdem diese chemisch modifiziert wurde. Das M-Primerpaar bindet an methylierte DNA, welche durch die chemische Modifizierung nicht verändert wurde. Ein drittes Primerpaar (W; Wildtyp) fungierte als Kontrolle für die Effektivität der chemischen Modifikation. Dieses Primerpaar war eine Komponente des “CpG WIZ® MGMT Amplification Kit” (die Sequenz wird von der Herstellerfirma nicht veröffentlicht). Für jedes Primerpaar wurde ein Mastermix angesetzt, siehe Tabelle 17.

Tabelle 17. Zusammensetzung des Mastermixes für die MSP.

Reagenz	Volumen [µL]
Nukleasefreies Wasser (Ambion)	15,3
10 mM dNTP Mix (PeqLab)	0,83
Primerpaare U, M oder W	0,83
10x Taq Puffer (PeqLab)	2,1
Taq-Polymerase (PeqLab)	0,17

dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat; U, unmethyliert; M, methyliert; W, Wildtyp.

Jeweils 18 µl des Master-Mixes wurden mit 2 µl der modifizierten DNA vermischt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe ohne DNA mitgeführt, als Positiv-Kontrolle eine Kontroll-DNA aus dem Labor. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18. PCR-Programm für die MSP.

Schritt	Dauer	Temp. [°C]	Funktion	Zyklen
1	5 min	95	Initiale Denaturierung	1
2	45 sek	95	Denaturierung	44
3	45 sek	60	Annealing	44
4	60 sek	72	Synthese	44
5	7 min	72	Finale Strangsynthese	1
6	unbegrenzt	4	Kühlung	1

Die Analyse der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Dazu wurden die PCR-Produkte mit 6x Orange Loading Dye (Thermo Scientific, Schwerte, D) versetzt und die Hälfte der Probe auf einem 2%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die zweite Hälfte wurde auf einem zusätzlichen Gel analysiert. Als Marker wurde der “MassRuler™ DNA Ladder Mix” (Thermo Scientific, Schwerte, D) verwendet. Im ChemiDoc XRS (BioRad, München, D) wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde genutzt, um das Vorhandensein von CD133/Prominin-1-positiven Zellen in den Kulturen der diversen Zelllinien zu bestimmen. Gleichzeitig ermöglicht die Analyse die Bestimmung der Verteilung von Zellen in den Zellzyklusphasen nach Markierung mit Propidium-Jodid (PI). PI ist ein DNA-interkalierendes Agens und besitzt die Fähigkeit zur Fluoreszenz. Die Intensität des Fluoreszenzsignals entspricht der Menge der PI-markierten DNA, die wiederum Rückschlüsse auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zulässt.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen, im vorliegenden Fall fluoreszenzmarkierter Antikörper bzw. Propidium-Jodid-markierter Zellen. Die Zellen werden im Durchflusszytometer einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt und das hier entstehende Signal von einem Detektor registriert. Es werden zwei Parameter, das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC), analysiert. Das Vorwärtsstreulicht hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht hängt von der Größe und Granularität der Zelle ab.

Die durchflusszytometrischen Analysen fanden im Institut für Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck am "BD™ LSR II benchtop flow cytometer" (BD Biosciences, Heidelberg, D) statt. Zur Auswertung der Messungen der Antikörper-markierten Zellen wurde die BD FACS Diva Software Version 6.1 (BD Biosciences, Heidelberg, D) benutzt. Zur Auswertung der Messungen der PI-markierten Zellen wurde die Software Summit 4.1 (DaKo, Hamburg, D) eingesetzt.

2.2.8.1 Antikörper-markierte Zellen

Die in der Durchflusszytometrie analysierten Zelllinien wurden zunächst in T25 Zellkulturflaschen in der Dichte 1×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und am Folgetag mit verschiedenen TMZ-Konzentrationen behandelt. Die ausgewählten TMZ-Konzentrationen orientierten sich an den jeweiligen EC50-Werten für TMZ, die zuvor mittels BrdU-ELISA ermittelt wurden. Die Durchflusszytometrie fand an Tag d3 und Tag d6 nach der Behandlung statt. Als Positivkontrolle wurde bei jeder Messung die Zelllinie CaCo₂ mitgeführt. Diese Zellen entstammen einem kolorektalen Adenokarzinom. CaCo₂-Kulturen enthalten $\geq 90\%$ CD133-positive Zellen (Corbeil et al., 2000).

Die Zellen wurden trypsiniert (siehe 2.2.1), für 5 min bei 250 x g zentrifugiert und einmal in 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden auf fünf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Dabei war Ansatz (1) die unbehandelte Kontrolle (kein Antikörper), Ansatz (2) die Isotyp-Kontrolle (IgG2b-PE, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) und Ansatz (3) der Ansatz mit dem CD133-Antikörper (CD133/2-PE, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D). Zwei weitere Aliquots wurden für die Zellzyklus-Analyse asserviert.

Die Ansätze (1) bis (3) wurden für 1 min bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 80 µl FACS-Puffer (siehe Tabelle 4) resuspendiert. Im Dunkeln wurden jeweils 20 µl FcR-Blocking Reagent (human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) zugegeben. Des Weiteren wurden zum Ansatz (2) 10 µl des Antikörper-Isotyps und zu Ansatz (3) 10 µl des CD133-Antikörpers pipettiert. Alle Proben wurden für 15 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 1 ml FACS-Puffer. Die Proben wurden danach für 10 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden jeweils in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und danach am "BD™ LSR II benchtop flow cytometer" (BD Biosciences, Heidelberg, D) gemessen.

2.2.8.2 Propidium-Jodid (PI) markierte Zellen

Zwei der zuvor asservierten Zellaliquots wurden für die Zellzyklus-Analyse eingesetzt. Dazu erfolgte eine Zentrifugierung für 1 min bei 250 x g. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen und die Zellpellets auf Eis gestellt. Zum Fixieren der Zellen wurden pro Pellet 500 µl Ethanol-Eisessig (95:5 v:v) hinzugefügt und resuspendiert bis keine Aggregate mehr sichtbar waren. Danach folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Es wurde erneut für 1 min bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert, gevortext und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 100 µl PI/FACS-Mix (siehe Tabelle 4) resuspendiert, gevortext und resuspendiert bis keine Aggregate mehr sichtbar waren. Die Zellen inkubierten für 30 min auf Eis. Dann wurden je 200 µl kaltes PBS hinzugegeben und für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die komplette Zellsuspension wurde gefiltert (Cell Trics, 50 µm Poren, Partec, Görlitz, D) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Messungen erfolgten wiederum am "BD™ LSR II benchtop flow cytometer" (BD Biosciences, Heidelberg, D).

2.2.9 Statistik

Für die Analysen mittels BrdU-ELISA, MTT- und Zytotoxizitäts-Assay wurde je Messreihe der Mittelwert aus acht Einzelwerten und die Standardabweichung berechnet. Die Assays wurden wiederholt. Um die verschiedenen Gruppen gegeneinander zu vergleichen wurde nach Feststellung der Normalverteilung der Werte ein One-way ANOVA Test mit anschließendem Tukey Post-Test durchgeführt. Des Weiteren wurden aus den Mittelwerten die EC₅₀-Werte (50% Senkung der Vitalität/Proliferation bzw. 50% Steigerung der LDH-Abgabe) berechnet. Um die EC₅₀ zu ermitteln, wurde das Programm „non-linear sigmoidal curve fitting (variable slope)“ (Sebaugh, 2011) von GraphPadPrism Version 8.1.1 eingesetzt. Es wurden die „inhibitor versus response“ Werte errechnet und die EC₅₀-Werte für die Bedingung „best fit“ selektiert (Motulsky und Christopoulos, 2003[#]). Da die SLGC-Linien stets geringe Unterschiede im Wachstumsverhalten aufweisen, insbesondere bei Linien mit großen Aggregaten, sind nur die Experimente einer Serie direkt miteinander vergleichbar. Daher wurden die Grenzwerte für die rechnerisch ermittelten EC₅₀-Werte im Text und in den Tabellen angegeben.

Für die Daten aus den Analysen mittels RT-PCR, Western Blot, Durchflusszytometrie sowie MSP-Assay wurde aufgrund geringer Fallzahlen und experimenteller Variationen keine Statistik durchgeführt. Besonders zu berücksichtigen ist die Qualität der Zellen, hier kann es insbesondere bei semi-adhärenenten und sphäroiden Zelllinien zu Aggregatbildungen kommen, die die späteren Messungen beeinflussen. Daher sind auch hier nur die Daten einer Serie miteinander vergleichbar. Es wurde hier ein systematischer Fehler von 5% oder 10% angenommen, der sich aus früheren empirischen Analysen des Labors ableitet.

Für die Tierexperimente zur Untersuchung der Tumorigenität von Zelllinien wurden keine statistischen Signifikanzen berechnet, da einerseits die Fallzahlen gering waren und andererseits die Größe der orthotopen Tumoren sehr stark variierte (siehe Abb. 5).

[#] Motulsky und Christopoulos, 2003; GraphPadPrism, Fitting Models to Biological Data using linear and nonlinear regression; GraphPad Software Inc., San Diego, www.graphpad.com

Im TMZ-Behandlungsexperiment der mit T1467 inokulierten Mäuse wurden keine konklusiven Daten erhoben, weshalb eine statistische Auswertung entfiel.

3 Ergebnisse

3.1 Vorspann

Die Darstellung der Ergebnisse wird in zwei Abschnitte aufgeteilt. Der erste Teil befasst sich mit der Charakterisierung von Zelllinien. Im zweiten Teil wird die TMZ-Sensitivität verschiedener Zelllinien analysiert.

3.2 Tumoren T1467 und T1469 und abgeleitete Zellkulturen

Um eine Zelllinie zu charakterisieren und herauszufinden, ob sie Zellen mit Stammzelleigenschaften (SLGCs) besitzt, sind mehrere Faktoren von Bedeutung. In dieser Untersuchung wurden die Zelllinien über den Phänotyp der Zellkultur, den MGMT-Status, die Expression von Nestin und GFAP und die Tumorigenität im Mausmodell charakterisiert. In Abb. 3 ist gezeigt, welche Experimente im Rahmen der Charakterisierung der Zelllinien durchgeführt wurden. Insofern makroskopisch sichtbare orthotope Tumoren entstanden, wurden aus diesen Zellkulturen angelegt und mit dem Namen der Ursprungkultur und dem Suffix „SCID“ bezeichnet.

Ein Teil des Gewebestücks aus dem Tumor T1467 wurde histochemisch analysiert. Es ließen sich auch hier sowohl Nestin- als auch GFAP-positive Zellen nachweisen. Dabei wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Regionen des Tumors evident. Analog wurde ein Teil des Tumors T1469 gefärbt. Hier ließen sich weder GFAP-positive, noch Nestin-positive Zellen nachweisen (nicht gezeigt). Teile beider Tumoren wurden für das Anlegen einer Zellkultur genutzt, ein weiterer Teil unbehandelt in Flüssigstickstoff eingefroren und später für MSP-Analysen eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden in dieser Arbeit aus den Tumorbiopsien T1467 und T1469 Zellkulturen etabliert und charakterisiert. Später wurde zusätzlich die Zelllinie T1467-SCID angelegt und charakterisiert.

In den T1467 und T1467-SCID Zellkulturen ließen sich verschiedene Phänotypen unterscheiden; adhärente, semi-adhärente und sphärisch wachsende Zellen, wobei der sphäroidale Phänotyp überwog. Die T1469-Kulturen enthielten dagegen nur adhärente Zellen. Der Phänotyp änderte sich über die Passagen kaum. So zeigte die Zelllinie T1469 dauerhaft ein adhärentes Wachstum. Die Zelllinien T1467 und T1467-SCID wechselten zwischen einem semi-adhären Wachstum und Sphäroiden (adhärente

Zellen siehe Abb. 4, Sphäroide nicht gezeigt). Dabei bedeutet semi-adhärenent, dass die Zellen in Aggregaten vorlagen, die zum Teil Kontakte zur Wachstums Oberfläche der Zellkulturgefäße ausbildeten. Die Fähigkeiten zur Bildung von Sphäroiden in der Zellkultur wird von einigen Autoren als eine Eigenschaft der Gliomstammzellen angesehen (Galli et al., 2004).

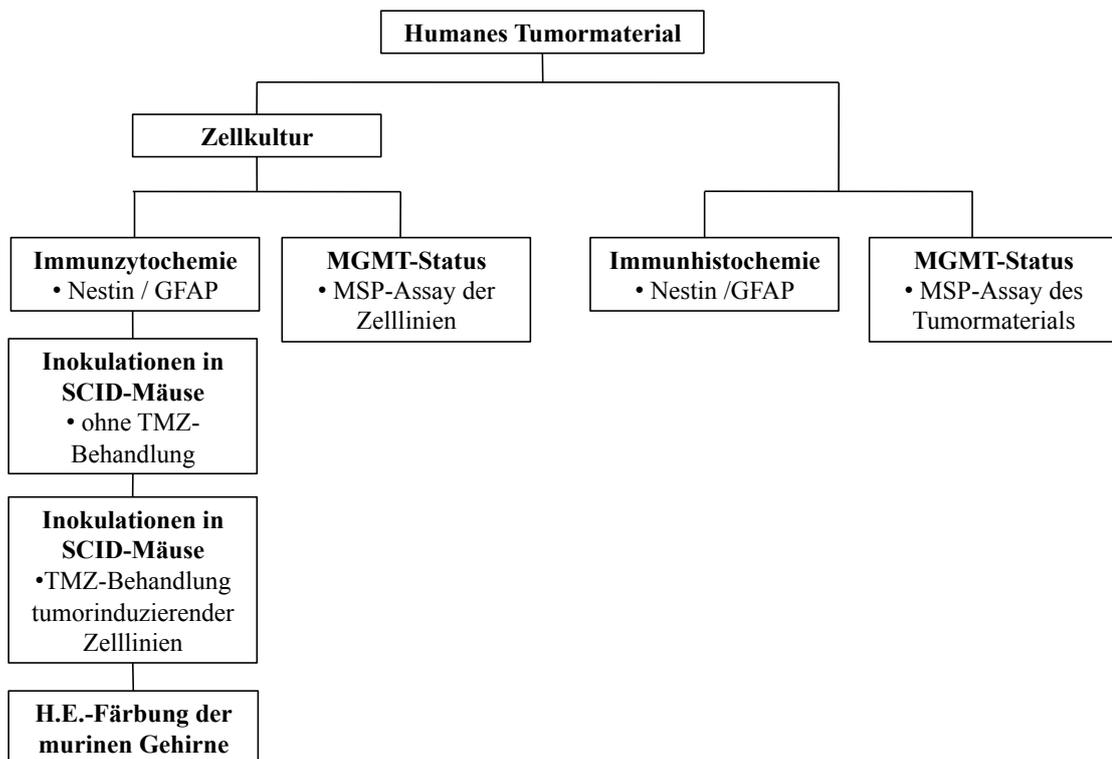


Abb. 3. Übersicht der durchgeführten Experimente zur Charakterisierung von Zelllinien. GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*; MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; SCID, engl. *severe combined immunodeficiency*; TMZ, Temozolomid; H.E., Hämatoxylin-Eosin.

Die Expression von Nestin und GFAP wurde mittels Immunhistochemie und Immunzytologie untersucht. Im Fall der Zellkulturen wurde die Häufigkeit von Nestin- und GFAP-positiven Zellen auf den Deckgläsern bestimmt. Abb. 4 zeigt beispielhaft Bilder der immunzytochemischen Analyse der Zelllinie T1467. Die Abb. 22 im Anhang zeigt Bilder der immunhistochemischen Analyse der korrespondierenden Tumoren T1467 und T1469. Das Intermediärfilament Nestin wird in neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen exprimiert und ist außerdem ein Marker für SLGCs (Überblick in Schonberg et al., 2014). So spricht ein positives Nestin-Signal für eine neuronale Prägung der Zellen. Ein positives GFAP-Signal zeigt eine gliale Prägung (Galli et al., 2004). Die immunzytochemischen Analysen wiesen Nestin-positive Zellen und einen komplexen

Phänotyp in T1467-Kulturen nach. GFAP-positive Zellen mit einem komplexen Phänotyp wurden in T1467- und T1469-Kulturen beobachtet. Nestin-positive Zellen fehlten im Fall der Zelllinie T1469, die sich von einem Meningeom ableitete.

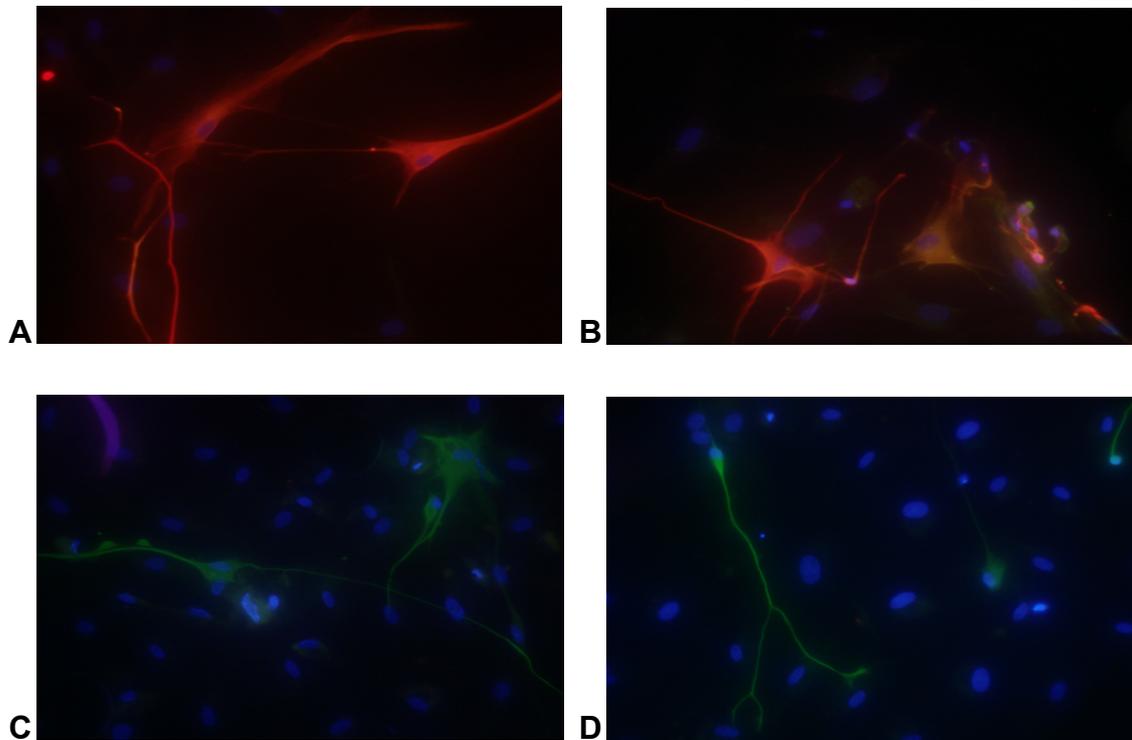


Abb. 4. Immunzytochemische Analyse der Intermediärfilamente Nestin und GFAP.

Die Abbildungen A bis D zeigen unterschiedliche Analysen der Zelllinie T1467. Es erfolgte eine Tripel-Färbung mit den Antikörperpaaren α Nestin goat/anti-mouse (grün), α GFAP goat/anti-rabbit (rot) und DAPI (blau).

Außer den selbst angelegten Zelllinien T1467 und T1469 verwendete ich weitere SLGC-Linien für die Xenotransplantation von SCID-Mäusen (siehe unten). Diese Zelllinien (T1371, T1440, T1442, T1522, T1524, T1549, T1556) waren von den Kollegen im Labor etabliert und anfänglich charakterisiert worden (siehe Tabelle 1). In diesen Fällen fertigte ich lediglich Kontrollfärbungen parallel zu den Inokulationen der Mäuse an, auf die hier nicht eingegangen wird, da sie bekannte Daten bestätigten.

3.3 Tumorigenität von SLGC-Linien

Um die potentiellen SLGC-Linien auf ihre Tumorigenität zu untersuchen, wurden Zellen der Primärkulturen in die Gehirne von SCID-Mäusen inokuliert. Es wurden auch

die Nestin-negativen Zellen der Meningeom-Zelllinie T1469 verwendet. Zunächst wurde der Versuchsaufbau etabliert, da die Methode zu Beginn dieser Arbeit im Labor nur sporadisch genutzt wurde. Daher wurden für die ersten Inokulationen stets verschiedene Zellzahlen eingesetzt; 25.000, 50.000, 150.000 und 250.000 Zellen. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen Zellzahl und Tumorigenität oder Tumorgroße beobachtet. Die ersten Experimente erfolgten mit Zellen der Gliosarkom-Linie T1371 und erbrachten durchwachsene Ergebnisse (siehe Tabelle 19). Zudem wurden zur Kontrolle Mäuse mit der etablierten GBM-Zelllinie U87MG inokuliert. Diese Zelllinie war zuvor mehrfach auf die Fähigkeit zur Bildung orthotoper Tumoren selektiert worden und ist im Tumorigenitäts-Assay daher sehr aggressiv. Die mit U87-Zellen xenotransplantierten Tiere zeigten bereits nach 2-3 Wochen neurologische Ausfälle oder eine Kachexie und wurden geopfert.

In der Wiederholung der Inokulation mit T1371 wurden in allen Mäusen Tumoren nachgewiesen (Beispiel siehe Abb. 5). Es folgten die Zelllinien T1440, T1442 und T1467, sowie die Meningeom-Zelllinie T1469 (siehe Tabelle 19). Die Inokulationen mit T1469 führten zu keinen histopathologisch nachweisbaren Tumoren. Im Fall von T1440 und T1467 entstanden u.a. sehr große Tumoren (Beispiel siehe Abb. 5), die bereits makroskopisch erkennbar waren. Aus diesen wurden erneut Zellkulturen angelegt, die mit dem Suffix „SCID“ gekennzeichnet wurden. Von den SCID-Linien wurde in dieser Arbeit nur T1467-SCID weiter analysiert und erneut inokuliert. Die Zelllinie T1467-SCID ähnelte in allen Parametern der Ursprungszelllinie T1467 (siehe Tabelle 1). Die Inokulation von T1467-SCID ergab jedoch keine makroskopisch sichtbaren orthotopen Tumoren, auch in den H.E.-Färbungen wiesen nicht alle Tiere orthotope Tumoren auf (siehe Tabelle 19). Die orthotopen T1440-Tumoren waren generell groß (siehe Abb. 5), obwohl die Zelllinie ein adhärentes Wachstumsmuster zeigte und Nestin und GFAP exprimierte. Die T1371- und T1442-Tumoren wuchsen diffus und invasiv (siehe Abb. 5). Die Inokulationen von T1522, T1524, T1549 und T1556 ergaben durchweg nur orthotope Tumoren geringer Größe (siehe Tabelle 19). Allerdings war im parallelen Kontrollexperiment auch die Tumorbildung nach U87MG-Inokulationen deutlich verzögert und die Tiere blieben mehr als 2 Monate symptomfrei. Bei diesen Experimenten fiel auf, dass die Mäuse Zeichen eines Infekts, wie eine Entzündung an den Augen, aufwiesen. Weiterhin ist zu erwähnen, dass es in einigen Fällen zu einer extrakraniellen Tumorbildung kam, die darauf zurückzuführen ist, dass Zellen durch

den Sog der Hamilton-Spritze in den Stichkanal und nach extrakraniell gelangten (siehe Abb. 5, T1440-D).

Mäuse, die makroskopisch sichtbare Tumoren, neurologische Ausfälle oder eine Kachexie zeigten, wurden umgehend geopfert. Die makroskopisch sichtbaren Tumoren stellten sich knotig und verdrängend wachsend dar (siehe Abb. 5, T1467). Die Größe der Tumoren war sehr heterogen. So ließ sich im Fall von T1467 innerhalb kürzester Zeit in einigen Tieren das Wachstum großer Tumoren beobachten, während andere Tiere nur kleine Tumoren aufwiesen. Diese Beobachtung traf auf alle Serien von Experimenten zu, wobei die Tumorgöße nicht mit der Anzahl der inokulierten Zellen korrelierte. Mikroskopisch zeigte sich eine Invasion der Tumorzellen in das umgebende Hirnparenchym. In der H.E.-Färbung variierte auch das Erscheinungsbild der Tumorzellen, d.h. die Tumorzellen selbst waren polymorph; es zeigten sich epitheloide, spindelige, kleinzellige Phänotypen, sowie Riesenzellen. Eine Assoziation dieser Beobachtung mit dem Zelltyp und/oder der Zellzahl war nicht erkennbar.

In Abb. 5 wurden H.E.-Färbungen zusammengestellt, die einige Besonderheiten der erhobenen Daten zeigen. Der Schnitt des T1371-Tumors zeigt ein auf eine Hemisphäre begrenztes Tumorwachstum. Der Schnitt des T1467-Tumors zeigt einen großen Tumor, der sich über beide Hemisphären erstreckt und makroskopisch sichtbar war. Die Schnitte des T1442-Tumors zeigen im Schnitt A einen Tumor, der sich über beide Hemisphären ausbreitet, im Schnitt B ist der Tumor auf eine Hemisphäre begrenzt. Die Variabilität der orthotopen T1440-Tumoren sind in den Schnitten A bis D gezeigt. In den Schnitten A und B sind T1440-Tumoren, welche die Mittellinie überschreiten. Im Schnitt C liegt der Tumor an der Basis des Gehirns. Der Schnitt D zeigt beispielhaft die Verschleppung von Zellen über den Stichkanal und eine dadurch bedingte Tumorbildung im Stichkanal, sowie extrakraniell.

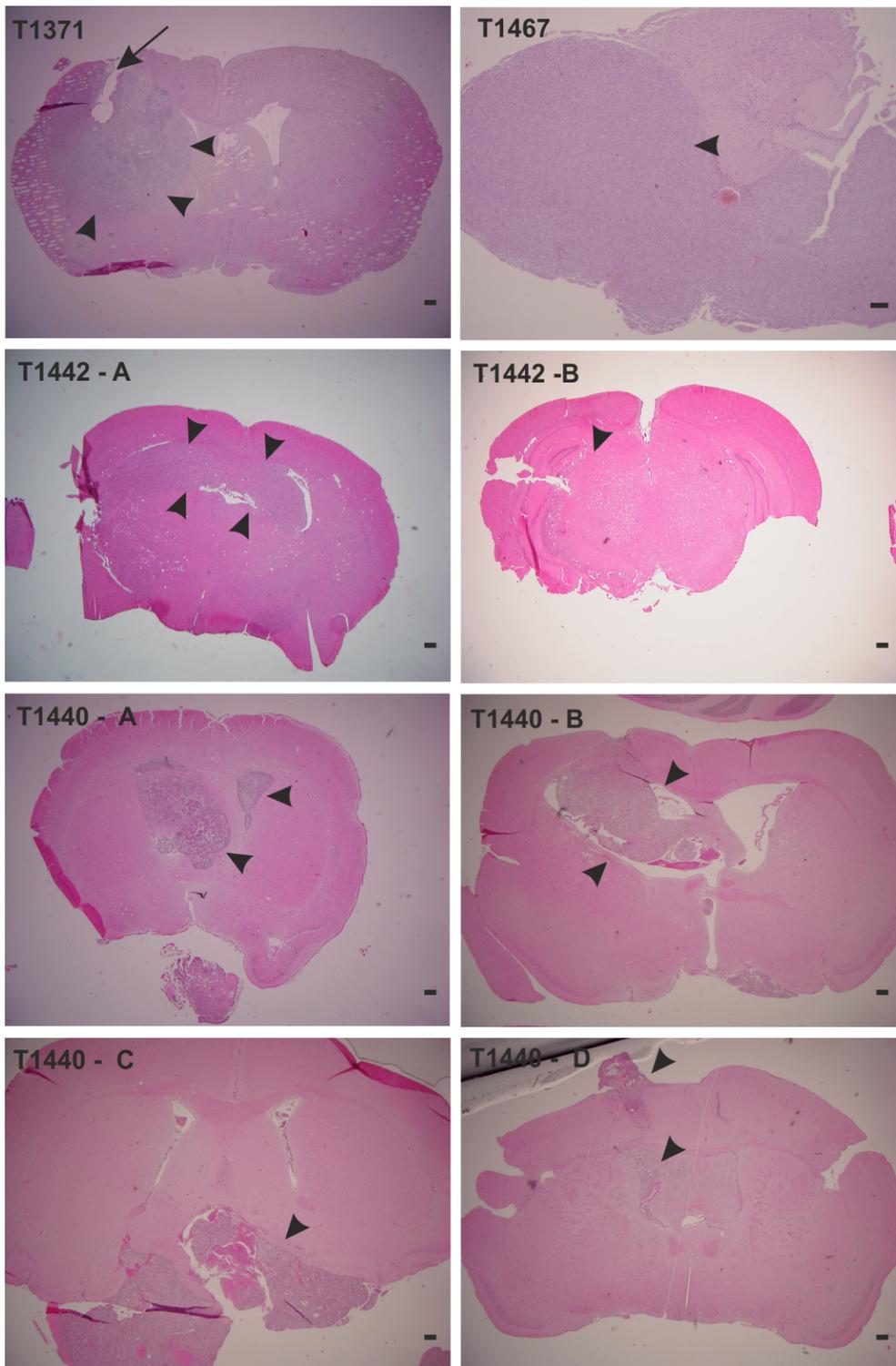


Abb. 5. H.E.-Färbung muriner Gehirne nach Xenotransplantation von SLGC-Linien.
 Die Abbildungen zeigen jeweils einen coronaren Schnitt durch ein murines Gehirn. Die Pfeile markieren den Tumor oder Tumorgrenzen. Der Balken entspricht 50 µm.

Tabelle 19. Tumorigenität von SLGC-Linien.

Zelllinie	Zellzahl	Tumor	Anzahl	Bemerkung
T1371	50.000, 150.000, 250.000	ja	1/5	heterogene Größe; z.T. sehr groß und invasiv; unabhängig von der Zellzahl
	50.000, 150.000, 250.000	ja	6/6	
T1440	150.000, 250.000	ja	4/4	heterogene Größe; z.T. sehr groß und invasiv; unabhängig von der Zellzahl
	150.000, 250.000	ja	11/11	
T1442	150.000, 250.000	ja	2/5	sehr groß und invasiv
	200.000	ja	5/8	
	200.000	ja	3/3	
T1467	150.000, 250.000	ja	8/9	heterogene Größe; unabhängig von der Zellzahl; zum Teil makroskopisch erkennbar
T1467-SCID	200.000	ja	5/5	heterogene Größe
T1469	100.000, 200.000	nein	5/5	
T1522	150.000, 250.000	ja	1/2	heterogene Größe; unabhängig von der Zellzahl
	200.000	ja	2/3	
T1524	200.000	ja	3/3	meist sehr kleine Läsionen
T1549	200.000	ja	3/3	meist sehr kleine Läsionen
T1556	200.000	ja	3/3	meist sehr kleine Läsionen

Die Tumoren wurden mittels H.E.-Färbung detektiert, die Anwesenheit kleiner Tumoren kann so nicht ausgeschlossen werden. Die TMZ-Gabe erfolgte über das Trinkwasser. SCID, engl. *severe combined immunodeficiency*; TMZ, Temozolomid.

Die initialen Inokulationen mit den acht Glioblastomlinien identifizierten T1467 als eine der aggressivsten SLGC-Linie hinsichtlich ihrer Tumorigenität. Um die Wirkung von TMZ auf eine SLGC-Linie *in vivo* zu untersuchen wurden daher Mäuse mit T1467-Zellen inokuliert und anschließend mit TMZ behandelt. Das TMZ wurde über das Trinkwasser der Mäuse appliziert. Die Testgruppe (TMZ-Behandlung) umfasste 5 Tiere. Die TMZ-Behandlung wurde ab Woche 5 nach der Inokulation begonnen. Eine Kontrollgruppe ohne TMZ-Behandlung war nicht vorhanden. In dieser Analyse zeigten sich keine makroskopischen Tumoren. In der H.E. Färbung gab es ebenfalls keinen eindeutigen Tumornachweis. In einem weiteren Experiment wurde die Zelllinie T1467-SCID inokuliert. Die Kontrollgruppe ohne TMZ-Behandlung umfasste 2 Tiere, jede Behandlungsgruppe 4 Tiere. Eine Testgruppe erhielt die TMZ-Behandlung ab Woche 2 und eine weitere Testgruppe ab Woche 3 nach der Xenotransplantation. Ein Tumornachweis in der H.E.-Färbung konnte nur für ein Tier aus der Gruppe, welche ab Woche 3 behandelt wurde, erbracht werden.

Tabelle 20. Tumorigenität von TMZ-behandelten SLGC-Linien.

Zelllinie	Zellzahl	Tumor	Anzahl	TMZ-Gabe
T1467	50.000	nein	0/5	ab Woche 5
T1467-SCID	50.000	nein	0/2	-
	50.000	nein	0/4	ab Woche 2
	50.000	ja	1/4	ab Woche 3

SLGC, engl. stem like glioma cell; TMZ, Temozolomid; SCID, engl. severe combined immunodeficiency.

3.4 TMZ-Sensitivität von SLGC-Linien

Für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mit dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) behandelt. Anschließend wurden Aspekte der TMZ-Resistenz (ABC-Transporter, MGMT-Status), der Proliferation, der Vitalität und Stammzeleigenschaften mittels unterschiedlicher Methoden analysiert. Abb. 6 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Experimente.

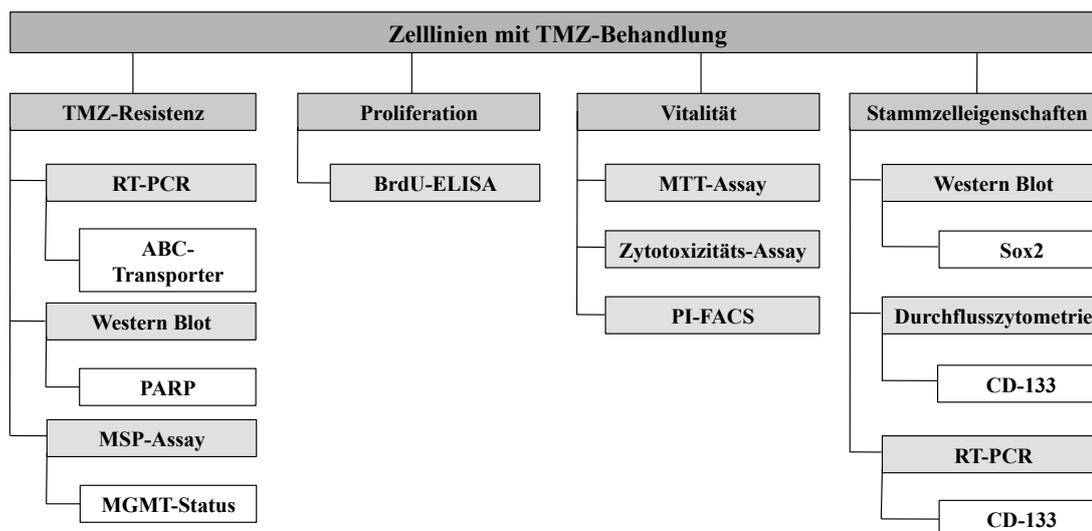


Abb. 6. Übersicht der durchgeführten Experimente zur Analyse der TMZ-Sensitivität.

TMZ, Temozolomid; PCR, engl. *polymerase chain reaction*; BrdU, Bromdesoxyuridin; ELISA, engl. *enzyme-linked-immunosorbent assay*; MTT, Dimethylthiazol-diphenyltetrazoliumbromid; PI, Propidium Jodid; PARP, Poly(ADP-ribose)-Polymerase; MSP, engl. *methylation specific polymerase chain reaction*; MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; Sox2, engl. *sex-determining-region Y (SRY)-box 2*.

3.4.1 TMZ-Resistenzmechanismen

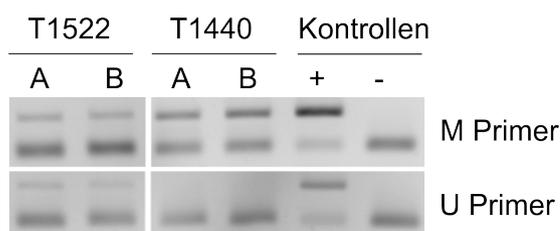
Zur Untersuchung von Eigenschaften, die zur Resistenz gegenüber TMZ beitragen, wurde die Methylierung des *mgmt*-Promotors analysiert. Dieser war für die Mehrheit der SLGC-Linien in frühen Passagen ermittelt worden, kann sich aber nachweislich ändern und wurde daher überprüft bzw. erstmalig bestimmt. Weiterhin wurde die Expression verschiedener ABC-Transportergene mittels RT-PCR untersucht. Mittels Western Blot wurde die Expression und proteolytische Spaltung der Polymerase PARP bestimmt. Die Zelllinien wurden zum Teil unbehandelt untersucht. Bei Experimenten mit TMZ-Behandlung wurden die parallelen Kontrollansätze mit DMSO behandelt, da das TMZ in DMSO gelöst ist.

Tabelle 21. Übersicht der Daten des MSP-Assays.

Zelllinie	unmethyliert (%)	methyliert (%)	MGMT-Status
T1371	100	-	u
T1440	-	100	m
T1442	40	60	u/m
T1467	20	80	u/m
T1469	100	-	u
T1522	40	60	u/m
T1524	60	40	u/m
T1549	70	30	u/m
T1556	n.d.	n.d.	-
T1564	n.d.	n.d.	-

Der fett gedruckte MGMT-Status gibt an welcher Status überwog. MSP, engl. *methylation specific polymerase chain reaction*; MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; u, unmethyliert; m, methyliert.

Die Methylierungsspezifische-PCR wurde eingesetzt, um den MGMT-Status zu überprüfen, bzw. erstmals zu bestimmen. Für T1371 wurde der unmethylierte Zustand bestätigt, ebenso der unmethylierte Zustand im Fall von T1440. Für T1442 ergab sich ein u/m Status, d.h. es lagen sowohl methylierte als auch unmethylierte *mgmt*-Promotoren vor. Auch für T1467, T1522, T1524 und T1549 wurde ein u/m Status ermittelt. Dabei überwog in den Zelllinien T1442, T1467 und T1522 der methylierte Zustand, in T1524 und T1549 der unmethylierte. Die Meningeom-Zelllinie T1469 zeigte einen unmethylierten Status.

**Abb. 7. Beispiel einer Methylierungsspezifischen-PCR (SLGC-Linien T1522 und T1440).**

Dargestellt sind zwei parallele Ansätze, eine Positiv-Kontrolle (+) für jedes Primerpaar (M: methyliert, U: unmethyliert), sowie eine Negativ-Kontrolle (-), welche kein Template enthielt. Die untere Bande zeigt unspezifische Primerreste, die obere Bande spezifische Produkte.

Die Expression der ABC-Transporter ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 wurde durch semi-quantitative RT-PCR untersucht. Wenn Transporter exprimiert werden, die in der Lage sind TMZ wieder aus der Zelle zu befördern, wäre dies ein möglicher Grund für eine TMZ-Resistenz. Abb. 8 und Abb. 9 zeigen die gegen *gapdh*-mRNA normalisierte relative Expression der untersuchten Transporter in

unbehandelten und TMZ-behandelten Zelllinien. Es wurden die basalen Expressionslevel der Zelllinien T1522, T1524, T1549 und T1556 verglichen. Weiterhin wurden für T1440 und T1442 mögliche Veränderungen der Expressionslevel nach Behandlung mit 50 μ M TMZ ermittelt.

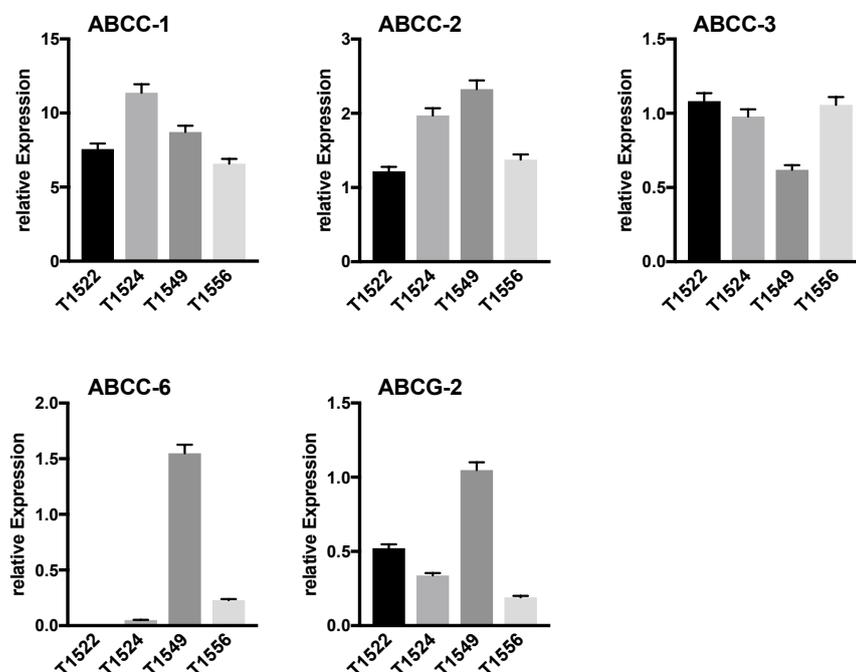


Abb. 8. Graphische Darstellung der mittels semi-quantitativer RT-PCR untersuchten Expression von ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 in unbehandelten Zelllinien. Normalisierung der Expression gegen die Expression von gapdh. Der Fehlerbalken gibt den systematischen Fehler von 5% an.

Die unbehandelten Zelllinien T1522, T1524, T1549 und T1556 zeigten eine Expression der für den Transporter ABCC-1 kodierenden mRNA, wobei diese in T1524 am höchsten war, gefolgt von T1549, T1522 und T1556. Dabei war die Expression in T1524 doppelt so hoch wie in T1556. Die Expressionslevel der ABCC-2 mRNAs unterschieden sich ebenfalls im niedrigen, einstelligen Bereich. Das Expressionslevel war hier in T1549 am höchsten, gefolgt von T1524, T1556 und T1522. Dabei betrug die höchste Expression in T1524 wiederum das Doppelte der niedrigsten in T1522. Anders bei ABCC-3, hier erreichte das mRNA-Expressionslevel in T1522 einen doppelt so hohen Wert wie in T1549. Insgesamt ergab sich für ABCC-3 die folgende Reihung der Expressionslevel T1522 > T1556 > T1524 > T1549. Während die Expressionslevel der ABCC-1, ABCC-2 und ABCC-3 mRNAs sich zwischen den Zelllinien maximal um den Faktor zwei unterschieden, verhielt es sich bei ABCC-6 anders. Hier zeigte T1549 mit 1,55 die höchste relative Expression, während sich in T1522 keine Expression

nachweisen ließ. Auch in T1524 wurde nur ein sehr geringes relatives Expressionslevel unter 0,1 festgestellt. In T1556 war das ABCC-6 mRNA-Level höher als in T1522 und T1524, erreichte aber auch nur etwa 14% des Levels in T1549. Somit scheint die Expression der untersuchten ABC-Transporter-mRNAs innerhalb der „C“-Gruppe im Fall von ABCC-6 am variabelsten zu sein. Die Expressionslevel des Transporters ABCG-2, der einzige hier untersuchte Transporter aus der „G“-Gruppe, waren in T1549 am höchsten und etwa doppelt so hoch wie in T1522. Die Expressionslevel für T1524 und T1556 lagen jeweils niedriger, womit sich die Reihung T1549 > T1522 > T1524 > T1556 ergab.

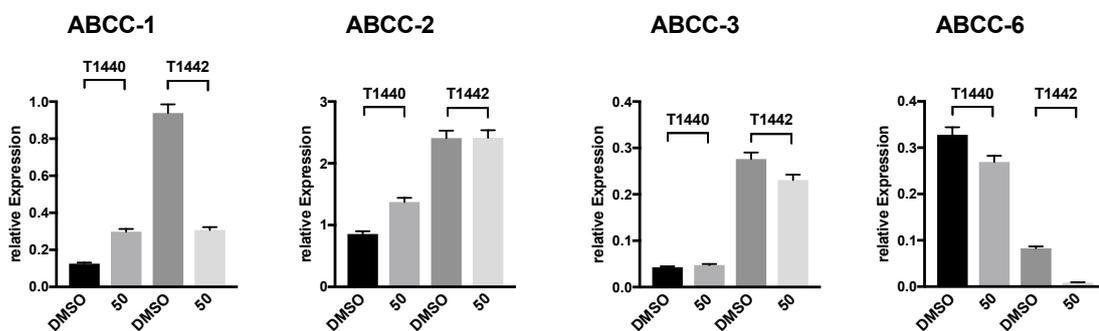


Abb. 9. Graphische Darstellung der mittels semi-quantitativer RT-PCR untersuchten Expression von ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3 und ABCC-6 in den Zelllinien T1440 und T1442 in Abhängigkeit von der TMZ-Behandlung. Behandlung mit 50 μM TMZ. Normalisierung der Expression gegen die Expression von gapdh. Die Kontrollen wurden mit DMSO behandelt, da TMZ in DMSO gelöst wird. Der Fehlerbalken gibt den systematischen Fehler von 5% an.

Zwei Zelllinien wurden auf die Veränderung des Expressionslevels der ABC-Transporter-mRNAs nach Behandlung mit 50 μM TMZ untersucht. Es wurden T1440 und T1442 ausgewählt. Erstere ist gegenüber TMZ sehr empfindlich und zeigte einen methylierten MGMT-Status. T1442 weist einen m/u Status auf, mit Präferenz zum methylierten Status (siehe Tabelle 21). Jeweils verglichen mit der DMSO-Kontrolle, reagierte T1440 auf die Behandlung mit 50 μM TMZ mit einer Steigerung des ABCC-1 und ABCC-2 mRNA-Levels; im Fall von ABCC-1 um das Doppelte und im Fall von ABCC-2 um etwa ein Drittel. Für die ABCC-3 mRNA war nur eine minimale Veränderung feststellbar, für die ABCC-6 mRNA nur eine Senkung von etwa 20%. Die Zelllinie T1442 reagierte anders. Hier induzierten 50 μM TMZ eine starke Reduktion der ABCC-1 mRNA um fast 70%, sowie des ABCC-6 mRNA-Levels um über 90%. Das Level der ABCC-2 mRNA blieb nahezu unverändert. Das Level der ABCC-3

mRNA fiel um etwa 15%. Damit liegt die Vermutung nahe, dass TMZ die Expressionslevel von ABC-Transportern der „C“-Gruppe verändern kann.

Mittels Western Blots wurden die Expression und proteolytische Spaltung des PARP Proteins untersucht. Die Spaltung von PARP ist ein Indiz für die Aktivierung der Effektorcaspase 3 und damit der Apoptose (Porter und Jänicke, 1999). Das typische Spaltfragment hat eine Größe von 89 kDa. Die Expression wurde relativ zu den Aktin- und GAPDH-Ladekontrollen ausgedrückt.

Generell war festzustellen, dass die Behandlung der Zelllinien T1440, T1522, T1524, T1549 und T1556 zum Zelltod führte und aus dem behandelten Proben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nur deutlich reduzierte Zellmengen geerntet werden konnten. Dies spiegelte sich in der Signalstärke der Banden der PARP-Blots wider, insbesondere bei den Ansätzen mit 300 μM TMZ (siehe Abb. 10). Aus diesem Grund wurden die Blots in Abb. 10 überexprimiert.

Die Zelllinie T1522 wies an Tag d3 eine Verdopplung der PARP-Expression unter Behandlung mit 200 μM TMZ im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO auf. Die mit 300 μM behandelte Probe zeigte hingegen keine nachweisbare PARP-Expression. Allerdings waren auch für die stark exprimierten Ladekontrollen Aktin und GAPDH trotz längerer Exposition keine oder nur schwache Signale erkennbar. An Tag d6 wies die DMSO-Probe ein stärkeres PARP-Signal auf als die mit 200 und 300 μM TMZ behandelten Proben bei nahezu gleichen Aktin- und GAPDH-Signalen. Eine Abspaltung des cleaved PARP vom Volle-Länge-Protein war nur in den Tag d6-Proben erkennbar. Die Zelllinie T1524 zeigte an Tag d3 einen dosisabhängigen Anstieg der PARP-Expression unter Behandlung mit TMZ. An Tag d6 wies bereits die DMSO-Kontrolle eine erhöhte PARP-Expression auf, diese stieg unter Behandlung mit 100 μM TMZ noch an und war in der mit 200 μM behandelten Probe gleichbleibend. Für die Zelllinie T1549 war an Tag d3 nur in der DMSO-Kontrolle eine geringe PARP-Expression nachweisbar, während für die mit 200 μM und 300 μM TMZ behandelten Proben keine PARP-Expression nachweisbar war. An Tag d6 war die PARP-Expression in der DMSO-Kontrolle relativ zu Tag d3 erhöht. Für die mit TMZ-behandelten Proben wurde eine >80% reduzierte PARP-Menge ermittelt. Die Ladekontrollen Aktin und GAPDH zeigten, sowohl an Tag d3 als auch an Tag d6, dass hier nur geringe Proteinmengen in den behandelten Proben vorhanden waren. Die Zelllinie T1440 zeigte bei methyliertem MGMT-Status (siehe Tabelle 21) eine hohe Sensitivität gegenüber

TMZ, so dass sie hier mit 5 μ M TMZ behandelt wurde. Der Western Blot wurde nur an Tag d3 durchgeführt. Bei der sehr geringen TMZ-Dosis zeigte sich in den T1440-Proben nur eine leicht erhöhte PARP-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die 89 kDa Bande war etwas stärker als in der DMSO-Kontrolle. Die Zelllinie T1556 wies in der DMSO-Kontrolle nur eine sehr geringe, in den TMZ-behandelten Proben keine messbare PARP-Expression auf. Dazu waren auch die Aktin- und GAPDH-Ladekontrollen in den behandelten Proben kaum nachweisbar, was einen massiven Zelltod wahrscheinlich macht. Insgesamt war in keiner der Proben eine deutliche Induktion der 89 kDa Bande des cleaved PARP durch TMZ erkennbar. Da massiver Zelltod auftrat, scheint dieser nicht durch Apoptose vermittelt zu werden.

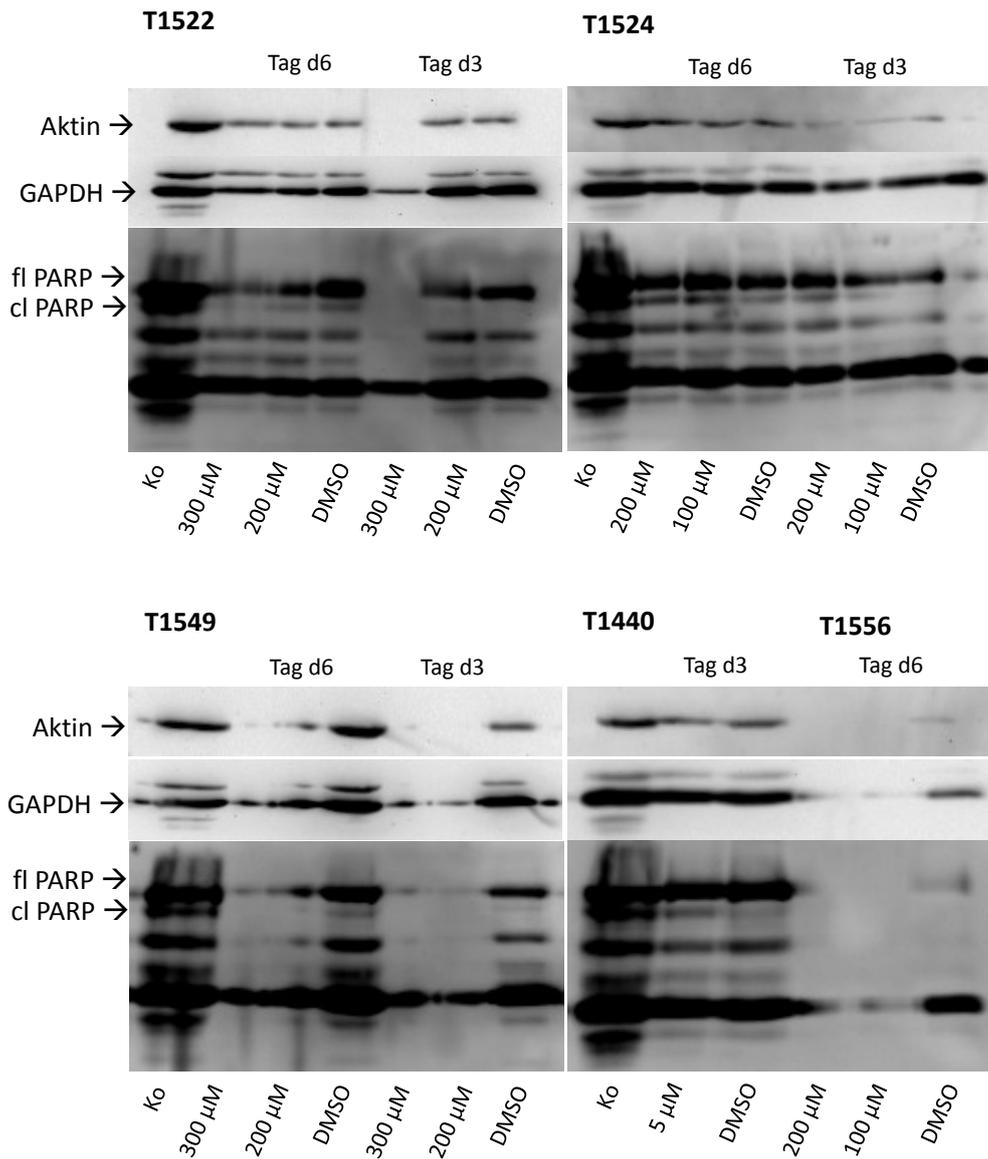


Abb. 10: Western Blot Analyse der PARP-Expression und Proteolyse in SLGC-Linien.

12 μ M Gesamtzellproteinextrakt wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit einem Antikörper inkubiert, der sowohl das Volle-Länge-PARP (fl, 116 kDa) als auch das durch Caspase 3 abgespaltene Fragment (cl, 89 kDa) erkennt. Die Zelllinie T1440 wurde nur an Tag d3 untersucht, die Zelllinie T1556 wurde nur an Tag d6 untersucht. Als Ladekontrollen dienten Aktin und GAPDH. Die Kontrollproben enthielten DMSO, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst eingesetzt wurde. Die Zelllinie T1440 diente als Positiv-Kontrolle (Ko) für den Blot, da hier eine PARP-Expression bereits nachgewiesen werden konnte. fl PARP, engl. *full length*, Volle-Länge-Protein; cl PARP, engl. *cleaved*, Spaltfragment; Ko, Kontrolle.

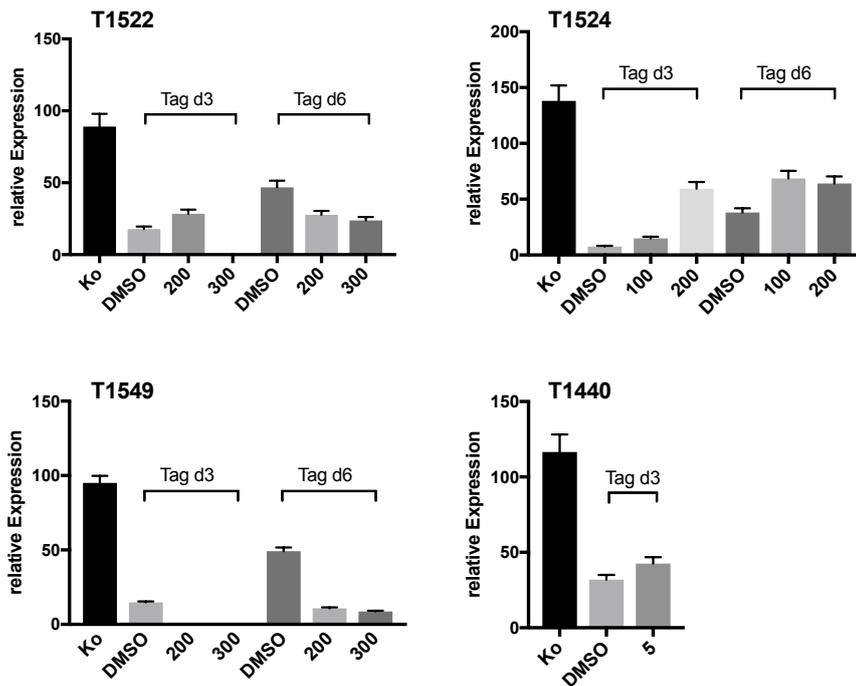


Abb. 11. Darstellung der relativen Expression des Volle-Länge-PARPs.

Graphische Darstellung der relativen Expression von PARP nach TMZ-Behandlung an den Tagen d3 und d6. Die Zelllinie T1440 wurde lediglich an Tag d3 untersucht. Auf die Darstellung der Zelllinie T1556 wurde bei fehlender Expression verzichtet. Als Positiv-Kontrolle (Ko) wurde die Zelllinie T1440 verwendet. Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung der Blots in Abb. 10 nach Normalisierung gegen die Aktin- und GAPDH-Level. Der Fehlerbalken gibt den systematischen Fehler von 5% an. Die TMZ Konzentrationen sind in μM angegeben.

3.4.2 Effekte auf Proliferation und Vitalität

Die Zellproliferation unter TMZ-Behandlung wurde mittels BrdU-ELISA untersucht. Zur Untersuchung der Vitalität von TMZ-behandelten Zellen wurden MTT-Assays und Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse mit Propidium-Jodid-markierten Zellen wurden ebenfalls Hinweise auf Zelltod, aber insbesondere Aussagen zum Zellzyklus erhalten. Die Messungen erfolgten jeweils an Tag d3 und Tag d5 nach TMZ-Zugabe. Die Zellen wurden mit ansteigenden TMZ-Konzentrationen behandelt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen, sowie mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Als Vergleichswert wurde bei den photometrischen Methoden die mittlere effektive TMZ-Konzentration, die sogenannte EC50, berechnet. Dieser Wert gibt an, bei welcher Konzentration 50% der behandelten Zellen einen messbaren Effekt, im Sinne einer Veränderung der optischen Dichte, auf das TMZ zeigten. Dies erfolgte analog für die Senkung der optischen Dichte (OD) im

BrdU-ELISA und MTT-Assay, sowie die Steigerung der optischen Dichte im Zytotoxizitäts-Assay.

3.4.2.1 Beeinflussung der Proliferation von SLGC-Linien durch TMZ

BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Die mit BrdU markierten Zellen lassen sich nach Abschluss des Experiments mittels eines Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers nachweisen, der aufgrund einer Redox-Reaktion einen Farbumschlag induziert. Dieser wird dann im Photometer gemessen. Es wurden die Zelllinien T1522, T1524, T1549, T1564, T1440 und T1495 untersucht. Für die beiden zuletzt genannten Zelllinien liegen bereits Daten im Labor vor. Hier stellte sich die Frage, ob diese Daten bestätigt werden können bzw. ob das Verhalten der Zellen in der *in vitro* Kultur stabil war. Die weiteren Zelllinien waren zuvor noch nie untersucht worden. Die Ergebnisse hinsichtlich der EC50-Werte sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Hier sollen die Daten für die Zellen T1522, T1524, T1440 und T1495 exemplarisch anhand der graphischen Darstellungen besprochen werden, die übrigen Daten lediglich anhand der Tabellen. Angaben zu Details der statistischen Auswertung befinden sich im Anhang (Tabelle 25 bis Tabelle 30). Wie zuvor angesprochen, wurden die EC50-Werte mehrerer Serien zusammengeführt und daher Grenzwerte statt individueller EC50-Werte angegeben.

Fünf der sechs untersuchten Zelllinien zeigten eine dosisabhängige Senkung der BrdU-Inkorporation an den Tagen d3 und d5. Bei T1522 wurde die EC50 an Tag d3 mit Konzentrationen zwischen 300 und 350 μM , an Tag d5 zwischen 200 und 250 μM erreicht. Da die Qualität der Tumorstammzellen stets etwas schwankt sind nur individuelle Experimentserien statistisch zu bewerten. Im Fall von T1522 wurde eine statistisch signifikante Senkung der optischen Dichte relativ zur Kontrolle an Tag d3 und Tag d5 mit 50 μM erreicht (Abb. 12). Der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von Tag d3 und d5 in Abb. 13 zeigt, dass die Senkung der optischen Dichte nahezu parallel verlief.

Auch für die Zelllinie T1524 wurde eine dosisabhängige Senkung der optischen Dichte beobachtet, wobei die EC50 an Tag d3 bei 100 - 200 μM erreicht wurde. An Tag d5 wurde die EC50 bereits bei 50 - 100 μM erreicht (Abb. 12). Weiterhin wurde eine statistisch signifikante Senkung der optischen Dichte an Tag d5 bereits bei 12,5 - 25 μM TMZ beobachtet. Dabei fällt auf, dass eine Verdopplung der TMZ-Konzentration nicht zu einer Halbierung der optischen Dichte führte. Viel mehr reagierten die Zellen auf

Konzentrationsunterschiede zwischen 100 und 200 μM TMZ an Tag d5 sehr sensitiv. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass TMZ in T1524 Kulturen eine dosis- und zeitabhängige Inhibierung der Proliferation bewirkt (Abb. 13).

Die Zelllinie T1440 zeigte an Tag d3 und Tag d5 ein Verhalten, das von dem der anderen Zelllinien abwich. So induzierten 6,25 μM TMZ wie erwartet eine deutliche Senkung der optischen Dichte um etwa 50%. Eine weitere Erhöhung der TMZ-Konzentration hatte nur noch einen moderaten Effekt (Abb. 12) und die Messwerte bei höheren TMZ-Konzentrationen lagen zum Teil über denen bei 6,25 μM TMZ. Dieses Verhalten wurde reproduzierbar für T1440-Kulturen beobachtet und reflektiert Änderungen in den Kulturen, wie Aggregatbildungen und Zelltod.

Die Wirkung von TMZ auf die Zelllinie T1495 war an Tag d3 und d5 dosisabhängig. Die Werte für die EC50 lagen an Tag d3 zwischen 100 und 150 μM , am Tag d5 zwischen 90 und 100 μM . Die längere Inkubationszeit steigerte den TMZ-Effekt nur insofern, dass die Messwerte für 200 μM an Tag d5 unter denen an Tag d3 lagen (Abb. 12).

Auf die beiden weiterhin untersuchten Zelllinien T1549 und T1564 übte TMZ wiederum eine dosisabhängige Senkung der Proliferation aus, wobei für T1549 zusätzlich eine zeitabhängige Steigerung des Effekts feststellbar war. Die EC50-Werte lagen für T1549 zwischen 250 und 300 μM an Tag d3 und zwischen 90 und 100 μM an Tag d5, für T1564 bei über 400 μM an Tag d3 und zwischen 350 und 400 μM an Tag d5 (Tabelle 22).

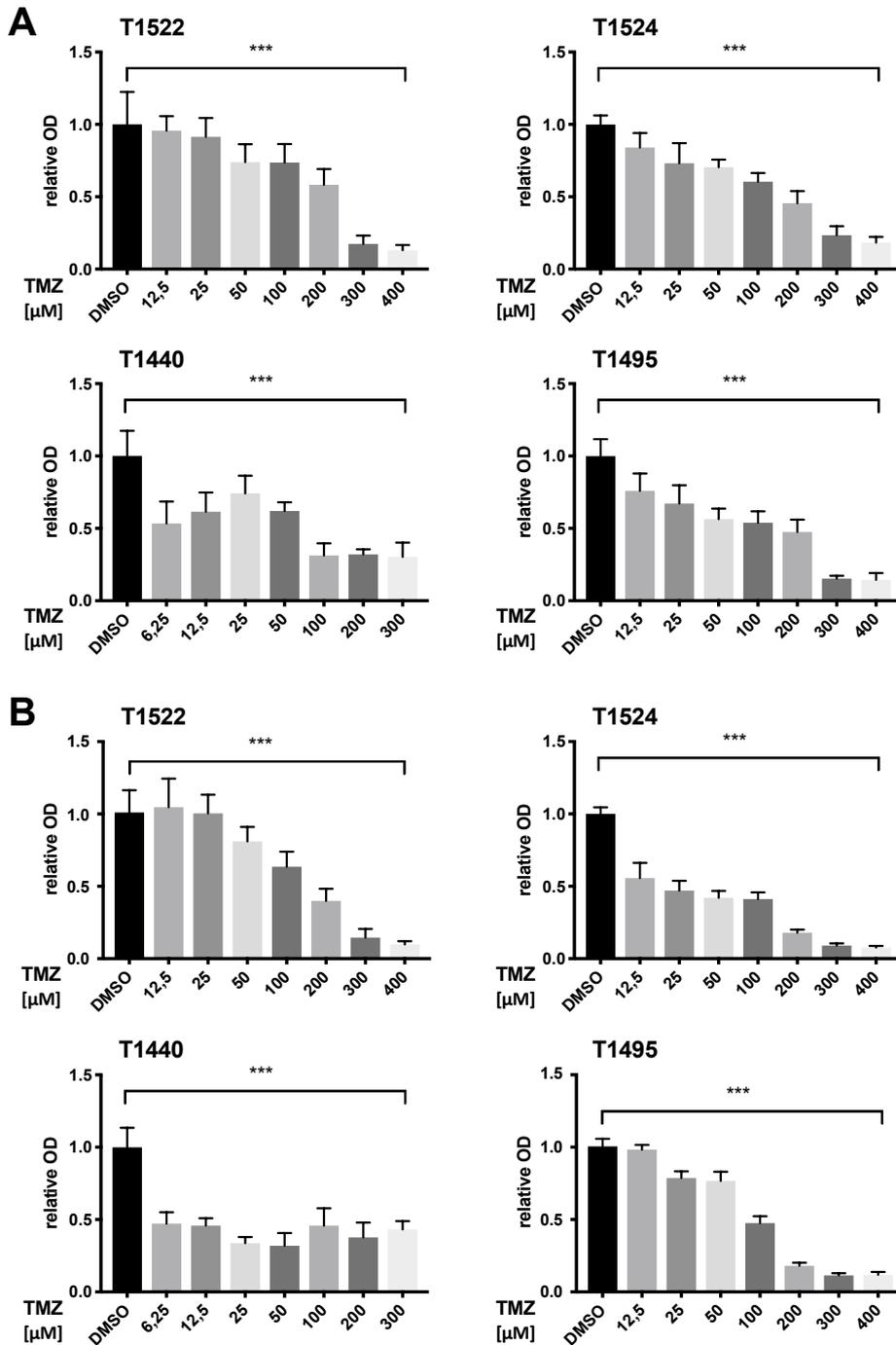


Abb. 12. Senkung der BrdU-Inkorporation in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen an A) Tag d3 und B) Tag d5 des BrdU-ELISA. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD). DMSO diente als Kontrolle, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst wurde. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels ANOVA Test ermittelt. *** = $p < 0,001$.

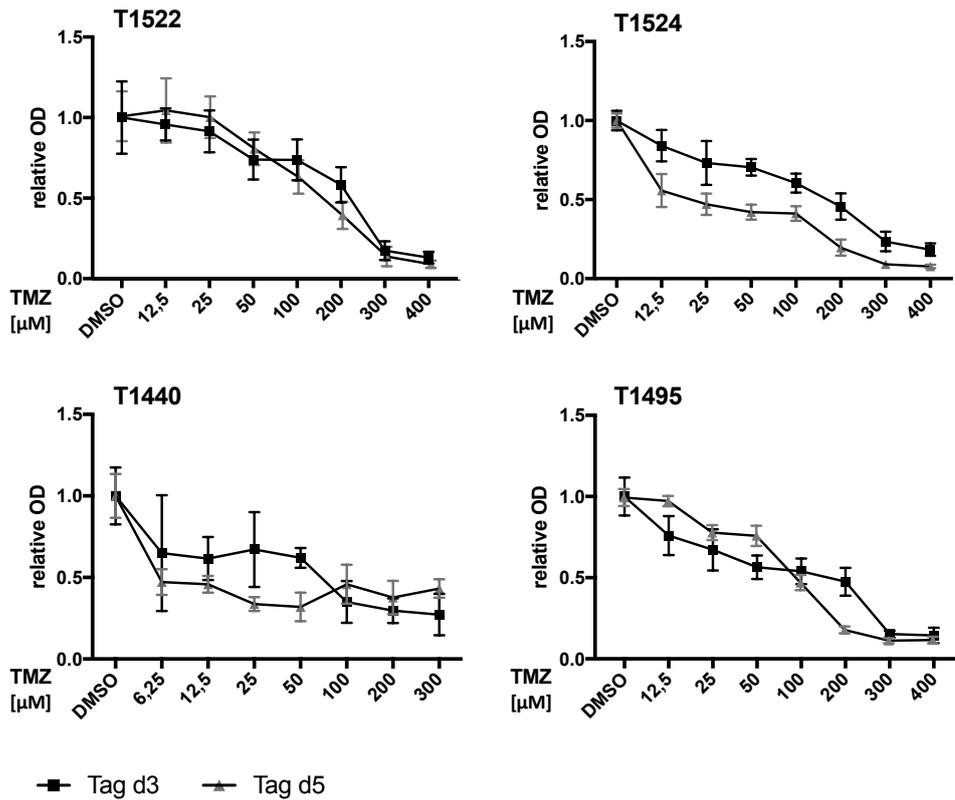


Abb. 13. Dosis-Wirkungs-Kurven des BrdU-ELISA in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen des BrdU-ELISA an Tag d3 und Tag d5. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD).

3.4.2.2 Effekte von TMZ auf die Vitalität von SLGC-Linien

MTT wird von Zellen über Endozytose oder Proteine aufgenommen, anschließend erfolgt eine Reduktion und es entsteht ein violettes Formazan. Dieses kann die Zelle nicht verlassen und sammelt sich so in vitalen Zellen an. Wird die Zellwand zerstört, wird das violette Formazan freigesetzt und kann photometrisch gemessen werden. Kann eine Zelle das MTT reduzieren, so gibt dies einen Hinweis darauf, dass die Zelle vital und metabolisch aktiv ist (Mosmann, 1983).

Insgesamt wurde die optische Dichte aller untersuchten Zelllinien im MTT-Assay an beiden Messtagen nur moderat gesenkt, so dass die EC50 in keinem Fall erreicht wurde. Zudem wurden nur geringe Dosiseffekte und keine zeitabhängigen Effekte beobachtet (Abb. 14). Angaben zu Details der errechneten p-Werte befinden sich in Tabelle 25 bis Tabelle 30 im Anhang.

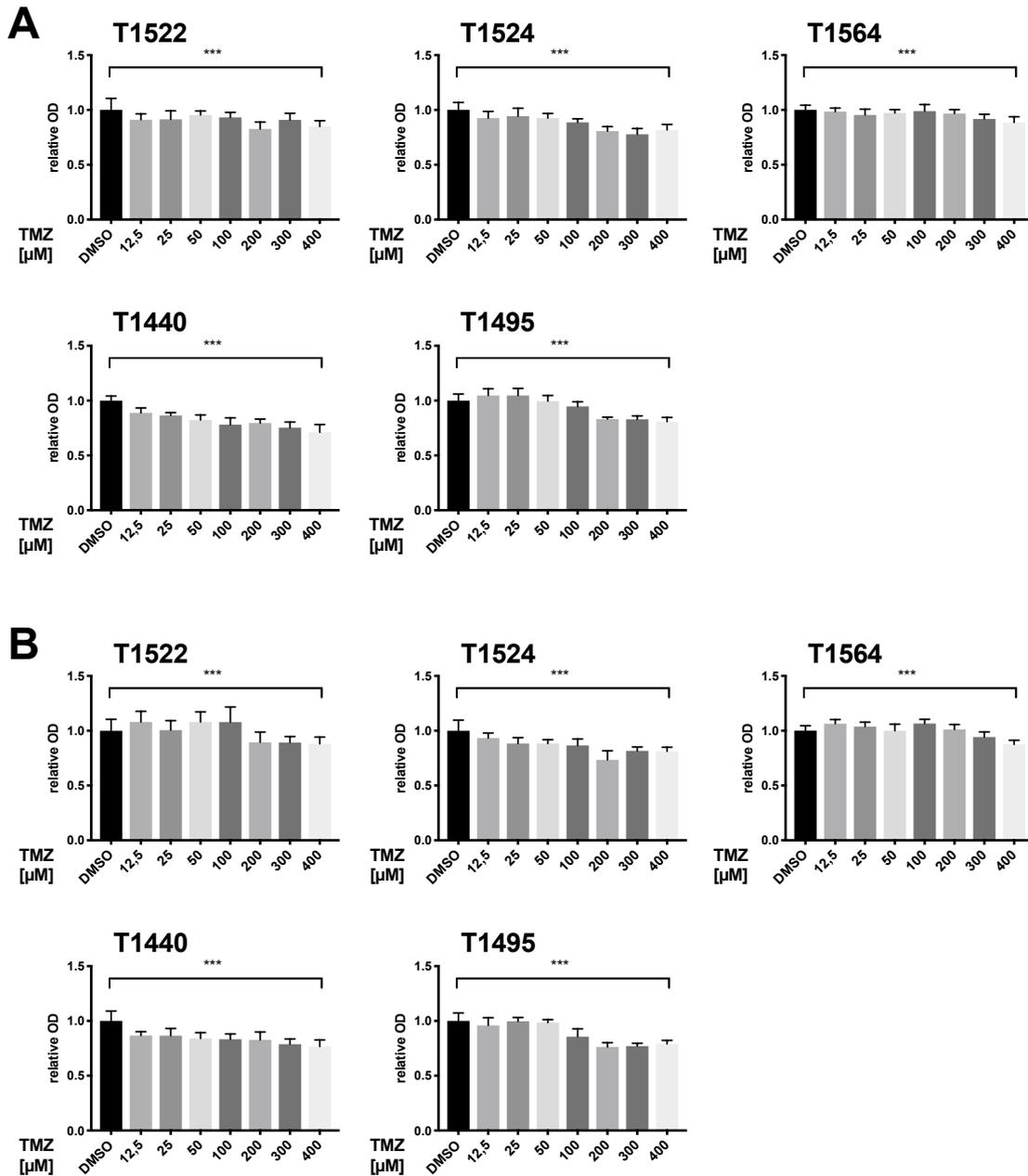


Abb. 14. Senkung der Formazan-Bildung in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen an A) Tag d3 und B) Tag d5 des MTT-Assays. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD). DMSO diente als Kontrolle, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst wurde. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Proben wurde mittels ANOVA Test ermittelt. *** = $p < 0,001$.

Im Fall von T1522 und T1564 wurden an Tag d3 geringe, statistisch signifikante, Senkungen der optischen Dichte um 10-15% beobachtet, ohne dass ein deutlicher Dosisseffekt erkennbar war. Auch an Tag d5 befanden sich die Messwerte der optischen Dichte für die niedrigen bis mittleren TMZ-Konzentrationen (12,5 – 100 μM) im

Bereich der DMSO-Kontrolle. Für T1522 wurde bei TMZ-Konzentrationen $>200 \mu\text{M}$ eine moderate Senkung der optischen Dichte beobachtet, die für alle Konzentrationen ähnlich war. Bei T1564 deutete sich bei TMZ-Konzentrationen ab $100 \mu\text{M}$ eine dosisabhängige Senkung der optischen Dichte an, die zwar statistisch signifikant, aber gering war (maximale Senkung um 10% bei $400 \mu\text{M}$ TMZ). Eine statistisch signifikante dosisabhängige Senkung der optischen Dichte wurde für T1524 und T1495 an Tag d3 und d5 beobachtet. Im Fall von T1440 war bereits mit $12,5 \mu\text{M}$ TMZ eine statistisch signifikante Senkung der optischen Dichte feststellbar, eine Dosisabhängigkeit war aber nur an Tag d3 erkennbar. Übereinstimmend mit der hohen TMZ-Sensitivität von T1440, im Vergleich zu den anderen vier Zelllinien, trat eine Reduktion der optischen Dichte an Tag d3 (29%) und an Tag d5 (24%) bereits mit $12,5 \mu\text{M}$ auf. Für T1549 wurden keine interpretierbaren Daten gewonnen.

Generell war festzustellen, dass die Vitalität der Zelllinien durch steigende TMZ-Dosen gesenkt wurde, die maximale Senkung aber gering war und eine Verstärkung des Effekts durch eine 2 Tage längere Inkubationszeit nicht erreicht wurde.

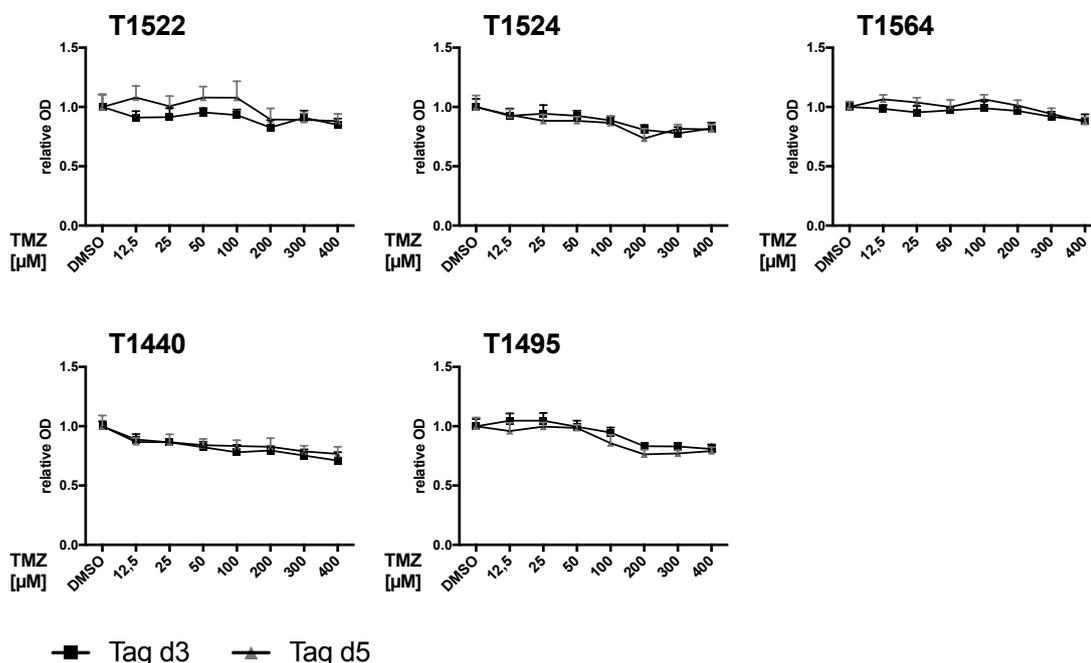


Abb. 15. Dosis-Wirkungs-Kurven des MTT-Assays in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen an Tag d3 und Tag d5. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD).

3.4.2.3 *Steigerung der LDH-Freisetzung in SLGC-Linien unter TMZ-Behandlung*

Das Prinzip des Zytotoxizitäts-Assays basiert auf der Fähigkeit der Laktatdehydrogenase (LDH) Pyruvat in Laktat umzuwandeln. Hierzu wird das Coenzym NADH benötigt, das wiederum mit Formazan reagiert und eine Änderung der Absorption bewirkt, die bei $\lambda = 340$ nm messbar ist. Diese Änderung der Absorption korreliert mit der Menge an LDH. Die Freisetzung von LDH aus der Zelle ist ein Hinweis auf eine Zellschädigung (Korzeniewski und Callewaert, 1983). Angaben zu Details der errechneten p-Werte befinden sich in im Anhang (Tabelle 25 bis Tabelle 30).

Eine dosisabhängige Steigerung der LDH-Freisetzung wurde für T1522, T1524, T1564, T1440 und T1495 beobachtet. Wie bereits im Fall des MTT-Assays zeigte T1549 auch bei der Betrachtung der LDH-Freisetzung ein abweichendes Verhalten. Hier wurden für alle TMZ-Konzentrationen sehr ähnliche Werte gemessen. Es zeigte sich an Tag d3 eine dosisabhängige Erhöhung der optischen Dichte (bis maximal 70%), an Tag d5 dagegen eine geringe dosisabhängige Senkung um maximal 16%. Für T1522 wurde mit TMZ-Konzentrationen >100 μM eine Erhöhung der LDH-Menge festgestellt (Abb. 16). Dabei fiel diese an Tag d5 schwächer aus als an Tag d3. Die maximal freigesetzte LDH-Menge wurde an Tag d3 und d5 mit 200 μM TMZ beobachtet. Dagegen war der Anstieg der LDH-Freisetzung für die Zelllinie T1524 an Tag d5 deutlich stärker als an Tag d3. Zudem war der Dosis-Wirkungs-Effekt an Tag d5 nur schwach ausgeprägt, an Tag d3 aber deutlich erkennbar (Abb. 16, Abb. 17). Für die Zelllinie T1564 waren die Messwerte an Tag d3 und Tag d5 nahezu identisch. Statistisch signifikante Unterschiede gab es zwischen der Tag d3- und d5-Kurve für keine TMZ-Konzentration. Eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte wurde zudem erst mit TMZ-Konzentrationen >300 μM beobachtet. Für T1440 war die Dosis-Wirkungs-Kurve an Tag d3 relativ zu den anderen Zelllinien am steilsten und eine 50%ige Zunahme der optischen Dichte wurde bereits mit weniger als 25 μM TMZ erreicht. An Tag d5 wurden bereits mit 12,5 μM TMZ eine Steigerung der optischen Dichte um fast das 3-fache gemessen. Allerdings konnte die Erhöhung der TMZ-Konzentration diesen Effekt nicht weiter steigern (Abb. 16). Für die Zelllinie T1495 wurde an Tag d3, nicht aber an Tag d5, eine 50%ige Steigerung der LDH-Freisetzung beobachtet. An Tag d3 wurde dies bereits mit 100 μM TMZ erreicht, eine weitere Steigerung des Effekts mit höheren TMZ-Dosen war jedoch nicht erkennbar. An Tag d5 bewirkten 100 μM TMZ ebenfalls

eine vermehrte LDH-Freisetzung, aber nur um 40%. Wiederum war der Effekt mit höheren TMZ-Dosen nicht steigerbar (Abb. 16).

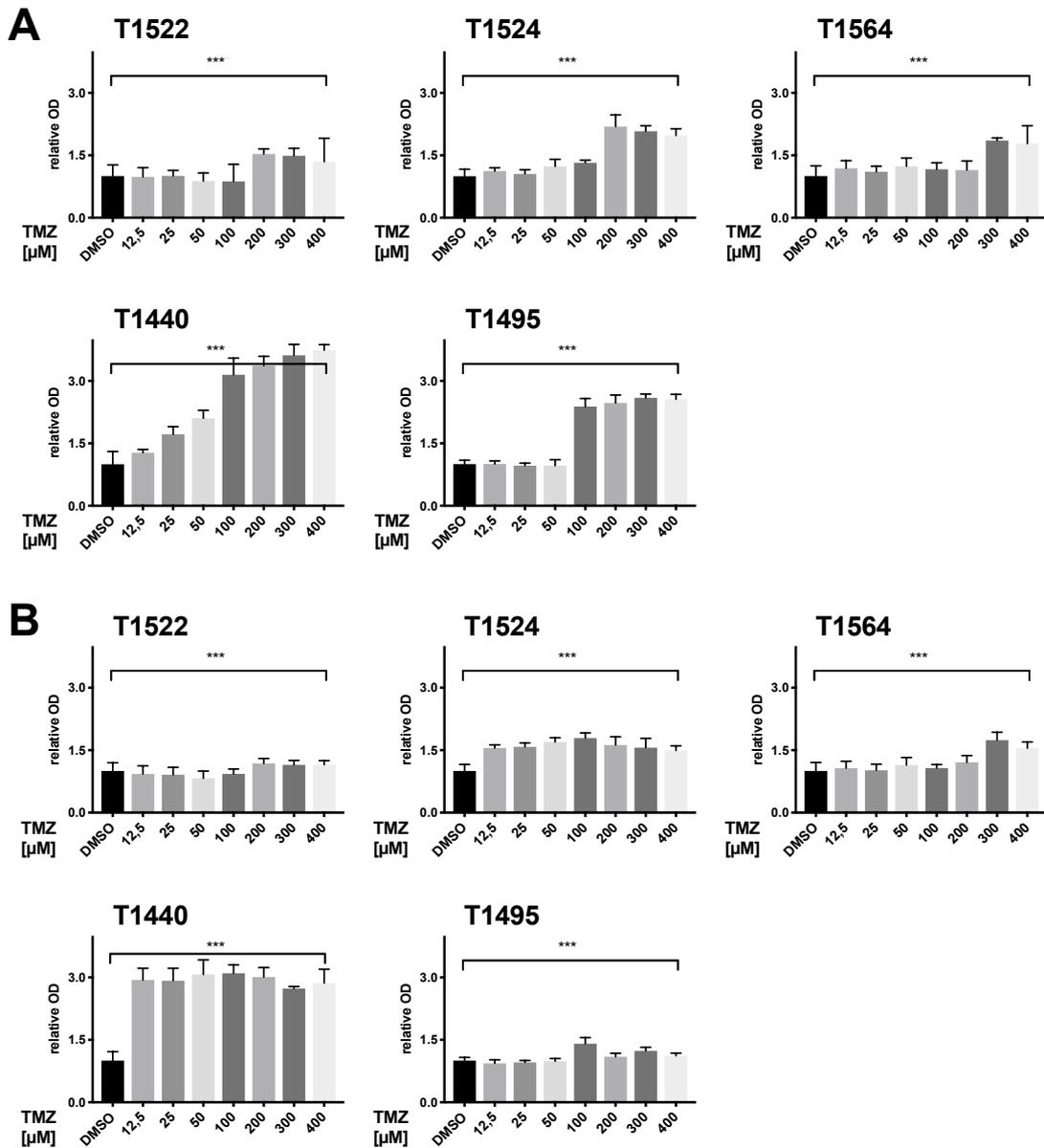


Abb. 16. Steigerung der LDH-Freisetzung in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen an A) Tag d3 und B) Tag d5 des Zytotoxizitäts-Assays. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD). DMSO diente als Kontrolle, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst wurde. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Proben wurde mittels ANOVA Test ermittelt. *** = $p < 0,001$.

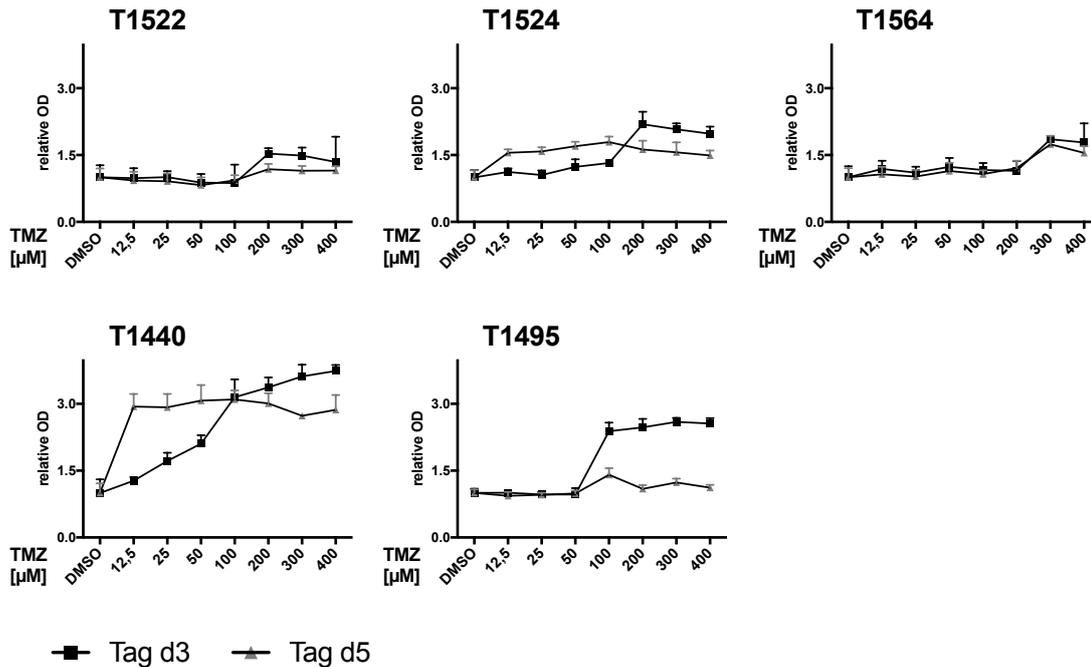


Abb. 17. Dosis-Wirkungs-Kurven des Zytotoxizitäts-Assays in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen an Tag d3 und Tag d5. Auf der x-Achse sind die DMSO-Kontrolle und die verabreichten TMZ-Dosen aufgetragen, auf der y-Achse die photometrisch bestimmte relative optische Dichte (OD).

3.4.2.4 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse aus BrdU-ELISA, sowie MTT- und Zytotoxizitäts-Assay

Wie bereits erklärt, sind nur die Werte einer Serie statistisch vergleichbar, da das spezifische Wachstumsverhalten der Zellen zu Variabilitäten in der Vitalität und der Proliferation führt. Die in Abb. 12 bis Abb. 17 dargestellten Serien von Assays wurden wie im Kapitel 2.2.9 beschrieben statistisch ausgewertet. Die Listung aller individuellen p-Werte in den Graphen würde zu weit führen. Daher sind die p-Werte für die Vergleiche der diversen TMZ-Konzentrationen gegen die DMSO-Kontrolle im Anhang in Tabelle 25 bis Tabelle 30 gezeigt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der sechs untersuchten Zelllinien untereinander verglichen werden. Dazu wurden die EC50-Werte von zwei oder mehr Assays für die Angaben herangezogen, die nicht im Detail gezeigt werden. Tabelle 22 stellt zudem die Messwerte dem MGMT-Status gegenüber, wobei zwischen einem methylierten, unmethylierten, sowie einem Mischstatus des *mgmt*-Promotors unterschieden wird.

Im Vergleich wurde die EC50-Proliferation (BrdU-ELISA) mit 25 - 100 μM und <12,5 μM TMZ am besten bei T1440 erreicht, eine Zelllinie mit methyliertem *mgmt*-

Promotor. Die nächstbeste Sensitivität wies T1495 auf, mit einer EC50-Proliferation an Tag d3 bei 100 - 150 μM und an Tag d5 bei 90 - 100 μM und einem m/u-Status. Ähnliche Werte für die EC50-Proliferation ergaben sich für die Zelllinie T1524. T1522 und T1549 zeigten insgesamt höhere EC50-Werte. Die Zelllinien T1522, T1524 und T1549 weisen alle einen m/u-Status auf. Die SLGC-Linie T1564 erreichte an Tag d3 sogar bei 400 μM TMZ die EC50 nicht, der MGMT-Status dieser Zelllinie ist unbekannt. Eine Verstärkung der Sensitivität über die zwei Tage längere Inkubation führte außer bei T1564 und T1495 zu keiner signifikanten Steigerung des TMZ-Effekts.

Das MTT-Assay ergab bei keiner Zelllinie eine 50%ige Senkung der optischen Dichte und der Effekt der verlängerten Inkubationszeit war gering und statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zum Proliferations-Assay (BrdU-ELISA) waren die Effekte wiederum bei T1440 und T1495 am stärksten.

Das Zytotoxizitäts-Assay zeigte dosis- und zeitabhängige Effekte. Dabei wurden wiederum die niedrigsten TMZ-Dosen, die für eine 50%ige Steigerung der LDH-Freisetzung nötig waren, für T1440 gefolgt von T1495 gemessen. T1522 und T1524 zeigten eine 50%ige Steigerung bei 200 μM an Tag d3, T1564 bei 300 μM und bei T1549 wurde der Wert nicht erreicht. Vergleicht man die Kurven an Tag d3 und Tag d5 (siehe Abb. 17) fällt auf, dass die LDH-Freisetzung ab Tag d5 im Fall von T1522, T1549 und T1495 niedriger war als an Tag d3. Im Fall von T1440 und T1524 war zwar die LDH-Freisetzung mit niedrigen TMZ-Dosen an Tag d5 höher, der Dosis-Wirkungs-Effekt war jedoch kaum feststellbar, so dass die LDH-Freisetzung mit steigenden TMZ-Dosen nicht steigerbar war.

Tabelle 22. EC50-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven und mgmt-Status.

Zelllinie	EC50-Proliferation		EC50-MTT		EC50-Zytotoxizität		mgmt
	Tag d3	Tag d5	Tag d3	Tag d5	Tag d3	Tag d5	
T1522	300-350 µM	200-250 µM	n.e.	n.e.	100-200 µM	n.e.	u/m
T1524	100-200 µM	50-100 µM	n.e.	n.e.	100-200 µM	12,5-25 µM	u/m
T1549	250-300 µM	90-100 µM	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	u/m
T1564	>400 µM	350-400 µM	n.e.	n.e.	200-250 µM	200-250 µM	n.d.
T1440	25-100 µM	<12,5 µM	n.e.	n.e.	25-50 µM	12,5-25 µM	m
T1495	100-150 µM	90-100 µM	n.e.	n.e.	90-100 µM	n.e.	u/m

Die Berechnung der EC50-Werte erfolgte mit GraphPadPrism (nicht-lineare Regression mit variabler Steigung [Berechnungsoption: best fit]). Für die Proliferation (Senkung des Einbaus von Bromodesoxyuridin) wurde die Funktion „inhibitor vs. response“, für die EC50-Zytotoxizität (Freisetzung der Lactatdehydrogenase) wurde die 50%ige Steigerung mittels der Funktion „agonist vs response“ berechnet. Eine 50% Senkung der Viabilität (MTT Assay) wurde in keinem Fall beobachtet. In der Tabelle sind Grenzwerte angegeben, die sich durch mehrere experimentelle Serien ergaben. Die zum Teil deutlichen Unterschiede beruhen auf dem sphäroidalen Wachstum der Zellen und der geringen Adhärenz. - n.e., nicht erreicht; n.d., nicht durchgeführt; mgmt, Promotor des für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase kodierenden Gens; m, methyliert; u, unmethyliert.

3.4.2.5 Beeinflussung des Zellzyklus durch DMSO und TMZ

Propidium-Jodid (PI) interkaliert zwischen den Basen der DNA und kann aufgrund seiner Fluoreszenz durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da das PI jedoch nicht in der Lage ist eine intakte Zellwand zu passieren, muss die Zellwand zuvor

permeabilisiert werden. Somit erlaubt die durchflusszytometrische Analyse PI-markierter Zellen die Bestimmung der verschiedenen Phasen des Zellzyklus, aber auch die Ermittlung des Anteils toter Zellen.

Es wurden Messungen mit behandelten Kulturen der Zelllinien T1440, T1522, T1524 und T1549 durchgeführt. Es wurde jeweils eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Die Zelllinie T1440 wurde mit 5 μM TMZ behandelt. Die Zelllinien T1522, T1524 und T1549 mit 200 μM und 300 μM TMZ. In den mit 300 μM TMZ behandelten Proben kam es in allen Kulturen zu einem massiven Zelltod, so dass keine Aussagen zum Zellzyklus gewonnen wurden. Beispiele der Auswertung finden sich in Abb. 18 und im Anhang.

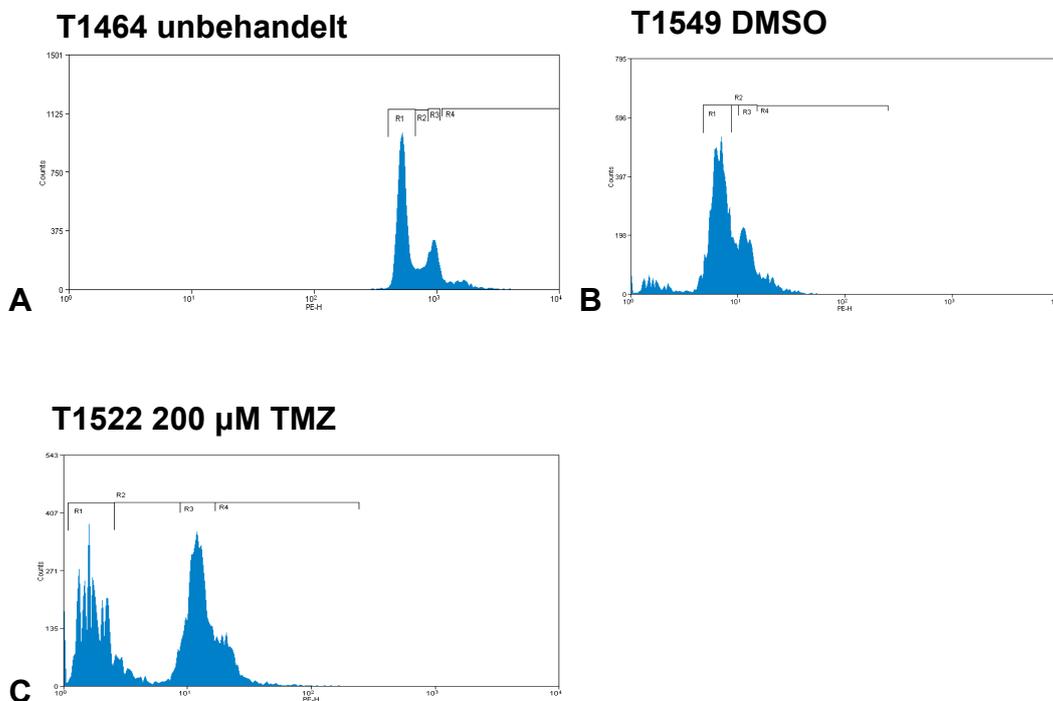


Abb. 18. Beispielbilder durchflusszytometrischer Analysen Propidium-Jodid (PI)-markierter Zellen. X-Achse: Intensität der Fluoreszenz des Propidium-Jodids. Y-Achse: Zellzahl. A) Zelllinie T1464 unbehandelt. R1 entspricht der G0/G1-Phase und R3 der G2/M-Phase des Zellzyklus. B) Zelllinie T1549 DMSO behandelt, Tag d3 nach Zugabe. R1 entspricht der G0/G1-Phase und R3 der G2/M-Phase des Zellzyklus. C) Zelllinie T1522 mit 200 μM TMZ behandelt, Tag d3 nach Zugabe. R1 entspricht der sub-G1-Phase und R3 der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die G2/M-Phase des Zellzyklus lässt sich nicht sicher abgrenzen.

Die Zelllinie T1440 zeigte an Tag d3 bereits in der DMSO-Kontrolle eine Veränderung der Zellzyklus-Phasen. Vor dem G0/G1-Phase Peak befand sich eine ausgeprägte Spitze, die für einen hohen Anteil von toten Zellen steht. Auch in der mit 5 μM TMZ

behandelten Probe zeigte sich ein ähnliches Bild. Zusätzlich war der G2/M-Phase Peak abgeflacht. An Tag d6 waren nur für die DMSO-Kontrolle Peaks für die Zellzyklus-Phasen erkennbar, nach den Behandlungen waren individuelle Peaks nicht mehr klar abgrenzbar.

Die Messung der Zelllinie T1522 ergab in den DMSO-Kontrollen an Tag d3 und d6 keine klar erkennbaren Peaks, die den Zellzyklusphasen zugeordnet werden könnten. Es war nur noch ein breiter Peak sichtbar, was für einen hohen Anteil an toten Zellen spricht. Für die mit TMZ behandelten Proben wurden für die 200 μ M TMZ behandelte Probe an Tag d3 individuelle Peaks beobachtet. Dabei zeigte sich vor dem G0/G1-Phase Peak eine weitere Spitze, der G2/M-Phase Peak ließ sich nicht mehr sicher abgrenzen.

Für die Zelllinie T1524 wurden lediglich Daten aus der Messung der DMSO-Kontrolle an Tag d3 erhoben. Hier ließen sich, wie in den meisten anderen Zelllinien nach der Behandlung keine Zellzyklusphasen abgrenzen.

Für die Zelllinie T1549 erbrachten nur die DMSO-Kontrolle an Tag d3 und die mit 200 μ M TMZ behandelte Probe an Tag d6 verwertbare Daten. In der DMSO-Kontrolle zeigten sich links der G0/G1-Phase zahlreiche kleine Spitzen, was für einen moderaten Anteil toter Zellen spricht. Rechts des G0/G1-Phase Peaks ließ sich noch die Spitze des G2/M-Phase Peaks erkennen. In der mit 200 μ M TMZ behandelten Probe waren dagegen keine Zellzyklusphasen mehr abgrenzbar.

Insgesamt ist die Auswertung des Experiments durch die hohe Anzahl nicht verwertbarer Messungen deutlich erschwert. Es konnte aber festgestellt werden, dass in den meisten Kulturen bereits das DMSO einen Einfluss auf den Zellzyklus hatte und teilweise zu einem hohen Anteil toter Zellen führte. Auch in den TMZ-behandelten Proben zeigten sich Veränderungen des regulären Ablaufs des Zellzyklus, die in den meisten Fällen zu einem Peak bei einem DNA-Gehalt $< 2n$ führte und zusätzlich zu einem Verschmelzen der G0/G1- und G2-Peaks führte.

3.4.3 Einfluss auf die Expression von Sox2 und den Anteil CD133-positiver Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es verschiedene Stammzellmarker, welche zur Erkennung von SLGCs genutzt werden. Für die Zelllinien T1522, T1524, T1549, T1556 und T1440 wurde die Expression des Pluripotenzfaktors Sox2 mittels Western Blot

ermittelt. Weiterhin wurde die Anzahl CD133-positiver Zellen in parallelen Kulturen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.4.3.1 Sox2-Expression und Änderung nach TMZ-Gabe

Da die Proteinkonzentrationen in den Proben der behandelten Kulturen niedrig waren, wurde der Blot zunächst mit den Antikörpern gegen die Ladekontrollen Aktin, gefolgt von GAPDH inkubiert, um zu prüfen, ob ausreichend Protein vorhanden war. Erst danach wurde mit dem Sox2-Antikörper inkubiert. Da sich die Position der Banden des Aktins (42 kDa), GAPDH (37 kDa) und des Sox2-Proteins (38 kDa) im Blot nur wenig unterscheiden, liegen insbesondere die Signale von GAPDH und Sox2 im Blot sehr nah beieinander (siehe Abb. 19). Zur Übersicht werden die Aufnahmen aller drei Detektionsschritte (1. Aktin, 2. GAPDH, 3. Sox2) in Abb. 19 gezeigt. Entsprechend sind im unteren Blot alle drei Proteine gemeinsam zu sehen. Die Quantifizierung erfolgte für die Sox2-Signale, sowie die korrespondierenden Aktin- und GAPDH-Signale. Da die Sox2- und GAPDH-Banden in unmittelbarer Nähe lagen, sind die Werte zur relativen Sox2-Expression in Abb. 20 nur eingeschränkt interpretierbar.

Das Sox2-Protein ist deutlich in der T1440-Kontrollprobe zu erkennen, die in allen Blots parallel untersucht wurde. Ein ähnlich starkes Signal ist in den Spuren der DMSO-Kontrollen von T1524, T1549, T1556 und T1440 zu erkennen. Für T1522 wurde in der Kontrolle kein eindeutiges Sox2-Signal identifiziert. Am Tag d3 wurden durch 200 und 300 μM TMZ die Sox2-Level in Proben der Zelllinie T1549 reduziert, während sich für T1524 und T1440 keine Veränderung zeigte. Im Fall von T1522 wurde in der 200 μM , nicht aber in der 300 μM Probe eine Sox2-Bande detektiert. Am Tag d6 war das Sox2-Level in der DMSO-Kontrolle im Fall von T1524 und T1549 relativ zu Tag d3 reduziert. Im Fall von T1524 wurde in den behandelten Proben eine höhere Signalstärke verzeichnet, nicht aber im Fall von T1549. Bei T1522 hatte die TMZ-Behandlung kaum einen Effekt auf die Sox2-Level. Für T1556 ist keine eindeutige Aussage möglich, da die Proteinmenge in den 100 μM und insbesondere 200 μM Proben sehr gering war. Aufgrund der massiven Verluste an Zellmaterial durch Zelltod war die Menge an Proteinextrakt so gering, dass die in Abb. 19 gezeigte Analyse nicht wiederholt werden konnte.

Insgesamt lässt sich keine einheitliche Aussage zur Sox2-Expression nach TMZ-Gabe machen. Zwei Zelllinien, T1440 und T1524, zeigten keine eindeutige Änderung der Sox2-Level nach TMZ-Gabe. Zwei Zelllinien, T1549 und T1556, reagierten mit einer

Senkung des Sox2-Levels, wobei diese Aussage wegen der deutlich reduzierten Proteinmenge in den behandelten Proben nur eingeschränkt gültig ist. T1522 wies generell geringe Sox2-Level auf und zeigte ein heterogenes Verhalten.

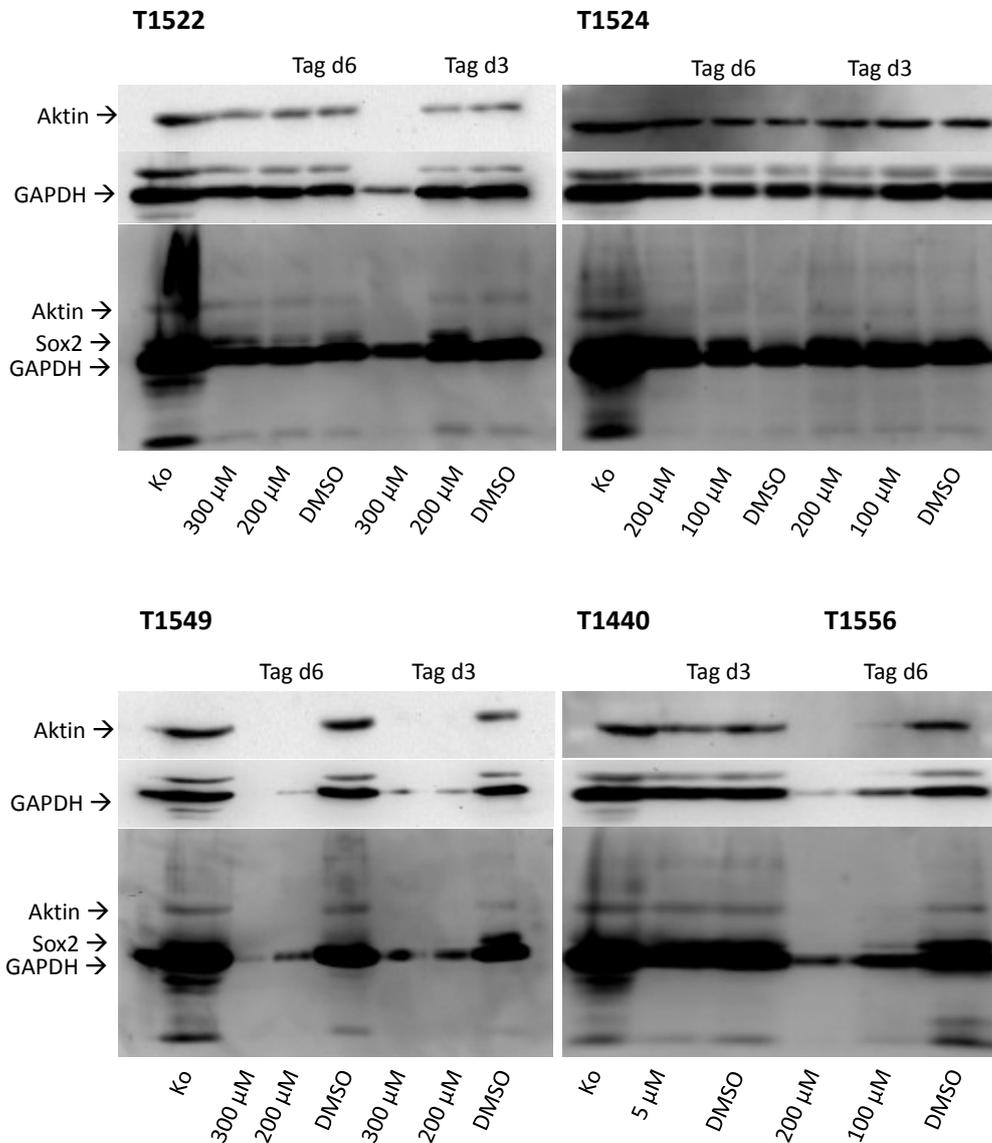


Abb. 19. Western Blot Analyse der Sox2-Expression in SLGC-Linien.

12 μ M Gesamtzellproteinextrakt wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgebracht, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit einem Antikörper gegen Sox2 inkubiert. Die Zelllinie T1440 wurde nur an Tag d3 untersucht, die Zelllinie T1556 wurde nur an Tag d6 untersucht. Ladekontrollen Aktin und GAPDH. Kontrolle der TMZ-Behandlung mittels DMSO, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst eingesetzt wurde. Eine unbehandelte Probe der Zelllinie T1440 diente als Positiv-Kontrolle (Ko) für den Blot, da hier eine Sox2-Expression bereits nachgewiesen werden konnte.

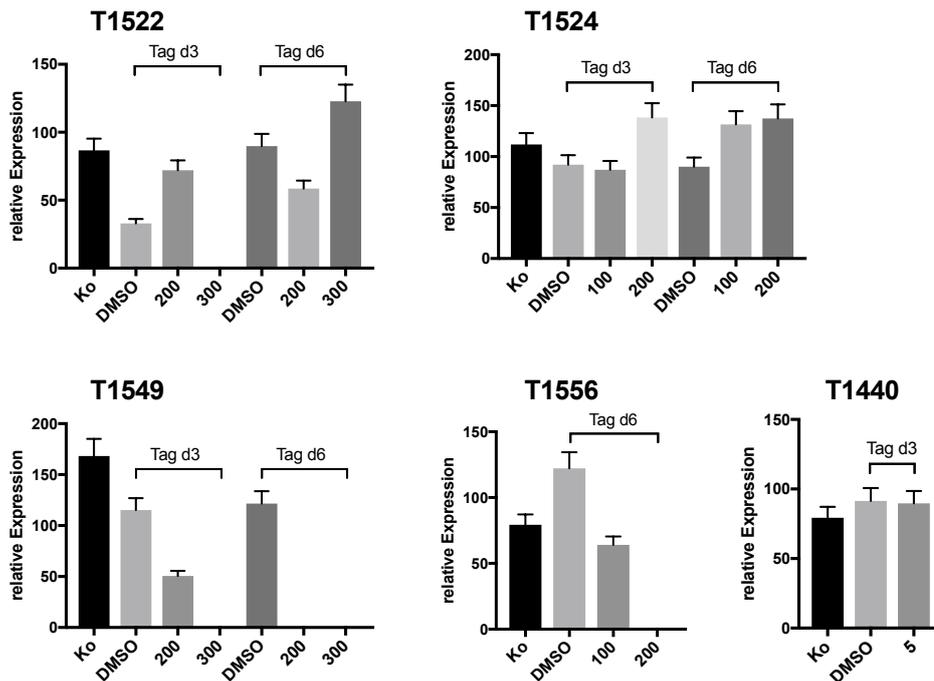


Abb. 20. Relative Expression des Sox2-Proteins in behandelten SLGC-Linien.

Graphische Darstellung der relativen Expression des Sox2-Proteins nach TMZ-Behandlung in unterschiedlicher Konzentration an Tag d3 und Tag d6. Die Werte korrespondieren mit den Blots in Abb. 19. Die Zelllinie T1440 wurde lediglich an Tag d3 untersucht, die Zelllinie T1556 lediglich an Tag d6. Zusätzlich wurde eine DMSO Kontrolle mitgeführt, da TMZ in DMSO gelöst wurde. Eine unabhängige Probe der Zelllinie T1440 diente als Positiv-Kontrolle (Ko). Der Fehlerbalken gibt den systematischen Fehler von 5% an. Die TMZ Konzentrationen sind in μ M angegeben. Es sind die gegen GAPDH normalisierten Werte dargestellt.

3.4.3.2 Einfluss von TMZ auf CD133-positive Zellen

CD133 ist, wie in der Einleitung beschrieben, der am häufigsten genutzte SLGC-Marker. Mittels semi-quantitativer RT-PCR wurden für drei zusätzliche Zelllinien Daten zur CD133 mRNA erhoben. Diese Zelllinien wurden mittels Durchflusszytometrie nicht untersucht.

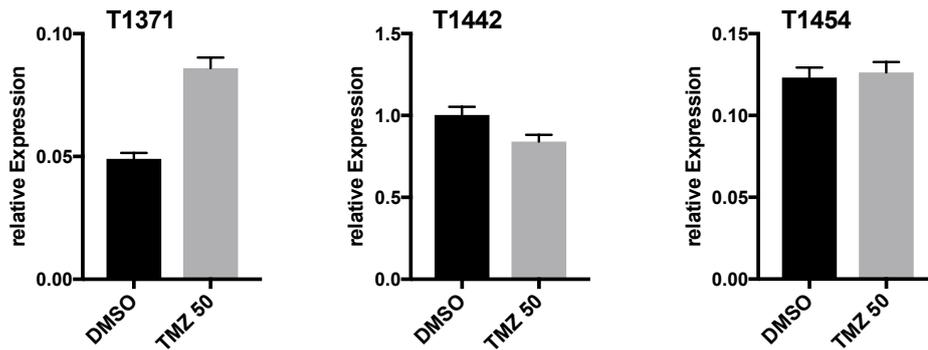


Abb. 21. Graphische Darstellung der CD133-mRNA Expression in behandelten Kulturen (50 μM TMZ) von T1371, T1442 und T1454.

Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR. Normalisierung der Expression gegen die Expression von *gapdh*. DMSO wurde als Kontrolle mitgeführt, da TMZ in DMSO gelöst wurde. Der Fehlerbalken gibt den systematischen Fehler von 5% an.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen für die Zelllinie T1371 eine deutliche Steigerung der CD133-mRNA Expression nach Behandlung mit 50 μM TMZ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Zelllinie T1442 zeigt hingegen eine leicht verminderte CD133-Expression unter der TMZ-Behandlung und für die Zelllinie T1454 ist die Expression nach Gabe von DMSO und TMZ fast identisch.

Zusätzlich zur Expressionsanalyse erfolgte eine Bestimmung des Anteils CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie, wobei sich die eingesetzten TMZ-Dosen nach den im BrdU-ELISA ermittelten EC50-Werten richteten. Es erfolgten Messungen an Tag d3 und Tag d6 nach TMZ-Zugabe. Als Positiv-Kontrolle wurde bei jeder Messung die Zelllinie CaCo₂ mitgeführt, die einem kolorektalen Adenokarzinom entstammt und $\geq 90\%$ CD133-positiv Zellen enthält (Corbeil et al., 2000). Abb. 23 im Anhang zeigt beispielhaft die Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse der Zelllinie T1556. Die erhobenen Daten sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Der Anteil an CD133-positiven Zellen variierte zwischen den untersuchten Zelllinien sehr deutlich. Dabei veränderte sich der Anteil CD133-positiver Zellen von Tag d3 zu Tag d6 in den Kontrollbehandlungen mit DMSO nur für T1556 deutlich. Für die übrigen Zelllinien lag die Änderung in den Größenordnungen des Messfehlers oder der Anteil war sehr gering. Den geringsten Anteil an CD133-positiven Zellen wies die T1440 Kultur auf (<2%), gefolgt von den T1522 (<4%) und T1549 (<3%) Kulturen. Zwischen 8 und 10% CD133-positiv Zellen wurden in der T1524 Kultur ermittelt, $30 \pm 5\%$ im Fall von T1556.

Der geringe Anteil an CD133-positiven Zellen in der T1522 Kultur änderte sich auch nach Zugabe von 200 und 300 μM TMZ nur wenig. Ebenso lag die Anzahl der CD133-positiven Zellen in den TMZ-behandelten T1549 und T1440 Kulturen im Bereich der Werte der DMSO-Kontrolle, d.h. die Variation lag im Bereich des Messfehlers von 10%. Anders im Fall von T1524 und T1556. Im Fall von T1524 stieg der Anteil an CD133-positiven Zellen nach Behandlung mit 100 μM TMZ an Tag d3 relativ zur DMSO-Kontrolle von 8,8% auf 13% und an Tag d6 von 10,1% auf 16,3%. Dies weist auf eine geringe Anreicherung von CD133-positiven Zellen in T1524 Kulturen nach TMZ-Behandlung hin. Im Fall von T1556 sank der Anteil CD133-positiver Zellen an Tag d3 relativ zur DMSO-Kontrolle (26,9%) auf 14,5% mit 100 μM TMZ und auf 4,9% mit 200 μM TMZ. An Tag d6 war die Reduktion des Anteils an CD133-positiven Zellen noch drastischer. Hier wurden in der mit 100 μM TMZ behandelten Probe keine CD133-positiven Zellen mehr nachgewiesen und in der mit 200 μM TMZ behandelten Probe nur noch 1,5%. Somit scheint TMZ die Anzahl an CD133-positiven Zellen in T1556 Kulturen zu reduzieren.

Tabelle 23. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Anteils CD133-positiver Zellen von SLGC-Linien nach TMZ-Behandlung.

Zelllinie	Messtag	Anteil CD133-positiver Zellen (%)				
		DMSO	TMZ 5	TMZ 100	TMZ 200	TMZ 300
T1522	Tag d3	4,1			2,6	1,9
	Tag d6	2,2			1,8	0
T1524	Tag d3	8,8		13,0	10,5	
	Tag d6	10,1		16,3	16,1	
T1549	Tag d3	3,0			5,6	5,5
	Tag d6	0,5			2,9	5,7
T1556	Tag d3	26,9		14,5	4,9	
	Tag d6	35,4		0,5	1,5	
T1440	Tag d3	0,2	0,7			
	Tag d6	1,8	n.d.			

Angabe der TMZ-Konzentrationen in μM . CD, engl. *cluster of differentiation*; TMZ, Temozolomid; n.d., nicht durchgeführt.

3.4.3.3 *Übersicht der Effekte von TMZ auf die Sox2-Expression und den Anteil CD133-positiver Zellen in SLGC-Linien*

Die in Tabelle 24 gezeigte Übersicht macht deutlich, dass sich keine allgemeingültigen Rückschlüsse von der Sox2-Expression auf den Anteil CD133-positiver Zellen oder umgekehrt ziehen lassen. Jede Zelllinie zeigt eine andere Reaktion auf die TMZ-Behandlung. T1440 zeigt weder hinsichtlich der Sox2-Expression, noch des Anteils CD133-positiver Zellen in den hier durchgeführten Analysen eine signifikante Änderung. T1522 zeigte im Western Blot unterschiedliche Reaktionen auf die Gabe von TMZ, in der Durchflusszytometrie war keine signifikante Änderung nachweisbar. T1524 zeigte keine signifikante Änderung der Sox2-Expression nach TMZ-Gabe, in der Durchflusszytometrie konnte ein erhöhter Anteil CD133-positiver Zellen nach TMZ-Behandlung gemessen werden. T1549 zeigte eine verminderte Sox2-Expression nach TMZ-Gabe im Western Blot, in der Durchflusszytometrie ließ sich keine signifikante Änderung des Anteils CD133-positiver Zellen nachweisen. T1556 zeigte als einzige Zelllinie ein homogenes Ergebnis, so verminderte sich sowohl die Sox2-Expression, als auch der Anteil CD133-positiver Zellen nach der Gabe von TMZ.

Tabelle 24. Änderung der Sox2-Proteinexpression und des Anteils CD133-positiver Zellen nach TMZ-Behandlung.

Zelllinien	Sox2	CD133+
T1440	-	-
T1522	↑/↓	-
T1524	-	↑
T1549	↓	-
T1556	↓	↓

-, keine Veränderung bzw. Änderung im Bereich des systematischen Fehlers; ↑, Anstieg;
↓, Senkung.

4 Diskussion

4.1 Vorspann

Für den malignen hirneigenen Tumor Glioblastoma multiforme (GBM) sind bisher nur begrenzte Therapieoptionen verfügbar. Die derzeitige Standardtherapie ist, wenn möglich die chirurgische Tumorresektion und eine adjuvante kombinierte Radiochemotherapie, in besonderen Fällen auch eine alleinige Radio- oder Chemotherapie. Die Chemotherapie wird mit dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) durchgeführt. Trotz dieser Therapieoptionen beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer 14,6 Monate (Stupp et al., 2005). Es bestehen außerdem große interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf die Chemotherapie mit TMZ. Ein entscheidender Faktor ist, dass es zahlreiche verschiedene Subtypen des GBMs gibt. So wurden Klassifikationen nach verschiedenen Eigenschaften erstellt, als wichtigste sind hier die WHO-Klassifikation (Louis et al., 2016), sowie die Unterteilung des „The Cancer Genome Atlas“ Konsortiums (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) zu nennen. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich mit verschiedenen Aspekten der Charakterisierung von Gliomzellen befasst, um die Heterogenität der Tumoren zu analysieren. Hier steht im Fokus das Tumorstammzell-Modell, welches besagt, dass es innerhalb der Tumorzellen eine Population gibt, welche Stammzeleigenschaften besitzt. Es wird vermutet, dass diese Population der „stem like glioma cells“ (SLGC) die entscheidende Rolle bei der Therapieresistenz und Rezidiventwicklung der Glioblastome spielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen aus zwei primären Hirntumoren angelegt und charakterisiert. Weiterhin wurden diese, sowie weitere in der Arbeitsgruppe vorhandene SLGC-Linien im Mausmodell auf Tumorigenität untersucht. Acht primäre SLGC-Linien, sowie eine von einem orthotopen Tumor abgeleitete SLGC-Linie wurden von mir analysiert. Weitere potenzielle SLGC-Linien oder Klone dieser wurden von Kollegen in der Arbeitsgruppe im Mausmodell analysiert (Choschzick et al., 2014; Hirseland, 2017; Loy, 2018). In einem weiteren Schritt wurde die Sensitivität einiger SLGC-Linien gegenüber TMZ untersucht, zwei Zelllinien wurden dabei *in vivo* analysiert, sechs weitere Zelllinien *in vitro* in serumfreien Kulturen.

4.2 Charakterisierung von hirneigenen Tumorzellen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung von potenziellen SLGC-Linien hinsichtlich der Stammzeleigenschaften vorgenommen. Eine Stammzelle zeigt typischerweise die Eigenschaften der Selbsterneuerung und Differenzierung. Über das Wachstumsmuster in der Zellkultur lassen sich Zelllinien mit Stammzeleigenschaften ebenfalls identifizieren, allerdings ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Sphäroiden kein eindeutiger Nachweis (Schonberg et al., 2014). Das Wachstum in Form von Sphären wurde als Stammzeleigenschaft diskutiert, da neurale Stammzellen *in vitro* Neurosphären bilden (Galli et al., 2004). Es hat sich mittlerweile allerdings gezeigt, dass SLGC-Kulturen genauso semi-adhärent oder sogar adhärent wachsen können (Choschzick et al., 2014). Die in dieser Arbeit angelegte und charakterisierte Gliom-Zelllinie T1467 zeigte ein semi-adhärentes und sphärisches Wachstum. Dies wurde ebenso für die Zelllinie T1467-SCID beobachtet, die sich von einem orthotopen Tumor der Zelllinie T1467 ableitet. Die Meningeom-Zelllinie T1469, welche als Kontrolle diente, zeigte dagegen ein rein adhärentes Wachstum.

Als ein Marker für das Vorhandensein von Stammzeleigenschaften wird das Intermediärfilament Nestin genutzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Nestin in SLGCs nachweisen (Phillips et al., 2006; Veselska et al., 2006; Chen et al., 2010). Es konnte auch klinisch nachgewiesen werden, dass der Anteil Nestin-positiver Zellen mit dem WHO-Grad des Tumors zunimmt, Nestin also als Marker für die Aggressivität eines Tumors dienen kann (Dahlrot et al., 2014). Für T1467 und T1467-SCID, nicht aber die Meningeom-Zelllinie T1469, ließen sich in der Immunzytologie Nestin-Filamente nachweisen. Identische Ergebnisse zeigten sich bei der immunhistochemischen Analyse des entsprechenden Tumorgewebes. Im gleichen Versuchsaufbau wurde auch die Expression des Intermediärfilaments GFAP untersucht. GFAP wird häufig als ein Marker für differenzierte Zellen genutzt (Überblick in Schonberg et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte GFAP jedoch auch in einer Subpopulation von SLGC-Linien mit hoher Sox2-Expression nachweisen (Choschzick et al., 2014; Raju, 2015).

Außer den Zelllinien T1467, T1467-SCID und T1469 wurden weitere potenzielle SLGC-Linien auf die Nestin- und GFAP-Expression untersucht. Dabei wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, bevor die Zellen in die Mausgehirne xenotransplantiert wurden. Von allen transplantierten Zelllinien waren T1440, T1467 und T1467-SCID

GFAP-positiv. T1371 und T1442 Kulturen enthielten einige wenige GFAP-positive Zellen und die T1522 Kultur war GFAP-negativ. Dagegen waren Nestinfilamente in allen Zellen aller Zelllinien nachweisbar. Nestin ist in Stammzellen und Vorläuferzellen des sich entwickelnden Gehirns hochreguliert und wird anschließend im erwachsenen Gehirn durch verschiedene Intermediärfilamente wie GFAP ersetzt (Veselska et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Stammzellmarker wie Nestin in einer Art Gleichgewicht zu den Markern für Differenzierung wie GFAP stehen (Zhang et al., 2006). Werden die Stammzellmarker hochreguliert, werden gleichzeitig die Marker für Differenzierung herunterreguliert. Diese Art Gleichgewicht bestätigte sich nicht in allen hier untersuchten Zelllinien. Für die Zelllinien T1467 und T1467-SCID, von denen sich später im Mausmodell T1467 als sehr aggressiv darstellte, ließen sich Nestin- und GFAP-positive Zellen nachweisen. Genauso zeigten die Zellen der Linie T1440 eine Nestin-/GFAP-Co-Expression. Somit kann GFAP in mindestens drei Linien (T1467, T1467-SCID, T1440) als Marker für einen hohen Stammzellcharakter gelten. Diese Zelllinien verhalten sich ähnlich der adulten, neuralen Stammzell, die ebenfalls GFAP-positiv ist (Doetsch et al., 1999; Robel et al., 2011).

Zur Untersuchung der Tumorigenität wurden die Zellen der verschiedenen Zelllinien in die Gehirne von immunsupprimierten SCID-Mäusen xenotransplantiert. Im Rahmen der Etablierung der Xenotransplantation kam es zu heterogenen Ergebnissen. Nach dem Abschluss dieser initialen Experimente waren alle untersuchten Gliom-Zelllinien in der Lage orthotope Tumoren in SCID-Mäusen zu erzeugen. Für die Meningeom-Zelllinie T1469 konnte dagegen keine Tumorigenität nachgewiesen werden. Kam es in den ersten Versuchsreihen mit den Zelllinien T1371, T1440, T1442 und T1467 zum Teil zu sehr großen, makroskopisch sichtbaren Tumoren, änderte sich das Bild einiger Serien der späteren Experimente. So erzeugten die Zelllinien T1522, T1524, T1549 und T1556 lediglich kleine Läsionen, die sich aber über die H.E.-Färbung deutlich nachweisen ließen. Die mitgeführten Kontrollen der etablierten GBM-Zelllinie U87MG zeigten im Parallelansatz zu T1522, T1524, T1549 und T1556 ebenfalls ein verändertes tumorigenes Verhalten. Musste die Gruppe der mit U87MG inokulierten Mäuse zuvor nach 2-3 Wochen wegen eines makroskopischen Tumorwachstums geopfert werden, so blieben die Mäuse zum Teil über die gesamte Zeit des Experiments (12 Wochen) symptomfrei. Dieses Verhalten zeigte sich auch in Wiederholungen des Experiments durch unsere Arbeitsgruppe. Eine Erklärung könnte die wiederholte Beobachtung von entzündlichen Veränderungen der Mäuse, beispielsweise Augeninfektionen, sein. Die

Enzündungsreaktion könnte zu einer Immunkompetenz der SCID-Mäuse geführt haben und damit das Tumorwachstum vermindert haben.

Aus einem orthotopen Tumor der Zelllinie T1467 wurde eine Zellkultur angelegt und die Zelllinie T1467-SCID wurde erneut für die Inokulation genutzt. Auch die Zelllinie T1467-SCID war in der Lage ein Tumorwachstum im Mausmodell zu induzieren. Diese Tumoren zeigten sich in ihrer Größe heterogen und waren makroskopisch nicht sichtbar. Die zellbiologische Charakterisierung von T1467-SCID ergab identische Eigenschaften zu T1467, sowohl hinsichtlich der Nestin- als auch GFAP-Expression und dem u/m-Status des *mgmt*-Promotors.

Die Zelllinien T1467 und später auch T1467-SCID wurden für die Analyse der TMZ-Sensitivität *in vivo* ausgewählt. Hierzu wurden erneut Inokulationen in SCID-Mäuse vorgenommen und die Mäuse anschließend mit TMZ behandelt. In der Untersuchung von T1467 wurde die TMZ-Behandlung der Mäuse ab Woche 5 begonnen. Die Tumorbildung war in diesem Experiment inhibiert und Schlussfolgerungen betreffend der TMZ-Wirkung nicht möglich. Es folgte eine Versuchsreihe der Zelllinie T1467-SCID wobei eine Kontrollgruppe und zwei TMZ-Gruppen gebildet wurden, die erste wurde ab Woche zwei, die andere ab Woche drei mit TMZ behandelt. Das Experiment erbrachte keine einheitlichen Ergebnisse. Wiederum war die Tumorbildung in der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen inhibiert. Lediglich eine Maus aus der Gruppe, welche ab Woche drei eine TMZ-Behandlung erhielt, zeigte makroskopisch und histologisch ein Tumorwachstum. Eine histochemische Färbung mit Antikörpern, die auch kleine Tumoren detektieren könnte, wurde nicht durchgeführt. Wie oben erwähnt, gab es in diesen experimentellen Serien Probleme mit Augenentzündungen bei den Versuchstieren.

Eine Schwierigkeit könnte hier auch die verabreichte TMZ-Dosis darstellen. Die Mäuse erhielten das TMZ gelöst im Trinkwasser, es kann also für die einzelnen Versuchstiere keine exakte Dosis berechnet werden. Auch ist der Unterschied zum derzeitigen TMZ-Regime in der Klinik anzuführen, hier erhalten die Patienten an 5 Tagen pro Woche für insgesamt 4 Wochen einmal täglich TMZ mit einer Dosis von 150-200 mg/m² Körperoberfläche (KOF). Über das Trinkwasser wird stetig TMZ appliziert, was einen nicht abschätzbaren Effekt auf die Pharmakokinetik hat. Beim Menschen wird das höchste Plasmalevel von TMZ 30-90 Minuten nach der Einnahme erreicht (Brada et al., 1999). Es ist fraglich, ob mit der Applikation übers Trinkwasser Dosen erreicht werden

können, die einen zytotoxischen Effekt haben. Beier et al. (2008) zeigten in Gliom-Zelllinien, dass mit einer TMZ-Dosis von 50 µmol/L nur SLGC mit methyliertem *mgmt*-Promotor eliminiert werden konnten, auch bei einer Dosissteigerung auf 500 µmol/L konnten die SLGC mit unmethyliertem *mgmt*-Promotor nur inkomplett eliminiert werden (Beier et al., 2008). Sowohl T1467 als auch T1467-SCID zeigen einen Mischstatus des *mgmt*-Promotors. In der Weiterführung der Inokulation von SCID-Mäusen innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurden subkutane Medikamentenpumpen genutzt, um eine gesicherte Verabreichung der gewünschten Dosis der zu untersuchenden Substanz zu gewährleisten. Auch beinhaltet der Prozess der Inokulation mögliche Fehlerquellen. Trotz eines standardisierten Versuchsablaufes kann nicht gewährleistet werden, dass jede Maus die gleiche Zellzahl erhält. Dafür könnte der Unterdruck beim Herausziehen der Inokulationsnadel verantwortlich sein. Meine H.E.-Färbungen zeigten zum Teil Verschleppungen von Zellen über den Stichkanal bis nach extrakraniell. Auch die Positionierung der Injektionsstelle unterliegt Abweichungen, da bei der Fixierung der Mäuse im stereotaktischen Rahmen die Länge der Mäusezähne geringe Veränderungen bedingen kann. Wie bereits mehrfach erläutert, könnten Entzündungsreaktionen eine partielle Immunkompetenz der SCID-Mäuse bewirken.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass alle inokulierten Gliom-Zelllinien Tumorigenität besitzen. Die Behandlung der Mäuse mit TMZ muss jedoch durch die Weiterentwicklung der Applikationsform optimiert werden. Die hier genutzten Zelllinien stehen zum Teil für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung, da sie das Wachstum einstellten oder die Kryokonservierung nicht überlebten.

Der MGMT-Status wurde für die Zelllinien im *in vitro* Behandlungsexperiment untersucht. Es konnte bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Hypermethylierung der Promotor-Region des *mgmt*-Gens, welche zum „*gene silencing*“ führt, einen direkten Effekt auf die Wirksamkeit der TMZ-Behandlung hat (Watts et al., 1997; Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2005). Fehlt die MGMT, können die durch TMZ verursachten DNA-Schädigungen nicht repariert werden und die Tumorzelle wird apoptotisch oder geht in den Zellzyklusarrest. Die Zelllinie T1440 wies einen methylierten *mgmt*-Promotor auf. T1442, T1467, T1467-SCID, T1495, T1522, T1524 und T1549 zeigen jeweils einen Mischtyp, wobei der methylierte Anteil bei T1442, T1467 und T1522 überwog und bei T1524 und T1549 der unmethylierte.

Die Zelllinien T1371 und T1469 wiesen einen unmethylierten *mgmt*-Promotor auf. Der Mischstatus bedeutet, dass der Promotor in den Zellen der Kultur sowohl in der methylierten, als auch in der unmethylierten Form vorliegt. Die Beobachtung, dass im MSP-Assay eine Bande für den unmethylierten und den methylierten Promotor nachweisbar ist, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Hegi et al., 2005). Als Ursache wurde eine Verunreinigung mit DNA von anderen Zelltypen, wie z.B. Lymphozyten oder Endothel, benannt. Es könnte aber auch sein, dass der *mgmt*-Promotor lediglich für ein Allel methyliert vorliegt. Für Tumoren konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines Glioms der MGMT-Status gleich bleibt, da multiple stereotaktische Probenentnahmen aus einem Tumor durchgeführt wurden und der MGMT-Status dieser Proben identisch war (Grasbon-Frodl et al., 2007). Insgesamt kann der über den MSP-Assay ermittelte MGMT-Status einer Probe als repräsentativ für den gesamten Tumor gewertet werden. Bei den Zelllinien mit methyliertem *mgmt*-Promotor, bzw. solchen mit überwiegend methylierten Promotoren, würde man eine hohe TMZ-Sensitivität erwarten.

4.3 Beeinflussende Faktoren der TMZ-Sensitivität von SLCs

Das alkylierende Agens Temozolomid gehört zu den etablierten Chemotherapeutika des GBMs. Die Wirksamkeit scheint jedoch bei jedem Patienten unterschiedlich und eine dauerhafte Tumorfreiheit ist auch bei hoher TMZ-Sensitivität eines GBMs nicht nachgewiesen. Das oral verabreichte Medikament hat eine Bioverfügbarkeit von nahezu 100% (Newlands et al., 1992) und zeigt pharmakokinetisch kaum interindividuelle Unterschiede (Tsang, 1991). In der cerebrospinalen Flüssigkeit lassen sich jedoch nur etwa 20% der systemischen TMZ-Konzentration nachweisen (Ostermann et al., 2004). Ein klinisch relevanter Faktor ist der MGMT-Status, dieser gibt jedoch lediglich einen Anhalt über die TMZ-Sensitivität, kann diese aber nicht allein erklären. Eine Reihe weiterer Faktoren scheinen einen Einfluss auf die Wirksamkeit des TMZ zu haben, darunter die Expression von ABC-Transportern. Einige dieser Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Letztlich müssen aufgrund der Komplexität des menschlichen Gehirns und der Heterogenität der primären Hirntumoren zahlreiche weitere Faktoren berücksichtigt werden. *In vitro* Versuche mit TMZ-Konzentrationen von 5 $\mu\text{mol/L}$ zeigten, dass diese Konzentration nicht ausreicht um einen zytotoxischen Effekt von TMZ *in vitro* zu bewirken (Beier et al., 2008). Da 5 $\mu\text{mol/L}$ auch die

maximale Konzentration ist, welche in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Patienten gemessen wurde (Portnow et al., 2009), stellt sich die Frage wie TMZ überhaupt seine Wirksamkeit erreicht. Auch ist zu berücksichtigen, dass durch das infiltrative Wachstum des GBMs auch Tumorzellen in Bereichen des Gehirns zu finden sind, welche noch eine intakte Blut-Hirn-Schranke besitzen (Wei et al., 2013). Hier kann von keiner ausreichenden Wirkung des TMZ ausgegangen werden, da es vermutlich gar nicht in die Tumorzellen gelangen kann. So verbleiben auch bei einer hohen TMZ-Sensitivität Tumorzellen, welche möglicherweise das Potenzial zur Rezidivbildung besitzen.

Es wird vermutet, dass Tumorzellen in der Lage sind verschiedenste Mechanismen zu entwickeln, die zu einem Verlust der Wirkung von Medikamenten führen. Ein Resistenzmechanismus ist die zuvor angesprochene Expression von ABC-Transportern. Diese Exporter finden sich im menschlichen Gehirn vor allem an der Blut-Hirn-Schranke und an cerebralen Blutgefäßen (Zhang et al., 2003). Hier wären sie in der Lage zu verhindern, dass Medikamente wie TMZ ins Gehirn gelangen. Bislang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass TMZ als Substrat einer dieser ABC-Transporter fungiert (Bleau et al., 2009; Tivnan et al., 2015). Jedoch konnte eine erhöhte Expression der ABC-Transporter mit einer erniedrigten TMZ-Sensitivität in Zusammenhang gebracht werden (Martin et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde die Expression von ABC-Transportern mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden die Expressionslevel der mRNAs bestimmt, die für die Transporter ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 kodieren. Zunächst wurden die Expressionslevel in den Zelllinien T1522, T1524, T1549 und T1556 ohne TMZ-Behandlung bestimmt. Es konnte in allen untersuchten Zelllinien die Expression von mRNAs für diese ABC-Transporter nachgewiesen werden. Die Expressionslevel variierten zwischen den Zelllinien, am deutlichsten bei der Expression der ABCC-6-mRNA. Hier zeigte T1549 eine um >90% höhere Expression als die übrigen Zelllinien. In einem weiteren Experiment wurden die Zelllinien T1440 und T1442 mit 50 μ M TMZ behandelt und wiederum die Expressionslevel der ABCC-1-, ABCC-2-, ABCC-3- und ABCC-6-mRNAs bestimmt. Die TMZ-Behandlung führte bei T1440 zur erhöhten Expression der ABCC-1- und ABCC-2-mRNA, bei einer gleichbleibenden Expression der ABCC-3-mRNA und einer leicht verminderten Expression der ABCC-6-mRNA. Bei T1442 zeigte sich eine verminderte Expression der ABCC-1-, ABCC-3- und

ABCC-6-mRNA, sowie eine gleichbleibende Expression der ABCC-2-mRNA. Die Ergebnisse sprechen zumindestens dafür, dass ABC-Transporter eine Rolle in der Wirksamkeit des TMZ spielen könnten. Das Ausmaß würde dabei für jede Zelllinie individuell sein, da sich die mRNA-Level unterscheiden. Weiterführende Untersuchungen könnten die Expression nach Behandlung mit verschiedenen TMZ-Dosen ermitteln, um einen möglichen Dosiseffekt nachzuweisen. Zudem wäre eine Analyse der Proteinexpression durch Immunzytochemie wichtig, um Expression und intrazelluläre Lokalisation zu ermitteln. Auch über den Einsatz von spezifischen Inhibitoren für verschiedene ABC-Transporter könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen TMZ-Sensitivität und ABC-Transporter Expression aufgedeckt werden.

Die Enzyme PARP-1 und PARP-2 spielen eine Rolle bei DNA-Reparaturmechanismen, sie erkennen DNA-Einzelstrangbrüche und leiten die Reparatur ein. Es wurde eine erhöhte Expression dieser Enzyme in Tumorzellen festgestellt und daraufhin PARP-Inhibitoren entwickelt. Cheng et al. (2005) konnten im Mausmodell zeigen, dass die Inhibition von PARP zu einer erhöhten Wirksamkeit von TMZ beitragen kann. Zuvor gegen TMZ resistente Tumorzellen erlangten durch den PARP-Inhibitor INO-1001 eine Sensitivität gegenüber TMZ (Cheng et al., 2005). Der vermutete Mechanismus ist, dass die durch die TMZ-Behandlung entstehenden N-Methylpurin-Addukte, N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin, PARP aktivieren und die Basenexzisionsreparatur einleiten. Ist PARP jedoch inhibiert, kommt es zu einer DNA-Schädigung, die dann zur Apoptose der Tumorzelle führen kann (Tentori und Graziani, 2009). In dieser Arbeit wurde die Expression und die proteolytische Spaltung des PARP Proteins mittels Western Blot untersucht. Die Spaltung des Volle-Länge-PARP (fl-PARP) in ein 89 kDA Fragment (cl-PARP) ist ein Indiz für die Aktivierung der Effektorcaspase 3 und damit der Apoptose (Porter und Jänicke, 1999). Für die untersuchten Zelllinien T1522, T1524, T1549, T1556 und T1440 ergaben sich heterogene Ergebnisse. Insgesamt kam es durch die TMZ-Behandlung der Proben zwar zu einem zum Teil massiven Zelltod, eine Änderung des Levels von fl- oder cl-PARP war jedoch gering. Lediglich bei den Zelllinien T1522 (Tag d3) und T1524 (Tag d3 und d6) kam es nach TMZ-Behandlung zu einer erhöhten Expression des fl-PARP. Die Zelllinie T1549 wies an Tag d3 keine fl-PARP-Expression in den behandelten Proben auf, an Tag d6 eine verminderte Expression. Für T1440 ließ sich an Tag d3 eine leicht erhöhte fl-PARP-Expression nachweisen. Aufgrund der geringen Extraktmengen konnten für die Zelllinie T1556, insbesondere nach TMZ Behandlung, keine Aussagen zur PARP-Expression gemacht

werden. Insgesamt war in keiner der Proben eine deutliche Induktion der PARP-Proteolyse nach TMZ-Behandlung erkennbar. Zudem war die 89 kDA-Bande des cl-PARP nur im Fall von T1522, T1524 und T1440 deutlich nachweisbar. Ein Problem bei der Analyse ist die geringe Menge an Proteinextrakt, die aus den TMZ behandelten Kulturen gewonnen werden konnte. Dem gegenüber stand die Notwendigkeit 15 µg Proteinextrakt pro Spur aufzutrennen, um einen eindeutigen PARP-Nachweis führen zu können. Eine Lösung für das Problem könnte die Analyse der Proben zu früheren Zeitpunkten nach der TMZ-Gabe sein. In weiterführenden Untersuchungen könnte zudem mittels eines PARP-Inhibitors untersucht werden, ob Zelllinien, die PARP exprimieren nach Behandlung mit einem solchen Inhibitor ein verbessertes Ansprechen auf die TMZ-Behandlung zeigen. So könnte auch geprüft werden, ob durch die zusätzliche Gabe eines PARP-Inhibitors, die mittlere effektive TMZ-Konzentration einer Zelllinie reduziert werden kann.

4.3.1 Der variierende Einfluss von TMZ auf die Proliferation und Vitalität von SLGCs

Ein wichtiger Faktor für den Erfolg der TMZ-Therapie ist die Frage, ob TMZ in der Lage ist die Proliferation und Vitalität von Tumorzellen zu reduzieren. Treten die SLGCs nach TMZ-Gabe lediglich in den Zellzyklusarrest ein, könnten sie nach Beendigung der Behandlung erneut in den Zellzyklus eintreten und Tochterzellen erzeugen. In dieser Arbeit wurden ansteigende TMZ-Dosen eingesetzt und überprüft, ob diese dosisabhängig die Proliferation und/oder Vitalität von sechs verschiedenen SLGC-Linien beeinflussen.

Um die Proliferation der Zelllinien unter der TMZ-Behandlung zu untersuchen, wurde der BrdU-ELISA genutzt. Zur Abschätzung der TMZ-Wirksamkeit wurde die Konzentration bestimmt, die zu einer 50%igen Senkung der Proliferation führte ($EC_{50_{Prolif}}$). Es wurde in allen untersuchten Zelllinien die EC_{50} erreicht, jedoch mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen. So wurde bei der Zelllinie T1440 bereits mit 12,5 µM TMZ die $EC_{50_{Prolif}}$ erreicht. Bei den weiteren untersuchten Zelllinien T1522, T1524, T1549, T1564 und T1495 lagen die Werte für die $EC_{50_{Prolif}}$ zwischen 50 µM und 400 µM TMZ (siehe Tabelle 31 im Anhang). Zieht man in Betracht, dass die TMZ-Konzentration, welche in der cerebrospinalen Flüssigkeit erreicht wird, bei $0,6 \pm 0,3$ µg/mL liegt (Portnow et al., 2009) und vergleicht diese Werte mit den vorliegenden Daten, dann liegt die benötigte Dosis um die $EC_{50_{Prolif}}$ zu erreichen deutlich über der

Dosis welche im Tumor der Patienten zu erwarten wäre. Dies könnte Hinweise auf eine Ursache für die begrenzte klinische Wirkung des TMZ geben. Ein zeitabhängiger Effekt von TMZ auf die Proliferation der SLGC-Linien konnte nicht beobachtet werden. So stellten sich die Dosis-Wirkungs-Kurven an den Tagen d3 und d5 nach TMZ-Zugabe ähnlich dar.

Zur Analyse der Zellvitalität wurden das MTT-Assay, sowie ein Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Im MTT-Assay erreichten die untersuchten Zelllinien T1522, T1524, T1549, T1564, T1440 und T1495 an beiden Messtagen (d3 und d5) nicht den EC50-Wert. Im Zytotoxizitäts-Assay, das die Freisetzung der Laktatdehydrogenase misst, wurde eine 50%ige Steigerung der optischen Dichte zum Teil an Tag d3 und/oder d5 erreicht.

Das MTT-Assay nutzt die metabolische Aktivität der Zelle als Grundlage für die Bestimmung der Vitalität. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Produktion von Reduktionsäquivalenten ein Parameter vitaler Zellen ist (Mosmann, 1983). Signifikante Senkungen der optischen Dichte wurden für alle sechs untersuchten Zelllinien, sowohl an Tag d3 als auch d5, festgestellt. Für die Zelllinie T1440, mit vollständig methyliertem *mgmt*-Promotor, wurde eine signifikante Reduktion der optischen Dichte bereits mit 12,5 μM TMZ gemessen. Die Steigerung der TMZ-Dosis auf 400 μM konnte jedoch lediglich eine moderate zusätzliche Senkung (<4% relativ zur Kontrolle) induzieren. Für die übrigen SLGC-Linien, die alle einen m/u-Status aufwiesen (Tabelle 21), waren höhere TMZ-Dosen nötig, um eine signifikante Senkung der optischen Dichte zu induzieren. Für T1495 und T1549 waren dazu 50-100 μM TMZ ausreichend für T1522, T1524 und T1564 >200 μM TMZ. Dabei lag das Verhältnis von methyliertem zu unmethyliertem *mgmt*-Promotor im Fall von T1495 und T1522 auf der Seite des methyliertem Promotors, bei T1524, T1549 und T1564 auf der Seite des unmethylierten Promotors. Somit korreliert die Senkung der optischen Dichte teilweise mit dem Methylierungsgrad des *mgmt*-Promotors. Das MTT-Assay weist zudem daraufhin hin, dass die Vitalität der Zellen durch die TMZ-Behandlung kaum beeinflusst wurde.

Da im Zytotoxizitäts-Assay überwiegend eine Steigerung der optischen Dichte erreicht wurde, kann es durchaus zu einer Induktion von Zelltod durch das TMZ gekommen sein. Insbesondere an Tag d3 wurde für die Zelllinien T1440 und T1495 eine Steigerung der optischen Dichte um das 3,5- bzw. 2,8-fache beobachtet. Dabei war eine

signifikante Erhöhung der optischen Dichte im Fall von T1440 mit 25 μM TMZ, im Fall von T1495 mit 100 μM zu verzeichnen. Bei den drei anderen SLGC-Linien wurde eine signifikante Steigerung erst mit 200 μM (T1522, T1524) bzw. 300 μM TMZ (T1564) evident. Eine 50%ige Steigerung wurde für T1549 nicht erreicht. Interessanterweise wurde der Effekt nur im Fall von T1440 durch eine zwei Tage längere Inkubation deutlich verstärkt. Hier wurde eine signifikante Steigerung der LDH-Freisetzung am Tag d5 zudem schon mit 12,5 μM TMZ erreicht. Für T1495 wurde eine Abschwächung des Effekts vom Tag d3 zum Tag d5 festgestellt.

Zusammen führen BrdU-ELISA, MTT- und Zytotoxizitäts-Assay zur Schlussfolgerung, dass TMZ nur zum Teil den Zelltod induziert und mit niedrigen Dosen vor allem ein Zellzyklusarrest eintritt. Würde diese Situation auch auf Gliomzellen *in vivo* zutreffen, wäre eine alleinige TMZ-Therapie nicht in der Lage das Tumorwachstum nachhaltig zu stoppen. Mit den erreichbaren Dosen würde primär eine vorübergehende Eindämmung der Proliferation über einen Zellzyklusarrest induziert. Ähnliche Vermutungen hinsichtlich einer nur vorübergehenden Hemmung der Proliferation wurden auch von anderen Arbeitsgruppen publiziert (Chen et al., 2012).

Die oben besprochenen Daten legten die Induktion eines Zellzyklusarrests nahe. Um Evidenzen hierfür zu gewinnen wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit Propidium-Jodid (PI)-markierten Zellen mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Interpretation der erhobenen Daten wurde durch einen hohen Anteil an toten Zellen in den Proben erschwert. In den mit 300 μM TMZ behandelten Proben waren in der Mehrheit der Experimente keine lebenden Zellen mehr vorhanden. Konklusive Ergebnisse wurden für die Zelllinie T1464 erhoben. Im unbehandelten Fall ließen sich die Peaks für die G0-/G1-Phase (diploid, 2n) und die G2-Phase (4n) deutlich abgrenzen. Zusätzlich zeigten sich mehrere niedrige Peaks vor dem G0-/G1-Peak welche den Zelldebris repräsentierten. Nach der TMZ-Behandlung wurden die Signale im „Debris-Peak“ verstärkt, was auf zunehmenden Zelltod hinwies. Eine deutliche Unterscheidung von G1/G0 zum G2-Peak war nicht mehr möglich. Das Vermischen der G1/G0-Peaks (2n) mit dem G2-Peak (4n) weist auf Schädigung der Zellen hin. Obwohl ein G1- oder G2-Arrest nicht erkennbar war, wies die Analyse daraufhin, dass die TMZ-Behandlung den regulären Ablauf des Zellzyklus veränderte. Für die übrigen Analysen waren die Daten nicht eindeutig. Eine zu lange Fixierung der Zellen mit dem Ethanol/Eisessig-Gemisch oder eine mechanische Schädigung wären als Ursachen denkbar.

4.3.2 Expression von Sox2 und Anteil CD133-positiver Zellen

Die publizierten Daten zum Effekt auf CD133-positive Zellen sind kontrovers (Schonberg et al., 2014). Dies könnte an den untersuchten Zelllinien, aber auch den experimentellen Bedingungen liegen. Hier wurde für fünf SLGC-Linien das Sox2-Level und der Anteil CD133-positiver Zellen nach Gabe von TMZ oder dem Lösungsmittel DMSO ermittelt.

Das Sox2-Protein wurde mittels Western Blot untersucht. Das *sox2*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der zu den Pluripotenzfaktoren zählt, da er einer der vier Faktoren ist, mit denen differenzierte Fibroblasten in pluripotente Zellen (iPS) umgewandelt werden können (Takahashi und Yamanaka, 2006). Weiterhin vermindert das „*gene silencing*“ von *sox2* die Proliferationsfähigkeit von Gliomzellen und führt zum Verlust der Tumorigenität (Gangemi et al., 2009). Umgekehrt steigert eine erhöhte *sox2*-Expression die Migration und Invasivität (Garros-Regulez et al., 2016b). Weiterhin ist die Typ I-Zelle (Gliomstammzelle) im Hierarchie-Modell von Chen et. al (2010) Sox2-positiv und die Sox2-Expression nimmt mit zunehmender Differenzierung der Zellen ab.

Sox2 war in allen untersuchten SLGC-Linien nachweisbar. Insgesamt lässt sich aber keine einheitliche Aussage zur Sox2-Expression nach TMZ-Gabe machen. Zwei Zelllinien, T1440 und T1524, zeigten keine deutliche Änderung der Sox2-Level nach TMZ-Gabe. Zwei Zelllinien, T1549 und T1556, reagierten mit einer Senkung des Sox2-Levels, was auf eine Eliminierung von Typ I-Zellen hinweisen könnte. Die Zelllinie T1522 wies in der Kontrolle geringe Sox2-Level auf, die an Tag d3 in der mit 200 µM TMZ behandelten Probe erhöht waren. An Tag d6 waren die Sox2-Level in der 300 µM TMZ Probe erhöht (Abb. 20). Es könnte somit eine Selektion auf Typ I-Zellen erfolgt sein. Diese Aussagen müssten jedoch durch Analysen auf Einzelzellniveau bestätigt werden. Hierzu wäre eine immunzytochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Sox2 und CD133 möglich.

Als etablierter und bereits vielfach untersuchter Marker für „*stemness*“ wurde CD133 verwendet und mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR untersucht. Lange wurde CD133 als zuverlässiger Tumorstammzellmarker genutzt. Mittlerweile konnte allerdings gezeigt werden, dass auch CD133-negative Tumorzellen Stammzeleigenschaften besitzen können und Tumoren im Mausmodell erzeugen können (Beier et al., 2007; Wang et al., 2008). Chen et al. (2010) postulierten die

Hypothese einer hierarchischen Ordnung der Tumorzellen, welche sich in 3 Subtypen aufteilen. Der Subtyp I ist CD133 negativ und kann CD133-negative und -positive Zellen hervorbringen. Der Subtyp II ist CD133 positiv und kann ebenfalls CD133-negative und -positive Zellen hervorbringen. Der Subtyp III ist CD133 negativ und kann nur CD133-negative Zellen erzeugen. Diese Subtypen sind hierarchisch nach ihrer Aggressivität und Differenzierung geordnet, wonach der Subtyp I der aggressivste und am wenigsten differenzierte ist (Chen et al., 2010). So wird CD133 nicht mehr vorrangig als Stammzellmarker verwendet, der CD133-Status eines Tumors kann aber als Anhalt für die Aggressivität genutzt werden.

Die von uns untersuchten Zelllinien zeigten jeweils unterschiedliche Ergebnisse unter der Behandlung mit TMZ. Eindeutige Ergebnisse erbrachten nur die durchflusszytometrischen Messungen der Zelllinien T1524 und T1556. Der Anteil CD133-positiver Zellen stieg in T1524 unter der TMZ-Behandlung moderat an. Die Zelllinie T1524 ist Nestin-positiv und war in der Lage orthotope Tumoren im Mausmodell zu erzeugen. In T1556 kam es zu einer deutlichen Reduktion der CD133-positiven Zellen nach TMZ-Gabe. Diese Zelllinie ist ebenfalls Nestin-positiv und besitzt Tumorigenität. Für die Zelllinien T1440, T1522 und T1549 befanden sich die Ergebnisse im Bereich des Messfehlers.

Die Überprüfung der Höhe des Anteils von CD133 positiven Zellen als prognostischer Marker zeigte, dass sich über den CD133-Status keine validen Vorhersagen bezüglich der Überlebensdauer von GBM-Patienten machen lassen (Dahlrot et al., 2014). Eine weitere Frage ist, auf welche Zellen TMZ vorrangig wirkt. Man geht davon aus, dass die Masse des Tumors aus differenzierten Zellen besteht. Diese werden durch das TMZ eliminiert und es bleiben Zellen mit Stammzeleigenschaften zurück. Es wurde deshalb auch postuliert, dass durch das TMZ eine Selektion der SLGCs stattfindet und dadurch eine Rezidivbildung gefördert wird (Chen et al., 2012; Gaspar et al., 2010). Es finden sich allerdings auch gegensätzliche Ergebnisse von Beier et al. (2008), welche zeigen, dass die Behandlung mit TMZ vor allem die Anzahl der SLGCs mindert, jedoch keinen Einfluss auf die differenzierten Zellen hat (Beier et al., 2008). Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen keine generelle Aussage zu, hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.3.3 Fazit und Ausblick auf zukünftige Forschung und Therapieoptionen

In der Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse lässt sich die Aussage treffen, dass das Glioblastoma multiforme eine heterogene Gruppe von hirneigenen Tumoren umfasst, die sich in grundlegenden Faktoren und der klinischen Präsentation zwar ähnlich sind, aber auf zellulärer Ebene deutliche Unterschiede aufweisen. Als wichtige Gemeinsamkeit ist die Tumorigenität im Mausmodell zu nennen. Zusätzlich zu den hier vorgestellten Ergebnissen wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe zahlreiche weitere Zelllinien im Mausmodell inokuliert und führten zu einem orthotopen Tumorstadium. Diese Eigenschaft spricht für das Vorhandensein von SLGCs, die in der Lage sind sich zu vermehren und das Tumorstadium zu initiieren. Der Aufbau der verschiedenen GBMs kann also ähnlich sein, sie bestehen aus differenzierten Zellen, welche die Tumormasse bilden und SLGCs die möglicherweise für die Therapieresistenz und die Rezidivbildung verantwortlich sind. So waren die Ergebnisse der Versuche zur TMZ-Sensitivität im Grunde für jede Zelllinie individuell und zum Teil komplett gegensätzlich. Wenn sich die Eigenschaften der Tumorzellen jedoch in jedem GBM deutlich voneinander unterscheiden, kann die Anwendung derselben Therapieregime für alle GBMs nicht erfolgversprechend sein. Für die vollständige Eliminierung der Tumorzellen und damit die Rezidivfreiheit der Patienten, wäre die Erstellung eines molekulargenetischen Profils jedes Tumors erforderlich, um anschließend die jeweils passende Therapie auszuwählen. Der Aufbau der Tumorzelle und die verschiedenen Resistenzmechanismen stellen sich jedoch so komplex dar, dass es kaum möglich erscheint die Tumorzelle in naher Zukunft vollständig zu verstehen. So muss zunächst die Verbesserung der vorhandenen Therapieoptionen und Entwicklung neuer Medikamente, welche die Tumorstadium verlangsamen vorangebracht werden und sollte möglichst zu einem deutlich verlängerten Überleben der betroffenen Patienten führen. Ansätze wie beispielweise die Entwicklung von PARP-Inhibitoren, welche einen synergistischen Effekt mit der bereits etablierten TMZ-Therapie bewirken, scheinen zumindest für einen Teil der Patienten die Effektivität der Therapie zu erhöhen. Letzlich muss sich die GBM-Forschung weiter mit der Entschlüsselung der Tumorzellen und der Entstehung der Tumoren befassen, um in Zukunft die gezieltere Entwicklung von Therapien zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Gliome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren und das Glioblastoma multiforme (GBM) ist die häufigste Form der Gliome. Trotz multimodalem Therapiekonzept, bestehend aus der chirurgischen Resektion, sowie einer kombinierten Radiochemotherapie, gibt es bisher keine kurative Behandlung. Als eine Ursache der Therapieresistenz gelten die stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs, engl. *stem like glioma cells*). Um SLGCs zu identifizieren und zu charakterisieren, wurden Zellkulturen aus humanen Hirntumoren in serumfreiem Medium angelegt und diese Zellen in das Gehirn immunsupprimierter SCID-Mäuse xenotransplantiert. Alle inokulierten Gliom-Zelllinien waren in der Lage orthotope Tumoren im Mausmodell zu erzeugen, die Meningeom-Zelllinie T1469 hingegen nicht. Die Zelllinie T1467, die im Tumorigenitätstest reproduzierbar große orthotope Tumoren generierte, wurde für ein *in vivo* Experiment selektiert, in dem die TMZ-Sensitivität getestet werden sollte. Die *in vivo* TMZ-Behandlung der T1467-xenotransplantierten SCID-Mäuse ließ jedoch keine Rückschlüsse auf die TMZ-Sensitivität zu. Aufgrund der ineffizienten und heterogenen Bildung der orthotopen Tumoren konnte keine Aussage zum Ansprechen auf das Alkylans TMZ getroffen werden.

Die TMZ-Sensitivität wurde in weiteren *in vitro* Versuchen analysiert. Mittels RT-PCR wurde die Expression der mRNAs der ABC-Transporter ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 bestimmt. Für alle fünf untersuchten ABC-Transporter wurden mRNAs nachgewiesen, wobei ABCC-6 die heterogenste Expression aufwies. Weiterhin wurde mittels Methylierungsspezifischer-PCR (MSP) die Methylierung des *mgmt*-Promotors ermittelt. Die Mehrheit der Zelllinien wies einen Mischstatus m/u auf, d.h. außer methylierten lagen auch unmethylierte Promotoren vor. Lediglich T1371 wies ausschließlich einen u-Status auf und T1440 war durch einen m-Status charakterisiert. Die Sensitivität der sechs SLGC-Linien T1440, T1495, T1522, T1524, T1549 und T1564 wurde in Proliferations-, Vitalitäts- und Zytotoxizitäts-Assays ermittelt. TMZ reduzierte in allen Zelllinien dosisabhängig die Proliferation (BrdU-ELISA), während nur geringe Effekte auf die Vitalität (MTT-Assay) feststellbar waren. Die Verlängerung der Inkubation um zwei Tage hatte in der Mehrheit der Fälle nur einen moderaten Effekt. Die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (Zytotoxizitäts-Assay) stieg mit höheren TMZ-Dosen, die Verlängerung der Inkubationszeit führte bei keiner Zelllinie zu einer Verstärkung des Effekts. Generell korrelierte die Sensitivität der untersuchten

Zelllinien gut mit dem MGMT-Status. Bei den Zelllinien mit m/u-Status gab es jedoch deutliche Unterschiede in der Responsivität. Obwohl TMZ die Anzahl lebender Zellen in den Kulturen zum Teil drastisch reduzierte, war eine Induktion der Caspase 3, untersucht als Spaltung der Polymerase PARP, nicht evident. Zwei Zelllinien reagierten auf die TMZ-Gabe mit einer Veränderung des Anteils an CD133-positiven Zellen. Eine geringe Steigerung wurde bei T1524 beobachtet, die nicht mit einer Änderung der Sox2-Level auftrat. Eine Abnahme des Anteils CD133-positiver Zellen wurde bei T1556 gemessen, wobei hier ebenfalls das Sox2-Level sank. Abschließend ist festzustellen, dass SLGC-Linien unterschiedlich auf TMZ reagieren, was teilweise durch den MGMT-Status erklärt werden kann und nicht notwendigerweise zur Erhöhung des Stammzellcharakters der Kultur führt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP Binding Cassette
ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat
AIC	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
BCRP	breast cancer resistance protein
bFGF	basic fibroblast growth factor
BTSC	brain tumor stem cell
CD	cluster of differentiation
CSC	cancer stem cell
CT	Computertomographie
D	Deutschland
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLX2	distal less homeobox protein 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBSS	Earle's balanced salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FABP7	fatty acid binding protein 7
FACS	fluorescence assisted cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FSC	forward scatter
GAMPO	Goat-Anti-Mouse Peroxidase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GARPO	Goat-Anti-Rabbit Peroxidase
GBM	Glioblastoma multiforme
GCIMP	glioma CpG island methylator phenotype
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GSC	glioma stem cell
GTH	Gemeinsame Tierhaltung
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
IDH	Isocitratdehydrogenase
IF	Intermediärfilament
iPS	induced pluripotent stem cell
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOF	Körperoberfläche
LDH	Laktatdehydrogenase
M	methyliert
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP-1	multi-drug resistance protein 1
MRT	Magenresonanztomographie
MSP	methylation specific polymerase chain reaction
MTIC	Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid
MTT	Dimethylthiazol-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-1	Neurofibromin-1
NH ₄	Ammonium
Oct	Octamer-binding transcription factor
OD	optische Dichte
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDGF-R α	platelet-derived growth factor receptor alpha
PI	Propidium-Jodid
PIC	Proteinaseinhibitorcocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
R	Rückwärtsprimer
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLGC	stem like glioma cell
Sox2	sex determining region Y(SRY)-box2
SSC	side scatter
TBE	Tris / Borat / EDTA
TBR2	T-box brain protein
TCGA	„The Cancer Genome Atlas“
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TMZ	Temozolomid

Tris	Tris-aminomethan
U	unmethyliert
U87MG	Uppsala 87 malignant glioma
V	Vorwärtsprimer
VT	Volumenteil
W / WT	Wildtyp
WCE	whole cell extracts
WHO	World Health Organisation

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Zelllinien.....	21
Tabelle 2. Rahmenbedingungen für die Inokulationen von Zellen in SCID-Mäuse.	21
Tabelle 3. Zusammensetzung der Zellkulturmedien.	22
Tabelle 4. Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 5. Primer für die RT-PCR.....	29
Tabelle 6. Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.....	32
Tabelle 7. Schritte der reversen Transkription.	32
Tabelle 8. Zusammensetzung des Mastermixes für die semiquantitative PCR.....	32
Tabelle 9. Schritte der RT-PCR mit gapdh-spezifischem Primer.....	33
Tabelle 10. Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.	34
Tabelle 11. Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.	34
Tabelle 12. Zusammensetzung der Antikörper-Mixe für die Immunfluoreszenzfärbung.	35
Tabelle 13. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.....	39
Tabelle 14. Primärantikörper für den Western Blot.	41
Tabelle 15. Sekundärantikörper für den Western Blot.	41
Tabelle 16. Primer für die MSP.....	43
Tabelle 17. Zusammensetzung des Mastermixes für die MSP.....	44
Tabelle 18. PCR-Programm für die MSP.....	44
Tabelle 19. Tumorigenität von SLGC-Linien.	55
Tabelle 20. Tumorigenität von TMZ-behandelten SLGC-Linien.	56
Tabelle 21. Übersicht der Daten des MSP-Assays.	58

Tabelle 22. EC50-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven und MGMT-Status.....	75
Tabelle 23. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Anteils CD133-positiver Zellen von SLGC-Linien nach TMZ-Behandlung.	82
Tabelle 24. Änderung der Sox2-Proteinexpression und des Anteils CD133-positiver Zellen nach TMZ-Behandlung.	83
Tabelle 25. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1522.....	119
Tabelle 26. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1524.....	119
Tabelle 27. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1549.....	120
Tabelle 28. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1564.....	120
Tabelle 29. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1440.....	120
Tabelle 30. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1495.....	121
Tabelle 31. Übersicht Tumorigenität, MGMT-Status und EC50-Werte von SLGC-Linien.....	122

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Schematische Darstellung des stochastischen Modells und des Tumorstammzellmodells.	10
Abb. 2. Modell der hierarchischen Organisation von Typ I-, Typ II- und Typ III-Zellen im GBM.	12
Abb. 3. Übersicht der durchgeführten Experimente zur Charakterisierung von Zelllinien	50
Abb. 4. Immunzytochemische Analyse der Intermediärfilamente Nestin und GFAP. ..	51
Abb. 5. H.E.-Färbung muriner Gehirne nach Xenotransplantation von SLGC-Linien. .	54
Abb. 6. Übersicht der durchgeführten Experimente zur Analyse der TMZ-Sensitivität.	57
Abb. 7. Beispiel einer Methylierungsspezifischen-PCR (SLGC-Linien T1522 und T1440).	58
Abb. 8. Graphische Darstellung der mittels semi-quantitativer RT-PCR untersuchten Expression von ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3, ABCC-6 und ABCG-2 in unbehandelten Zelllinien.	59
Abb. 9. Graphische Darstellung der mittels semi-quantitativer RT-PCR untersuchten Expression von ABCC-1, ABCC-2, ABCC-3 und ABCC-6 in den Zelllinien T1440 und T1442 in Abhängigkeit von der TMZ-Behandlung.	60
Abb. 10: Western Blot Analyse der PARP-Expression und Proteolyse in SLGC-Linien.	63
Abb. 11. Darstellung der relativen Expression des Volle-Länge-PARPs.	64
Abb. 12. Senkung der BrdU-Inkorporation in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.	67
Abb. 13. Dosis-Wirkungs-Kurven des BrdU-ELISA in SLGC-Kulturen nach TMZ- Behandlung.	68
Abb. 14. Senkung der Formazan-Bildung in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.	69

Abb. 15. Dosis-Wirkungs-Kurven des MTT-Assays in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.	70
Abb. 16. Steigerung der LDH-Freisetzung in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.	72
Abb. 17. Dosis-Wirkungs-Kurven des Zytotoxizitäts-Assays in SLGC-Kulturen nach TMZ-Behandlung.	73
Abb. 18. Beispielbilder durchflusszytometrischer Analysen Propidium-Jodid (PI)-markierter Zellen.	76
Abb. 19. Western Blot Analyse der Sox2-Expression in SLGC-Linien.....	79
Abb. 20. Relative Expression des Sox2-Proteins in behandelten SLGC-Linien.....	80
Abb. 21. Graphische Darstellung der CD133-mRNA Expression in behandelten Kulturen (50 μ M TMZ) von T1371, T1442 und T1454.....	81
Abb. 22. Immunhistochemische Analyse der Intermediärfilamente Nestin und GFAP in einer Tumorbiopsie des Tumors T1467.....	119
Abb. 23. Prozentualer Anteil an CD133-positiven Zellen in Kulturen der Zelllinie T1556 (durchflusszytometrische Messung).	121

9 Literaturverzeichnis

Alonso, M.M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., de Munain, A.L., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solis, S., Vicente, C., Odero, M.D., Bandrés, E., García-Foncillas, J., Idoate, M.A., Lang, F.F., Fueyo, J., and Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas. *PLoS ONE* 6, e26740.

Anido, J., Sáez-Borderías, A., González-Juncà, A., Rodón, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sánchez, R.M., Barba, I., Martínez-Sáez, E., Prudkin, L., Cuartas, I., Raventós, C., Martínez-Ricarte, F., Poca, M.A., García-Dorado, D., Lahn, M.M., Yingling, J.M., Rodón, J., Sahuquillo, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2010). TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18, 655–668.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.

Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2008). Targeting Cancer Stem Cells through L1CAM Suppresses Glioma Growth. *Cancer Res.* 68, 6043–6048.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133+ and CD133– Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Res.* 67, 4010–4015.

Beier, D., Röhr, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., and Beier, C.P. (2008). Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Res.* 68, 5706–5715.

Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol. Cancer* 10, 128.

Bidlingmaier, S., Zhu, X., and Liu, B. (2008). The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 86, 1025–1032.

Bleau, A.-M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4, 226–235.

Brada, M., Judson, I., Beale, P., Moore, S., Reidenberg, P., Statkevich, P., Dugan, M., Batra, V., and Cutler, D. (1999). Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br. J. Cancer* 81, 1022–1030.

- Brennan, C., Momota, H., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., and Holland, E. (2009). Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations. *PLoS ONE* 4, e7752.
- Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci. Lett.* 565, 7–13.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522–526.
- Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., Modrusan, Z., Nacu, S., Guerrero, S., Edgar, K.A., Wallin, J.J., Lamszus, K., Westphal, M., Heim, S., James, C.D., VandenBerg, S.R., Costello, J.F., Moorefield, S., Cowdrey, C.J., Prados, M., and Phillips, H.S. (2010). A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362–375.
- Cheng, C.L., Johnson, S.P., Keir, S.T., Quinn, J.A., Ali-Osman, F., Szabo, C., Li, H., Salzman, A.L., Dolan, M.E., Modrich, P., Bigner, D.D., and Friedman, H.S. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair-deficient malignant glioma xenograft. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1364–1368.
- Choschzick, I. (2015). Differenzierungskapazität von Stammzell-ähnlichen Zellen aus humanen Glioblastomen. Dissertation, Universität zu Lübeck.
- Choschzick, I., Hirsland, E., Cramer, H., Schultz, S., Leppert, J., Tronnier, V., and Zechel, C. (2014). Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes α , β and γ . *Neuroscience* 279, 44–64.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., 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.
- Claus, E.B., Bondy, M.L., Schildkraut, J.M., Wiemels, J.L., Wrensch, M., and Black, P.M. (2005). Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery* 57, 1088–1095; discussion 1088-1095.
- Clément, V., Marino, D., Cudalbu, C., Hamou, M.-F., Mlynarik, V., de Tribolet, N., Dietrich, P.-Y., Gruetter, R., Hegi, M.E., and Radovanovic, I. (2010). Marker-independent identification of glioma-initiating cells. *Nat. Methods* 7, 224–228.
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Taviani, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., and Huttner, W.B. (2000). The Human AC133 Hematopoietic Stem Cell Antigen Is also Expressed in Epithelial Cells and Targeted to Plasma Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* 275, 5512–5520.
- Dahlrot, R.H., Hansen, S., Jensen, S.S., Schröder, H.D., Hjelmberg, J., and Kristensen, B.W. (2014). Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 3739–3751.

Dahlstrand, J., Collins, V.P., and Lendahl, U. (1992). Expression of the Class VI Intermediate Filament Nestin in Human Central Nervous System Tumors. *Cancer Res.* *52*, 5334–5341.

Dantzer, F., Amé, J.-C., Schreiber, V., Nakamura, J., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol.* *409*, 493–510.

deCarvalho, A.C., Nelson, K., Lemke, N., Lehman, N.L., Arbab, A.S., Kalkanis, S., and Mikkelsen, T. (2010). Gliosarcoma stem cells undergo glial and mesenchymal differentiation in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 181–190.

Dirks, P.B. (2010). Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol. Oncol.* *4*, 420–430.

Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* *6*, 1127–1134.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* *97*, 703–716.

Ehrmann, J., Kolar, Z., and Mokry, J. (2005). Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J. Clin. Pathol.* *58*, 222–223.

Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999). Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia. *Cancer Res.* *59*, 793–797.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., Vitis, S.D., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* *64*, 7011–7021.

Gangemi, R.M.R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 40–48.

Garros-Regulez, L., Aldaz, P., Arrizabalaga, O., Moncho-Amor, V., Carrasco-Garcia, E., Manterola, L., Moreno-Cugnon, L., Barrera, C., Villanua, J., Ruiz, I., Pollard, S., Lovell-Badge, R., Sampron, N., Garcia, I., and Matheu, A. (2016a). mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin. Ther. Targets* *20*, 393–405.

Garros-Regulez, L., Garcia, I., Carrasco-Garcia, E., Lantero, A., Aldaz, P., Moreno-Cugnon, L., Arrizabalaga, O., Undabeitia, J., Torres-Bayona, S., Villanua, J., Ruiz, I., Egaña, L., Sampron, N., and Matheu, A. (2016b). Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front. Oncol.* *6*, e222.

Gaspar, N., Marshall, L., Perryman, L., Bax, D.A., Little, S.E., Viana-Pereira, M., Sharp, S.Y., Vassal, G., Pearson, A.D.J., Reis, R.M., Hargrave, D., Workman, P., and

Jones, C. (2010). MGMT-INDEPENDENT TEMOZOLOMIDE RESISTANCE IN PAEDIATRIC GLIOBLASTOMA CELLS ASSOCIATED WITH A PI3-KINASE-MEDIATED HOX / STEM CELL GENE SIGNATURE. *Cancer Res.* *70*, 9243–9252.

Goyal, R., Mathur, S.K., Gupta, S., Goyal, R., Kumar, S., Batra, A., Hasija, S., and Sen, R. (2015). Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *J. Neurosci. Rural Pract.* *6*, 499–503.

Grasbon-Frodl, E.M., Kreth, F.W., Ruitter, M., Schnell, O., Bise, K., Felsberg, J., Reifenberger, G., Tonn, J.-C., and Kretschmar, H.A. (2007). Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int. J. Cancer* *121*, 2458–2464.

Green, M.R. and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Guo, Y., Liu, S., Wang, P., Zhao, S., Wang, F., Bing, L., Zhang, Y., Ling, E.-A., Gao, J., and Hao, A. (2011). Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* *59*, 763–775.

Han, S.J., Yang, I., Ahn, B.J., Otero, J.J., Tihan, T., McDermott, M.W., Berger, M.S., Prados, M.D., and Parsa, A.T. (2010). Clinical characteristics and outcomes for a modern series of primary gliosarcoma patients. *Cancer* *116*, 1358–1366.

Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S., and Simjee, S. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *18*, 3–9.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., and Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 997–1003.

Higgins, C.F. (1992). ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu. Rev. Cell Biol.* *8*, 67–113.

Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2001). p53 Effects Both the Duration of G2/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* *61*, 1957–1963.

Hirseland, E. (2017). Zelluläre und molekulare Heterogenität stammzellähnlicher Gliomzellen und Bedeutung für die Therapiesensibilität. Dissertation, Universität zu Lübeck.

Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Saito, N., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2011). Glioma-initiating Cells Retain Their Tumorigenicity through Integration of the Sox Axis and Oct4 Protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 41434–41441.

Johannessen, A.L., and Torp, S.H. (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol. Oncol. Res.* *12*, 143–147.

- Karnofsky, D.A., Abelmann, W.H., Craver, L.F., and Burchenal, J.H. (1948). The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer* *1*, 634–656.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., and Schöler, H.R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* *454*, 646–650.
- Korzeniewski, C., and Callewaert, D.M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* *64*, 313–320.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D.R., Gokaslan, Z.L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F.F., McCutcheon, I.E., Hassenbusch, S.J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., and Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* *95*, 190–198.
- Laperriere, N. (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *64*, 259–273.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., MacSwords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 421–432.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Myers, J.T., Li, M., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Huang, A.Y., and Rich, J.N. (2011). Direct In Vivo Evidence for Tumor Propagation by Glioblastoma Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* *6*, e24807.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., and Fine, H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* *9*, 391–403.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* *60*, 585–595.
- Li, Y.M., Suki, D., Hess, K., and Sawaya, R. (2016). The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *J. Neurosurg.* *124*, 977–988.
- van Linde, M.E., Brahm, C.G., de Witt Hamer, P.C., Reijneveld, J.C., Bruynzeel, A.M.E., Vandertop, W.P., van de Ven, P.M., Wagemakers, M., van der Weide, H.L., Enting, R.H., Walenkamp, A.M.E., and Verheul, H.M.W. (2017). Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis. *J. Neurooncol.* *135*, 183–192.
- Linn, J., Wiesmann, M., Brückmann, H. (2011). *Atlas Klinische Neuroradiologie des Gehirns*, 1. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, 213-216.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* *5*, 67.

- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 803–820.
- Loy, M. (2018). Charakterisierung stammzellähnlicher Zellen aus humanen malignen Gliomen. Dissertation, Universität zu Lübeck.
- Malmström, A., Grønberg, B.H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M.E., Rosell, J., Henriksson, R., and Nordic Clinical Brain Tumour Study Group (NCBTSG) (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 916–926.
- Martin, V., Sanchez-Sanchez, A.M., Herrera, F., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Alvarez-Vega, M.A., Antolin, I., and Rodriguez, C. (2013). Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br. J. Cancer* *108*, 2005–2012.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* *65*, 55–63.
- Mosteller, R. (1987). Simplified Calculation of Body-Surface Area. *N. Engl. J. Med.* *317*, 1098–1098.
- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W.L., Shay, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M.C.M., Hainfellner, J.A., Heppner, F.L., Dietrich, P.-Y., Zimmer, Y., Cairncross, J.G., Janzer, R.-C., Domany, E., Delorenzi, M., Stupp, R., and Hegi, M.E. (2008). Stem cell-related “self-renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 3015–3024.
- Newlands, E.S., Blackledge, G.R., Slack, J.A., Rustin, G.J., Smith, D.B., Stuart, N.S., Quarterman, C.P., Hoffman, R., Stevens, M.F., and Brampton, M.H. (1992). Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br. J. Cancer* *65*, 287–291.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Hayes, D.N., Perou, C.M., Schmidt, H.K., Ding, L., Wilson, R.K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L.M., Buckley, J., Herman, J.G., Baylin, S.B., Laird, P.W., and Aldape, K. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* *17*, 510–522.
- Oh, D., and Prayson, R.A. (1999). Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *123*, 917–920.

- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 93–108.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 764–772.
- Ossovskaya, V., Koo, I.C., Kaldjian, E.P., Alvares, C., and Sherman, B.M. (2010). Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes Cancer* 1, 812–821.
- Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L.A., and Stupp, R. (2004). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 3728–3736.
- Park, C.H., Bergsagel, D.E., and McCulloch, E.A. (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 411–422.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K.N., Shinjo, S.M.O., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., and Kinzler, K.W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 321, 1807.
- Pegg, A.E. (1990). Mammalian O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Regulation and Importance in Response to Alkylating Carcinogenic and Therapeutic Agents. *Cancer Res.* 50, 6119–6129.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., and Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.
- Porter, A.G., and Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99–104.
- Portnow, J., Badie, B., Chen, M., Liu, A., Blanchard, S., and Synold, T.W. (2009). The Neuropharmacokinetics of Temozolomide in Patients with Resectable Brain Tumors: Potential Implications for the Current Approach to Chemoradiation. *Clin. Cancer Res.* 15, 7092–7098.
- Raju, S. (2015). Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model. *Neurosurgery* 77, 629–643.
- Rebetz, J., Tian, D., Persson, A., Widegren, B., Salford, L.G., Englund, E., Gisselsson, D., and Fan, X. (2008). Glial Progenitor-Like Phenotype in Low-Grade Glioma and Enhanced CD133-Expression and Neuronal Lineage Differentiation Potential in High-Grade Glioma. *PLoS ONE* 3, e1936.
- Regenbrecht, C.R.A., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2008). Stemming Cancer: Functional Genomics of Cancer Stem Cells in Solid Tumors. *Stem Cell Rev.* 4, 319–328.

Roa, W., Brasher, P.M.A., Bauman, G., Anthes, M., Bruera, E., Chan, A., Fisher, B., Fulton, D., Gulavita, S., Hao, C., Husain, S., Murtha, A., Petruk, K., Stewart, D., Tai, P., Urtasun, R., Cairncross, J.G., and Forsyth, P. (2004). Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 1583–1588.

Robel, S., Berninger, B., and Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 88–104.

Rutka, J.T., Ivanchuk, S., Mondal, S., Taylor, M., Sakai, K., Dirks, P., Jun, P., Jung, S., Becker, L.E., and Ackerley, C. (1999). Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 17, 503–515.

Salazar, O.M., and Rubin, P. (1976). The spread of glioblastoma multiforme as a determining factor in the radiation treated volume. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1, 627–637.

Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., and Rich, J.N. (2014). Brain tumor stem cells: molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects Med.* 0, 82–101.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 517–528.

Scott, J.N., Rewcastle, N.B., Brasher, P.M.A., Fulton, D., MacKinnon, J.A., Hamilton, M., Cairncross, J.G., and Forsyth, P. (1999). Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann. Neurol.* 46, 183–188.

Sebaugh, J.L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm. Stat.* 10, 128–134.

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.

Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J., and Fine, H.A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440–452.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., and Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7, 392–401.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R.O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Tentori, L., and Graziani, G. (2009). Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. *Curr. Med. Chem.* 16, 245–257.

Tentori, L., Ricci-Vitiani, L., Muzi, A., Ciccarone, F., Pelacchi, F., Calabrese, R., Runci, D., Pallini, R., Caiafa, P., and Graziani, G. (2014). Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. *BMC Cancer* 14, 151.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.

Thon, N., Damianoff, K., Hegermann, J., Grau, S., Krebs, B., Schnell, O., Tonn, J.-C., and Goldbrunner, R. (2010). Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 51–59.

Tivnan, A., Zakaria, Z., O’Leary, C., Kögel, D., Pokorny, J.L., Sarkaria, J.N., and Prehn, J.H.M. (2015). Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Front. Neurosci.* 9, e218.

Tsang, L.L. (1990). Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 26, 429–436.

Tsang, L.L. (1991). Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 27, 342–346.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting New Advances in Neuro-Oncology. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabrie, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., and Hayes, D.N. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.

Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T., and Relichova, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* 6, 32.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* *10*, 717–728.

Wang, J., Sakariassen, P.Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røsland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., and Enger, P.Ø. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *122*, 761–768.

Watts, G.S., Pieper, R.O., Costello, J.F., Peng, Y.M., Dalton, W.S., and Futscher, B.W. (1997). Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5612–5619.

Wei, K.-C., Chu, P.-C., Wang, H.-Y.J., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Lee, P.-Y., Tseng, I.-C., Feng, L.-Y., Hsu, P.-W., Yen, T.-C., and Liu, H.-L. (2013). Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening to Enhance Temozolomide Delivery for Glioblastoma Treatment: A Preclinical Study. *PLoS ONE* *8*, e58995.

Welte, Y., Adjaye, J., Lehrach, H.R., and Regenbrecht, C.R. (2010). Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun. Signal. CCS* *8*, 6.

Wick, W., Platten, M., and Weller, M. (2009). New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro-Oncol.* *11*, 69–79.

Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J.P., Sabel, M., Combs, S.E., Vesper, J., Braun, C., Meixensberger, J., Ketter, R., Mayer-Steinacker, R., Reifenberger, G., Weller, M., and NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 707–715.

Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C.-H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T.E., and Pekny, M. (2004). Absence of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Prevents Hypertrophy of Astrocytic Processes and Improves Post-Traumatic Regeneration. *J. Neurosci.* *24*, 5016–5021.

Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., and Ding, J. (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J. Biol. Chem.* *279*, 33946–33957.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., and Bigner, D.D. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 765–773.

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.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clin. Cancer Res.* *14*, 123–129.

Zhang, Q.B., Ji, X.Y., Huang, Q., Dong, J., Zhu, Y.D., and Lan, Q. (2006). Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res.* *16*, 909–915.

Zhang, W., Mojsilovic-Petrovic, J., Andrade, M.F., Zhang, H., Ball, M., and Stanimirovic, D.B. (2003). Expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J* *17*, e2085-7.

Zhao, J., Ma, W., and Zhao, H. (2014). Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: a meta-analysis. *Neuro-Oncol.* *16*, 103–112.

10 Anhang

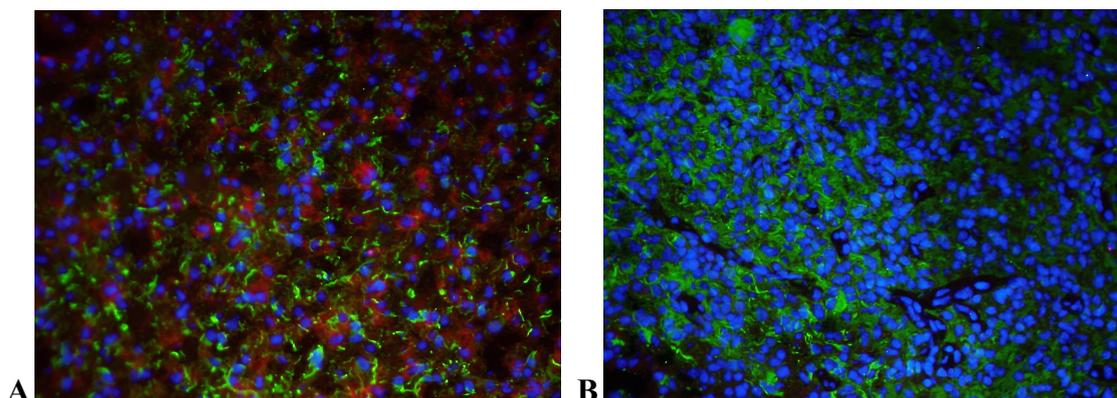


Abb. 22. Immunhistochemische Analyse der Intermediärfilamente Nestin und GFAP in einer Tumorbiopsie des Tumors T1467.

Die Abbildungen A) und B) zeigen verschiedenen Regionen des Tumors T1467. Es erfolgte eine Tripel-Färbung mit den Antikörperpaaren α Nestin goat/anti-mouse (grün), α GFAP goat/anti-rabbit (rot) und DAPI (blau). Die Präparate wurden mir zur Verfügung gestellt.

Tabelle 25. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1522.

T1522	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
12,5 μ M TMZ	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.
25 μ M TMZ	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.
50 μ M TMZ	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 μ M TMZ	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
200 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,01	n.s.	n.s.
300 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	p<0,01	p<0,001	n.s.	n.s.
400 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

Tabelle 26. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1524.

T1524	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
12,5 μ M TMZ	p<0,01	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	p<0,001
25 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,01	p<0,001
50 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001
100 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
200 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
300 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
400 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

Tabelle 27. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1549.

T1549	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
12,5 µM TMZ	p<0,001	p<0,05	p<0,001	n.s.	p<0,001	p<0,001
25 µM TMZ	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001
50 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.	p<0,001	p<0,001
100 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01
200 µM TMZ	n.s.	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
300 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,01
400 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

Tabelle 28. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1564.

T1564	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
12,5 µM TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.
25 µM TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.
50 µM TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.
100 µM TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,05	n.s.
200 µM TMZ	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
300 µM TMZ	n.s.	p<0,01	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001
400 µM TMZ	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

Tabelle 29. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1440.

T1440	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
6,25 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	n.s.	p<0,001	p<0,001	p<0,001
12,5 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
25 µM TMZ	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
50 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
100 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
200 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
300 µM TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

Tabelle 30. One-way ANOVA und Tukey Post Test der TMZ-Behandlung vs. DMSO Kontrolle der Zelllinie T1495.

T1495	Tag d3			Tag d5		
	BrdU	MTT	LDH	BrdU	MTT	LDH
12,5 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.
25 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
50 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
100 μ M TMZ	p<0,001	n.s.	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
200 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
300 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
400 μ M TMZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey Post Test. Es wurden die TMZ-Behandlungen gegen die DMSO-Kontrolle verglichen. n.s., nicht signifikant.

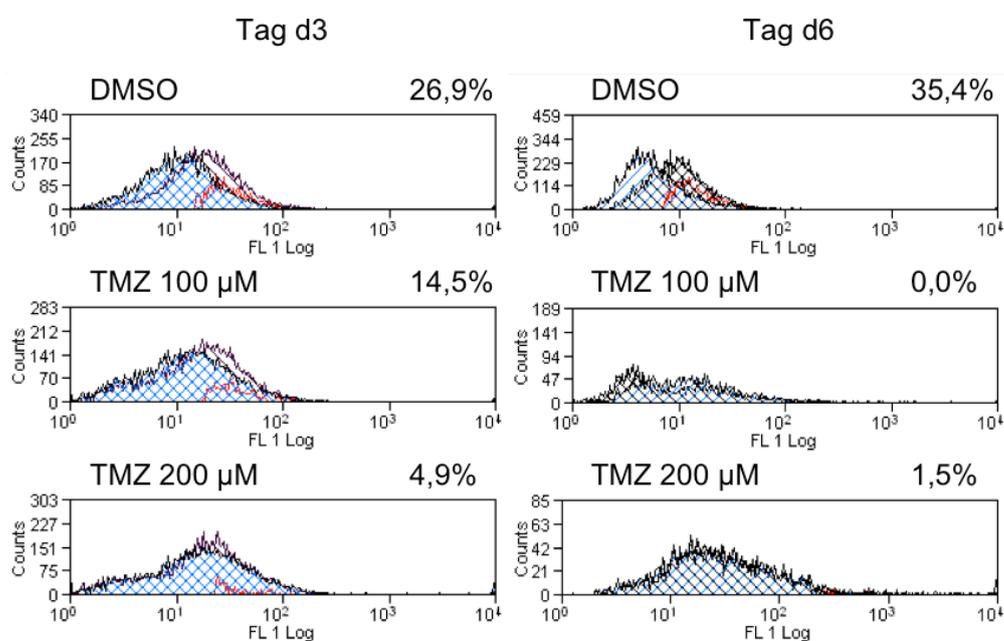


Abb. 23. Prozentualer Anteil an CD133-positiven Zellen in Kulturen der Zelllinie T1556 (durchflusszytometrische Messung). X-Achse: Intensität der Fluoreszenz des CD133-Antikörpers. Y-Achse: Zellzahl. Die Kontrolle erfolgte mittels DMSO, da das hydrophobe TMZ in DMSO gelöst verwendet wurde. Die Messungen erfolgten an Tag d3 und Tag d6 nach Zugabe des TMZ.

Tabelle 31. Übersicht Tumorigenität, MGMT-Status und EC50-Werte von SLGC-Linien.

Zelllinie	Tumor	mgmt	EC50 _{Prolif}		EC50 _{Cyttox}	
			Tag d3	Tag d5	Tag d3	Tag d5
T1371	Ja	u	300 µM*	250 µM*	n.d.	n.d.
T1440	Ja	m	25 µM	12,5 µM	12,5-25 µM	<12,5 µM
T1495	Ja	u/m	100 µM	100 µM	50-100 µM	n.e.
T1522	Ja	u/m	200-300 µM	200-300 µM	200 µM	n.e.
T1524	Ja	u/m	200 µM	12,5-25 µM	200 µM	25-50 µM
T1549	Ja	u/m	300 µM	100 µM	50 µM	n.e.
T1564	n.d.	n.d.	>400 µM	400 µM	300 µM	300 µM

Die Tumorigenität wurde mittels H.E.-Färbung ermittelt, das Vorhandensein von kleinen Tumoren kann so nicht ausgeschlossen werden. Die EC50 wurde aus den Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Auf die Darstellung der Ergebnisse des MTT-Assays wurde verzichtet, da hier keine der untersuchten Zelllinien den EC50 Wert erreichte. Die EC50 des Zytotoxizitäts-Assays bezieht sich auf eine 50%ige Steigerung der LDH-Freisetzung. Beim MGMT-Status ist die dominante Modifizierung fett geschrieben. SCID, engl. *severe combined immunodeficiency*; m, methyliert; u, unmethyliert; n.e., nicht erreicht; n.d., nicht durchgeführt. * markiert Werte, die von Kollegen im Labor ermittelt worden.



Universität zu Lübeck

*Eingang
9.9.08*

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Zechel
Klinik für Neurochirurgie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 27.06.2008
Aktenzeichen: **08-070**
(immer angeben!)

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission 20. Mai 2008 – Ihr Schreiben vom 20. Juni 2008

Antragsteller: Frau Dr. Zechel / Herr Prof. Tronnier

Titel: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr
Raspe
Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)

Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)

Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)

Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)

Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)

Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)

Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Ahrensburg)

Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein
(Medizinische Klinik I)

Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)

Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)

Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Im Fortschritt des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau

PD Dr. C. Zechel

Klinik für Neurochirurgie

im Hause

Aktenzeichen: 08-070

Datum 18.03.2009

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Hier: Optimierte Aufklärung – Ihr Schreiben vom 12.03.2009

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

die optimierte Aufklärung habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
 für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
 Vorsitzender

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Christina Zechel für die Überlassung meines Dissertationsthemas, sowie die engagierte und stetige Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation bedanken. Über die gesamte Dauer der Arbeit konnte ich mich auf ihre professionelle und herzliche Betreuung verlassen.

Ich danke Prof. Dr. med. Volker Tronnier für die Möglichkeit meine Dissertation in dem Labor für Neuroonkologie und Molekularbiologie der Klinik für Neurochirurgie durchführen zu können.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Jörg Köhl für die Möglichkeit der Nutzung der CAAnaCore-Facility des Instituts für systemische Entzündungsforschung. Vielen Dank an die Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie von Prof. Dr. med. Detlef Zillikens für die Möglichkeit der Paraffineinbettung der Mausgehirne. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck und bei Dr. med. vet. Barthel Schmelting für die Betreuung der Tiere. Vielen Dank an Prof. Dr. Dr. med. Jens Habermann für die Bereitstellung der CaCO₂-Zelllinie. Prof. Dr. med. Manfred Westphal und Prof. Dr. med. Katrin aus der Neurochirurgie des UKE Hamburg sei für die freundliche Bereitstellung der Zelllinie U87MG gedankt.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Labors für Neuroonkologie und Molekularbiologie für die angenehme Zusammenarbeit. Dabei gilt mein Dank vor allem Frau Edith Pawlak für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit, insbesondere der Betreuung der Zellkulturen. Frau Anja Kerstein und Frau Isabell Choschzick danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und die stetige Unterstützung. Frau Susanne Behling danke ich für die Hilfe beim Präparieren der Mausgehirne, sowie dem Anfertigen der Mikrotomschnitte. Ich danke Herrn Dr. Jan Leppert für die Einweisung in die praktische Handhabung der Mäuse. Frau Mira Loy danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit während der Durchführung der Tierexperimente.

Zuletzt möchte ich mich sehr herzlich für die andauernde Unterstützung meiner Eltern bedanken. Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden für die Motivation in allen Phasen bis zur Fertigstellung der Arbeit.

12 Lebenslauf

Name: Laura Bähr
 Geburtsdatum: 08.06.1986
 Geburtsort: Bremerhaven



Schulbildung:

1992 – 1996 Grundschule „Zwingli-Schule“, Bremerhaven
 1996 – 1998 Orientierungsstufe „Schule Am Leher Markt“, Bremerhaven
 1998 – 2002 Gymnasium „Pestalozzi-Schule“, Bremerhaven
 2002 – 2005 Oberstufe „Geschwister Scholl Schule“, Bremerhaven
 05/2005 Abitur

Studium:

10/2005 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der
 Universität zu Lübeck
 03/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 06/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf:

Weiterbildung zur Fachärztin für Unfallchirurgie und Orthopädie

05/2013 – 08/2016 Assistenzärztin in den Abteilungen Unfallchirurgie und
 Orthopädie, Wirbelsäulenchirurgie, Allgemein- und
 Viszeralchirurgie
 Paracelsus Klinik Henstedt-Ulzburg
 09/2016 - 06/2017 Assistenzärztin in der Abteilung “Interdisziplinäre operative
 Intensivmedizin”
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
 seit 03/2018 Assistenzärztin in den Abteilungen Unfallchirurgie und
 Orthopädie, Wirbelsäulenchirurgie
 Asklepios Klinik Nord – Standort Heidberg, Hamburg

Publikationen:

Kongressbeiträge:

Kerstein A., Leppert J., Gödecke L., Bähr L., Pawlak E., Tronnier V., Zechel C. – Therapy responsiveness of stem like human glioma cells. *Stem Cells & Regenerative Medicine (JSRM) vol 6 issue 2*. - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Lübeck 2010.

Bähr L., Kerstein A., Hirsland E., Loy M., Leppert J., Tronnier V., Zechel C. - Molecular basis of the distinct TMZ-sensitivity of primary BTSC lines from human glioblastoma. - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung Leipzig, 29. – 30. Nov. 2012

Meiners R., Hirsland E., Kerstein A., Bähr L., Frobel J., Behling S., Tronnier V., Zechel C. - Epigenetic aspects of the regulation of the expression of the DNA repair protein MGMT in glioma. - Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, Essen, 05.-07. Sept. 2012.

Limpert A, Leppert J, Kerstein A, Alkanan Y, Bähr L., Tronnier V, Zechel C. - APPROACH TO SENSITIZE GLIOMA STEM CELLS TO STANDARD CHEMOTHERAPY. - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Rostock, 6.-7. September 2013.