

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier

Effekte von Imatinib auf stammzellähnliche Gliomzellen aus Glioblastomen und Gliosarkomen in An- und Abwesenheit von Temozolomid

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Julia Elßner

aus Hamburg

Lübeck 2021

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Martha Kirstein

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.09.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Tumorentstehung.....	1
1.2 Maligne neuroepitheliale Gehirntumoren	1
1.3 Mutationen und deregulierte Signalwege in Glioblastomen	4
1.4 Die Glioblastomtherapie	6
1.5 Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib.....	7
1.6 Ursachen der Therapieresistenz	8
1.7 Bedeutung und Eigenschaften von Gliomstammzellen	9
1.8 Fragestellung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Zelllinien	13
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.3 Zellkultur und Passagieren von Zellen.....	19
2.4 Immunzytochemische Färbung	21
2.5 Durchflusszytometrie	23
2.6 Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot	24
2.7 BrdU-ELISA.....	27
2.8 Wachstumsfaktor-ELISA	29
2.9 Statistik.....	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Phänotypen von SLGC-Linien und Klonen	31
3.2 Anreicherung von CD133- und CD140a-positiven Zellen nach Behandlung	36
3.3 Beeinflussung der PDGFR- α und PDGFR- β -Expression durch die Behandlung	48
3.4 Beeinflussung von Sox-2 und CD133 durch die Behandlung	59
3.5 Beeinflussung der CD133- und Sox-2-Expression auf Einzelzellniveau	65
3.6 Beeinflussung der Proliferation durch die Behandlungen	71
3.7 Expression des Intermediärfilamentproteins GFAP	75
3.8 Beeinflussung der PDGF-AB-Sekretion durch Imatinib	78
4 Diskussion.....	80
4.1 Eigenschaften von SLGC-Linien und abgeleiteten Klonen.....	80
4.2 Effekte von Imatinib- und/oder TMZ auf Proliferation und PDGFR-Expression	83

4.3	Selektion auf Gliomstammzellen und/oder Progenitorstadien	89
4.4	Möglichkeit der autokrinen Stimulation von PDGFR- α und PDGFR- β	92
4.5	Fazit und Ausblick.....	93
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis.....	97
7	Anhang	104
8	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

ABC- *ATP-binding-casette*
ABL- *abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
ABTS- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AIC- 5-aminoimidazol-4-carboxamid
AKT- Proteinkinase B (PKB)
APC- Allophycocyanin
ATP- Adenosintriphosphat
ATRX- *ATP-dependent helicase ATRX*
BCR- *breakpoint cluster region*
BER- Basen-Exzisionsreparatur
BIT- *bovine serum albumin-insulin-transferrin*
BRCA1- *Breast cancer1*
BrdU- Bromdesoxyuridin
CD133- Prominin-1
CD140a- PDGFR- α CHI3L1- *chitinase 3-like1*
cl- Klon
d- Tag
DAPI- 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
D/DMSO- Dimethylsulfoxid
DNA-Desoxyribonukleinsäure
EDTA- Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR- *epidermal growth factor receptor*
ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*
F(ab')- Antigenbindendes Fragment
FC- Durchflusszytometrie
FcR- Fc-Rezeptor
FCS- Fetales Kälberserum
GAPDH- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARPO- Ziege-anti-Kaninchen
GAMPO- Ziege-anti-Maus
GBM- Glioblastoma multiforme
GFAP- Saures Gliafaserprotein
HRP- Meerrettichperoxidase
hu rbFGF- *recombinant human basic fibroblast growth factor*
hu rEGF- *recombinant human epidermal growth factor*
I- Imatinib
ICC- Immunzytochemie
IDH- Isocitratdehydrogenase 1/2

IgG- Immunglobulin G
JLB- *jurkat-lysis-buffer*
MAB- monoklonaler Antikörper
MAPK- *mitogen activated protein kinase*
Mc- Mutterkultur
MET- *hepatocyte growth factor receptor*
MGMT- O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMR- *mismatch-repair*
MTIC- 5-(3-N-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid
mTOR- *mechanistic target of rapamycin*
NF1- Neurofibromin 1
PAGE- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF- *platelet-derived growth factor*
PDGFR- *PDGF-Receptor*
PDK- *3-phosphoinositide-dependent kinase*
PE- Phycoerythrin
PI3K- Phosphoinositid-3-kinase
PIC- *protease inhibitor cocktail* PIP3- Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PMSF- Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN- *phosphatase and tensin homolog*
RAS- *rat sarcoma*
RNA- Ribonukleinsäure
SCID- schwerer kombinierter Immundefekt
SDS- Natriumdodecylsulfat
SLGC- Stammzellähnliche Gliomzellen
Sox-2- *sex determining region Y HMG box 2*
TERT- *telomerase reverse transcriptase*
T/TMZ- Temozolomid
Tp53- Tumor Protein p53
Tris- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB- Westernblot
WCE- Gesamtzellproteinextrakt
WHO- Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Unterschiede zwischen IDH-Wildtyp Glioblastomen und IDH-mutierten Glioblastomen	3
Tab. 2: Zelllinien	13
Tab. 3: Puffer-, Färbe- und Fixierlösungen.....	14
Tab. 4: Reagenzien	15
Tab. 5: Primäre Antikörper.....	16
Tab. 6: Sekundäre Antikörper	17
Tab. 7: Medien für Zellkulturen	17
Tab. 8: Kits.....	17
Tab. 9: Geräte und anderes Zubehör	18
Tab. 10: Verbrauchsmaterialien	19
Tab. 11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	26
Tab. 12: Anteil CD133-positiver Zellen in % in mit TMZ und/oder Imatinib behandelten Kulturen	46
Tab. 13: Anteil CD140a-positiver Zellen in % in mit TMZ und/oder Imatinib behandelten Kulturen	47
Tab. 14: Expression von PDGFR- α und Anteile an CD133- und CD140a-positiven Zellen in den SGLC-Mutterkulturen und Klonen.....	104
Tab. 15: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1371 cl 2.....	111
Tab. 16: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1371 cl 3.....	112
Tab. 17: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 1.....	113
Tab. 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 3.....	114
Tab. 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 7.....	115
Tab. 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 9.....	116
Tab. 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 2.....	117
Tab. 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 4.....	118
Tab. 23: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 6.....	119
Tab. 24: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 7.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Expression von Nestin und PDGFR- α in den T1522 Klonen	31
Abb. 2: Expression von Nestin und PDGFR- α in dem T1522 Klon cl 10.....	32
Abb. 3: Phänotypisierung der T1586 Klone im Vergleich zur T1586 Mutterkultur.....	33
Abb. 4: Anteil der CD133-positiven und CD140a-positiven Zellen in Kulturen der untersuchten Klone.....	35
Abb. 5: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung von T1371 cl 2, T1522 cl 3 und T1586 cl 7.....	37
Abb. 6: Durchflusszytometrie der T1442 Mutterkultur.	38
Abb. 7: Durchflusszytometrie der T1371 Zelllinie.....	39
Abb. 8: Durchflusszytometrie der T1522 Zelllinie.....	41
Abb. 9: Durchflusszytometrie der T1586 Zelllinie.....	43
Abb. 10: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α und β in der T1442 Mutterkultur der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots	49
Abb. 11: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots	50
Abb. 12: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots.....	52

Abb. 13: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in der T1586 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots	53
Abb. 14: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in der T1371 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots	55
Abb. 15: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots.....	56
Abb. 16: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots	58
Abb. 17: Beispielhafte Westernblots von Sox-2 aus T1371- und T1522 Klonen, sowie der T1586-Mutterkultur und abgeleiteten T1586 Klonen	59
Abb. 18: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1442 Mutterkultur..	60
Abb. 19: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen	60
Abb. 20: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in den T1522 Klonen.....	61
Abb. 21: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen	63
Abb. 22: (A) Relative Expression von CD133 in den T1522 Klone der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots.....	64
Abb. 23: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1442 Mutterkultur	66
Abb. 24: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1371 Mutterkultur und T1371 Klonen.....	67
Abb. 25: Expression von CD133 und Sox-2 in den T1522 Klonen	69
Abb. 26: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1586 Mutterkultur und T1586 Klonen.....	70
Abb. 27: BrdU-ELISA der Klone T1371 cl 2 und cl 3.....	71
Abb. 28: BrdU-ELISA der Klone T1522 cl 1, cl 3, cl 7 und cl 9.....	72
Abb. 29: BrdU-ELISA der Klone T1586 cl 2, cl 4, cl 6 und cl 7	74
Abb. 30: (A) Relative Expression von GFAP in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots.....	76
Abb. 31: (A) Relative Expression von GFAP in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots.....	77
Abb. 32: PDGF-AB Gehalt in pg/ml im Zellkulturmedium nach Behandlung der Zellen	79
Abb. 33: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1442 Mutterkultur.....	104
Abb. 34: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1371 Mutterkultur und Klone	105
Abb. 35: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1371 Klone.....	106
Abb. 36: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1522 Klone.....	107
Abb. 37: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1522 Klone.....	108
Abb. 38: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1586 Mutterkultur und Klone	109
Abb. 39: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1586 Klone.....	110
Abb. 40: Westernblot Analyse der MGMT-Expression in Mutterkulturen und Klonen.....	121
Abb. 41: Vergleich der Expression von PDGFR- α und PDGFR- β in verschiedenen SLGC-Linien	121
Abb. 42: PDGFR- α Expression (Westernblot-Analyse) – (A) T1371 Mutterkultur, T1371 Klone sowie T1442 Mutterkultur; (B) T1522 Klone; (C) T1586 Mutterkultur und T1586 Klone	122

Abb. 43: PDGFR- β -Detektion (Westernblot-Analyse) – (A) T1371 Mutterkultur, T1371 Klone sowie T1442 Mutterkultur; (B) T1522 Klone	122
Abb. 44: Expression von Nestin und Sox-2 in Kulturen von T1442 mc, T1371 Klon cl 16, T1522 Klon cl 9 und cl 10, T1586 mc und T1586 Klon cl 2 und cl 4.....	123
Abb. 45: Immunzytochemische Analyse der PDGFR- α -Expression in den T1522 Klonen cl 1 und cl 7	124

1 Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Die Krebsentstehung ist ein komplexer Prozess, der bis heute nicht vollständig verstanden ist. Einige auslösende Faktoren sind bekannt, wie zum Beispiel der Kontakt mit ionisierender Strahlung und bestimmte genetische Prädispositionen (Ostrom et al., 2014).

Hanahan und Weinberg fassen in "The hallmarks of cancer: The next generation 2011" Merkmale von Krebszellen zusammen. So trägt die Unabhängigkeit von wachstumsfördernden Signalen und die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen zur unkontrollierten Proliferation der Krebszellen bei (Hanahan und Weinberg, 2011). Zudem zeichnen sich Krebszellen durch die Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion, Immortalität und die Vermeidung von Apoptose aus. Invasives Wachstum und Metastasierung sind weitere Merkmale von Tumorzellen. Weitere Eigenschaften sind die Umprogrammierung des Energiemetabolismus, um eine effizientere Versorgung der Tumorzellen zu ermöglichen sowie die Fähigkeit von Krebszellen, sich dem Angriff des Immunsystems entziehen zu können. (Hanahan und Weinberg, 2011)

Eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielen die sogenannten Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene (Wang et al., 2018). So sind Proto-Onkogene Gene, die einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und Zellüberleben haben. Kommt es durch sogenannte *gain-of-function* Mutationen zu einer Aktivierung und/oder Deregulierung, tragen sie zur Krebsentstehung bei (Lee und Muller, 2010). Tumorsuppressor-Gene spielen bei der Verhinderung von Tumoren eine Rolle, zum Beispiel über Hemmung der Zellteilung oder die Apoptoseinduktion (Wang et al., 2018). *Loss-of-function* Mutationen führen zu einem funktionellen Ausfall des Tumorsuppressors; dabei ist der Ausfall eines Allels nicht ausreichend, um die Funktion des Tumorsuppressors aufzuheben (Lee und Muller, 2010). Bekannte Tumorsuppressor-Gene sind zum Beispiel BRCA1 und BRCA2 sowie Tp53, RB und PTEN (Sherr, 2004). Dabei kodieren die beiden Tumorsuppressoren RB und Tp53 für Proteine, die zentrale Stellungen in der Zellzyklusregulation einnehmen; Tp53 und RB sind Proteine, die an den sogenannten *checkpoints* im Zellzyklus aktiv sind, aber auch Seneszenz und Apoptoseprogramme aktivieren können (Hanahan und Weinberg, 2011).

1.2 Maligne neuroepitheliale Gehirntumoren

Über 81 % der primären intrakraniellen Tumoren sind Gliome, zu denen auch das Glioblastoma multiforme (GBM) und das Gliosarkom zählen; GBMs machen etwa 45 % aller Gliome aus (Ostrom et al., 2014). Aufgrund ihrer hohen Malignität und ihres schnellen Krankheitsverlaufs werden GBMs als Grad IV Tumoren klassifiziert (Norden und Wen, 2006). Dabei gelten ein Alter unter 50 Jahren

bei Diagnosestellung, die Durchführung einer Tumoresektion und eine adjuvante Radiotherapie als positive Kriterien hinsichtlich der Überlebensdauer (Kozak et al., 2009).

Die Ätiologie der Gliome ist immer noch umstritten. Bewiesen wurde nur, dass ionisierende Strahlung sowie bestimmte vererbte Syndrome, wie z.B. das Li Fraumeni Syndrom, bei dem Keimbahnmutationen von Tp53 vorliegen, mit einem erhöhten Risiko für die Glioblastomentwicklung einhergehen (Qualmann et al., 2015). Weiterhin sind atopische Erkrankungen mit einem verminderten Risiko für Glioblastomentstehung assoziiert (Ostrom et al., 2014). Zudem werden andere Auslöser wie häufiger Mobiltelefongebrauch diskutiert. Um die Bedeutung der genannten Faktoren abschließend klären zu können, werden weitere Studien nötig sein (Ostrom et al., 2014).

Als Ursprungszellen, aus denen sich Gliome entwickeln können, werden neurale Stammzellen, neurale oder gliale Progenitorzellen sowie Astrozyten und Oligodendrozyten angesehen (Van Meir et al., 2010). Die genaue Ursprungszelle der Gliome ist weiterhin unklar (Azzarelli et al., 2018). Man geht jedoch davon aus, dass differenzierte Zellen resistenter gegenüber einer malignen Transformation sind, wobei im Mausmodell auch ausgereifte Neuronen als Ursprungszelle von Gliomen nachgewiesen werden konnten (Azzarelli et al., 2018).

Die WHO (Weltgesundheitsorganisation) hat 2016 die überarbeitete vierte Auflage der „WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems“ veröffentlicht. Neben den rein histopathologischen Kennzeichen wurden darin auch molekularbiologische und molekulargenetische Erkenntnisse berücksichtigt. Die vorgeschlagene, neue Unterteilung der Gliome erfolgt anhand des IDH-Status (Isocitrat Dehydrogenase 1/2) in IDH-Wildtyp, IDH-Mutation und nicht klassifizierte Gliome, bei denen keine ausreichende Testung möglich war (Louis et al., 2016). Klinisch werden Glioblastome in primäre und sekundäre GBMs eingeteilt, wobei die primären GBMs hauptsächlich den IDH-Wildtyp aufweisen und bei sekundären Glioblastomen größtenteils eine IDH-Mutation vorliegt (Ohgaki und Kleihues, 2013; Louis et al., 2016). Primäre GBMs entstehen de novo, während sich die sekundären GBMs meist aus astrozytischen, neuroepithelialen Tumoren des WHO Grades II und III entwickeln (Miller und Perry, 2007). Nach der neuen Klassifizierung werden GBMs mit einem IDH-Wildtyp weiter in das Riesenzell-Glioblastom, das Gliosarkom und das Epitheloide Glioblastom unterteilt (Chen et al., 2017).

Verhaak und Kollegen (2010) unterscheiden vier verschiedene Subtypen des Glioblastoms anhand von molekularen Veränderungen. Sie definieren den klassischen, mesenchymalen, proneuralen und neuronalen GBM-Subtyp. Dabei sind PDGFR- α (*platelet-derived growth factor receptor*) Anomalien, IDH1- und Tp53- Mutationen vor allem mit dem proneuralen GBM-Subtyp assoziiert; diesen findet

man häufig bei sekundären Glioblastomen und jungen Patienten (Verhaak et al., 2010). Der klassische GBM-Subtyp weist Amplifikationen im Chromosom 7 und Deletionen im Chromosom 10 auf. Dazu wurden Amplifikationen des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Gens und homozygote Deletionen im Ink4a/ARF Locus identifiziert, dagegen fehlen hier Anomalien der Tumorsuppressoren Tp53 und NF1 (Neurofibromin 1) und der Proteine PDGFR- α oder IDH1 (Verhaak et al., 2010). Eine hohe Expression von CHI3L1 (*chitinase 3-like1*) und der Rezeptortyrosinkinase MET (*hepatocyte growth factor receptor*) (Phillips et al., 2006) sowie NF1-Mutationen und niedrige Level von NF1 mRNA zeichnen den mesenchymalen GBM-Subtyp aus; zudem konnten Schwannzellmarker wie S100A und mikrogliale Marker nachgewiesen werden (Verhaak et al., 2010). Die geringsten Unterschiede zum normalen Gehirnparenchym weist der neurale GBM-Subtyp auf; die Zellen dieses Subtypen ähneln differenzierten neuronalen Zellen (Verhaak et al., 2010).

Tab. 1: Unterschiede zwischen IDH-Wildtyp Glioblastomen und IDH-mutierten Glioblastomen

	IDH-Wildtyp Glioblastom	IDH-mutiertes Glioblastom
Synonym	primäres Glioblastom, IDH-Wildtyp	sekundäres Glioblastom, IDH-mutiert
Vorgänger Läsion	nicht identifizierbar; de novo entwickelt	diffuses Astrozytom, anaplastisches Astrozytom
Verteilung	~ 90 % aller Glioblastome	~ 10 % aller Glioblastome
Mittleres Alter bei Diagnosestellung	~ 62 Jahre	~ 44 Jahre
Verteilung männlich/weiblich	1,42:1	1,05:1
Operation und Strahlentherapie	Mittleres Gesamtüberleben 9,9 Monate	Mittleres Gesamtüberleben 24 Monate
Operation mit kombinierter Strahlen- und Chemotherapie	Mittleres Gesamtüberleben 15 Monate	Mittleres Gesamtüberleben 31 Monate
Lokalisation	supratentoriell	vorrangig frontal
Nekrose	ausgeprägt	gering
TERT Promotor Mutationen	72 %	26 %
Tp53 Mutationen	27 %	81 %
ATRX Mutationen	in Ausnahmefällen	71 %
EGFR Amplifikationen	35 %	in Ausnahmefällen
PTEN Mutationen	24 %	in Ausnahmefällen

IDH, Isocitratdehydrogenase 1/2; TERT, *telomerase reverse transcriptase*; Tp53, Tumor Protein p53; ATRX, *ATP-dependent helicase ATRX*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; PTEN, phosphatase and tensin homolog; Quelle: Louis et al., 2016, modifiziert.

Die Glioblastome mit einem IDH-Wildtyp und IDH-Mutation unterscheiden sich in ihrer Auftretenswahrscheinlichkeit, aber auch hinsichtlich ihrer Prognose und den tumorinduzierenden Mutationen (Tab. 1).

Wie in Tab. 1 zugeordnet, wird das Gliosarkom meist als eine seltene Variante des IDH-Wildtyp Glioblastoms angesehen (Louis et al., 2016). Dabei zählen nur 1,8 – 2,8 % der Glioblastome zu den Gliosarkomen (Lutterbach et al., 2001). Gliosarkome weisen eine gliale Komponente und eine mesenchymale Komponente auf, wobei bei der glialen Komponente GFAP (Saures Gliafaserprotein) nachgewiesen werden kann (Miller und Perry, 2007). Dabei kann die mesenchymale Komponente sehr verschiedene Zelltypen aufweisen, die sich von Fibroblasten-, Knorpel-, Knochen- und Muskelzellen ableiten könnten (Han et al., 2010). Im Gegensatz zum GBM, welches kaum extrakranielle Metastasen aufweist, neigt das Gliosarkom zur Metastasierung (Han et al., 2010). Eine häufige Lokalisation des Gliosarkoms ist der Temporallappen (Kozak et al., 2009). Statistisch werden bei Gliosarkompatienten häufiger als bei Glioblastompatienten Tumorresektionen vorgenommen (Kozak et al., 2009). Wie auch beim Glioblastom hat das Alter bei Diagnosestellung, das Resektionsausmaß und die adjuvante Radiotherapie einen Einfluss auf die Überlebensdauer bei Gliosarkompatienten (Kozak et al., 2009). Dabei ist die Prognose im Vergleich zum Glioblastom bei identischer Therapie geringfügig schlechter (Kozak et al., 2009; Han et al., 2010). Eine abschließende Beurteilung zur Ätiologie und Optimierung der Therapie des Gliosarkoms wird erst nach weiteren Studien möglich sein.

1.3 Mutationen und deregulierte Signalwege in Glioblastomen

Die am häufigsten in GBMs deregulierten Signalwege sind die proliferativen Signalwege und der RB-Seneszenz-Signalweg (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Nakada et al., 2011; Huse und Holland, 2010). Bei 74 % der Fälle waren alle drei Signalwege betroffen (Nakada et al., 2011). Proliferation kann nach Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase über den RAS/MAP-Kinase Signalweg oder über den PI3Kinase/AKT/mTOR-Signalweg erfolgen (Huse und Holland, 2010). Dabei fungieren die Tumorsuppressoren NF1 und PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) als Inhibitoren des RAS/MAPK- bzw. PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs (Huse und Holland, 2010). Sowohl der Tp53- als auch der RB-Signalweg stehen in der Hierarchie unterhalb der Proliferation fördernden Signalwege und regulieren den Zellzyklus (Huse und Holland, 2010; Nakada et al., 2011). Die Aktivierung der Kinasen PI3K/AKT und MAPK(p44/p42) über das kleine G-Protein RAS könnte eine Rolle in der Chemo- und Radioresistenz spielen (Chakravati et al., 2002).

Die folgenden Betrachtungen konzentrieren sich auf PDGFR- α und PTEN, deren Expression in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Diese beiden Proteine haben eine zentrale Bedeutung für

die proliferativen Signalwege (Huse und Holland, 2010, Nakada et al., 2011). In 13% der GBMs konnten PDGFR- α Amplifikationen nachgewiesen werden; bei 36 % der Fälle wurden homozygote Deletionen und inaktivierende Mutationen von PTEN beobachtet (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Sowohl die PDGFR- α Amplifikationen als auch die PTEN-Deletion führen zu vermehrter Proliferation sowie einem zu gesteigertem Überleben der Tumorzellen (Huse und Holland, 2010, Nakada et al., 2011).

PTEN ist ein Tumorsuppressor, der häufig in Glioblastomen verändert ist (Tab. 1). Wie bereits beschrieben wirkt das Protein PTEN auf den PI3K/AKT/mTOR Signalweg, indem es über die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)PIP₃) die PDK (*3-phosphoinositide-dependent kinase*) und AKT inhibiert (Huse und Holland, 2010; Nakada et al., 2011).

Die PDGF-Rezeptoren α und β sind Rezeptortyrosinkinasen, die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden. Das Gen für den PDGFR α ist auf Chromosom 4q12 lokalisiert, während das PDGFR β -Gen auf Chromosom 5 lokalisiert ist (Ostman et al., 2001). In Anwesenheit von PDGF dimerisieren zwei PDGFR-Rezeptoren, wobei sich die Zusammensetzung des Liganden-aktivierten Dimers ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$ oder $\alpha\beta$) nach der Isoform des PDGF richtet (Ostman et al., 2001). So können PDGF-AA Homodimere, PDGF-BB Homodimere, PDGF-CC Homodimere und PDGF-AB Heterodimere an PDGFR- α Homodimere binden, während an PDGFR- $\alpha\beta$ Heterodimere nur PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD binden (Ostman et al., 2001; Heldin und Lennartsson, 2013). PDGFR- β Homodimere können nur PDGF-BB und PDGF-DD binden (Ostman et al., 2001; Bergsten et al., 2001). Weiterhin können andere Rezeptoren wie z.B. der EGF-Rezeptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder FGFR-1 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor) mit den PDGF-Rezeptoren interagieren und so die Signalgebung über den PDGF-Rezeptor beeinflussen (Heldin und Lennartsson, 2013). Es sind verschiedene Signalwege bekannt, über die die PDGF-Rezeptoren wirken. So gehören unter anderem die Ras-MAPK-, PI3K-, und PLC- γ -Signalwege dazu (Andrae et al., 2008; Heldin und Westermark, 1999). Auch STAT-Proteine können an die PDGF-Rezeptoren binden (Heldin und Westermark, 1999). Über die PDGF-Rezeptoren kann sowohl das Zellwachstum als auch das Zellüberleben und die Zellmigration gesteuert werden (Heldin und Lennartsson, 2013). So tragen sie im gesunden Gewebe zur Homöostase bei, in neoplastisch transformierten Zellen sind dagegen häufig fehlregulierte PDGF-Rezeptoren vorhanden (Heldin und Lennartsson, 2013).

In Glioblastomen konnten sowohl Amplifikationen des PDGFR- α Gens nachgewiesen werden als auch aktivierende Mutationen des PDGFR- α (Puputti et al., 2006, Clarke et al., 2003). Erhöhte PDGF-AA-Level können Gliome induzieren, wobei dieser Effekt durch PTEN- oder p53-Verlust verstärkt werden konnte (Ozawa et al., 2014). PDGFR- β spielt möglicherweise auch eine Rolle für den Erhalt

des Stammzellstatus, die Selbsterneuerung und das Überleben der SLGCs (Stammzellähnliche Gliomzellen) (Kim et al., 2012), worauf in Kapitel 1.7 eingegangen wird.

1.4 Die Glioblastomtherapie

Bisher existiert keine kurative Therapie für Glioblastompatienten. Auch die Standardtherapie ist eine palliative Therapie, die nur eine geringe Lebensverlängerung bietet (van Meir et al., 2010, Norden und Wen, 2006). Gemäß der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zum Thema Gliome von Februar 2021 besteht die Standardtherapie des Glioblastoms mit IDH-Wildtyp für Patienten in gutem Allgemeinzustand aus der Resektion/Biopsie des Tumors mit anschließender Strahlentherapie sowie zeitgleicher und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (Wick et al., 2021). Die Behandlung von Glioblastomen mit nachgewiesener IDH-Mutation erfolgt analog dazu, jedoch mit mehr Zyklen adjuvanter Chemotherapie (Wick et al., 2021). Aktuell empfiehlt die Leitlinie keine standardmäßige Anpassung der Therapie an den MGMT-Promotorstatus (Wick et al., 2021).

Nach operativer Entfernung des Tumors und kombinierter Radiochemotherapie liegt die mittlere Gesamtüberlebensdauer beim IDH-Wildtyp Glioblastom bei nur 15 Monaten (siehe Tab. 1). Zurzeit wird deshalb intensiv an neuen Therapieoptionen geforscht. Man erhofft sich durch neue gezielte Behandlungen, sogenannte „targeted therapies“, die Entwicklung von Immuntherapien oder auch nanotechnologischen Verfahren eine deutliche Verbesserung der Überlebenszeiten (Wick et al., 2018; Michael et al., 2018).

Wie oben beschrieben wird in der Standardchemotherapie des Glioblastoms Temozolomid (3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-carboxamid), abgekürzt als TMZ, eingesetzt. TMZ zählt zu den monofunktionellen alkylierenden Agenzien und wirkt über Methylierungen der DNA (Desoxyribonukleinsäure) (Casorelli et al., 2012). TMZ ist ein Prodrug; bei physiologischem pH-Wert wird es im Körper nichtenzymatisch zu MTIC (5-(3-N-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid) umgewandelt (Beier et al., 2011). MTIC wird dann zu AIC (5-aminoimidazol-4-carboxamid) und Methylhydrazin hydrolysiert (Lee, 2016).

TMZ ist lipophil und kann die Bluthirnschranke überwinden (Lee, 2016); die im Tumorparenchym vorliegende TMZ-Konzentration ist nicht bekannt. In PET Studien sind Konzentrationen zwischen 10 µM und 18 µM im normalen Gehirnparenchym gemessen worden; dabei wurde jedoch nicht zwischen intravasalem und interstitiellem TMZ unterschieden (Rosso et al., 2009). Im Blutplasma liegen die TMZ-Konzentrationen zwischen 27 µM und 50 µM (Brada et al., 1999).

1.5 Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib

Da die erhöhte Expression von PDGF und die Deregulierung der PDGF-Rezeptoren in Glioblastomen nachgewiesen werden konnte (Heldin et al., 2013), könnten PDGF-Rezeptor-Inhibitoren wie Imatinib als mögliche Therapieoption in Betracht gezogen werden.

Imatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor und wurde ursprünglich als Therapie für BCR-ABL-positive Leukämieformen entwickelt (Buchdunger et al., 2002). Man nimmt an, dass die Inhibierung der Tyrosinkinasen über eine kompetitive Hemmung an der ATP-Bindungsstelle erfolgt. Dabei inhibiert Imatinib nicht nur die cABL-Kinase, sondern auch andere Tyrosinkinasen mit Kinase-Insert, darunter beide PDGF-Rezeptoren (Dong et al., 2011). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) für die PDGF-Rezeptoren liegt bei 0,1 µM (Buchdunger et al., 2002; Dong et al., 2011).

Bei *in vitro* Versuchen mit kultivierten GBM-Zellen wurden unterschiedliche Beobachtungen zur Wirkung und Effektivität von Imatinib gemacht. So gab es Hinweise darauf, dass Imatinib in der Konzentration von 1 µM bei Untertypen von hochgradigen Gliomen wachstumshemmend wirkt, vor allem auf solche, die vermehrt PDGF-Rezeptoren exprimieren (Hägerstrand et al., 2006). Kilic et al. (2000) konnten zeigen, dass Imatinib bei Zellen, die autokrine Loops aufweisen, das Wachstum, die Tumorbildung und die autokrine Stimulierung über PDGF-Rezeptoren hemmt. Dabei wirkte Imatinib auf die untersuchten Zelllinien eher zytostatisch als zytotoxisch (Kilic et al., 2000). Im Mausmodell wurde beobachtet, dass Imatinib die intrakranielle Tumorbildung hemmt (Kilic et al., 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass die gezielte Inhibierung von PDGFR-β die Erneuerung von GBM-Zellen einschränkte sowie ein vermindertes Tumorstadium und ein reduziertes invasives Wachstum zur Folge hatte (Kim et al., 2012). Bei den etablierten Glioblastomzelllinien U-87 MG, U-118 MG und U-373 MG wies Imatinib bei Konzentrationen bis zu 10 µM keine antiproliferative Aktivität auf (Gross et al., 2006).

Während die oben beschriebenen *in vitro* Versuche mit etablierten GBM-Zelllinien zum Teil erfolgversprechende Ergebnisse lieferten, konnten diese in Studien mit Patienten nicht bestätigt werden. Verschiedene klinische Studien ergaben, dass Imatinib in Konzentrationen zwischen 0,21-4,31 µg/g im Gehirnparenchym nachweisbar war (Holdhoff et al., 2010) und auch die Verträglichkeit von Imatinib in Kombination mit TMZ konnte belegt werden (Reardon et al., 2008). Eine Analyse verschiedener Phase II und III Studien zur Wirksamkeit von Imatinib sowie Imatinib in Kombination mit Hydroxurea auf Glioblastome ergab keinen Vorteil der adjuvanten Imatinib-Therapie relativ zur Standardtherapie (De Witt Hamer, 2010). Es wird vermutet, dass die Ergebnisse der Behandlungen mit PDGF-Rezeptor Antagonisten deshalb keinen Fortschritt erbrachten, weil eine Vielzahl an verschiedenen Mutationen in den Tumoren vorlag und eine Einflussnahme auf den PDGF-Rezeptor allein nicht ausreichend war (Heldin und Lennartsson, 2013).

1.6 Ursachen der Therapieresistenz

Als Ursache für die schlechte Prognose der Glioblastompatienten wird eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Standard-GBM-Therapie vermutet (Jiapaer et al., 2018). Eine Radioresistenz von GBM-Zellen wurde *in vitro* und im Mausmodell belegt (Bao et al., 2006). Dabei erwies sich die Zellpopulation mit einer Expression des Markers CD133(Prominin-1) deutlich resistenter als die CD133-negative Zellpopulation. Die höhere Resistenz war mit einer effizienteren Aktivierung der in die DNA-Schadensantwort involvierten Signalkaskaden assoziiert (Bao et al., 2006)

Bei der TMZ-Resistenz werden zwei mögliche Szenarien diskutiert. Zum einen eine primäre Resistenz des Tumors gegen TMZ, zum anderen könnten die Tumorzellen die TMZ-Resistenz auch erst im Verlauf der Therapie erwerben (Lee, 2016). Weiterhin beruht die TMZ-Resistenz auf verschiedenen Ursachen, darunter molekulare und zelluläre sowie strukturelle Gegebenheiten wie die Blut-Hirn-Schranke (Beier et al., 2011). Die TMZ-Resistenz wird am besten durch ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen erklärt. So wirken sich Veränderungen in DNA-Reparatursystemen wie dem *mismatch-repair* (MMR), der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und der Aktivität der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) auf die TMZ-Empfindlichkeit aus (Jiapaer et al., 2018). Wie oben beschrieben kommt es durch TMZ zu Methylierungen der DNA, wobei die Methylierung der Guanosylreste in der O6-Position oder N7-Position oder des Adenosylrestes in der N3-Position für die zytotoxische Wirkung entscheidend ist (Beier et al., 2011). Die MMR sorgt dafür, dass die fehlgepaarte Base entfernt wird und es im Verlauf zur Apoptose der Zelle kommt (Jiapaer et al., 2018). Die O6-Methylguanin-Läsion kann durch MGMT repariert werden (Jiapaer et al., 2018). Dabei ist MGMT ein Suizid-Enzym, das heißt, das Enzym wird durch die Reaktion inaktiviert (Liu und Gerson, 2006). MGMT kann auch durch O⁶-Benzylguanin inhibiert werden, wodurch eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber alkylierenden Agenzien möglich ist (Liu und Gerson, 2006). Eine im Vergleich untergeordnete Rolle spielt die BER, die z.B. die modifizierten Basen 7-Methylguanin und 3-Methyladenin entfernt (Casorelli et al., 2012; Jiapaer et al., 2018). Eine Funktionsstörung dieser Reparatursysteme hat unterschiedliche Folgen. So führt ein Ausfall der MMR zu erhöhter TMZ-Resistenz, während die Methylierung des MGMT-Promotors und der Ausfall der BER zu erhöhter TMZ-Sensitivität führen (Jiapaer et al., 2018). Wie oben beschrieben, wurde die MGMT-Status adaptierte Therapie bereits in die Therapieempfehlung für ältere Patienten aufgenommen.

Eine weitere Möglichkeit zur Manifestation einer TMZ-Resistenz ist der Efflux von TMZ über sogenannte ABC (*ATP-binding-cassette*) Transporter (Beier et al., 2011). Zu diesen gehören die *multidrug resistance-related* Proteine, die in Glioblastomen nachgewiesen wurden (Beier et al., 2011). Besonderes Interesse wurde dem ABC-Transporter ABCG₂ (ATP-binding cassette sub-family G member 2) zu Teil. Dieser kann aktiv zytotoxische Substanzen aus der Zelle herausschleusen (Emery et al.,

2017). ABCG2 kommt in hohem Maße in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke vor, außerdem konnten hohe mRNA Level in CD133-positiven Glioblastomzellen nachgewiesen werden (Emery et al., 2017). Zudem könnte die ABCG2-Expression mit dem Stammzellcharakter in einer Subpopulation von GBM-Zellen korrelieren (Wee et al., 2016; Emery et al., 2017).

Als weiterer Resistenzmechanismus wird die Autophagozytose diskutiert (Jiapaer et al., 2018). Durch Autophagozytose kann in frühen Stadien die Tumorentstehung verhindert werden, andererseits ist die Autophagozytose ein Mechanismus, der Krebszellen vor zytotoxischem Stress schützen kann (Yang et al., 2011). So konnte nachgewiesen werden, dass die Chemotherapeutika TMZ und Imatinib beide die Autophagozytose induzieren können (Kanzawa et al., 2004; Shingu et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung in einem späten Stadium des Autophagozytoseprozesses zur Apoptose führte, während bei der Hemmung der Autophagozytose zu einem frühen Zeitpunkt die Zytotoxizität der Chemotherapeutika vermindert wurde (Kanzawa et al., 2004; Shingu et al., 2009).

Die oben beschriebenen Vorgänge weisen auf eine Heterogenität der GBM-Zellen hinsichtlich der Sensitivität gegenüber der Radio- und Chemotherapie hin. Dabei spielen molekulare, aber auch zelluläre Unterschiede eine Rolle. So scheinen insbesondere die sogenannten Tumorstammzellen, die maßgeblich zu zellulärer Heterogenität von GBM beitragen, eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Strahlen- und Chemoresistenz der Glioblastome auszuüben (Seymour et al., 2015; Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2014).

1.7 Bedeutung und Eigenschaften von Gliomstammzellen

Es existieren zwei verschiedene Theorien, um die zelluläre Heterogenität von Tumoren zu erklären. Die klonale Evolutionstheorie basiert darauf, dass sich die Krebszellen aus einer einzigen mutierten Zelle entwickeln und diese Krebszellen im Verlauf weitere Mutationen akquirieren und sich so verschiedene Subpopulationen von GBM-Zellen entwickeln (Campbell und Polyak, 2007). Die zweite Theorie geht davon aus, dass im Tumor sogenannte Tumorstammzellen vorkommen, die das Potential zur unbegrenzten Selbsterneuerung und Differenzierung haben (Campbell und Polyak, 2007). Tumorzellen mit Eigenschaften von Stammzellen wurden mittlerweile in GBMs und Gliosarkomen identifiziert (Übersicht in Schonberg et al., 2014; Choschick et al., 2014; Raju et al., 2015). In der Literatur werden verschiedene Namen für Tumorstammzellen aus Gliomen verwendet: darunter *brain cancer-propagating cells* (van Meir et al., 2010), *glioma stem cells* (Schonberg et al., 2014), *cancer stem-like cells* (Seymour et al., 2015) und *stem-like glioma cells* (SLGC) (Raju et al., 2015). Im Weiteren werden die Glioblastomstammzellen als SLGC bezeichnet, da es in Gliomen stammzellähnliche Zellen auf verschiedenen Differenzierungsniveaus gibt (Chen et al., 2010; Raju et al., 2015).

Der Ursprung der SLGCs ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass diese sich aus neuronalen Stammzellen oder Progenitorzellen des adulten Gehirns entwickeln können. Aber auch die Entwicklung aus differenzierten Astrozyten oder Oligodendrozyten, die durch Mutationen und/oder epigenetisch Veränderungen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung gewinnen, wird diskutiert (Schonberg et al., 2014; Campell und Polyak, 2007; Guo et al., 2011; Huse und Holland, 2010).

Für Glioblastomstammzellen wurden verschiedene Marker beschrieben, der bekannteste ist CD133/Prominin-1 (Schonberg et al., 2014). Dies beruht darauf, dass Singh und Kollegen im Jahr 2004 erstmals mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung Tumorstammzellen aus malignen Hirntumoren isolierten (Singh et al., 2004). Später wurde nachgewiesen, dass es mindestens drei Differenzierungsstufen von GBM-Zellen mit Stammzeleigenschaften gibt, die sich hinsichtlich ihrer CD133-Expression unterscheiden (Chen et al., 2010). Diese drei Typen sind zueinander hierarchisch angeordnet (Chen et al., 2010): Die Typ I-Zelle ist eine CD133-negative Zelle; wenn sich diese weiter differenziert, werden daraus CD133-positive Typ II-Zellen. Die Typ II-Zelle differenziert in die am weitesten differenzierte Typ III-Zelle, die wiederum CD133-negativ ist. Typ III-Zellen können nur zu CD133-negativen Zellen differenzieren und zeigen eine geringe Proliferation. Sowohl die Typ I-, als auch die Typ II- und Typ III-Zelle kann sich selbst erneuern und generiert orthotope Tumoren in SCID- (engl. Schwerer kombinierter Immundefekt) Mäusen. Weiterhin exprimieren alle drei SLGC Typen den Transkriptionsfaktor Sox-2 und das Intermediärfilament Nestin. Dabei ist die Sox-2-Expression vor allem mit Typ I- und Typ II-Stammzellen assoziiert (Chen et al., 2010). Auch hinsichtlich der Aggressivität der in SCID-Mäusen beobachteten orthotopen Tumoren unterschieden sich Typ I-, Typ II-, und Typ III-Zellen. So entstehen aus xenotransplantierten Typ-III-Zellen kleine Tumoren mit geringer Aggressivität. Die Aggressivität der orthotopen Tumoren nimmt mit steigendem Grad an *stemness*, also von der Typ II- zu Typ I- Zelle, zu (Chen et al., 2010).

Das Intermediärfilament Nestin und der Transskriptionsfaktor Sox-2 werden in Typ I-, Typ II-, und Typ III-Zellen exprimiert und sind gut als SLGC-assoziierte Marker akzeptiert (Zhang et al., 2008; Guo et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor Sox-2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Selbsterneuerung und Pluripotenz in SLGCs, adulten neuronalen Stammzellen, aber auch menschlichen embryonalen Stammzellen (Fong et al., 2008). Es wurde beobachtet, dass bei SLGCs die Abwesenheit von Sox-2 zu einem Proliferationsstopp führte (Gangemi et al., 2009). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen der Imatinibresistenz von Glioblastomzellen und der Sox-2-Expression postuliert (Hägerstrand et al., 2011). Zudem wurde beobachtet, dass die Sox-2-Expression umso höher war, je höhergradig das Gliom war (Guo et al., 2011). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Signalgebung über PDGF-Rezeptoren eine Rolle in der Aufrechterhaltung der *stemness* spielt (Dong et al., 2012).

Das Intermediärfilament GFAP (Saures Gliafaserprotein) wird in Astrozyten und nicht-myelinisierenden Schwannzellen exprimiert (Yang und Wang, 2015). GFAP ist aber auch der Marker der adulten neuralen Stammzelle in der subventrikulären Zone und subgranulären Zone (Vescovi et al., 2006). Die meisten SLGC-Linien sind GFAP-negativ, einige jedoch auch GFAP-positiv (Choschzick et al., 2014; Raju et al., 2015). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die GFAP-positiven SLGCs von adulten neuralen Stammzellen ableiten. Wenn die GFAP-Expression in SLGCs hochreguliert wird, kann dies ein Hinweis auf eine Differenzierung in Glia-ähnliche Zellen sein (Dong et al., 2012).

Für Stammzellen wurden sogenannte Stammzellnischen beschrieben; das sind Kompartimente innerhalb eines Gewebes, in denen optimale Bedingungen für die Stammzellen herrschen (Jones und Wager, 2008). Für die SLGCs sind diese Nischen in pallisadenartigen Bereichen oder perivaskulär lokalisiert (Calabrese et al., 2007; Lathia et al., 2015). Dabei können SLGCs aktiv zur Nischenbildung beitragen, indem sie in Endothelzellen differenzieren und die Angiogenese stimulieren (Mei et al., 2017).

1.8 Fragestellung

Wie oben beschrieben, waren klinische Studien zur Behandlung von Glioblastompatienten mit Imatinib nicht sehr erfolgreich. In diesen wurde jedoch nicht darauf geachtet, ob das therapierte GBM über die Rezeptortyrosinkinasen EGFR, MERTK oder PDGFR- α die proliferationsstimulierenden Signale erhielt.

Die Analysen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass SLGC-Linien aus malignen Gliomen Zellen mit genetischen und/oder epigenetischen Unterschieden enthielten (Diss. E. Hirsland, 2017). Diese Befunde basierten auf Beobachtungen an Zellklonen, die durch *limited dilution assays* aus den SLGC-Mutterkulturen gewonnen wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, wie sich SLGCs mit verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen-Expression unter der Behandlung bzw. Behandlungskombination mit Imatinib und/oder TMZ verhielten. Dazu wurden insgesamt drei Glioblastomstammzelllinien und eine Gliosarkomstammzelllinie sowie mehrere davon abgeleitete Subklone untersucht. Bei den untersuchten Mutterkulturen und Klonen handelte es sich um T1371, T1442, T1522 und T1586. Da im Gegensatz zu T1371 und T1442 die T1522 und T1586 Mutterkulturen und Klone noch nicht charakterisiert waren, wurde von diesen zunächst eine immunzytochemische Phänotypisierung vorgenommen.

Im Vordergrund stand die Frage, ob Imatinib die Wirksamkeit von TMZ in Abhängigkeit vom SLGC-Typ steigern konnte. Es wurde überprüft, ob sich die Sensitivität von Mutterkulturen und Klonen gegenüber Imatinib und/oder TMZ unterschied. Hierzu wurde ein BrdU (Bromdesoxyuridin)-ELISA genutzt, der Rückschlüsse auf die Proliferation der Kulturen erlaubte. Weiterhin wurde überprüft, ob es zu Veränderungen hinsichtlich der zellulären Hierarchie in den behandelten Kulturen kam. Dazu wurde mittels immunzytochemischer Analysen untersucht, ob sich das relative Verhältnis von Typ I- zu Typ II- und Typ III- Zellen in den Kulturen nach der Behandlung veränderte.

Um zu ermitteln, welche Auswirkungen die Behandlungen mit Imatinib auf die PDGF-Signalgebung hatten, wurde einerseits die Expression des PDGFR- α und PDGFR- β bestimmt. Andererseits wurde die PDGF-AB Sekretion mittels ELISA untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Die untersuchten SLGC-Linien wurden aus Tumorproben angelegt, die in der Klinik für Neurochirurgie des UKSH Lübeck gewonnen wurden. Die Tumoren wurden von einem Pathologen nach WHO-Kriterien klassifiziert. Die Patienten wurden über die Verwendung des Tumormaterials für die *in vitro* Zellkulturen und molekularbiologischen Analysen aufgeklärt und erteilten danach das schriftliche Einverständnis für die Verwendung des Gewebematerials. Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck für die Anwendungen vor (Votum 08-070, 27.06.2008).

Aus den Tumor-Mutterkulturen wurden in der Arbeitsgruppe durch *limited dilution assay* einzelne Klone gewonnen. Das Vorgehen wurde in der Dissertation von E. Hirsland (2017) erläutert. Die Klone trugen die gleiche Code-Nummer wie die SLGC-Mutterkultur, die zur Anonymisierung des Tumorgewebes vergeben wurde. Zusätzlich gab die Endung „cl“ und eine Nummer an, um welchen Klon es sich handelte. Der Tp53-Status der Mutterkultur/Klone war durch die Kollegen in der AG ermittelt worden. Zusätzlich wurde in einigen Experimenten, z.B. in der Durchflusszytometrie die etablierte CaCo₂-Zelllinie als Positivkontrolle verwendet.

Tab. 2: Zelllinien

Code-Nummer	MC/Klone	Ursprungstumor	Tp53-Status	PTEN-Status	MGMT-Status
T1371	mc, cl 2, cl 3, cl 15, cl 16	Gliosarkom	Mutiert (R175H)	negativ	u/u
T1442	mc, cl 5*, cl 6*, cl 9*	Glioblastom	Mutiert (N239D)	negativ	m/u
T1522	cl 1, cl 2, cl 3, cl 4, cl 5, cl 7, cl 9, cl 10	Glioblastom	Wildtyp	negativ	m/u
T1586	mc, cl 1, cl 2, cl 4, cl 5, cl 6, cl 7, cl 8	Glioblastom	Wildtyp	negativ	m/u

mc, Mutterkultur; cl, Klon; R175H: Argininrest 175 durch Histidinrest ausgetauscht; N239D: Asparaginrest 239 durch Aspartatrest ausgetauscht, MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; Tp53, Tumor Protein p53; u, unmethylierter MGMT-Promotor; m, methylierter MGMT-Promotor, m/u Mischstatus (C. Zechel, pers. Mitteilung); *, abgestorbene Klone.

Die Klone der T1371 SLGC-Linie wurden vor Beginn der Arbeit angelegt und aus in Flüssigstickstoff gelagerten Kulturen rekultiviert. Die Kulturen der T1442 Klone stellten nach dem Auftauen der Kryo-Präparate das Wachstum ein und konnten daher nicht untersucht werden. Die Klone, die sich von der T1522 bzw. T1586 Mutterkultur ableiteten, befanden sich zu Beginn dieser Arbeit auf dem

Stadium der Expansion in 24- bzw. 6-Lochplatten. Diese Klone wurden expandiert, phänotypisiert und in der Passage 5 oder 6 der Analyse zugeführt.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Puffer-, Färbe- und Fixierlösungen

Name	Zusammensetzung
10 x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 9,2 g Na ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l Aqua bi-dest
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Trizma®-Base, 1 % SDS; pH [8,8] mit konzentrierter HCl eingestellt
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	1 M Trizma®-Base, 1 % SDS; pH [6,8] mit konzentrierter HCl eingestellt
1 x SDS-PAGE Elektrophorese-puffer	25 mM Trizma®-Base, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS
Coomassie-Brilliant-Blau Färbelösung	0,1 % Coomassie R 250, 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol
Coomassie-Entfärber	75 % Essigsäure, 25 % Ethanol
Westernblot-Transferpuffer	48 mM Trizma®-Base, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol
Westernblot-Waschpuffer	1 x PBS, 0,05 % TWEEN 20
Westernblot-Blockingpuffer	1 x PBS, 2 % Trockenmilch
Fixierlösung für ICC	95 % Ethanol, 5 % Eisessig
Waschlösung für BrdU Labeling and Detection Kit III	Waschlösung (Medium/2 % FCS)
Fixierlösung für BrdU-ELISA	70 % Ethanol in 0,5 M HCl
TEN-Puffer	10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH [7,5]
Durchflusszytometrie-Puffer	1 x PBS, 0,5 % FCS, 2 mM EDTA
2 x Laemmli Puffer	125 mM Trizma®-Base (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % Glycerol, 10 % 2 – Mercaptoethanol, 0,002 % Bromethanolblaulösung
JLB-Puffer (pH 8)	50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton-X-100
JLB-Puffer mit PMSF/PIC-Mix	1 ml JLB-Puffer, 0,5 µl PMSF, 2 µl PIC

PBS, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung; SDS, Natriumdodecylsulfat; PAGE, Polyacrylamid-Gelelektrophorese; ICC, Immunzytochemie; BrdU, Bromdesoxyuridin; FCS, Fetales Kälberserum; Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; JLB, *jurkat-lysis-buffer*; PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid; PIC, *protease inhibitor cocktail*.

Tab. 4: Reagenzien

Reagenz	Hersteller/Bezugsquelle
Bradfordreagenz	BioRad, München, Deutschland
0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen™-Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
FcR Blocking Reagent human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
FCS (20 % fetales Kälberserum)	Invitrogen™-Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
DMEM / HAM's F-12	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Gemisch (10 000 IE/ml, 10 mg/ml)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Amphotericin (250 µg/ml)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
BIT 9500 Admixture 100	Pelo Biotech, Martinsried, Deutschland
hu rbFGF (FGF-2)	PromoKine/PromoCell, Heidelberg, Deutschland
hu rEGF	PromoKine/PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fibronectin 1 mg/ml	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
PIC	Roche, Mannheim, Deutschland
PMSF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas/Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Trockenmilch	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Trizma®-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Load 1 (4x)	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Temozolomid	MSD, Haar, Deutschland
Imatinib- Glivec®	Novartis, Nürnberg, Deutschland
CP-673451	Selleck Chemicals, Houston, USA
Na-Azid 2 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Fluoromount-G®	Southern Biotech, Birmingham, USA

EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; FcR, Fc-Rezeptor; FCS, Fetales Kälberserum; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; BIT, *bovine serum albumin-insulin-transferrin*; hu rbFGF, *recombinant human basic fibroblast growth factor*; hu rEGF, *recombinant human epidermal growth factor*; PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid; PIC, *protease inhibitor cocktail*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DMSO, Dimethylsulfoxid.

Tab. 5: Primäre Antikörper

Antikörper (Klon)	Verwendung	Verdünnung	Herkunft	Bezugsquelle
Nestin (#MAB5326)	ICC	1:100	Maus	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
GFAP (#AB5804)	ICC/ WB	1:250/ 1:1000	Kaninchen	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sox-2 (D6D9) XP (#3579)	ICC/ WB	1:100/ 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CD133/1(W6B3C1) (130-092-395)	ICC/ WB	1:20/ 1:100	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PDGFR- α (D1E1E) XP (#3174)	ICC/ WB	1:500/ 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PDGFR- β (C82A3) (#4564)	WB	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
MGMT (clone cIMT3.1)	WB	1:500	Maus	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Aktin (MAB#1501) (pan-Aktin)	WB	1:20000	Maus	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
GAPDH (14C10) MAB (HRP Conjugate) (#3683)	WB	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IgG2b-PE (clone IS6-11E5.11)	FC	1:11	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IgG1-APC (clone IS5-21F5)	FC	1:11	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD133/2-PE (clone 293C3)	FC	1:11	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD140a-APC (clone AP A5)	FC	1:11	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

ICC, Immunzytochemie; WB, Westernblot; FC, Durchflusszytometrie; GFAP, Saures Gliafaserprotein; Sox-2, *sex determining region Y-box 2*; CD133, Prominin-1; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; MAB, monoklonaler Antikörper; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HRP, Meerrettichperoxidase; IgG, Immunglobulin G; PE, Phycoerythrin; APC, Allophycocyanin; CD140a, PDGFR- α .

Tab. 6: Sekundäre Antikörper

Antikörper (Klon)	Verwendung	Verdünnung	Herkunft	Bezugsquelle
Cy3® Cy™ 3-conjugated goat-anti-rabbit IgG (H+L) (109626)	ICC	1:300	Ziege	Jackson Immunotech, West Grove, USA
DyLight® 488 goat-anti-mouse IgG (H+L) (35502)	ICC	1:400	Ziege	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
GARPO: goat F(ab') ₂ Fragment Anti-rabbit IgG (H+L)-Peroxidase	WB	1:5000	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
GAMPO: goat F(ab') ₂ Fragment Anti-mouse IgG (H+L)-Peroxidase	WB	1:5000	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

IgG, Immunglobulin G; ICC, Immunzytochemie; WB, Westernblot; GARPO, Ziege-anti-Kaninchen; GAMPO, Ziege-anti-Maus; F(ab'), Antigenbindendes Fragment; H+L, schwere und leichte Ketten.

Tab. 7: Medien für Zellkulturen

Medien	Bestandteile (Reagenzien, Tab. 4)
CaCO ₂ -Medium	DMEM, 20 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Gemisch
Basis-Medium	DMEM / HAM's F ₁₂ , 2 % L-Glutamin (200 mM), 1 % Penicillin/Streptomycin-Gemisch, 1 % Amphotericin
N-Medium (Standardmedium)	80 % Basismedium, 20 % BIT 9500 Admixture 100, 20 ng/ml hu rb-FGF (FGF-2), 20 ng/ml hu rEGF
Wasch-Medium für BrdU- +ELISA	DMEM/HAM's F ₁₂ , 2 % FCS

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; FCS, Fetales Kälberserum; BIT, *bovine serum albumin-insulin-transferrin*; hu rbFGF: *recombinant human basic fibroblast growth factor*; hu rEGF, *recombinant human epidermal growth factor*; BrdU, Bromdesoxyuridin; ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

Tab. 8: Kits

Kits	Hersteller
BrdU Labeling and Detection Kit III	Roche, Darmstadt, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BRDU (colorimetric)	Roche, Darmstadt, Deutschland
Quantikine® ELISA Human PDGF-AB Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA

BrdU, Bromdesoxyuridin; ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*; PDGF, *platelet-derived growth factor*.

Tab. 9: Geräte und anderes Zubehör

Produkte	Hersteller/Bezugsquelle
Zellkultur-Brutschrank Galaxy 170 S	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock MBT 250	ETG-Entwicklungs- und Technologie GmbH Ilmenau
Asys UVM 340 Microplate-reader	Biochrom, Berlin, Deutschland
Microwin2000 Software	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland
Helios Omega Photometer	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Mikroskop Biozero BZ-8000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Biozero BZ Viewer 9000 Software	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
BD LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Diva Software Version 6.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Summit v4.3 Software	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Protean III SDS-PAGE System	Biorad, München, Deutschland
Transblot SD System	Biorad, München, Deutschland
ChemiDoc XRS	BioRad, München, Deutschland
Quantity One (Version 4.6.2) Software	BioRad, München, Deutschland
DAKO PEN	Dako, Hamburg, Deutschland
Rotina 380 R-Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hereus PICO 17 Microcentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
pH-Meter inoLab® pH 7110	Xylem inc., Rye Brook, USA
AutoKlav Systec VX-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Wärmeschrank T6060	Heraeus, Hannover, Deutschland
Vortexer Genie G-560 E	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Gilson Pipetman® P1000, P200, P20, P10, P2	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
ErgoOne® 8-Kanal Pipette	STARLAB GMBH, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen	Roth®, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 10: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Bezugsquelle
Lab-Tek™ Chamber Slide™ System (8 Kammern)	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Objektträger	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,75 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten steril (20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalplastikröhrchen steril (50 ml, 15 ml, 12 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturgefäße (T75, T25)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-/12-Lochplatte (96 <i>well plate</i> , 12 <i>well plate</i>)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
LABSOLUTE® Einwegküvetten (Halbmikro) 1,6ml	Th.Geyer GMBH&Co KG, Hamburg, Deutschland
Karl Hecht™ Assistent™ Runde Deckgläser, 12 mm Durchmesser	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Nagellack	Rival de Loop, Rossmann, Deutschland
5 ml Rundbodenröhrchen für Durchflusssytopometrie	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran, Porengröße 0,45 µm	BioRad, München, Deutschland
Whatman® Chromatographie-Papiere 3 MM	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

2.3 Zellkultur und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größen T25 und T75 in 4 ml bzw. 10 ml Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Die Glioblastom- und Gliosarkomzelllinien wurden in N-Medium (Tab. 7) vermehrt, die CaCo₂-Zelllinie in CaCo₂-Medium (Tab. 7). Das Medium wurde jeweils montags, mittwochs und freitags gewechselt; dabei wurde die Hälfte des Mediums abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Der Mediumwechsel sowie das Passagieren, Ausplattieren und Behandeln der Zellen erfolgte stets unter der sterilen Sicherheitswerkbank.

Das Passagieren erfolgte nach unterschiedlichen Protokollen und war jeweils an die Wachstumsart der Zellen und die Zelllinie angepasst. Bei den adhärenenten SLGC-Zelllinien und Klonen wurde zuerst das Medium abgegossen. Danach wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS (Tab. 3) gewaschen und unter Zuhilfenahme von Trypsin/EDTA (Tab. 4) und einer Pasteurpipette vom Flaschenboden gelöst. Für die T25 Zellkulturflaschen wurde 1 ml Trypsin/EDTA und für die T75 Zellkulturflaschen 2 ml

Trypsin/EDTA verwendet. Sobald die Zellen ausreichend vereinzelt waren, wurden entsprechend der Trypsin/EDTA-Menge 1 ml oder 2 ml N-Medium zum Stoppen der Trypsinverdauung zugegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde in 12 ml Einmalplastikröhrchen überführt und für 3 min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Passagieren der CaCo₂-Zellen erfolgte analog mit dem Unterschied, dass hier das CaCo₂-Medium eingesetzt wurde. Das weitere Vorgehen entsprach der Behandlung der adhärennten Zellen mit dem Unterschied, dass CaCo₂-Medium anstelle von N-Medium verwendet wurde.

Um die sphäroidal wachsenden SLGC-Linien und Klone zu passagieren, wurde die Zellsuspension aus den T25 Flaschen in 12 ml Einmalplastikröhrchen überführt und für 3 min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1 x PBS gewaschen und danach mittels Trypsin/EDTA und einer Pasteurpipette vereinzelt. Die Menge an Trypsin/EDTA richtete sich nach der Größe der Zellpellets. Zum Stoppen wurde N-Medium in entsprechender Menge hinzugeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugierung für 3 min bei 250 x g und Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen in 1 ml 1 x PBS suspendiert.

Bei den semi-adhärennten Kulturen wurden zunächst die Sphäroide in Einmalplastikröhrchen überführt und dann die adhärennten Zellen wie oben beschrieben gelöst. Die in Trypsin/EDTA befindlichen adhärennten Zellen wurden anschließend mit den PBS-gewaschenen Sphäroiden in 12 ml Einmalplastikröhrchen zusammengeführt und die Aggregate mechanisch dissoziiert. Nach Zugabe eines äquivalenten Anteils an Medium wurde für 3 min bei 250 x g zentrifugiert.

Beim Passagieren wurden die Zellen je nach Wachstumsverhalten verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausplattiert bzw. expandiert.

Zellmaterial, das beim Passagieren nicht für das Anlegen neuer Kulturen benötigt wurde, wurde für Kontrollexperimente asserviert. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und danach bei -20 °C gelagert.

Die Zellen für die Behandlungsversuche wurden analog der oben beschriebenen Methode mit Trypsin/EDTA gelöst und danach in den gewünschten Formaten plattiert. Um zu gewährleisten, dass alle SLGC-Linien und Klone in der gleichen Zelldichte für die Versuche verwendet wurden, wurde vor dem Ausplattieren die Zellzahl mit Hilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer (Zählkammerfaktor 1×10^4 Zellen/ml) bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausplattiert. Lediglich die T1371 Mutterkultur wurde aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften in einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² plattiert. Pro Versuch wurden eine 96-Lochplatte,

vier *chamber slides*, vier T25 Zellkulturflaschen und vier 10 cm Petrischalen eingesetzt. Die 96-Lochplatte und die *chamber slides* wurden einen Tag vor dem Ausplattieren mit Fibronectin beschichtet. Für adhärente und semi-adhärente Zellen wurden die 96-Lochplatten mit einer 1:1000 Verdünnung von Fibronectin/1 x PBS beschichtet und für semi-adhärente Linien mit 1:100 Fibronectin in 1 x PBS. Die *chamber slides* wurden unabhängig von der Adhärenz der Zellen mit Fibronectin 1:100 beschichtet. Zelllinien mit primär sphäroidalen Wachstum wurden auf Kulturgefäßen mit Fibronectin 1:100 in 1 x PBS plattiert und zusätzlich 16 h vor der Analyse mit fetalem Kälberserum versetzt (Endkonzentration 2 % FCS), um eine Adhärenz zu induzieren. Das war insbesondere für solche Experimente nötig, bei denen mehrfache Waschschriffe notwendig waren (BrdU-ELISA, ICC-Analysen). Hierbei ist zu beachten, dass die kurzzeitige Behandlung von SLGCs mit FCS bei Anwesenheit von EGF (Komponente des N-Mediums) keine Differenzierung induziert (Raju et al., 2015).

Die Behandlung der Zellen mit TMZ und Imatinib erfolgte am Tag nach dem Plattieren. Da das TMZ in DMSO gelöst vorliegt, wurde die Kontrollbehandlung stets mit 1 % DMSO durchgeführt. Imatinib wurde in den Konzentrationen 5 µM (I5) und 10 µM (I10) eingesetzt, die Behandlung mit TMZ erfolgte mit 50 µM (T50) und 100 µM (T100).

Im BrdU-ELISA (Kapitel 2.7) wurden zusätzlich Kombinationen von verschiedenen Konzentrationen Imatinib (10 000 nM, 5 000 nM, 1 000 nM, 500 nM, 100 nM, 50 nM) in Anwesenheit von 1 % DMSO oder 100 µM TMZ in DMSO untersucht. Weiterhin erfolgten Behandlungen mit dem PDGFR- α / β -Inhibitor CP-673451 (Tab. 4) in Konzentrationen von 1 nM bis 500 nM sowie Kombinationsbehandlungen mit 100 nM, 10 nM, und 1 nM des PDGFR- α / β -Inhibitors CP-673451 in Anwesenheit von 20 ng PDGF-AB. Außerdem wurde der Effekt der Kombination von 100 nM, 10 nM, und 1 nM des CP-673451 in Anwesenheit von 100 µM TMZ und 20 ng/ml des c-Kit-Liganden SCF getestet. Leider waren diese Versuche aufgrund der mangelnden Adhärenz der Zellen nicht auswertbar.

2.4 Immunzytochemische Färbung

Zum Nachweis der Proteine CD133 (Prominin-1), Sox-2 und Nestin auf Einzelzellniveau wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Antikörper und Verdünnungen sind in Tab. 5 gelistet. Alle Färbelösungen enthielten 10 % FCS, 0,04 % Na-Azid sowie die Antikörper in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen (Tab. 5 und Tab. 6). Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte an einem definierten Tag nach der Behandlung. Lediglich im Fall der phänotypischen Charakterisierung der bis dato uncharakterisierten Zellklone wurden die Präparate nach Erreichen einer ca. 80 %-igen Konfluenz fixiert. Für die Fixierung wurde das Medium verworfen und die *chamber slides* einmal mit 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in den Kammern vorsichtig mit auf -20 °C temperiertem Ethanol/Eisessig (95:5) (Tab. 3) überschichtet und für 7 min bei -20 °C inkubiert. Es folgten 3 Waschschriffe mit 1 x PBS bei Raumtemperatur. Das erste Mal wurde nur kurz

gewaschen, um die Reste der Fixierlösung zu entfernen. Die beiden weiteren Male wurde für jeweils 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Lagerung bei 4 °C wurden die *chamber slides* mit 1 x PBS überschichtet.

Vor der Färbung wurden die *chamber slides* unter dem Lichtmikroskop auf eine ausreichende Zellerhaltung kontrolliert. Der Plastikaufsatz wurde von dem Objektträger getrennt. Die Kammern wurden mit einem Fettstift (DAKO PEN) (Tab. 9) umrundet und pro Kammer 24 µl Färbelösung pipettiert. Diese enthielt eine Antikörpermischung aus Nestin/Sox-2 oder Sox-2/CD133. Die Objektträger wurden nun für 60 min bei Raumtemperatur in einer wasserdampfgesättigten Box inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 1 x PBS, wobei jeweils für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der sekundäre Antikörper-Mix bestehend aus anti-Kaninchen-Cy3® und anti-Maus-DyLight Antikörpern (Tab. 6) sowie 10 % FCS und 0,04 % Na-Azid wurde pipettiert; die Menge Färbelösung pro Feld betrug wiederum 24 µl. Die sekundären Antikörpermischungen wurden analog zu den primären, aber unter Abdunklung inkubiert. Danach folgte ein dreimaliges Waschen mit 1 x PBS bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 24 µl DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol 1:200 verdünnt in 1 x PBS) (Tab. 4) zum Anfärben des Zellkerns pipettiert und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Es folgte wie zuvor ein dreimaliges Waschen mit 1 x PBS. Nach dem letzten Waschschrift wurde pro Feld ein Tropfen Fluoromount-G® (Tab. 4) aufgetropft und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Zuletzt wurden Objektträger und Deckglas mit Nagellack (Tab. 10) umrundet und somit luftdicht versiegelt. Die Präparate wurden bei -20 °C gelagert.

Für die immunzytochemische Färbung von Sphäroiden wurde ein analoges Färbeprotokoll angewendet; die Fixierung und Färbung erfolgten dabei in Suspension. Dazu wurden die Kulturen/Zellsuspension für 5 min bei 1000 x g pelletiert und in den Waschlösungen (80 µl bzw. 100 µl) bzw. Färbegemischen (50 µl) resuspendiert. Die Inkubationszeit für den Primärantikörpermix betrug 60 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und danach dreimal mit 80 µl 1 x PBS gewaschen. Die Färbung mit den sekundären Antikörpern erfolgte analog zur Inkubation der Primärantikörper, aber im Dunkeln. Es folgten wiederum 3 Waschschriffe mit 1 x PBS. Als letztes wurde die Färbung mit DAPI(4',6-Diamidin-2-phenylindol) -Lösung (1:200 in 1x PBS) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 3 Waschschriffen mit 80 µl 1 x PBS wurde der Überstand nach der letzten Zentrifugierung möglichst quantitativ abgenommen. Das Zellpellet aus dem Reaktionsgefäß wurde in einem Tropfen Fluoromount-G® resuspendiert und dann auf einen Objektträger gegeben. Zuletzt wurde ein 12 mm Deckglas (Tab. 10) möglichst luftblasenfrei aufgelegt und mit Nagellack versiegelt.

Von allen immunzytochemischen Färbungen wurde stets ein technisches Replikat angefertigt. Für die Bewertung der Expression wurden 8-10 verschiedene Areale fotografiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Biozero BZ-8000 von Keyence und der Software Biozero BZ viewer 9000 (Tab. 9). Von den mit den Nestin/Sox-2-Antikörpern gefärbten adhären Zellen wurden 10 Mikrofotographien pro Behandlung aufgenommen. Die Intensität der Sox-2-Färbung wurde in drei Gruppen (-, schwach/abwesend; +, positiv; ++, stark) bewertet und die relative Anzahl ermittelt. Bei den Sphäroiden und den mit dem Sox-2/CD133-Antikörpermix gefärbten Zellen wurden sogenannte Z-Stacks aufgenommen und die CD133-Signalintensität bewertet. Aufgrund der geringen Adhärenz der Zellen oder der Induktion von Zelltod war es zum Teil nicht möglich, 10 Bilder aufzunehmen, so dass einige Präparate dann nicht quantitativ ausgewertet wurden. Zudem variierte die Zelldichte von Klon zu Klon, weshalb die Zahl der insgesamt beurteilten Zellen stark variierte. Von den mit dem PDGFR- α -Antikörper gefärbten Klonen wurden Z-Stacks aufgenommen und die PDGFR- α -Expression beurteilt.

2.5 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil der Zellen bestimmt, die Prominin-1 (CD133) oder PDGFR- α (CD140a) in der Plasmamembran integriert trugen. Als Positivkontrolle für den Nachweis CD133-positiver SLGCs wurden CaCo₂-Zellen verwendet.

Für die Durchflusszytometrie wurden die SLGCs bzw. CaCo₂-Zellen aus den behandelten T25 Zellkulturflaschen an Tag d4 nach der Behandlung geerntet. Zuerst wurden die Flaschen unter dem Lichtmikroskop auf Unterschiede in der Zellmenge und Viabilität überprüft. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA enzymatisch dissoziiert. Das Medium der SLGC-Kulturen wurde nicht verworfen, sondern in 12 ml Einmalplastikröhrchen gefüllt, da es für den Wachstumsfaktor ELISA (2.8) zur Verfügung stehen sollte. Um Zellen oder Zelldebris zu entfernen, wurde das Medium für 10 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Jeweils 2 ml Mediumüberstand wurden auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

Alle Arbeitsschritte für die immunzytochemische Färbung der Zellen erfolgten auf Eis. Die Zellpellets wurden zunächst in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, die für (I) Isotyp-Kontrolle (PE/APC-gekoppelt) und (II) Anti-CD133(2)-PE und Anti-CD140a-APC Antikörper dienten. Für genauere Angaben zu den Antikörpern siehe Tab. 5. Danach wurden die Zellen in den Reaktionsgefäßen für 1 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis mit auf 4 °C temperierten Puffern. Die Zellpellets wurden in 70 μ l Durchflusszytometrie-Puffer (Tab. 3) pro Reaktionsgefäß resuspendiert. Danach wurde unter Abdunklung 20 μ l FcR Blocking Reagenz () hinzugegeben sowie entweder 10 μ l IgG2b-PE/10 μ l IgG1-APC oder 10 μ l CD133(2)-PE/10 μ l CD140-APC. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml Durchflusszytometrie-Puffer hinzugegeben und die Reaktionsgefäße für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand

wurde vorsichtig entfernt und die Zellpellets je nach Größe in 300-500 µl Durchflusszytometrie-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellsuspensionen in Einmalplastik-Röhrchen (Tab. 10) überführt und kurz vor der Messung gevortext.

Die Messung erfolgte am BD LSR II Durchflusszytometer (Tab. 9) der Cell Analysis Core Facility (CAnaCore) Lübeck. Die Auswertung erfolgte mit der Software Summit v4.3 (Tab. 9). Im Ergebnisteil und Anhang sind die Dot-plots der Isotypenkontrollen und der mit CD133/CD140a markierten Zellen abgebildet (Abb. 33 - Abb. 39). Da für die durchflusszytometrischen Messungen mindestens 10^4 Zellen pro Ansatz nötig waren, wurden diese Analysen in den Behandlungsansätzen nur einmal durchgeführt, zumal parallel mehrere Kontrollen erforderlich waren und die Behandlungen die Proliferation und die Viabilität der Zellen deutlich reduzierten.

2.6 Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot

Proteinextraktion

Für die Westernblotanalyse wurden Gesamtzellproteinextrakte (*whole cell extracts, WCE*) verwendet. Diese wurden an Tag d5 nach der Behandlung aus den in den 10 cm Schalen behandelten Zellen gewonnen. Zuerst wurden die behandelten 10 cm Schalen unter dem Mikroskop auf Unterschiede in Anzahl oder Viabilität überprüft. Danach wurde zuerst das Medium aus den Schalen in 50 ml Einmalplastikröhrchen transferiert. Die in den Schalen verbliebenen Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und danach 1000 µl TEN-Puffer (Tab. 3) zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Silikon-schaber vorsichtig vom Schalenboden gelöst. Die so gewonnene Zellsuspension wurde zu den Zellen in den 50 ml Plastikröhrchen dazugegeben. Danach erfolgte die Zentrifugierung für 3 min bei 500 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1 ml 1 x PBS gewaschen und danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut pelletiert, der Überstand abgesaugt und die Zellpellets bis zur Proteinextraktion bei -20 °C eingefroren.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellpellets auf Eis gestellt und je nach Größe in 100-250 µl JLB-Puffer mit PMSF und PIC (Tab. 3) resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation auf Eis für 20 min, bevor für 10 min bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand mit den Proteinextrakten wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde ein Bradford-Assay nach Standardprotokoll (Green und Sambrook, 2012) durchgeführt. Dazu wurden zuerst 800 µl 1x PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 2 µl WCE sowie 200 µl 5 x Bradford-Reagenz (Tab. 4) hinzugefügt. Parallel wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus 200 µl Bradford-Reagenz und 800 µl 1x PBS ohne Protein ange-

setzt. Alle Proben wurden durch Vortexen und Invertieren gut gemischt. Nachdem die Reaktionsgefäße für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert hatten, wurde der Inhalt in Einmalküvetten gegeben und im Helios Omega Photometer (Tab. 9) die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichkurve ermittelt, die zuvor mit BSA (Bovines Serum Albumin) im Labor erstellt wurde.

Um die Integrität der *WCEs* zu überprüfen, wurden 5 μ l *WCE* mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe unten) und danach mit Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung (Tab. 3) gefärbt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 20-25 min in Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung gefärbt und danach so lange in Coomassie-Entfärber (Tab. 3) inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels der Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid-Elektrophorese nach Laemmli (Green und Sambrook, 2012). Dabei wurden die in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine mittels SDS (Natriumdodecylsulfat) und β -Mercaptoethanol denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 10 %-igen SDS-Trenngel, nachdem die Proben zuvor ein SDS-haltiges Sammelgel durchlaufen hatten. Es wurde das Protean III SDS-PAGE System (Tab. 9) genutzt.

Es wurden 10 %-SDS-Trenngele und 4 %-SDS-Sammelgele hergestellt. Dazu wurden destilliertes Wasser, Trenngelpuffer bzw. Sammelgelpuffer und Acrylamidlösung (Tab. 3 und Tab. 4) in der entsprechenden Menge (Tab. 11) zusammengegeben und gemischt. Nach der Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin wurde erneut gemischt. Das Trenngel wurde dann zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel aufgeschichtet und ein Sample-Well-Kamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Gele in die mit SDS-PAGE Elektrophoresepuffer gefüllten Kammern gespannt und nach dem Probenauftrag eine Spannung von 200 V angelegt. Die Elektrophorese erfolgte, bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers den unteren Rand des SDS-Gels erreicht hatte.

Tab. 11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	10 % SDS-PAGE Trenngel	4 % SDS-PAGE Sammelgel
H ₂ O (bidest)	2,00 ml	1,8 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	0,75 ml
Acrylamidlösung	1,66 ml	0,4 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	100 µl	30 µl
Tetramethylethylendiamin	6 µl	8 µl

SDS, Natriumdodecylsulfat; PAGE, Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Zusammensetzung von Trenngel- und Sammelgelpuffer ist Tab. 3 zu entnehmen.

Die Proteinproben wurden mit 2 x Laemmli Puffer (Tab. 3) und 1 x PBS angesetzt. Für analytische SDS-PAGE wurden stets 5 µl *WCE* eingesetzt. Für präparative SDS-PAGE mit nachfolgender Westernblot-Analyse wurden je nach Antikörper verschiedene Mengen *WCE* verwendet; dies waren 15 µg *WCE* (PDGFR-α) und 25 µg *WCE* (CD133, PDGFR-β, Sox-2 und GFAP). Wenn die Konzentration des *WCE* zu gering war, wurden die Proteinproben mit 4 x Roti®-Load 1 (Tab. 4) statt mit 2 x Laemmli-puffer (Tab. 4) angesetzt. Alle Proteinproben wurden für 5 min bei 94 °C inkubiert, um die Denaturierung zu vervollständigen. Parallel zu den *WCEs* wurden 3-5 µl Proteinmarker (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) (Tab. 4) aufgetrennt.

Westernblot

Es wurde das Semi-dry-Blot-Verfahren angewendet. Die Trenngele aus der SDS-PAGE wurden, nachdem das Sammelgel abgetrennt war, für 10-15 min in den Transferpuffer (Tab. 3) gelegt. Danach wurde das Blot-Sandwich bestehend aus drei Whatman® Chromatographie-Papieren 3 MM (Tab. 10), der Nitrozellulosemembran (Tab. 10), dem Gel und weiteren 3 Lagen Whatman® Chromatographie-Papiere 3 MM ohne Luftblasen assembliert. Darüber wurde das Trenngel gelegt. Es folgten wieder drei Lagen Whatman® Chromatographie-Papier 3 MM. Der Transfer erfolgt mit dem Transblot SD System (Tab. 9) für 60 min bei 12 V. Nach Abschluss des Transfers wurde der Nitrozellulosefilter für 15 min in 100 ml Westernblot-Blockingpuffer (Tab. 3) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Filterpapier in 5 ml Westernblot-Blockingpuffer und dem darin gelöstem primärem Antikörper (Tab. 5) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dreimal für 10 min in Westernblot-Waschpuffer (Tab. 3) gewaschen. Danach wurde 5 ml der Verdünnung der sekundären Antikörper (Verdünnung laut Tab. 6 in Westernblot-Blockingpuffer) für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit Westernblot-Waschpuffer, bevor die Nitrocellulosemembranen auf eine Glasplatte aufgebracht und mit 800 µl Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (Tab.

4) pro Filter überschichtet wurden. Die Detektion erfolgte am Chemidoc XRS (Tab. 9) mit dem Programm Quantity One (Tab. 9). Die Detektion der Blots von Klonen einer Zelllinie erfolgte für die jeweiligen Antikörper stets parallel, um die Vergleichbarkeit der Daten zu erhöhen.

Im Ergebnisteil ist in den Blot-Bildern jeweils nur eine Ladekontrolle dargestellt. Welche für die Darstellung ausgewählt wurde, ist von der Lage der übrigen Banden (z.B. PDGFR Detektion) und von der „*signal-to-noise-ratio*“ abhängig. Alle Westernblots wurden mindestens einmal wiederholt. Im Ergebnisteil wird jedoch nur ein technisches Replikat gezeigt.

Typischerweise wurde ein und dieselbe Nitrozellulosemembran für die Detektion von zwei bis vier verschiedenen Antikörpern eingesetzt, wobei die nacheinander detektierten Proteine deutlich verschiedene Größen aufwiesen, um das Risiko für fehlerhafte Daten auszuschließen. Zum Nachweis von PDGFR- α und wurden jeweils 15 μ g WCE pro Spur verwendet, die entsprechenden Ladekontrolle war der pan-Aktin-Antikörper (Tab. 5). Für CD133, PDGFR- β , Sox-2 und GFAP wurden jeweils 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen und als Ladekontrolle dienten pan-Aktin- oder GAPDH-Antikörper (Tab. 5). Die Signalstärken von PDGFR- α , PDGFR- β , CD133, Sox-2 und GFAP wurden relativ zur Signalstärke von Aktin sowie GAPDH ermittelt und die Quotienten graphisch dargestellt. Da sich Aktin aufgrund der Position im Blot und der Qualität des Antikörpers in allen Fällen als die beste Ladekontrolle erwies, wurde die Expression in den Graphen stets relativ zum Aktin-Signal angegeben. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Quantity One® 1-D Analysis Software (Tab. 9).

2.7 BrdU-ELISA

Aufgrund von mehrmonatigen Lieferproblemen des Herstellers während der Durchführung der Experimente wurden zwei verschiedene Kits für die Messung des BrdU- (Bromodesoxiuridin) Einbaus während der Replikation verwendet. Der Einbau von BrdU gibt Hinweise auf die Proliferation von Zellen.

BrdU Labeling and Detection Kit III

Wegen der Lieferprobleme wurden lediglich die Proliferation der T1371 Mutterkultur und die Proliferation des Klons T1371 cl 3 mit dem *BrdU Labeling and Detection Kit III* (Tab. 8) überprüft. Am Tag d5 nach der Behandlung wurden die 96-Lochplatten fixiert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend zweimal mit 250 μ l Waschlösung (Tab. 3) pro Vertiefung gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 200 μ l auf -20 °C temperierte Fixierlösung (Tab. 3) für 30 min bei -20 °C. Nach dem Absaugen der Fixierlösung erfolgten drei Waschschrte mit 250 μ l Waschlösung (Tab. 7) pro Vertiefung. Danach wurde die Platte unter dem Mikroskop auf Zellerhaltung kontrolliert. Es erfolgte die Zugabe von 100 μ l Nuclease-Lösung (1:100 Verdünnung mit *incubation buffer*, Kitkomponente) pro Vertiefung zugegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei

Waschschritte mit Waschlösung wie oben beschrieben, bevor 100 µl Antikörperlösung (1:100 Verdünnung des Anti-BrdU Antikörper in 1 x Waschpuffer, Kitkomponente) pro Vertiefung zugegeben wurde. Die 96-Lochplatten wurden nochmals für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde wie zuvor dreimal mit Waschpuffer gewaschen und danach 100 µl ABTS-Substrat (Kitkomponente) pro Vertiefung pipettiert. Die 96-Lochplatte wurde bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min nach Substratzugabe die erste Messung im Asys UVM 340 ELISA-Readers (Tab. 9) bei 405 nm (Referenz Wellenlänge $\lambda = 490$ nm) durchgeführt. Das für die Messung und Auswertung verwendete Programm war Microwin2000 (Tab. 9). Zu den Zeitpunkten 20, 30, 40, 60, 90 und 120 min wurde erneut gemessen. Ausgewertet wurden jeweils die Zeitpunkte, an denen die höchsten Messwerte für die optische Dichte zwischen 1,0 und 1,2 lagen.

Cell Proliferation ELISA, BRDU (colorimetric)

Auf Grund der oben benannten Lieferschwierigkeiten wurden für die Experimente mit den Zelllinien T1586 und T1522 sowie dem Klon T1371 cl 2 der *Cell Proliferation ELISA, BRDU (colorimetric)* (Tab. 8) zur Bestimmung des BrdU-Einbaus genutzt. Auch für die mit dem PDGFR- α / β -Inhibitor CP-673451 behandelten 96-Lochplatten wurde das *Cell Proliferation ELISA, BRDU (colorimetric)* Kit benutzt. An Tag d5 nach der Behandlung wurden die 96-Lochplatten untersucht. Zuerst wurde das Medium aus den Vertiefungen entfernt. Bei den adhären wachsenden Zelllinien wurde das Medium direkt abgesaugt und Mediumreste durch Klopfen entfernt. Bei sphärisch wachsenden Zelllinien wurde zuerst für 5 min bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, danach das Medium abgesaugt und danach die Platten für 1 h im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. In beiden Fällen wurden die Zellen danach fixiert. Dafür wurden pro Vertiefung 200 µl *FixDenat*-Lösung (Kitkomponente) hinzugegeben und die Platten für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die *Anti-BrdU-POD working solution* vorbereitet; dazu wurde die *Anti-BrdU-POD* Stammlösung 1:100 mit Antikörperverdünnungslösung (Kitkomponente) verdünnt. Nach dem Absaugen der *FixDenat*-Lösung wurde ein Waschschritt mit 200 µl Medium/2 % FCS pro Vertiefung durchgeführt. Danach wurden pro Vertiefung 100 µl *Anti-BrdU-POD working solution* dazu pipettiert und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit 200 µl 1 x PBS pro Vertiefung wurden 100 µl Substratlösung (Kitkomponente) pro Vertiefung zugegeben und die Platte nach 2, 5 und 10 min und dann in 5-minütigen Abständen gemessen, bis keine deutlichen Veränderungen der Messwerte mehr erkennbar waren. Ausgewertet wurden die Zeitpunkte, an denen die Messwerte für die optischen Dichte zwischen 1,0 und 1,2 lagen. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 370$ nm (Referenz-Wellenlänge $\lambda = 492$ nm). Das für die Messung und Auswertung verwendete Programm war Microwin2000 (Tab. 9). Für die Auswertung wurden acht Einzelwerte erhoben.

2.8 Wachstumsfaktor-ELISA

Für die Bestimmung der PDGF-AB Konzentration in den Kultur-Medien wurde das *Quantikine® ELISA Human PDGF-AB Immunoassay* (Tab. 8) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte und Anpassungen beschrieben. Zunächst wurde aus dem PDGF-AB-Standard eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden in sieben 1,5 ml Reaktionsgefäße PDGF-AB-Verdünnungen mit den Konzentrationen 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml und 15,6 pg/ml mit *calibrator diluent RD5R* (Kitkomponente) hergestellt. Die benötigte Anzahl an ELISA-Streifen (Kitkomponente), die bereits den PDGF-AB-Antikörper trugen, wurde in die Halterung (Kitkomponente) eingebracht. Ein Reaktionsgefäß mit reinem *calibrator diluent RD5R* wurde als Null-Standard verwendet. Das aus den Kulturüberständen gewonnene biologische Material (Abschnitt 2.5) wurde aufgetaut. Währenddessen wurden pro Vertiefung 100 µl *assay diluent RD1X* (Kitkomponente) zugegeben und der Antikörper hierdurch rekonstituiert. Zu den 100 µl *assay diluent* wurden 100 µl des zu untersuchenden Mediums zugegeben und die Proben der Eichkurve pipettiert. Die Platte wurde mit Klebefolie aus dem Kit verschlossen. Danach wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein viermaliges Waschen mit je 400 µl *wash buffer* (Kitkomponente) pro Vertiefung. Nach dem letzten Waschen wurden die Pufferreste komplett entfernt und danach 200 µl *PDGF-AB-Conjugate* (Kitkomponente) pro Vertiefung zugegeben. Die Platte wurde wiederum mit Klebefolie verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten wieder ein viermaliges Waschen mit 400 µl *wash buffer* pro Vertiefung, bevor jeweils 200 µl Substratlösung (Kitkomponente) pro Vertiefung unter Abdunklung zugegeben wurden. Die Substratlösung wurde kurz vor der Zugabe aus den *color reagents A* und *B* (Kitkomponente) hergestellt. Nach 20 min unter Abdunklung wurden 50 µl Stopplösung (Kitkomponente) pro Vertiefung zugegeben und innerhalb von 30 min im ELISA-Reader bei $\lambda = 450$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 540$ nm) gemessen. Die PDGF-AB-Konzentrationen wurden anhand der parallel erstellten Eichgeraden ermittelt. Diese wurde mit Hilfe der Messwerte der oben erläuterten Verdünnungsreihe in Microsoft-Excel errechnet. (Formel: $x = (y - 0,0001) / 0,0012$). Alle Messwerte wurden als Duplikate erhoben.

2.9 Statistik

Da die Anzahl Zellen pro Mikrofotographie in der immunzytochemischen Analyse sehr stark variierte, insbesondere nach den Behandlungen, wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse und den Westernblots wurde aufgrund der geringen Fallzahl ebenfalls keine statistische Analyse vorgenommen. Stattdessen wurde die Variation der Messwerte zwischen parallelen technischen Replikaten ermittelt. Dieser Wert betrug maximal 10 % des errechneten Mittelwerts. Mit Ausnahme der Sox-2-Blots, geben die Graphen jeweils die Ergebnisse

der Quantifizierung der darunter befindlichen Westernblots wieder. Der Wachstumsfaktor-ELISA wurde mit einer geringen Probenzahl ($n=2$) durchgeführt, weshalb auch hier eine statistische Analyse nicht sinnvoll war.

Bei den BrdU-ELISAs erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA mit einem post-hoc TUKEY Test. Das Signifikanzniveau betrug 5 %. Weiterhin wurden Mittelwerte, Normalverteilung und Standardabweichung errechnet. Die ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Ergebnisteil und im Anhang zusammengefasst.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypen von SLGC-Linien und Klonen

Die Charakterisierung von T1522 und T1586 Klonen war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht erfolgt. Daher wurden zunächst die in der AG vorhandenen T1522 und T1586 Klone mit Antikörpern gegen den PDGF-Rezeptor- α , den Transkriptionsfaktor Sox-2 sowie die Intermediärfilamente Nestin und GFAP gefärbt. Dabei zeigten hohe Nestin- und Sox-2-Level einen hohen Stammzellcharakter an (Zhang et al., 2008; Guo et al., 2011; Chen et al., 2010), während GFAP in Abhängigkeit von der SLGC-Linie als ein Differenzierungs- oder Stammzellmarker zu bewerten ist (siehe Einleitung).

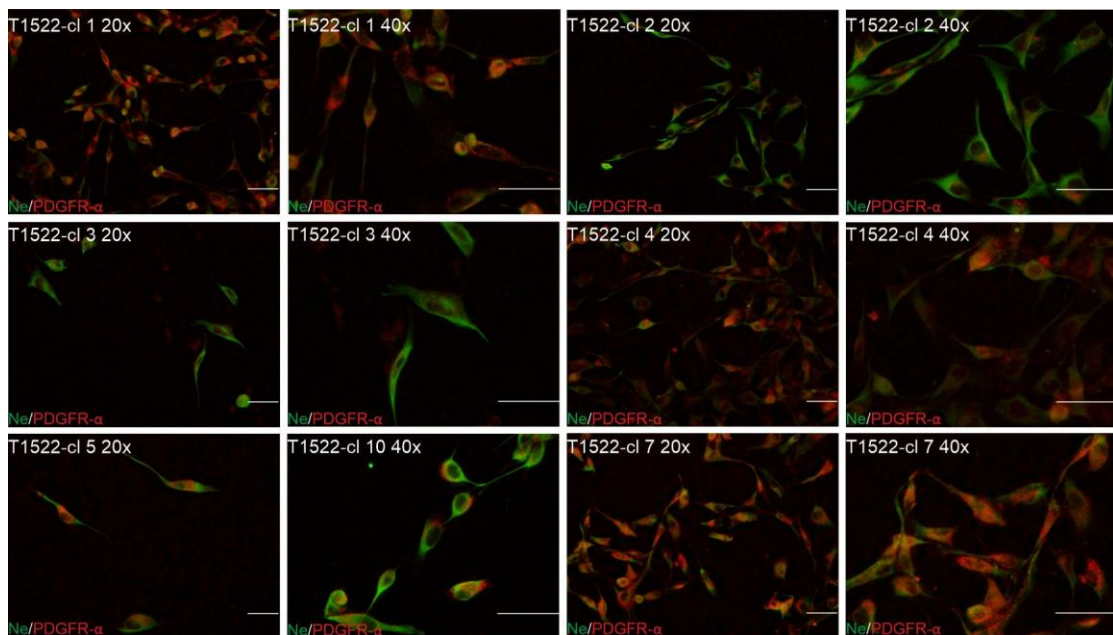


Abb. 1: Expression von Nestin und PDGFR- α in den T1522 Klonen. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-PDGFR- α /Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Mikrofotographien weggelassen. Balken: 50 μ m; Ne, Nestin; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

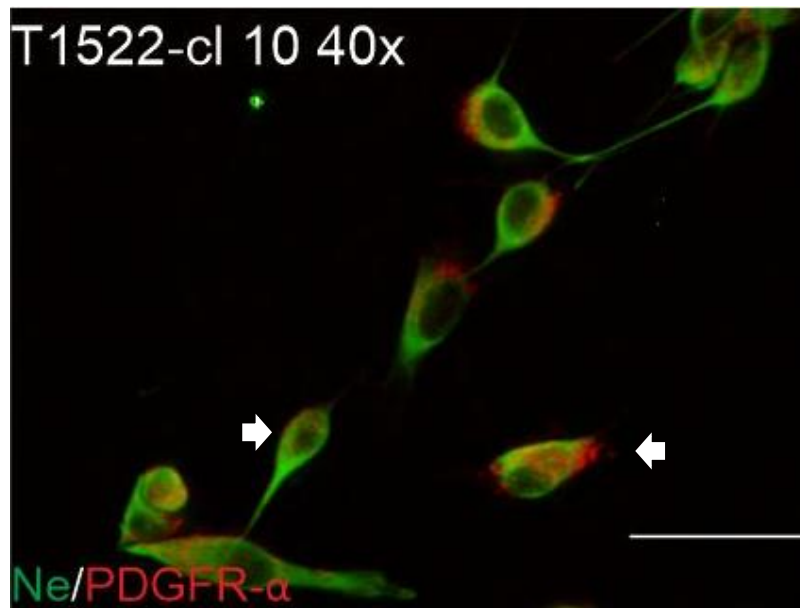


Abb. 2: Expression von Nestin und PDGFR- α in dem T1522 Klon cl 10. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus- DyLight® und Kaninchen-anti- PDGFR- α /Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Mikrofotographien weggelassen. Balken: 50 μ m; Ne, Nestin; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei den T1522 Klonen wurden in allen untersuchten Klonen sowohl Nestin als auch PDGFR- α nachgewiesen (Abb. 1). Die Klone wurden aufgrund ihrer PDGFR- α -Expression in zwei verschiedene Gruppen, solche mit hoher bzw. geringer Expression eingeteilt. Zu den Klonen, die eine hohe PDGFR- α -Expression aufwiesen, zählten T1522 Klon cl 1, cl 4, cl 5 und cl 7. Die Klone T1522 Klon cl 2, cl 3 und cl 10 wiesen hingegen eine geringe PDGFR- α -Expression auf. Wie die Mikrofotographie von T1522 cl 10 (Abb. 2) zeigt, war das PDGFR- α -Signal in der Plasmamembran nicht gleichmäßig verteilt. Weiterhin variierte die Signalstärke zwischen den Zellen derselben Kulturen. Neben Zellen mit hoher PDGFR- α -Signalstärke gab es solche, die nahezu kein PDGFR- α exprimierten (siehe Pfeile in Abb. 2). Dieses Phänomen wurde in allen Klonkulturen übereinstimmend beobachtet (Abb. 1). Somit zeigen diese Analysen, dass hinsichtlich der PDGFR- α -Expression eine inter- und intraklonale Heterogenität vorlag. Insbesondere bei den Klonen T1522 cl 4 und cl 7 wurden neben sehr stark PDGFR- α -positiven Zellen solche mit sehr geringer Expression beobachtet (Abb. 1). Im Fall des Klons T1522 cl 7 fällt zudem auf, dass die subzelluläre Lokalisation des Signals variierte. Auffällig war, dass in der Mehrheit der Zellen in den Kulturen von T1522 cl 1, cl 2, cl 5 und cl 7 PDGFR- α -Signale im Cytoplasma auftraten. Relativ zur Nestin-Expression, die in den Klonen cl 2, cl 3, cl 5 und cl 10 hoch, in den Klonen T1522 cl 1, cl 4 und cl 7 niedrig war, ließ sich keine Korrelation feststellen. So wiesen die stark Nestin-positiven Zellen von Klon cl 3 wenig, die stark Nestin-positiven Zellen von Klon cl 2 und cl 7 intermediäre und zum Teil starke PDGFR- α -Signale auf. Die Sox-2-Level in den T1522 Klonen

wurden in dieser Arbeit nicht ermittelt, waren aber Gegenstand einer anderen parallel angefertigten Arbeit.

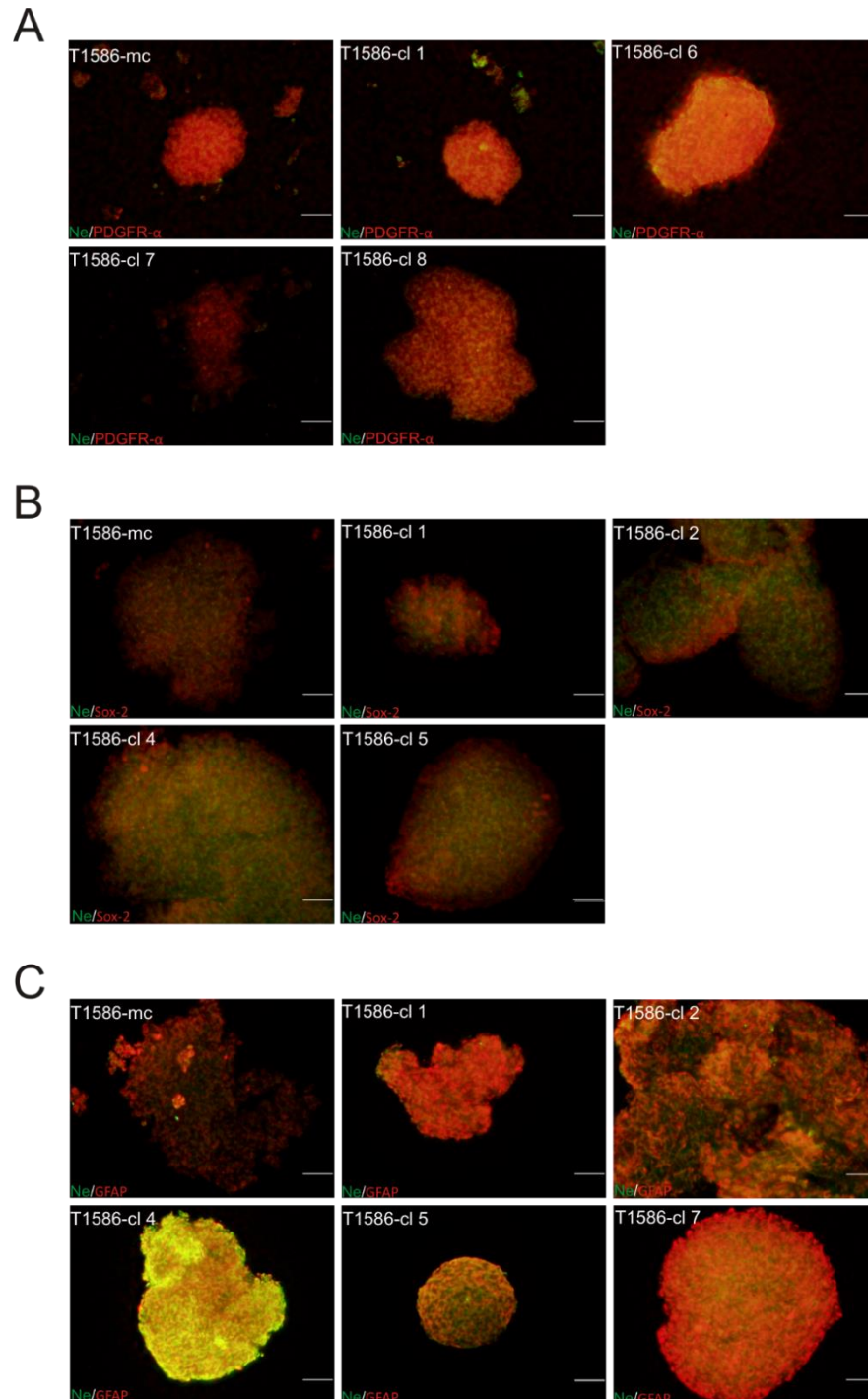


Abb. 3: Phänotypisierung der T1586 Klone im Vergleich zur T1586 Mutterkultur; Immunzytochemische Färbung mit den Antikörperkombinationen: A) Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-PDGFR- α /Ziege-anti-Kaninchen-Cy3®; B) Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3®; C) Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-GFAP/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3®. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung auf den Mikrofotographien

weggelassen. Balken: 50 μ m; Ne, Nestin; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; GFAP, Saures Gliafaserprotein; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die immunzytochemische Analyse von T1586 (Klone und Mutterkultur) erfolgte aufgrund des sphäroidalen Wachstums in Suspension. Hierdurch bedingt war es nur eingeschränkt möglich, eine Färbung der Zellen in Inneren der Aggregate zu erreichen (Abb. 3). Generell wiesen alle T1586 Klone wie auch die Mutterkultur nur ein schwaches Nestin-Signal auf. Dies war in den Doppelfärbungen mit Nestin/PDGFR- α , Nestin/GFAP bzw. Nestin/Sox-2 ähnlich (Abb. 3). Das Sox-2-Signal war in den Zellen an der Peripherie der Aggregate stark, im Inneren der Aggregate jedoch nicht eindeutig. Das PDGFR- α -Signal war in allen Klonen außer Klon T1586 cl 7 stark und entsprach dem der Mutterkultur. Das GFAP-Signal war in allen Klonen stark und innerhalb der jeweiligen Klone homogen. Im Fall der Mutterkultur wies jedoch nur die Subpopulation der Zellen ein starkes GFAP-Signal auf (Abb. 3 C). Die Expression von PDGFR- α , GFAP, und Sox-2 in den Klonen wurde nicht nur auf Einzelzellniveau, sondern auch durch Westernblot Analysen erfasst. Dabei wurden weitere SLGC-Linien und Klone einbezogen, deren Responsivität gegenüber von Imatinib und TMZ in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Exemplarische Westernblots zu diesen Analysen finden sich im Anhang (Abb. 42 und Abb. 43).

Um weitere Hinweise auf die phänotypischen Eigenschaften von den Klonen und Mutterkulturen in der geplanten Analyse zu erhalten, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Dabei wurden die Zellen nach Zugabe der Antikörper gegen CD133/Prominin-1 bzw. CD140a/PDGFR- α analysiert (Abb. 4, Tab. 14, Anhang). CD133 ist ein Indiz für die Anwesenheit von Typ II-Zellen in Mutterkulturen und Klonen (siehe Einleitung).

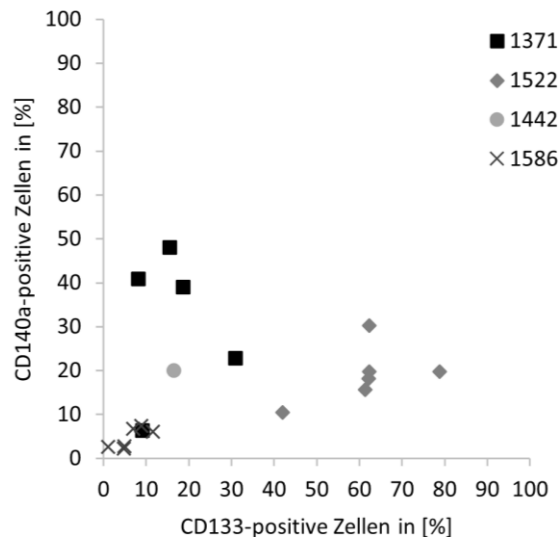


Abb. 4: Anteil der CD133-positiven und CD140a-positiven Zellen in Kulturen der untersuchten Klone (durchflusszytometrische Untersuchung). CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor α* .

Generell ist festzustellen, dass der Anteil an CD133-positiven Zellen lediglich in Kulturen der T1522 Mutterkultur und Klonen hoch war (Abb. 4). Die Werte lagen in diesen Fällen über 60 % und erreichten für den Klon T1522 cl 2 sogar 78,8 %. Der Klon T1522 cl 7 wich hiervon ab und erreichte lediglich einen Anteil von 42 % CD133-positiven Zellen. Im Fall von T1586 lagen die Anteile an CD133-positiven Zellen zwischen 1,1 % (Klon cl 5) und 11,5 % (Klon cl 6). Die CD133-positiven Anteile variierten zwischen den Klonen der T1371 Linie deutlich, wobei lediglich Klon T1371 cl 2 eine größere Population CD133-positiver Zellen aufwies (30,9 %) und die Anteile an CD133-positiven Zellen für alle übrigen Klone und die Mutterkultur zwischen 8,2 % und 18,7 % lagen (Tab. 14). Im Punktdiagramm gibt es Hinweise auf einen indirekt proportionalen Zusammenhang von CD140a- und CD133-positiven Zellen bei den Klonen der T1371 Zelllinie, da Kulturen mit hohen Anteilen an CD140a-positiven Zellen geringe Anteile an CD133-positiven Zellen enthielten. Im Fall der T1586 Mutterkulturen und Klone waren sowohl die Anteile an CD133-positiven als auch an CD140a-positiven Zellen sehr gering. Die T1522 Klone mit über 60 % CD133-positiven Zellen enthielten 15,6 % - 30 % CD140a-positive Zellen (Abb. 4).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Responsivität der SLGC-Linien und Klone gegenüber TMZ und Imatinib untersucht. Ein kritischer Parameter für die TMZ-Sensitivität ist die Expression des Reparaturproteins MGMT (Hermisson et al., 2006), für die Imatinib-Sensitivität die Expression von PDGF-Rezeptoren (Hägerstrand et al., 2006). Die Expression von MGMT in Kulturen von Klonen und Mutterkulturen wurde mittels Westernblot ermittelt, die Daten jedoch nicht parallel zu den Behandlungsexperimenten erhoben (Beispiele in Abb. 40, Anhang).

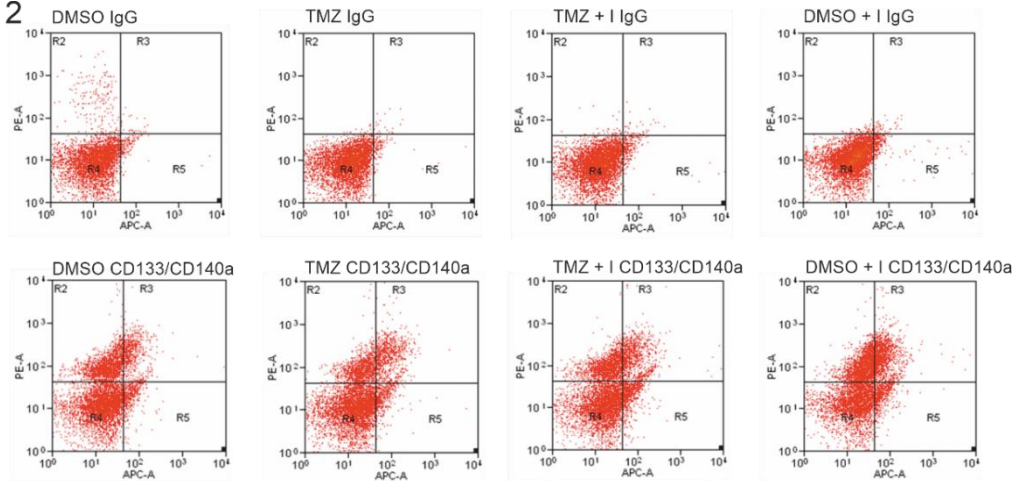
3.2 Anreicherung von CD133- und CD140a-positiven Zellen nach Behandlung

Um die Sensitivität von Mutterkulturen und abgeleiteten Klonen gegenüber von TMZ und Imatinib zu untersuchen, wurden Zellen derselben Passage parallel mehreren Experimenten zugeführt. Erstens wurde der Anteil CD133- bzw. CD140-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zweitens wurde die Expression von Proteinen mittels Westernblot und immunzytochemischer Analyse untersucht (Kapitel 3.3 - 3.5 und 3.7). Drittens erfolgte die Bestimmung der Proliferation über die Inkorporation des Basenanalogs BrdU (Kapitel 3.6). Viertens wurde die Sekretion des Wachstumsfaktors PDGF-AB mittels ELISA untersucht (Kapitel 3.8). Wegen der hohen Anzahl notwendiger Zellen, der geringen Proliferationsrate von SLGCs sowie der zum Teil hohen Zellverluste durch Zelltod nach Behandlung war die Anzahl technischer Replikate in den jeweiligen Analysen limitiert. Für die Durchflusszytometrie (Mindestanzahl zu zählender Ereignisse 1×10^4) war nur $n=1$ möglich, für die Immunzytochemie $n=2$, für den BrdU-ELISA $n=8$, für die Westernblot-Analysen $n=2$. Eine Wiederholung der Experimente mit biologischen Replikation erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt für eine Subgruppe der Zellklone, die nach der Kryokonservierung erneut proliferierende Kulturen ergaben. Da unveröffentlichte Ergebnisse des Labors und die in diesem Kontext erhobenen Daten belegen, dass sich der Anteil von Typ I zu Typ II und Typ III- Zellen (siehe Einleitung) deutlich veränderte, wurden diese Daten nicht in diese Arbeit einbezogen.

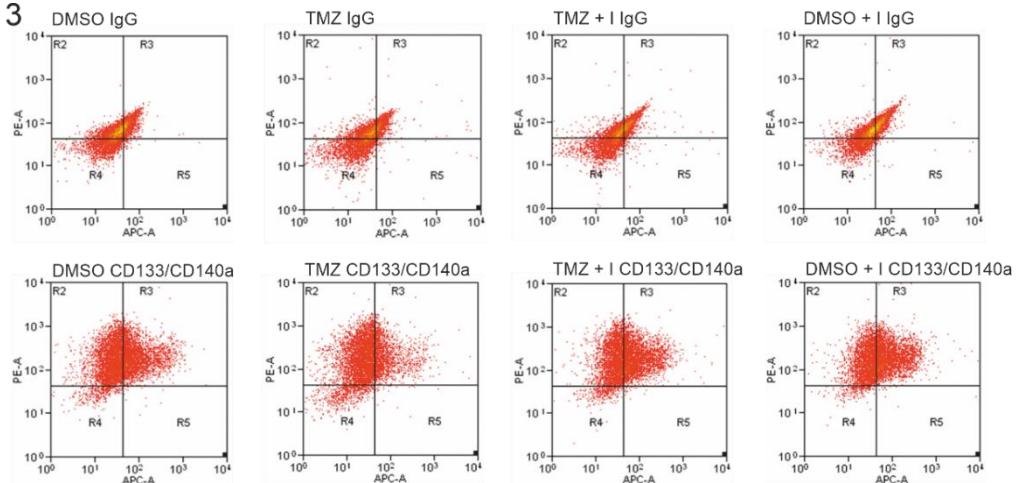
Um zu überprüfen, ob die Behandlungen mit Imatinib und/oder TMZ zu einer Anreicherung des Anteils von CD133- und/oder CD140a-positiven Zellen führten, wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Das TMZ wurde in einer Endkonzentration von 50 μM (T50) allein und in der Kombinationsbehandlung mit 5 μM Imatinib (I5) getestet. Da TMZ in DMSO gelöst wurde, erfolgte eine Kontrollbehandlung mit 1 % DMSO. Ebenso wurde Imatinib, das in wässriger Lösung vorlag, in der Einfachbehandlung in Anwesenheit von 1 % DMSO untersucht. Die Isotypkontrollen erfolgten mit einem IgG-Antikörper der identischen Subklasse. Exemplarisch werden drei typische Punktwolkendiagramme der Durchflusszytometrie (Abb. 5) gezeigt. Weitere Punktwolkendiagramme befinden sich im Anhang (Abb. 33 - Abb. 39).

Abb. 5 illustriert sehr deutlich die CD133-positive Zellpopulation in den Klonen T1371 cl 2 und T1522 cl 3, die sich in Richtung der PE-Achse von den übrigen Zellpopulationen abtrennt. Diese Punktwolke fehlt in T1586 cl 7. Eine vergleichbar deutliche Punktwolke der CD140a-positiven Zellpopulation ließ sich selten beobachten, was aufgrund der inhomogenen Verteilung von PDGFR- α -Proteinen in der Zellmembran (vergleiche Abb. 2) und der häufig schwachen Signale zu erwarten war (Abb. 45).

T1371 cl 2



T1522 cl 3



T1586 cl 7

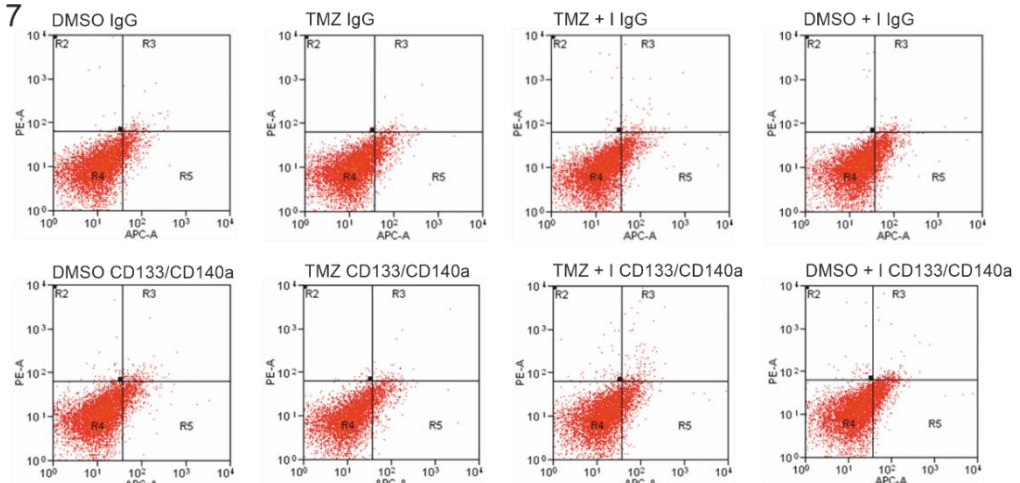


Abb. 5: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung von T1371 cl 2, T1522 cl 3 und T1586 cl 7. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid plus 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid plus 5 μ M Imatinib (D+I). CD133-Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor- α* ; cl, Klon.

T1442 Mutterkultur

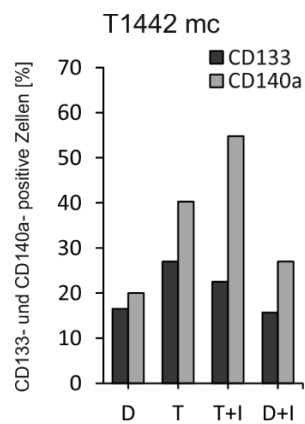


Abb. 6: Durchflusszytometrie der T1442 Mutterkultur. Die Anteile an CD133- und CD140a-positiven Zellen in Prozent wurden an Tag d4 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 µM Temozolomid (T), 50 µM Temozolomid plus 5 µM Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid plus 5 µM Imatinib (D+I); CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor-α*; mc, Mutterkultur.

Die Auswertung mittels der Software Summit v4.3 (Tab. 9) ergab, dass der Anteil der CD133-positiven Zellen in der T1442 Mutterkultur nach TMZ-Behandlung zunahm, während es unter 50 µM TMZ/5 µM Imatinib lediglich zu einem Anstieg von 6 % kam und sich nach alleiniger Imatinibgabe keine Veränderung relativ zur Kontrolle feststellen ließ (Abb. 6). Weiterhin kam es nach allen Behandlungen zu einem relevanten Anstieg der CD140a-positiven Zellpopulation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Dieser war nach Gabe von 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib am stärksten ausgeprägt und lag 34,8 % über der Kontrolle und 20,3 % über der alleinigen TMZ-Behandlung. Somit stieg die Anzahl CD133-positiver Zellen nach TMZ-Gabe an, während die Anzahl CD140a-positiver Zellen durch TMZ und Imatinib erhöht wurde.

T1371 Mutterkultur und abgeleitete Klone

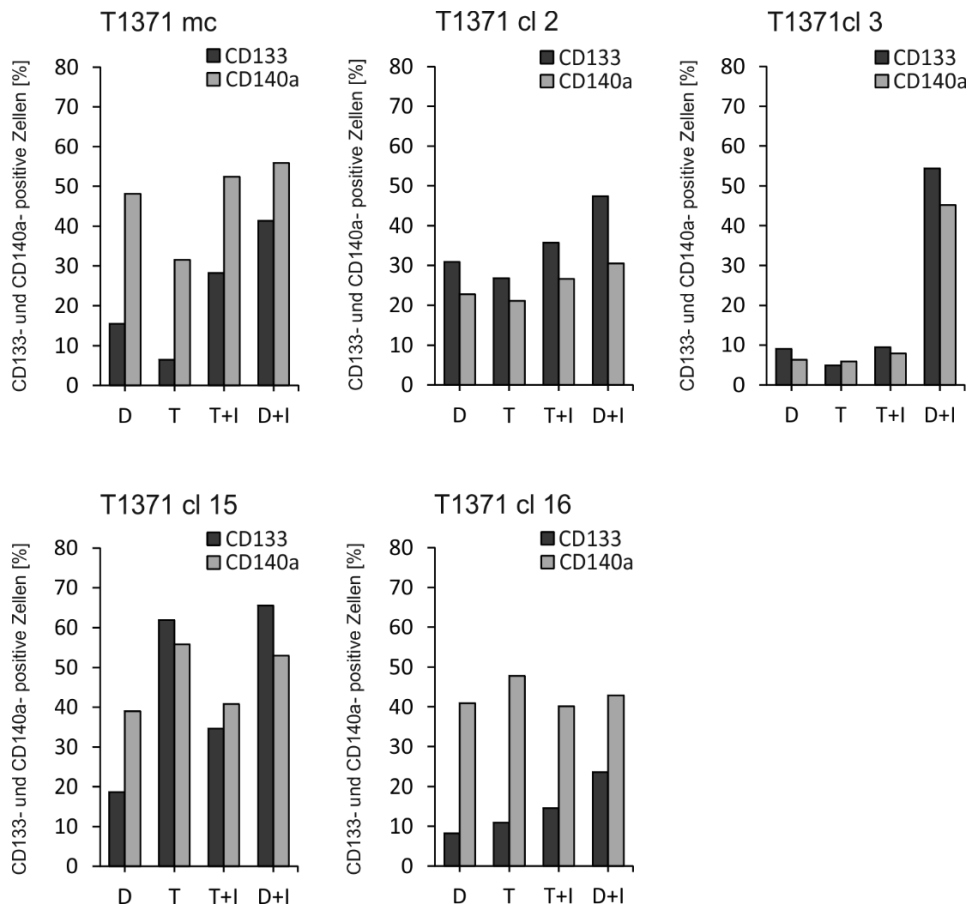


Abb. 7: Durchflusszytometrie der T1371 Zelllinie. Die Anteile der CD133- und CD140a-positiven Zellen in Prozent wurden an Tag d4 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 µM Temozolomid (T), 50 µM Temozolomid plus 5 µM Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid plus 5 µM Imatinib (D+I). CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor-α*; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Der Anteil an CD133-positiven Zellen nahm in der T1371 Mutterkultur nach alleiniger Behandlung mit 50 µM TMZ um 9,1 % ab, während es nach der alleinigen Imatinib-Behandlung und der Ko-Applikation von TMZ/Imatinib zu einer Zunahme kam (Abb. 7). Bei der T1371 Mutterkultur ergab sich nach der alleinigen Behandlung mit 50 µM TMZ ein deutlicher Abfall des Anteils an CD140a-positiven Zellen um 16,6 %. Der Anstieg der CD140a-positiven Zellpopulation nach Behandlung mit 50 µM TMZ/5 µM Imatinib und alleiniger Behandlung mit Imatinib war gering ausgeprägt.

Die Auswertung ergab für T1371 cl 2 einen Anteil an CD133-positiven Zellen in der DMSO-Kontrolle von 30,9 %, für 50 µM TMZ 26,8 %, für 50 µM TMZ/5 µM Imatinib 35,7 % sowie für DMSO/5 µM Imatinib 47,4 % (Abb. 7). Hier zeigte sich eine Zunahme der CD133-positiven Zellen nach der Imatinib-Behandlung um 16,5 %, bei den Behandlungen mit TMZ allein und in Kombination mit Imatinib zeigten sich nur geringe Veränderungen. Der Anteil an CD140a-positiven Zellen stieg für den Klon T1371

cl 2 nach der Einfachbehandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib um 7,7 %, während die Veränderungen nach den temozolomidhaltigen Behandlungen nur gering ausfielen.

Bei Klon T1371 cl 3 kam es zu einer messbaren Reduktion des Anteils an CD133-positiven Zellen nach alleiniger Behandlung mit 50 μ M TMZ um 4,2 %, während es nach Gabe von 5 μ M Imatinib zu einem Anstieg der CD133-positiven Zellpopulation um mehr als das 5-fache kam. Die Kombinationsbehandlung 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib hatte nur eine geringe Veränderung des Anteils an CD133-positiven Zellen zur Folge. Auch der Anteil an CD140a-positiven Zellen wurde am deutlichsten von 5 μ M Imatinib beeinflusst, während sich bei der Behandlung mit 50 μ M TMZ nur eine geringe Veränderung zeigte. So führte die Behandlung mit 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib zu einer geringen Zunahme des Anteils an CD140a-positiven Zellen um 1,6 %, die Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib zu einer Zunahme der CD140a-positiven Zellpopulation von T1371 cl 3 auf 45,2 %.

Zu einer Zunahme des Anteils an CD133-positiven Zellen nach allen Behandlungen kam es bei Klon T1371 cl 15. Dieser war mit über 60 % bei den Behandlungen mit 50 μ M TMZ und 5 μ M Imatinib am stärksten ausgeprägt. Nach der Kombinationsbehandlung mit 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib kam es zu keiner relevanten Zunahme der Anzahl CD140a-positiver Zellen. Dagegen führte die alleinige Behandlung mit 50 μ M TMZ sowie die Behandlung DMSO/5 μ M Imatinib zu einer Zunahme des Anteils CD140a-positiver Zellen auf 55,8 % bzw. 53 %.

Bei Klon T1371 cl 16 kam es zu einer Erhöhung des Anteils CD133-positiver Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle, der für die Behandlung DMSO/5 μ M Imatinib mit 23,6 % am stärksten ausgeprägt war. Nach alleiniger Behandlung mit 50 μ M TMZ war der Anstieg mit 10,9 % nur gering. Die Kombinationsbehandlung 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib steigerte den Anteil CD133-positiver Zellen um 6,3 %. Der Anteil der CD140a-positiven Zellen änderte sich bei Klon T1371 cl 16 unabhängig von der Behandlung nur wenig. Die Messwerte an CD140a-positiven Zellen betrugen für DMSO 40,9 %, für 50 μ M TMZ 47,8 %, für 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib 40,1 % und für DMSO/ 5 μ M Imatinib 42,9 %.

Insgesamt resultierte die TMZ-Behandlung in einem unterschiedlichen Verhalten der T1371 Klone. Für zwei Klone (cl 2, cl 3) wurde eine Senkung des Anteils an CD133-positiven Zellen gemessen, ein Klon (cl 16) zeigte eine nahezu invariables Verhalten und lediglich der Klon cl 15 reagierte mit einem drastischen Anstieg der Anzahl CD133-positiver Zellen. Die Mutterkulturen, die Zellen aller vier Klone enthielt, wies nach der TMZ-Gabe eine reduzierte Anzahl CD133-positiver Zellen auf. Die alleinige Behandlung mit Imatinib steigerte in allen T1371 Klonkulturen und in der T1371 Mutterkultur den Anteil CD133-positiver Zellen. Außer im Fall des Klons T1371 cl 15 lag der Anteil an CD133-positiven Zellen für die Doppelbehandlung mit 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib zwischen den Werten für die jeweiligen Einfachbehandlungen, was auf einen mehrheitlich additiven Effekt von TMZ und

Imatinib hinwies, während Imatinib der TMZ-vermittelten Steigerung der CD133-positiven Anteile entgegenwirkte und umgekehrt. Der Anteil an CD140a-positiven Zellen stieg nach Behandlung mit Imatinib nur im Fall des Kons T1371 cl 3 (nahezu 7-fach) und Klon cl 15 deutlich. Auch die Kombinationsbehandlung mit 50 μ M TMZ und 5 μ M Imatinib, wie auch die alleinige Behandlung mit 50 μ M TMZ, hatte keine bis geringe Auswirkungen auf den Anteil an CD140a-positiven Zellen in den Klonkulturen, mit Ausnahme von Klon cl 15, hier kam es zu einer Zunahme nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ. Eine weitere Ausnahme von diesem Verhalten ist die deutliche Senkung des Anteils an CD140a-positiven Zellen in der TMZ-behandelten T1371 Mutterkultur, die zudem mit einer drastisch Reduktion an CD133-positiven Zellen einherging, so dass sich die Frage stellte, ob es sich hier um eine verminderte Proliferation oder den Verlust an lebenden Zellen generell handelte. Auf die Untersuchungen zur Proliferation wird in Kapitel 3.6 eingegangen.

T1522 Mutterkultur und abgeleitete Klone

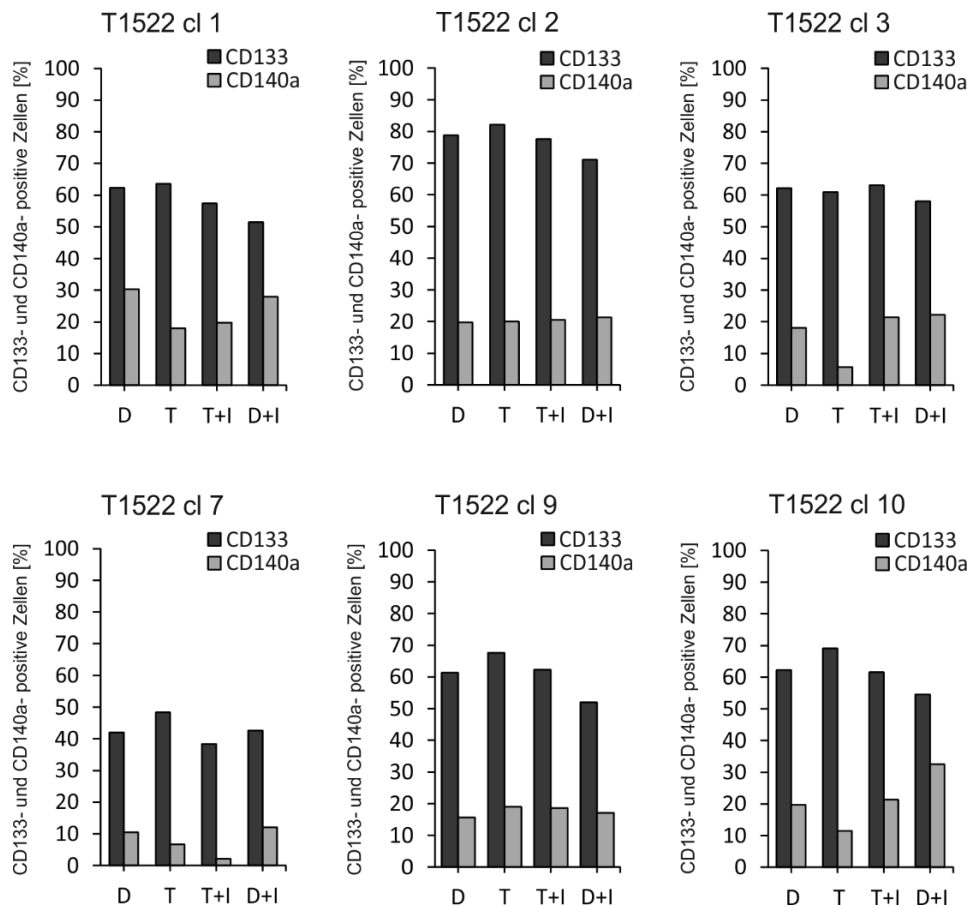


Abb. 8: Durchflusszytometrie der T1522 Zelllinie. Die Anteile der CD133- und CD140a-positiven Zellen in Prozent wurden an Tag d4 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid plus 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid plus 5 μ M Imatinib (D+I). CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor- α* ; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei Klon T1522 cl 1 ergaben sich nur geringe Veränderungen des Anteils an CD133-positiven Zellen nach den Behandlungen (Abb. 8). Für die Behandlung mit DMSO betrug der Anteil CD133-positiver Zellen 62,3 %, für 50 µM TMZ 63,6 %, für 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib 57,4 % und für DMSO/ 5 µM Imatinib 51,5 %. Der Anteil der CD140a-positiven Zellen hingegen veränderte sich nach den temozolomidhaltigen Behandlungen. Die Berechnungen bestätigten eine Abnahme der CD140a-positiven Zellpopulation nach den temozolomidhaltigen Behandlungen auf 18 % bei 50 µM TMZ und 19,8 % bei 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib, während die mit DMSO/ 5 µM Imatinib behandelte Probe keine relevanten Veränderungen zur DMSO-Kontrolle aufwies.

Klon T1522 cl 2 wies minimale Schwankungen im Bereich der CD133-positiven und CD140a-positiven Zellpopulationen auf. Der Anteil an CD133-positiven Zellen lag bei T1522 cl 2 in der DMSO-Kontrolle bei 78,8 %, unter 50 µM TMZ bei 82,2 %, unter 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib bei 77,6 % sowie bei 71,1 % unter DMSO/ 5 µM Imatinib. Der Anteil der CD140a-positiven Zellen betrug nach Behandlung mit DMSO 19,7 %, nach 50 µM TMZ 20,0 %, nach 50 µM TMZ/5 µM Imatinib 20,5 % und nach DMSO/5 µM Imatinib 21,3 %.

Auch bei Klon T1522 cl 3 zeigten sich nur geringe Schwankungen des Anteils an CD133-positiven Zellen. Bei dem Anteil der CD140a-positiven Zellen sank der berechnete Wert für die mit TMZ behandelte Kultur um beinahe ein Drittel im Vergleich zur Kontrolle auf 5,7 %. Unter der Behandlung mit DMSO/ 5 µM Imatinib hingegen zeigte sich ein Anstieg auf 22,2 % und nach der Doppelbehandlung 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib auf 21,4 %.

T1522 Klon cl 7 wies nur geringe Schwankungen in dem Anteil an CD133-positiven Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf. Imatinib allein bewirkte keine deutliche Veränderung im Anteil CD140a-positiver Zellen, während es in der Kombinationsbehandlung den Effekt von TMZ zu verstärken schien. Die TMZ-haltigen Behandlungen bei T1522 cl 7 führten zu einer Reduktion des Anteils an CD140a-positiven Zellen nach Behandlung mit 50 µM TMZ auf 6,6 % und nach 50 µM TMZ/5 µM Imatinib auf 2,1 %.

Bei T1522 Klon cl 9 führten die Behandlungen zu geringen Veränderungen der Zahl an CD133-positiven Zellen (Abb. 8). Für die DMSO-Kontrolle betrug der Wert an CD133-positiven Zellen 61,4 %, für 50 µM TMZ 67,6 %, für 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib 62,3 % und für DMSO/ 5 µM Imatinib 52,0 %. Die Anteile an CD140a-positiven Zellen von T1522 cl 9 zeigten nach den Behandlungen minimale Steigerungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Die bei T1522 Klon 10 nach den Behandlungen hervorgerufenen Änderungen in der Anzahl an CD133-positiven Zellen waren gering. Nach der Behandlung mit 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib zeigte sich kein deutlicher Unterschied an CD140a-positiver Zellpopulation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Nach

der Behandlung mit 50 μ M TMZ kam es zu einer Reduktion der CD140a-positiven Zellpopulation auf 11,5 % und unter DMSO/5 μ M Imatinib zu einem Anstieg des Anteils an CD140a-positiven Zellen auf 32,5 %, dies konnte auch in den Punktwolkendiagrammen nachvollzogen werden.

Insgesamt wurden in den oben beschriebenen Experimenten Anreicherungen und Eliminierungen von CD133-positiven Zellen nach Gabe von 50 μ M TMZ beobachtet. Dabei verhielten sich sogar die verschiedenen Subklone, die sich von ein und derselben Mutterkultur ableiteten, unterschiedlich. Ein heterogenes Verhalten wurde ebenfalls für die Anwesenheit von CD140a-positiven Zellen festgestellt, wobei es hier in der Mehrheit der Fälle (insbesondere bei T1371 Klonen) zu einer Anreicherung an CD140a-positiven Zellen nach der Imatinib-Behandlung kam.

T1586 Mutterkultur und abgeleitete Klone

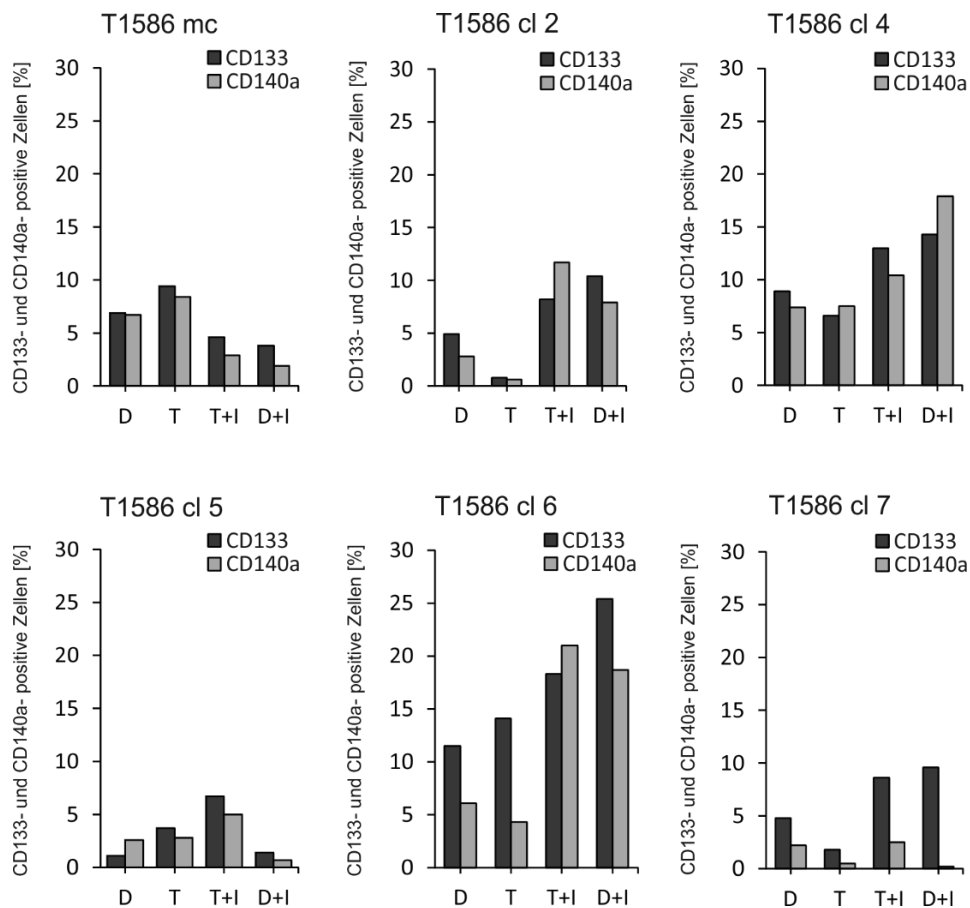


Abb. 9: Durchflusszytometrie der T1586 Zelllinie. Die Anteile der CD133- und CD140a-positiven Zellen in Prozent wurden an Tag d4 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid plus 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid sowie 5 μ M Imatinib (D+I). CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor- α* ; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die T1586 Mutterkultur wies nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ einen um 2,5 % höheren Anteil an CD133-positiven Zellen als die DMSO-Kontrollprobe (Abb. 9). Die Imatinib-haltigen Behandlungen führten zu einer Reduktion der CD133-positiven Zellpopulation auf 4,6 % nach 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und 3,8 % nach DMSO/5 μ M Imatinib. Der Anteil der CD140a-positiven Zellen der T1586 Mutterkultur stieg nach alleiniger Behandlung mit 50 μ M TMZ auf 8,4 %, während die Imatinib-haltigen Behandlungen zu einem Abfall führten auf 2,9 % bei 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und auf 1,9 % bei DMSO/5 μ M Imatinib.

Bei der Behandlung mit 50 μ M TMZ kam es zu einer relevanten Reduktion des Anteils an CD133-positiven Zellen auf 0,8 % bei Klon T1586 cl 2, während die Kombinationsbehandlung den Anteil an CD133-positiven Zellen um 3,3 % steigerte und es bei der alleinigen Behandlung mit Imatinib zu einer Verdoppelung kam. Nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ waren für den Klon T1586 cl 2 kaum noch CD140a-positive Zellen nachweisbar. Die Imatinib-haltigen Behandlungen führten dagegen zu einer Steigerung des Anteils an CD140a-positiven Zellen auf 11,7 % nach 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und 7,9 % nach DMSO/5 μ M Imatinib.

T1586 cl 4 zeigte unter der Behandlung mit 50 μ M TMZ eine Verringerung des Anteils an CD133-positiven Zellen auf 6,6 %, während die Imatinib-haltigen Behandlungen zu einer Steigerung der CD133-positiven Zellpopulation um 4,1 % bei 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib und um 5,4 % bei alleiniger Behandlung mit Imatinib führten. Der Anteil an CD140a-positiven Zellen von T1586 cl 4 nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ war relativ zur DMSO-Kontrolle invariant. Die Imatinib-haltigen Behandlungen führten zu einem Anstieg um 3 % bei der Kombinationsbehandlung 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib und auf das 1,5 fache der Kontrolle bei DMSO/5 μ M Imatinib.

Bei T1586 Klon cl 5 trat nach allen Behandlungen ein erhöhter Anteil an CD133-positiven Zellen auf. Unter 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib kam es zum stärksten Anstieg (6-fach). Der Anstieg bei DMSO/ 5 μ M Imatinib war mit einer Erhöhung um 0,3 % am geringsten ausgeprägt (Abb. 9). Unter der Behandlung mit 50 μ M TMZ blieben die Anteile an CD140a-positiven Zellen für T1586 Klon 5 invariant bei 2,8 %. Bei der Kombination 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib kam es zu einer Verdopplung auf 5 %. Die Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib führte zu einer Verminderung der CD140a-positiven Zellpopulation um mehr als ein Drittel auf 0,7 %.

T1586 Klon 6 wies nach allen Behandlungen eine Steigerung der CD133-positiven Zellpopulation auf. Bei der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib wurden die Werte mehr als verdoppelt. Nach Behandlung mit 50 μ M TMZ stiegen sie um 2,6 % und bei 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib um 6,8 %. Der Anteil an CD140a-positiven Zellen fiel bei Klon T1586 cl 6 nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ auf 4,3 %, die beiden Imatinib-haltigen Behandlungen führten dagegen zu einem Anstieg der CD140a-

positiven Zellpopulation auf 21 % bei 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und 18,7 % bei DMSO/5 μ M Imatinib.

Bei T1586 Klon 7 führte die Behandlung mit 50 μ M TMZ zu einer Reduktion des Anteils an CD133-positiven Zellen auf 1,8 %. Dieses Ergebnis war nur eingeschränkt verwertbar, da weniger als die notwendigen 10^4 Ereignisse in dieser durchflusszytometrischen Analyse gezählt werden konnten. Beide Imatinib-haltigen Behandlungen führten zu einer ähnlichen Steigerung der CD133-positiven Zellpopulation auf beinahe die doppelte Menge. Nach Behandlung von T1586 cl 7 mit 50 μ M TMZ fiel der Anteil an CD140a-positiven Zellen auf 0,5 %. Dieses Ergebnis war nur eingeschränkt verwertbar, da wiederum zu wenige Zellen für die Messung verfügbar waren. Die Behandlung mit 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib zeigte sich mit 2,5 % invariant gegenüber der DMSO-Kontrolle. Unter der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib wurde eine relevante Senkung der CD140a-Zellzahl auf 0,2 % beobachtet.

Insgesamt zeigte sich, dass die Sensitivität von T1586 Klonen gegenüber Imatinib und TMZ unterschiedlich war und auch vom Verhalten der Mutterkultur abwich, sodass es nach der identischen Behandlung je nach Klon/Kultur zu einer positiven oder negativen Selektion von CD133- und/oder CD140a-positiven Zellen kam.

Überblick und Fazit zu den Durchflusszytometrischen Analysen

Abschließend zu den detaillierten Darstellungen der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sollen die erhobenen Daten noch einmal in zwei Tabellen und im Text zusammengefasst werden.

Tab. 12: Anteil CD133-positiver Zellen in % in mit TMZ und/oder Imatinib behandelten Kulturen

Zelllinie	Klone	DMSO	50 µM TMZ	50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib	DMSO/ 5 µM Imatinib
T1442	MC	16,5 %	27,0 % (↑)	22,5 % (↑)	15,7 % (∼)
T1371	MC	15,5 %	6,4 % (↓)	28,2 % (↑)	41,3 % (↑)
	Cl 2	30,9 %	26,8 % (∼)	35,7 % (∼)	47,4 % (↑)
	Cl 3	9,1 %	4,9 % (↓)	9,5 % (∼)	54,4 % (↑)
	Cl 15	18,7 %	61,9 % (↑)	34,6 % (↑)	65,5 % (↑)
	Cl 16	8,2 %	10,9 % (↑)	14,5 % (↑)	23,6 % (↑)
T1552	Cl 1	62,5 %	63,6 % (∼)	57,4 % (∼)	51,5 % (↓)
	Cl 2	78,8 %	82,2 % (∼)	77,6 % (∼)	71,1 % (∼)
	Cl 3	62,2 %	60,9 % (∼)	63,1 % (∼)	58,1 % (∼)
	Cl 7	42,0 %	48,3 % (∼)	38,3 % (∼)	42,6 % (∼)
	Cl 9	61,4 %	67,6 % (∼)	62,3 % (∼)	52,0 % (∼)
	Cl 10	62,3 %	69,1 % (∼)	61,6 % (∼)	54,6 % (∼)
T1586	MC	6,9 %	9,4 % (↑)	4,6 % (↓)	3,8 % (↓)
	Cl 2	4,9 %	0,8 % (↓)	8,2 % (↑)	10,4 % (↑)
	Cl 4	8,9 %	6,6 % (↓)	13,0 % (↑)	14,3 % (↑)
	Cl 5	1,1 %	3,7 % (↑)	6,7 % (↑)	1,4 % (↑)
	Cl 6	11,5 %	14,1 % (↑)	18,3 % (↑)	25,4 % (↑)
	Cl 7	4,8 %	1,8 % (↓)	8,6 % (↑)	9,6 % (↑)

DMSO, Dimethylsulfoxid; TMZ, Temozolomid, (∼) Veränderung im Bereich der Variationen bei wiederholter Testung; (↓), Senkung des Anteils CD133-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle; (↑) Anstieg des Anteils CD133-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle; CD133, Prominin-1; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die TMZ- nicht aber die Imatinib-Behandlung führte in der T1442 Mutterkultur zu einer deutlichen Anreicherung von CD133-positiven Zellen. Die T1371 Mutterkultur reagierte auf die TMZ-Gabe mit einer deutlichen Senkung des Anteils an CD133-positiven Zellen, während Imatinib diesen drastisch erhöhte und die Werte der Doppelbehandlung dazwischen lagen. Ähnlich verhielten sich die Klone T1371 cl 3 und partiell T1371 cl 2. Dagegen bewirkte die TMZ-Behandlung im Falle des Klons T1371 cl 16, aber besonders für T1371 cl 15 die Anreicherung der CD133-positiven Zellen. Eine Anreicherung der CD133-positiven Zellen bewirkte auch die alleinige Gabe von Imatinib, ein additiver Effekt war nicht evident. Im Fall von T1522 standen nur Klone, nicht aber die Mutterkultur zur Verfügung. Alle T1522 Klone, mit Ausnahme von T1522 cl 7, enthielten sehr hohe Anteile an CD133-positiven Zellen. Im Fall der T1586-Mutterkultur und Klone wurden jeweils nur niedrige Anteile von CD133-

positiven Zellen ermittelt, die im Fall der Klone T1586 cl 4 und cl 6 durch 5 μ M Imatinib auf ca. 15 % bzw. 25 % gesteigert wurden, während TMZ unterschiedliche Effekte hatte (Tab. 12).

Tab. 13: Anteil CD140a-positiver Zellen in % in mit TMZ und/oder Imatinib behandelten Kulturen

Zelllinie	Klone	DMSO	50 μ M TMZ	50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib	DMSO/ 5 μ M Imatinib
T1442	MC	20,0 %	40,3 % (↑)	54,8 % (↑)	27,0 % (↑)
T1371	MC	48,1 %	31,5 % (↓)	52,4 % (≈)	55,9 % (≈)
	Cl 2	22,8 %	21,1 % (≈)	26,6 % (≈)	30,5 % (↑)
	Cl 3	6,3 %	5,9 % (≈)	7,9 % (≈)	45,2 % (↑)
	Cl 15	39,0 %	55,8 % (↑)	40,8 % (≈)	53,0 % (↑)
	Cl 16	40,9 %	47,8 % (≈)	40,1 % (≈)	42,9 % (≈)
T1552	Cl 1	30,3 %	18,0 % (↓)	19,8 % (↓)	28,0 % (≈)
	Cl 2	19,7 %	20,0 % (≈)	20,5 % (≈)	21,3 % (≈)
	Cl 3	18,1 %	5,7 % (↓)	21,4 % (≈)	22,2 % (↑)
	Cl 7	10,5 %	6,6 % (↓)	2,1 % (↓)	12,1 % (≈)
	Cl 9	15,6 %	19,0 % (≈)	18,6 % (≈)	17,1 % (≈)
	Cl 10	19,7 %	11,5 % (↓)	21,4 % (≈)	32,5 % (↑)
T1586	MC	6,7 %	8,4 % (≈)	2,9 % (↓)	1,9 % (↓)
	Cl 2	2,8 %	0,6 % (↓)	11,7 % (↑)	7,9 % (↑)
	Cl 4	7,4 %	7,5 % (≈)	10,4 % (↑)	17,9 % (↑)
	Cl 5	2,6 %	2,8 % (≈)	5,0 % (↑)	0,7 % (↓)
	Cl 6	6,1 %	4,3 % (↓)	21,0 % (↑)	18,7 % (↑)
	Cl 7	2,2 %	0,5 % (↓)	2,5 % (≈)	0,2 % (↓)

DMSO, Dimethylsulfoxid; TMZ, Temozolomid, (≈) Veränderung im Bereich der Variationen bei wiederholter Testung; (↓), Senkung des Anteils CD140a-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle; (↑) Anstieg des Anteils CD140a-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle; CD140a, *platelet-derived growth factor- α* ; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Der Anteil an CD140a-positiven Zellen stieg in der SLGC-Linie T1442 nach allen Behandlungen, am effizientesten nach der TMZ-Behandlung (2-fach) und insbesondere der TMZ/Imatinib-Doppelbehandlung (ca. 2,7-fach). Der Anteil an CD140a-positiven Zellen in der T1371 Mutterkultur lag deutlich über dem Anteil an CD140a-positiven Zellen der anderen untersuchten Klone. Die Responsivität der T1371 Zelllinie gegenüber TMZ war sehr heterogen. So sank der Anteil CD140a-positiver Zellen bei der Mutterkultur um 16,6 % und stieg bei Klon cl 15 um das 1,4 fache an, während er sich bei den restlichen untersuchten Klonen wenig veränderte (cl 2, cl 3, cl 16). Die alleinige Gabe von Imatinib steigerte den Anteil an CD140a-positiven Zellen zwischen wenig (cl 16, mc), über moderat (cl 2, cl 15) bis drastisch (cl 3: 7-facher Anstieg). Ein additiver Effekt der Doppelbehandlung mit TMZ und Imatinib war nicht evident. Im Fall des Klons cl 3 wurde der Imatinib-bedingte Anstieg an CD140a-positiven Zellen sogar durch TMZ aufgehoben.

Vier von sechs der untersuchten T1522-Klone wiesen ähnliche Anteile an CD140a-positiven Zellen auf (15,6 % - 19,7 %), der Anteil bei cl 7 lag etwas darunter (10,5 %), der Anteil bei cl 1 war dagegen annähernd doppelt so hoch. Die Behandlung mit 5 μ M Imatinib hatte nur bei Klon T1522 cl 3 und cl 10 einen deutlichen Effekt und führte zum Anstieg der CD140a-positiven Zellpopulation (Tab. 13). Die Gabe von 50 μ M TMZ reduzierte in vier von sechs Klonen (T1522 cl 1, cl 3, cl 7, cl 10) den Anteil an CD140-positiven Zellen deutlich (Tab. 13), während für zwei Klone (cl 2, cl 9) nur geringe Veränderungen festgestellt wurden. In der Doppelbehandlung dominierte für die Klone cl 1, cl 2, cl 9 und cl 10 der TMZ-Effekt. Dagegen hob im Fall von T1522 cl 3 Imatinib den Effekt von TMZ auf. Im Fall von T1522 cl 7 reduzierte die Co-Applikation von TMZ mit Imatinib den Anteil von CD140a-positiven Zellen auf Werte an der Detektionsgrenze, während Imatinib allein nur wenig Effekt hatte.

Die T1586 Mutterkultur und untersuchten Klonkulturen enthielten nur geringe Mengen an CD140a-positiven Zellen (<7,5 %), deren Anzahl im Fall der Klone T1586 cl 2, cl 6 und cl 7 durch 50 μ M TMZ noch weiter reduziert wurde. Eine deutliche Steigerung (2,5 - 3-fach) an CD140a-positiven Zellen wurde mit Imatinib in Kulturen der Klone cl 2, cl 4 und cl 6 bewirkt, während der Anteil CD140a-positiver Zellen in der Mutterkultur und für den Klon T1586 cl 5 sank. Die Werte für die Co-Applikation von TMZ und Imatinib lagen zwischen denen der Einfachbehandlungen, mit Ausnahme T1586 cl 2, cl 5 und cl 6; hier kam es zu einer Steigerung der CD140a-positiven Zellen.

Insgesamt ist das Antwortverhalten aller SLGC-Mutterkulturen und Klone heterogen. Dennoch lässt sich eine Tendenz zur Steigerung der Anzahl CD140a-positiver Zellen nach Gabe von 5 μ M Imatinib ableiten, sowie ein invarianter bis negativer Effekt nach Gabe von 50 μ M TMZ.

3.3 Beeinflussung der PDGFR- α - und PDGFR- β -Expression durch die Behandlung

Da die Wirkung von Imatinib über die PDGF-Rezeptoren α und β erfolgen kann, umgekehrt aber auch Imatinib die Stabilität von PDGF-Rezeptoren beeinflussen könnte, wurden die Mutterkulturen und Klone mit TMZ und/oder Imatinib behandelt und danach die Expression der PDGF-Rezeptoren α und β mittels Westernblots untersucht. Zur besseren Übersicht wurden die Werte der DMSO-Kontrollen auf 1 normiert und die behandelten Proben desselben Klons im Verhältnis dazu graphisch dargestellt.

Mit dem Antikörper gegen den PDGFR- α konnten mehrere Banden nachgewiesen werden. Dabei wurden zusätzlich zu dem Volle-Länge-Protein, das als Duplett (bzw. Triplett) bei 160-180 kDa detektiert wurde, noch weitere Banden bei 50-70 kDa sowie 35-40 kDa nachgewiesen (Abb. 42, Anhang). Auffällig war, dass bei den Klonen der Zelllinien T1522 und T1586 sowie bei der T1586 Mutterkultur die Bande zwischen 50-70 kDa stärker ausgeprägt war als das Duplett/Triplett bei 160-180 kDa. Bei den T1522 Klonen war auch die Bande bei 35-40 kDa sehr stark ausgeprägt, während diese

bei T1586 kaum nachweisbar war. Im Fall der T1371 Mutterkultur und Klone sowie der T1442 Mutterkultur war die Bande mit mittlerem und niedrigen Molekulargewicht ebenfalls nachweisbar, allerdings war das Signal wesentlich schwächer als bei T1522 und T1586, (Abb. 42, Anhang). Da unbekannt ist, ob es sich bei den verkürzten Banden um funktionelle, verkürzte Rezeptoren oder Abbauprodukte des PDGFR- α handelte, wurde nur das Duplett/Triplett bei 160-180 kDa quantifiziert. Bei den Blots mit dem PDGFR- β Antikörper wurden ebenfalls zusätzlich zu dem Volle-Länge-Protein niedermolekulare Banden unbekannter Herkunft detektiert (Abb. 43, Anhang). Auch bei PDGFR- β wurde nur die Doppelbande (180-190 kDa) quantifiziert und im Folgenden besprochen.

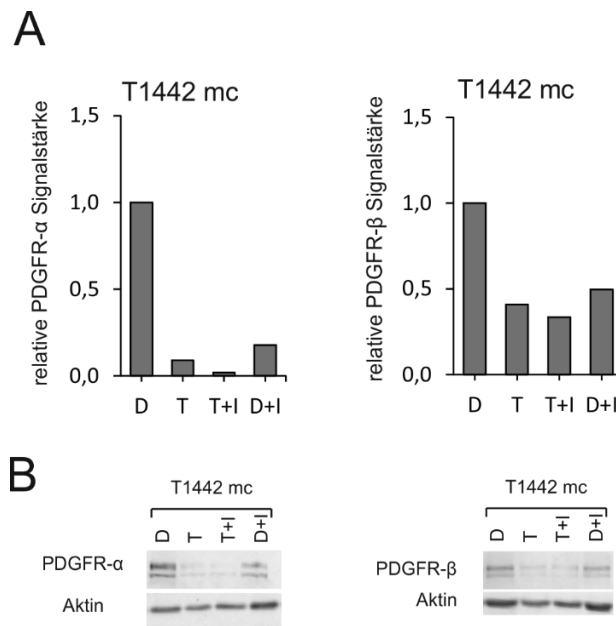


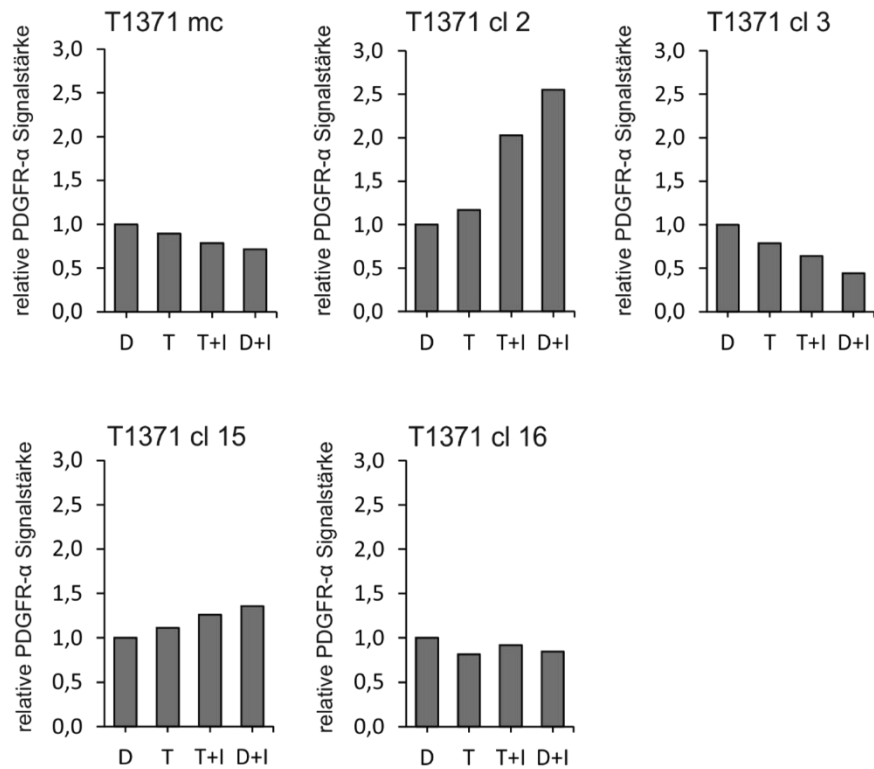
Abb. 10: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α und β in der T1442 Mutterkultur der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; mc, Mutterkultur.

Die SLGC-Linie T1422 exprimierte sowohl PDGFR- α als auch PDGFR- β (Abb. 10 B). Die Blots ergaben nach allen Behandlungen eine Verminderung der PDGFR- α -Level um mehr als ein Fünftel. Die Doppelbehandlung 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib senkte das PDGFR- α -Level am stärksten. Auch 5 μ M Imatinib allein bewirkte eine drastische Senkung um 80 %, die weniger stark war als die mit 50 μ M TMZ allein. Somit kooperierten 50 μ M TMZ und 5 μ M Imatinib hinsichtlich der Senkung der PDGFR- α -Expression, ohne dass die Effekte synergistisch waren.

Auch bei der relativen PDGFR- β -Expression der T1442 Mutterkultur konnte ein Rückgang in der Signalintensität um mehr als die Hälfte nach den Behandlungen festgestellt werden (Abb. 10 A). Dabei

war auch hier der Rückgang bei den mit 50 μ M TMZ behandelten Proben stärker als mit 5 μ M Imatinib. Die gleichzeitige Applikation von TMZ/Imatinib erreichte noch eine geringfügig höhere Senkung als 50 μ M TMZ allein (Abb. 10 A).

A



B

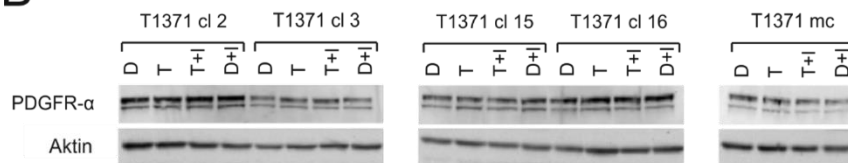


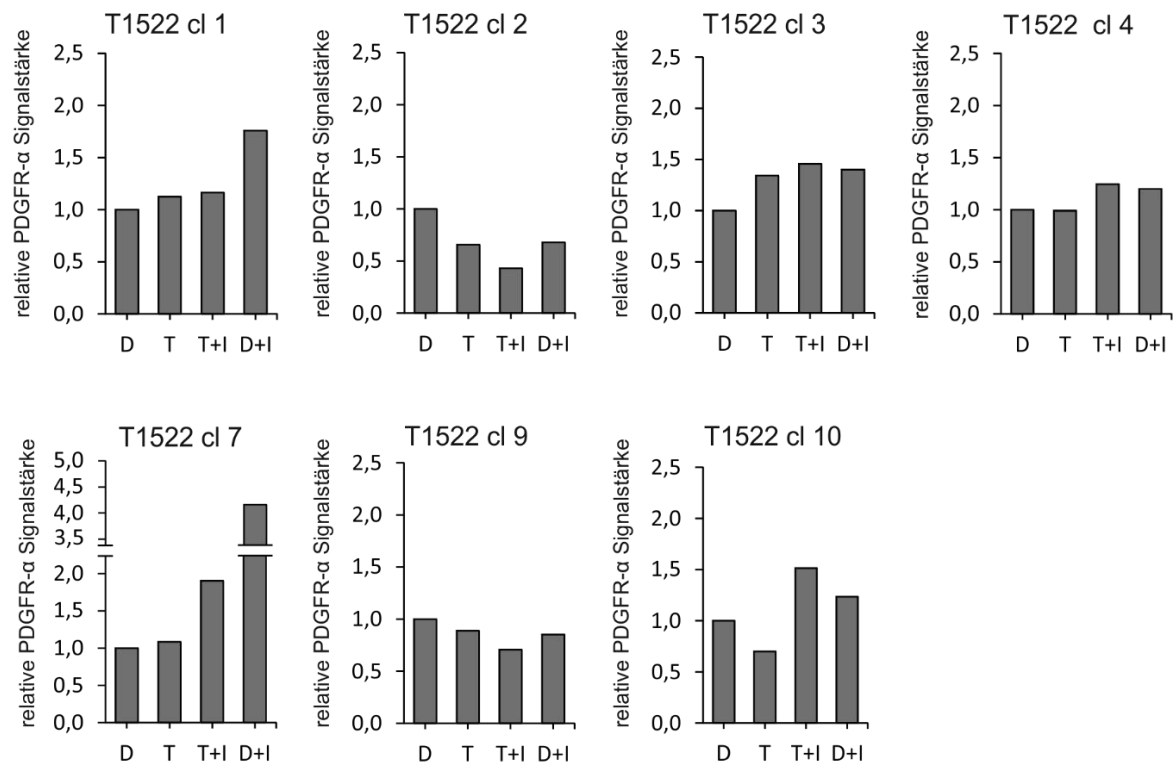
Abb. 11: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Sowohl die T1371 Mutterkultur als auch die Klone exprimierten PDGFR- α , wobei die relativen Expressionslevel in den Klonen T1371 cl 2 und cl 16 am höchsten waren (Abb. 11 A, B). Bei der T1371 Mutterkultur wurde eine geringe Abnahme der relativen PDGFR- α -Expression insbesondere nach der Einfachbehandlung mit Imatinib festgestellt. Die Veränderung nach Gabe von 50 μ M TMZ war

kleiner als 10 % und lag im Bereich der Variation zwischen identischen, parallelen Proben. Die relative PDGFR- α -Expression nach Doppelbehandlung lag zwischen denjenigen der Einfachbehandlungen (Abb. 11). Die Quantifizierung ergab für den Klon T1371 cl 2 einen Anstieg der PDGFR- α -Signalstärke nach den Behandlungen. Dabei betrug der Anstieg nach alleiniger Behandlung mit 50 μ M TMZ das 1,2 fache der Kontrolle (Abb. 11 A). Nach den Imatinib-Behandlungen war die relative PDGFR- α -Expression deutlich gestiegen; um das Doppelte bei der Behandlung mit 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib, bzw. 2,5-fache bei der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib. Für den Klon T1371 cl 3 wurde in allen Fällen ein schwächeres PDGFR- α -Signal als für den Klon cl 2 detektiert (Abb. 11 B). Nach den Behandlungen kam es zu einer Abnahme der PDGFR- α -Signalstärke. Dabei war die Senkung nach Gabe von 50 μ M TMZ geringer als nach Behandlung mit TMZ/ 5 μ M Imatinib. Nach Gabe von 5 μ M Imatinib allein sank die Signalstärke um über die Hälfte (Abb. 11 A). Auch der Klon T1371 cl 15 zeigte ein schwächeres PDGFR- α -Signal als der Klon cl 2. Die Quantifizierung ergab geringe Änderungen der PDGFR- α -Expression, wobei es sich um eine geringe Zunahme der Expressionslevel nach Gabe von TMZ und TMZ/Imatinib und insbesondere 5 μ M Imatinib allein handelte (Abb. 11 A). T1371 Klon 16 zeigte eine ähnlich starke PDGFR- α -Expression wie Klon 2. Nach den Behandlungen blieb diese nahezu unverändert (Abb. 11 A).

Insgesamt hatten, mit Ausnahme des Klons T1371 cl 2, weder die TMZ- noch die Imatinib-Behandlung noch die TMZ-/Imatinib-Doppelbehandlung deutliche Effekte auf das Expressionslevel des PDGFR- α Volle-Länge-Proteins in den untersuchten T1371-Kulturen (Mutterkultur und Klone).

A



B

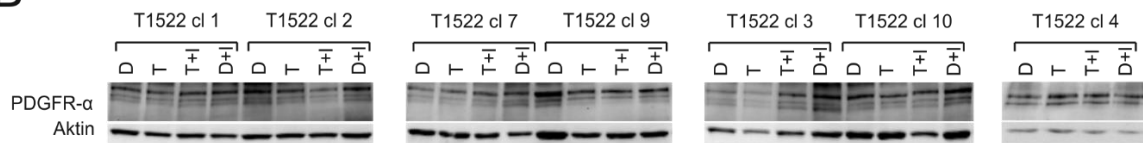


Abb. 12: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei T1522 Klon cl 1 veränderte sich nach Gabe von TMZ die relative PDGFR- α -Expression nur geringfügig, ebenso bei der Doppelbehandlung. Nach der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib kam es zu einer Zunahme der Signalstärke auf fast das 1,8-fache der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 12 A, B). Bei Klon cl 2 führten alle Behandlungen zur Senkung der PDGFR- α -Expression, die nach der Kombinationsbehandlung mit TMZ/5 μ M Imatinib am stärksten ausgeprägt war (Abb. 12). Der Klon T1522 cl 3 wies nach den Behandlungen einen Anstieg der relativen PDGFR- α -Expression um das 1,3- bis 1,4-fache auf. Zwischen den verschiedenen Behandlungen zeigten sich jedoch nur geringe Unterschiede (Abb. 12). Bei Klon cl 4 kam es nach den Behandlungen nur zu kleinen Änderungen im PDGFR- α -Expressionslevel (Abb. 12). Bei T1522 Klon cl 7 zeigte sich nach den Behandlungen mit

TMZ/Imatinib und insbesondere Imatinib allein (mehr als das 4-fache der Kontrollprobe) eine Erhöhung der PDGFR- α -Expression (Abb. 12 A). Bei Klon cl 9 kam es nach den Behandlungen nur zu geringen Veränderungen der relativen PDGFR- α -Expression, die in einer geringen Senkung resultierten (Abb. 12). Bei Klon cl 10 kam es nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ zu einem geringen Abfall der PDGFR- α -Expression und nach den Behandlungen mit TMZ/Imatinib und Imatinib allein zu einem geringen Anstieg (Abb. 12).

Insgesamt waren die Effekte von TMZ und Imatinib auf die relative Expression des PDGFR- α Voll-Länge-Proteins gering. Allerdings zeigten die Klone cl 1, cl 3 und cl 10, aber insbesondere Klon cl 7 eine geringe Steigerung der PDGFR- α -Levels nach Behandlung mit 5 μ M Imatinib und/oder TMZ/Imatinib, wobei diese nur im Fall des Klons cl 7 einen Wert von 4 überstieg (Abb. 12 A).

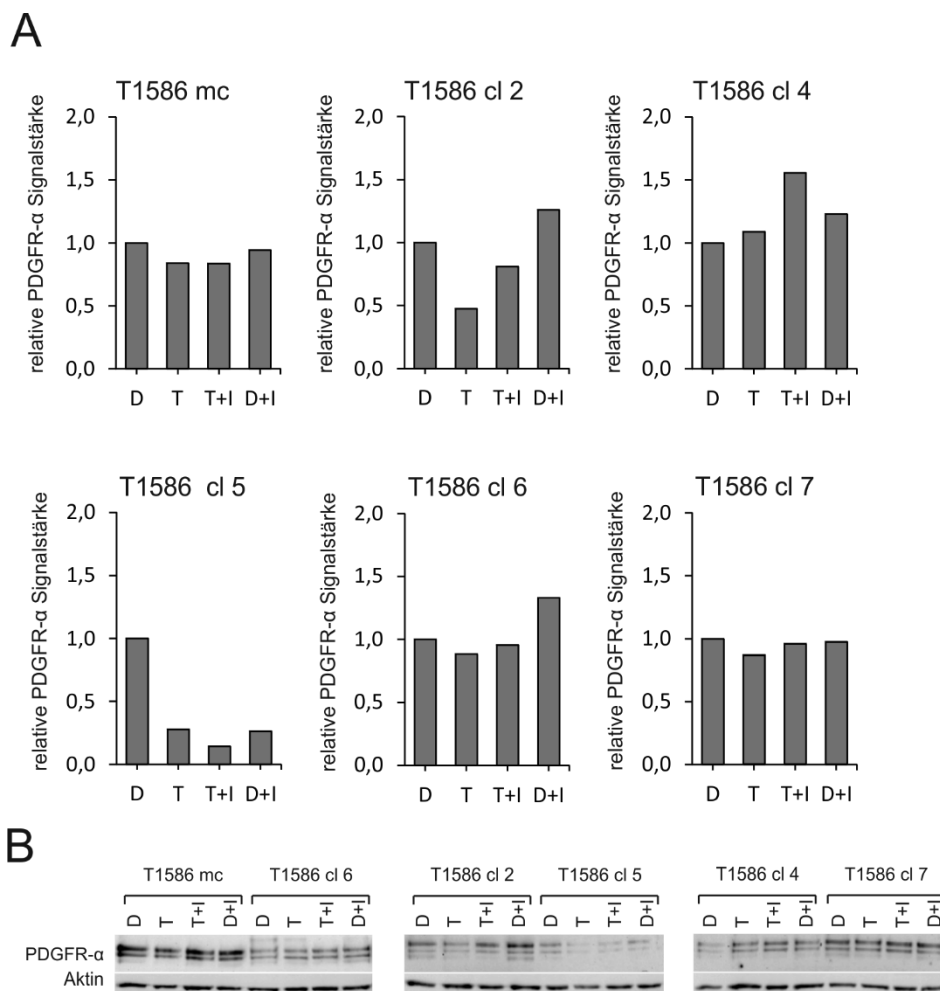


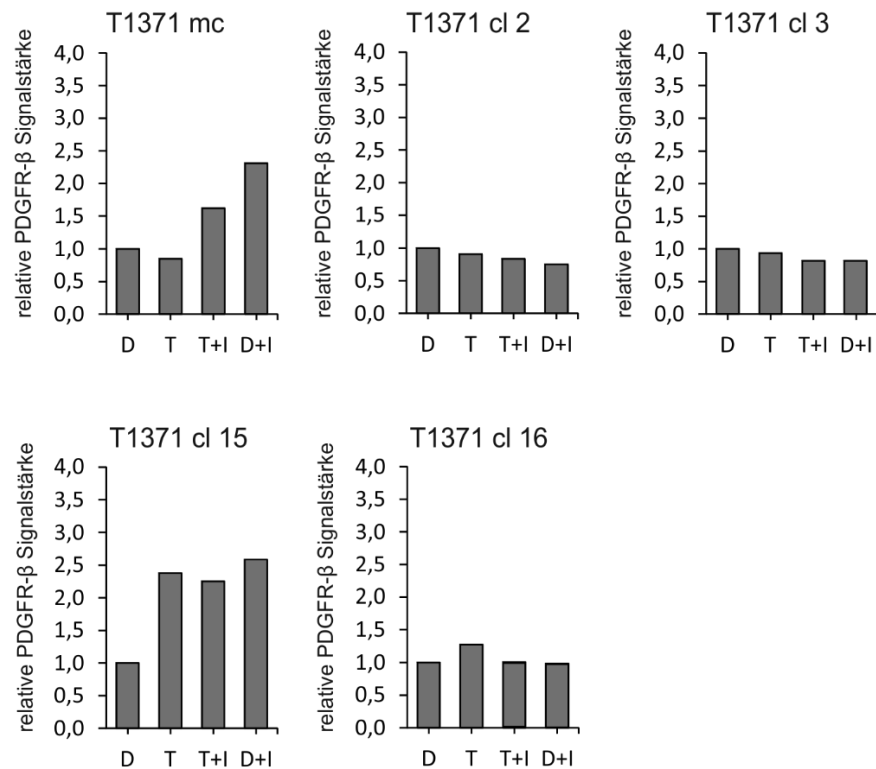
Abb. 13: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren α in der T1586 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Pro-

ben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die T1586 Mutterkultur wies relativ zu den untersuchten T1586 Klonen die höchste PDGFR- α -Expression auf. Bei der T1586 Mutterkultur änderte sich die PDGFR- α -Expression nach den Behandlungen nur sehr geringfügig (Abb. 13 A, B). Im Fall des Klons T1586 cl 2 führte die Behandlung mit TMZ und TMZ/Imatinib zu einer Senkung der relativen PDGFR- α -Signalstärke. Die alleinige Behandlung mit Imatinib hingegen führte zu einem Anstieg der PDGFR- α -Expression (Abb. 13 A). Bei Klon cl 4 veränderte sich die relative PDGFR- α -Signalstärke nach der Kombinationsbehandlung mit TMZ und Imatinib, die in einem moderaten Anstieg um ca. 50 % resultierte. Klon cl 5 zeigte nach den Einfachbehandlungen mit TMZ und Imatinib und der Kombinationsbehandlung eine Senkung des relativen PDGFR- α -Signalstärkelevels auf weniger als ein Drittel der DMSO-Kontrolle. Bei Klon cl 6 führte die Behandlung mit Imatinib zu einer geringfügig höheren PDGFR- α -Expression (Abb. 13 A). Bei T1586 Klon cl 7 kam es wie bei der Mutterkultur zu keiner deutlichen Änderung der PDGFR- α -Expression nach den Behandlungen (Abb. 13).

Insgesamt variierte die PDGFR- α -Expression zwischen den Klonen und war in der T1586 Mutterkultur am höchsten. Deutliche Veränderungen des PDGFR- α -Levels nach den Behandlungen waren für die Klone T1586 cl 2 und cl 5, sowie weniger deutlich für T1586 cl 4 und cl 6, zu beobachten. Dabei wurde für die Klone cl 2 und cl 6 ein Anstieg des PDGFR- α -Levels nach Gabe von 5 μ M Imatinib evident. Im Falle des Klons cl 5, der ohnedies das niedrigste PDGFR- α -Level aufwies, bewirkten alle Behandlungen eine Verminderung des Signals im Blot.

A



B

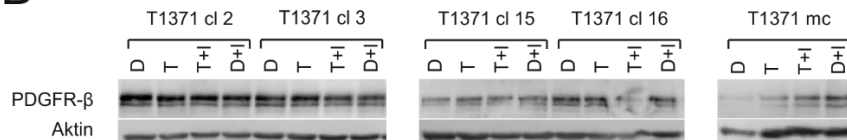


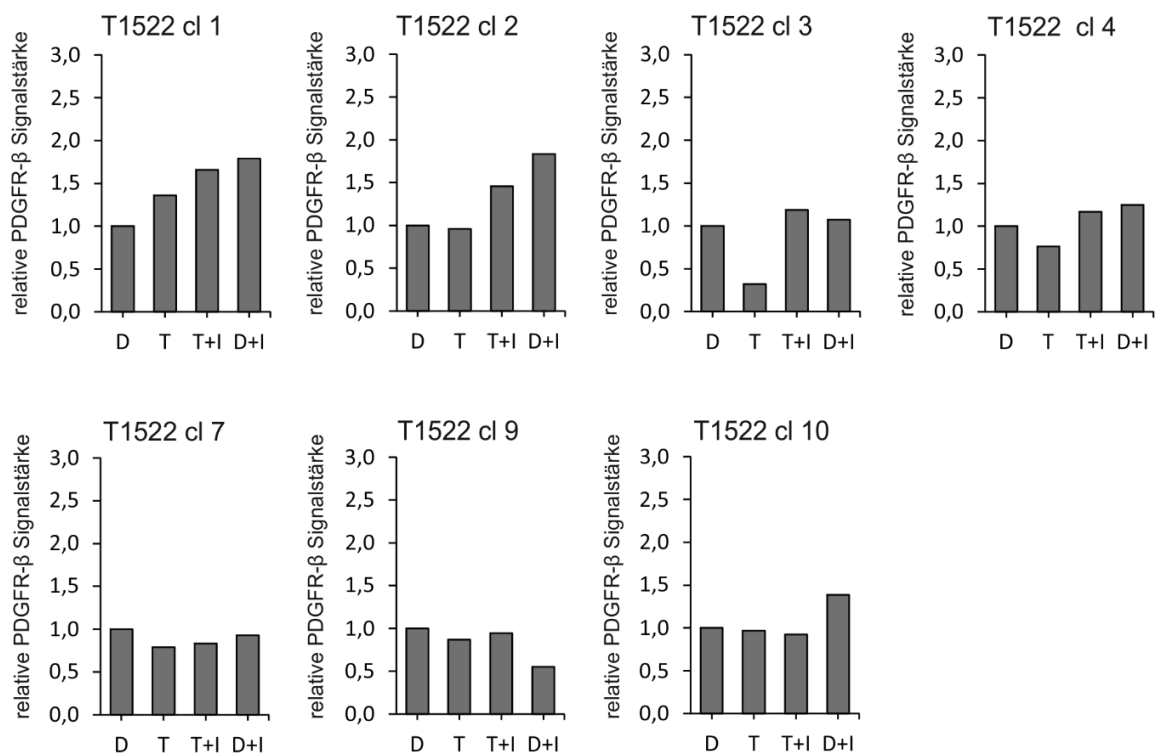
Abb. 14: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in der T1371 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die Untersuchung der PDGFR- β -Expression in der T1371 Mutterkultur ergab nach Behandlung mit 50 μ M TMZ keine Veränderung, während nach Behandlung mit Imatinib allein und TMZ/Imatinib ein deutlicher Anstieg des PDGFR- β -Levels festgestellt wurde. Die Ergebnisse wurden durch das technische Replikat (nicht gezeigt) bestätigt (Abb. 14 A, B). Bei den T1371 Klonen cl 2 und cl 3 kam es nach den Behandlungen zu keiner nennenswerten Änderung der relativen Signalstärke. Leider waren die Westernblots zur Analyse der Klone T1371 cl 15 und cl 16 nicht frei von Artefakten, die jedoch primär den unteren Bereich des Blots betrafen, was für die Bewertung der Volle-Länge-Protein-Expression nicht relevant war (Abb. 43, Anhang). Die Quantifizierung der in Abb. 14 gezeigten Blots legten die Vermutung nahe, dass alle Behandlungen von cl 15 das PDGFR- β -Level steigerten.

Dabei ergab sich die Zunahme des Wertes vor allem daraus, dass das Signal der Ladekontrolle Aktin für die Proben TMZ/ Imatinib und Imatinib relativ zu der Kontrolle reduziert war (Abb. 14 B). Für den Klon T1371 cl 16 ergab sich rechnerisch kein Anstieg der relativen PDGFR- β -Expression nach den Behandlungen. Die Banden für die Probe TMZ und Imatinib im Blot für Klon cl 16 wiesen Artefakte auf, weshalb die Berechnung des relativen PDGFR- β -Levels anhand des technischen Replikats erfolgte.

Insgesamt war das PDGFR- β -Level in den Klonen T1371 cl 15 und cl 16 und in der Mutterkultur gering, in den Klonen T1371 cl 2 und cl 3 deutlich höher. Ein Einfluss der Behandlungen war nur für die Mutterkultur und den Klon cl 15 evident, wobei es sich bei der Mutterkultur primär um eine Imatinib-induzierte Steigerung des PDGFR- β -Levels handelte.

A



B

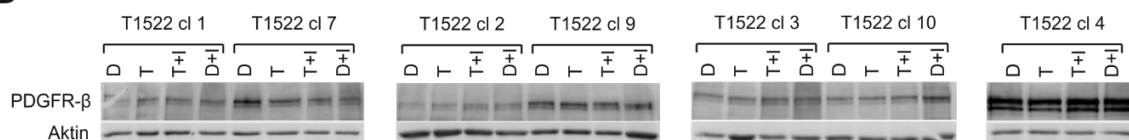


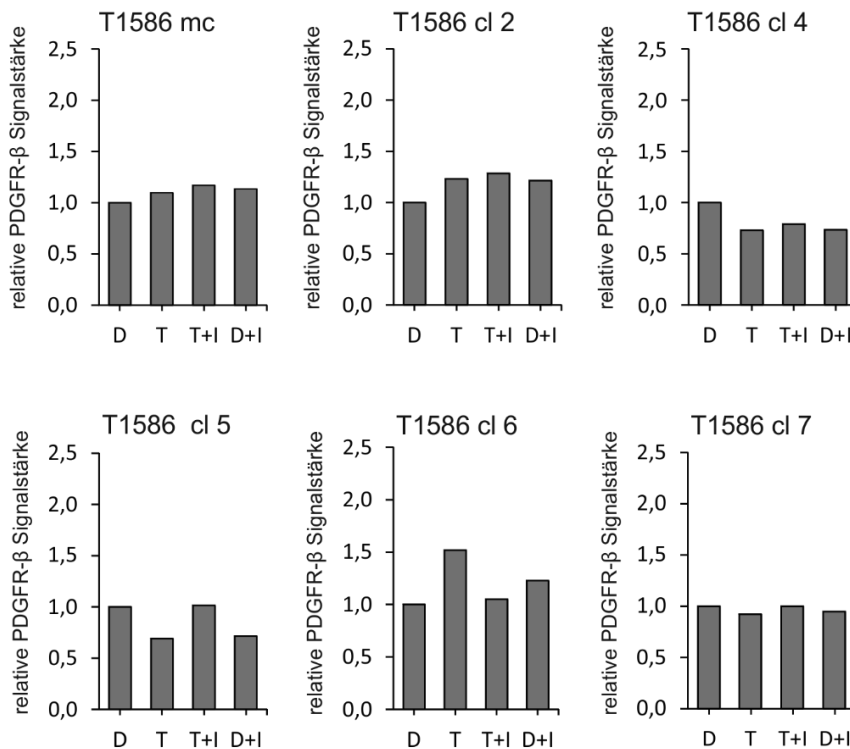
Abb. 15: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor

wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bis auf den Klon cl 4 zeigten alle T1522 Klone eine geringe Signalstärke für PDGFR- β (Abb. 15 B). Bei T1522 Klon cl 1 kam es nach den Behandlungen zu einer Steigerung des PDGFR- β Signals, wobei dies in der mit Imatinib behandelten Probe am stärksten war (Abb. 15 A, B). Bei Klon cl 2 wurde nach der Behandlung mit Imatinib ein Anstieg der relativen PDGFR- β -Signalstärke beobachtet, der weniger stark auch in der TMZ/Imatinib-Behandlung erkennbar war (Abb. 15). T1522 Klon cl 3 zeigte eine Senkung der relativen PDGFR- β -Expression bei den mit 50 μ M TMZ behandelten Zellen auf ein Drittel relativ zur Kontrolle. Nach den Behandlungen mit Imatinib oder TMZ/Imatinib kam es zu keinen deutlichen Veränderungen der Signalstärke. Optisch glichen sich die Signalstärkenlevel in den Spuren TMZ, TMZ/ Imatinib und Imatinib im Blot in der Abb. 15 B. Da die TMZ-behandelte Probe aber eine deutlich stärkere Aktin-Bande aufwies, errechnete sich die deutlich niedrigere relative Expression (Abb. 15 B). Bei Klon cl 4 wurde eine verminderte relative PDGFR- β -Expression nach Gabe von 50 μ M TMZ beobachtet, während die Werte für die Proben TMZ/Imatinib und Imatinib leicht (maximal 1,2-fach) stiegen (Abb. 15). Klon cl 7 zeigte eine geringe Senkung der relativen PDGFR- β -Expression nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ, die auch nach Gabe von TMZ/Imatinib erkennbar war (Abb. 15). Bei Klon cl 9 wurde in der Probe mit Imatinib eine Senkung der relativen PDGFR- β -Expression errechnet, wobei dies auf einem stärkeren Aktin-Signal beruhte (Abb. 15). Bei T1522 Klon cl 10 führte lediglich die Behandlung mit Imatinib allein zu einer Veränderung, d.h. zu einer geringen Steigerung der PDGFR- β -Expression auf das 1,4-fache (Abb. 15).

Insgesamt war das PDGFR- β -Level in allen T1522 Klonen, bis auf T1522 cl 4, sehr gering. Eine Steigerung des PDGFR- β -Levels durch Imatinib wurde für die Klone cl 1, cl 2 und cl 10 und in geringem Maße für Klon cl 4 festgestellt. Auffallend ist die deutliche Senkung der relativen PDGFR- β -Expression für die Probe T1522 cl 3 TMZ, die allein auf einer Verstärkung des Aktin-Signals, nicht aber einer Abnahme des PDGFR- β -Signals beruht.

A



B

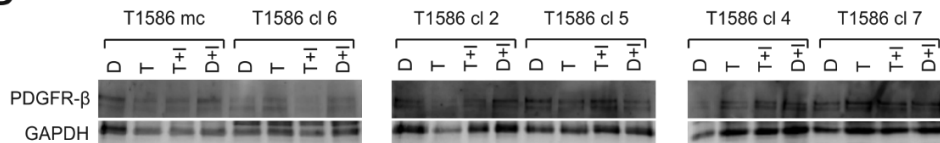


Abb. 16: (A) Relative Expression der PDGF-Rezeptoren β in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. In (B) ist jedoch aus Gründen der besseren Bildqualität die Ladekontrolle GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase dargestellt. PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; mc, Mutterkultur.; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei den T1586 Klonen und der Mutterkultur war das PDGFR- β -Signal sehr gering, wodurch sich eine ungünstige „*signal-to-noise-ratio*“ in allen Blots ergab (Abb. 16 B). Dies war reproduzierbar der Fall. Aussagen zu Veränderungen der Signalstärke waren daher nur eingeschränkt möglich. Bei der T1586 Mutterkultur sowie den Klonen T1586 cl 7 ließ sich keine Veränderung der relativen Expression feststellen (Abb. 16 A, B). Bei den Klonen T1586 cl 2 kam es zu einer geringen Steigerung der Signalstärke und bei Klon cl 4 zu einer geringen Senkung nach den Behandlungen. Im Fall des Klons cl 5 war eine Reduktion der Signalstärke für die Proben TMZ sowie Imatinib erkennbar, im Fall des

Klons cl 6 dagegen eine geringe Verstärkung, ebenfalls für TMZ und Imatinib. Bei der Kombinationsbehandlung war bei den Klonen cl 5 und cl 6 keine deutliche Veränderung nachweisbar.

Insgesamt waren die PDGFR- β Signale bei hohen Hintergrundsignalen gering, so dass eine Auswertung problematisch war. Dieses Ergebnis wurde in zwei technischen Replikaten bestätigt. Trotz dieser Einschränkungen wiesen die Daten darauf hin, dass in der Mehrheit der T1586 Klone und der Mutterkultur die Behandlungen keine Auswirkungen auf das PDGFR- β -Level haben. Die beobachteten geringen Veränderungen bei den Klonen cl 5 und cl 6 erlauben aufgrund der ungünstigen „*signal-to-noise-ratio*“ keine belastbaren Schlussfolgerungen.

3.4 Beeinflussung von Sox-2 und CD133 durch die Behandlung

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Behandlungen Effekte auf den Stammzellcharakter der unterschiedlichen Zelllinien und Klone haben könnten, wurden an Tag d 5 nach Behandlung Westernblots mit Antikörper gegen CD133 und Sox-2 durchgeführt. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Co-Expression von CD133 und Sox-2 indikativ für die sogenannten Typ II-Zellen, während die hohe Expression von Sox-2 in CD133-negativen Zellen für die Typ-I-Zelle, d.h. die Glioblastomstammzelle, typisch ist (vergleiche Kapitel 1.7). Die Expression von Sox-2 und CD133 wurde einerseits mittels Westernblot-Analyse bestimmt, andererseits parallel dazu mit Immunzytochemie untersucht. Während der Sox-2 Antikörper in den Westernblots aller Zelllinien und Klone Banden der zu erwartenden Länge (Abb. 17) detektierte, wurden Banden mit dem CD133 Antikörper nur für die T1522 Klone erhalten, obwohl pro Gelspur 25 μ g Proteinextrakt aufgetragen wurden. Das CD133-Signal erschien als singuläre Bande bei 120 kDa, das Sox-2 Signal als Doppelbande bei 38 kDa (Abb. 17).

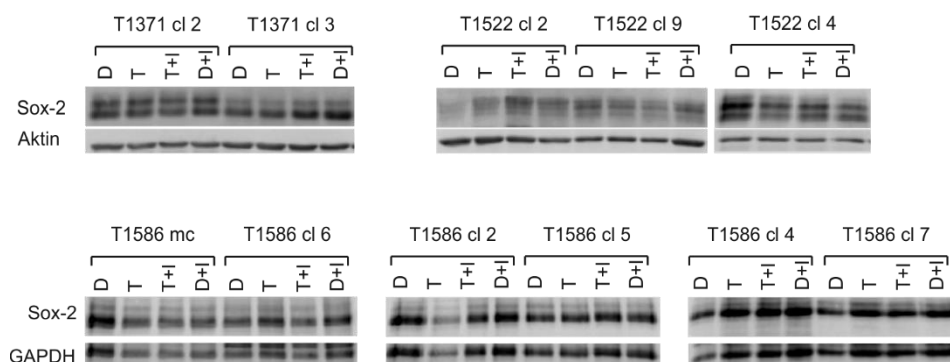


Abb. 17: Beispielhafte Westernblots von Sox-2 aus T1371- und T1522 Klonen, sowie der T1586-Mutterkultur und abgeleiteten T1586 Klonen. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Da die Sox-2- und Aktin-Banden auf der 10 % SDS-PAGE bei der T1586 Zelllinie sehr nahe beieinander liegen, wurde in diesen Abbildungen die Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) dargestellt. Sox-2, sex determining region Y HMG box 2; cl, Klon; mc, Mutterkultur. Aus Gründen der

besseren Trennung und bildlichen Darstellung wird bei der T1586 Zelllinie die Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gezeigt.

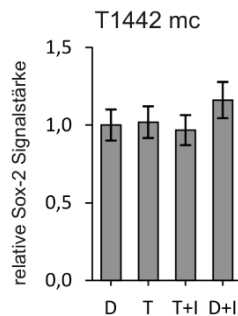


Abb. 18: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1442 Mutterkultur an Tag d5 nach Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 µM Temozolomid, (T+I) 50 µM TMZ/ 5 µM Imatinib und (D+I) DMSO/ 5 µM Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zur Ladekontrolle Aktin berechnet. Der Median und die Varianz zwischen den technischen Replikaten (n=2) sind angegeben. Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; mc, Mutterkultur.

Eine Sox-2-Expression war in der SLGC-Linie T1442 nachweisbar (Abb. 18). Nach den Behandlungen kam es nur zu geringfügigen Veränderungen. Relativ zur Lösungsmittelkontrolle stieg die Signalstärke mit 5 µM Imatinib leicht an und fiel nach der Doppelbehandlung leicht ab. Somit resultierten die Behandlungen nur in geringen Veränderungen der Sox-2-Level.

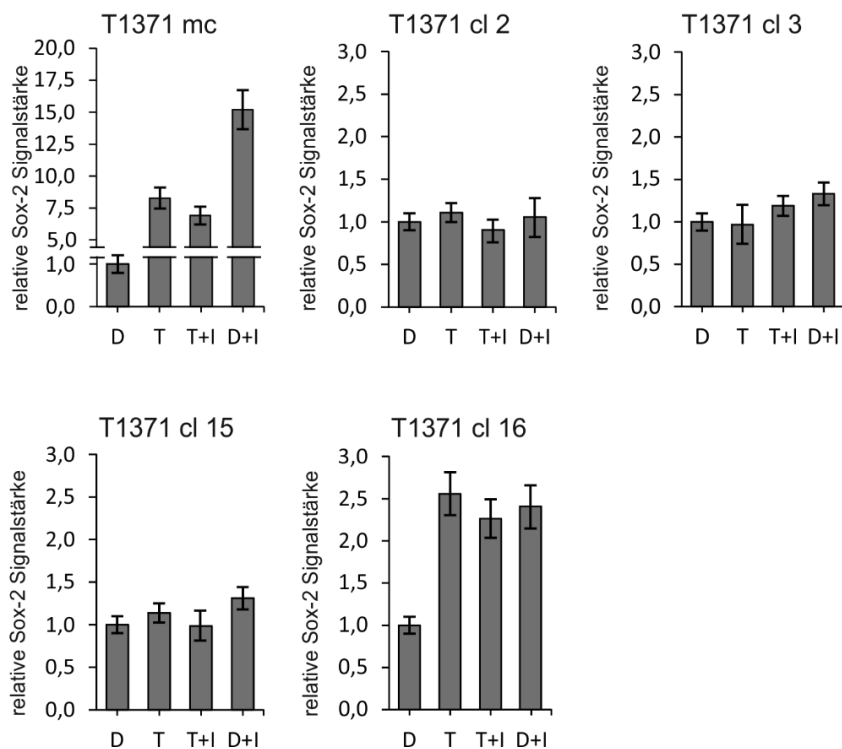


Abb. 19: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen an Tag d5 nach Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle),

(T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und (D+I) DMSO/ 5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. Der Median und die Varianz zwischen den technischen Replikaten (n=2) sind angegeben. Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei der T1371 Mutterkultur zeigte sich nach den Behandlungen ein drastischer Anstieg der Sox-2-Expression (Abb. 19). Bei T1371 Klon cl 2 waren keine deutlichen Veränderungen in der Sox-2-Expression nach den Behandlungen sichtbar. Bei Klon cl 3 zeigte sich nach der Doppelbehandlung und der Behandlung mit Imatinib allein ein geringer Anstieg des Signals (Abb. 19). Der T1371 Klon cl 15 wies nach der Behandlung mit Imatinib einen Anstieg der Sox-2-Expression um den Faktor 1,3 auf (Abb. 19). Bei Klon cl 16 führten alle Behandlungen zu einer Erhöhung der relativen Sox-2-Expression, wobei mit TMZ und Imatinib allein eine 2,4 – 2,5 Steigerung erreicht wurde, nach der Doppelbehandlung das 2,2-fache (Abb. 19).

Somit reagierten sowohl die T1371 Mutterkultur als auch der Klon cl 16 auf die TMZ-Behandlung mit einem deutlichen Anstieg der Sox-2-Expression, während 50 μ M TMZ auf die Klone cl 2, cl 3 und cl 15 nahezu keinen Effekt hatte. Ein deutlicher Anstieg des Sox-2-Levels durch Imatinib war ebenfalls bei der Mutterkultur und Klon cl 16 evident, wobei in der Doppelbehandlung kein additiver Effekt auftrat.

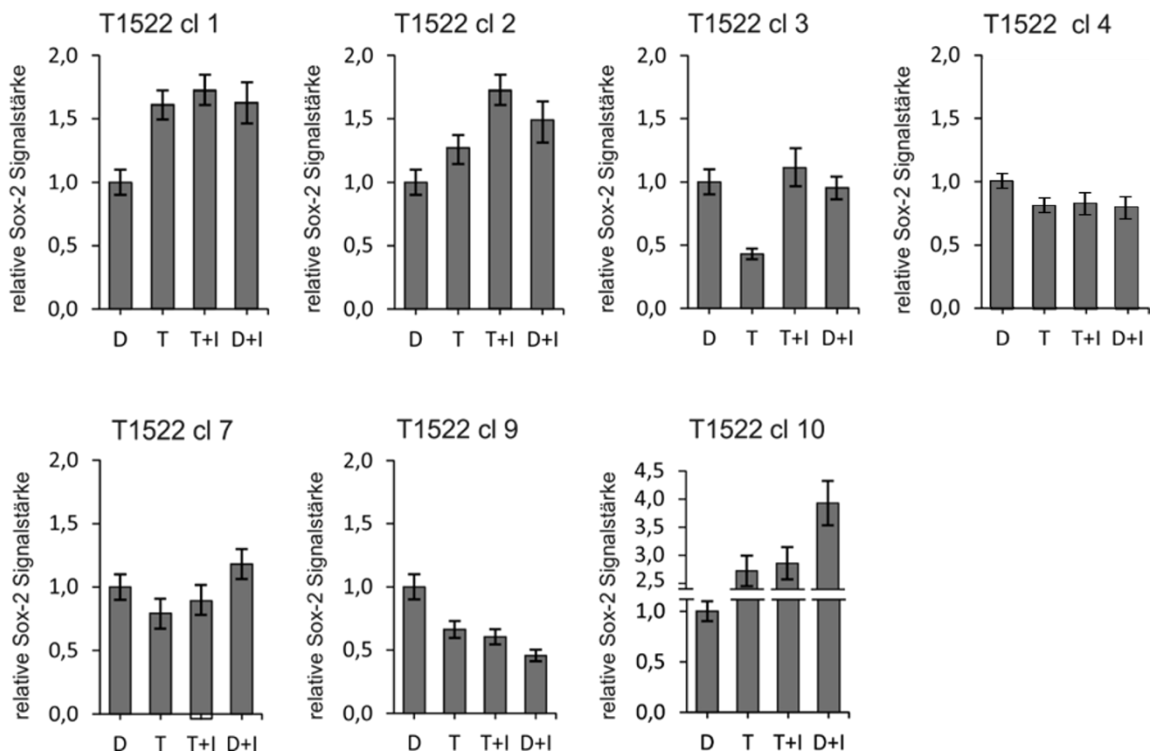


Abb. 20: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in den T1522 Klonen an Tag d5 nach Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und (D+I) DMSO/ 5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-

Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. Der Median und die Varianz zwischen den technischen Replikaten (n=2) sind angegeben. Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon.

Bei der T1522 Zelllinie wurde mit dem Anti-Sox-2 Antikörper nicht nur eine Bande bei 38 kDa nachgewiesen, sondern ein Duplett bzw. Triplet (Abb. 17). Ob es sich hier um eine posttranslationale Modifikation oder eine partielle Proteolyse des Volle-Länge Sox-2 handelte, ist unklar, weshalb stets das gesamte Duplett/Triplett quantifiziert wurde. T1522 Klon cl 1 zeigte einen Anstieg der relativen Sox-2 Expression nach allen Behandlungen, der mit TMZ/Imatinib am höchsten war und das 1,6-fache der Kontrolle erreichte (Abb. 20). Bei Klon cl 2 führten ebenfalls alle Behandlungen zu einem Anstieg der relativen Sox-2-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 20). Auch hier war der stärkste Anstieg bei TMZ/Imatinib zu beobachten. T1522 Klon cl 3 zeigte für die TMZ-Probe eine Senkung des relativen Sox-2-Levels. Bei Betrachtung der Blots fällt auf, dass die Bande der Aktin-Ladekontrolle bei der TMZ Probe stärker ausgeprägt war als bei den anderen Behandlungen, nicht aber die Sox-2 Bande. Dieses Ergebnis wurde mit identischem Resultat reproduziert. Bei Klon cl 4 kam es nach allen Behandlungen zu einer Verminderung der Sox-2-Expression, wobei die Senkung 15 – 20 % betrug. Klon T1522 cl 7 zeigte nach den Behandlungen nur geringe Änderungen des Sox-2-Levels (Abb. 20). Bei Klon cl 9 führten alle Behandlungen zu einer Reduktion der relativen Sox-2-Expression, die nach Behandlung mit Imatinib am stärksten ausgeprägt war (Abb. 20). So war das Sox-2-Level nach TMZ- und TMZ/Imatinib-Behandlung um ein Drittel reduziert, mit Imatinib allein um die Hälfte. Der T1522 Klon cl 10 zeigte einen starken Anstieg der Sox-2-Expression nach allen Behandlungen, am stärksten nach der Behandlung mit Imatinib, wobei das Sox-2-Level um das 4-fache gesteigert war (Abb. 20).

Insgesamt bewirkte 50 µM TMZ lediglich bei drei Klonen (cl 1, cl 2 und cl 10) eine Steigung der Sox-2-Expression. In diesen Klonen bewirkten auch 5 µM Imatinib einen Anstieg. Die für die übrigen Klone (cl 3, cl 4, cl 7 und cl 9) errechneten Senkungen des Sox-2-Levels betrugen mit Ausnahme der Klone cl 3 und cl 9 nach der TMZ-Behandlung 15-20 %. Dabei beruhte die errechnete deutliche Senkung im Fall des Klons cl 3 (60 %) auf der deutlich erhöhten Signalstärke der Ladekontrolle, was auf den Klon cl 9 nicht zutraf. Für den Klon cl 9 wurde zudem nach der Imatinib-Behandlung eine Verminderung des Sox-2-Levels um 50 % beobachtet, was diesen Klon deutlich von allen anderen unterscheidet.

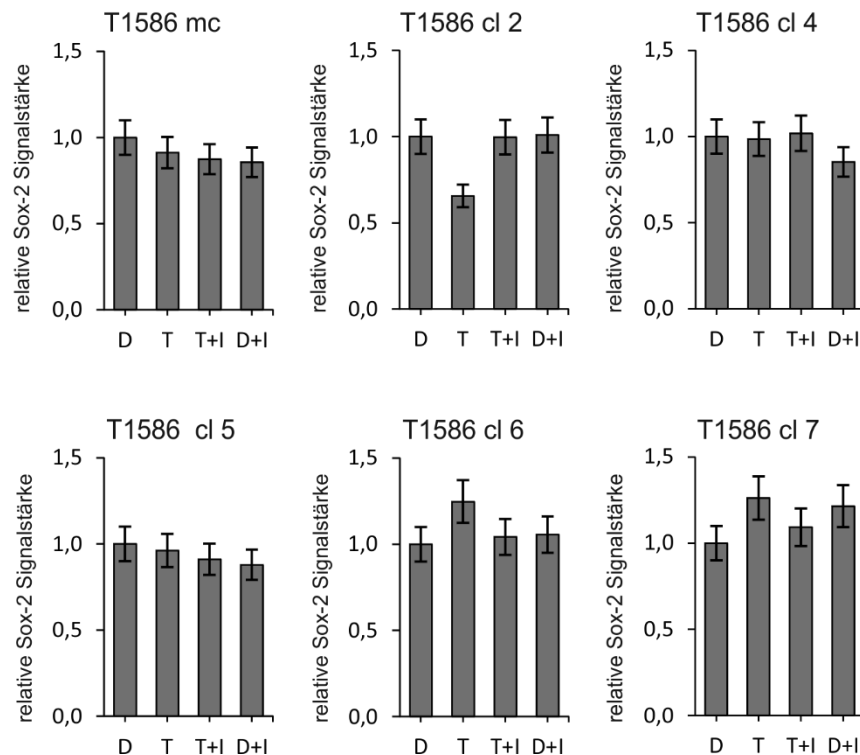
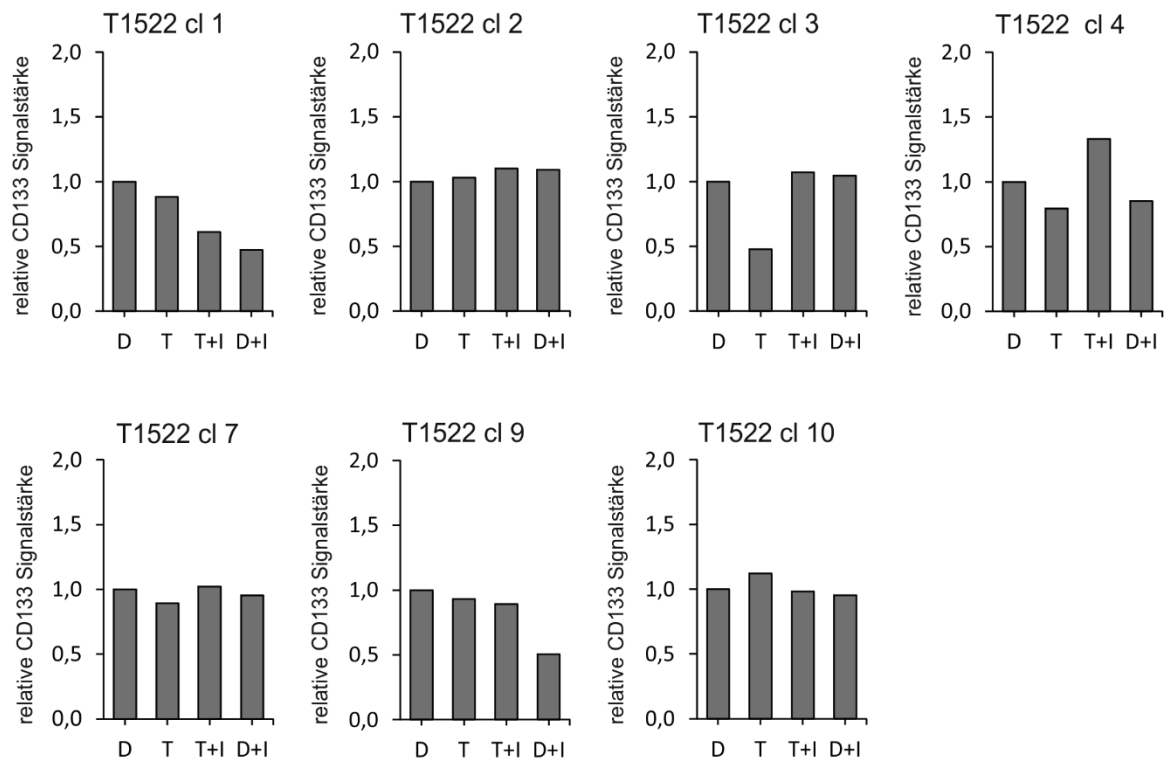


Abb. 21: Graphische Darstellung der relativen Expression von Sox-2 in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen an Tag d5 nach Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 µM Temozolomid, (T+I) 50 µM TMZ/5 µM Imatinib und (D+I) DMSO/ 5 µM Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. Der Median und die Varianz zwischen den technischen Replikaten (n=2) sind angegeben. Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die T1586 Mutterkultur und Klone wiesen nur eine deutliche Sox-2-Bande auf (Abb. 17), die im Vergleich mit den übrigen untersuchten Zelllinien und Klonen sehr stark war. Bei der T1586 Mutterkultur war die Sox-2-Expression nach den Behandlungen nahezu invariant (Abb. 21). Auch die untersuchten Klone reagierten in der Mehrzahl weder auf die TMZ- noch auf die Imatinib-Behandlung mit deutlichen Änderungen im Sox-2-Level. Die Doppelbehandlung änderte an diesem Ergebnis ebenfalls nichts (Abb. 17, Abb. 21). Eine deutliche Senkung der relativen Sox-2-Expression wurde nur im Fall der TMZ-behandelten Probe des Klons T1586 cl 2 beobachtet (Beispiele in Abb. 17 und Abb. 21)

A



B

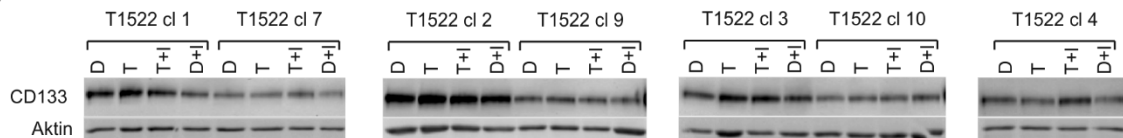


Abb. 22: (A) Relative Expression von CD133 in den T1522 Klone der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Zuvor wurde für alle Proben die Expression relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. CD133, Proliferin-1; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; mc, Mutterkultur.

Da sich die relative Häufigkeit von Typ I-, II- und III-Zellen in SLGC-Kulturen in der Expression von Sox-2 und CD133 widerspiegelt, wurde die CD133-Expression im Westernblot untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass für einen reproduzierbaren Nachweis der CD133-Expression im Westernblot mindestens 25 μ g Gesamzellproteinextrakt pro Spur auf der SDS-PAGE aufgetrennt werden mussten. Unter diesen Bedingungen konnte eine CD133-Expression unter allen untersuchten Zelllinien und Klonen nur für die T1522 Klone nachgewiesen werden. Abb. 22 zeigt die relative CD133-Expression der T1522 Klone. Für Klon cl 1 wurde eine Senkung des CD133-Levels für alle Proben beobachtet, die mit Imatinib am stärksten war und bei ca. 50 % lag. Bei den Klonen cl 2, cl 7 und cl 10 führten die Behandlungen zu keiner deutlichen Änderung des CD133-Levels. Bei Klon cl 3 war die Signal-

stärke der CD133-Bande ebenfalls nahezu unverändert. Allerdings wurde, wie bereits mehrfach beobachtet, eine deutlich stärkere Aktinbande festgestellt, so dass sich für die TMZ-Probe rechnerisch eine Senkung des CD133-Levels um 50 % ergab. Bei Klon cl 4 kam es nach der Doppelbehandlung mit TMZ/Imatinib zu einem Anstieg des CD133-Levels um das 1,3-fache. Für die alleinige Behandlung mit TMZ und Imatinib ergab sich dagegen eine Senkung des relativen CD133-Levels um 20-25 %. Bei Klon cl 9 war die Stärke des CD133-Signals in allen Proben nahezu identisch. Durch das erhöhte Signal der Aktin-Ladekontrolle ergab sich jedoch für die Probe DMSO/Imatinib eine Senkung des relativen CD133-Levels.

Insgesamt wurden eindeutige Veränderungen in den Signalstärken der CD133-Bande nur für die Klone T1522 cl 1, cl 3 und cl 4 ermittelt. Dabei geht die Senkung des relativen CD133-Levels in Klon cl 1 mit einer Steigerung der Sox-2 Expression einher (Abb. 20). Die Senkung des CD133-Levels in den Klonen cl 3 und cl 4 durch TMZ und Imatinib war dagegen mit einer Senkung des Sox-2-Levels assoziiert.

3.5 Beeinflussung der CD133- und Sox-2-Expression auf Einzelzellniveau

In Kapitel 3.2 und Kapitel 3.4 wurde der Einfluss der Behandlung mit TMZ und/oder Imatinib auf die Anzahl CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie und auf die Expression von Sox-2 und CD133 mittels Westernblot erläutert. Zusätzlich wurde die Expression von CD133 und Sox-2 mittels immunzytochemischer Färbung untersucht. Um den neuralen Charakter der Zellen zu überprüfen, wurden weiterhin Färbungen mit einem Antikörper gegen das Intermediärfilament Nestin durchgeführt. In den Doppelfärbungen mit den Antikörperpaaren Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® wurde eine starke Nestin-Expression in allen Zellen nachgewiesen, die sich nach den Behandlungen nicht änderte. Einige Beispiele dieser Färbungen sind in Abb. 44 im Anhang dargestellt.

Hinsichtlich des Expressionslevels von Sox-2 wurden zwischen Mutterkulturen und Klonen sowie nach den Behandlungen Unterschiede ermittelt. Dabei wurden für die Bewertung der Änderungen der Sox-2-Expression sowohl die Ergebnisse der Nestin/Sox-2 als auch der CD133/Sox-2 Färbungen berücksichtigt. In der Arbeit ist jeweils eine komplette Serie der CD133/Sox-2 Analysen gezeigt. Das technische Replikat sowie die vollständige Serie der Nestin/Sox-2 Färbung werden nicht in Bildform dargestellt. Für die Auswertung wurden jeweils 10 repräsentative Mikraufnahmen herangezogen.

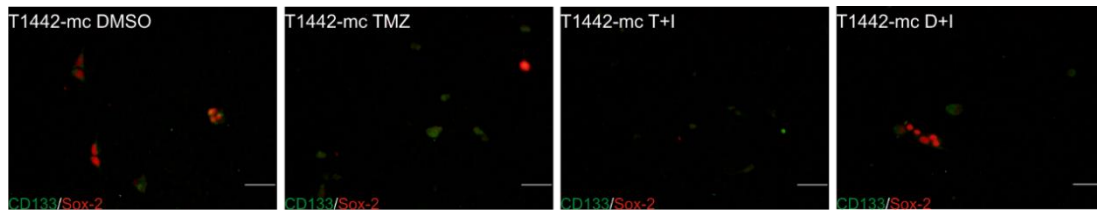


Abb. 23: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1442 Mutterkultur. Analyse am Tag d5 der Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib, sowie (D+I) Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-CD133/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Fotos weggelassen. Balken: 50 μ m; CD133, Prominin-1; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; mc, Mutterkultur.

In der T1442 Mutterkultur wurde mit dem CD133 Antikörper auf der Oberfläche aller Zellen ein Signal detektiert, dieses war relativ schwach. In Zellen mit einer starken Sox-2-Expression war das CD133-Signal abwesend. Nach der TMZ-Behandlung war die Anzahl von Zellen mit einem starken Sox-2-Signal vermindert, ebenso nach der Doppelbehandlung mit TMZ/Imatinib. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von Sox-2-positiven Zellen zu Sox-2-negativen Zellen nach der alleinigen Imatinibbehandlung ähnlich der DMSO-Kontrolle (Abb. 23). Somit führte die Behandlung mit 50 μ M TMZ zur Verminderung der Anzahl von T1442-Zellen mit hohem Stammzellcharakter (vergleiche Kapitel 1.7).

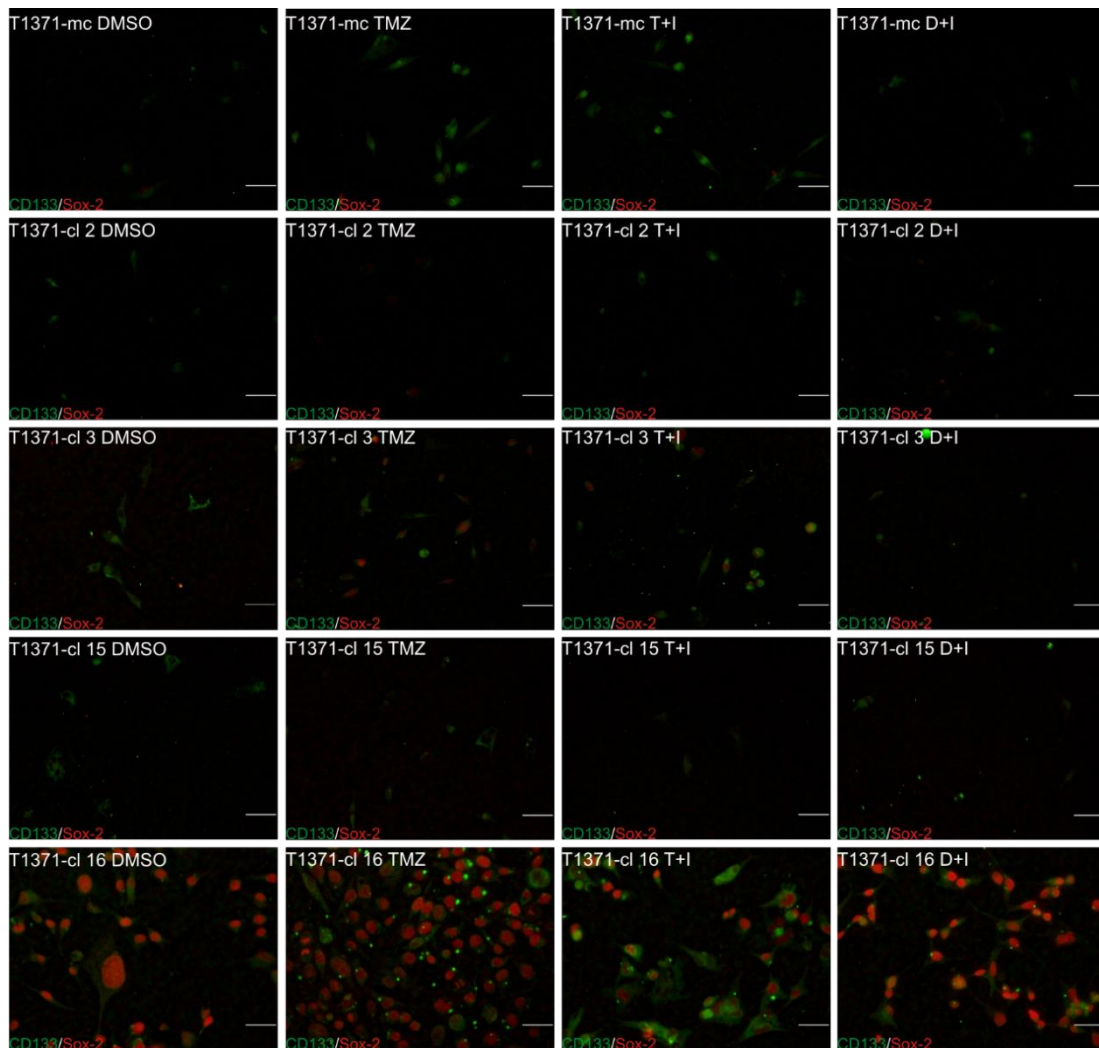


Abb. 24: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1371 Mutterkultur und T1371 Klonen. Analyse am Tag d5 der Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib, sowie (D+I) Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-CD133/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Fotos weggelassen. Balken: 50 μ m; CD133, Prominin-1; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

In den Kulturen der T1371 Mutterkultur waren sowohl das CD133-Signal als auch das Sox-2-Signal nur schwach ausgeprägt. Nach den Behandlungen mit TMZ sowie TMZ/Imatinib nahm die Anzahl an Zellen mit deutlicher CD133-Expression zu, nicht aber nach der alleinigen Imatinib-Behandlung (Abb. 24, obere Reihe). Die Klone T1371 cl 2, cl 3 und cl 15 verhielten sich ähnlich wie die T1371 Mutterkultur, wobei das CD133-Signal schwächer und die Anreicherung von CD133-positiven Zellen weniger effektiv war (Abb. 24). In den Nestin/Sox-2 Doppelfärbungen war das Sox-2-Signal deutlicher als in den hier gezeigten CD133/Sox-2 Doppelfärbungen (Beispiele Abb. 44, Anhang). Die Nestin/Sox-2 Doppelfärbungen belegen eine Abnahme des Sox-2-Signals in den TMZ behandelten Kul-

turen. Dagegen kam es in den Kulturen des Klons T1371 cl 16, die bereits in der Kontrolle eine deutlich stärkere Sox-2-Expression zeigten als die Mutterkultur und die übrigen Klone, zu einer Anreicherung von Sox-2-positiven Zellen nach der TMZ-Behandlung. Eine Zunahme der Anzahl von Zellen mit starkem Sox-2-Signal, bei gleichzeitiger Senkung der Anzahl von Zellen mit CD133-Expression, wurde auch nach der alleinigen Imatinib-Behandlung beobachtet. Nach der Doppelbehandlung mit TMZ/Imatinib kam es jedoch zu einer Steigerung der Anzahl von Zellen mit starker CD133-Expression, was darauf hinweist, dass die Kombination von TMZ und Imatinib den Effekt der Einfachbehandlungen (hier die Anreicherung von Sox-2-positiven Zellen) nicht verstärkt, sondern aufhebt.

Zusammengenommen weisen die Daten darauf hin, dass TMZ, nicht aber Imatinib zur Anreicherung von sogenannten Typ II-Zellen (siehe Einleitung) in der T1371 Mutterkultur und den Klonen T1371 cl 2 und cl 15 führte und dieser Effekt durch Imatinib nicht beeinflusst wurde. Im Fall des Klons T1371 cl 16 führten sowohl die Einfachbehandlungen mit TMZ als auch Imatinib zur Anreicherung von Typ I-Zellen, die Doppelbehandlungen dagegen zur Anreicherung von Typ II-Zellen.



Abb. 25: Expression von CD133 und Sox-2 in den T1522 Klonen. Analyse am Tag d5 der Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib, sowie (D+I) Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-CD133/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Fotos weggelassen. Balken: 50 μ m; CD133, Prominin-1; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Unter den T1522 Klonen wurden in den Kontrollen keine Zellen mit einem starken Sox-2-Signal nachgewiesen, während das CD133-Signal auf allen Zellen erkennbar war (Abb. 25), was für Kulturen mit einem primären Anteil an Typ II-Zellen spricht. Die Durchflusszytometrie und die Western-blot-Analysen hatten ebenfalls die hohe Expression von CD133 in T1522 Klonen belegt (siehe Abb. 8 und Abb. 22). Nach der Behandlung mit TMZ sowie TMZ/Imatinib traten in den Kulturen der Klone T1522 cl 1 deutlich mehr Sox-2-positive Zellen auf. Die Behandlung mit 5 μ M Imatinib bewirkte in der T1522 cl 1 Kultur ebenfalls eine Anreicherung von stark Sox-2-positiven Zellen. Somit würden alle Behandlungen Typ I-Zellen in T1522 cl 1 Kulturen anreichern. Allerdings wiesen die Zellen der doppelbehandelten Klon cl 1-Kulturen auf den stark Sox-2-positiven Zellen oft auch ein starkes CD133-Signal auf. Eine Anreicherung von stark Sox-2-positiven Zellen durch TMZ wurde auch für den Klon T1522 cl 2 beobachtet. In den anderen untersuchten T1522 Klonen wurden keine Effekte von TMZ, Imatinib und TMZ/Imatinib festgestellt (Abb. 25). Die Beobachtungen für das Sox-2-Signal wurden durch die Nestin/Sox-2 Doppelfärbung bestätigt (Beispiele in Abb. 44, Anhang).

Zusammenfassend zeigte sich in zwei von sieben untersuchten T1522 Klonen eine Anreicherung von Sox-2-positiven Zellen nach Behandlung mit 50 μ M TMZ. Dabei war in einem dieser Klone, T1522 cl 1, eine Erhöhung der Anzahl Sox-2-positiver Zellen auch mit 5 μ M Imatinib induzierbar.

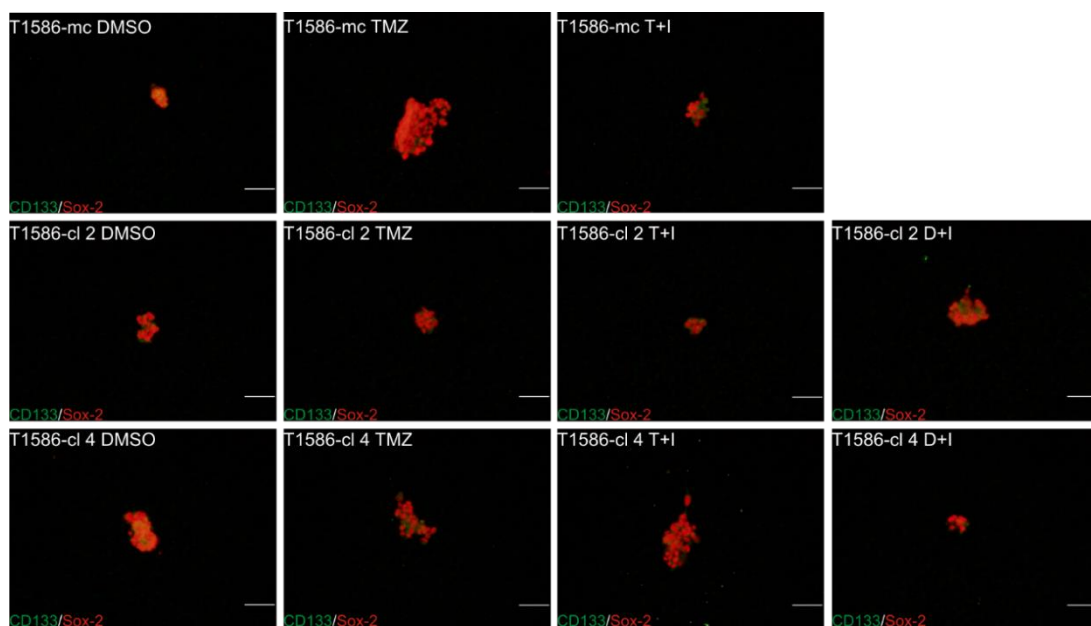


Abb. 26: Expression von CD133 und Sox-2 in der T1586 Mutterkultur und T1586 Klonen. Analyse am Tag d5 der Behandlung mit (D) Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib, sowie (D+I) Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-CD133/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI; der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Fotos weggelassen. Balken: 50 μ m; CD133, Prominin-1; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Im Fall von T1586 wurden nur die Mutterkultur und die Klone T1586 cl 2 und cl 4 untersucht. In allen drei Fällen bildeten die Zellen Sphäroide und die Zellhaftung an den Fibronectin beschichteten Substraten war vermindert. Die haftenden Sphäroide zeigten in allen Fällen übereinstimmend eine sehr starke Sox-2-Färbung bei sehr schwachem bis abwesendem CD133-Signal (Abb. 26, linke Spalte). Damit enthielten diese Kulturen ausschließlich Typ I-Zellen. Weder nach der TMZ- noch der Imatinib-Einfachbehandlung oder der Doppelbehandlung änderte sich daran etwas. Es kam somit nicht zu einer Anreicherung von weiter differenzierten Typ II- oder Typ III-Zellen.

3.6 Beeinflussung der Proliferation durch die Behandlungen

Die Effekte verschiedener Behandlungskombinationen und Konzentrationen von TMZ und Imatinib auf die Proliferation wurden mittels BrdU-ELISA analysiert. Dabei wurde untersucht, ob ansteigende TMZ-Konzentrationen oder die Kombination mit Imatinib zu einer stärkeren Verminderung der Proliferation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führten. In den Graphen (Abb. 27 - 29) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen optischen Dichten angegeben. Die vollständigen Ergebnisse der statistischen Analyse mittels ANOVA und post-hoc Tukey sind im Anhang aufgeführt (Tab. 15 - Tab. 24). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den Graphen lediglich die statistisch signifikanten Unterschiede der Behandlungen relativ zur Kontrollbehandlung mit DMSO angegeben. Aus technischen Gründen wurde in dieser Arbeit nur ein Teil der durch Durchflusszytometrie und Westernblot charakterisierten Proben im BrdU-ELISA untersucht.

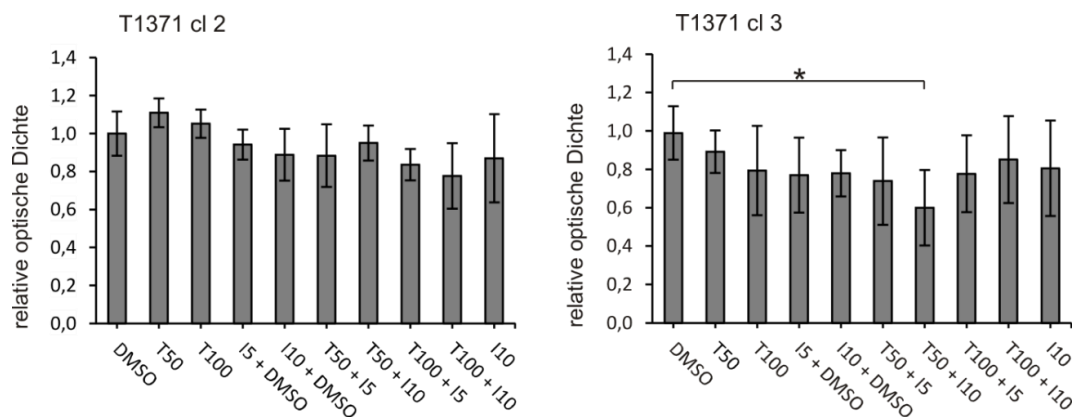


Abb. 27: BrdU-ELISA der Klone T1371 cl 2 und cl 3. Die Analyse erfolgte an Tag d5 nach der Behandlung. Da Temozolomid in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wird, dient die DMSO-Kontrolle als Referenzwert und die Behandlung mit Imatinib erfolgt in 1 % DMSO. 50 μ M Temozolomid (T50), 100 μ M Temozolomid (T100), DMSO/ 5 μ M Imatinib (D+I5), DMSO/ 10 μ M Imatinib (D+I10), 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib (T50+I5), 50 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T50+I10), 100 μ M TMZ/5 μ M Imatinib (T100+I5), 100 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T100+I10) und 10 μ M Imatinib (I10). Die optische Dichte des Mittelwerts der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (ANOVA mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; cl, Klon.

Bei Klon T1371 cl 2 konnten im Vergleich zur DMSO-Kontrollprobe keine signifikanten Unterschiede in der BrdU-Inkorporation nach den Behandlungen festgestellt werden (Abb. 27 links). Relativ zur Behandlung mit 50 μ M TMZ (T50) wurde für die Behandlungen 100 μ M TMZ/5 μ M Imatinib ($p < 0,05$), 100 μ M TMZ/10 μ M Imatinib ($p < 0,01$) und 10 μ M Imatinib ($p < 0,05$) eine geringe, aber statistisch signifikante Senkung der optischen Dichten ermittelt (Tab. 15). Für den Klon T1371 cl 3 war die Reduktion der optischen Dichten deutlicher (Abb. 27 rechts). Allerdings waren die Standardabweichungen innerhalb der Messreihen sehr hoch, was an dem sphäroidalen Wachstum der Zellen lag. Eine statistisch signifikante Senkung des BrdU Einbaus, relativ zur DMSO-Kontrolle, konnte daher nur für die Doppelbehandlung mit 50 μ M TMZ und 10 μ M Imatinib (T50 + I10) festgestellt werden. Somit wiesen die Daten auf eine Steigerung der Wirkung von TMZ bei Kombination mit 10 μ M Imatinib im Falle der Klone T1371 cl 2 und cl 3 hin.

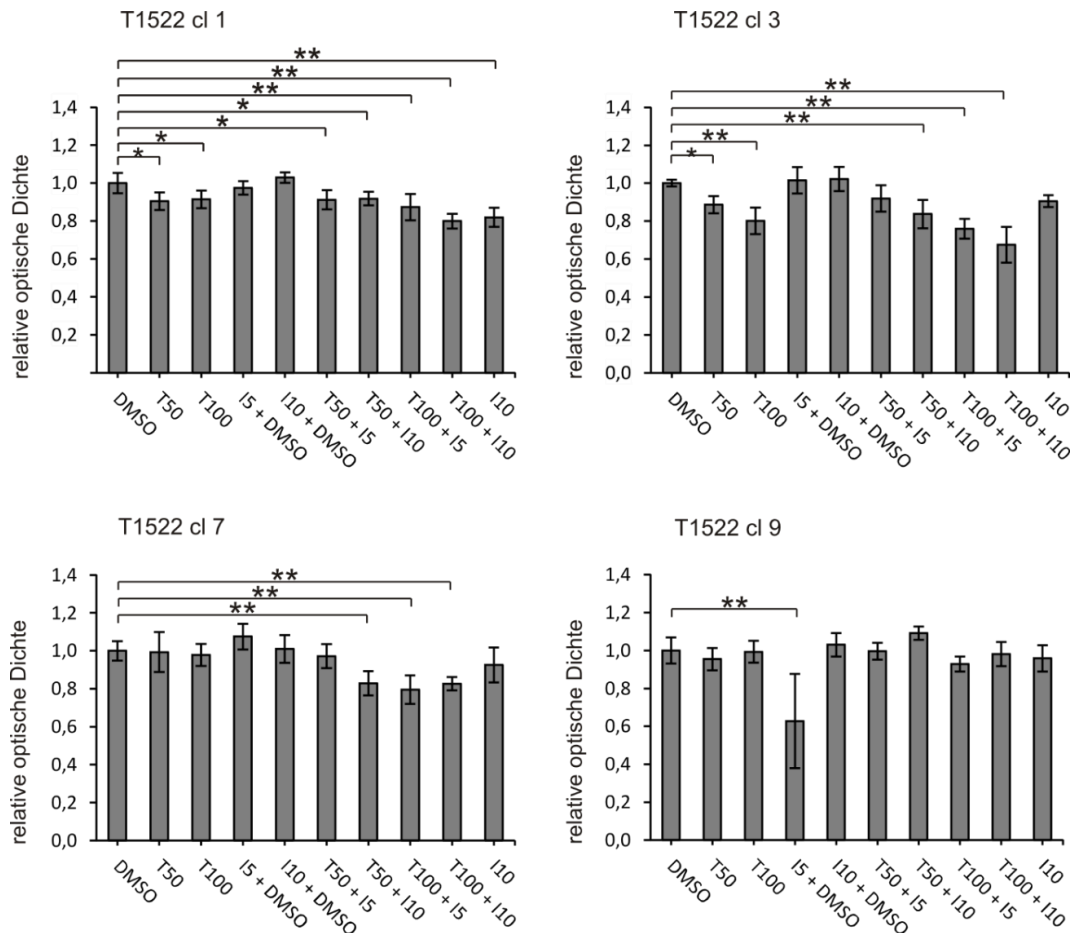


Abb. 28: BrdU-ELISA der Klone T1522 cl 1, cl 3, cl 7 und cl 9. Die Analyse erfolgte an Tag d5 nach der Behandlung. Da Temozolomid in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wird, dient die DMSO-Kontrolle als Referenzwert und die Behandlung mit Imatinib erfolgt in 1 % DMSO. 50 μ M Temozolomid (T50), 100 μ M Temozolomid (T100), DMSO/ 5 μ M Imatinib (D+I5), DMSO/ 10 μ M Imatinib (D+I10), 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib (T50+I5), 50 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T50+I10), 100 μ M TMZ/5 μ M Imatinib (T100+I5), 100 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T100+I10) und 10 μ M Imatinib (I10). Die optische Dichte

des Mittelwerts der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (ANOVA mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; cl, Klon.

Vier der T1522 Klone (T1522 cl 1, cl 3, cl 7 und cl 9) wurden mittels BrdU-ELISA auf ihre Sensitivität gegenüber TMZ und Imatinib untersucht. Eine statistisch signifikante Reduktion der BrdU-Inkorporation relativ zur DMSO-Kontrolle war nach Gabe von 50 μM und 100 μM TMZ in der Gruppe der untersuchten Klone lediglich für T1522 cl 1 und cl 3 nachweisbar (Abb. 28 oben). Eine statistisch signifikante Reduktion der optischen Dichte nach Gabe von 5 μM Imatinib allein wurde nur für T1522 cl 9 gemessen, wobei es sich hierbei eher um ein Artefakt handeln dürfte, da zwar 5 μM Imatinib, nicht aber 10 μM Imatinib eine Senkung der optischen Dichte bewirkte. Eine Verstärkung des durch TMZ induzierten Effekts nach Gabe von Imatinib war im Fall des Klons T1522 cl 1 für die Kombination 100 μM TMZ /10 μM Imatinib (T00 + I10) statistisch signifikant (Tab. 17, Anhang). Bei Klon cl 3 wurde eine statistisch signifikante Verstärkung des Effekt von 50 μM TMZ gegenüber 100 μM TMZ/5 μM Imatinib und 100 μM TMZ/10 μM Imatinib sowie eine Verstärkung des Effekts von 100 μM TMZ bei 50 μM TMZ/10 μM Imatinib und 100 μM TMZ/10 μM Imatinib erreicht (Abb. 28 oben rechts, Tab. 18, Anhang). Eine statistisch signifikante Verminderung der optischen Dichten nach der Behandlung mit TMZ in Anwesenheit von Imatinib wurde auch für den Klon T1522 cl 7 evident, obwohl beide Substanzen allein keine statistisch signifikante Senkung des BrdU-Einbaus bewirkten. Dabei steigerte die Zugabe von 10 μM Imatinib (T50+I10) relativ zu 50 μM TMZ (T50) allein und 50 μM TMZ/5 μM Imatinib(T50+I5) die Senkung der optischen Dichten deutlich. In Anwesenheit von 100 μM TMZ waren die Wirkungen von 5 μM und 10 μM Imatinib dagegen ähnlich (Abb. 28). Somit zeigten drei von vier T1522 Klonen (cl 1, cl 3, cl 7) eine Kooperativität von TMZ und Imatinib bei der Senkung der Proliferation.

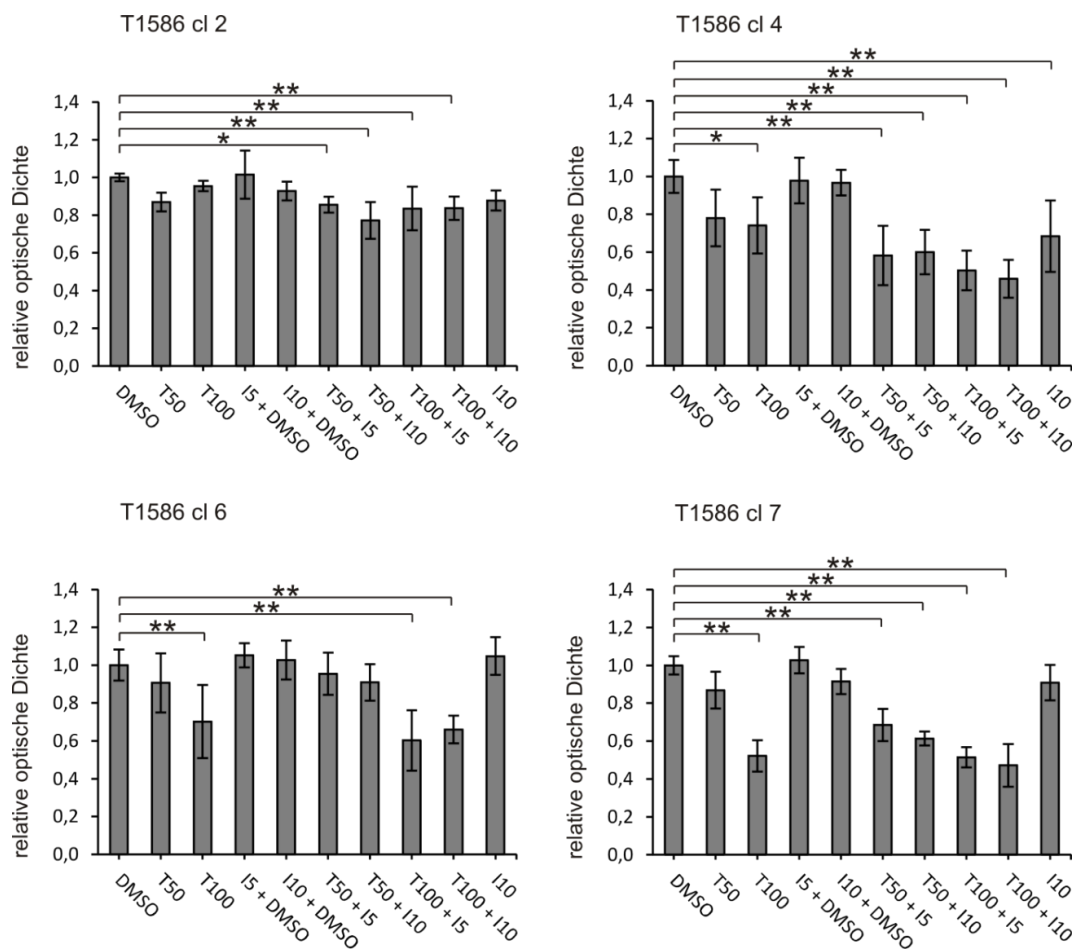


Abb. 29: BrdU-ELISA der Klone T1586 cl 2, cl 4, cl 6 und cl 7. Die Analyse erfolgte an Tag d5 nach der Behandlung. Da Temozolomid in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wird, dient die DMSO-Kontrolle als Referenzwert und die Behandlung mit Imatinib erfolgt in 1 % DMSO. 50 μ M Temozolomid (T50), 100 μ M Temozolomid (T100), DMSO/ 5 μ M Imatinib (D+I5), DMSO/ 10 μ M Imatinib (D+I10), 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib (T50+I5), 50 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T50+I10), 100 μ M TMZ/5 μ M Imatinib (T100+I5), 100 μ M TMZ/10 μ M Imatinib (T100+I10) und 10 μ M Imatinib (I10). Die optische Dichte des Mittelwerts der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (ANOVA mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; cl, Klon.

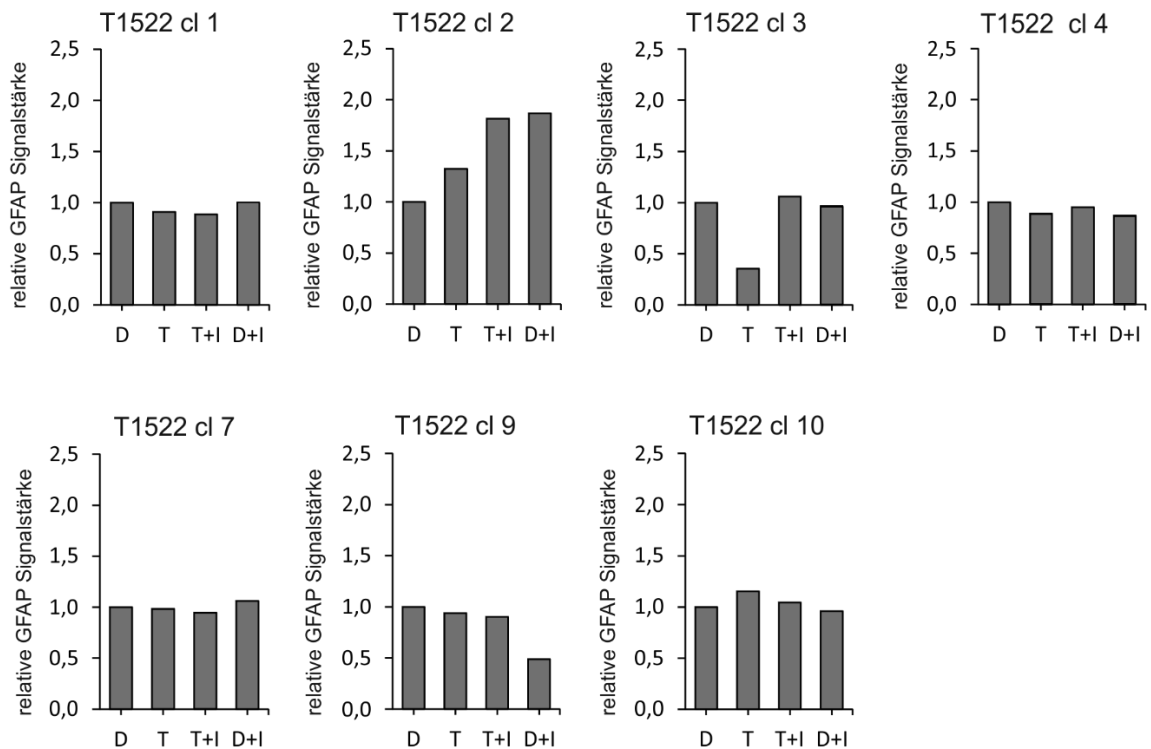
Von den vier untersuchten T1586 Klonen (cl 2, cl 4, cl 6 und cl 7) wiesen drei eine statistisch signifikante Verminderung des BrdU-Einbaus nach Behandlung mit 100 μ M TMZ auf. Dabei lagen die Mittelwerte für die Messreihen mit 100 μ M TMZ im Fall der Klone T1586 cl 6 und cl 7 deutlich unter den Mittelwerten für die Messreihen mit 50 μ M TMZ (Abb. 29 unten). Bei T1586 cl 2 führten nur die Kombinationsbehandlungen zu Proliferationseinschränkungen. Mit 10 μ M Imatinib allein wurde nur bei T1586 Klon cl 4 eine statistisch signifikante Veränderung der Inkorporation von BrdU gemessen. Bei Klon T1586 cl 4 war bei den hohen Temozolomiddosierungen von 100 μ M TMZ eine Verstärkung des Effektes durch die Zugabe von Imatinib erkennbar (Tab. 22, Anhang), Klon cl 7 hingegen wies nur bei den niedrigen TMZ-dosierungen einen zusätzlichen Effekt durch die Zugabe von

Imatinib auf (Abb. 29 unten, Tab. 24, Anhang). Weiterhin war eine Kooperativität der TMZ- und Imatinib-Behandlung trotz relativer Unempfindlichkeit gegen Imatinib allein für alle untersuchten T1586 Klone bis auf Klon cl 2 evident. Damit erwiesen sich drei T1586 Klone (cl 4, cl 6, cl 7) als sensitiv gegenüber 100 μ M TMZ.

3.7 Expression des Intermediärfilamentproteins GFAP

Das Intermediärfilament GFAP ist ein Marker für neurale Stammzellen, reife Astrozyten, aber auch in bestimmten Linien von SLGC nachweisbar (Yang und Wang, 2015; Vescovi et al., 2006; Choschzick et al., 2014). In Proteinextrakten der T1442 Mutterkultur war eine GFAP-Expression nicht nachweisbar und auch durch die Behandlung mit TMZ und/oder Imatinib nicht induzierbar (diese Blots werden wegen fehlender Signale nicht gezeigt). Ebenso war bei der T1371 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen kein GFAP-Signal im Westernblot erkennbar. Dagegen wurde ein deutliches GFAP Signal für alle Proben aus T1522 Klonen sowie der T1586 Mutterkultur und Klone detektiert. Im Fall der T1522 Klone handelte es sich meist um eine starke Bande bei 50 kDa (Abb. 30 B), die dem Voll-Länge-Protein von GFAP entspricht (Kamphuis et al., 2012). Im Fall der T1586-Proben wurde dagegen ein deutliches Triplett detektiert, in dem die oberste Bande bei 50 kDa lag (Abb. 31 B). Für die Berechnung der relativen GFAP-Expression wurden die 50 kDa-Bande von GFAP und die Aktin-Ladkontrolle herangezogen. Da im Fall der T1586 GFAP-Westernblots die Aktinbande (42 kDa) in der bildlichen Darstellung nicht gut von den unteren Banden des GFAP-Tripletts zu separieren ist, wird in Abb. 31 B die Ladkontrolle GAPDH anstelle von Aktin gezeigt.

A



B

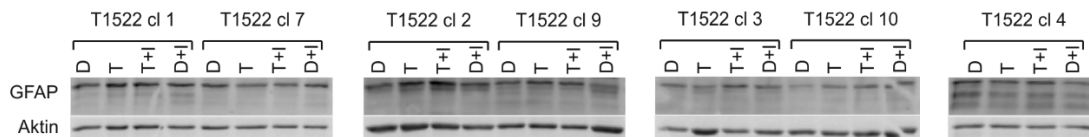
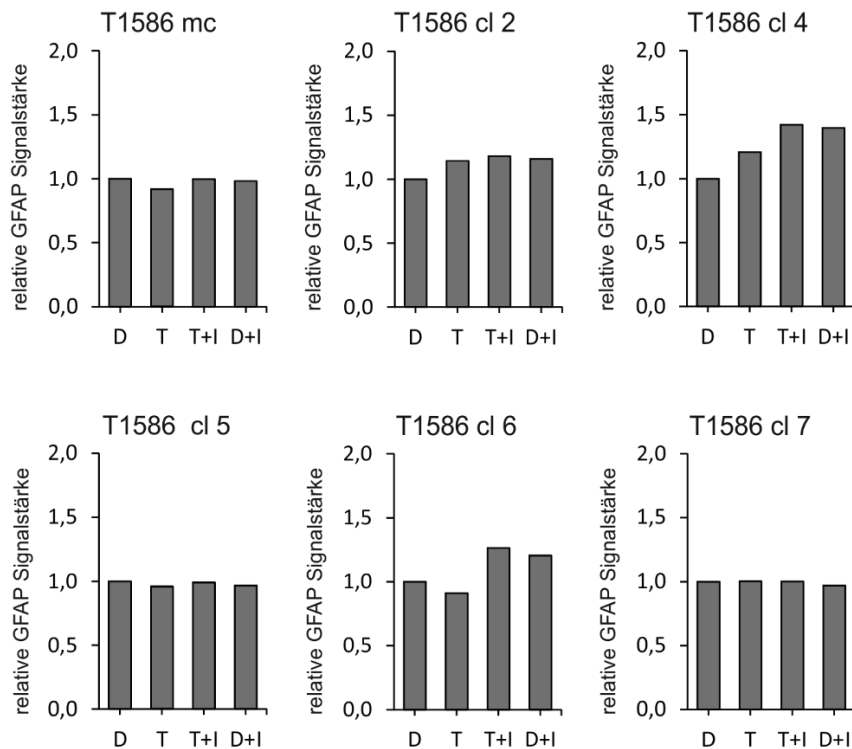


Abb. 30: (A) Relative Expression von GFAP in den T1522 Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D), Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T), 50 μ M Temozolomid, (T+I), 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zur Ladekontrolle Aktin berechnet. GFAP, saures Gliafaserprotein; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; mc, Mutterkultur.; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Bei dem Klon T1522 cl 1 führte keine der Behandlungen zu einer Änderung der GFAP-Expression (Abb. 30 A, B). Sehr ähnlich waren die Ergebnisse für die Klone T1522 cl 4, cl 7 und cl 10. Bei Klon T1522 cl 3 war zwar das GFAP-Signal in den verschiedenen Proben nahezu identisch, durch das starke Aktin-Signal in der TMZ-Probe ergab sich jedoch eine reduzierte relative Expression (Abb. 30 A, B). Bei Klon T1522 cl 2 kam es nach den Behandlungen zu einem Anstieg der relativen GFAP-Signalstärke, welcher bei den Behandlungen mit TMZ/Imatinib sowie Imatinib allein mehr als das 1,9-fache der Kontrolle betrug. Bei Klon cl 9 kam es bei 5 μ M Imatinib zu einer Senkung der relativen GFAP-Expression auf die Hälfte. Bei der Berechnung der relativen GFAP-Expression ist zu beachten, dass für die Probe T1522 cl 9/D+I primär das starke Aktinsignal die errechnete 55 %-Senkung bedingt und weniger die Reduktion des GFAP-Signals.

A



B

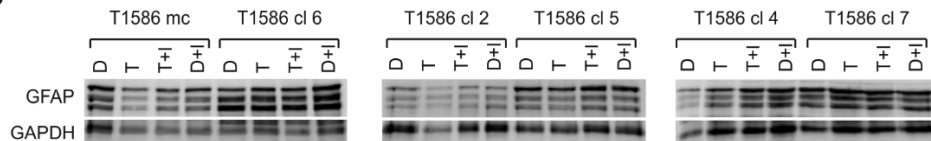


Abb. 31: (A) Relative Expression von GFAP in der T1586 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen der in (B) dargestellten beispielhaften Westernblots. Die Gesamtproteinextrakte wurden an Tag d5 nach der Behandlung isoliert. (D) Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Lösungsmittelkontrolle), (T) 50 μ M Temozolomid, (T+I) 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. Die relative Signalstärke der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert und die behandelten Proben im Verhältnis dazu dargestellt. Die Expression wurde relativ zu der Ladekontrolle Aktin berechnet. – Aus Gründen der besseren Trennung und bildlichen Darstellung wird hier die Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gezeigt; GFAP, Saures Gliafaserprotein; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

Die Proben der T1586 Mutterkultur wiesen nach den Behandlungen relativ zur DMSO-Kontrolle keine Veränderungen der relativen GFAP-Expression auf. Die Klone cl 2, cl 5 und cl 7 wiesen ebenfalls nach den Behandlungen eine zu den jeweiligen Kontrollen vergleichbare GFAP-Expression auf (Abb. 31). Im Fall des Klons cl 4 zeigte sich eine Zunahme der GFAP-Expression insbesondere nach den Behandlungen mit Imatinib allein oder in Kombination mit TMZ (Abb. 31). Dabei wurde in beiden Fällen eine ca. 1,4-fache Steigerung des GFAP-Levels festgestellt. Auch der Klon T1586 cl 6 wies nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und 5 μ M Imatinib einen geringen Anstieg der relativen GFAP-Signalstärke auf, die jedoch maximal das 1,3-Fache betrug (Abb. 31).

Insgesamt ist festzustellen, dass sowohl bei den T1522 Klonen als auch den T1586 Proben (Mutterkultur und Klone) nur in Einzelfällen Änderungen in der GFAP-Expression auftraten. Diese betrafen einen Anstieg der relativen GFAP-Expression in Klon T1522 cl 2 sowie T1586 cl 4 und cl 6, wo jeweils die mit TMZ/Imatinib und Imatinib behandelten Proben eine höhere GFAP-Expression aufwiesen. Dabei betrug die Steigerung stets weniger als das 2-Fache.

Weiterhin wurde eine Senkung der relativen Expression für die Proben T1522 cl 9 DMSO/5 μ M Imatinib und T1522 cl 3 TMZ errechnet, die primär auf dem deutlich erhöhten Signal der Aktin-Ladekontrolle beruhte. Dieses Verhalten wurde in den technischen Replikaten bestätigt. Die Problematik des erhöhten Aktin-Signals, bei identischen Mengen an aufgetrenntem Gesamtzellproteinextrakten, wurde auch in zuvor besprochenen Westernblots beobachtet und betraf primär die Proben T1522 cl 3/T und T1522 cl 9/D+I. Worauf dieses Phänomen beruht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass es sich um eine abnorme Anreicherung von Aktin in den untersuchten Zellproben handelt. Der verwendete pan-Aktin Antikörper erkennt beide Aktin-Isoformen, wird in Verdünnungen von 1:20 000 eingesetzt und erwies sich in Westernblot-Analyse als generell sehr geeignet, da bereits unter sehr kurzen Detektionszeiten die Chemilumineszenz-Signale sehr deutlich zu detektieren waren.

3.8 Beeinflussung der PDGF-AB-Sekretion durch Imatinib

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob sich die SLG-Linien autokrin stimulieren konnten, wurde auf das Vorhandensein von PDGF-AB in den Medien von SLGC Mutterkulturen und Klonen getestet. Dazu wurde das Medium der DMSO-Kontrollen und das Medium der mit DMSO/5 μ M Imatinib behandelten Zellen auf den PDGF-AB Gehalt untersucht (= Überstände der Proben der Westernblot-Analysen). Das N-Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, enthielt keine Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie, sondern lediglich das Serum-Supplement BIT (*bovine serum albumin-insulin-transferrin*) und die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF. Die gemessenen PDGF-AB Spiegel sollten daher von den Zellen produziert werden. Aufgrund technischer Gegebenheiten wurde dieser ELISA nur einmalig durchgeführt und deshalb keine statistische Analyse vorgenommen.

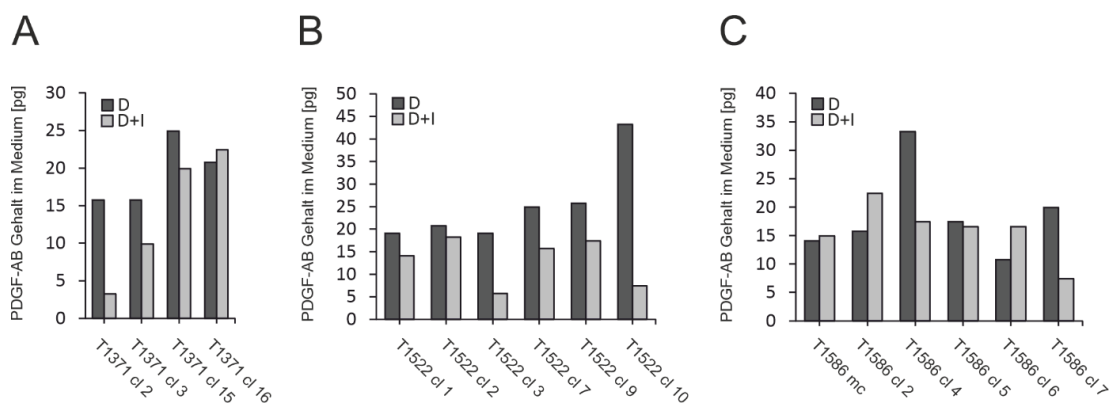


Abb. 32: PDGF-AB Gehalt in pg/ml im Zellkulturmedium nach Behandlung der Zellen mit DMSO bzw. mit DMSO/5 μ M Imatinib (Wachstumsfaktor ELISA). Das Medium wurde an Tag d 5 nach der Behandlung entnommen. (D) Behandlung mit Dimethylsulfoxid, (D+I) DMSO/5 μ M Imatinib. PDGF, *platelet-derived growth factor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; I, Imatinib; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

In allen untersuchten Proben war PDGF-AB nachweisbar (Abb. 32 A, B, C). Die ermittelten PDGF-AB Konzentrationen variierten zwischen den Zellklonen, aber auch zwischen der DMSO und DMSO/I-matinib-Behandlung. Im Medium der mit DMSO behandelten T1371 Klone cl 2 und cl 3 wurden jeweils 15,8 pg PDGF-AB gemessen; nach Zugabe von 5 μ M Imatinib sanken die PDGF-AB-Level auf 3,3 pg bei Klon cl 2 und 9,9 pg bei Klon cl 3 ab. Bei T1371 Klon cl 15, der einen höheren PDGF-AB-Basiswert aufwies, konnte ebenfalls eine Verringerung des PDGF-AB-Levels um 5 pg nach Behandlung mit 5 μ M Imatinib festgestellt werden. Bei T1371 cl 16, der ebenfalls ein erhöhtes Basislevel aufwies, wurde nach der Imatinib-Behandlung eine geringe Zunahme des PDGF-AB-Levels von 20,8 pg auf 22,4 pg gemessen.

Bei den T1522 Klonen kam es im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in allen 6 Fällen zu einer Reduktion des PDGF-AB-Levels nach der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib. Dabei war die Senkung am stärksten im Fall des Klons cl 10, der mit 43,3 pg das höchste PDGF-AB-Basislevel hatte. Auch der Klon cl 3 wies eine starke Senkung (um 60 %) auf. Ansonsten betrug die Abnahme des PDGF-AB-Levels 26 % (cl 1), 12 % (cl 2) sowie 37 % (cl 7) und 32 % (cl 9).

Auch bei den T1586 Klonen waren unterschiedlich hohe Basislevel an PDGF-AB feststellbar (Abb. 32). Dabei lagen die Level für die Klone cl 2 und cl 5 auf dem der Mutterkultur. Der Klon cl 6 hatte ein reduziertes, die Klone cl 4 und cl 7 ein 2,4-fach bzw. 1,4-fach erhöhtes Basislevel. Bei der T1586 Mutterkultur und Klon cl 5 schwankte der PDGF-AB-Gehalt des Mediums nach der Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib um 5 %. Bei den Klonen T1586 cl 4 und cl 7 wurde eine Senkung der PDGF-AB-Level nach Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib auf 52 % und 37 % beobachtet. Bei den Klonen cl 2 und cl 6 konnte eine Zunahme des PDGF-AB-Levels um 42 % bzw. 54 % nach Behandlung mit DMSO/5 μ M Imatinib gemessen werden. Somit bewirkte die Gabe von 5 μ M Imatinib bei zwei von sechs T1586 Klonen eine Steigerung der PDGF-AB Sekretion und bei zwei eine Senkung.

4 Diskussion

4.1 Eigenschaften von SLGC-Linien und abgeleiteten Klonen

Wie in der Einleitung erläutert, können Glioblastome (GBMs) anhand ihrer molekulargenetischen Veränderungen in die vier Subtypen klassische-GBMs, mesenchymale-GBMs, neurale-GBMs und proneurale-GBMs unterschieden werden (Verhaak et al. 2010; van Meir et al., 2010): dabei ist das klassische-GBM u.a. durch die Überaktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und den Verlust des Tumorsuppressors PTEN gekennzeichnet (Verhaak et al., 2010). Eine Überexpression von EGFR bei ansonsten neuraler Signatur wird für das neurale-GBM beobachtet (van Meir et al., 2010). Der Verlust von drei Tumorsuppressoren (NF1, Tp53 und PTEN) wird für das mesenchymale-GBM beschrieben (van Meir et al., 2010). Der proneurale-GBM Subtyp wiederum zeichnet sich durch den Verlust von PTEN und Tp53 und eine Überaktivität des PDGFR- α aus (van Meir et al., 2010). Die in dieser Arbeit untersuchten stammzellähnlichen Tumorzellen (SLGCs) aus GBMs sowie die SLGCs aus dem Gliosarkom T1371 lassen sich diesen Kategorien zuordnen. So zeichnen sich alle vier SLGC Mutterkulturen T1371, T1442, T1522 und T1586 durch die Expression der neuronalen Marker Nestin und Tau sowie den Verlust von PTEN aus (Diss. E. Hirseland, 2017; diese Arbeit und persönliche Mitteilung PD. Dr. C. Zechel). Weiterhin exprimieren alle vier SLGC Linien EGFR und unterschiedliche Level an PDGFR- α und PDGFR- β , wobei keine Überexpression dieser beiden Rezeptortyrosinkinasen vorliegt. Der Tp53-Status von T1522 und T1586 ist Wildtyp, während T1371 und T1442 eine homozygote Mutation des Tp53-Gens aufweisen (T1371: *gain of function mutation* R175H; T1442: *loss of function mutation* N239D; persönliche Mitteilung PD. Dr. C. Zechel). Für die T1371 und T1442 SLGCs ist weiterhin bekannt, dass diese GFAP nach Induktion der Differenzierung exprimieren (Diss. E. Hirseland, 2017 und diese Arbeit). Dass es sich bei allen vier SLGC-Linien um stammzellähnliche Tumorzellen handelt, wurde durch Xenotransplantationen in SCID-Mäuse (M. Loy, 2019) und die Expression des Pluripotenzfaktors Sox-2 nachgewiesen (Choschick et al., 2014; Diss. E. Hirseland, 2017 und diese Arbeit).

In der Literatur wird eine intratumorale Heterogenität für diverse solide Tumoren beschrieben, was bedeutet, dass die Zellen ein- und desselben Tumors unterschiedliche genetische und epigenetische Veränderungen aufweisen (Qazi et al., 2017). Eine Charakterisierung von Zellklonen, die mittels *limited dilution assay* aus den T1371- bzw. T1442-Kulturen gewonnen wurden, ist bereits vor Beginn dieser Arbeit von Bachelorstudenten im Labor erfolgt. Die T1522 und T1586 Klone wurden erst zu Beginn dieser Arbeit gewonnen, so dass zunächst eine Analyse der Zellklone mittels Immunzytochemie (ICC) und Durchflusszytometrie erfolgte. Außer der Expression von GFAP, Nestin und Sox-2, sowie der beiden PDGFR-Rezeptoren wurde die Expression von CD133 untersucht, da dies Auskunft über die Ausbildung einer zellulären Hierarchie in den Klonkulturen gibt (Chen et al.,

2010). An dieser Stelle sei angemerkt, dass von der T1442 Mutterkultur drei Subklone existierten, diese aber nach dem Auftauen der in Flüssigstickstoff gelagerten Kulturen nach wenigen Tagen das Wachstum einstellten und daher in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten.

PDGFR- α /CD140a waren auf den Zellen der T1522 und T1586 Klonkulturen mittels ICC und Durchflusszytometrie nachweisbar. Die Klone unterschieden sich jedoch in beiden Fällen hinsichtlich der Expression. So wiesen die T1522 Klone cl 1, cl 4, cl 5 und cl 7 eine hohe PDGFR- α -Expression in der immunzytochemischen Färbung auf, während diese für die Klone T1522 cl 2, cl 3 und cl 10 gering war. In der Durchflusszytometrie zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Anteile an CD140a-positiven Zellen in den Klonkulturen. Klon T1522 cl 1 hatte mit 30,3 % den höchsten Anteil an CD140a-positiven Zellen innerhalb der Gruppe der T1522 Klone. Die T1522 Klone cl 2, cl 3 und cl 10 wiesen untereinander einen ähnlichen Anteil an CD140a-positiven Zellen auf, der zwischen 18,1 % und 19,7 % lag, Klon T1522 cl 7 zeigte mit 10,5 % den geringsten Anteil. Die Inkongruenz, die zwischen immunzytochemischer und durchflusszytometrischer Analyse festgestellt wurde, ist wahrscheinlich durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von PDGFR- α /CD140a bedingt. So variierten einerseits die relativen Anteile von PDGFR- α -Signalen im Cytoplasma und auf der Plasmamembran, zum anderen war auch die Verteilung der Signale in der Plasmamembran inhomogen. Es kann daher vermutet werden, dass einerseits das Internalisieren und/oder Recyclen von PDGFR- α zwischen den Zellen einer Kultur variiert, andererseits Rezeptoren in bestimmten Arealen der Plasmamembran, den sogenannten *lipid rafts* (Levental et. al., 2020), gehäuft vorliegen. In der immunzytochemischen Färbung von T1586 Klonen waren keine deutlichen Unterschiede in der PDGFR- α -Expression erkennbar. Dies beruht zumindest teilweise darauf, dass das sphäroidale Wachstum eine Lokalisierung des PDGFR- α -Signals in Zellkompartimenten und/oder definierten Regionen der Plasmamembran nach der immunzytochemischen Färbung der Tumorsphären nicht zuließ. In der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden Unterschiede zwischen den T1586 Klonen evident, da hier mit Einzelzellsuspensionen gearbeitet wurde. Allerdings lagen die PDGFR- α /CD140a-Level bei den T1586 Klonen bei maximal 7,4 %. In der T1586 Mutterkultur und den Klonen cl 4 und cl 6 waren die Anteile an CD140a-positiven Zellen mit 6,7 %, 7,4 % und 6,1 % am höchsten, während die T1586 Klone cl 2, cl 5 und cl 7 weniger als 3 % CD140a-positive Zellen aufwiesen.

Im Fall der T1442 und T1371 Mutterkultur sowie der untersuchten T1371 Klone erfolgte die Analyse der PDGFR- α /CD140a-Level lediglich mittels Durchflusszytometrie und Westernblot-Analyse. Der Anteil an PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen betrug im Fall von T1442 20 %, obwohl die Signale im Westernblot nur schwach waren. Im Fall der T1371 Mutterkultur und T1371 Klone belegten Westernblot und Durchflusszytometrie eine im Vergleich zu den anderen T1522- und T1586 Klonen hohe PDGFR- α -Expression. Die Anteile an PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen erreichten in der

T1371-Mutterkultur und den Klonen cl 15 und cl 16 Werte um 40 %. Obwohl das PDGFR- α -Level im Westernblot ähnlich hoch war wie für T1371 cl 16, betrug der Anteil an CD140a-positiven Zellen für T1371 cl 3 nur 6,3 %. Somit ist davon auszugehen, dass der PDGFR- α auch im Fall von T1442 sowie der T1371 Mutterkultur und den T1371 Klonen eine Heterogenität hinsichtlich der Expression, aber vor allem der Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten zeigt.

Die PDGFR- β -Expression wurde in dieser Arbeit nur im Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich für die T1371, T1522 und T1586 Klone eine Heterogenität der PDGFR- β -Expression. Im Fall der T1371 Mutterkultur und der untersuchten Klone war die Expression in den Klone T1371 cl 2 und cl 3 am höchsten. Im Fall der T1522 Klone, mit Ausnahme von T1522 cl 4, lag das PDGFR- β -Signal nahe an der Nachweisgrenze. Dies wurde ebenso im Fall der T1586 Mutterkultur und aller T1586 Klone beobachtet. Da die T1586-Kulturen (Mutterkultur und Klone) im Westernblot und in den ICC-Analysen eine im Vergleich zu den T1522 und T1371 Klonen deutlich höhere Sox-2-Expression aufwiesen (siehe unten), könnte vermutet werden, dass hohe PDGFR- β -Level auf ein differenzierteres Stadium der Kulturen hinweisen. Dies würde sich in höheren Anteilen an Typ III-Zellen und weiter differenzierten Tumorzellen widerspiegeln (Chen et al., 2010). Diese Vermutung kann für die T1371 und T1522 Klone durch die immunzytochemischen Analysen der Sox-2- und CD133-Expression nicht bestätigt werden.

Die Sox-2-Expression wurde in dieser Arbeit mittels immunzytochemischen Färbungen und durch Westernblot-Analysen untersucht. Bei der T1442 Mutterkultur war Sox-2 in den ICC-Färbungen nachweisbar, in den Westernblot-Analysen zeigte sich eine geringe Sox-2-Expression. Unter den T1371 Klonen wies der Klon cl 16 in den ICC-Färbungen mit Abstand die höchste Sox-2-Expression auf, wobei die Unterschiede zur T1371 Mutterkultur und den Klonen cl 2, cl 3 und cl 15 im Westernblot weniger deutlich waren. Unter den T1522 Klonen war das Sox-2-Level in den Westernblots für die Klone T1522 cl 1 und cl 4 am höchsten, wobei sich die Sox-2-Bande als Doppelbande präsentierte. Im Gegensatz zu den T1522-Blots, in denen beide Sox-2-Banden ähnlich stark waren, dominierte im Fall von T1586 (Mutterkultur und Klonen) die untere Bande. Da das Sox-2-Signal auch in den immunzytochemischen Analysen für T1586 (Mutterkultur und Klone) sehr stark war, ist davon auszugehen, dass dieses die starken Westernblot-Signale der unteren Bande widerspiegelte.

Die Analyse der GFAP-Expression erfolgte in dieser Arbeit, bis auf T1586 (Mutterkultur und Klone), ausschließlich mittels Westernblot. Übereinstimmend mit den Daten anderer Arbeitsgruppenmitglieder, die GFAP als Marker für differenzierte T1371-Zellen identifizierten (Diss. E. Hirseland, 2017; Diss. M. Loy, 2018), war die Expression von GFAP in den T1371-Blots unter der Nachweisgrenze. Für die T1586 Klone dagegen, die auch in den immunzytochemischen Analysen dieser Arbeit deutlich GFAP-positiv waren, wurden im Westernblot starke Signale detektiert. Im Gegensatz dazu waren

die Signale für alle T1522 Klone schwach. Sowohl in den T1586- als auch den T1522-Blots handelte es sich bei dem GFAP-Signal um ein Triplett, in dem die oberste Bande dem Volle-Länge-GFAP-Protein entsprach. Ob es sich bei den beiden unteren Banden um Isoformen des GFAPs oder um Spaltprodukte einer definierten GFAP-Isoform handelte (Kamphuis et al., 2012), wurde nicht überprüft. Generell wiesen die T1586 Mutterkultur und alle T1586 Klone in der immunzytochemischen Färbung und im Westernblot starke GFAP-Signale auf, die insbesondere für die T1586 Mutterkultur und die Klone cl 4, cl 6 und cl 7 sehr hoch waren. Die immunzytochemischen Färbungen der T1586 Klone demonstrierten zudem eine hohe Sox-2-Expression bei nahezu fehlender CD133-Expression. Da CD133 von Chen et al. (2010) als Marker der Typ II-Zelle identifiziert wurde, die relativ zur Typ I-Zelle eine weiter differenzierte Progenitorzelle ist und weniger Sox-2 exprimiert, kann geschlossen werden, dass die Kulturen der T1586 Klone primär aus Typ I-Zellen bestehen. Damit verhält sich T1586 (Mutterkultur und alle Klone) analog zu den im Labor etablierten SLGC-Linien T1440, T1452 und T1464 (Choschick et al., 2014; Diss. E. Hirseland, 2017; Diss. M. Loy, 2018), für die GFAP ebenfalls ein Marker der Gliomstammzelle (Typ I-Zelle) ist. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung wichtig, dass normale adulte, neurale Stammzellen ebenfalls GFAP exprimieren (Vescovi et al., 2006). Es könnte somit vermutet werden, dass sich das Glioblastom, von dem die T1586 Mutterkultur angelegt wurde, von neoplastisch transformierten adulten, neuronalen Stammzellen ableitet. Die Expression von CD133 und die Anzahl CD133-positiver Zellen war in allen T1522 Klonen hoch (> 60 %; Ausnahme T1522 cl 7: 42 %), was frühere Beobachtungen von E. Hirseland (2017) bestätigte.

In der Summe lassen die vorliegenden Daten zu T1371, T1442, T1522 und T1586 auf eine inter- und intratumorale Heterogenität schließen. Diese betrifft nicht nur den Grad an Differenzierung (zelluläre Hierarchie), sondern auch die Anwesenheit funktionaler Tumorsuppressoren und die Expression der PDGF-Rezeptoren α und β . Wie die vier SLGC-Linien sowie die T1371, T1522 und T1586 Klone auf die Behandlung mit dem PDGFR-Inhibitor Imatinib (in An- und Abwesenheit von TMZ) reagieren, wird in Abschnitt 4.2 besprochen. In Abschnitt 4.3 wird diskutiert, ob es durch die Behandlung mit Imatinib und/oder TMZ zu einer Selektion von bestimmten Differenzierungsstadien (Typ I-, II- oder III-Zellen) kommt. Abschließend erfolgt eine Betrachtung zur Fähigkeit der untersuchten SLGC-Linien und Klone, den Wachstumsfaktor PDGF-AB zu sezernieren (4.4).

4.2 Effekte von Imatinib und/oder TMZ auf Proliferation und PDGFR-Expression

Wie in der Einleitung beschrieben, wird für die GBM die Entwicklung einer Chemoresistenz diskutiert, die vor allem die stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) involviert (Überblick in Schonberg et al., 2014). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente (Durchflusszytometrie, Westernblot-Analysen und BrdU-ELISA) zeigen, dass die vier untersuchten SLGC-Linien und die abgeleiteten

Klone unterschiedlich gegenüber der Einzelbehandlung mit TMZ und Imatinib sowie der Doppelbehandlung mit TMZ/Imatinib reagierten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden alle SLGC-Linien und Klone mit identischen Konzentrationen von TMZ und Imatinib behandelt. TMZ wurde in den Dosen 50 μ M und 100 μ M eingesetzt, Imatinib in den Konzentrationen 5 μ M und 10 μ M. Dabei beruhte die Wahl der eingesetzten Konzentrationen auf Experimenten, die vor dem Beginn dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. An dieser Stelle ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass die Bestimmung der Proliferation mittels BrdU-ELISA im Fall der SLGCs und Klone durch deren sphäroidales Wachstum und die zum Teil geringe Adhärenz kompliziert werden. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Interpretierbarkeit der Daten zu verbessern, wurden die 96-Lochplatten daher stets mit Fibronektin beschichtet und 2 % FCS dem Medium beigelegt, was keinen Einfluss auf die Proliferation hat, die Adhärenz jedoch deutlich steigert (Raju et al., 2015). Dennoch wiesen die gemessenen optischen Dichten im Fall einiger BrdU-ELISA für einige SLGCs und Klone hohe Standardabweichungen auf, die deren primär sphäroidales Wachstum und/oder deren geringere Adhärenz reflektieren.

Die Sensitivität von T1442-Zellen gegenüber der TMZ-/Imatinib-Behandlung wurde lediglich in Hinblick auf die Anreicherung von PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen und die Expression der PDGF-Rezeptoren im Westernblot untersucht. Die durchflusszytometrischen Analysen belegen eine Anreicherung von CD140a-positiven Zellen von insgesamt 20 % in der Kontrolle auf mehr als das Doppelte nach der TMZ- (40,3 %) und der TMZ/Imatinib- (54,8 %) Behandlung (Imatinib allein: 27 %). Dies spiegelt sich jedoch nicht in einer Erhöhung der PDGFR- α -Signale in den korrespondierenden Westernblots wider. Es könnte daher vermutet werden, dass die für Rezeptortyrosinkinasen typische Internalisierung der Rezeptoren (Rogers und Fantauzzo, 2020) durch TMZ, nicht aber den Kinase-Inhibitor Imatinib stark vermindert wird.

Für die beiden im BrdU-ELISA untersuchten T1371 Klone cl 2 und cl 3 wurde mit TMZ (50 und 100 μ M TMZ) keine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation erreicht. Dies lässt sich mit der Tatsache erklären, dass beide Klone eine hohe MGMT-Expression aufwiesen. Die MGMT-Expression wurde in zweifacher Hinsicht ermittelt (persönliche Mitteilung PD. Dr. C. Zechel). Zum einen wurde an Zellpellets mit ansteigenden Passagenzahlen überprüft, dass das MGMT-Level in biologischen Replikaten von Mutterkulturen bzw. Klonen stabil ist. Zum anderen wurde das MGMT-Level an Extrakten aus Mutterkulturen und Klonen ermittelt (Abb. 40, Anhang). In diesem Kontext ist wichtig, dass aufgrund der Antikörpereigenschaften mindestens 20 μ g Proteinextrakt pro Gelprobe und Gelspur eingesetzt werden mussten und die Signale für geringe Mengen an MGMT-Protein dennoch unter der Nachweisgrenze lagen. Da diese Westernblots wegen der genannten experimentellen Bedingungen und der Knappheit des biologischen Materials nur teilweise mit den Extrakten aus

kontrollbehandelten Mutterkulturen und Klonen erfolgten, werden Beispiele dieser Daten nur im Anhang gezeigt (Abb. 40, Anhang). In der Summe belegen diese Analysen eine hohe Stabilität der MGMT-Expression über 20 – 50 Passagen und eine Variabilität des MGMT-Levels zwischen den Zellklonen, wenn die Mutterkultur hinsichtlich der MGMT-Promotormethylierung einen M/U-Status aufweist. Dabei bedeutet ein M/U-Status, dass in derselben SLGC-Mutterkultur Zellen mit und ohne MGMT-Promotormethylierung vorkommen bzw. eine partielle Methylierung des Promotors vorliegt (Yu et al., 2020).

Für die beiden T1371 Klone cl 2 und cl 3 war auch die Empfindlichkeit gegenüber 5 und 10 μM Imatinib gering, obwohl beide Klone PDGFR- α und PDGFR- β exprimierten. Nach der Doppelbehandlung mit 50 μM TMZ/10 μM Imatinib wurde nur für den Klon T1371 cl 3 eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation festgestellt. Dennoch weisen die Daten auf eine mögliche Kooperativität von TMZ und Imatinib hin. Dies wird auch durch die Westernblot-Daten gestützt, die für beide Klone eine geringe Veränderung der PDGFR- α -Expression (nicht aber PDGFR- β -Expression) anzeigten, die nach alleiniger Imatinib-Behandlung und TMZ/Imatinib Doppelbehandlung verschieden war. Die Anzahl an PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen lag in den Kulturen der T1371 Klone cl 2 und cl 3 bei 22,8 % bzw. 6,3 %. Eine Anreicherung in Anwesenheit von Imatinib war für den Klon cl 3 (Kontrolle: 6,3 %; Imatinib: 45,2 %), weniger stark ausgeprägt auch für den Klon cl 2 (Kontrolle: 22,8 %; Imatinib: 30,5 %), zu verzeichnen. Eine deutliche Anreicherung von PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen nach Imatinib-Gabe fehlte weiterhin in Kulturen des Klons T1371 cl 16 und war für die Mutterkultur und den Klon cl 15 gering.

Die vier mittels BrdU-ELISA untersuchten T1522 Klone zeigten unterschiedliche Reaktionen auf die Behandlungen. So reagierte der Klon T1522 cl 3 gegenüber der Behandlung mit 50 und 100 μM TMZ mit einer statistisch signifikanten Reduktion der Proliferation um 10 % bzw. 20 %. Auch der Klon T1522 cl 1 wies eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation nach TMZ-Behandlung auf, die jedoch geringer ausfiel (10 % bei 100 μM TMZ). Dagegen bewirkte die TMZ-Behandlung bei den beiden anderen Klonen (T1522 cl 7 und cl 9) keine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation. Dieses Verhalten lässt sich nur zum Teil auf den MGMT-Status zurückführen. So wiesen alle Klone einen M/U-Status hinsichtlich der Promotormethylierung auf und exprimierten in Kontrollproben ähnliche MGMT-Proteinlevel (Abb. 40, Anhang). Als mögliche Erklärungen hierfür kommen die Aktivitäten anderer Reparatursysteme in Frage. So können die durch TMZ in die DNA eingebrachten Methylierungen nicht nur von MGMT, sondern auch mittels MMR und Basenexzisionsreparatur entfernt werden (Jiapaer et al., 2018). Dabei können diese beiden Reparatursysteme auf-

grund von genetischen oder epigenetischen Veränderungen in den Tumorzellen unterschiedlich aktiv sein (Burman et al., 2020). Zusätzlich könnte auch die Expression von bestimmten ABC-Transportern die Anwesenheit von TMZ in den Zellen modulieren (Beier et al., 2011).

10 μ M Imatinib induzierte nur im Fall des Klons T1522 cl 1 eine statistisch signifikante Verminderung der Proliferation. Dies lässt sich jedoch nicht auf die Expressionslevel der PDGF-Rezeptoren zurückführen, da die PDGFR- α -Level in den vier mittels BrdU-ELISA untersuchten Klonen vergleichbar waren und die Klone T1522 cl 7 und cl 9 höhere PDGFR- β -Level aufwiesen als die Klone cl 1 und cl 3. Allerdings ließen sich im Fall von T1522 cl 1 und cl 7 Steigerungen des PDGFR- α -Levels nach Behandlung mit Imatinib im Westernblot nachweisen. In der Tat kann eine Kooperativität zwischen der TMZ- und Imatinib-Behandlung aus den Doppelbehandlungen mit 100 μ M TMZ/5 μ M Imatinib und 100 μ M TMZ/10 μ M Imatinib für die Klone T1522 cl 1, cl 3 und cl 7 abgeleitet werden. Eine Anreicherung an PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen nach Imatinib-Behandlung (allein oder in Kombination mit TMZ) war in den Kulturen der T1522 Klone nur für den Klon T1522 cl 10 erkennbar, der nicht im BrdU-ELISA untersucht wurde, und für Klon cl 3. Auffallend ist, dass sowohl der Klon T1522 cl 1 als auch die Klone cl 3, cl 7 und cl 10 nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ weniger PDGFR- α /CD140a-positive Zellen aufwiesen. Ob dies ein Absterben CD140a-positiver Zellen oder aber eine Beeinflussung der Rezeptorinternalisierung anzeigt, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht erklärt werden.

Die vier untersuchten T1586 Klone wiesen ebenfalls Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber TMZ und/oder Imatinib auf. So wurde eine statistisch signifikante Senkung der Proliferation mit 100 μ M TMZ für die Klone T1586 cl 4, cl 6 und cl 7, nicht aber den Klon T1586 cl 2 ermittelt. Bereits mit 50 μ M TMZ wurde eine Senkung der Mittelwerte der ermittelten optischen Dichten evident, die aufgrund der hohen Standardabweichung der Messwerte das Signifikanzniveau von $<0,05$ nicht erreichte. Wie in dieser Arbeit beschrieben, zeichnen sich alle T1586 Klone durch ein primär sphäroidales Wachstum aus, was die Analyse mittels BrdU-ELISA trotz der oben beschriebenen Maßnahmen erschwerte. Mit 10 μ M Imatinib wurde nur im Fall des Klons T1586 cl 4 eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation erreicht. Allerdings erlaubte die Kombination von TMZ und Imatinib bereits bei Dosen von 50 μ M TMZ und 5 μ M Imatinib bei zwei Klonen (T1586 cl 4, cl 7) eine Senkung der Proliferation, die stärker war als mit TMZ allein. Bei Dosen von 100 μ M TMZ war der kooperative Effekt von TMZ und Imatinib nur bei Klon T1586 cl 4 evident. Ähnlich wie im Fall von T1522 weist der MGMT-Promotor in der T1586 Mutterkultur und Klonen einen M/U-Status auf und das MGMT-Protein war im Westernblot nachweisbar. Auch hier erklären die geringen MGMT-Expressionsunterschiede (Abb. 40, Anhang) nicht das unterschiedliche Verhalten der Klone und eine Beeinflussung des Verhaltens durch von MMR, BER und/oder ABC-Transportern sind, analog zur

Situation bei den T1522 Klonen, wahrscheinlich. Hinsichtlich des PDGFR- β wiesen alle T1586 Klone eine sehr niedrige Expression auf, die im Westernblot an der Nachweisgrenze des Antikörpers lag und sich nach den Behandlungen nicht deutlich veränderte. Die PDGFR- α -Expression war für die Klone T1586 cl 6 und cl 7 höher als für die Klone cl 2 und cl 4, eine Steigerung nach Imatinib-Behandlung war aber lediglich für den Klon cl 2 und cl 6 zu beobachten. Eine Anreicherung von PDGFR- α /CD140a-positiven Zellen war für die Klone T1586 cl 2, cl 4 und cl 6 nach der alleinigen Imatinib-Behandlung sowie nach der TMZ/Imatinib-Doppelbehandlung nachweisbar.

Wie bereits oben beschrieben wirkt TMZ über die Methylierung von Basen in der DNA, wobei diese in der O6- oder N7-Position von Guanin oder der N3-Position von Adenin erfolgen kann (Casorelli et al., 2012). Dabei ist die Methylierung in der N7-Position des Guanins deutlich häufiger als diejenige in der O6-Position. Auch die N3-Methylierung von Adenin tritt deutlich häufiger auf (Jiapaer et al., 2018). Welche Reparatursysteme die Läsionen in der DNA reparieren können, hängt von deren Typ ab. So kann die Aktivierung der MMR, ebenso wie ein hohes MGMT-Level, eine erhöhte TMZ-Resistenz bewirken, da MMR und MGMT die Methylierung in der O6-Position des Guanins entfernen (Jiapaer et al., 2018). Der Ausfall der BER führt zu einer erhöhten TMZ-Sensitivität, da sowohl die Läsion an der N7-Position von Guanin als auch diejenige an der N3-Position von Adenin durch BER repariert wird (Jiapaer et al., 2018). Wie oben angesprochen, könnte eine TMZ-Resistenz auch durch das Vorhandensein von bestimmten ABC-Transportern bedingt werden, die eine Akkumulation von TMZ in der Zelle verhindern (Beier et al., 2011). Der Einfluss von MGMT, MMR, BER und ABC-Transportern zur TMZ-Sensitivität der untersuchten SLGC-Linien und Klone wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt. Die Arbeiten einer früheren Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe belegen hinsichtlich der Methylierung des MGMT-Promotors einen gemischten Status für die T1442 und T1522 Mutterkultur, für die T1371-Linie eine vollständige Demethylierung (Diss. L. Bähr, 2018). Frau Dr. Bähr hat weiterhin für die T1522 Mutterkultur die Expression der ABC-Transporter ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6 und ABCG2 auf dem RNA-Level untersucht und bis auf ABCC6 Transkripte für alle genannten ABC-Transporter nachgewiesen. EC50-Werte für TMZ wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Klone nicht ermittelt, diejenigen für die Mutterkulturen sind jedoch bekannt und liegen für BrdU-ELISA (Messung an Tag d5) bei 90-100 μ M für T1442, T1522 und T1586, sowie 300-400 μ M für T1371 (Diss. L. Bähr, 2018 und persönliche Mitteilung PD. Dr. Zechel). In der Literatur wurden EC50-Werte für TMZ bei malignen Gliomen zwischen 87 μ M und 1290 μ M beschrieben (Hermisson et al., 2006). Für die Klone der T1371-Linie ist aufgrund der MGMT-Expression und des Verhaltens im BrdU-ELISA davon auszugehen, dass die TMZ-Dosierung zu gering war, um starke Effekte zu erzeugen. Umso wichtiger ist es, dass die Doppelbehandlung mit TMZ/Imatinib eine signifikante Reduktion der Proliferation von T1371 cl 3 induzierte, obwohl beide Agenzien allein keine solche Wirkung hatten.

Die Behandlungsexperimente in der vorliegenden Arbeit belegen unterschiedliche Empfindlichkeiten von SLGC-Mutterkulturen und Klonen gegenüber der Behandlung mit Imatinib. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen, dass Imatinib das Wachstum von Gliomzellen hemmen kann (Hägerstrand et al., 2006). Bei diesen Gliomzellen handelte es sich jedoch nicht um Gliomstammzellen, sondern um nicht näher spezifizierte primäre Kulturen, die in serum-haltigen Medium expandiert wurden und daher eine Population von weiter differenzierten Tumorzellen repräsentieren sollten (vergleiche Kapitel 1.7). Sechs der in der Studie von Hägerstrand und Kollegen (2006) untersuchten Zelllinien zeigten in Anwesenheit von 1 μM Imatinib eine Inhibierung des Wachstums um 40 %, sieben Zelllinien eine Inhibierung um 20 %. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Imatinib-Konzentrationen betrugen 5 μM und 10 μM . Mit 10 μM Imatinib wurde nur in zwei Fällen (T1522 cl 1, T1586 cl 4) eine statistisch, signifikante Reduktion der Proliferation beobachtet. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften resistenter gegenüber Imatinib sind als weiter differenzierte Gliomzellen. In der Literatur wurden Resistenzen bei GBM-Zellen für Imatinibkonzentrationen bis zu 10 μM beschrieben (Gross et al., 2006). Dafür wurde eine vermehrte Aktivierung von ERK1/2 und p38MAPK, sowie der PI3K/Akt- oder STAT3-Signalkaskade verantwortlich gemacht (Dong et al., 2011). Es wurden sogar Steigerungen der Proliferation unter niedrigen Dosen Imatinib (bis 5 μM) beschrieben (Ren et al., 2009; Dong et al., 2011). Als Ursache für eine Imatinibresistenz sind zudem Mutationen der PDGF-Rezeptoren denkbar. Weiterhin ist eine Beteiligung des ABL-Proteins an der beobachteten Sensitivität möglich. Für BCR-ABL sind in der Tat verschiedene Mutationen bekannt, die zu einer Imatinibresistenz führen (Nardi et al., 2004).

Ein wichtiger Aspekt im Kontext der vorliegenden Arbeit ist, dass hier die Wirkung von Imatinib in Anwesenheit von 1 % DMSO ermittelt wurde. Da TMZ hydrophob ist und in DMSO gelöst werden muss, enthielten alle Doppelbehandlungen und TMZ-Einfachbehandlungen stets 1 % DMSO. Die Analyse des gut wasserlöslichen Imatinib in Anwesenheit von DMSO hat den Grund, dass die Kooperativität von Imatinib und TMZ untersucht werden sollte. In diesem Zusammenhang sei auf eine Publikation von Galvao et al. (2014) hingewiesen, in der zytotoxische Effekte von DMSO auf retinale Ganglionzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht wurden und die einen Verlust an Viabilität ab DMSO-Konzentration von größer 1 % beschreiben

Eine Kooperativität von TMZ und Imatinib in der Reduktion der Proliferation von SLGCs wurde in der vorliegenden Arbeit für die Klone T1371 cl 3, T1522 cl 1, cl 3 und cl 7, sowie T1586 cl 4, cl 6 und cl 7 festgestellt (siehe oben). Dabei handelte es sich um additive Effekte, die bei 50 μM TMZ deutlicher auftraten als bei 100 μM . Imatinib kann somit die inhibierende Wirkung von TMZ auf die

Proliferation für eine Subpopulation von SLGCs verstärken. Ren et al. (2009) beschrieben eine Synergie von TMZ und Imatinib bei einigen Zelllinien aus malignen Gliomen, die bei höheren Dosen der Chemotherapeutika stärker ausgeprägt war. Die Autoren postulierten, dass TMZ vor allem auf die Zellen wirkt, bei denen Imatinib nicht zum Zellzyklusarrest führt (Ren et al., 2009). In der Literatur wurde weiterhin eine stärkere Wirkung von Imatinib auf „teilungs-aktive“ relativ zu „teilungs-inaktiven“ Zellen beschrieben, insbesondere wenn die Zellen zuvor mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB stimuliert worden waren (Dong et al., 2011). Wie in Kapitel 4.4 besprochen, sezernieren die untersuchten SLGC-Linien und Klone den Wachstumsfaktor PDGF-AB. Ob dieser eine Rolle bei den unterschiedlichen Sensitivitäten spielt, ist nicht geklärt.

4.3 Selektion auf Gliomstammzellen und/oder Progenitorstadien

Wie in der Einleitung beschrieben gibt es drei Typen von Gliomstammzellen, die hierarchisch organisiert sind. Dabei steht die eigentliche Gliomstammzelle (Typ I-Zelle) an der Spitze. Von dieser leiten sich dann die weiter differenzierten Typ II- und Typ III-Zellen ab, die ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, aber als Progenitoren einzustufen sind und die letztendlich zu weiter differenzierten Tumorzellen differenzieren (Chen et al., 2010). Alle drei Zelltypen exprimieren den Pluripotenzfaktor Sox-2, wobei dessen Expression mit steigendem Differenzierungsniveau abnimmt (Chen et al., 2010). Weiterhin sind alle drei Zelltypen für das Intermediärfilament Nestin positiv, das als Marker für undifferenzierte Zellen neuralen Ursprungs gilt (Zhang et al., 2008). Die Nestin-Expression erschien in der immunzytochemischen Analyse nach den Behandlungen relativ zur Kontrolle unverändert, was den Erhalt des neuralen Charakters der Zellen belegt. Von den drei unterschiedlich stark differenzierten Zelltypen weist nur die Typ II-Zelle die Expression von CD133 auf (Chen et al., 2010). Der vierte Marker, der in dieser Arbeit in der immunzytochemischen Analyse zum Einsatz kam, ist GFAP. Das Intermediärfilament GFAP ist ein Marker für reife Astrozyten und wird in der Analyse von GBM-Zellen oft als Marker für eine fortgeschrittene Differenzierung verwendet (Yang und Wang, 2015; Dong et al., 2012). In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass GFAP nach Langzeitbehandlung mit Imatinib in Gliomzellen höher exprimiert wird (Dong et al., 2012). Es gibt allerdings Gliomstammzellen, die sehr hohe Sox-2- und GFAP-Level aufweisen und als Typ I-Zellen zu klassifizieren sind (Choschick et al., 2014, Raju et al., 2015). Zu dieser Kategorie gehören auch die in dieser Arbeit charakterisierten T1586 Klone. Eine gleichzeitige Reduktion der GFAP- und Sox-2-Expression würde in den T1586 Klonen somit eine zunehmende Differenzierung von Typ I-Zellen in weiter differenzierte Zelltypen anzeigen. Hingegen würde die Steigerung der GFAP-Expression in den T1371-Zellen, die auf dem Niveau der Typ I-Zelle (= Gliomstammzelle) GFAP-negativ sind, ein Hinweis auf eine zunehmende Differenzierung sein. In der vorliegenden Arbeit wurde weder für die untersuchten Mutterkulturen (T1371, T1442, T1586) noch für die meisten

Klone von T1371, T1522, T1586 eine deutliche Veränderung der GFAP-Expression beobachtet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine effiziente Differenzierung in weiter differenzierte Tumorzellen durch die Behandlungen nicht ausgelöst wurde.

Um Hinweise auf die Anreicherung von Typ I-, Typ II- oder Typ III-Zellen zu erhalten, wurde untersucht, ob es nach den Behandlungen zu Änderungen in der Expression von Sox-2 und CD133 kam. Die CD133-Expression wurde durch immunzytochemische Färbungen und Westernblot Analysen untersucht und die Anzahl CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Untersuchungen zur Sox-2-Expression erfolgten mittels ICC und Westernblot. CD133-Signale wurden im Westernblot lediglich für die Proben aus den T1522 Klonen erhalten, die sich durch einen sehr hohen Anteil an CD133-positiven Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse auszeichneten, der mit Ausnahme des Klons T1522 cl 7 (42 %), bei > 60 % lag. Im Fall der Mutterkulturen T1442, T1371 und der T1371 Klone betrug der Anteil an CD133-positiven Zellen < 20 % (Ausnahme T1371 cl 2), bei der T1586 Mutterkultur und den T1586 Klonen < 10 % (Ausnahme T1586 cl 6: 11,5 %). Der Westernblot erlaubte somit nur dann die Detektion eines CD133-Signals, wenn sehr hohe Anteile an CD133-positiven Zellen in den untersuchten Kulturen vorlagen.

Im Fall der T1442-Linie führten die Behandlungen mit 50 μ M TMZ allein und die Kombination von TMZ/Imatinib zu einem Anstieg der Anzahl an CD133-positiven Zellen; dies wurde mit 5 μ M Imatinib allein nicht beobachtet. Somit ist von einem TMZ-induzierten Anstieg der Anzahl an Typ II-Zellen auszugehen. Da die T1442-Kultur auch in der immunzytochemischen Färbung mehr stark Sox-2-positive Zellen in der Kontrolle als in den mit TMZ-behandelten Proben aufwies, deuten auch diese Experimente auf eine TMZ-vermittelte Anreicherung von CD133-positiven Typ II-Zellen auf Kosten der Typ I-Zellen hin. Eine Anreicherung von CD133-positiven Zellen nach TMZ-Behandlung wurde ebenfalls von Perazzoli und Kollegen (2015) beobachtet, während Beier und Kollegen (2008) eine Abnahme der Anzahl an CD133-positiven Zellen beschrieben.

In den immunzytochemischen Färbungen der T1371-Mutterkultur und Klone wurden in den Kulturen der Kontrollen lediglich im Fall des Klons cl 16 sehr hohe Anteile an stark Sox-2-positiven Zellen festgestellt bei gleichzeitig geringer CD133-Expression. Nach der Behandlung mit 50 μ M TMZ stieg der Anteil von stark Sox-2-positiven Zellen in den Kulturen an, nicht aber nach der TMZ/Imatinib-Doppelbehandlung. Der Anteil an CD133-positiven Zellen stieg nach den Behandlungen, in denen Imatinib eingesetzt wurde, am stärksten aber nach der alleinigen Imatinib-Gabe (TMZ/Imatinib ca. 2-fach, Imatinib allein ca. 3-fach). Somit kann geschlossen werden, dass 50 μ M TMZ positiv auf Typ I-Zellen selektiert, Imatinib dagegen auf die weiter differenzierten Progenitoren. Mit Ausnahme der Kulturen des Klons T1371 cl 15 wiesen die T1371 Mutterkultur und T1371 Klone ebenfalls eine positive Selektion auf CD133-positive Zellen durch Imatinib und eine negative Selektion auf CD133-

positive Zellen durch TMZ auf. Im Fall des Klons T1371 cl 15 führte auch die Gabe von 50 μ M TMZ zur deutlichen Anreicherung von Typ II-Zellen. Ob die Anreicherung von CD133-positiven-Zellen auf einer Differenzierung von Typ I- zu Typ II Zellen beruht oder auf der höheren Viabilität von Typ II-Zellen bzw. dem Verlust von Typ I-Zellen durch Zelltod, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Wie oben erläutert, waren die aus den T1522 Zellklonen gewonnen Proben die einzigen, bei denen CD133 mittels Westernblot nachweisbar war. Da zudem in den immunzytochemischen Färbungen der Kontrollen in der Mehrzahl Zellen mit schwachen Sox-2-Signalen detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass in allen T1522 Klonkulturen die Typ I-Zellen unterrepräsentiert sind oder nahezu fehlen. Insgesamt zeigten sich nach den Behandlungen in der Durchflusszytometrie geringe Veränderungen des Anteils an CD133-positiven Zellen, die maximal 10 % über oder unter dem Wert der Kontrolle lagen. Dazu passt, dass auch die Signale im Westernblot relativ zur Kontrolle nur geringe Veränderungen aufwiesen. Eine Ausnahme davon stellt der Klon T1522 cl 1 dar, der nach den Behandlungen eine messbare Verringerung des CD133-Signals im Westernblot zeigte. Auch die immunzytochemischen Analysen legen die Vermutung nahe, dass es im Fall des Klone T1522 cl 1 zu einer Anreicherung von Typ I-Zellen kommt, die hier durch 50 μ M TMZ und 5 μ M Imatinib ausgelöst werden kann. Dabei ist nicht von synergistischen, sondern eher von zwei unabhängigen Effekten auszugehen.

Nach den Behandlungen variierte das Sox-2-Level für die T1586-Kulturen nur sehr geringfügig und der Anteil an CD133-positiven Zellen war insgesamt niedrig. Bis auf bei der Mutterkultur kam es bei allen Klonen zu einem Anstieg unter der Behandlung mit Imatinib, am deutlichsten bei T1586 cl 6. Hier erreichte der Anteil CD133-positiven-Zellen in den Imatinib behandelten Kulturen 25 % (DMSO-Kontrolle 11,5 %). Ob dies eine Zunahme an Typ II-Zellen in den T1586 cl 6 Kulturen bedeutet, konnte durch die immunzytochemischen Färbungen nicht belegt werden. Wie auch in den anderen T1586-Kulturen (Mutterkultur und Klone) wurden große Sphäroide und eine geringe Adhärenz beobachtet. Insgesamt kann lediglich geschlussfolgert werden, dass die T1586 Mutterkultur und Klone hohe Level an Sox-2 in der Mehrheit der Zellen exprimierten und schwache CD133-Signale nur in einigen Bereichen der Sphäroide, primär in deren Zentrum, zu beobachten waren. Somit ist denkbar, dass der Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen im Zentrum der Sphäroide eine Weiterdifferenzierung bedingt. Damit wäre dieses Verhalten demjenigen in der Gliom-Stammzellennische entgegengesetzt, in der die Zellen mit dem höchsten Stammzellcharakter eher im Zentrum beobachtet werden (Persano et al., 2011). Persano und Kollegen postulierten zudem, dass die Zelle mit dem höchsten Stammzellcharakter deutlich erhöhte Level an MGMT exprimiert (Persano et al., 2011).

In Hinblick auf die Untersuchung der Sox-2-Expression mittels Westernblot soll hier auf einen weiteren interessanten Aspekt eingegangen werden. So wurde stets eine Doppelbande bei ca. 38 kDa detektiert. Sowohl für die T1586 Mutterkultur als auch alle untersuchten T1586 Klone wurde im Westernblot und der immunzytochemischen Färbung ein hohes Sox-2 Level festgestellt. Dabei dominierte im Westernblot die Bande mit der geringeren Molekülgröße deutlich. Ob es sich bei der Sox-2-Bande höheren Molekulargewichts um ein posttranslational modifiziertes Sox-2-Protein handelt, wurde nicht geprüft. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Phosphorylierung, Acetylierung, SUMOylierung und Ubiquitinierung sowie O-Glykosylierung dieses Transkriptionsfaktors vorkommen und diese Modifizierungen einen Einfluss auf die Funktion von Sox-2 haben (Schaefer und Lengerke, 2020). In der Tat wurde die Sox-2 Doppelbande ebenso bei der T1371 und T1442 Mutterkultur wie auch in den Westernblots der T1371 und T1522 Klone beobachtet.

4.4 Möglichkeit der autokrinen Stimulation von PDGFR- α und PDGFR- β

In dieser Arbeit wurden in allen SLGC-Mutterkulturen und abgeleiteten Klonen mittels Westernblot die Expression von PDGFR- α und PDGFR- β ermittelt. Wie bereits in der Einleitung erläutert, können sich Glioblastomzellen über PDGF selbst, d.h. autokrin, stimulieren (Kilic et al., 2000). Da in der Literatur beschrieben wurde (Karcher et al., 2006), dass Primärkulturen aus Glioblastomen PDGF-AB produzieren, wurde auch in dieser Arbeit abschließend überprüft, ob es zur Sekretion von PDGF-AB in unbehandelten und behandelten Kulturen kommt. Bei Karcher und Kollegen (2006) lagen die PDGF-AB-Konzentrationen nach 48 h Inkubationszeit im Mittel bei 0,741 ng/ml/10⁶ Zellen, wobei bei einigen Primärkulturen keine PDGF-AB Produktion nachweisbar war. Jedoch verwendeten Karcher und Kollegen (2006) keine SLGCs und kultivierten die Zellen zudem in serumhaltigem Medium. In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an PDGF-AB im Medium nach 5 Tagen gemessen, wobei alle Kulturen in serum-freiem Medium inkubiert wurden. In allen Kontrollproben war PDGF-AB im pg-Bereich nachweisbar. Die Menge an PDGF-AB war bei den verschiedenen Zelllinien und Klonen unterschiedlich, lag jedoch im Bereich von 10,8 pg/ml bis 43,3 pg/ml. Eine autokrine Stimulation scheint damit im Prinzip in allen untersuchten Mutterkulturen und Klonen möglich. Andererseits könnte die Sekretion von PDGF-AB im Tumormikroumfeld auch auf die Nicht-Tumorzellen, wie z.B. die Perizyten oder Endothelzellen wirken und damit die Tumorprogression fördern. Liu und Kollegen beobachteten, dass die durch PDGF vermittelte mesenchymale Transformation zu einer Resistenz des Endothels gegenüber anti-VEGF-Behandlung bei GBM-Tumorzellen führt und die Unterdrückung der PDGF-Signalgebung GBM sensibler gegenüber der anti-VEGF-Behandlung macht (Lui et al., 2018).

Nach Behandlung mit Imatinib zeigten die Klone T1371 cl 2, cl 3, cl 15 sowie alle untersuchten Klone der T1522 Zelllinie und die Klone T1586 cl 4, cl 7 einen niedrigeren PDGF-AB Gehalt. Bei T1371 cl 16,

der T1586 Mutterkultur und T1586 cl 5 kam es nur zu sehr geringen Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei T1586 cl 2 und cl 6 war der PDGF-AB Gehalt nach der Imatinib-Behandlung höher. Die niedrigere PDGF-AB Konzentration nach Behandlung mit Imatinib bei den Klonen T1371 cl 2, cl 3 und cl 15 sowie bei der T1522 Zelllinie könnte man als eine Schwächung des autokrinen Loops werten. Bei den Klonen T1586 cl 2 und cl 6 wurde die PDGF-AB-Sekretion dagegen gesteigert. Dies könnte als Stärkung der autokrinen Stimulation dieser Zellen zu werten sein. Die Bindung von Imatinib kompetiert mit der von ATP an die geteilte Kinasedomäne von PDGF-Rezeptoren. Experimente zur möglichen Hemmung des PDGF-BB-Signals durch Imatinib wurden von Malavaki und Kollegen mit Zellen aus humanen Mammakarzinomen durchgeführt. Dabei kam es zu einer deutlichen, von der Imatinib-Dosis abhängigen Reduktion der durch PDGF-BB stimulierten Proliferation, wobei bereits mit 3 μ M Imatinib signifikante Effekte beobachtet wurden (Malavaki et al., 2013).

Insgesamt zeigten sich auch in der Analyse der PDGF-AB-Sekretion (und dem Einfluss von Imatinib auf diese) Unterschiede, die als eine inter- und intratumorale Heterogenität interpretiert werden können.

4.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Imatinib einen Einfluss auf die untersuchten SLGC-Linien und die davon abgeleiteten Klone hat. Jedoch ist die Wirkung auf die SLGC-Linien und die Klone derselben SLGC-Linie unterschiedlich. Damit belegen die Daten eine inter- und intratumorale Heterogenität. Diese erstreckt sich auch auf die Expression der PDGF-Rezeptoren und die Sekretion des Wachstumsfaktors PDGF-AB. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit Imatinib und TMZ die TMZ-Wirksamkeit bei einigen, nicht aber bei allen Klonen verbessern kann. Die Behandlungen mit Imatinib und/oder TMZ hatten auch einen Einfluss auf die relativen Anteile an Typ I- (Gliomstammzellen) und Typ II-/III-Zellen (Progenitoren) in den Kulturen, wobei mit demselben Chemotherapeutikum in einigen Klonkulturen eine positive Selektion auf Typ I-Zellen, in anderen dagegen eine Selektion auf die Progenitoren stattfand.

Warum keine einheitlichen Effekte bei den Klonen nachweisbar waren, muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden. In jedem Fall ist die unterschiedliche Sensitivität gegenüber TMZ und/oder Imatinib nicht generell auf Unterschiede in der MGMT- und/oder PDGFR-Expression zurückzuführen. So könnten außer dem MGMT-Protein auch andere Reparatursysteme oder Transporter einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen haben. Hinsichtlich der PDGF-Rezeptoren ist denkbar, dass Mutationen in PDGFR- α und - β oder den Proteinen der nachgeschalteten Signalkaskaden vorliegen. Da Imatinib auch andere Tyrosinkinasen inhibieren kann, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Kinasen die Effekte von Imatinib in den untersuchten Kulturen vermittelten oder die Effekte modulierten. Um die Beteiligung von PDGF-Rezeptoren zu belegen, könnten Inhibitoren eingesetzt

werden, die nur auf die PDGF-Rezeptoren wirken. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit CP-673451 (Tab. 4), einem selektiven PDGFR- α /- β -Inhibitor, durchgeführt, leider waren diese Versuche aufgrund der mangelnden Adhärenz der Zellen nicht auswertbar.

Hinsichtlich der Imatinib-Wirkung wurde das Hauptaugenmerk auf die Expression von PDGF-Rezeptoren gelegt, die von PDGF-Rezeptoren gesteuerten Signalkaskaden jedoch nicht untersucht. In weiteren Experimenten sollte der Phosphorylierungsstatus von Proteinen in solchen Signalkaskaden überprüft werden, da die Literatur nahelegt, dass die Wirksamkeit von Imatinib bei niedrigen Aktivitätsleveln von PDGFR- β eingeschränkt ist (Dong et al., 2011). Im Unterschied zu dieser und weiteren Arbeiten mit Imatinib wurden in der vorliegenden Arbeit Kulturen mit stammzellähnlichen GBM-Zellen eingesetzt und keine heterogene Mischkultur, die primär weiter differenzierte GBM-Zellen enthielt. Kilic et al. (2000), Hägerstrand et al. (2006), Gross et al. (2006), Dong et al. (2011, 2012) und Ren et al. (2009) untersuchten GBM-Zellen in serumhaltigem Medium, wobei diese Untersuchungen primär das Verhalten von differenzierten GBM-Zellpopulationen gegenüber Imatinib reflektieren. Auch die Behandlungsdauer unterschied sich bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten. So verwendeten Dong und Kollegen eine durch Langzeitbehandlung mit Imatinib gewonnene imatinib-resistente GBM-Linie und verglichen diese mit der originalen Zelllinie (Dong et al., 2012). Die Daten von mehreren Arbeitsgruppen belegen, dass stammzellähnliche GBM-Zellen in vitro und in vivo eine höhere Resistenz gegenüber TMZ und Radiotherapie aufweisen als die weiter differenzierten GBM-Zellen (Bao et al., 2006; Chen et al., 2012 und Überblick in Beier et al., 2011 und Schonberg et al., 2014).

Damit der Stammzellcharakter der GBM-Zellen erhalten bleibt, ist es notwendig, die Zellen in serumfreiem Medium in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF zu kultivieren (Lee et al., 2006; Raju et al., 2015, Kim et al., 2012). Trotz der Kultivierung in serumfreiem Medium kann es bei der Expansion von SLGCs unter in vitro Bedingungen zu einer Anreicherung bestimmter Differenzierungsstadien von SLGCs kommen, was wiederum die Ergebnisse beeinflusst. Die Variabilität kann durch z.B. die Größe der Aggregate beeinflusst werden, in deren Zentrum die SLGCs aufgrund von Sauerstoff- und Nährstoffmangel in die Apoptose eintreten. So kann sich der relative Anteil an Typ I-, sowie Typ II- und III-Zellen in den Kulturen über mehrere Passagen deutlich verschieben (Diss. E. Hirseland, 2017) und damit die Sensitivität der Kulturen gegenüber den Behandlungen beeinflussen. Damit ist auch der Vergleich biologischer Replikate von SLGCs stets problematisch, da sich der relative Anteil an Typ I-, II- und III-Zellen selbst in serumfreien Kulturen deutlich verändern kann (Diss. E. Hirseland, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Analysen mit den diversen Klonen in annähernd gleichen Passagen durchgeführt und alle Daten einer experimentellen Serie

parallel mit demselben Zellpräparat erhoben. Damit ergaben sich Limits hinsichtlich der Durchführbarkeit und Probenanzahl. Andererseits kann davon ausgegangen werden, dass die erhobenen Daten die Sensitivität der SLGC-Linien und Klone gegenüber TMZ und Imatinib sehr gut anzeigen.

Die Frage, ob sich Imatinib als adjuvante Therapie für Glioblastompatienten eignet, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht klären. Wie oben beschrieben, wurde die Wirkung von TMZ nur bei einigen Klonen durch die Zugabe von Imatinib verstärkt. In weiteren Arbeiten sollten die genetischen und epigenetischen Unterschiede zwischen den Klonen untersucht werden. So sollten z.B. molekulare Marker identifiziert werden, die als Prädiktor für eine erfolgreiche adjuvante Therapie mit Imatinib gelten könnten. Nichtsdestotrotz wird jede adjuvante Therapie aufgrund der hohen inter- und intratumoralen Heterogenität nur für eine Subgruppe von GBM-Patienten adäquat sein.

5 Zusammenfassung

Gliome sind primäre intrakranielle Tumore; zu ihnen zählen das Glioblastoma multiforme und das Gliosarkom (Ostrom et al., 2014). Die Standardtherapie von malignen Gliomen umfasst die Resektion der Tumoren und die adjuvante Radio-/Chemotherapie, kann aber lediglich die Überlebenszeit um wenige Monate verlängern (van Meir et al., 2010, Norden und Wen, 2006). In neoplastisch transformierten Zellen kommen häufig fehlregulierte PDGF-Rezeptoren vor (Heldin und Lennartsson, 2013). Auch in Glioblastomen konnten in 13 % PDGFR- α Amplifikationen nachgewiesen werden (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Die Kinasedomänen der PDGFR- α und - β werden durch Imatinib (Glivec®) inhibiert, eine Substanz, die bereits für die Therapie bestimmter Leukämien erfolgreich eingesetzt wird (Buchdunger et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich SLGCs mit verschiedener PDGFR- α und - β -Expression unter der Behandlung mit Imatinib allein oder nach Kombinationsbehandlung von Imatinib und TMZ verhalten. Dazu wurden drei SLGC-Linien aus Glioblastomen und eine SLGC-Linie aus einem Gliosarkom untersucht. Dabei wurden die SLGC-Linien und davon abgeleitete Subklone verglichen, die mittels *limited dilution assay* aus den Primärkulturen gewonnen wurden. Die Veränderungen des Stammzellstatus sowie die Proliferation der Zellen unter den verschiedenen Behandlungen wurden untersucht. Ein besonderer Fokus der Arbeit lag auf der Phänotypisierung der untersuchten Klone. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie, Westernblot-Analysen und immunzytochemischen Färbungen. Weiterhin wurden Änderungen der Expression von PDGFR- α und - β und die Sekretion von PDGF-AB nach Behandlung mit Imatinib überprüft.

Die Versuche zeigten, dass die untersuchten Zellen deutliche Unterschiede aufwiesen. Zum einen unterschieden sich die untersuchten SLGC-Zelllinien voneinander. Aber auch die von einer Zelllinie abgeleiteten Klone wiesen Unterschiede auf. Insbesondere hinsichtlich der durch die Behandlungen induzierten Senkung der Proliferation zeigten die Klone kein einheitliches Verhalten. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass 5 μ M Imatinib einen Einfluss auf die untersuchten Zelllinien und Klone hat. So kam es zu Veränderungen der PDGFR- α Proteinexpression auf der Zelloberfläche und der Proteinmenge von PDGFR- α und PDGFR- β . Die Tatsache, dass die Klone unterschiedlich reagierten, belegt eine hohe intratumorale Heterogenität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung von Imatinib und TMZ die TMZ-Wirksamkeit bei einigen Klonen verbessern konnte. Bei anderen zeigte sich jedoch kein Effekt oder sogar ein gegenteiliger Effekt, was ebenfalls die Schlussfolgerung auf eine hohe intratumorale Heterogenität stützt. Die Behandlungen mit Imatinib und TMZ resultierten je nach Subklon in der Selektion oder Eliminierung von Sox-2-positiven/CD133-negativen bzw Sox-2-positiven/CD133-positiven Zellen und belegen damit ebenfalls die intratumorale Heterogenität.

6 Literaturverzeichnis

- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and Development* 22, 1276-1312
- Azzarelli R, Simons BD, Philpott A (2018) The developmental origin of brain tumors: a cellular and molecular framework. *Development* 145: dev162693
- Bähr L, Stammzellähnliche Tumorzellen aus malignen Gliomen: phänotypische Unterschiede und Sensitivität gegenüber Temozolomid (TMZ). Medizinische Dissertation Lübeck, 2018
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* 444, 756-760
- Beier D, Röhl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP (2008) Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Research* 68, 5706-5715
- Beier D, Schulz JB, Beier CP (2011) Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells-much more complex than expected. *Molecular Cancer* 10:128
- Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U (2001) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nature Cell Biology* 3, 512- 516
- Brada M, Judson I, Beale P, Moore S, Reidenberg P, Statkevich P, Dugan M, Batra V, Cutler D (1999) Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British Journal of Cancer* 81,1022-1030
- Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J (2002) Pharmacology of imatinib (STI571). *European Journal of Cancer* 38, 28-36
- Burman P, Lamb L, McCormack A (2020) Temozolomide therapy for aggressive pituitary tumours-current understanding and future perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 21, 263-276
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ (2007) A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11, 69-82
- Campbell LL, Polyak K (2007) Breast Tumor Heterogeneity: Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle* 6, 2332-2338
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068
- Casorelli I, Bossa C, Bignami M (2012) DNA Damage and Repair in Human Cancer: Molecular Mechanisms and Contribution to Therapy-Related Leukemias. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 9, 2636-2657

- Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS (2002) The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Research* 62, 4307–4315
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF (2012) A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. *Nature* 488, 522-526
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, Van den Berg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362-375.
- Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H (2017) Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics* 14, 284-297
- Choschzick I, Hirseland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, 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 ID, Dirks PB (2003) A human brain tumor-derived PDGFR- α deletion mutant is transforming. *Oncogene* 22, 722–733
- De Witt Hamer PC (2010) Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro Oncology* 12, 304-316
- Dong Y, Han Q, Zou Y, Deng Z, Lu X, Wang X, Zhang W, Jin H, Su J, Jiang T, Ren H (2012) Long-term exposure to imatinib reduced cancer stem cell ability through induction of cell differentiation via activation of MAPK signaling in glioblastoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 370, 89-102
- Dong Y, Jia L, Wang X, Tan X, Xu J, Deng Z, Jiang T, Rainov NG, Li B, Ren H (2011) Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *International Journal of Oncology* 38, 555-569
- Emery IF, Gopalan A, Wood S, Chow K, Battelli C, George J, Blaszyk H, Florman J, Yun K (2017) Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas. *Journal of Neuro-Oncology* 133, 47-57
- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ (2008) Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1931–1938
- Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF (2014) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal* 28, 1317-1330
- Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G (2009) SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27, 40-48
- Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4.Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

- Gross D, Bernhardt G, Buschauer A (2006) Platelet-derived growth factor receptor independent proliferation of human glioblastoma cells: selective tyrosine kinase inhibitors lack antiproliferative activity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132, 589-599
- Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling EA, Gao J, Hao A (2011) Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 59, 763–775
- Hägerstrand D, He X, Bradic Lindh M, Hoefs S, Hesselager G, Ostman A, Nistér M (2011) Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro Oncology* 13, 1178-1191
- Hägerstrand D, Hesselager G, Achterberg S, Wickenberg Bolin U, Kowanetz M, Kastemar M, Heldin CH, Isaksson A, Nistér M, Ostman A (2006) Characterization of an imatinib-sensitive subset of high-grade human glioma cultures. *Oncogene* 25, 4913-4922
- Han SJ, Yang I, Tihan T, Prados M D, Parsa AT (2010) Primary gliosarcoma: key clinical and pathologic distinctions from glioblastoma with implications as a unique oncologic entity. *Journal of Neurooncology* 96, 313-320
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674
- Heldin CH, Lennartsson J (2013) Structural and Functional Properties of Platelet-Derived Growth Factor and Stem Cell Factor Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a009100
- Heldin CH, Westermark AD (1999) Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* 79, 1283-1316
- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 96, 766-776
- Hirseland E, Zelluläre und molekulare Heterogenität stammzellähnlicher Gliomzellen und Bedeutung für die Therapiesensibilität, *Naturwissenschaftliche Dissertation Lübeck*, 2017
- Holdhoff M, Supko JG, Gallia GL, Hann CL, Bonekamp D, Ye X, Cao B, Olivi A, Grossman SA (2010) Intratumoral concentrations of imatinib after oral administration in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of Neurooncology* 97, 241-245
- Huse JT, Holland EC (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer* 10, 319-331
- Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M (2018) Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica* 58, 405-421
- Jones DL, Wagers AJ (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 11-21
- Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AHP, Verveer M, de Groot LR, Smith VD, Rangarajan S, Rodríguez JJ, Orre M, Hol ME (2012) GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astroglia in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLOS ONE* 7, e42823

- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation* 11, 448–457
- Karcher S, Steiner HH, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H, Unterberg A, Herold-Mende C (2006) Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *International Journal of Cancer* 118, 2182–2189
- Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black PM, Stiles CD (2000) Intracranial Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Glioblastoma Cell Growth by an Orally Active Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class. *Cancer Research* 60, 5143–5150
- Kim Y, Kim E, Wu Q, Guryanova O, Hitomi M, Lathia JD, Serwanski D, Sloan AE, Weil RJ, Lee J, Nishiyama A, Bao S, Hjelmeland AB, Rich J N (2012) Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. *Genes and Development* 26, 1247–1262
- Kozak KR, Mahadevan A, Moody JS (2009) Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro-Oncology* 11, 183–191
- Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim LL, Rich JN (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes and Development* 29, 1203–1217
- Lee EYHP, Muller WJ (2010) Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a0032
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA (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
- Lee SY (2016) Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes and Diseases* 3, 198–210
- Levental I, Levental KR, Heberle FA (2020) Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain. *Trends in Cell Biology* 30, 341–353
- Liu L, Gerson SL (2006) Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* 12, 328–331.
- Liu T, Ma W, Xu H, Huang M, Zhang D, He Z, Zhang L, Brem S, O'Rourke DM, Gong Y, Mou Y, Zhang Z, Fan Y (2018) PDGF-mediated mesenchymal transformation renders endothelial resistance to anti-VEGF treatment in glioblastoma. *Nature Communications* 9:3439
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131, 803–820
- Loy M, Charakterisierung stammzellähnlicher Zellen aus humanen malignen Gliomen. Medizinische Dissertation Lübeck, 2018
- Lutterbach J, Guttenberger R, Pagenstecher A (2001) Gliosarcoma: a clinical study. *Radiotherapy and Oncology* 61, 57–64

- Malavaki CJ, Roussidis AE, Gialeli C, Kletsas D, Tsegenidis T, Theocharis AD, Tzanakakis GN; Karanmanos NK (2013) Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells. *The Febs Journal* 280, 2477-2489
- Mei X, Chen YS, Chen FR, Xi SY, Chen ZP (2017) Glioblastoma stem cell differentiation into endothelial cells evidenced through live-cell imaging. *Neuro Oncology* 19, 1109-1118
- Michael JS, Lee BS, Zhang M, Yu JS (2018) Nanotechnology for treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Translational Internal Medicine* 6, 128-33
- Miller CR, Perry A (2007) Glioblastoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 131, 397-406
- Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada JI (2011) Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers* 3, 3242-3278
- Nardi V, Azam M, Daley GQ (2004) Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology* 11, 35-43
- Norden AD, Wen PY (2006) Glioma therapy in adults. *Neurologist* 12, 279-292
- Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 19, 764-772
- Ostman A, Heldin CH (2001) Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. *Advances in Cancer Research* 80, 1-38
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS (2014) The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncology* 16, 896-913
- Ozawa T, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, Charles N, Michor F, Holland EC (2014) Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell* 26, 288-300
- Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, González B, Melguizo C (2015) Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLOS ONE* 10, e0140131
- Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G (2011) The Three-Layer Concentric Model of Glioblastoma: Cancer Stem Cells, Microenvironmental Regulation, and Therapeutic Implications. *The Scientific World Journal* 11, 1829-1841
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest W F, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, 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
- Puputti M, Tynninen O, Sihto H, Blom T, Maenpää H, Isola J, Paetau A, Joensuu H, Nupponen NN (2006) Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Molecular Cancer Research* 4, 927-934

- Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK (2017) Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Annals of Oncology*, 28, 1448-1456
- Qualmann KJ, Tandon N, Kim DH, Shepard S R, Bhattacharjee M, Papasozomenos S, Blanco AI, Zhu JJ (2015) Characterization of primary gliomas in individuals with Li-Fraumeni syndrome: a case series. *Neuro Oncology* 17, 151-152
- Raju EN, Kuechler J, Behling S, Sridhar S, Hirsland E, Tronnier V, Zechel C (2015) Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model. *Neurosurgery* 77, 629-643
- Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Sathornsumetee S, Rich J N, Quinn JA, Lagattuta TF, Egorin MJ, Gururangan S, McLendon R, Herndon JE 2nd, Friedman AH, Salvado AJ, Friedman HS (2008) Safety and pharmacokinetics of dose-intensive imatinib mesylate plus temozolomide: phase 1 trial in adults with malignant glioma. *Neuro Oncology* 10, 330-340
- Ren H, Tan X, Dong Y, Giese A, Chou TC, Rainov N, Yang B (2009) Differential effect of imatinib and synergism of combination treatment with chemotherapeutic agents in malignant glioma cells. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 104, 241-52
- Rogers MA, Fantauzzo KA (2020) The emerging complexity of PDGFRs: activation, internalization and signal attenuation. *Biochemical Society Transactions* 48, 1167-1176
- Rosso L, Brock CS, Gallo JM, Saleem A, Price PM, Turkheimer FE, Aboagye EO (2009) A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Research* 69, 120-127
- Schaefer T, Lengerke C (2020) SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene* 39, 278-292
- Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN (2014) Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 39, 82-101
- Seymour T, Nowak A, Kakulas F (2015) Targeting aggressive cancer stem cells in glioblastoma. *Frontiers in Oncology* 5, 159
- Sherr CJ (2004) Principles of Tumor Suppression. *Cell* 116, 235–246
- Shingu T, Fujiwara K, Bogler O, Akiyama Y, Moritake K, Shinojima N, Tamada Y, Yokoyama T, Kondo S (2009) Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *International Journal of Cancer* 124, 1060–1071
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olsen JJ (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a cancer journal for clinicians* 60, 166-193
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L,

- Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds B A (2006) Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer* 6, 425–436
- Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK (2018) Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry* 51, 2647-2693
- Wee B, Pietras A, Ozawa T, Bazzoli E, Podlaha O, Antczak C, Westermarck B, Nelander S, Uhrbom L, Forsberg-Nilsson K, Djaballah H, Michor F, Holland EC (2016) ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells. *Scientific Reports* 6:25956
- Wick W, Bendszus M, Goldbrunner R, Grosu A, Hattingen E, Hau P, Herrlinger U, Kessler T, Platten M, Pukrop T, Reifenberger G, Sahm F, Schaaf S, Schlegel U, Steinbach J, Stockhammer G, Stummer W, Tabatabai G, Tonn JC, Weller M (2021) Gliome, S2k-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 14.12.2021)
- Wick W, Osswald M, Wick A, Winkler F (2018) Treatment of glioblastoma in adults; Therapeutic Advances in Neurological Disorders 11, 1-13
- Yang Z, Wang KK (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences* 38, 364-374
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA (2011) The role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications, *Molecular Cancer Therapeutics* 10,1533-1541
- Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A (2020) O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology* 9: 1547
- Zhang, M, Song, T, Yang, L, Chen, R, Wu, L, Yang, Z, Fang, J (2008) Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 27: 85

7 Anhang

Tab. 14: Expression von PDGFR- α und Anteile an CD133- und CD140a-positiven Zellen in den SGLC-Mutterkulturen und Klonen

Klone	PDGFR- α		CD133+ (%)	CD140a+ (%)
	ICC	WB	Durchflusszytometrie	Durchflusszytometrie
T1442 mc	/	+	16,5	20,0
T1371 mc	/	+	15,5	48,1
T1371 cl 2	/	+	30,9	22,8
T1371 cl 3	/	+	9,1	6,3
T1371 cl 15	/	+	18,7	39,0
T1371 cl 16	/	+	8,2	40,9
T1522 cl 1	+	+	62,3	30,3
T1522 cl 2	+	+	78,8	19,7
T1522 cl 3	+	+	62,2	18,1
T1522 cl 4	+	+	/	/
T1522 cl 7	+	+	42,0	10,5
T1522 cl 9	/	+	61,4	15,6
T1522 cl 10	+	+	62,3	19,7
T1586 mc	+	+	6,9	6,7
T1586 cl 2	/	+	4,9	2,8
T1586 cl 4	/	+	8,9	7,4
T1586 cl 5	/	+	1,1	2,6
T1586 cl 6	+	+	11,5	6,1
T1586 cl 7	+	+	4,8	2,2

CD140a/PDGFR- α , *platelet-derived growth factor receptor- α* ; CD133, Prominin-1; ICC, Immunzytochemie, WB, Westernblot; cl, Klon; mc, Mutterkultur; /, nicht untersucht; +, nachweisbar.

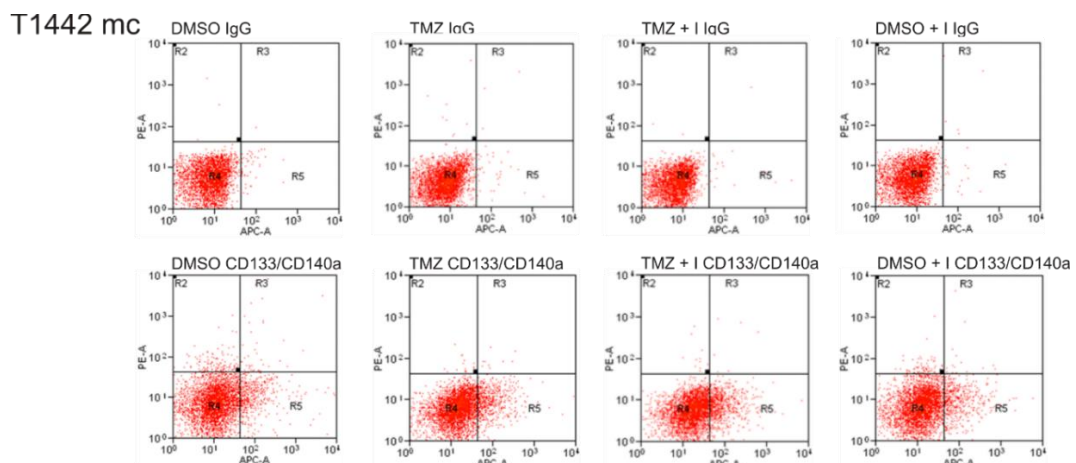
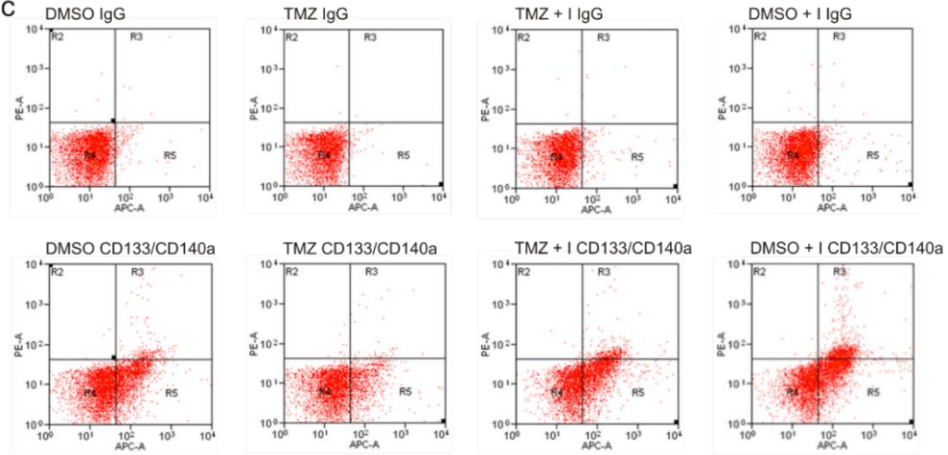
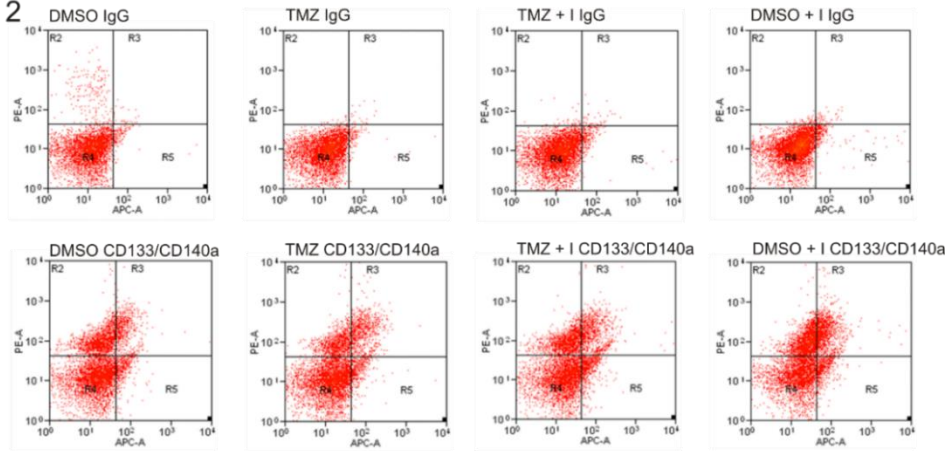


Abb. 33: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1442 Mutterkultur. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; mc, Mutterkultur.

T1371 mc



T1371 cl 2



T1371 cl 3

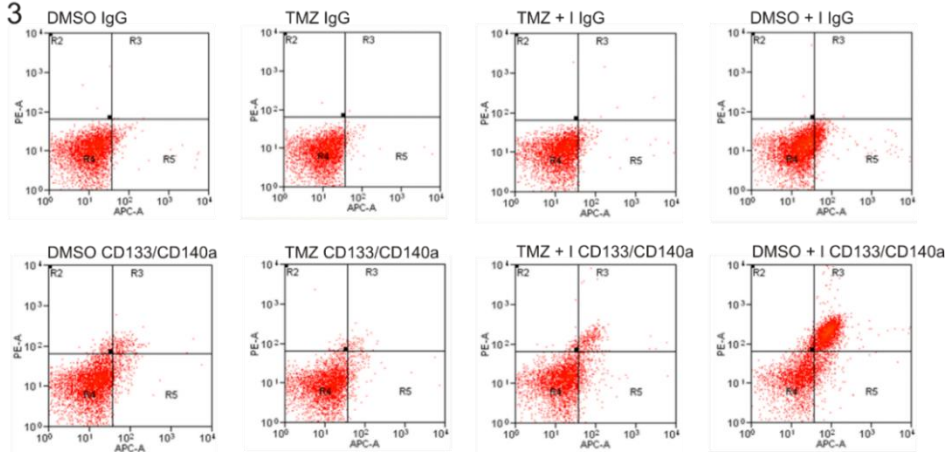


Abb. 34: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1371 Mutterkultur und Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Proliferin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

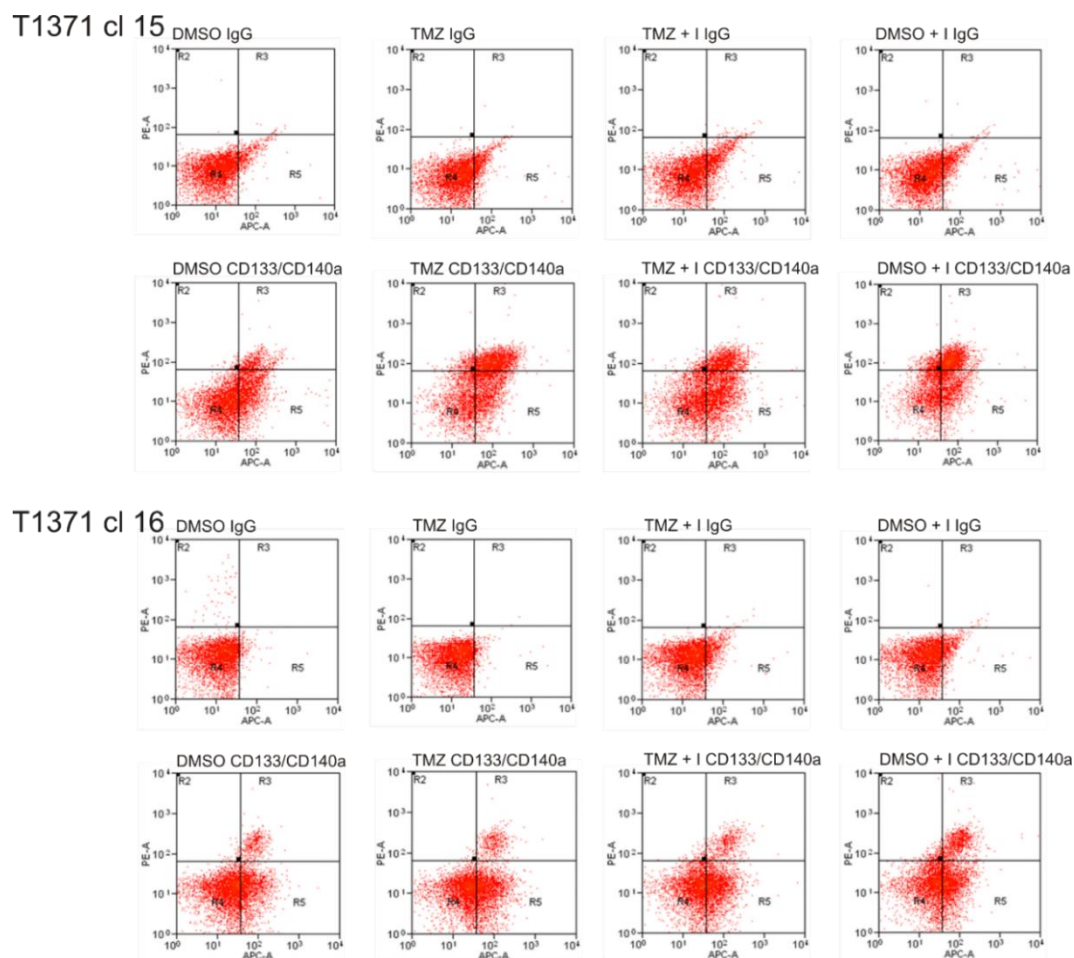
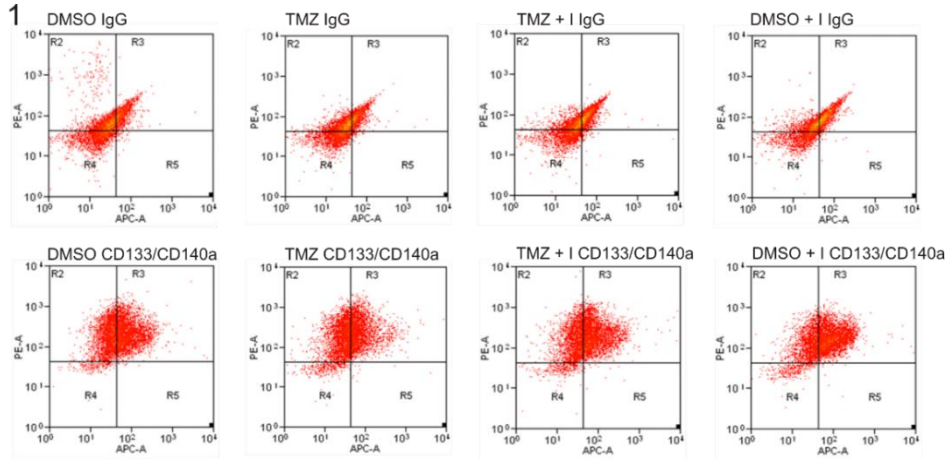
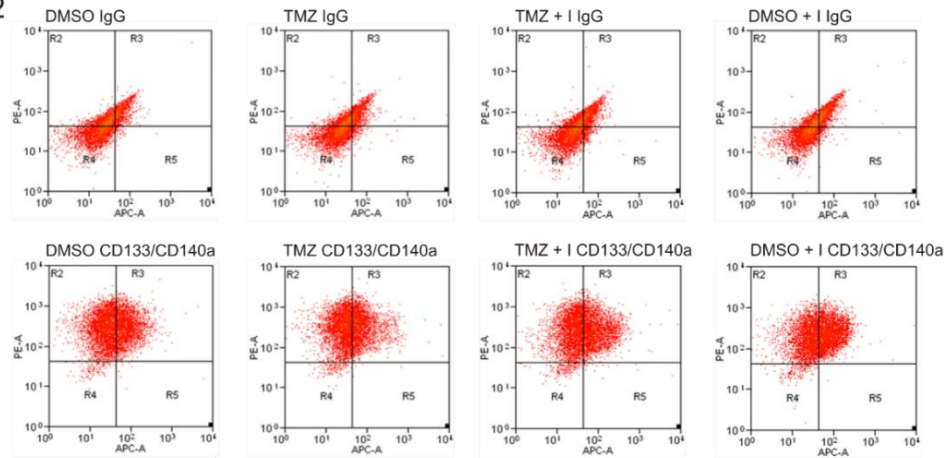


Abb. 35: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1371 Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon.

T1522 cl 1



T522 cl 2



T1522 cl 3

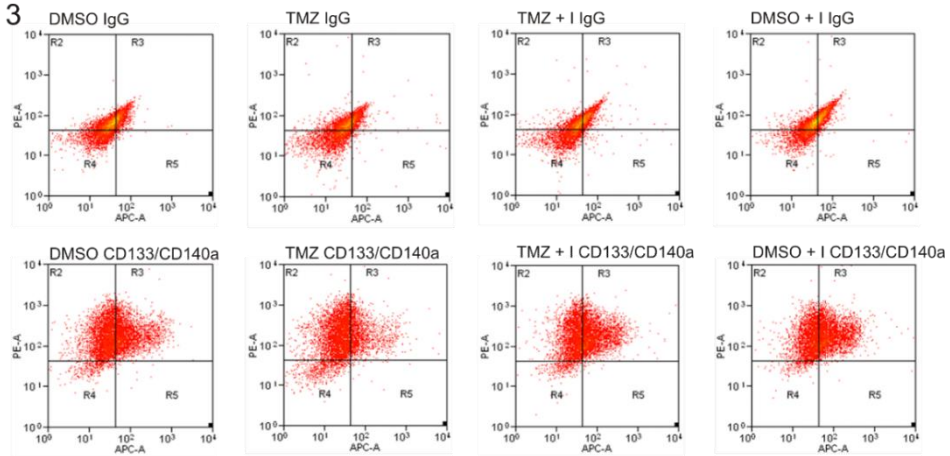
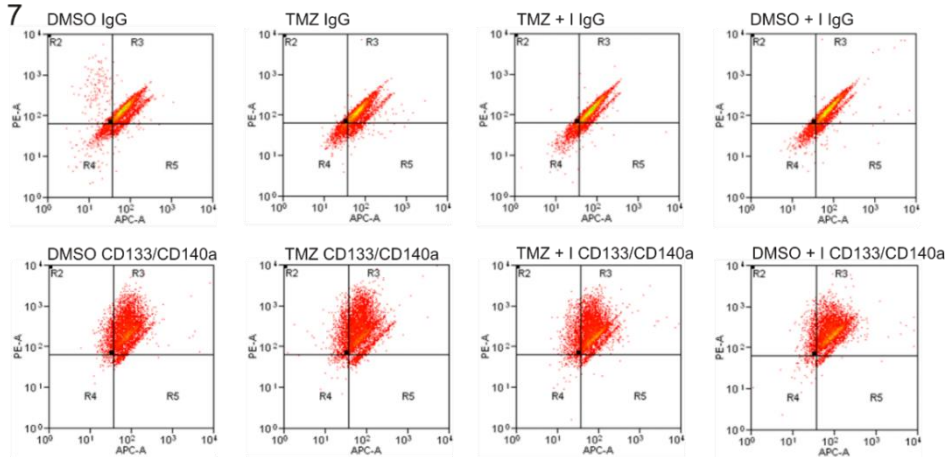
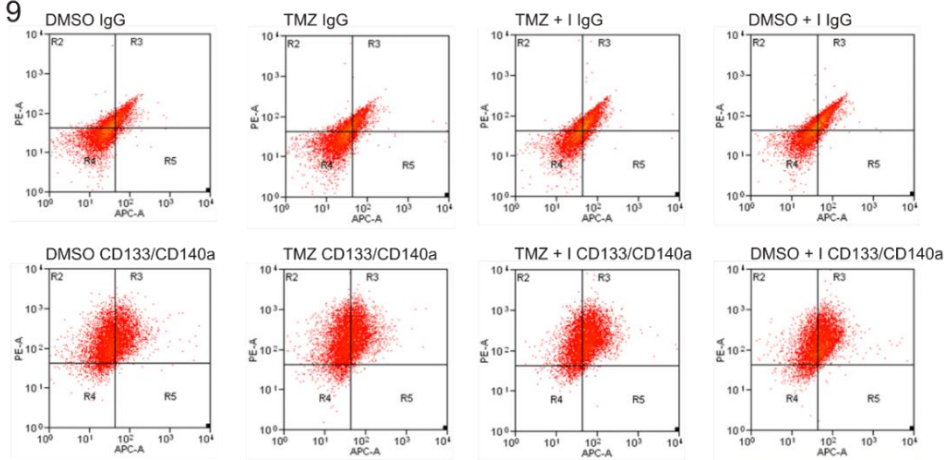


Abb. 36: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1522 Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Proliferin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon.

T1522 cl 7



T1522 cl 9



T1522 cl 10

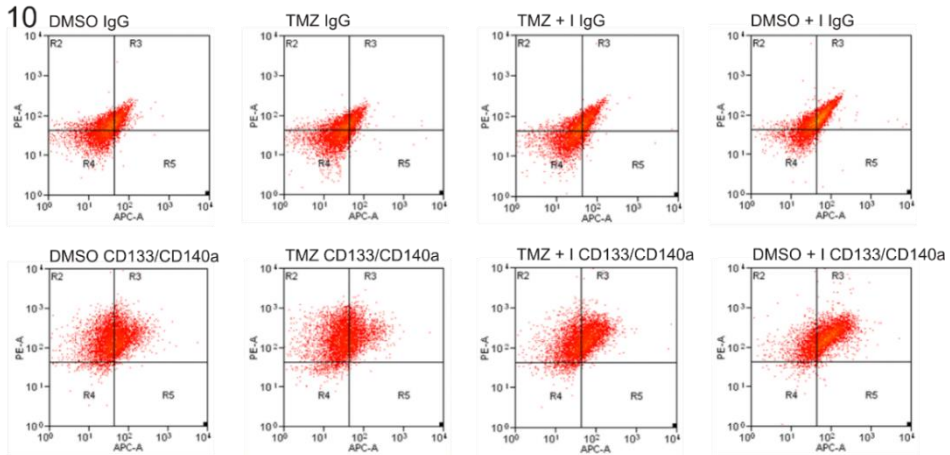


Abb. 37: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1522 Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon.

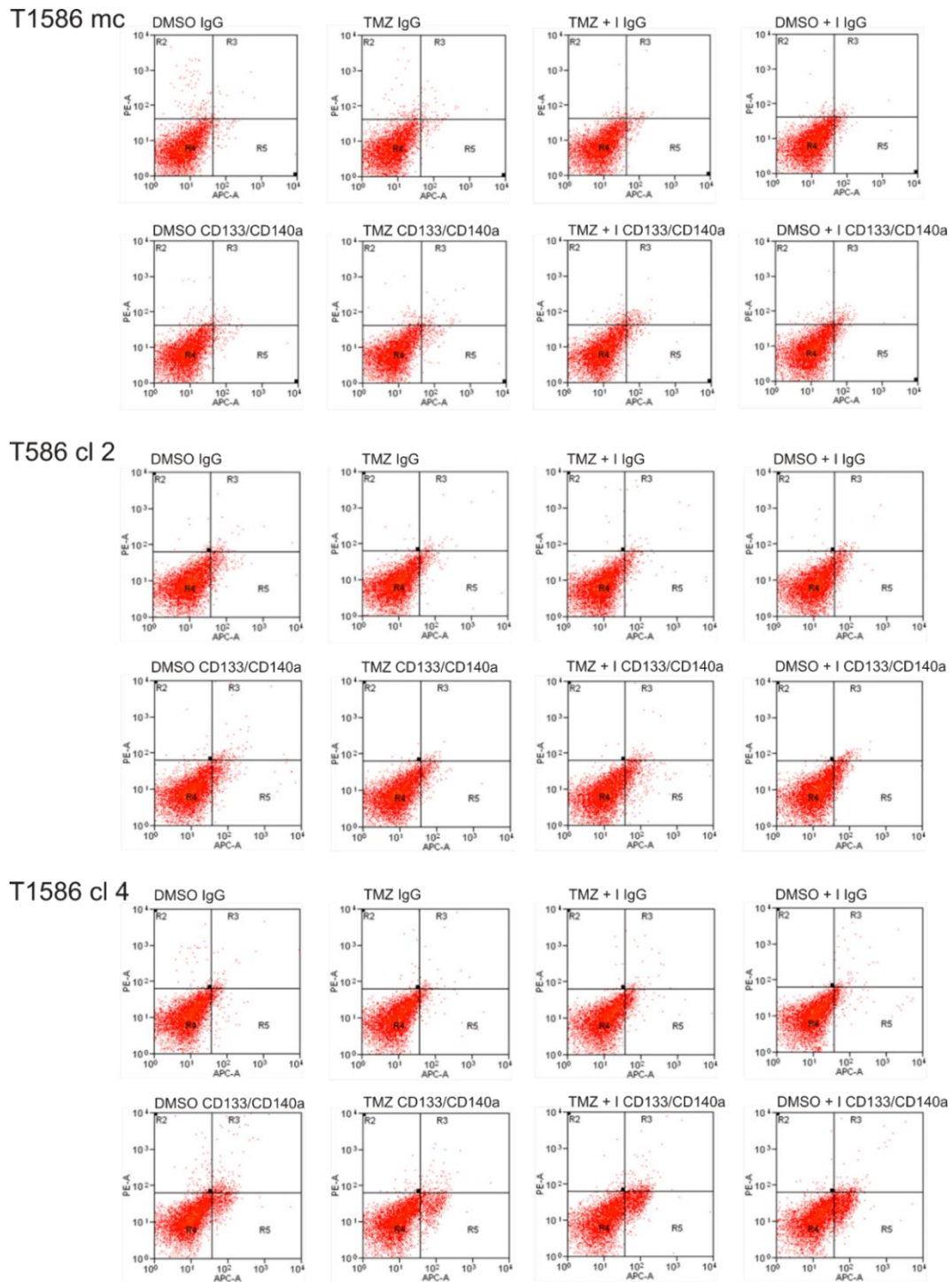
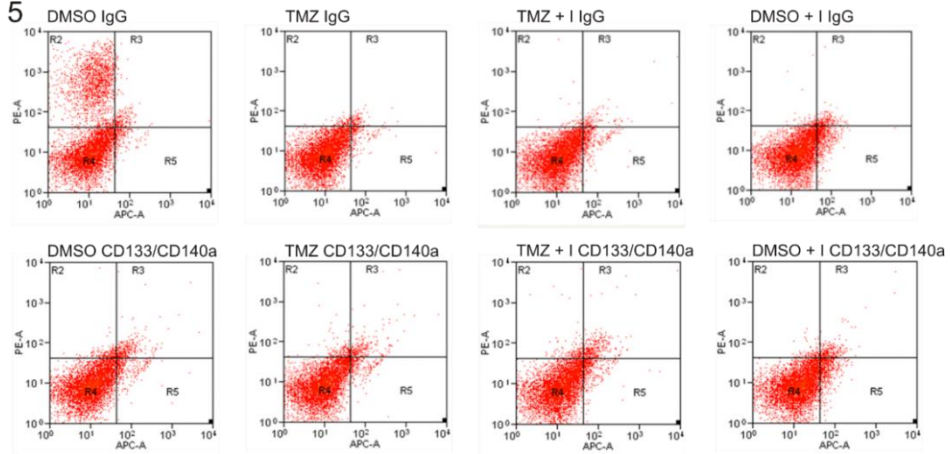
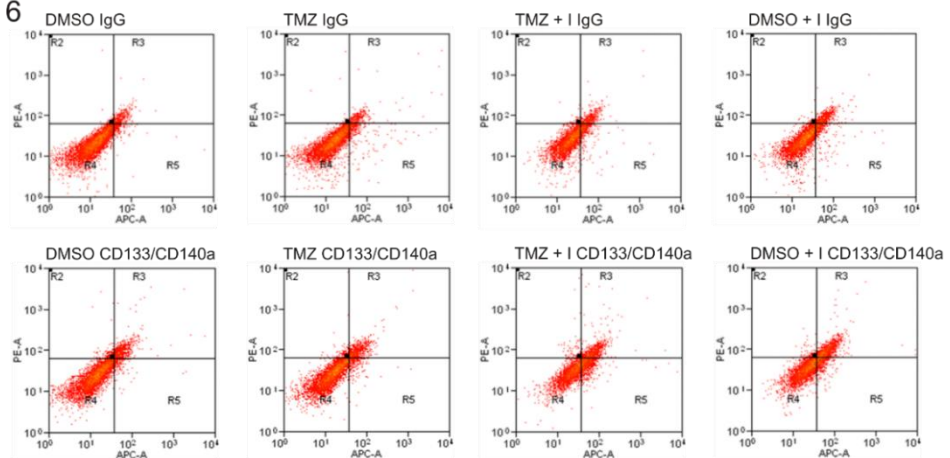


Abb. 38: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1586 Mutterkultur und Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Prominin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

T1586 cl 5



T1586 cl 6



T1586 cl 7

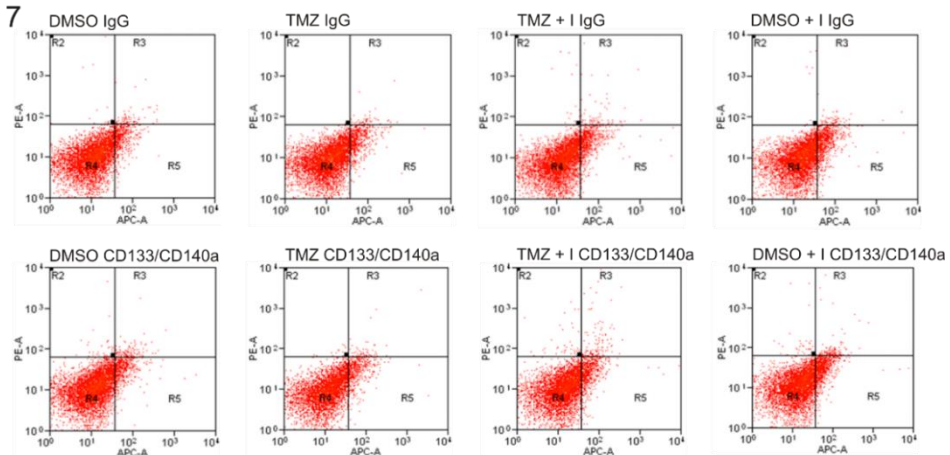


Abb. 39: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der T1586 Klone. CD133- und CD140a-positive Zellen sowie dazugehörige Isotypen-Kontrolle an Tag d4 nach der Behandlung. Die Behandlungen erfolgten mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). CD133 -Antikörper: Phycoerythrin (PE)-gekoppelt; CD140a-Antikörper: Allophycocyanin (APC)-gekoppelt; CD133, Proliferin-1; CD140a, *platelet-derived growth factor receptor- α* ; cl, Klon.

Tab. 15: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1371 cl 2: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 μ M Temozolomid; (T100), 100 μ M Temozolomid; (I5), 5 μ M Imatinib; (I10), 10 μ M Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1371 cl 2	DMSO	vs	T50	0,8729796	2,1482	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,8999947	1,0162	insignifikant
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	1,1802	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8921172	2,1024	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,7828751	2,3639	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,8999947	0,9961	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I5	0,4285748	3,203	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I10	0,0628439	4,5126	insignifikant
	DMSO	vs	I10	0,6687911	2,6371	insignifikant
	T50	vs	T100	0,8999947	1,132	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,3417793	3,3988	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,1145363	4,1663	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,0551928	4,5826	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,4232438	3,2148	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,0118067	5,3512	* $p < 0,05$
	T50	vs	T100+I10	0,0010053	6,7312	** $p < 0,01$
	T50	vs	I10	0,0327914	4,8558	* $p < 0,05$
	T100	vs	I5+DMSO	0,8389331	2,2297	insignifikant
	T100	vs	I10+DMSO	0,4839425	3,0787	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,3356219	3,4135	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,8999947	2,0457	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,1047161	4,2192	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,0074481	5,5621	** $p < 0,01$
	T100	vs	I10	0,2360133	3,6867	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,0348	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	1,2253	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,8999947	0,1905	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,8814685	2,1279	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,3210995	3,4493	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10	0,8999947	1,5081	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,0996	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,8999947	1,2112	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,8999947	0,975	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,86859	2,1587	insignifikant
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,3614	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,8999947	1,4158	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8999947	0,9441	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,8413081	2,224	insignifikant
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	0,2828	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,8046044	2,3119	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,2513441	3,6399	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,8999947	1,6986	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,2045	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,8999947	0,6709	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,8999947	1,9413	insignifikant

Tab. 16: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1371 cl 3: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 μ M Temozolomid; (T100), 100 μ M Temozolomid; (I5), 5 μ M Imatinib; (I10), 10 μ M Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1371 cl 3	DMSO	vs	T50	0,8999947	1,3607	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,6366896	2,7139	insignifikant
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,4435738	3,1694	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,5502487	2,9208	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,2639625	3,6026	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,0101691	5,416	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	T100+I5	0,4968684	3,0484	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I10	0,8999947	1,9253	insignifikant
	DMSO	vs	I10	0,6681857	2,6385	insignifikant
	T50	vs	T100	0,8999947	1,3102	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,8999947	1,7012	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,5105	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,8849805	2,1197	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,1667116	3,9265	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,8999947	1,5843	insignifikant
	T50	vs	T100+I10	0,8999947	0,5466	insignifikant
	T50	vs	I10	0,8999947	1,1883	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,8999947	0,348	insignifikant
	T100	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,2003	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,8999947	0,7666	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,6774966	2,6163	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,8999947	0,2311	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,8999947	0,7636	insignifikant
	T100	vs	I10	0,8999947	0,1648	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,1411	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,4333	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,7870578	2,3541	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,8999947	0,121	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,8999947	1,1366	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,5308	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,5597	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,7611909	2,416	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,8999947	0,0242	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,8999947	0,9639	insignifikant
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,3717	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,8999947	1,9355	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8999947	0,5543	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,5552	insignifikant
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	0,9641	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,7382134	2,471	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,3495699	3,3799	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,5727607	2,8669	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,0197	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,8999947	0,4098	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,8999947	0,6238	insignifikant

Tab. 17: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 1: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 μ M Temozolomid; (T100), 100 μ M Temozolomid; (I5), 5 μ M Imatinib; (I10), 10 μ M Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1522 cl 1	DMSO	vs	T50	0,0109624	5,3944	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	T100	0,0348871	4,8303	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	1,4355	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,647	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,0370788	4,7989	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	T50+I10	0,0378332	4,7884	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	7,4011	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	11,7344	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	I10	0,0010053	10,2298	** $p < 0,01$
	T50	vs	T100	0,8999947	0,5641	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,1595945	3,9589	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,0010053	7,0415	** $p < 0,01$
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	0,3839	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,8999947	0,7829	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,8999947	1,8298	insignifikant
	T50	vs	T100+I10	0,0019217	6,1631	** $p < 0,01$
	T50	vs	I10	0,0345477	4,8353	* $p < 0,05$
	T100	vs	I5+DMSO	0,3440194	3,3948	insignifikant
	T100	vs	I10+DMSO	0,0010053	6,4773	** $p < 0,01$
	T100	vs	T50+I5	0,8999947	0,1581	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,8999947	0,2003	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,7625263	2,4124	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,0010053	6,7457	** $p < 0,01$
	T100	vs	I10	0,0108449	5,3995	* $p < 0,05$
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,4825605	3,0825	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,3335981	3,4197	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,3826848	3,3059	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0034064	5,9186	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	10,2518	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	I10	0,0010053	8,7943	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,0011398	6,3813	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	6,4895	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	9,1022	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	13,4355	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	I10	0,0010053	11,8768	** $p < 0,01$
	T50+I5	vs	T50+I10	0,8999947	0,3548	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8723885	2,149	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,0013828	6,3016	** $p < 0,01$
	T50+I5	vs	I10	0,0234795	5,0296	* $p < 0,05$
	T50+I10	vs	T100+I5	0,6407498	2,7044	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,0010053	7,1898	** $p < 0,01$
	T50+I10	vs	I10	0,0047064	5,7768	** $p < 0,01$
	T100+I5	vs	T100+I10	0,0666139	4,4854	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,4464738	3,1641	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,8999947	1,1691	insignifikant

Tab. 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 3: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1522 cl 3	DMSO	vs	T50	0,0424726	4,7279	* p<0,05
	DMSO	vs	T100	0,0010053	8,2796	** p<0,01
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	0,6224	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,9482	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,3062591	3,4897	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	6,7802	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	10,0282	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	14,0268	** p<0,01
	DMSO	vs	I10	0,1563067	3,9723	insignifikant
	T50	vs	T100	0,2831842	3,5517	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,0178108	5,1648	* p<0,05
	T50	vs	I10+DMSO	0,0041614	5,8311	** p<0,01
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	1,3932	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,8999947	2,0524	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,0134034	5,3004	* p<0,05
	T50	vs	T100+I10	0,0010053	9,1439	** p<0,01
	T50	vs	I10	0,8999947	0,7555	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,0010053	8,5772	** p<0,01
	T100	vs	I10+DMSO	0,0010053	9,4994	** p<0,01
	T100	vs	T50+I5	0,0220155	5,0614	* p<0,05
	T100	vs	T50+I10	0,8999947	1,4994	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,8999947	1,7486	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,0091949	5,4757	** p<0,01
	T100	vs	I10	0,090529	4,3073	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,2676	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,1531514	3,9854	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	7,1366	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	10,2572	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	14,0833	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,0724239	4,4389	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,0545719	4,5937	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	7,9508	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	11,3053	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	15,5007	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	I10	0,0224929	5,0508	* p<0,05
	T50+I5	vs	T50+I10	0,2975635	3,5129	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,0010053	6,8674	** p<0,01
	T50+I5	vs	T100+I10	0,0010053	10,9069	** p<0,01
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	0,6129	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,4086467	3,248	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,0010053	7,0242	** p<0,01
	T50+I10	vs	I10	0,5975859	2,8079	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,2419515	3,6697	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,0024749	6,0559	** p<0,01
	T100+I10	vs	I10	0,0010053	9,9242	** p<0,01

Tab. 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 7: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1522 cl 7	DMSO	vs	T50	0,8999947	0,2501	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,8999947	0,8387	insignifikant
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,6199692	2,754	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,397	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	1,0773	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	6,54	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	8,0927	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	6,8862	** p<0,01
	DMSO	vs	I10	0,5789894	2,8522	insignifikant
	T50	vs	T100	0,8999947	0,5886	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,5232587	2,9856	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,6387	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	0,8356	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,0013438	6,2983	** p<0,01
	T50	vs	T100+I5	0,0010053	7,8426	** p<0,01
	T50	vs	T100+I10	0,0010053	6,636	** p<0,01
	T50	vs	I10	0,6799076	2,6105	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,2903914	3,5305	insignifikant
	T100	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,2073	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,8999947	0,267	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,0051127	5,7297	** p<0,01
	T100	vs	T100+I5	0,0010053	7,254	** p<0,01
	T100	vs	T100+I10	0,0024487	6,0475	** p<0,01
	T100	vs	I10	0,8999947	2,0419	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8078735	2,3041	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,2393584	3,6756	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	8,7573	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	10,2464	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	9,1294	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,0124468	5,3267	* p<0,05
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	1,4275	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	6,7167	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	8,2153	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	7,0497	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	I10	0,4542445	3,146	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,0134853	5,2892	* p<0,05
	T50+I5	vs	T100+I5	0,0010053	6,741	** p<0,01
	T50+I5	vs	T100+I10	0,007231	5,5754	** p<0,01
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	1,7185	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,8999947	1,2783	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,8999947	0,1127	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,2756689	3,5707	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,2066	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,0263129	4,9662	* p<0,05
	T100+I10	vs	I10	0,2009357	3,8005	insignifikant

Tab. 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1522 cl 9: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q static	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1522 cl 9	DMSO	vs	T50	0,8999947	1,3295	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,8999947	0,2063	insignifikant
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,0010053	10,7668	** p<0,01
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,8552	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,1139	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,6722024	2,629	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I5	0,8243052	2,2643	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I10	0,8999947	0,5893	insignifikant
	DMSO	vs	I10	0,8999947	1,0521	insignifikant
	T50	vs	T100	0,8999947	1,0875	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,0010053	9,1376	** p<0,01
	T50	vs	I10+DMSO	0,8864435	2,1153	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	1,177	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,1923565	3,8328	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,8999947	0,9051	insignifikant
	T50	vs	T100+I10	0,8999947	0,7602	insignifikant
	T50	vs	I10	0,8999947	0,2686	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,0010053	10,2251	** p<0,01
	T100	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,0278	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,8999947	0,0895	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,6237084	2,7453	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,8999947	1,9926	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,8999947	0,363	insignifikant
	T100	vs	I10	0,8999947	0,8189	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,0010053	11,2529	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	10,3146	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	12,9704	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	8,2325	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	10,1975	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,0010053	9,4062	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,9383	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,8999947	1,7175	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,508933	3,0205	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,8999947	1,4245	insignifikant
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	1,8468	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,6610433	2,6557	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8999947	2,0822	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,8999947	0,4554	insignifikant
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	0,9085	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,0416688	4,7379	* p<0,05
	T50+I10	vs	T100+I10	0,4310958	3,1983	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,2786448	3,5642	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,695	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,8999947	1,1737	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,8999947	0,4828	insignifikant

Tab. 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 2: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1586 cl 2	DMSO	vs	T50	0,0522934	4,6193	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,8999947	1,6139	insignifikant
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	0,5352	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,6989254	2,5649	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,0289493	4,9285	* p<0,05
	DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	8,0858	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I5	0,0025935	6,0421	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I10	0,0031662	5,9566	** p<0,01
	DMSO	vs	I10	0,0858938	4,3434	insignifikant
	T50	vs	T100	0,5153214	3,0054	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,0183422	5,1545	* p<0,05
	T50	vs	I10+DMSO	0,8999947	2,0544	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	0,4905	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,3153771	3,4665	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,8999947	1,2714	insignifikant
	T50	vs	T100+I10	0,8999947	1,1858	insignifikant
	T50	vs	I10	0,8999947	0,2758	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,8722279	2,1491	insignifikant
	T100	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,951	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,3514594	3,378	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,0010053	6,4719	** p<0,01
	T100	vs	T100+I5	0,0813141	4,3753	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,0936667	4,2898	insignifikant
	T100	vs	I10	0,6302879	2,7296	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,4750491	3,1001	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,0099778	5,4428	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	8,621	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	6,5949	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	6,5093	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,0319414	4,8787	* p<0,05
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,7408627	2,4643	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0084232	5,5209	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,345025	3,3931	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,382199	3,3075	insignifikant
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	1,7785	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,584246	2,84	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8999947	0,7131	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,8999947	0,6311	insignifikant
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	0,7555	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,8056373	2,3088	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,7699742	2,3944	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,2194646	3,7424	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	0,0886	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,8999947	1,5562	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,8999947	1,4707	insignifikant

Tab. 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 4: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 μ M Temozolomid; (T100), 100 μ M Temozolomid; (I5), 5 μ M Imatinib; (I10), 10 μ M Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1586 cl 4	DMSO	vs	T50	0,0712692	4,4552	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,0103196	5,437	* $p < 0,05$
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	0,4431	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,6517	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	8,4734	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	7,8023	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	10,1062	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	10,9954	** $p < 0,01$
	DMSO	vs	I10	0,0011457	6,4036	** $p < 0,01$
	T50	vs	T100	0,8999947	0,8357	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,1479601	4,0121	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,2568659	3,6287	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,1465427	4,0182	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,2951915	3,5218	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,0064817	5,651	** $p < 0,01$
	T50	vs	T100+I10	0,0010053	6,5402	** $p < 0,01$
	T50	vs	I10	0,8999947	1,9484	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,0265432	4,9794	* $p < 0,05$
	T100	vs	I10+DMSO	0,0612736	4,539	insignifikant
	T100	vs	T50+I5	0,3797685	3,3143	insignifikant
	T100	vs	T50+I10	0,5897432	2,8272	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,0254501	5,0006	* $p < 0,05$
	T100	vs	T100+I10	0,003553	5,9189	** $p < 0,01$
	T100	vs	I10	0,8999947	1,1766	insignifikant
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,226	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	8,0303	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	7,3765	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	9,6631	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	10,5523	** $p < 0,01$
	I5+DMSO	vs	I10	0,0032305	5,9605	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	7,4893	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	6,8905	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	9,058	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	9,9123	** $p < 0,01$
	I10+DMSO	vs	I10	0,008998	5,5007	** $p < 0,01$
	T50+I5	vs	T50+I10	0,8999947	0,3387	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,8999947	1,6328	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I10	0,7167299	2,522	insignifikant
	T50+I5	vs	I10	0,8999947	2,0698	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,8999947	1,9074	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,6169557	2,7618	insignifikant
	T50+I10	vs	I10	0,8999947	1,6499	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	0,8892	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,2326592	3,7026	insignifikant
	T100+I10	vs	I10	0,0556179	4,5918	insignifikant

Tab. 23: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 6: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q static	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1586 cl 6	DMSO	vs	T50	0,8999947	1,9571	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,0010053	6,6996	** p<0,01
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	1,1363	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,5903	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	0,9786	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I10	0,8999947	1,899	insignifikant
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	8,3061	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	7,0949	** p<0,01
	DMSO	vs	I10	0,8999947	1,0897	insignifikant
	T50	vs	T100	0,0783245	4,4041	insignifikant
	T50	vs	I5+DMSO	0,4975993	3,0489	insignifikant
	T50	vs	I10+DMSO	0,7157413	2,5242	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,8999947	1,0169	insignifikant
	T50	vs	T50+I10	0,8999947	0,0561	insignifikant
	T50	vs	T100+I5	0,0022859	6,118	** p<0,01
	T50	vs	T100+I10	0,0283073	4,9509	* p<0,05
	T50	vs	I10	0,4926893	3,0604	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,0010053	7,8731	** p<0,01
	T100	vs	I10+DMSO	0,0010053	7,3092	** p<0,01
	T100	vs	T50+I5	0,0060398	5,6888	** p<0,01
	T100	vs	T50+I10	0,0704865	4,4641	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,8770304	2,1363	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,8999947	0,8886	insignifikant
	T100	vs	I10	0,0010053	8,0626	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,8999947	0,546	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,8859107	2,1149	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,5218292	2,9907	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	9,3978	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	8,1866	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,0839	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,8999947	1,5689	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,7399329	2,4661	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	8,8732	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	7,662	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,48	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,8999947	0,9587	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,0010053	7,3658	** p<0,01
	T50+I5	vs	T100+I10	0,0020994	6,1547	** p<0,01
	T50+I5	vs	I10	0,8919574	2,1004	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I5	0,0020065	6,1741	** p<0,01
	T50+I10	vs	T100+I10	0,025327	5,007	* p<0,05
	T50+I10	vs	I10	0,5177588	3,0005	insignifikant
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	1,1671	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,0010053	9,6008	** p<0,01
	T100+I10	vs	I10	0,0010053	8,3531	** p<0,01

Tab. 24: Ergebnisse der statistischen Analyse der BrdU-ELISA von T1586 cl 7: Fixierung an Tag d 5 nach der Behandlung. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO/D) als Lösungsmittelkontrolle; (T50), 50 µM Temozolomid; (T100), 100 µM Temozolomid; (I5), 5 µM Imatinib; (I10), 10 µM Imatinib; Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Anova mit post-hoc Tukey HSD) wurden folgendermaßen markiert: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs, versus; cl, Klon.

	Behandlungspaare			Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-Wert	Tukey HSD inference
T1586 cl 7	DMSO	vs	T50	0,0721954	4,4362	insignifikant
	DMSO	vs	T100	0,0010053	16,6969	** p<0,01
	DMSO	vs	I5+DMSO	0,8999947	0,9386	insignifikant
	DMSO	vs	I10+DMSO	0,5242885	2,9831	insignifikant
	DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	10,9917	** p<0,01
	DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	13,0536	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	16,9938	** p<0,01
	DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	18,4431	** p<0,01
	DMSO	vs	I10	0,524513	2,9826	insignifikant
	T50	vs	T100	0,0010053	12,1153	** p<0,01
	T50	vs	I5+DMSO	0,00817	5,5203	** p<0,01
	T50	vs	I10+DMSO	0,8999947	1,5985	insignifikant
	T50	vs	T50+I5	0,0010227	6,41	** p<0,01
	T50	vs	T50+I10	0,0010053	8,6174	** p<0,01
	T50	vs	T100+I5	0,0010053	12,5576	** p<0,01
	T50	vs	T100+I10	0,0010053	13,8614	** p<0,01
	T50	vs	I10	0,8999947	1,2795	insignifikant
	T100	vs	I5+DMSO	0,0010053	18,2546	** p<0,01
	T100	vs	I10+DMSO	0,0010053	14,1951	** p<0,01
	T100	vs	T50+I5	0,0034123	5,9055	** p<0,01
	T100	vs	T50+I10	0,4230241	3,2152	insignifikant
	T100	vs	T100+I5	0,8999947	0,8542	insignifikant
	T100	vs	T100+I10	0,8999947	1,8074	insignifikant
	T100	vs	I10	0,0010053	12,9284	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10+DMSO	0,1353924	4,0594	insignifikant
	I5+DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	12,3491	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	14,4203	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	18,4898	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	20,062	** p<0,01
	I5+DMSO	vs	I10	0,1556728	3,9721	insignifikant
	I10+DMSO	vs	T50+I5	0,0010053	8,2896	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T50+I10	0,0010053	10,4986	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I5	0,0010053	14,568	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	T100+I10	0,0010053	16,0026	** p<0,01
	I10+DMSO	vs	I10	0,8999947	0,2138	insignifikant
	T50+I5	vs	T50+I10	0,7302213	2,49	insignifikant
	T50+I5	vs	T100+I5	0,0010053	6,5594	** p<0,01
	T50+I5	vs	T100+I10	0,0010053	7,7129	** p<0,01
	T50+I5	vs	I10	0,0010053	7,4609	** p<0,01
	T50+I10	vs	T100+I5	0,1635716	3,9402	insignifikant
	T50+I10	vs	T100+I10	0,02657	4,9614	* p<0,05
	T50+I10	vs	I10	0,0010053	9,5589	** p<0,01
	T100+I5	vs	T100+I10	0,8999947	0,892	insignifikant
	T100+I5	vs	I10	0,0010053	13,3445	** p<0,01
	T100+I10	vs	I10	0,0010053	14,6017	** p<0,01

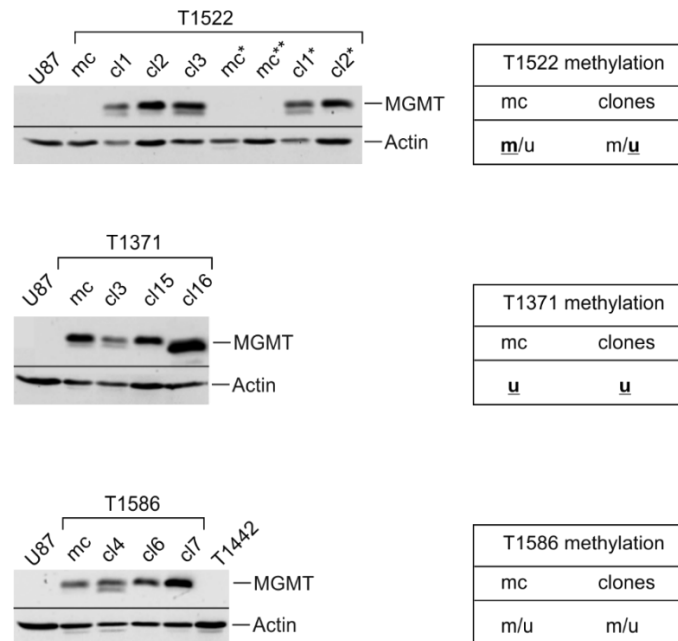


Abb. 40: links: Westernblot Analyse der MGMT-Expression in Mutterkulturen und Klonen. Es wurden 20 µg Gesamtzellprotein-Extrakt pro Spur eingesetzt. Aktin diente als Ladekontrolle. Bei der Interpretation der Blots ist zu beachten, dass der MGMT-Antikörper geringe Mengen an MGMT Protein (z.B. in der T1522 mc mit dem Methylierungsstatus m/u) nicht erkennt. U87, MGMT-defiziente, etablierte GBM-Linie. - mc, Mutterkultur; cl, Klon; * und ** symbolisieren biologische Replikate. – rechts: Methylierungsstatus des MGMT-Promotors (MSP; Methylierungsspezifische PCR. (die MSP-Daten wurden von PD. Dr. C. Zechel zur Verfügung gestellt) - m/u, MGMT-Promoter ist partiell methyliert (Fettdruck und Unterstrich geben den dominanten Status an); u, MGMT-Promoter ist nicht methyliert. MGMT, O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase.

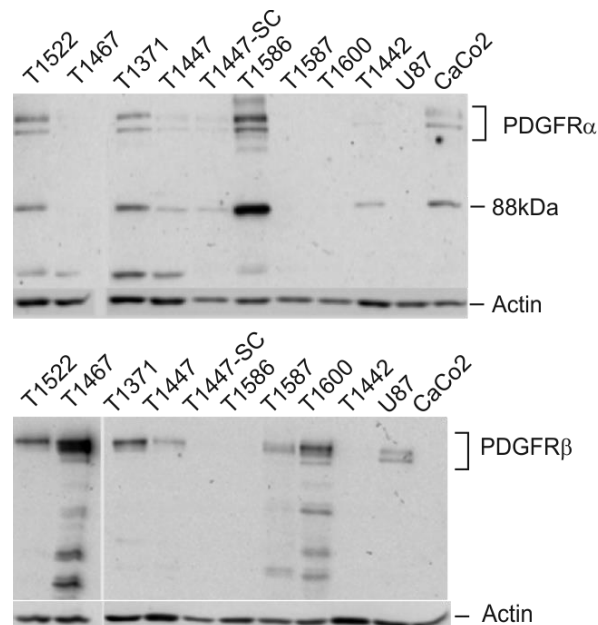


Abb. 41: Vergleich der Expression von PDGFR- α und PDGFR- β in verschiedenen SLGC-Linien. Westernblot Analyse. Die Abbildung wurde von PD. Dr. C. Zechel zur Verfügung gestellt.

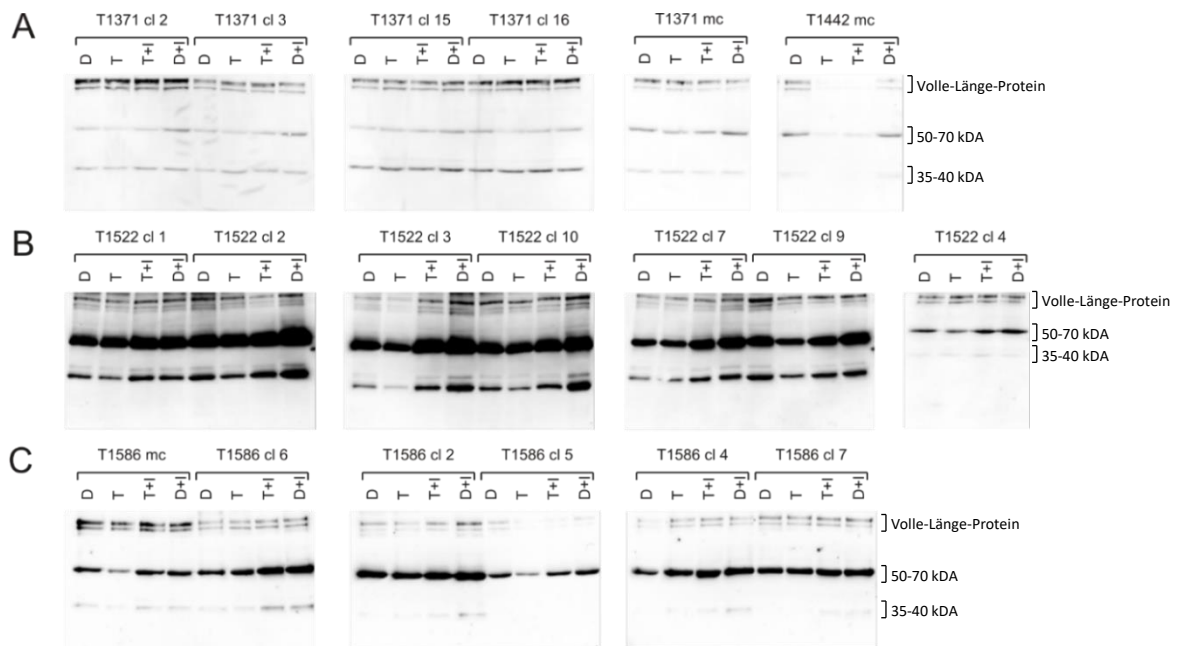


Abb. 42: PDGFR- α Expression (Westernblot-Analyse) – (A) T1371 Mutterkultur, T1371 Klone sowie T1442 Mutterkultur; (B) T1522 Klone; (C) T1586 Mutterkultur und T1586 Klone. Die Proteine wurden am Tag d 5 nach der Behandlung isoliert. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (D) (=Lösungsmittelkontrolle), 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib (T+I) und DMSO/ 5 μ M Imatinib (D+I). PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

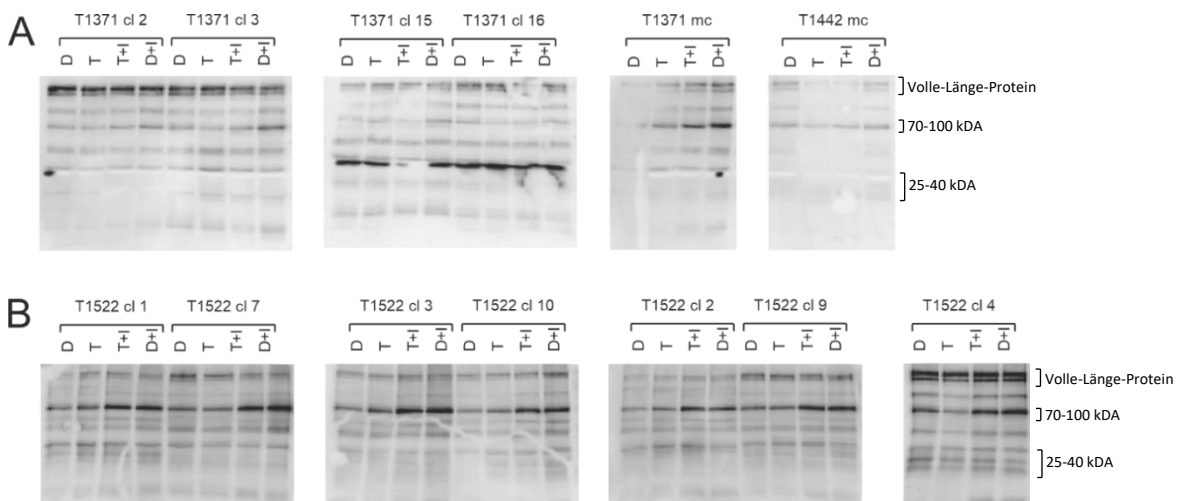


Abb. 43: PDGFR- β -Detektion (Westernblot-Analyse) – (A) T1371 Mutterkultur, T1371 Klone sowie T1442 Mutterkultur; (B) T1522 Klone. Die Proteine wurden am Tag d 5 nach der Behandlung isoliert. Behandlung mit Dimethylsulfoxid (D) (=Lösungsmittelkontrolle), 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M TMZ/ 5 μ M Imatinib (T+I) und DMSO/ 5 μ M Imatinib (D+I). PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; D/DMSO, Dimethylsulfoxid; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

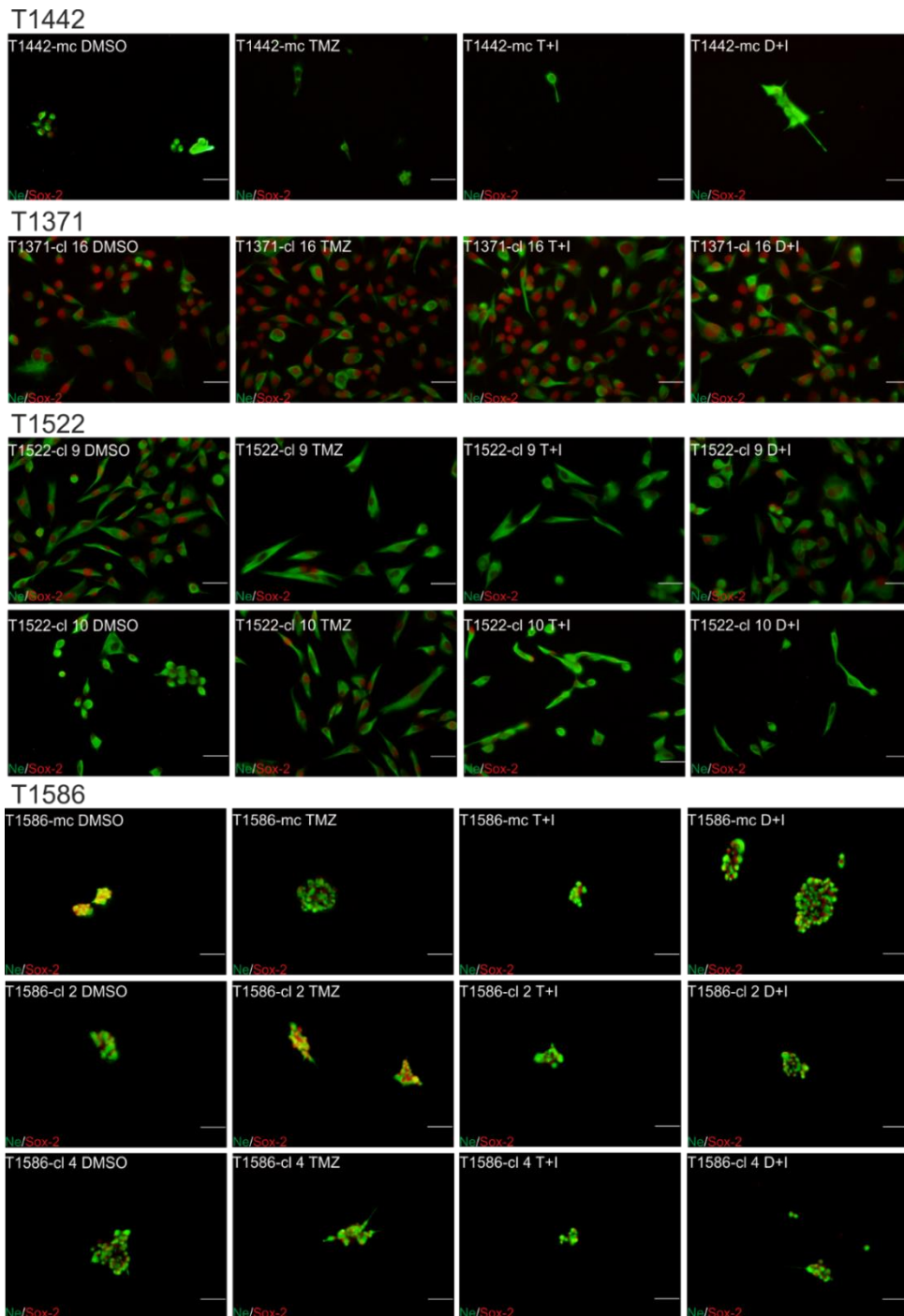


Abb. 44: Expression von Nestin und Sox-2 in Kulturen von T1442 mc, T1371 Klon cl 16, T1522 Klon cl 9 und cl 10, T1586 mc und T1586 Klon cl 2 und cl 4. Analyse am Tag d5 nach der Behandlung mit Dimethylsulfoxid (D) als Lösungsmittelkontrolle, 50 μ M Temozolomid (T), 50 μ M Temozolomid und 5 μ M Imatinib (T+I) sowie Dimethylsulfoxid und 5 μ M Imatinib (D+I). Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-Sox-2/Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Der DAPI-Kanal wurde zur besseren Darstellung der Sox-2-Färbung auf den Mikrofotographien weggelassen. Balken: 50 μ m; CD133, Prominin-1; Sox-2, *sex determining region Y HMG box 2*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.

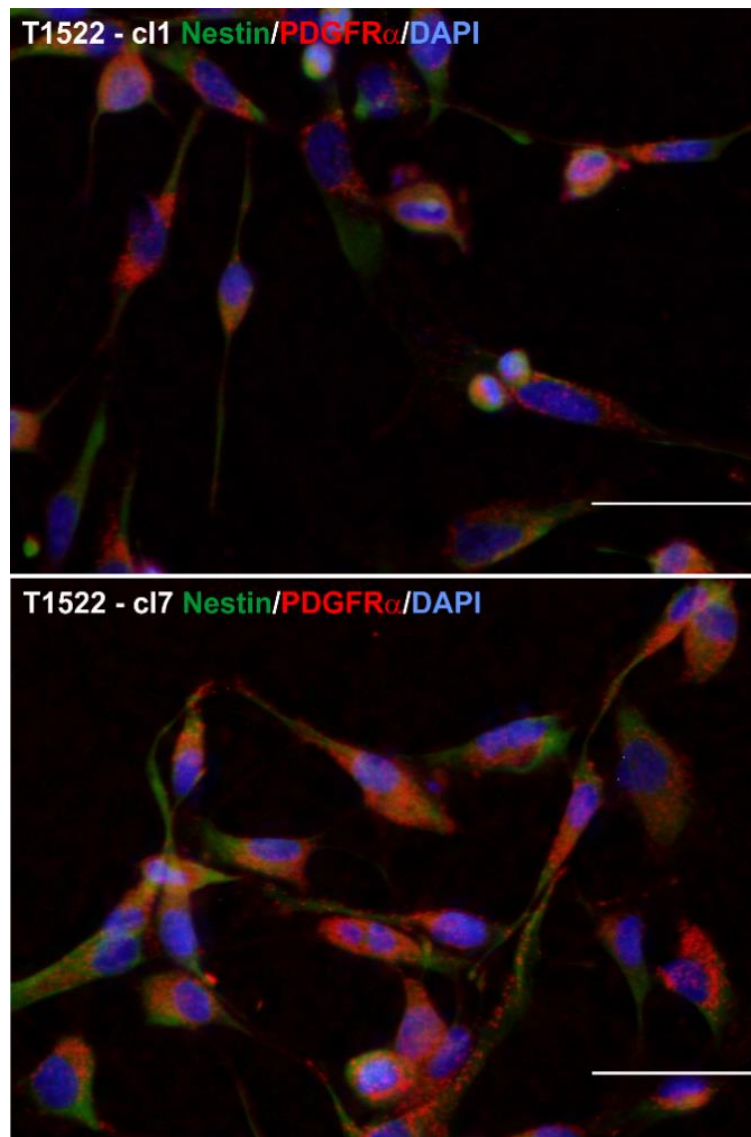


Abb. 45: Immunzytochemische Analyse der PDGFR- α -Expression in den T1522 Klonen cl 1 und cl 7. Die Mikrofotographien zeigen die irreguläre Verteilung der PDGFR- α -Signale (rot) im Zytoplasma und in der Plasmamembran. Es wurden die Antikörperpaare Maus-anti-Nestin/Ziege-anti-Maus-DyLight® und Kaninchen-anti-PDGFR- α /Ziege-anti-Kaninchen-Cy3® eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI. Balken: 50 μ m; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; cl, Klon; mc, Mutterkultur.



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

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
(Theologie)
Prof. Dr. Borek
(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 Focuss 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

8 Danksagung

Mit dieser Seite möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die auf unterschiedliche Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich beim Direktor der Klinik für Neurochirurgie des UKSH Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Tronnier für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Weiterhin danke ich herzlich Frau PD Dr. rer. nat. Zechel für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Überlassung des Themas.

Ich danke Frau Edith Pawlak für die Unterstützung bei der Arbeit in der Zellkultur sowie Frau Dr. rer. nat. Eileen Hirsland für die Einarbeitung im Labor.

Desweiteren danke ich dem Institut für systemische Entzündungsforschung für die Nutzung der CAnaCore-Facility.

Ein großer Dank gilt selbstverständlich auch meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums immer unterstützte und mir den nötigen Rückhalt gab.