

VALIDIERUNG GEEIGNETER ENTWICKLUNGSABHÄNGIGER
EXPRESSIONSMARKER FÜR EIN STAMMZELASSOZIIERTES,
SPHÄROIDES IN-VITRO-KULTURSYSTEM HOCHGRADIGER
GLIOME

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Fritz Paul Klippel
geboren am 02. Dezember 1985 in Görlitz

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. Christian Ewald, Jena
2. Priv.-Doz. Dr. med. Bernd F.M. Romeike, Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Christian Mawrin, Magdeburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.03.2017

Es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,
nicht das Besitzen, sondern das Erwerben,
nicht das Dasein, sondern das Hinkommen,
was den größten Genuß gewährt.

Carl Friedrich Gauß

(1777 - 1855)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis..... | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| Zusammenfassung | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Das Glioblastoma multiforme..... | 1 |
| 1.2 Symptomatik, Diagnose und Therapie..... | 3 |
| 1.3 Stammzellhypothese | 5 |
| 1.4 Etablierte Entwicklungsmarker | 7 |
| 1.4.1 Potenzielle Stammzellmarker CD133 und Musashi-1 | 7 |
| 1.4.2 Pluripotenzfaktoren Sox2, Oct4 und Nanog | 8 |
| 1.4.3 Entwicklungsspezifische Marker | 10 |
| 1.4.3.1 Oberflächenrezeptor Notch-1..... | 10 |
| 1.4.3.2 Die Intermediärfilamente Nestin, GFAP und Vimentin | 10 |
| 1.5 Sphärenkulturen und deren Assays..... | 11 |
| 2 Problemstellung und Ziele der Arbeit | 14 |
| 3 Methodik | 15 |
| 3.1 Material und Geräte..... | 15 |
| 3.2 Methodik der Tumorzellkultivierung | 22 |
| 3.2.1 Tumorzelllinien..... | 22 |
| 3.2.2 Herstellung adhärenter Primärzellkultur..... | 23 |
| 3.2.3 Herstellung von Zellkulturen mittels Stammzellisolationsprotokoll | 23 |
| 3.2.4 Versuchsaufbau | 24 |
| 3.2.5 Kultivierung und Beurteilung der Zellkulturen..... | 25 |
| 3.3 Physiologische und morphologische Charakterisierung von Zell- und Sphärenkulturen | 26 |
| 3.3.1 Zellviabilitäts-Assay | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.2 | Migrationsanalyse | 27 |
| 3.3.3 | Morphologische Charakterisierung der Zellkulturen per Immunfluoreszenzfärbung..... | 28 |
| 3.4 | Genexpressionsanalyse | 30 |
| 3.4.1 | RNA-Isolation..... | 30 |
| 3.4.2 | Reverse Transkription..... | 31 |
| 3.4.3 | Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)..... | 31 |
| 3.4.4 | Auswertung | 32 |
| 3.5 | Statistische Analyse | 33 |
| 4 | Ergebnisse..... | 34 |
| 4.1 | Betrachtung physiologischer Parameter der Vergleichsgruppen..... | 35 |
| 4.1.1 | Sphärenbildung..... | 35 |
| 4.1.2 | MTT-Viabilitätsanalyse..... | 37 |
| 4.1.3 | Migrationsanalyse | 38 |
| 4.2 | Morphologische Charakterisierung beider In-vitro-Systeme | 40 |
| 4.2.1 | CD133..... | 41 |
| 4.2.2 | Sox2..... | 44 |
| 4.2.3 | GFAP, Nestin und Vimentin | 45 |
| 4.2.4 | Ki67..... | 48 |
| 4.3 | Ergebnis der Genexpressionsanalyse..... | 48 |
| 4.3.1 | Expressionsquantifizierung der analysierten Marker..... | 48 |
| 4.3.2 | Expressionsratio gegenüber den isolierten Tumorsphären (Gr.T) | 50 |
| 4.3.3 | Korrelationsbeurteilung | 52 |
| 5 | Diskussion..... | 53 |
| 5.1 | Methodische Bewertung | 53 |
| 5.2 | Kernaussagen | 56 |
| 5.2.1 | Physiologisch-phänotypische Gegenüberstellung..... | 57 |
| 5.2.2 | Einordnung der Immunfluoreszenz- und Genexpressionsergebnisse... | 60 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2.3 | Einordnung der stammzellisolierten Sphären (Gr.T) bezüglich ihres Differenzierungsstandes | 62 |
| 5.2.4 | Resultierende Zielmarker | 65 |
| 5.3 | Ausblicke | 68 |
| 6 | Schlussfolgerung | 70 |
| | Anhang | 71 |
| I. | Literaturverzeichnis | 71 |
| II. | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| III. | Tabellenverzeichnis | 86 |
| IV. | Danksagung | 87 |
| V. | Lebenslauf | 88 |
| VI. | Ehrenwörtliche Erklärung | 89 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| 5-ALA | 5-Aminolävulinsäure |
| Abb. | Abbildung |
| A_{max} | Absorptionsmaximum |
| bFGF | <i>Basic fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 2 |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| d | Tag |
| DMEM | <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBSS | <i>Earle's Balanced Salt Solution</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor |
| E_{max} | Emissionsmaximum |
| FBS | <i>Fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum |
| Gr. | Gruppe |
| Gy | Gray |
| h | Stunde |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| HCL | Salzsäure |
| IDH1/2 | Isocitrat-Dehydrogenase 1/2 |
| KDa | Kilodalton |
| LSM | <i>Laser Scanning Mikroskope</i> |
| M | Molar, Stoffmengenkonzentration |

| | |
|----------------|---|
| <i>mg</i> | Milligramm |
| <i>MGMT</i> | 0-6-methylguanin-DNA-Methyltransferase |
| <i>ml</i> | Milliliter |
| <i>mM</i> | Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/Liter |
| <i>MOPS</i> | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| <i>mRNA</i> | <i>messenger Ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure |
| <i>mTOR</i> | <i>mechanistic Target of Rapamycin</i> |
| <i>n</i> | Anzahl |
| <i>NaCl</i> | Natriumchlorid |
| <i>NCBI</i> | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| <i>nm</i> | Nanometer |
| <i>OD</i> | Optische Dichte |
| <i>p</i> | Signifikanz |
| <i>PAS</i> | <i>Periodic Acid Schiffs</i> |
| <i>PBS</i> | <i>Phosphate buffered Saline</i> |
| <i>PCR</i> | <i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| <i>PDL</i> | Poly-D-Lysin |
| <i>PTEN</i> | <i>Phosphatase and Tensin homolog</i> |
| <i>R</i> | <i>Ratio</i> |
| <i>rpm</i> | <i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| <i>RT-qPCR</i> | quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion |
| <i>s</i> | Sekunde |
| <i>SPSS</i> | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> |
| <i>STAT3</i> | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| <i>Tab.</i> | Tabelle |
| <i>TEMED</i> | Tetramethylethylendiamin |
| <i>Tris</i> | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| <i>VE</i> | Volumeneinheit |
| <i>VEGF</i> | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Endothelwachstumsfaktor |
| <i>WHO</i> | <i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation |

englische(r) Bezeichnung oder Eigenname, deutsche Bezeichnung

Zusammenfassung

Um weiterführende, personalisierte Therapien für hochgradige Gliome bzw. Glioblastome zu entwickeln, sind geeignete In-vitro-Modelle unumgänglich. Ein interessantes System stellt die Kultivierung von Zellen in stammzellassozierten Sphärenformationen mit dem Oberflächenprotein CD133 als Stammzellmarker dar. Jedoch sind in den letzten Jahren mehrere Studien veröffentlicht worden, in denen CD133 als potentieller Stammzellmarker in Frage gestellt wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein stabiles Sphärenkultursystem aus humanen hochgradigen Gliomen zu erzeugen und Unterschiede zu herkömmlichen Kultivierungsmethoden unter Berücksichtigung etablierter Entwicklungsmarker zu beurteilen.

Zeigen sich im Hinblick auf Expression und Verteilung von entwicklungspezifischen Markern Unterschiede in Abhängigkeit vom Kultursystem? In welchen Kulturen sind die sogenannten Stammzellmarker verstärkt exprimiert?

Diesbezüglich wurden vier Gruppen miteinander verglichen. Gruppe T (*Tumorsphären*) wurde aus OP-Frischresektaten auf Grundlage eines beschriebenen, nach Zellgröße und -dichte selektierenden Stammzellisolationsprotokolls erzeugt. Als Vergleichsgruppen dienten vormals differenzierte Gliomkulturen (*Sphäreninduzierte*, Gr.V_s, n=6) und kommerzielle *Zelllinien* (Gr.V_z, n=4). Zellen dieser drei Gruppen sollten durch ein spezielles serumfreies *Sphärenmedium* Sphärenformationen erzeugen. Die vierte Gruppe V_P (Primärkulturen, n=6) stellten die adhärenenten Gliomkulturen im serumhaltigen *Differenzierungsmedium*.

Folgende Marker wurden mittels RT-qPCR untersucht: die beschriebenen Stammzellmarker *CD133* und *MUSASHI-1*, die Pluripotenzmarker *NANOG*, *SOX2*, *OCT4* sowie *NESTIN*, *NOTCH-1* und als entwicklungspezifischer Marker *GFAP*. Zusätzlich wurden der Metabolismus (MTT-Assay) und die Migrationsfähigkeit (24h-Assay) in den Sphärengruppen sowie ausgewählte phänotypische Marker (*CD133*, *Sox2*, *Nestin*, *GFAP*, *Vimentin*, *Ki67*) mit Immunfluoreszenzanalyse zur Kontrolle des Sphären- und Differenzierungsstadiums in allen Gruppen betrachtet.

Eine Sphärenformation im serumfreien Sphärenmedium gelang in allen Gruppen. Gr.T unterschied sich auf physiologischer und molekulargenetischer Ebene von den Vergleichskulturen. Diese benötigte signifikant länger, um Sphären zu generieren (14 Tage gegenüber ca. 2-3 Tagen), besaß eine um den Faktor 10 geringere metabolische

Aktivität und eine verstärkte Tendenz zur Migration gegenüber den Vergleichsgruppen Gr.Vs und Vz.

In allen Gruppen ließen sich über Immunfluoreszenzfärbungen CD133, Sox2 sowie Nestin, GFAP und Vimentin in Sphären- und differenzierten Kulturen in unterschiedlicher Ausprägung nachweisen. Dabei nahmen die Expression von CD133 und Sox2 im Zuge der jeweiligen Differenzierung ab und die der Intermediärfilamente zu. Sphärenstadium und Differenzierung konnten hierbei in allen Fällen bestätigt werden.

Das mRNA-Expressionsmuster der Gr.T (n=5) hob sich durch eine verstärkte, weitgehend signifikante Expression der Marker *MUSASH-1*, *NESTIN*, *NOTCH-1* sowie *GFAP* von den drei Vergleichsgruppen ab. Eine *CD133*-Expression ließ dagegen keine Unterscheidung der vier Gruppen untereinander zu. *SOX2*, *NANOG* und *OCT4* waren nicht reguliert.

Nach diesen Daten ist die Sphärenbildung als alleiniges Kriterium für die In-vitro-Beurteilung von stammzellähnlichen Tumorzellen nicht ausreichend. Die anhand des Stammzellisoliationsprotokolls erzeugten Kulturen (Gr.T) zeigten eher stammzellassoziierte physiologische und genetische Merkmale als die sphäreninduzierten Kulturen und sind folglich bei zukünftigen Arbeiten, welche auf stammzellassoziierten Sphären-Assays abzielen, zu präferieren.

So fand sich auf Seiten dieser Tumorsphären (Gr.T) die stärkste Expression des potentiellen Stammzellmarkers *MUSASHI-1* auf mRNA-Ebene, der demnach als geeigneter Referenzmarker für weiterführende Analysen betrachtet werden kann.

Zusätzlich scheint der verstärkten *NESTIN*- und *NOTCH-1*-Expression auf mRNA-Ebene in stammzellassoziierten Sphärenkulturen eine besondere Bedeutung zuzukommen.

1 Einleitung

Hochgradige Gliome sind Tumore des Zentralnervensystems selbst und grenzen sich von Meningeomen sowie von Metastasen hirnferner Tumore ab. Die Einteilung zentraler Neoplasien erfolgt nach den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation. Diese unterteilt grob in niedriggradige (I-II) und hochgradige (III-IV) Gliome (Louis et al. 2007).

Histologische Kriterien für hochgradige Gliome umfassen eine hohe Mitoseaktivität mit ausgeprägten Kernatypien und Invasivität ins umliegende Parenchym. Diese aggressiven Tumore gehen mit einer schlechten Prognose einher (Rees et al. 1996). Gliome stellen insgesamt 25% aller Neubildungen im Bereich des Zentralnervensystems und sind gleichzeitig die häufigsten hirneigenen malignen Neoplasien. Ihnen gemein ist der Ursprung aus ansässigen Glia(vorläufer)zellen, aus welchen sich in der Tumorgenese Astrozytome, Oligodendrogliome oder Oligoastrozytome entwickeln. Diese sind bezüglich ihrer Behandlung und Prognose nur bedingt vergleichbar (Masui et al. 2012). Unter den neuroepithelialen Tumoren tritt das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) als klinisch aggressivste Geschwulst in seiner Häufigkeit sowie seinem klinischen Verlauf hervor und sei im Weiteren vordergründig betrachtet.

1.1 Das Glioblastoma multiforme

Der häufigste hirneigene maligne Tumor des Erwachsenenalters (45%) nimmt seinen Ausgang von ansässigen Astrozyten bzw. deren Vorläufern und ist klinisch durch einen raschen Krankheitsverlauf charakterisiert. Das Glioblastoma multiforme tritt bei einer Gesamtinzidenz von 3 - 4/100.000 Personen vorzugsweise in den Großhirnhemisphären, dabei prozentual absteigend im Frontal- (26%), Temporal- (20%) und Parietallappen (12%) auf (Ostrom et al. 2013).

Es ist gekennzeichnet durch sein schnelles, destruktives Wachstum ins umliegende Parenchym, histologisch charakterisiert durch Pseudopalisadenbildung, diffusen und vor allem zentralen Nekrosen in Verbund mit intensiver Neovaskularisation und fortschreitender Infiltration des Parenchyms (Abb. 1), nicht selten über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre (Louis et al. 2007). Eine genetische Prädisposition liegt in den wenigsten Fällen vor. Im Rahmen bestimmter familiärer Tumorsyndrome, wie

Neurofibromatose 1 und 2, Li Fraumeni-, Hippel-Lindau- oder Turcot-Syndrom, wird ein vermehrtes Auftreten beschrieben (Reuss und von Deimling 2009).

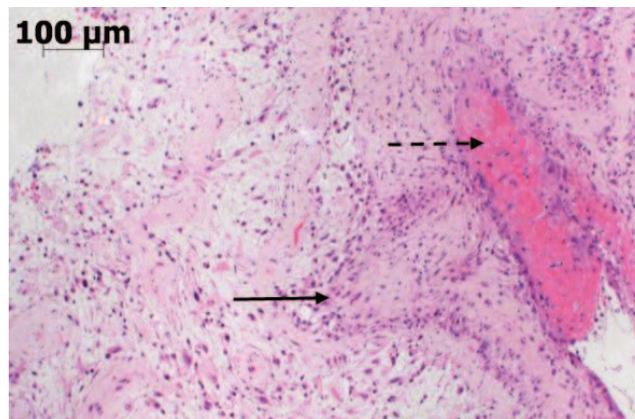


Abb. 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Glioblastom

Charakteristisches histologisches Bild mit Pseudopalissaden [→] und Neovaskulisation [- ->].
(Präparat Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Jena)

Für die große Mehrzahl der Fälle liegt die Ätiologie, wie allgemein bei Gliomen, viel mehr in multifaktoriellen genetischen bzw. epigenetischen Veränderungen (Phillips et al. 2006, Gaudet et al. 2003). Unerkannte Umwelteinflüsse (Lehrer 2010, Scott und Jinot 2011), Infektionen mit Viren (Tsutsui 2009, Miller 2009) und individuelle Prädisposition scheinen ebenso eine Rolle zu spielen.

Als bekannte charakterisierende genetische Mutationsmuster seien EGF-Rezeptor- und PI3-Kinase-mTor-Signalwegamplifikationen, Tumorsuppressorinaktivierungen, wie TP53- und PTEN-Mutationen, chromosomale 1p/19q-Deletionen (Masui et al. 2012, Yang et al. 2010), IDH-1/2 (Yan et al. 2009) und die MGMT-Promoter-Hypermethylierung genannt (Stupp und Weber 2005).

Pathogenetisch unterscheidet man in primäre und sekundäre Glioblastome. Erstere entstehen - de novo - ohne nachweisbare vorangegangene Läsion, wohingegen sekundäre Glioblastome aus niedrig malignen Gliomen, wie diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) unter Zunahme genetischer Aberrationen im Krankheitsverlauf über das *anaplastische Astrozytom* (WHO Grad III) bis hin zum sekundären Glioblastom (WHO Grad IV), hervorgehen. Beide sind histologisch wie klinisch nicht voneinander separierbar, jedoch von unterschiedlicher genetisch-kausaler Ätiologie (Ohgaki und Kleihues 2013, Scherer 1940).

IDH1- und TP53-Mutationen sind Marker für sekundäre Glioblastome bzw. anaplastische Astrozytome, die eher von einer Progenitorzelle ihren Ausgang nehmen.

Andererseits gehen EGF-Rezeptor-Überexpression, PTEN-Mutationen und spezifische Aberrationen des Chromosom 10 mit dem neunfach häufigerem primären Glioblastoma multiforme einher (Ohgaki und Kleihues 2013).

Seltenere Untergruppen lassen sich histologisch separieren, so z.B. in das dem Glioblastom genetisch nahestehende *Gliosarkom* oder das *Riesenzellglioblastom* mit eher anaplastischer Prägung (Louis et al. 2007).

Weiterhin erwähnt seien unter den hochgradigen Gliomen das *anaplastische Oligoastrozytom*, das *anaplastische Oligodendrogliom* wie auch das *anaplastische Ependymom* (Masui et al. 2012). In der zukünftigen überarbeiteten WHO-Klassifikation wird der zunehmenden Bedeutung molekularer Marker Rechnung getragen (Vigneswaran et al. 2015).

1.2 Symptomatik, Diagnose und Therapie

Die Patienten werden typischerweise durch erstmalig aufgetretene fokale oder generalisierte Krampfanfälle im mittleren Alter, neurokognitive Defizite, neurologische Herdzeichen oder durch Hirndrucksymptomatik auffällig.

Goldstandard der Diagnostik ist derzeit die Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel in drei Ebenen (Abb. 2), in der die entsprechenden raumfordernden Läsionen mit girlandenförmigen Kontrastmittelanreicherungen der Ränder, zentralen Nekrosen und perifokalem Ödem dargestellt werden (Macdonald et al. 1990, Wen et al. 2010, van den Bent et al. 2011).

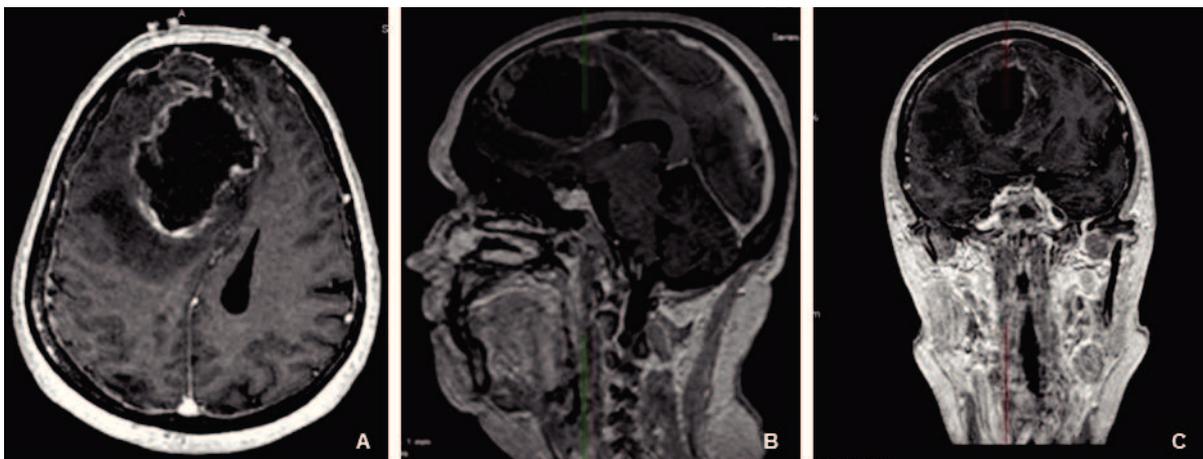


Abb. 2: Magnetresonanztomographieaufnahme

Glioblastom im rechten Frontallappen einer 62-jährigen Patientin, [A-C] T1-gewichtete Transversal-, Sagittal- und Coronal Aufnahme. (mit freundlicher Genehmigung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie, IDIR, Sektion Neuroradiologie des Universitätsklinikums Jena)

Die magnetresonanztomographisch dargestellten Grenzen spiegeln jedoch nicht die eigentliche Ausdehnung des Tumors wider. Zur Beantwortung besonderer Fragestellungen zu Differenzialdiagnosen oder Tumorinvasion können nuklearmedizinische Zusatzuntersuchungen, wie Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET), hinzugezogen werden (la Fougere et al. 2011).

Die derzeitige Therapie umfasst die chirurgische (Teil-)Resektion bzw. Befundsicherung mit anschließender Radio-Chemotherapie. Ziel des operativen Eingriffes ist, nach Möglichkeit und unter Berücksichtigung eloquenter Hirnareale, die Entfernung des in der Bildgebung dargestellten Tumors, wobei eine histologisch komplette Resektion aufgrund des diffusen Charakters der Erkrankung nicht möglich ist.

Die anschließende kombinierte Radio-Chemotherapie erfolgt nach dem Stupp-Schema (Stupp et al. 2009) mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolamid in sechs Zyklen, während beim Rezidiv patientenindividuell reevaluiert werden kann und Nitrosharnstoffe als Reserve und Bevacizumab als Kombinationspräparat zur Verfügung stehen (Gilbert et al. 2014). Temozolamid nimmt eine Sonderstellung ein, da es bei guter Verträglichkeit einen, in randomisierten Studien belegten, positiven Effekt auf das Gesamtüberleben hat, insbesondere bei Methylierung der Promoterregion des DNA-Reperaturenzym 0-(6)-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) auf Chromosom 10p26q (Stupp und Weber 2005, Stupp et al. 2009). Die Radiatio erfolgt fraktioniert bis zu einer Gesamtdosis von 60Gy (Weller 2015).

Die Standardtherapie bei anaplastischen Astrozytomen entspricht der des Glioblastoms. Anaplastische Oligodendrogliome mit der 1p/19q-Kodeletion besitzen eine etwas günstigere Prognose und werden kombiniert mit alkylierenden Chemotherapeutika (Procarbazin, Lomustin, Vincristin) ergänzend zur Strahlentherapie behandelt (Idbaih et al. 2007).

Nichtsdestoweniger ist das Therapieansprechen, wenn nicht schon primär, spätestens jedoch beim auftretenden Rezidiv aufgrund einsetzender Resistenz (Croteau und Mikkelsen 2001) mit einem 5-Jahresüberleben von weniger als 5% insuffizient (Bansal und Banerjee 2009, Ostrom et al. 2013) und die Prognose für den Patienten aller Regel nach schlecht (Buckner et al. 2007). Das mittlere Überleben beim Glioblastom verharrt

derzeit trotz jahrelanger intensivster Forschung ernüchternd zwischen 12 bis 14 Monaten, bei den Gliomen Grad III wenige Monate mehr (Ostrom et al. 2013).

1.3 Stammzellhypothese

Als ein Grund für dieses Therapieversagen werden so genannte stammzellähnliche oder „potentielle Tumorstammzellen“ postuliert, die das maligne Geschehen nicht nur maßgeblich unterhalten, sondern mit ihrer Chemo- und Strahlenresistenz einen *Escape*-Mechanismus für den Tumorprogress erzeugen sollen (Reya et al. 2001).

Stammzellen per se definieren sich nach gewissen Eigenschaften: Immortalität, Selbsterneuerung und der Fähigkeit in das entsprechende Organewebe kontrolliert auszudifferenzieren, um dieses kontinuierlich zu erneuern (Dalerba et al. 2007).

Im Hirn werden physiologische Regionen beschrieben, in denen eine erhöhte Dichte an neuronalen Progenitorzellen zu finden ist, wie beispielsweise in der subventrikulären Zone der Seitenventrikel oder der subgranulären Zone des Gyrus dentatus. Diese Zellen bilden in vitro kugelförmige Gebilde (Sphären), die in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone differenzieren können (Uchida et al. 2000). Sie migrieren vermutlich anhand chemokiner bzw. zytokiner Signalgebung aus Arealen wie dem Gyrus dentatus in beschädigte Parenchymareale oder sind in der Lage, anhand eines festgelegten Migrationsstroms, Zellpopulationen zu ersetzen, wobei diese Zellen offensichtlich eine erhebliche Rolle beim Erhalt der Lernfähigkeit spielen (Christie und Turnley 2012, Pastrana et al. 2011). Dabei sehen u.a. Germano et al. zusammenfassend diese subventrikuläre Zone mit ihren physiologischen Stammzellen auch als Ausgangspunkt der Entwicklung von malignen hirneigenen Tumoren (Germano et al. 2010), da diese Nischen häufig einen räumlichen Zusammenhang, insbesondere beim Glioblastom, aufweisen (Uchida et al. 2004, Walker et al. 2011).

Die obigen Eigenschaften überschneiden sich augenfällig mit den Kennzeichen der Karzinogenese, wie unbeschränkter Replikation, ausgeschalteter Apoptosemechanismen und Invasionsfähigkeit (Hanahan und Weinberg 2000). Bereits 2001 entstand der Gedanke, dass die Entwicklung von Gliomen Ausdruck einer Stammzell dysregulation sei (Reya et al. 2001). So zeigte sich in vitro bei glialen Vorläuferzellen eine erhöhte Transformationsanfälligkeit, verglichen mit ausdifferenzierten Astrozyten (Holland et al. 2000).

In der vergangenen Dekade haben sich die Daten zu dieser Zellsubpopulation erhärtet, sodass diesen stammzellähnlichen Zellen eine herausragende Stellung bezüglich der

Unterhaltung des Tumorgeschehens zugesprochen werden konnte. Weniger klar ist hingegen die Herkunft dieser Zellen. Der Ursprung der stammzellähnlichen Tumorzelle ist Gegenstand kontroverser Debatten (Clarke et al. 2006). Es werden hierbei mehrere kausale Möglichkeiten diskutiert: die Genese aus differenzierten Zellpopulationen oder aus Vorläuferzellen oder aus physiologischen adulten Stammzellen des lokalen Organs (Germano und Binello 2014, Clarke et al. 2006).

Diese speziellen Zellen sind in der Lage Stammzellfaktoren zu exprimieren, die in Zusammenhang mit Selbsterneuerung und Immortalität stehen. Gleichzeitig wird davon ausgegangen, dass sie im Zuge von asymmetrischen Zellteilungen (Lathia et al. 2011) Ausgangspunkt für eine weitaus größere, nicht immortale Tumormasse sind sowie gleichzeitig ihre eigene Population stabil halten und so eine intratumorale, genetisch abgrenzbare Zellhierarchie erzeugen (Houghton et al. 2007, Lottaz et al. 2010).

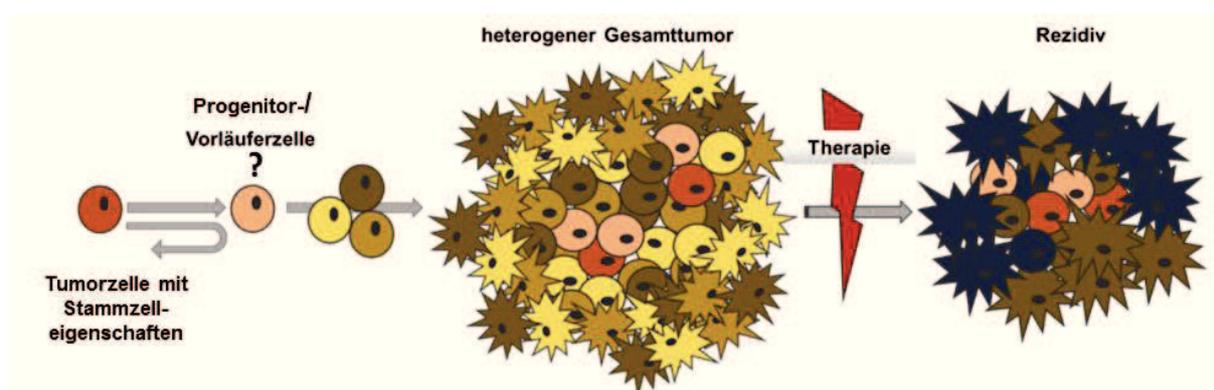


Abb. 3: Modell zur Tumorerhaltung

Ausgehend von einer Tumorzelle mit Stammzeleigenschaften wird ein proliferierendes Geschehen unterhalten, wobei die Gegenwart von Progenitorzellen unklar ist. Therapien oder strapaziöse, intratumorale Bedingungen führen zur Selektion aggressiverer Tochterpopulationen bei immortaler Tumorstammzellpopulation (Abbildung angelehnt an Clarke et al. 2006, Houghton et al. 2007, Lathia et al. 2011, Lottaz et al. 2010).

Die Stammzellhypothese bedeutete einen Paradigmenwechsel in der onkologischen Therapiestrategie, die von einer homogenen Tumorphosphäre ausging. Sie führte zur Erforschung spezifischer Eigenschaften dieser stammzellähnlichen Tumorstammzellpopulation für die künftige Etablierung stammzellspezifischer Therapien (Bernstein 2007, Clarke et al. 2006).

Eine allgemein vereinbarte Definition für stammzellähnliche bzw. Stammzellen in Tumoren existiert nicht. Als weitgehender Konsens gelten die, wie von Singh et al. beschriebenen folgenden spezifische Attribute: Bildung von *selbstorganisierten Tumorsphären*, *Selbsterneuerung* und *Proliferation* sowie die *phänotypische*

Ausdifferenzierung zurück zum Ausgangstumor (Singh et al. 2003). Als Progenitorzellen werden sie jedoch nicht angesehen, da sie aufgrund ihrer Aberrationen genetisch unterschiedliche Tochterzellen hervorbringen (Stiles und Rowitch 2008), die phänotypisch und genetisch verschieden sind und erst in der Gesamtheit ihren Ausgangstumor widerspiegeln (Dalerba et al. 2007). Progenitorzellen oder Vorläuferzellen sind, anders als Stammzellen, in ihrer Proliferationsfähigkeit limitiert und in ihrer Entwicklung in Richtung eines speziellen Zelltyps festgelegt (Unipotenz). Jedoch ist in den letzten Jahren eine zunehmende synonyme Verwendung der Begriffe *Stamm-* und *Progenitorzelle* zu beobachten (Seaberg und van der Kooy 2003).

1.4 Etablierte Entwicklungsmarker

Eine Vielzahl von Faktoren, die im Zusammenhang mit der Erforschung von embryonalen und pluripotenten Zellen in diversen Modellen entdeckt wurden, konnten auch in Zellpopulationen von Tumoren gefunden werden. Physiologisch sind sie in strikte regulatorische Zellprozesse eingebunden, wobei ihre Dysregulation in Gliomen ein Malignitätsmerkmal darstellt. Diese sind auf unterschiedlichen regulatorischen Ebenen angesiedelt und charakterisieren stammzellähnliche Populationen zugleich in Zellkulturen. Eine Auswahl an etablierten entwicklungscharakterisierenden Faktoren von Glioblastom- bzw. Gliomzellkulturen (Germano und Binello 2014, Dahlrot et al. 2013a, Calloni et al. 2013) wird im Folgenden betrachtet (Abb. 4).

1.4.1 Potenzielle Stammzellmarker CD133 und Musashi-1

Mit der Entdeckung des Vertreters einer neuen Proteinklasse, dem Prominin-1 (*CD133*) 1997 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen, rückte dieser als neuer Stammzellmarker in den wissenschaftlichen Fokus (Bonnet und Dick 1997).

Weigmann und Miraglai beschrieben ein mit 120kDa glykosyliertes Membranprotein mit fünf Transmembrandomänen, welches an Membranprotusionen verdichtet auftritt (Weigmann et al. 1997, Miraglia et al. 1997). Dabei scheint es membranorganisierende Funktionen im Zusammenhang mit vermehrten Cholesterinanreicherungen im Sinne von sogenannten *lipid rafts* zu stehen (Giebel et al. 2004). Dieses apikale Membranprotein erwies sich gleichsam als spezifischer Marker für physiologische, aber auch maligne Zellen mit Stammzeleigenschaften. Dabei fiel auf, dass CD133 bisweilen nicht in differenzierten, physiologischen Zellen nachzuweisen war wie

adulten Astrozyten (Pfenninger et al. 2007). Es tritt vor allem bei physiologischen Vorläuferzellen, nicht nur im Zentralnervensystem, auf (Neuzil et al. 2007).

Nach der Entdeckung von CD133 als möglichem Stammzellmarker konnte sukzessiv in weiteren Tumoren, wie dem Ovarial-, Colon-, Mamma-, Bronchialkarzinom und Meningeom (Tang et al. 2012, Chen et al. 2008b, Hueng et al. 2011, Leis et al. 2012, Ricci-Vitiani et al. 2007, Bapat et al. 2005), wie letztendlich ebenso im Glioblastoma multiforme (Singh et al. 2003, Galli et al. 2004) eine Tumorzellsubpopulation mit Expression des Membranmoleküls CD133 nachgewiesen werden.

Dies suggerierte, dass CD133 ein wesentlicher Faktor bei physiologischen Prozessen und ein stabiler Marker für diese Nischenpopulation in Gliomen zu sein scheint. CD133-positive Zellen werden als bedeutender Grund für das signifikante Therapieversagen hochgradiger Gliome genannt (Liu et al. 2006), auch aufgrund von Resistenz gegenüber radio- und chemotherapeutischen Maßnahmen (Reya et al. 2001).

Insgesamt ist weiterhin die genaue physiologische Funktion von CD133 unklar, jedoch unterhält sein quantitativer Nachweis im Kontext zu Invasivität (Shibahara et al. 2013) und Progression (Thon et al. 2010) die wissenschaftliche Diskussion.

Musashi-1 (*Musashi RNA-binding protein 1*) unterliegt zur Erhaltung und Dedifferenzierung von neuronalem Gewebe einer strikten Konservierung über die taxonomischen Stämme hinweg. RNA-bindende Proteine wie Musashi-1 regulieren auf epigenetischer Ebene durch ihre Interaktion mit ihrer entsprechenden mRNA die jeweilige Genexpression, deren Effekt von Verstärkung bis zur völligen Stilllegung reichen kann (Kaneko et al. 2000).

Musashi-1 ist während der Ausdifferenzierung von physiologischen Neurosphären hin zu Astrozyten zusammen mit Sox2, Nestin und Oct4 nachzuweisen und verschwindet bei GFAP-Expression wieder (Wilczynska et al. 2009).

Es scheint also bei der Sphärenbildung bzw. ihrer Erhaltung eine Rolle zu spielen (Hemmati et al. 2003). Es ist als potenter Marker für physiologische neuronale Stamm- und Progenitorzellen, aber auch als Malignitätsmerkmal in Gliomen beschrieben (Kanemura et al. 2001).

1.4.2 Pluripotenzfaktoren Sox2, Oct4 und Nanog

Bestimmte Pluripotenzfaktoren, die auf Transkriptionsebene aktiv und im Gesunden gemeinhin während der Embryonalphase nachweisbar sind, werden ebenso mit der

Selbsterneuerungsfähigkeit von stammzellähnlichen Tumorzellen in Zusammenhang gebracht. Die ineinandergreifenden Transkriptionsfaktoren Sox2, Oct4 und Nanog steuern die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und gelten als Schlüsselfaktoren der Pluripotenz (Pan und Thomson 2007).

Mit steigendem WHO-Grad gehen Oct4 und Sox2 mit einer Progression glialer Tumore, unabhängig vom Outcome, einher. Hingegen wird Nanog als prognostischer Marker jüngst vermutet (Elsir et al. 2014).

Der Transkriptionsfaktor Sox2 (*sex determining region Y (SRY)- box 2*) spielt eine entscheidende Rolle für die Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Fong et al. 2008). Ebenfalls ist er in Progenitorzellen im zentralen Nervensystem nachweisbar (Gangemi et al. 2009). Im Gegensatz zu Oct4 kann Sox2 auch noch in adulten neuralen Stammzellen in der subventrikulären Zone nachgewiesen werden (Zappone et al. 2000). Eine Bedeutung für die Gliompathogenese wird dadurch unterstrichen, dass ein Ausschalten von Sox2 in vitro zum Proliferationsstopp von Glioblastomzellen führt (Gangemi et al. 2009).

Der *Octamer binding transcription factor 4 (Oct4)* steuert von physiologischer Seite vor allem die Embryonalentwicklung und ist im Adulten, soweit bekannt, ausschließlich in den Keimzellen nachweisbar (Babaie et al. 2007). Dabei wird Oct4 in der primitiven inneren Zellmasse, bestehend aus embryonalen Stammzellen, von Sox2 als Transkriptionskomplex kontrolliert (Okumura-Nakanishi et al. 2005). Ebenfalls sollen sie zusammen ein stammzellähnliches Stadium der Tumorzellen aufrechterhalten (Ikushima et al. 2011). Nachgewiesen ist, dass Oct4 in die Proliferationsfähigkeit von Gliomen involviert ist und gleichzeitig die Differenzierung entsprechender Zellen hemmt (Du et al. 2009).

Ein dritter Transkriptionsfaktor ist Nanog, welcher in direkter Abhängigkeit zum Sox2/Oct4-Transkriptionskomplex steht (Rodda et al. 2005). Nanog ist ein Homöobox-Transkriptionsfaktor aus 96 Aminosäuren mit drei Domänen, der über Artgrenzen hinweg ebenfalls strikt konserviert scheint (Pan und Thomson 2007). Seine mRNA ist in allen pluripotenten Zellpopulationen nachweisbar und während der Differenzierung vermindert exprimiert. Die Stilllegung von jeweils einem dieser drei Transkriptionsfaktoren führt in vitro zum Verlust der embryonalen Selbsterneuerung und zur Differenzierung von embryonalen Zellkohorten (Fong et al. 2008, Hough et al. 2006, Hyslop et al. 2005).

1.4.3 Entwicklungsspezifische Marker

Differenzierte Gliomzellen unterscheiden sich von stammzellähnlichen, clusterbildenden Zellpopulationen *in vitro* über ein flächiges, allseitiges Wachstum mit der Expression spezifischer Moleküle. Im Folgenden seien ausgewählte etablierte Marker, die im Rahmen dieser Untersuchung von besonderer Bedeutung sind, herausgegriffen.

1.4.3.1 Oberflächenrezeptor Notch-1

Notch (engl. Kerbe) wurde bereits 1917 von T. Morgan anhand von Flügelveränderungen von *Drosophila melanogaster* in Kreuzungsexperimenten beschrieben (Morgan 1917). Notch ist ein Transmembranrezeptor zur Zell-Zell-Kommunikation, bestehend aus je einer unterschiedlichen extra - und intrazellulären Polypeptidkette. Vier Notch-Rezeptoren (*Notch1-4*) sind im Säugetier bekannt, wobei diesen fünf korrespondierenden Liganden (*Delta-like 1/3/4* und *Jagged1/2*) gegenüberstehen. Der Notch-Signalweg steuert über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden das Zellschicksal, tritt während der Embryonalentwicklung durch laterale Hemmungen hervor und reguliert im adulten Organismus insbesondere Proliferation sowie Differenzierung (Teodorczyk und Schmidt 2014).

In Gliomen sind der Notch-Komplex und insbesondere Notch-1 als Onkogen überexprimiert (Teodorczyk und Schmidt 2014). Hierbei bewirkt die Herunterregulation von Notch-1 Apoptose und Proliferationsstopp in Gliomzellkulturen (Purow et al. 2005). Notch-1 fördert ebenso Invasion und Migration in kommerziellen Gliomzelllinien (Zhang et al. 2012).

1.4.3.2 Die Intermediärfilamente Nestin, GFAP und Vimentin

Ein weiterer Vorläufermarker ist das Typ IV Intermediärfilament Nestin, welches physiologisch in der 6. bis 40. Schwangerschaftswoche im Zusammenhang mit neuronalen Migrationsbewegungen steht (Tohyama et al. 1992). Nestin wird im Adulten von den Zellen in Stammzellnischen, wie der subventrikulären Zone, exprimiert und ist unter Regenerationsereignissen hochreguliert (Lendahl et al. 1990). Im gleichen Sinne wurde eine verstärkte Nestin-Expression in Neoplasien, wie dem malignen Melanom, dem Rhabdomyosarkom, gastrointestinalen Stromatumoren und schließlich auch in Gliomen, lokalisiert (Yang et al. 2008, Dahlstrand et al. 1992).

Nestin ist ebenfalls ein Marker für die Invasivität und Migration (Ishiwata et al. 2011) und gilt obendrein als prognostischer Faktor in Gliomen (Strojnik et al. 2007).

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Bestandteil der Intermediärfilamente in Astrozyten. GFAP gilt als verlässlicher Marker, welcher gliale von epithelialen und mesenchymalen Neoplasien trennt (McComb und Burger 1985).

Vimentin, ein Intermediärfilament vom Typ III, ist ein mesenchymaler Zellmarker. Es findet sich in vielen differenzierten und undifferenzierten humanen Zellen, so beispielsweise in unreifen Astrozyten und auch ubiquitär in Gliomen (Yang et al. 1994).

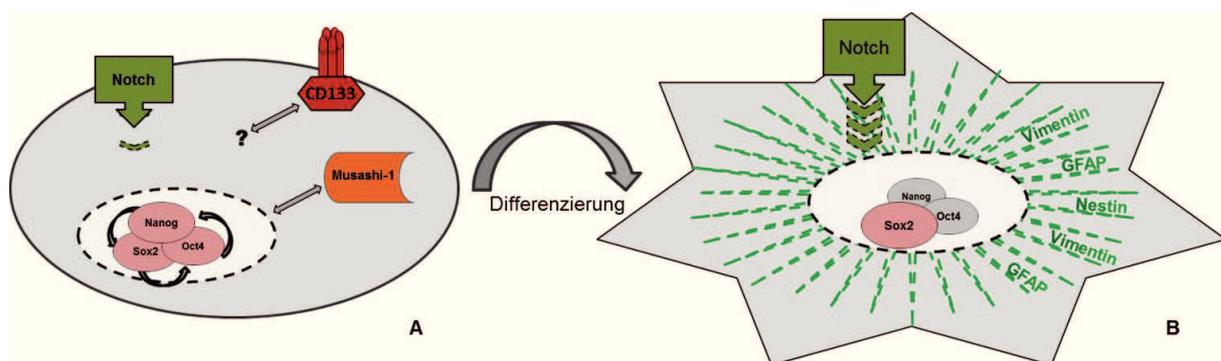


Abb. 4: Ausgewählte Entwicklungsmarker mit deren schematischer Positionierung auf unterschiedlichen zellulären Ebenen

Die Expression von Markern auf Transkriptions-, Translations- und auf Ebene der Zellmembran unterscheiden [A] undifferenzierte stammzellähnliche Tumorzellen und [B] differenzierte, adhärente Gliomzellen mit flächigem Auswachsen und entsprechender Expression von Intermediärfilamenten (Abbildung angelehnt an Calloni et al. 2013, Dahlrot et al. 2013a, Germano und Binello 2014).

1.5 Sphärenkulturen und deren Assays

Die Entwicklung weitergehender, personalisierender Therapien erfordert zuverlässige In-vitro-Modelle als Werkzeug für Substanztests und Kulturverhalten vor der Anwendung in Xenograftmodellen. Ein allgemein akzeptiertes System zur Erforschung von tumorinduzierenden oder -erhaltenden Kulturen, u.a. von Glioblastom- bzw. hochgradigen Gliomkulturen, ist das Sphärenmodell.

Ihm werden stammzellcharakterisierende Eigenschaften zugesprochen (Singh et al. 2003). Demnach besitzen diverse Organsysteme spezifische Zellen zur Regeneration ihrer Gewebe, ansässig in physiologischen Stammzellnischen, die sich in vitro in kugelförmigen Zellhaufen, den Sphären, akkumulieren und mit Stammzellfaktoren assoziiert werden (Pastrana et al. 2011). Sphärenkulturen kommen aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur dem In-vivo-Milieu von physiologischen neuronalen

Vorläufer- oder Stammzellen näher (Lu et al. 2012) und erfüllen genauso in Tumorzellkulturen komplexe heterogene Funktionen analoger Zellverbände (Dalerba et al. 2007). Tumorsphären-Assays gelten außerdem als Methode, neben einer durchflusszytometrischen Zellseparation, zur Identifikation von stammzellähnlichen Subpopulationen in Gliomkulturen (Fang et al. 2005, Singh et al. 2003). Ebenso ist man mit ihrer Unterstützung in der Lage, Schlüsselmerkmale, wie Langzeitüberleben und typische Ausdifferenzierung der In-vivo-Tumore, rückblickend zu reproduzieren (Dalerba et al. 2007).

Desgleichen können Änderungen der Kulturbedingungen, beispielsweise durch die Verwendung von serumfreiem Kulturmedium mit weiteren Wachstumsfaktoren, phänotypische Veränderungen der Zellkulturen von einer adhären, zweidimensionalen Kultur hin zu einer dreidimensionalen Sphärenkultur hervorbringen (Abb. 5).

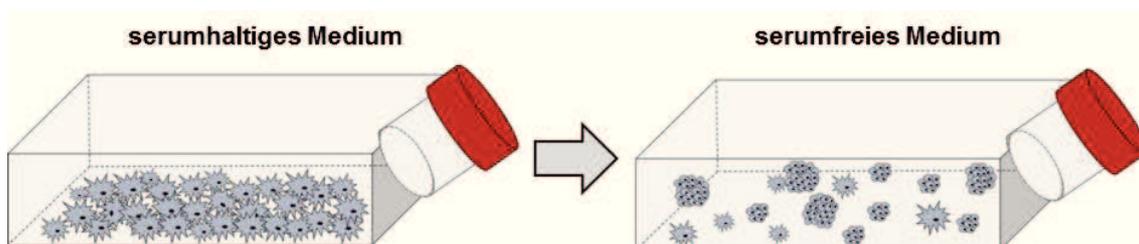


Abb. 5: Schema der Sphäreninduktion durch Nährmediumwechsel

Vorwiegend mit kommerziellen Zelllinien ist dies im Rahmen der Erforschung von stammzellassoziierten Faktoren durchgeführt worden. Aufgrund dieser Eigenschaften gelten sie für pharmakologische In-vitro-Studien als Basiswerkzeug (Rappa et al. 2008).

Dennoch scheinen primäre Glioblastomzellkulturen, erzeugt in spezifischem, serumfreiem Nährmedium, im Genotyp und bezüglich physiologischer Stammzeleigenschaften gegenüber etablierten kommerziellen Gliomzelllinien überlegen (Lee et al. 2006). Dabei wird klar, dass das Attribut *Sphärenbildung* wohl allein nicht ausreicht, um stammzellähnliche Populationen zu definieren.

So herrscht Konsens, dass Subpopulationen von Zellen mit Stammzeleigenschaften, charakterisiert durch Sphärenbildung in Kombination mit weiteren Faktoren, wie dem populären Oberflächenmarker CD133 als Stammzellmarker, derzeit eine Grundlage bzw. ein Target für die Erarbeitung weiterführender personalisierter

Behandlungskonzepte in der Karzinomtherapie allgemein und insbesondere der Glioblastomtherapie verkörpern (Aaberg-Jessen et al. 2013, Pavon et al. 2014, Germano et al. 2010, Hasselbach et al. 2014). Dessen ungeachtet ist die Sphärogenese im Kontext mit dem CD133-Protein hinsichtlich der Neoplasiepathologie weiterhin nur unzureichend geklärt (Dalerba et al. 2007).

Gleichwohl ist die Entwicklung des In-vitro-Modells zur Generierung von stammzellähnlichen Populationen bei weitem noch nicht abgeschlossen, da der derzeitige Goldstandard für „stammzellähnliche Zellen“ im zweiten Schritt immer noch den Nachweis im In-vivo-Modell fordert (Houghton et al. 2007).

2 Problemstellung und Ziele der Arbeit

In den letzten Jahren wurde CD133 als potentieller Stammzellmarker in unterschiedlichen Studien in Frage gestellt. So zeigten CD133-negative Zellkulturen ebenfalls stammzellassoziierte Merkmale in vitro und waren in vivo ebenso tumorigen (Joo et al. 2008, Ogden et al. 2008, Chen et al. 2010). Weiterführende Analysen verbanden CD133 eher mit der Neoangiogenese des Tumors (Wang et al. 2008a, Germano und Binello 2014).

Vor diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit das stammzellassoziierte Merkmal *Sphärenbildung* im In-vitro-Modell in Bezug zu ausgesuchten etablierten Entwicklungsmarkern sowie weiteren charakteristischen physiologischen und morphologischen Eigenschaften analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, zum einen ein stabiles Sphärenkultursystem in vitro aus humanen, hochgradigen Gliomen mittels eines beschriebenen Protokolls zu erzeugen und dessen Stammzellpotential in Vergleich zu herkömmlichen Kulturen zu beurteilen. Zum anderen sollen im Anschluss geeignete Marker validiert werden, mit welchen die Stammzeleigenschaften der Kulturen verdeutlicht werden können.

Folgende Fragestellungen ergeben sich hieraus:

- I. Gibt es phänotypische Unterschiede zwischen isolierten Tumorsphärenkulturen und sphäreninduzierten Vergleichskulturen?
- II. Sind die ausgewählten Marker auf mRNA- und Proteinebene in isolierten Tumorsphären und in den Vergleichsgruppen, den kommerziellen Zelllinien, den sphäreninduzierten primären Gliomkulturen und den differenzierten Primärkulturen vorhanden und für die jeweilige Untersuchungsgruppe spezifisch?
- III. Welche Veränderungen dieser ausgewählten Stammzellmarker stellen sich unter induzierten phänotypischen Veränderungen anhand der Vergleichsgruppen dar?
- IV. Treten die einzelnen genannten Marker oder Expressionsmuster als spezifisches Merkmal für stammzellähnliche Tumorsphären hervor?

3 Methodik

3.1 Material und Geräte

Tab. 1: Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|--|---|
| <i>2-Methylbutan</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Accutase</i> | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| <i>BSA Albumin Fraction V</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>B27 Supplement</i> | Invitrogen/ Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| <i>Borsäure >99 %</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Collagenase (Clostridium histolyt.)</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Complete Mini Protease Inhibitor</i> | Roche, Mannheim |
| <i>Coomassie Brilliantblau G250</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>D(+)-Saccharose</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>DAPI Vectashield Hoechst H33258</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>D-Glucose</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Di-Natriumhydrogenphosphat</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x)+ Glucose + L-Glut-Pyruvate</i> | GIBCO Invitrogen, Darmstadt |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-12</i> | GIBCO Invitrogen, Darmstadt |
| <i>Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)</i> | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| <i>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Epidermal Growth Factor human (EGF)</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Essigsäure</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| <i>Ethanol</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Fibroblast Growth Factor-Basic human (bFGF)</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Fetales Rinderserum (FBS)</i> | GIBCO invitrogen, Darmstadt |
| <i>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</i> | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| <i>Hepes Solution 1M, 20ml</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Hyaluronidase bovine 750-3000 units/mg</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Kaliumchlorid</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Kaliumhydrogenphosphat</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>MACS NeuroBrew-21 w/o Vitamin A</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| <i>MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Natriumacetat</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Natriumchlorid (NaCl)</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Natriumdihydrogenphosphat</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Natriumhydroxid</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Natronlauge</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Paraformaldehyd</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Phosphate buffered Saline (PBS) 1x</i> | Gibco Thermofischer, Darmstadt |
| <i>Penicillin/ Streptomycin</i> | GIBCO invitrogen, Darmstadt |
| <i>Pronase E</i> | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| <i>Protease E</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |

| | |
|---|---|
| <i>Salzsäure (HCl) 37%</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Tris- HCl</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Triton X-100</i> | PAA Laboratories, Cölbe Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Trypanblau Lösung 0,4 %</i> | Sigma Aldrich GmbH, Steinheim |
| <i>Trypsin-EDTA</i> | GIBCO invitrogen, Darmstadt |
| <i>Wasser, nukleasefrei</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

Tab. 2: Hergestellte Lösungen

| Hergestellte Lösungen | Herstellung |
|-------------------------------------|--|
| <i>0,25% PBS-T</i> | 250µl Triton® X-100, 99ml PBS |
| <i>4%ige Paraformaldehyd-Lösung</i> | 10g Paraformaldehyd, 112,5ml A. dest. (auf 70°C erhitzen), 30µl 10M Natronlauge, 125ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 |
| <i>Agarosegel 1,5% (RNA)</i> | 1,5g Agarose, 86ml Aqua bidest, 10ml 10x MOPS, 3ml 3% Formaldehyd |
| <i>Dissoziationsmedium</i> | 6,7mg Trypsin, 3,5mg Hyaluronidase, 5ml Lösung 1 |
| <i>DMEM-10% FBS</i> | 450 ml DMEM + 50 ml FBS |
| <i>Enzym-Mix</i> | 250mg Protease E, 200mg Collagenase Typ Iva, 50ml 1xPBS |
| <i>Hoechst-Lösung</i> | 1mg/ml Hoechst Nr. 33258 in Aqua bidest. Auflösen, filtrieren und danach mit PBS auf 2µg/ml verdünnen |
| <i>Lösung 1</i> | 50ml 10xHBSS, 9ml 300mg/ml D-Glukose, 7,5ml 1M HEPES, 433,5ml Aqua bidest, 10M NaOH pH bei 7,5 einstellen |
| <i>Lösung 2</i> | 25ml 10xHBSS, 154g Saccharose, 4575ml Aqua bidest, 10M NaOH ph bei 7,5 einstellen |

| | |
|--|--|
| <i>Lösung 3</i> | 490ml 1xEBSS, 20g BSA, 10ml 1M HEPES, 10M NaOH pH bei 7,5 einstellen |
| <i>Natriumphosphatpuffer</i> | 28,4g Di-Natriumhydrogenphosphat, 24g Natrium-dihydrogenphosphat, bis auf 1l A. bidest pH (7,4) |
| <i>Phosphate buffered Saline (PBS) 10x</i> | 80g Natriumchlorid, 2g Kaliumchlorid, 14,4g Dinatriumhydrogenphosphat, 2,4g Kaliumdihydrogenphosphat, 1900ml Aqua bidest |
| <i>Primärantikörper-Lösung</i> | xµl Antikörper nach Verdünnung add 500µl Carrageena |
| <i>Sekundärantikörper-Lösung</i> | 499µl Carageena, 1µl fluoreszenzmarkierter Antikörper (1:200) |
| <i>Tris-EDTA-Puffer pH 9,0</i> | 10mM Tris, 1mM EDTA, 0,05% Tween, Aqua bidest 1.000,0ml |
| <i>λ-Carrageenan</i> | 2,5g λ-Carrageenan, 0,1g Natriumazid, 1x PBS ad 500,0ml |

Tab. 3: Nährmedien

| Hergestellte Nährmedien | Herstellung |
|--------------------------------|---|
| <i>Differenzierungsmedium</i> | 90% DMEM, 10% FBS, 20µg/ml Ciprofloxacin |
| <i>Sphärenmedium</i> | DMEM F12, 0,8% HEPES Buffer®, 2% B27, 1% Penicillin/Streptomycin, 20ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF |

Tab. 4: Fertigprodukte

| Fertigprodukte | Hersteller |
|---|--|
| <i>DyNAMO Flash SYBRGreen qPCR</i> | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| <i>GoScript™ Reverse Kit</i> | Promega, Madison, USA |
| <i>Quiazol® Lysis Reagent</i> | Qiagen, Venlo, Niederlande |
| <i>Rneasy® Mini Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>Roche Cell Proliferation Kit I (MTT)</i> | Roche, Mannheim |

| | |
|-------------------|----------------|
| <i>RPE-Puffer</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>RTL-Puffer</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>RWI-Puffer</i> | Qiagen, Hilden |

Tab. 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Gerät | Produktbezeichnung / Hersteller |
|--|---|
| <i>48-Well-Mikrotiterplatte</i> | Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud, Belgien |
| <i>6-Well-Mikrotiterplatte</i> | Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud, Belgien |
| <i>96-Well-Mikrotiterplatte</i> | Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud, Belgien |
| <i>Absaugpumpe</i> | Integra Vacusafe, INTEGRA Biosciences, Fernwald |
| <i>Auflicht-/Videomikroskop</i> | Leica Mikrosysteme, Wetzlar |
| <i>Auslaufpipetten 5, 10ml</i> | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| <i>Durchlichtmikroskop</i> | Axiovert 25, Carl ZeissAG, Oberkochen |
| <i>Einhandzähler</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Einmalspritzen 5, 10ml</i> | Braun, Melsungen |
| <i>Elektrophoresekammer</i> | BioRad Laboratories, München |
| <i>Falcon-Tubes 15, 50ml</i> | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| <i>Filterspitzen 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl</i> | Biozym Scientific, Oldendorf |
| <i>Fluoreszenzmikroskop</i> | Zeiss AxioVision, Oberkochen |
| <i>Gasbrenner</i> | Fireboy Plus, INTEGRA Biosciences, Fernwald |
| <i>Gaskartusche</i> | Butan CV360, CarlRoth, Karlsruhe |
| <i>Geldokumentationsanlage (Syngene G:Box)</i> | VWR International GmbH, Darmstadt, BRD |
| <i>Gewebesieb Cell Strainer</i> | Falcon, Durham, USA |

| | |
|---|---|
| <i>Homogenisator</i> | Kinematica AG, Luzern, CH |
| <i>Inkubator</i> | HERA Cell, Heraeus, Hanau |
| <i>Kryoröhrchen</i> | Nalgene |
| <i>Laser Scanning Mikroskope (LSM) 510 Meta</i> | Carl-Zeiss AG, Jena |
| <i>Magnetrührer</i> | MR 3001, Heidolph, Schwabach |
| <i>Neubauer-Zählkammer</i> | Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen |
| <i>Objektträger Super Frost® Plus</i> | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| <i>Orbitalschüttler Duomax 1030</i> | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach |
| <i>PCR 0,1ml Tube</i> | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf |
| <i>pH-Meter inoLab pH720</i> | Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim |
| <i>Pipetten 0,5, 2, 20, 100, 200, 1000µl</i> | Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt |
| <i>Pipettenspritzen</i> | Hartenstein, Würzburg |
| <i>Poly-D-Lysin coated Glass Cover slips</i> | Sigma Aldrich, Steinheim |
| <i>Präzisionswaage</i> | CP323S - OCE, Sartorius, Göttingen |
| <i>RotorGene-Q</i> | Qiagen N.V., Hilden |
| <i>Skalpell Gr.22</i> | Dahlhausen, Halberstadt |
| <i>Spektrophotometer NanoDrop1000</i> | Technologies Inc., Wilmington, USA |
| <i>Sterilfilter Millex GP 0,22µm</i> | Merck Millipore, Darmstadt |
| <i>Sterilwerkbank HERA Safe</i> | Heraeus, Hanau |
| <i>Wasser, nukleasefrei</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| <i>Zentrifuge (groß) Biofuge Primo R</i> | Heraeus, Hanau |
| <i>Zentrifuge (klein) Biofuge fresco</i> | Heraeus, Hanau |

Tab. 6: Primerliste

| Trivialname | Ass. No. | Bezeichnung | Orientierung | Sequenz 5' → 3' | Primerlänge | Produktlänge | Schmelztemperatur in °C |
|------------------|--------------------------------|--|--------------|--------------------------|-------------|--------------|----------------------------|
| NANOG | NM_024865.3 | Homo sapiens Nanog homeobox (NANOG) | s | TGCAGGCAACTCACTTTATCC | 21 | 375 | 57,62 |
| NANOG | | | as | GTTTGCCTTTGGGACTGGTG | 20 | | 60,18 |
| SOX2 | NM_003106.3 | Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2), mRNA | s | ACCGGCGGCAACCAGAAGAACAG | 23 | 255 | 71,23 |
| SOX2 | | | as | GCGCCGCGGCCGGTATTTAT | 20 | | 70,68 |
| OCT4 | NM_002701.5 | Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1) | s | AGCAGATCAGCCACATCGCC | 20 | 73 | 63,17 |
| OCT4 | | | as | CAGAACCACACTCGGACCAGTC | 22 | | 61,64 |
| MUSASHI-1 | NM_002442.3 | Homo sapiens musashi RNA-binding protein 1 (MSI1), mRNA | s | GCTCAGCCAAAGGAGGTGAT | 20 | 160 | 59,07 |
| MUSASHI-1 | | | as | GGGCGAGGCCTGTATAACTC | 20 | | 58,91 |
| CD133 | NM_001145852.1 | Homo sapiens prominin 1 (PROM1) | s | CTGGGGCTGCTGTTTATTATTCTG | 24 | 337 | 62,48 |
| CD133 | | | as | ACGCCTTGTCTTGGTAGTGTTG | 23 | | 63,16 |
| GFAP | NM_002055.4 | Homo sapiens glial fibrillary acidic protein (GFAP) | s | ACATCGTGGTGAAGACCGTG | 20 | 142 | 58,57 |
| GFAP | | | as | CTATCCTGCTTCTGCTCGGG | 20 | | 59,96 |
| NESTIN | NM_006617.1 | Homo sapiens nestin (NES) | s | GTAGCTCCCAGAGAGGGGAA | 20 | 206 | 58,23 |
| NESTIN | | | as | CTCTAGAGGGCCAGGGACTT | 20 | | 57,55 |
| NOTCH1 | NM_017617.3 | Homo sapiens notch 1 (NOTCH1) | s | ACCAATACAACCCTCTGCGG | 20 | 141 | 59,83 |
| NOTCH1 | | | as | GGCCCTGGTAGCTCATCATC | 20 | | 59,29 |
| KI67 | NM_002417.4 | Homo sapiens marker of proliferation Ki-67 (MKI67) | s | GAAGGCTTTCAAGGCTGGTGA | 20 | 258 | 60,11 |
| KI67 | | | as | TTTCTCAGGCTTGTGAGGG | 20 | | 60,31 |

Tab. 7: Antikörper der Immunfluoreszenz

| Antikörper | Lokalisation | Verdünnung | Spezies | Hersteller |
|----------------------------------|----------------------|------------|-----------|--|
| CD133 | membranständig | 1:100 | Kaninchen | MyBioSource, San Diego/ CA, USA |
| GFAP | Intermediärfilamente | 1:250 | Maus | Merck Millipore, Darmstadt |
| Iba1 | zytoplasmaständig | 1:1500 | Kaninchen | Wako, Richmond, USA |
| Ki67 | kernständig | 1:250 | Kaninchen | Santa Cruz, Dallas/Texas, USA |
| Nestin | Intermediärfilamente | 1:100 | Maus | Abcam, Cambridge, UK |
| Sox2 | kernständig | 1:50 | Maus | Cell Signaling, Danvers, USA |
| Vimentin | Intermediärfilamente | 1:100 | Maus | Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark |
| Goat-anti-rabbit-IgG-Rhod | Sekundärantikörper | 1:200 | / | Jackson ImmunoResearch Laboratoris inc., West Grove, USA |
| Goat-anti-mouse-IgG-FITC | Sekundärantikörper | 1:200 | / | Sigma, Saint Louis, USA |

3.2 Methodik der Tumorzellkultivierung

Das verwendete Tumormaterial wurde im Rahmen der Operation entnommen. Die betroffenen Patienten stimmten der Materialentnahme zu, wobei ein entsprechendes Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena vorlag (AZ/ NR.: 3253-10/11).

Als Vergleichsmaterial wurden folgende kommerziell erworbene Gliomzelllinien verwendet: A172 (Bigner et al. 1981), U87 (Beckman et al. 1971), U373 (Ponten und Macintyre 1968, Ishii et al. 1999) und LN229 (de Tribolet et al. 1979).

3.2.1 Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien A172, U87, U373 und LN229 wurden im Differenzierungsmedium ausgesät und bei 37°Celsius unter 5%iger CO₂-Athmosphäre inkubiert. Im zwei- bis dreitägigen Rhythmus fanden Kontrollen unter dem Auflichtmikroskop mit zugehörigem Nährmediumwechsel statt. Die Passagierung der Kulturen erfolgte bei einer Konfluenz der Monolayerkulturen von mehr als 80%. Dabei wurde das vorhandene Nährmedium abgesaugt, mit 5ml PBS gespült und die Zellen unter dreiminütiger Inkubation bei 37°C mit 2ml Trypsin abgelöst. Der Erfolg wurde im

Hellfeld geprüft und anschließend die Zellsuspension im gewünschten Splittverhältnis erneut ausgesät.

3.2.2 Herstellung adhärenter Primärzellkultur

Die untersuchten Primärkulturen konnten durch folgendes Prozedere, modifiziert nach Yuan et al. (Yuan et al. 2004), gewonnen werden und lagen kryokonserviert vor:

Die frisch entnommenen Resektate wurden zerkleinert. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau durch 5ml *Enzym-Mix* (Tab. 2) für 60 Minuten bei 37°C. Diese Suspension wurde bei 1500rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand konnte abgenommen und das Pellet im Differenzierungsmedium ausgesät werden. Am Folgetag wurde das Medium ausgetauscht, um Zell-, Erythrozyten- und Bindegewebstrümmer abzutrennen. Die Passagierung erfolgte in der Regel nach zwei bis drei Tagen oder bei einer Konfluenz von mehr als 80%. Bis zur siebten oder achten Passage konnte eine primäre Zellkultur angenommen werden.

3.2.3 Herstellung von Zellkulturen mittels Stammzellisoliationsprotokoll

Dieses Isolationsprotokoll zur Gewinnung von Gliomzellkulturen mit erhöhtem Stammzellpotential ist modifiziert nach Azari et al. und Lee et al. (Lee et al. 2006, Azari et al. 2011).

Die Aufarbeitung der Probe erfolgte binnen 24 Stunden nach Resektion unter sterilen Bedingungen. Das Tumorpräparat wurde hierbei makroskopisch von Koageln und nekrotischem Gewebe mechanisch befreit und zerkleinert. Es folgte die Aufnahme in ein spezielles *Dissoziationsmedium* (Tab. 2) zur Inkubation unter 5% CO₂ bei 37°C im Wärmeschrank für zweimal 15 Minuten mit zwischenzeitlicher mechanischer Zerkleinerung des Tumorgewebes. Danach wurde die enzymatische Andauung der extrazellulären Matrix mit *Lösung 3* inaktiviert, wiederholt pipettierend dissoziiert und die Zellsuspension durch einen 100µm-Filter passiv geseiht, um gröbere Gewebereste abzutrennen, und bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Anschließend konnte das Pellet mit einer Volumeneinheit in *Lösung 2* resuspendiert und bei 2.000rpm für 10 Minuten zentrifugiert werden. Im folgenden Schritt wurde die Zellvereinzlung des Pellets in 12ml *Lösung 3* unter Zuhilfenahme der Zentrifugation mit 1.500rpm für sieben Minuten weiter fortgeführt. Abschließend erfolgten die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer und die Aufnahme der Tumorzellen in das Sphärenmedium.

3.2.4 Versuchsaufbau

Die Grundlage zur Erzeugung von Sphärenkulturen stellte der Wechsel der jeweiligen Zellkulturen in ein serumfreies Nährmedium dar.

Adhärente, sprich ausdifferenzierte Zellkulturen wurden zur Anzucht oder dauerhaft in DMEM mit 10%igem fetalen bovines Serum kultiviert (*Differenzierungsmedium*).

Die isolierten Tumorzellkulturen und Sphärenkulturen wurden hingegen im serumfreien Zellmedium DMEM F12 mit den Wachstumsfaktoren bFGF und EGF (je 20ng/ml) - als *Sphärenmedium* - modifiziert nach Lee - 2006 (Lee et al. 2006) gehalten und unter Stickstoffbegasung inkubiert.

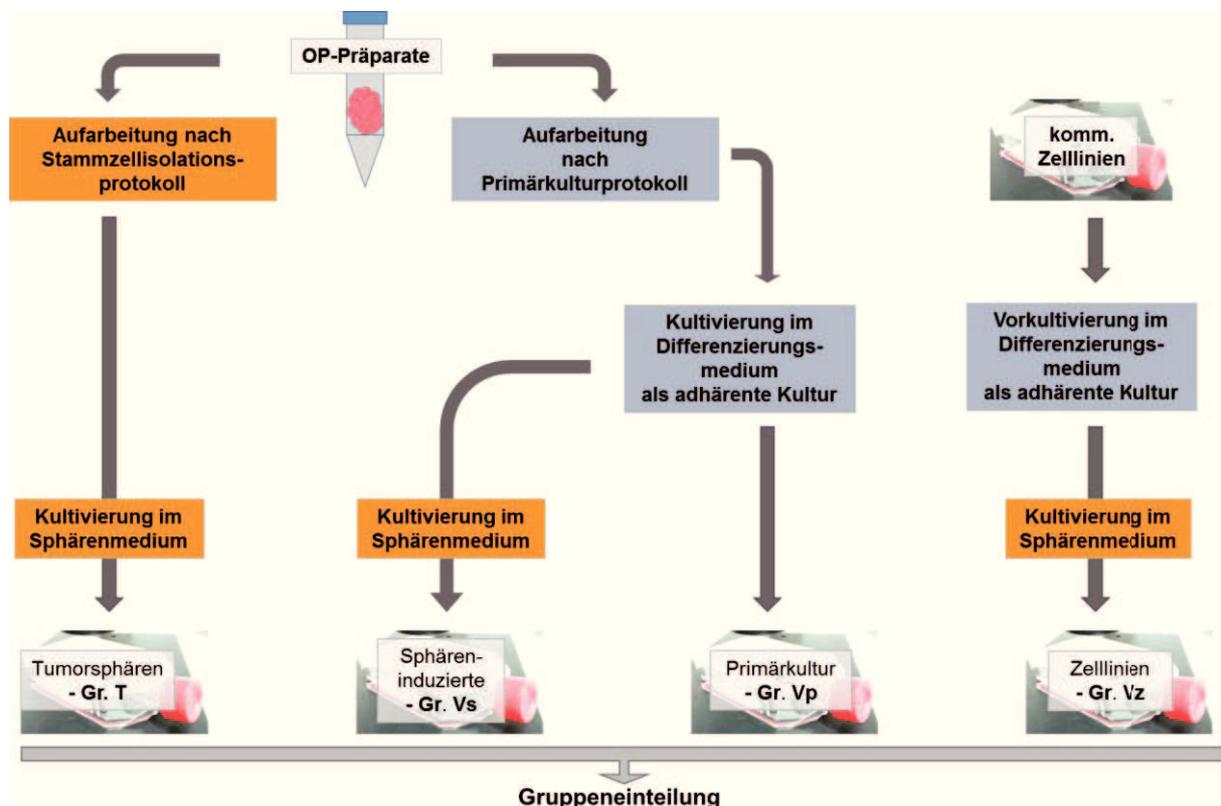


Abb. 6: Versuchsaufbau

Die Einteilung der Versuchsansätze erfolgte in vier Gruppen. Drei Gruppen wurden in serumfreiem *Sphärenmedium* inkubiert, um damit eine Sphärenbildung zu stimulieren:

1. Nach dem Stammzellisoliationsprotokoll erzeugte Zellkulturen aus intraoperativem Tumorfrischgewebe (*Tumorsphären, Gruppe T*),
2. Sphärenkulturen aus adhärenenten Primärkulturen (*Sphäreninduzierte Kulturen, Gruppe Vs*) und

3. die kommerziellen Zelllinien (*Zelllinien, Gruppe V_Z*).

Die vierte Gruppe entsprach den durchgehend im *Differenzierungsmedium* kultivierten adhärennten *Primärkulturen* als Gruppe V_P (Abb. 6).

3.2.5 Kultivierung und Beurteilung der Zellkulturen

Generell wurden alle Zellkulturen unter 95% Luftfeuchte, 5% CO₂ und bei 37°C bei 100.000 Zellen/ml je Nährmedium im Wärmeschrank kultiviert.

Der Kulturüberstand wurde in ein 15ml-Gefäß überführt und bei 1.000rpm für fünf Minuten zentrifugiert, um anschließend das überständige Medium als konditioniertes Medium steril zu filtrieren. Das Pellet konnte hiernach mit frischem Sphärenmedium zuzüglich dem konditionierten Medium im Verhältnis 1:3 resuspendiert und inkubiert werden.

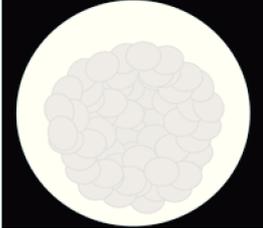
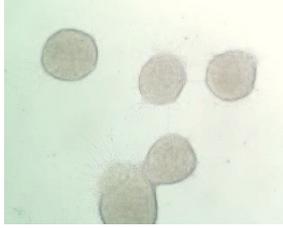
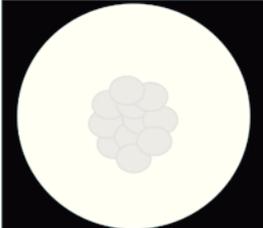
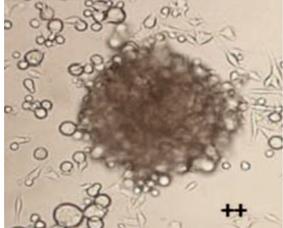
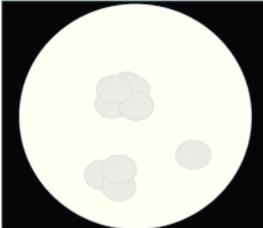
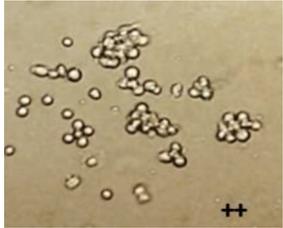
Das Passagieren begann analog nach sieben bis neun Tagen bzw. einem Score von 3 (siehe Tab. 8). Nach der Zentrifugation bei 1.000rpm für fünf Minuten erhielt das entstandene Pellet 0,5VE Accutase und wurde für drei Minuten inkubiert, um weitergehend bei adhärennten Kulturen im ca. zehnmaligen Wechselfluss in einer 10ml-Pipette behutsam eine Einzelzellsuspension zu erzeugen. Die anschließende zweiminütige Inkubation schloss mit siebenminütiger Zentrifugation bei 1.500rpm ab. Der Überstand wurde durch 1ml Sphärenmedium ersetzt, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend im entsprechenden Verhältnis mit Sphärenmedium versetzt.

Verfahren zur Objektivierung der Sphärogenese sind allgemein beschrieben. Als handhabbares Hilfsmittel zur Beurteilung der Zellkulturen wurde hier auf folgendes Bewertungssystem, modifiziert nach Johnson et al. (Johnson et al. 2013), unter Verwendung des Auflichtmikroskops, zurückgegriffen (siehe Tab. 8).

Grad 1 beschrieb vitale mehrzellige Zellformationen mit beginnender, sich abrundender Gesamtstruktur, *Grad 2* deutliche, runde Sphären, *Grad 3* große bis makroskopisch sichtbare Sphären (Tab. 8).

Ab einem Grad 2 konnten die Sphärenkulturen für Experimente herangezogen werden. Stabile Sphärenkulturen definierten sich im Vergleich zur Vorkontrolle und in Anzahl gleichbleibend oder zunehmend.

Tab. 8: Beurteilungsschema von Sphärenkulturen
(modifiziert nach Johnson et al. 2013)

| Grad | Beschreibung | Schema | Auflichtmikroskop 25x-Vergrößerung |
|-------------|--|---|--|
| 3 | Mehr als 2-3 Sphären pro eingestelltem Sichtfeld erkennbar; große bis mittelgroße Sphären, wirken proliferativ und vital; Anzahl nicht mehr bestimmbar |  |  |
| 2 | Deutliche Sphären im Sichtfeld, kleine bis mittelgroße, vital; proliferativ im Vergleich zur Vorkontrolle; noch zählbar (bis ca. 20) |  |  |
| 1 | Deutlich freischwimmende Einzelzellen sichtbar oder vereinzelt 2-3 Zellhaufen oder Zellen wirken deutlich vital oder nur vereinzelt granuliert Zellen |  |  |
| 0 | Zellen wirken granuliert oder wenige Einzelzellen oder bereits viel abgestorbenes Material in der Kultur vorhanden | | |

[++] Sichtfeldausschnitt

3.3 Physiologische und morphologische Charakterisierung von Zell- und Sphärenkulturen

Zur Beurteilung der metabolischen und proliferativen Aktivität sowie der morphologischen Charakterisierung der jeweiligen Kulturgruppen sind die folgenden Analysen vorangetrieben worden.

3.3.1 Zellviabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde mittels einer kalorimetrischen Methode, dem MTT-Assay, bestimmt.

Bei diesem Test wird einer Zellpopulation gelöstes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugesetzt, welches über mitochondriale

Dehydrogenasen zu einem nicht wasserlöslichen, farbigen Formazan, unter Abhängigkeit der Koenzyme NADH und NADPH, reduziert wird. Das im Weitergang gelöste Formazan wird photometrisch quantitativ via Absorptionsmessung erfasst (Optische Dichte) und ermöglicht in diesem Zusammenhang eine quantitative Bestimmung der Glykolyserate, welche proportional zur vitalen Zellzahl steht.

Die entsprechenden Zellen wurden nach Protokoll passagiert, ein benötigter Anteil auf eine Konzentration von 100.000 Zellen/ml Sphärenmedium eingestellt und anschließend der Versuch lt. Herstellerangaben (Roche®) durchgeführt. Die Messung erfolgte am Mikrotiterplattenreader bei einer Wellenlänge von 550nm zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 bis 96h nach Aussaat.

In der Auswertung wurden zwei Messergebnisse pro Zeitpunkt gemittelt und von der zu jedem Messzeitpunkt mitgeführten, gemittelten Hintergrundmessung (Blank) subtrahiert.

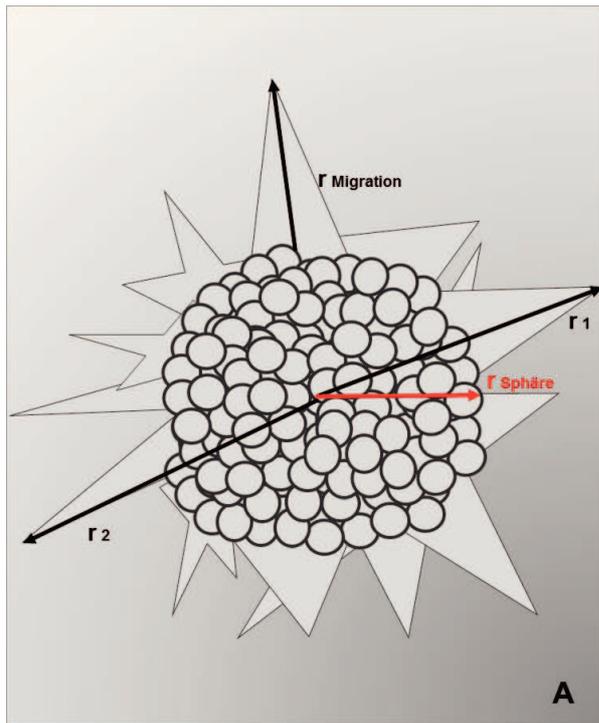
3.3.2 Migrationsanalyse

Zur Beurteilung der Invasivität der einzelnen Kulturen wurden entstandene Sphäroide aus dem Sphärenmedium auf ein Poly-D-Lysin-beschichtetes Deckgläschen im Differenzierungsmedium gesetzt, nach 24h für 20 Minuten mit PFA 4% fixiert und nachrückend zweimal mit PBS gespült.

Die Sphären wurden lichtmikroskopisch aufgesucht, fotografisch digitalisiert und gleichzeitig skaliert. Weiterführende Auswertungen fanden mit dem Programm ImageJ® statt.

Dabei wurden der gemittelte Durchmesser der Ursprungssphäre und die gemittelten fünf weitesten Sphärenausläufer einer Einzelsphäre, ausgehend von einem imaginären Mittelpunkt, gemessen (Abb. 7 [A]). Daraus wurde der gemittelte Gesamtradius errechnet und am Ende der mittlere Migrationsradius hiervon subtrahiert (Abb. 7 [1-3]).

Je Kultur wurden zehn Sphären vermessen und daraus aus den zehn Sphären- und Migrationsradien ein mittlerer Sphären- bzw. Migrationsradius für die jeweilige Sphärenkultur gebildet (Abb 7. [5-6]). Ebenso wurde aus den zehn Einzelratio einer Kultur (Abb 7. [4]) das geometrische Mittel der Migrationsratio gebildet. Daraus ergaben sich absolute Migrationswerte in Abhängigkeit der entsprechenden Sphärengröße sowie gleichzeitig eine Ratio zur relativen Migration der begutachteten Tumorsphärenkulturen.



$$[1] r_{\text{Mittel}} = (r_1 + r_2 + \dots + r_x) \div x$$

$$[2] r_{\text{Sphäre}} [\mu\text{m}] = (d_1 + d_2) \div 2$$

$$[3] r_{\text{Migration}} [\mu\text{m}] = r_{\text{Mittel}} - r_{\text{Sphäre}}$$

$$[4] \text{Ratio}_{\text{Migration}} = \frac{r_{\text{mittelMigration}}}{r_{\text{mittelSphäre}}}$$

Zusammenfassung einer Kultur:

$$[5] r_{\text{MittelMigration}} = \frac{(r_{\text{Migration1}} + r_{\text{Migration2}} + \dots + r_{\text{Migration10}})}{10}$$

$$[6] r_{\text{MittelSphäre}} = \frac{(r_{\text{Sphäre1}} + r_{\text{Sphäre2}} + \dots + r_{\text{Sphäre10}})}{10}$$

Abb. 7: Ermittlung des Migrationsausmaßes

[A] Schema zur Ermittlung der Sphären- und Migrationsradien in $[\mu\text{m}]$, [1-6] Abfolge des Berechnungswegs vom Sphären- und Migrationsradius bis zum Migrationsratio.

Die Mittel der Radien aus Sphären- und Migrationsradius je Vergleichsgruppe wurden ebenfalls gebildet. Diese Werte konnten anschließend statistisch ausgewertet werden.

3.3.3 Morphologische Charakterisierung der Zellkulturen per Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit ausgewählten Markern (siehe Tab. 7) an den adhärennten Zell- bzw. Sphärenkulturen ab Grad 2 durchgeführt.

Aus der betreffenden Kulturflasche wurde je $100\mu\text{l}$ auf ein PDL-beschichtetes Deckgläschen pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation sowie mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen mit je $500\mu\text{l}$ 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 20 Minuten fixiert, folgend zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Färbungsprozedur bei 4°C aufbewahrt.

Nach Entfernen des PBS erfolgte eine dreimalige, je fünfminütige Spülung mit $500\mu\text{l}$ PBS-T pro Deckglas in je einer Multiwell®-Zellkulturplatte. 10%ige FBS-Lösung blockierte mit $300\mu\text{l}$ je Deckglas binnen zehn Minuten unspezifische Bindungen. Die ausgewählten Primärantikörper wurden mit $200\mu\text{l}$ je Deckgläschen entsprechend ihren Verdünnungen für eine Stunde unter Raumtemperatur aufgetragen (siehe Tab. 7). Anschließend konnte wiederholt dreimal für fünf Minuten mit PBS-T gespült und

nachgehend je 200µl fluoreszenzkonjugierter Sekundärantikörper pro *Well* verwendet werden. Die Inkubationszeit war analog zu den Primärantikörpern wählbar. Nach dreimaligem fünfminütigen Spülen mit PBS erfolgte die Kernfärbung mit 300µl Hoechst 33342 pro Deckplättchen für fünf Minuten. Hiernach wiederholte sich der Spülzyklus mit PBS und die Deckgläschen konnten nach letztmaliger Aqua-bidest-Spülung mit Fluoromount™ eingedeckt werden.

Die Lokalisation der Zellverbände gelang mit der an den Nukleinsäuren der DNA bindenden Kernfärbung Hoechst 33342 (bisBenzimid). Diese wird bei 346nm angeregt und im blauen Spektrum detektiert. Die sekundär-bindenden Antikörper tragen am jeweiligen Fc-Teil grün fluoreszierendes Fluoresceinisothiocyanat (FITC, A_{\max} 495nm/ E_{\max} 521nm) und rot fluoreszierendes Rhodamin (Rhod, A_{\max} 570nm/ E_{\max} 590nm). Die so hergestellten Präparate wurden nun bei Raumtemperatur stets abgedunkelt für einen Tag getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert. Zwei Personen werteten sie unabhängig voneinander mikroskopisch aus.

Zur Bestimmung intra- und interzellulärer Lokalisationen bzw. Co-Lokalisationen konnten ausgewählte Untersuchungen an einem Laser-Scanning-Mikroskop (Programm ZEN® 2012) durchgeführt werden.

Zur graphischen Überlagerung von Mehrfachfärbungen wurde das Programm OriginPro 8G® ausgewählt.

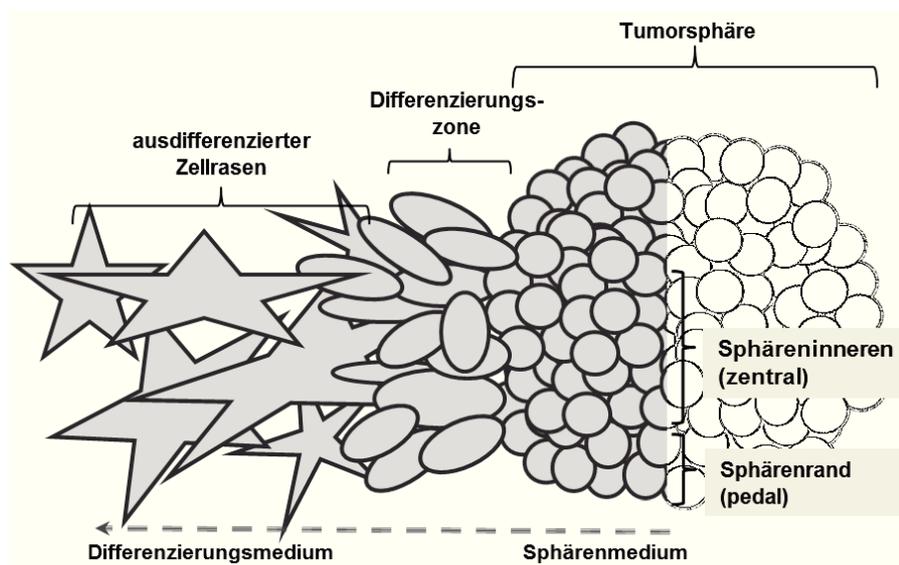


Abb. 8: Beurteilungsschema für ausdifferenzierende Sphärenformationen

Die Beschreibung der Lokalisation positiver Signale im Kultursystem erfolgte anhand eines Beurteilungsschemas, welches die Bereiche Sphäreninneres, -äußeres,

Differenzierungszone und differenzierte Zelle (Zellenrasen) anhand der Hellfeldmorphologie berücksichtigte (Abb. 8).

3.4 Genexpressionsanalyse

Die Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTqPCR) ist ein sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis spezifischer Gentranskripte. Bei dieser Zweischritt-Technik wird die vorliegende mRNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels des Enzyms Reverse Transkriptase umgeschrieben und in einer anschließenden Echtzeit-PCR vervielfältigt.

Durch den Einbau von *SYBR Green* in die doppelsträngigen DNA-Fragmente ist es möglich, die Menge an Nukleinsäuren nach jedem Verdoppelungszyklus mittels Fluoreszenzemissionsmessung zu bestimmen.

3.4.1 RNA-Isolation

Aus den Kulturen wurden 100.000 Zellen gewonnen, zentrifugiert, dazu in 1ml Quiazol® Lysis Reagent aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

Nach schonendem Auftauen der gefrorenen Proben erfolgte mittels modifiziertem *RNeasy*® Mini-Kit lt. Herstellerangaben die RNA-Extraktion. Dabei wurden die Proben mechanisch aufgebrochen, für fünf Minuten inkubiert, mit 200µl Chloroform im Reaktionsgefäß gleichmäßig vermengt und dreiminütig inkubiert. In der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei 12.000rpm bei 4°C wurde die oberste Phase in ein weiteres 1,5ml-Reaktionsgefäß mit einer Volumeneinheit (550µl) 70%igem Ethanol vermengt. Das Gemisch teilte sich in der im Kit enthaltenen Separationssäule in zwei gleiche Portionen auf und konnte unter jeweils 30-sekündiger Zentrifugation gleichermaßen aufgetrennt werden.

Die Aufreinigung wurde mit 700µl *RW1*, gefolgt von 550µl *RPE-Puffer* begonnen, um jeweils im Anschluss bei 30 Sekunden bei 12.000rpm abzuschließen. Hiernach folgte ein erneutes Auftragen des RPE-Puffers mit zweiminütiger Zentrifugation (12.000rpm). Im letzten Schritt wurde die Trocknung mit einem 2ml-Reaktionsgefäß durch einminütige Zentrifugation unter Maximalgeschwindigkeit durchgeführt und mit Zugabe von 50µl RNase-freiem Wasser auf die Reaktionssäule mit einminütiger Zentrifugation abgeschlossen. Die gewonnenen Proben wurden bei -70°C gekühlt zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Spektroskopie (NanoDrop1000®) geprüft.

Die qualitative Kontrolle der isolierten mRNA erfolgte über ein denaturierendes Agarosegel. Zu diesem Zweck wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt, 2µl der jeweiligen RNA-Probe und 8µl Probepuffer zugesetzt und das Gel bei 1,5V/cm in ein elektrisches Feld gesetzt.

Die intakten Proben bildeten im ultravioletten Spektrum ein charakteristisches Bandenmuster der ribosomalen 18S- und 28S- RNA-Untereinheiten, wohingegen degradierte Proben einen unspezifischen Bandenfilm zeigten. Zur weiteren Analyse wurden ausschließlich Proben mit intakter RNA verwendet.

3.4.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von mRNA in komplementäre DNA (cDNA) geschah in zwei Schritten mit Verwendung des *GoScriptTM*-Kits der Firma *Promega*.

Die Präinkubation der zur Aufschmelzung isolierten mRNA erfolgte nach dem Ansatz lt. Tab. 9 [A] für fünf Minuten bei 70°C und kühlte kontrolliert für zwei Minuten bei 4°C ab. Im Anschluss wurden die Komponenten der Hauptinkubation (Tab. 9 [B]) mit dem Präinkubationsmix vermischt und nach folgendem Protokoll inkubiert: fünf Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C, 15 Minuten bei 70°C.

Tab. 9: Inkubationskomponenten der reversen Transkription

[A] Präinkubation, [B] Hauptinkubation

| A | | B | |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Komponente | Volumen je Reaktion [µl] | Komponente | Volumen je Reaktion [µl] |
| 0,5-1 µg total RNA | 9,75 | 5x Reaction Buffer | 4 |
| Olig(dT)15 | 1 | MgCl ₂ (2,5mM) | 2 |
| Random Hexamer | 0,25 | dNTP(0,5mM) | 1 |
| | | RNase Inhibitor (40u/µl) | 0,5 |
| | | RNase-freies Wasser | 0,5 |
| | | Reverse Transkriptase | 1 |

3.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur quantitativen Polymerasekettenreaktion wurden die Proben jeweils auf eine cDNA-Konzentration von 25ng/µl eingestellt und durchweg auf Eis gekühlt. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten verwendet: 10µl *Master Mix*, 2µl

Primer-Mix (10µM *Forward Primer*, 10µM *Reverse Primer*), 6µl RNase-freies Wasser und 2µl Probe (siehe Tab. 6 Primerliste). Eine Negativkontrolle und ein interner Standard wurden mitgeführt.

Die Detektion erfolgte mittels *Rotor-Gene Q*[®]. Die Initialphase der PCR begann mit der Aktivierung der Polymerase bei 95°C für sieben Minuten. Im Anschluss folgten 40 aufeinander ablösende, identische Zyklen: die Auftrennung der DNA-Doppel- in Einzelstränge (Denaturierung) für 10 Sekunden bei 95°C, die Anlagerung der Primer an die freien DNA-Stränge (Annealing) in 20 Sekunden bei 55°C und die DNA-Verlängerung beginnend am 3'Ende (Elongation) der cDNA für 30 Sekunden bei 72°C. Dabei wird der fluoreszierende Farbstoff *SYBR Green* in den Doppelstrang eingebaut und dessen Lichtemission quantitativ vom Gerät erfasst.

Das Ergebnis ist der Schwellenwert *cycle threshold* (Ct). Dieser drückt den Beginn des exponentiellen Wachstums der Replikationskurve aus und lässt somit Rückschlüsse auf die Menge replizierter cDNA und schlussendlich auf die eigentliche vorhandene bzw. eingesetzte mRNA-Menge zu. Je niedriger sich der Ct-Wert darstellt, desto eher beginnt sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund mit steilerem Kurvenanstieg zu exponieren und umso reichlicher ist das eingesetzte Material vorhanden.

3.4.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach *Pfaffl, M. - ΔΔCt-Methode* und ist eine relative Quantifizierung des mRNA-Expressionlevels (Pfaffl 2001).

Die Ct-Werte wurden anhand des stabilen, getesteten Referenzgenes (*Ribosomales Protein L 13A*) zum *delta-Ct-Wert* (ΔCt) angeglichen (Pfaffl et al. 2004) [1]:

$$[1] \Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Housekeepergen}$$

Die einzelnen Proben wurden den jeweiligen Vergleichsgruppen zugeordnet. ΔCt-Werte einzelner Proben selber Marker wurden in den jeweiligen Gruppen gemittelt ($\overline{\Delta Ct}$), im Anschluss der ΔΔCt-Wert an Gruppe T (*Tumorsphäre*) ausgerichtet und die Ratio (R) ermittelt [2-3]:

$$[2] \Delta \Delta Ct_{Gruppe} = \overline{\Delta Ct}_{Gen\ Untersuchungsgruppe} - \overline{\Delta Ct}_{Gen\ Tumorsphäre}$$

$$[3] \text{Ratio}_{\Delta \Delta Ct} = 2^{-\Delta \Delta Ct_{Gruppe}}$$

3.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm *IBM Statistics SPSS 22*. Eine statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena.

Die ermittelten Einzelmesswerte aus den verschiedenen Untersuchungen sind zueinander unverbunden, meist nichtmetrisch, ggf. ohne vorgegebene Normverteilung, die in Rängen als ordinale Werte eingeordnet werden können. Der *Mann-Whitney-U-Test* wertete vergebene Ränge zweier Vergleichsgruppen aus und ermittelt somit spezifische Unterschiede von ihrer zentralen Tendenz der jeweiligen Gruppe bei einem Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ (Weiß 2010).

Zur Erkennung von Korrelationen zwischen den genutzten Faktoren wurde eine Rangkorrelationskoeffizient-Analyse nach *Spearman* durchgeführt, wobei ein parameterfreies Maß für die Signifikanz von $p < 0,05$ für die Zusammenhangswahrscheinlichkeit zwischen zwei ausgewählten Faktoren, oder hier Markern, ermittelt wurde. Dabei schließen Korrelationseffizienten $> 0,5$ eine positive Wechselseitigkeit nicht aus (Weiß 2010).

4 Ergebnisse

Im Zeitraum von 17 Monaten ging die Gesamtanzahl von 51 Proben histologisch gesicherter, hochgradiger Gliome von 47 Patienten in diese Arbeit ein. Die Gesamtkohorte bestand aus 27 Männern und 20 Frauen zwischen 10 bis 91 Jahren, im mittleren Alter von 65 Jahren (Abb. 9).

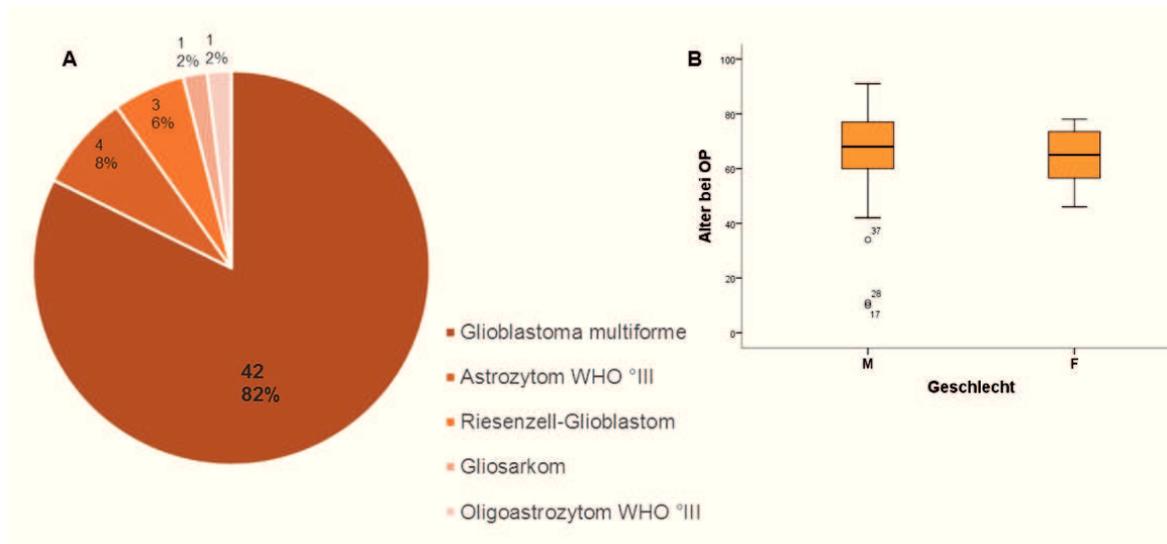


Abb. 9: Überblick zu Histologie und Patientenalter

[A] Histologie aller eingegangener Proben, [B] Geschlechter und Altersspanne im Boxplot

Die Mehrzahl stellten darunter 45 Frischresektate (Probenkürzel T₁ - T₄₅) von 43 Patienten, welche direkt postoperativ nach obigem Stammzellisoliationsprotokoll (siehe Kapitel 3.2.3.) aufgearbeitet und in Zellkulturen überführt werden konnten.

Bei 33 Suspensionen gelang eine erfolgreiche Isolation, wobei in 18 Kulturen eine Sphärenbildung im Auflichtmikroskop nachweisbar war und sich acht Sphärenkulturen dauerhaft kultivieren ließen. Stabile Sphären definierten sich hierzu gegenüber der Vorkontrolle als vitale und im Ausmaß konstante oder weiter proliferierende Sphärenkulturen (Abb. 10).

Diese 18 sphärengenerierenden Kulturen der Gr.T setzten sich aus histologisch gesicherten Glioblastomen (n=16), einem anaplastischen Astrozytom und einem Riesenzellglioblastom zusammen.

Zusätzlich vervollständigten sechs ausdifferenzierte, adhärente Glioblastomkulturen (Probenkürzel V₁ - V₆, davon ein Riesenzellglioblastom) aus der Kryozellkulturbank des experimentellen Labors der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums

Jena die Gesamtprobenanzahl. Deren Bearbeitung erfolgte unter den Bezeichnungen adhärente *Primärkulturen* (Gr.V_P) bzw. *Sphäreninduzierte Kulturen* (Gr.V_S).

Des Weiteren wurden die vier kommerziellen Glioblastomzelllinien (Gr. V_Z) A172, LN229, U87 und U373 einbezogen (siehe *Versuchsaufbau*, Kapitel 3.2.4.).

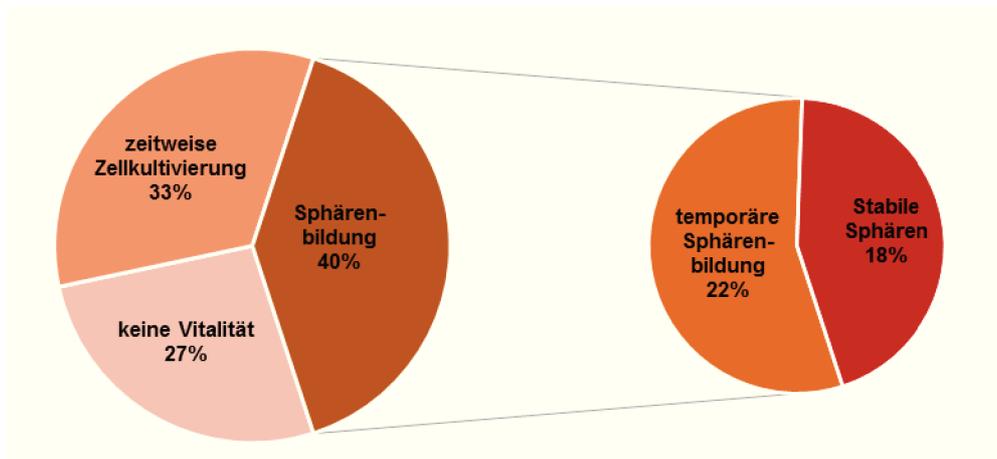


Abb. 10: Kulturausbeute auf Grundlage des Stammzellisoliationsprotokolls (Gr.T)
Dabei fand bei ca. 40% der Isolationen eine Sphärenbildung statt.

4.1 Betrachtung physiologischer Parameter der Vergleichsgruppen

Zu Beginn wurden folgende physiologische Parameter der drei Sphäregruppen betrachtet.

4.1.1 Sphärenbildung

Nach erfolgreicher Isolation konnte bei 18 Kulturen der Gr.T eine Sphärenbildung innerhalb unterschiedlicher Zeiträume und Grade nachgewiesen werden:

Tab. 10: Sphärenbildung Gr.T in [d]

| PROBEN-KÜRZEL | T5 | T8 | T10 ² | T13 | T14 | T15 | T16 | T19 ¹ | T20 | T21 | T27 | T28 | T30 | T31 | T32 | T33 | T34 | T36 | MITTEL |
|---------------|----|----|------------------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| GRAD | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | |
| ZEITRAUM [D] | 10 | 7 | 13 | ? | ? | 4 | 13 | 14 | 37 | 14 | 30 | 9 | 27 | 7 | 1 | ? | 19 | 12 | 14 |

[¹] Riesenzellglioblastom, [²] Astrozytom (Grad III)

16 Kulturen waren Glioblastome, dazu kamen je ein Astrozytom (WHO Grad III) und ein Riesenzellglioblastom. Sichtkontrollen fanden bis Tag sieben täglich, darüber hinaus ein bis zwei täglich statt. Die Sphärogenese trat in Gr.T zwischen einem bis 37

Tagen, im Mittel nach 14 Tagen ein. Dabei erreichte die Hälfte der Kulturen Grad 3 (Tab. 10).

Ein sukzessives Wachstum blieb danach aus. Auch war es nicht möglich, generierte Sphären ab Grad 3 erfolgreich unbeschadet vital zu passagieren.

Tab. 11: Sphärenbildung Gr.V_s in [d]

| PROBEN- KÜRZEL | V1 ¹ | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | MITTEL- WERT |
|-------------------|-----------------|----|----|----|----|----|-----------------|
| GRAD | - | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | |
| ZEITRAUM [D] | | 1 | 1 | 1 | 7 | 4 | 2,8 |

[¹] Riesenzellglioblastom

Tab. 12: Sphärenbildung Gr.V_Z in [d]

| PROBEN- KÜRZEL | U87 | A172 | LN229 | U373 | MITTEL- WERT |
|-------------------|-----|------|-------|------|-----------------|
| GRAD | 2 | 3 | 2 | 2 | |
| ZEITRAUM [D] | 5 | 1 | 1 | 2 | 2,3 |

Die Sphärenformation bei beiden vormals adhärenenten Kulturen Gr.V_s (n=6) und V_Z (n=4) gelang im Sphärenmedium innerhalb von sieben Tagen, im Mittel bei 2,6 Tagen. Bei fünf Kulturen in Gr.V_s und allen Zelllinien in Gr.V_Z fand eine Sphärogenese statt (Tab. 11, 12).

Die unterschiedliche Dauer zur Sphärenbildung von Gr.T gegenüber den zusammengefassten, sphäreninduzierten Vergleichsgruppen V_s und V_Z stellte sich als signifikant ($p=0,012$) dar (Abb. 11), zwischen Gr.V_s und V_Z (2,8 und 2,3 Tagen) war sie dagegen ohne Unterschied ($p= 1,0$).

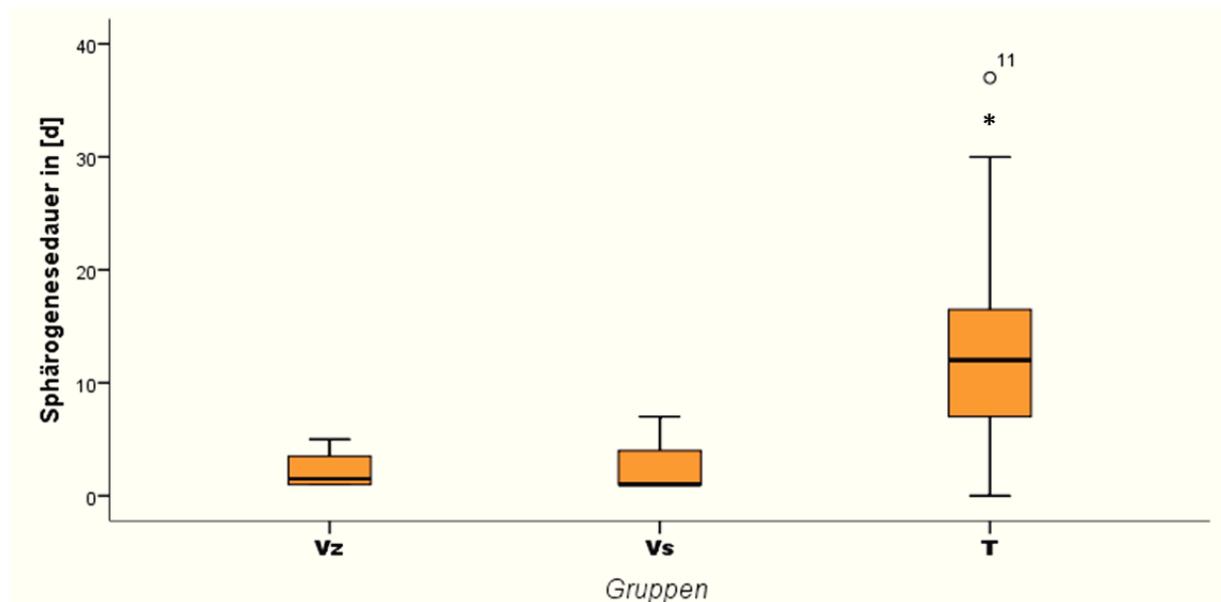


Abb. 11: Dauer der Sphärogenese [d]

Gr.T zeigte im Vergleich eine hohe Spannweite der Sphärenbildungszeit mit einem bis 37 Tagen. Im Mittel benötigte sie 12 Tage länger, um Sphären nach der Isolation zu generieren, [*] signifikant.

4.1.2 MTT-Viabilitätsanalyse

Für die Darstellung der metabolischen Aktivität der unterschiedlichen Ausgangspopulationen wurde zeitnah, in der Regel innerhalb der ersten drei Passagen aus der Isolation oder Kultivierung vor einer Sphärenbildung die Reduktion von 3-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blauem Formazan photometrisch ermittelt (siehe Methodik 3.3.1.). Das Ergebnis ermöglichte quantitative Rückschlüsse auf den Zellumsatz und somit auf die metabolische Aktivität der jeweiligen Zellpopulation zu vier Messpunkten im 24h-Rhythmus im selben Nährmedium (Sphärenmedium). Dabei war hier in allen eingegangenen Proben eine Formazangenerierung durch Violettfröbung des Nährmediums detektierbar.

Gr.V_Z (n=4) und V_S (n=4) zeigten insgesamt hohe Streubreiten der Optischen Dichte (OD) über alle vier Messzeitpunkte von 0,082 bis 0,936 bzw. 0,0865 bis 1,245.

Gruppe V_Z erzielte zum ersten Messzeitpunkt (24h) eine mittlere OD von 0,505, nahm an den folgenden drei Messpunkten um 28% ab und stabilisierte sich zwischen 0,393 und 0,274 (Abb. 12).

In Gr.V_S fiel die OD 24h im Mittel von 0,608 auf 0,427 um 30% und letztendlich nach 96h auf 0,294 um 52% sukzessiv vom ersten Messzeitpunkt ab (Abb. 12).

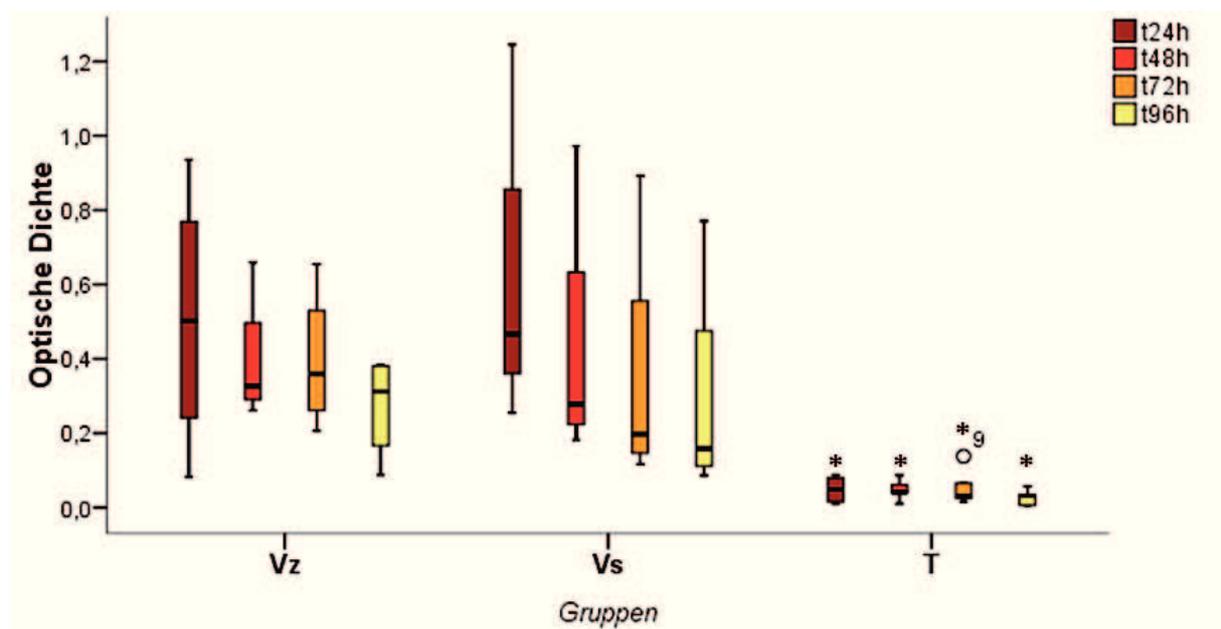


Abb. 12: Zellviabilitätsdarstellung im MTT-Assay

Darstellung der Optischen Dichte (OD) der Gruppen V_Z, V_S und T im Boxplot über die vier Messzeitpunkte von 24 bis 96h, [*] signifikant.

Die Gr.T (n=8) blieb hingegen mit einer mittleren OD um 0,06 bis 0,05 stabil mit enger Streubreite von 0,0065 bis 0,138 und zeigte sich insgesamt gegenüber beiden Vergleichskulturen signifikant um den Faktor 10 konstant reduziert (Abb. 12 und Tab. 13).

In Abb. 12 zeigen sich die Optischen Dichten der Vergleichsgruppen V_z und V_s über alle einzelnen Messpunkte in ihrer metabolischen Aktivität überwiegend vergleichbar und statistisch gegeneinander nicht signifikant unterscheidbar (Tab. 13).

Tab. 13: p-Werte der Vergleichsgruppen der einzelnen MTT-Messzeitpunkte auf Grundlage des Mann-Whitney-U-Test, [*] signifikant bei $p < 0,05$

| <i>p-Werte Gruppen</i> | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> | <i>96h</i> |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>Gr. V_z gegen Gr. V_s</i> | 0,886 | 0,686 | 0,486 | 0,686 |
| <i>Gr. V_s gegen Gr. T</i> | 0,004* | 0,004* | 0,008* | 0,016* |
| <i>Gr. V_z gegen Gr. T</i> | 0,016* | 0,004* | 0,004* | 0,016* |

4.1.3 Migrationsanalyse

Zur Beurteilung des Migrationsverhaltens von stabilen Sphärenformationen wurde die Migrationsstrecke der jeweiligen Kultur ausgehend vom Sphärenrand beim Wechsel in das Differenzierungsmedium nach 24h quantifiziert (siehe Methodik 3.3.2, Abb. 13 [A-C]).

Dabei wurde die Gr.T (n=5) mit V_z (n=4) und V_s (n=3) verglichen (Abb. 13). Beide Gruppen ließen verstärkte intraindividuelle Varianzen des Sphären- und Migrationsradius erkennen. Gr.T besaß zwischen 58 bis 135 μ m, im Mittel mit 90 μ m, tendenziell größere Sphärenradien gegenüber Gr. V_z mit 51 μ m, bei einer Spannweite von 40 bis 68 μ m ($p=0,063$).

In gleicher Richtung verhielten sich die Migrationsradien: Gr.T führte ebenfalls mit 119 bis 251 μ m signifikant gegenüber Gr. V_z mit 51 bis 135 μ m ($p=0,032$), (Abb. 13).

Gr. V_s bildete Sphären mit Größen von 40 bis 114 μ m (gegen Gr.T $p=0,57$) und migrierte 83 bis 132 μ m (gegen Gr.T $p=0,051$), was einen mittleren Sphären- und Migrationsradius von 76 μ m bzw. 98 μ m ergab (Abb. 13).

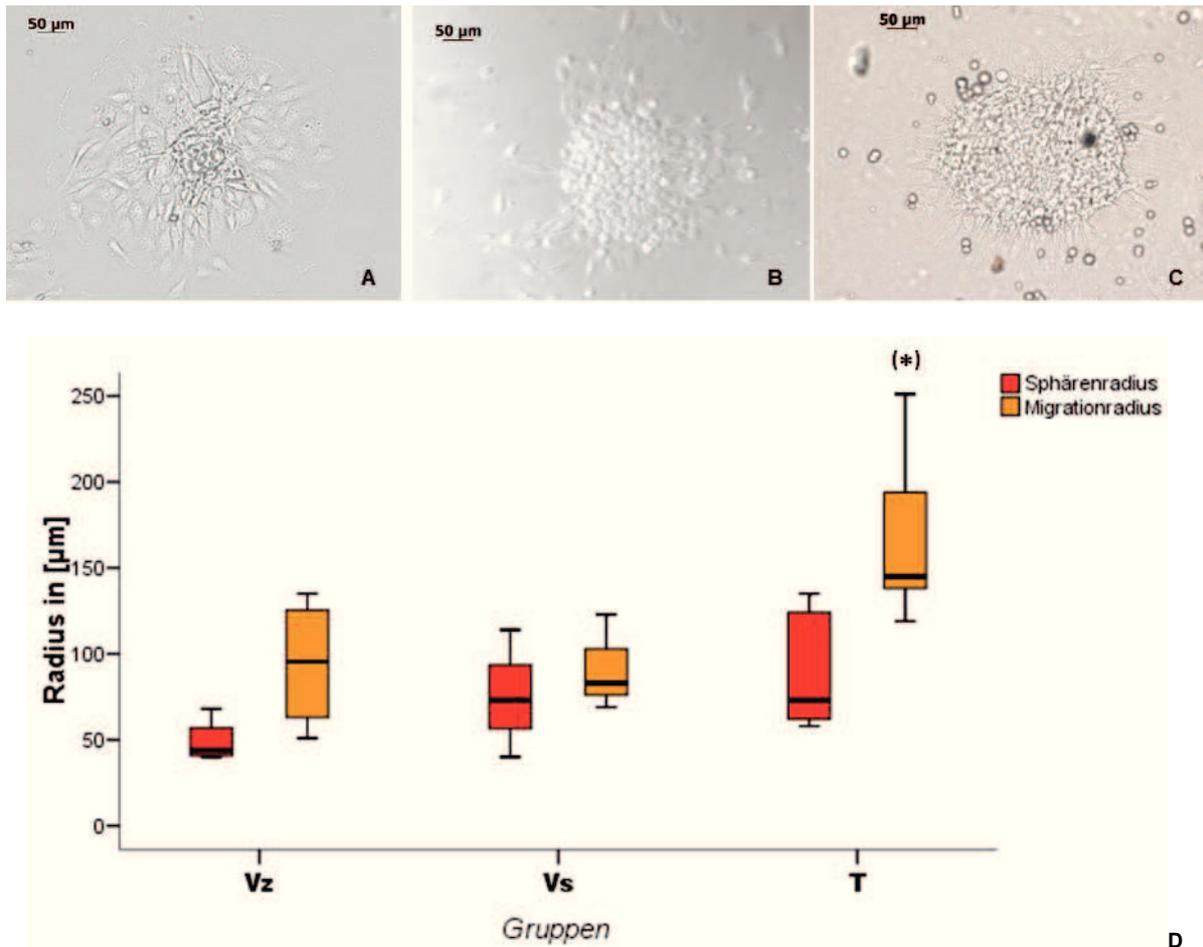


Abb. 13: Migrationsanalyse

Hellfeldaufnahmen zur Migrationsvermessung von [A] Gr.V_z (U373), [B] Gr.V_s (V4) und [C] Gr.T (T19). [D] Boxplotdarstellung von Sphären- und Migrationsradien der jeweiligen Sphärengruppen in µm, [*] signifikant.

Um eine von der Sphärengröße unabhängige Relation der Migrationstrecke zu ermitteln, wurden Migrationsradius und Sphärenradius zur Migrationsratio ins Verhältnis gesetzt und je Kultur im geometrischen Mittel zusammengefasst (Abb. 14). Darunter bildeten sich konkordante Varianzen aus: bei Gr.T 1,17 bis 2,72, bei Gr.V_z zwischen 1,15 bis 2,08 und Gr.V_s 1,13 bis 1,72.

Somit bezeichnete die Migrationsratio von Gr.T mit 2,06 eine erhöhte Migrationsbereitschaft gegenüber Gr.V_z mit 1,65 ($p=0,19$) und Gr.V_s mit 1,34 ($p=0,71$). Für die beiden Vergleichsgruppen (V_z, V_s) ergab sich untereinander kein Unterschied ($p=0,4$), (Abb. 14). Die Vereinigung der sphäreninduzierten Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T belegte einen signifikanten Unterschied der isolierten Tumorsphären bezüglich des Migrationsradius ($p=0,01$) und der Migrationsratio ($p=0,048$).

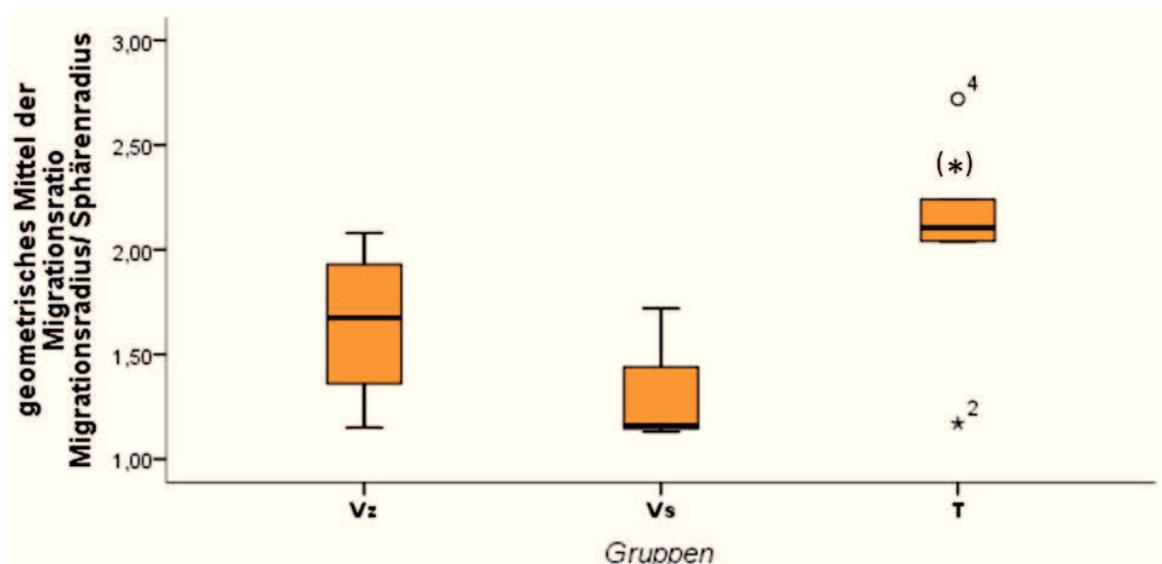


Abb. 14: Migrationsratio

Die Ratio neutralisierte die absoluten Messwerte und setzte den Migrationsradius zum Sphärenradius je Sphäroid ins Verhältnis. Die Einzelratio wurden intern für jede Kultur in einem geometrischen Mittel zusammengefasst, wobei Letztere in die zugehörige Vergleichsgruppe hier als Boxplot integriert wurde. [*] signifikant

4.2 Morphologische Charakterisierung beider In-vitro-Systeme

Zur morphologischen Charakterisierung und Bestätigung des in vitro erzeugten Entwicklungsstadiums der untersuchten Kultursysteme wurden die zu vergleichenden Gruppen zum einen im Sphärenmedium und zum anderen im Differenzierungsmedium kultiviert. Sphärenkulturen der Gr.T wurden dafür ergänzend für 24h im Differenzierungsmedium gehalten, wobei es zur erwarteten phänotypischen Metamorphose in Form einer flächigen Ausdifferenzierung, beginnend an den Sphärenrändern in allen Kulturen, kam.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnten hierzu alle Gruppen auf folgende Antigene immunzytochemisch untersucht werden: CD133, Sox2, GFAP, Nestin und Vimentin sowie Ki67. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle der Marker für aktivierte Mikroglia Iba1 (Ohsawa et al. 2004) mitgeführt.

Zur genaueren visuellen Bezeichnung dreidimensionaler Sphärenformationen geschah für ausgewählte Proben eine Begutachtung anhand einer Laserscanningmikroskopie (LSM).

Grundsätzlich konnten in allen Gruppen, Gr.T (n=5), Gr.V_S bzw. V_P (n=3) und Gr.V_Z (n=4), sowie in beiden Nährmedien die untersuchten Marker nachgewiesen werden.

4.2.1 CD133

Das Oberflächenprotein CD133 wurde in allen Gruppen spezifisch extranukleär exprimiert (Abb. 15 - 18).

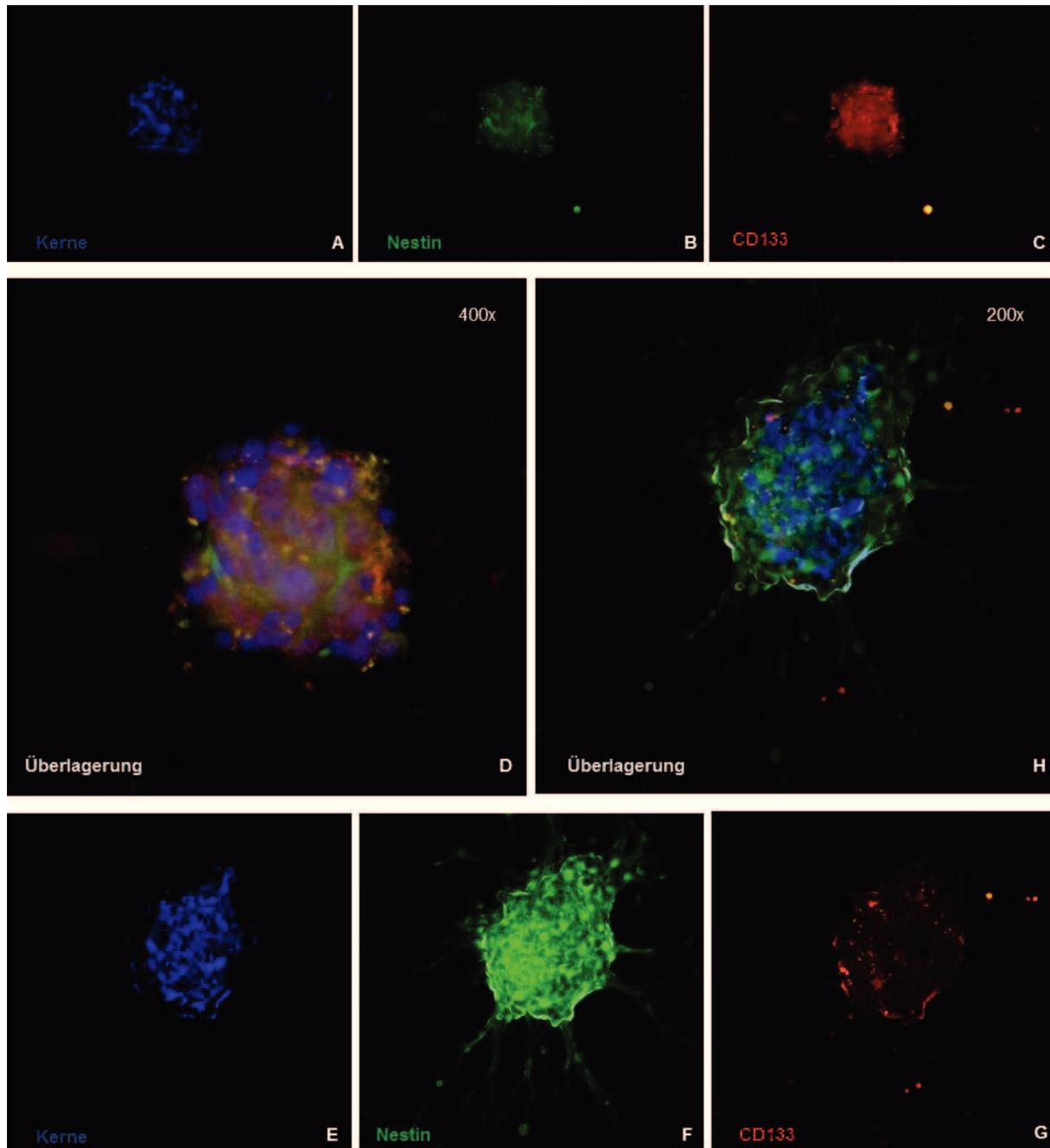


Abb. 15: CD133 und Nestin in Tumorsphären (Gr.T)

Einzelaufnahmen der Mehrfachfärbung mit entsprechender Bildüberlagerung im Sphärenmedium [A-D] T21, [E-H] T19; Nestin (grün) bildete sich vorwiegend sphärenperipher und CD133 (rot) vorwiegend zentral in allen Proben ab (Kerne, blau).

In Gr.T waren alle mit Immunfluoreszenz untersuchten Sphärenkulturen CD133 positiv (Abb.15). Innerhalb der Ausdifferenzierungsphase von 24h im

Differenzierungsmedium von Gr.T verschwand das CD133-Signal bei der Mehrheit der Kulturen, blieb aber in einer Kultur in einzelnen Zellformationen nachweisbar (Abb. 18). Bei einer Kultur in Gr.V_P (n=3) war ebenfalls CD133 in einzelnen Zellclustern zu finden. Im Sphärenmedium, als Gr.V_S, bildete sich in allen Kulturen ein identisches CD133-Signal zu Gr.T (Abb. 16).

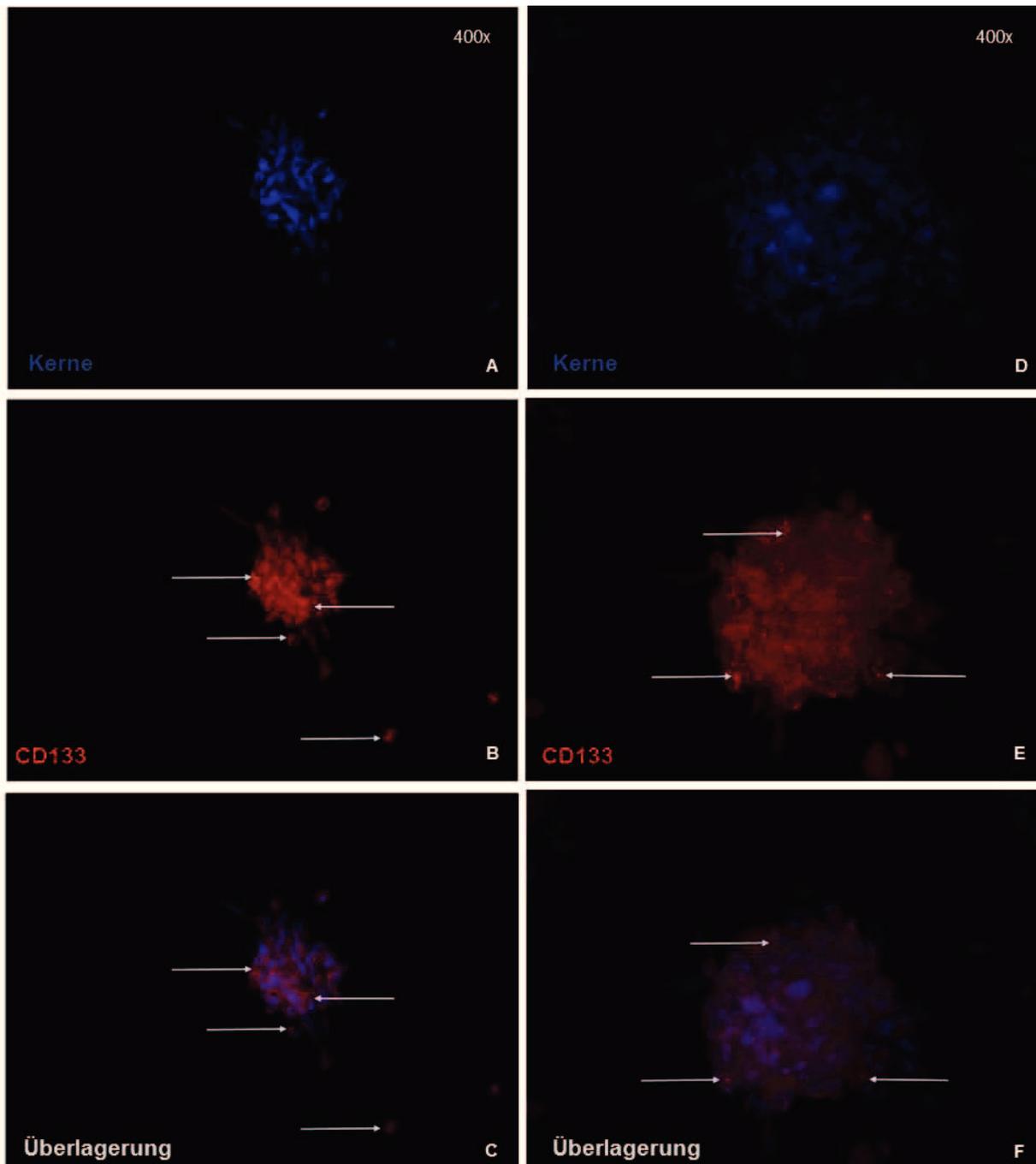


Abb. 16: CD133 in den sphäreninduzierten Kulturen

[A-C] Gr.V_S (V4), [D-F] Gr.V_Z (A172). Ausgewählte CD133-Signale (rot) wurden mit [→] gekennzeichnet (Kerne, blau).

Ebenso wiesen die Zelllinien A172 und U373 (Gr.V_Z) im Sphärenmedium CD133 auf (Abb. 16), wobei in diesen beiden Kulturen im Differenzierungsmedium ebenfalls in einzelnen Zellclustern ein spezifisches Signal zu finden war. LN299 besaß nur eine vereinzelte CD133-Immunfluoreszenz in einzelnen Sphärenformationen.

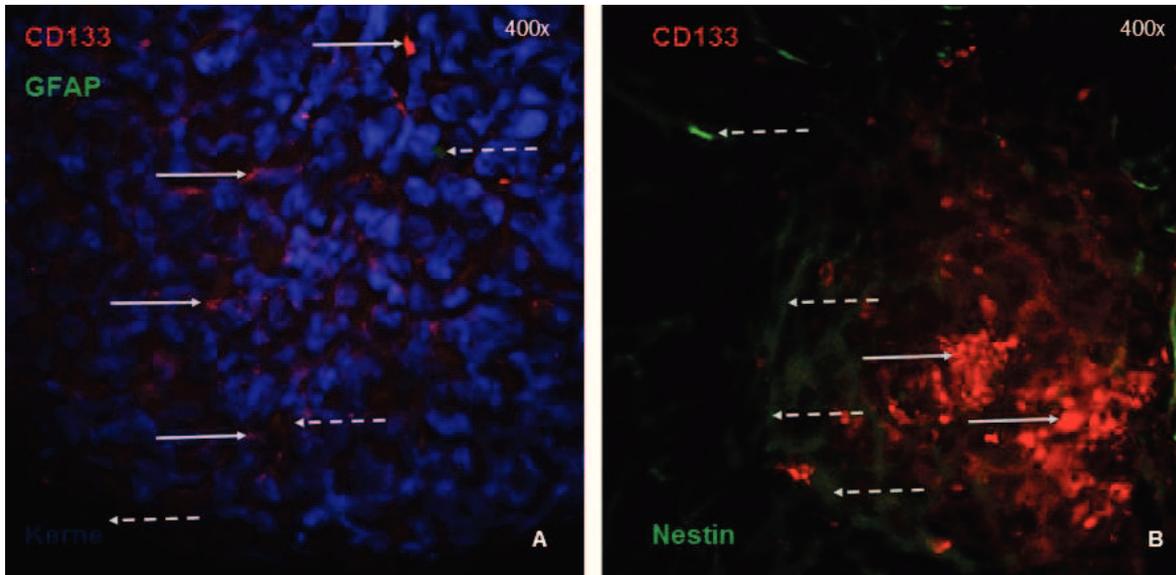


Abb. 17: LSM-Aufnahme durch das Sphärenzentrum bei ausgewählten Kulturen

[A] Gr.V_s mit extranukleärem CD133-Signal (rot, →) und schwach positivem GFAP-Signal (grün, - ->; Kerne, blau); [B] Gr.T bildete ein zentrales CD133-Signal (rot, →) und peripheres Nestin-Signal (grün, - ->) ab.

Im Bezug zu den Strukturproteinen Nestin und GFAP bildete sich CD133 in der Mehrfachfärbung in denselben Sphären ab (Abb. 15, 17). In der zusätzlichen LSM-Analyse waren der CD133- und die Differenzierungs- bzw. Strukturmarker hingegen räumlich voneinander getrennt, CD133 im Sphäreninneren und eher Nähmedium fern, Nestin und GFAP vorrangig am Sphärenrand (Abb. 17).

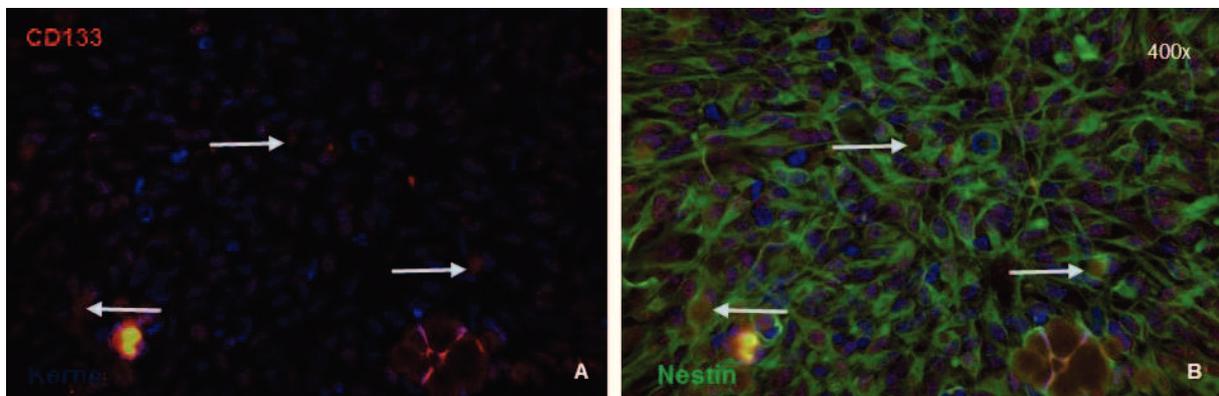


Abb. 18: Adhärenente Zellkultur

[A-B] Ein spezifisches extranukleäres CD133-Signal (rot, →) war auch in zwei adhärenenten Kulturen aus Gr.T und V_P nachweisbar. [B] Dabei belegte das deutliche Nestin-Signal (grün) ein differenziertes Zellkulturstadium (Kerne, blau).

4.2.2 Sox2

Sox2 bot ein mehr gestreutes Bild, wobei nur wenige der ausgewerteten Zellkerne ein positives Signal erkennen ließen (Abb. 19, 20). In der Differenzierungszone der Sphären zeigte Sox2 ein verstärktes Immunfluoreszenzsignal (Abb. 19).

Während der Differenzierung der Gr.T im Differenzierungsmedium erlosch das Signal. In Gr.T hob sich insbesondere randständig das Signal für Sox2 in vier Kulturen hervor (Abb.20).

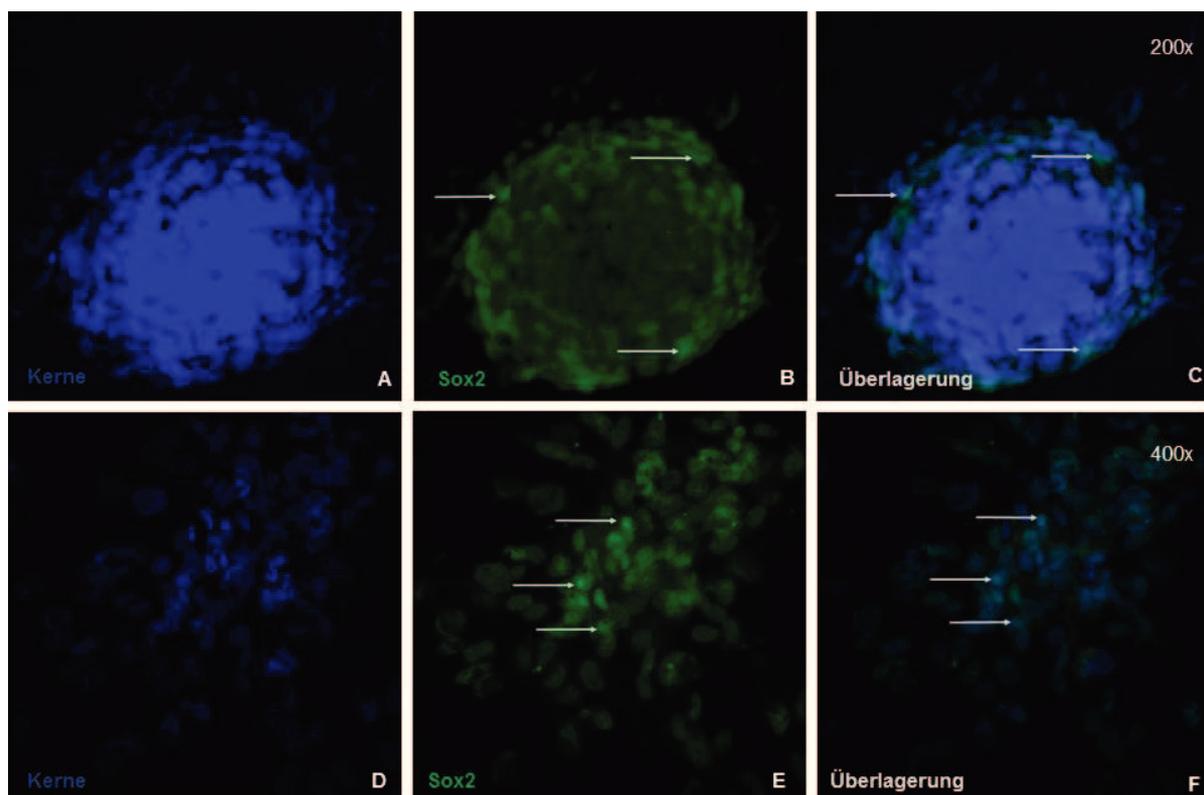


Abb. 19: Sox2-Expression in Gr.T

[A-C, LSM-Aufnahme mit Schnitt durch das Sphärenzentrum] Im Sphärenmedium war das Sox2-Signal (grün) randständig betont. [D-F] Im Differenzierungsmedium waren vereinzelte nukleäre Sox2-Signale (grün) zu sehen. [→] ausgewählte Signale (Kerne, blau)

Vereinzelt zeigte sich auch hier in zwei Kulturen der Gr.T ein positives Sox2-Signal in ausdifferenzierten Einzelzellen (Abb.19).

Die Sox2-Signale der Primärkulturen (V_P , V_S) entsprachen denen von Gr.T in Bezug zum jeweiligen Nährmedium, wobei in Gr. V_S alle und Gr. V_P zwei Kulturen Sox2-positiv waren.

In Gr. V_Z fand sich in zwei Kulturen (U373, A172) ein Sox2-Signal, wohingegen im Differenzierungsmedium nur U373 vereinzelt positive Zellen aufwies.

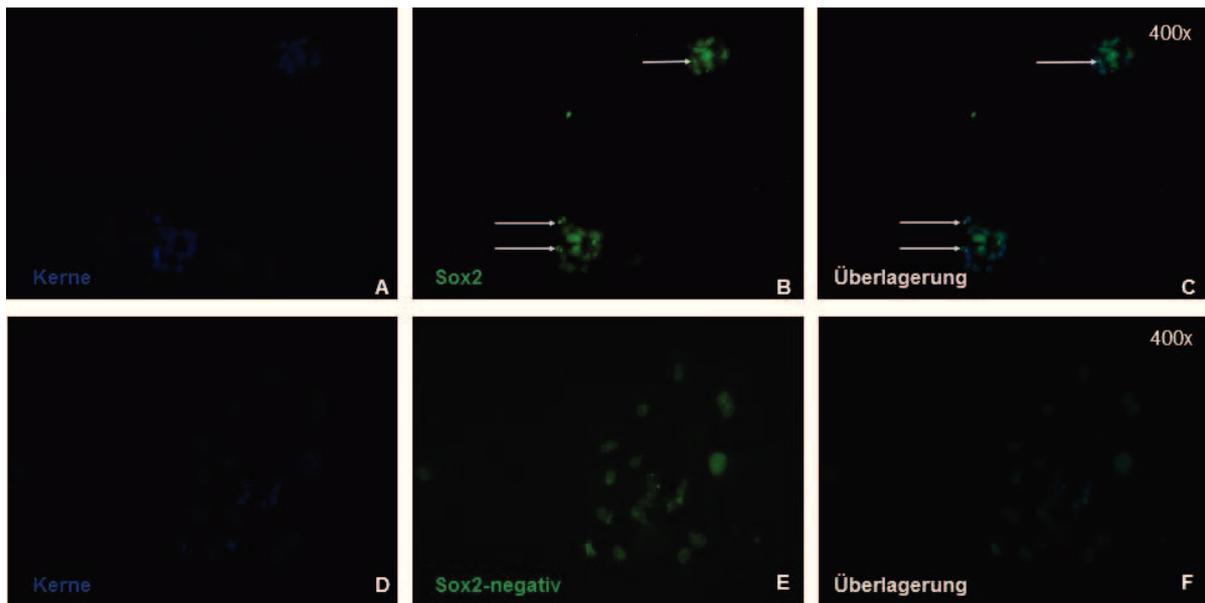


Abb. 20: Sox2-Expression

[A-C] Beispielhaft hier Gr.T (T21). Im Sphärenmedium hob sich Sox2 (grün) nucleär ab, [→] ausgewählte Signale. [D-F] Die adhärenente Kulturen im Differenzierungsmedium (hier Gr.T nach 24h, entsprechend Gr.V_P) zeigten in der großen Mehrheit kein Sox2-Signal (Kerne, blau).

4.2.3 GFAP, Nestin und Vimentin

Die Immunfluoreszenzfärbung dieser differenzierungsspezifischen Intermediärfilamente trennten jeweils zuverlässig Sphären- und Differenzierungsstadium in den jeweiligen Nährmedien ab.

GFAP, Nestin und Vimentin zeigten das erwartete spezifische Immunfluoreszenzbild der Intermediärfilamente.

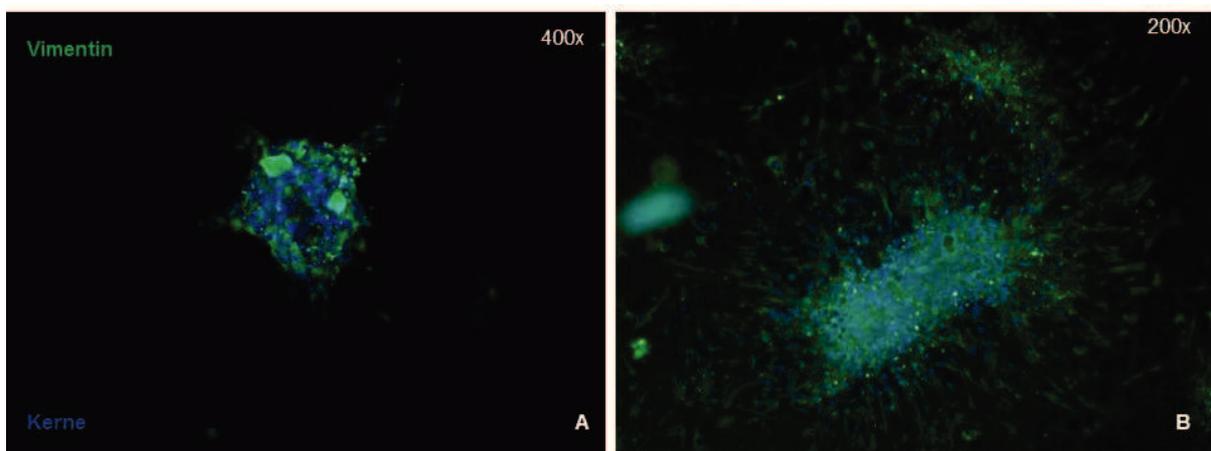


Abb. 21: Vimentin

Für Vimentin (grün) fand sich in den [A] Sphären aller Gruppen im Sphärenmedium ein randständiges Signal, welches [B] im Differenzierungsmedium nach 24h bzw. in Gr.V_P über die gesamten ausdifferenzierten Zellkörper abgebildet wurde (Kerne, blau).

Diese Strukturfilamente bildeten sich in Gr.T im Rahmen der Ausdifferenzierung mit deskriptiv kräftigerem Fluoreszenzsignal gegenüber den Vergleichsgruppen ab.

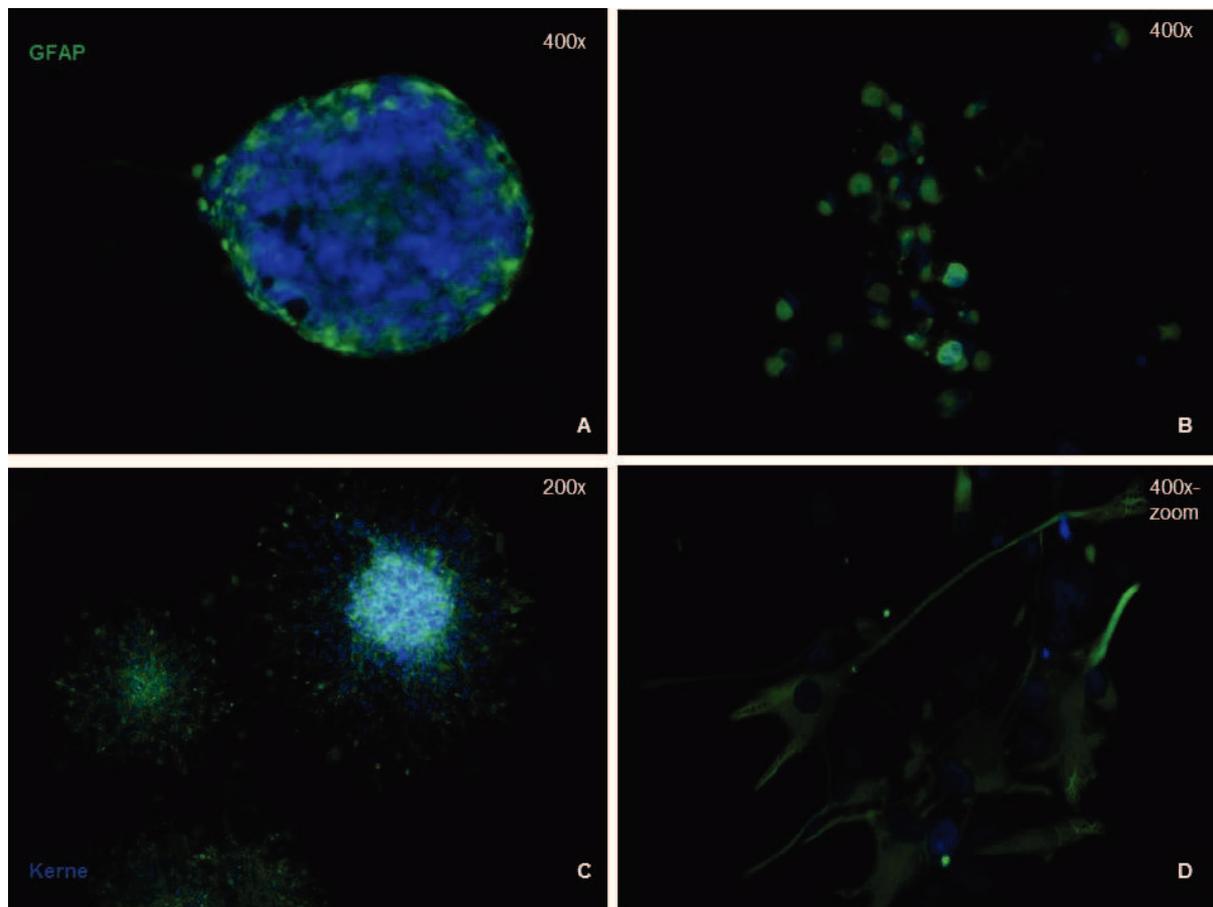


Abb. 22: GFAP

[A-B, Sphärenmedium] Das GFAP-Signal (grün) zeigte in den Tumorsphären [A] eine periphere Expression. Einer verstärkten GFAP-Expression bildeten sich [B] in Einzelzellen, entsprechend von Expressionskeimen und [C] im Differenzierungsmedium innerhalb der Zellformation bereits adhärenter und ausdifferenzierender Zellen am Sphärenrand ab. [D] Dargestellte adhärenente Glioblastomzellen im Bildausschnitt (Kerne, blau).

Im Sphärenmedium waren GFAP-, Nestin- und Vimentin-positive Zellen hauptsächlich in der Differenzierungszone am Rand der Sphären in allen Gruppen lokalisiert (Abb. 21 - 23). Einzelzellen und kleine adhärenente Kolonien von Tumorzellen zeigten ebenfalls ein positives Signal (Abb. 22).

Nach 24h im Differenzierungsmedium spiegelten in Gr.T die drei Marker die progrediente Ausdifferenzierung mit einem deutlichen Signalgewinn gegenüber der Kernfärbung mit Imitation der differenzierten Zytostuktur wider.

Die im Hellfeld sichtbare flächige Ausbreitung bestätigte die Differenzierung zusätzlich. Dabei nahm ebenfalls das Signal im Zentrum der sich differenzierenden, ehemals dreidimensionalen Sphären deutlich zu (Abb. 21 - 23).

Die Immunfluoreszenzsignale der drei Marker waren zwischen den differenzierten Kulturen der Gr.T und Gr.V_P durchweg vergleichbar. Im Sphärenmedium zeigten sich 80% der Kulturen der Gr.T GFAP und Vimentin positiv, im Differenzierungsmedium 100%. Nestin war in allen Proben entsprechend des jeweiligen Stadiums nachweisbar (Abb. 18, 23).

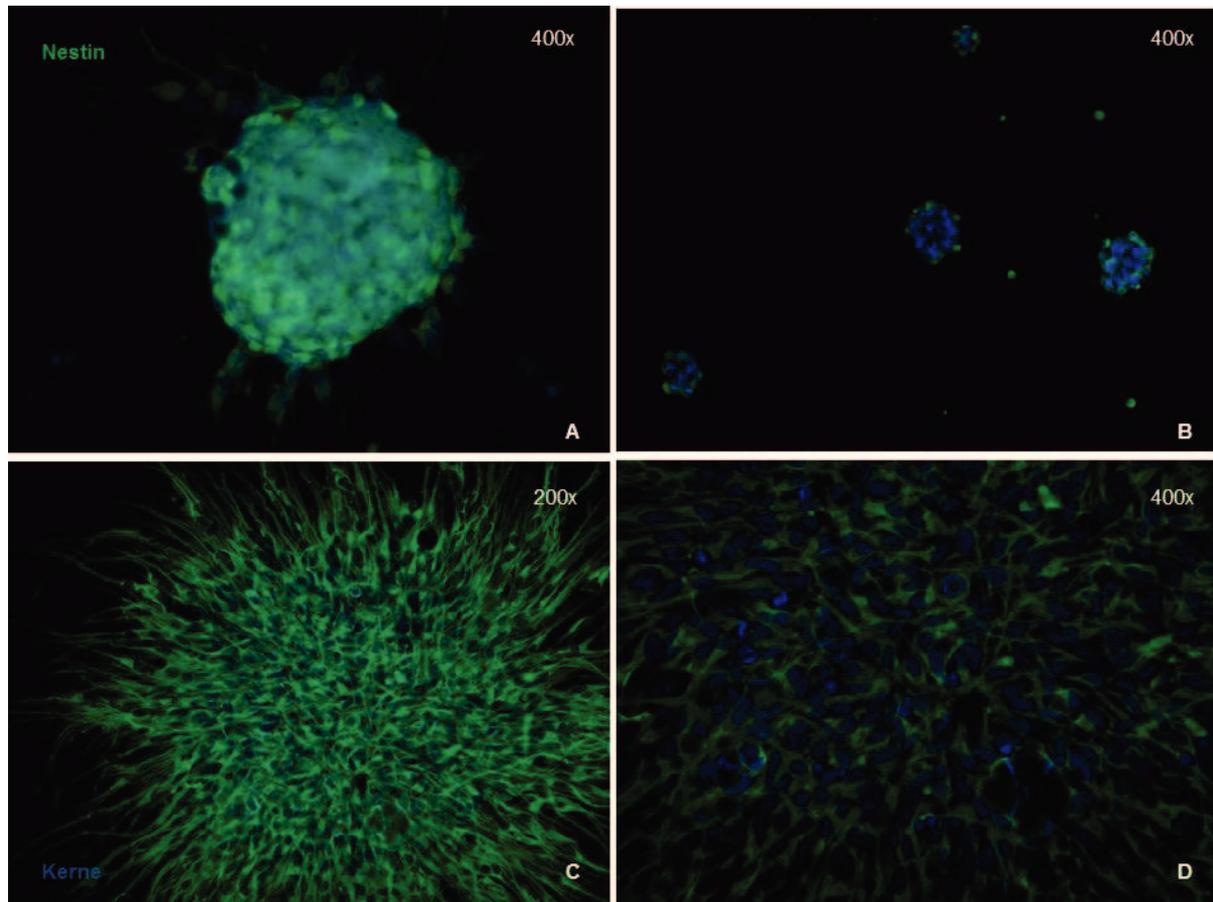


Abb. 23: Nestin

[A-B, Sphärenmedium] Das Nestin-Signal (grün) demonstrierte ein peripheres Signal in den Sphären (Gr.T [A] und Gr.V_S [B]) und [C] nach 24h im Differenzierungsmedium bzw. [D] in Gr.V_P ein der adhärenen Zellarchitektur entsprechendes. (Kerne, blau)

Die vier verwendeten Zelllinien (Gr.V_Z) zeigten GFAP, Nestin und Vimentin mit deskriptiv schwächerer Signalstärke als in den anderen Gruppen. Dabei war GFAP zu 75% in beiden Nährmedien nachzuweisen. LN229 verlor im Sphärenmedium und entgegengesetzt dazu U373 im Differenzierungsmedium GFAP.

In den sphäreninduzierten Vergleichskulturen (Gr.V_S) war Vimentin ebenso in jeder Probe vorhanden wie schlussendlich in allen ausdifferenzierten Kulturen (Abb. 21).

4.2.4 Ki67

Der Proliferationsmarker Ki67 trat charakteristisch in allen Gruppen auf. Dabei war sein Immunfluoreszenzsignal in den Sphären selbst, wie auch in ausdifferenzierten Zellverbänden, sicher in den Nuclei nachweisbar (Abb. 24) und bestätigte die Teilungsaktivität. Der Proliferationsmarker unterschied in keinem Fall Gruppen, Differenzierungsstadium oder Nährmedium.

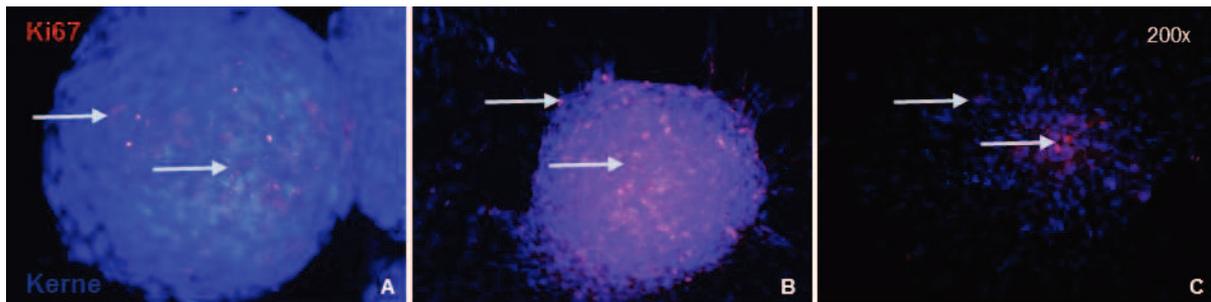


Abb. 24: Ki67

Beispielhaft dargestellt sind [A] Gr.T (T19) im Sphärenmedium, [B] nach 24h Differenzierungsmedium und [C] Gr.V_P im Differenzierungsmedium. Ki67(rot) war ubiquitär in allen Kulturen und Gruppen gegenwärtig, [→] ausgewählte Signale (Kerne, blau).

4.3 Ergebnis der Genexpressionsanalyse

Die RT-qPCR stellt ein hochempfindliches Verfahren zur Erfassung auch geringer mRNA-Mengen dar (Pfaffl et. Hageleit 2000), die in dieser Arbeit den Kern der Analyse der eingeteilten Kulturgruppen anhand ausgewählter Entwicklungsmarker bildete.

4.3.1 Expressionsquantifizierung der analysierten Marker

Die Gruppeneinteilung blieb unverändert und setzte sich aus Gr.T *Tumorsphären* (n=5, - Glioblastome, darunter ein Riesenzellglioblastom), Gr.V_Z *Zelllinien* (n=4), Gr.V_S *Sphäreninduzierten Kulturen* (n=6) und den im Differenzierungsmedium kultivierten *Primärkulturen* Gr.V_P (n=6) zusammen.

Es wurden die Pluripotenzmarker *SOX2*, *OCT4* und *NANOG*, die potentiellen Stammzellmarker *CD133* und *MUSASHI-1* sowie die weiteren Entwicklungsmarker *GFAP*, *NESTIN* und *NOTCH-1* in allen vier Gruppen nachgewiesen. *NANOG* (Ct-Werte von 26,1 bis 36,26) war nur in einzelnen Kulturen nachweisbar und bildete sich - wenn überhaupt - an der Nachweisgrenze ab, sodass eine vergleichende Analyse nicht möglich war und dementsprechend auf selbige verzichtet wurde.

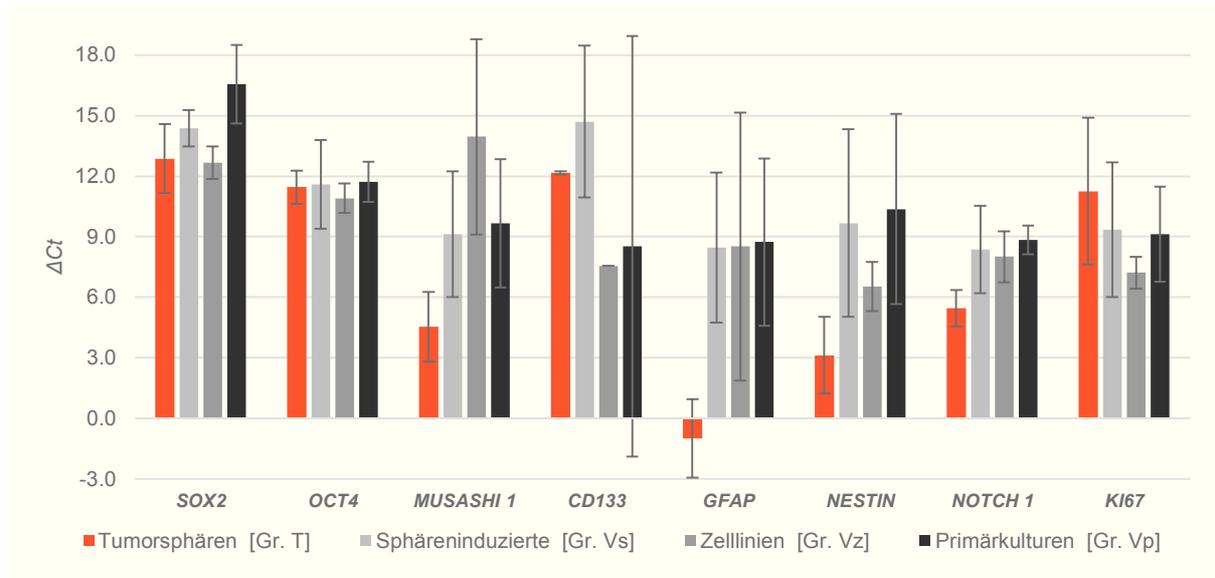


Abb. 25: Darstellung der delta-CT Werte (Δ CT)

Die Ct-Werte wurden über das gleichzeitig analysierte Housekeeper-Gen *RPL 13A* für alle exprimierten Marker zu den hier dargestellten Δ CT-Werten intern angeglichen. Bei dieser Auswertungsmethodik bedeuten **kleinere** Δ CT-Werte eine **stärkere** Expression. Die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe ist hier als Fehlerbalken [$\top \perp$] dargestellt

SOX2 zeigte einen Δ Ct-Mittelwert von 17,25, wobei die Gruppen von 12,66 bis 16,45 verstärkt streuten.

Die *OCT4*-Expression lag stabil im Δ Ct-Schnitt bei 14,11 und mit geringen Schwankungen aller Gruppen von 12,66 bis 16,55 ähnlich beieinander.

Das als Stammzellmarker definierte *CD133* lag im Δ Ct-Mittel bei 10,73 und war in der Spannbreite zwischen 7,58 bis 14,7 über die Gruppen exprimiert, wobei jeweils nur in der Hälfte der Kulturen jeder Gruppe *CD133* in dieser Analyse nachweisbar war. *MUSASHI-1* mit mittlerem Δ Ct-Wert von 9,32 zeigte hingegen eine weite Expressionsspanne über alle Gruppen von 4,54 bis 13,95, insbesondere aufgrund der höheren Expression in Gr.T mit 4,54.

Dicht beieinander lag die *GFAP*-Expression innerhalb der drei Vergleichsgruppen (Δ Ct bei 8,57). Durch die verstärkte Expression in Gr.T mit -1,00 ergab sich zusammengenommen ein Δ Ct-Durchschnitt von 6,18.

Ebenfalls hob *NESTIN* die Gr.T (Δ Ct 3,13) gegenüber den Vergleichsgruppen ab und lag im Δ Ct-Gesamtmittel bei 7,43. Ähnlich, aber mit geringerer Δ Ct-Streubreite von 5,46 bis 8,85 verhielt sich in dieser Analyse *NOTCH-1* mit einem Δ Ct-Mittelwert von 7,67 (Abb. 25).

4.3.2 Expressionsratio gegenüber den isolierten Tumorsphären (Gr.T)

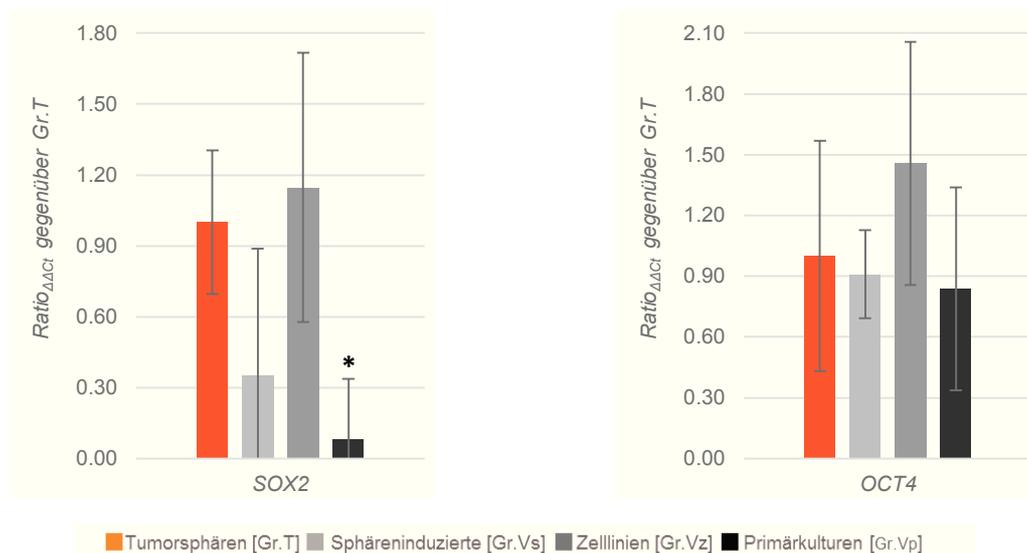


Abb. 26: Ratio der Pluripotenzmarker

Die dargestellte Ratio der $\Delta\Delta Ct$ -Werte richtete die Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T aus. [*] Unterschied ist signifikant gegenüber Gr.T; [\perp] Standardabweichung.

Mit Gr.T als Referenz zeigte SOX2 eine 12,85-fache signifikante Verringerung in Gr.V_P ($R=0,078$; $p=0,036$) und eine 2,85-fache Verringerung in Gr.V_S ($R=0,351$; $p=0,4$). Gr.V_Z hingegen wies eine mit 0,87 nicht signifikant erhöhte SOX2-Expression ($R=1,147$; $p=0,629$) auf.

OCT4 war in Gr.V_Z um das 0,68-Fache ($R=1,456$; $p=0,343$) erhöht, in Gr.V_P und Gr.V_S fiel die Expression um 1,2- bzw. 1,1-fach ($R=0,837$; $p=0,61$ bzw. $R=0,910$; $p=1,0$) niedriger aus (Abb. 26).

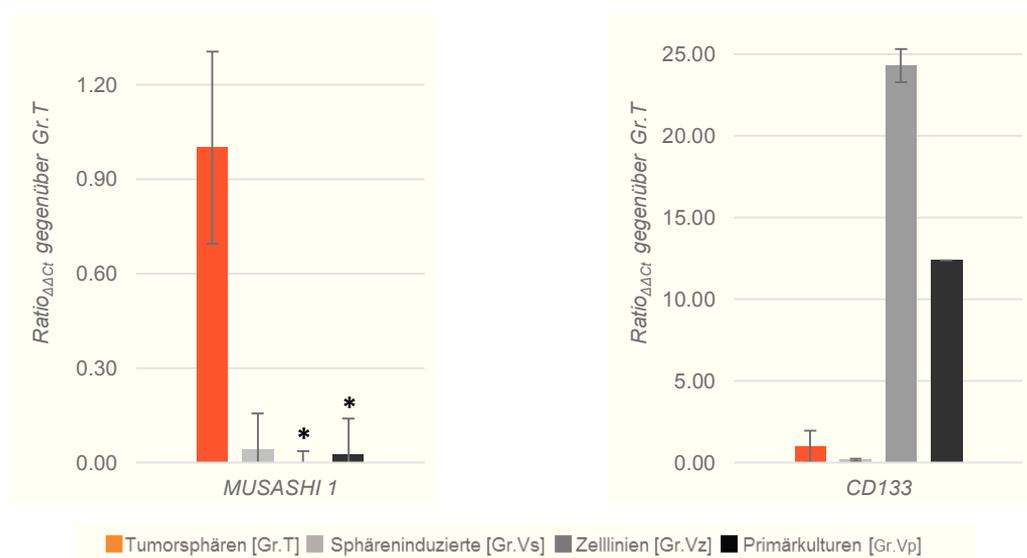


Abb. 27: Ratio der Stammzellmarker

Die dargestellte Ratio der $\Delta\Delta Ct$ -Werte richtete die Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T aus. [*] Unterschied ist signifikant gegenüber Gr.T; [\perp] Standardabweichung.

Gr.V_Z ($R=24,279$; $p=0,670$) und Gr.V_P ($R=12,385$; $p=0,860$) lagen mit gering erhöhter *CD133*-Expression (0,04- bzw. 0,08-fachen) in Bezug zu Gr.T dicht beieinander. In Gr.V_S ($R=0,171$; $p=1$) war die *CD133*-Expression hingegen um das 5,85-Fache verglichen mit Gr.T, erniedrigt.

MUSASHI-1 war signifikant in Gr.V_P um den Faktor 34,6 ($R=0,029$; $p=0,038$) und in Gr.V_Z um das 681-Fache ($R=0,001$; $p=0,029$), in Gr.V_S um das 24-Fache ($R=0,042$; $p=0,111$) gegenüber Gr.T vermindert exprimiert (Abb. 27).

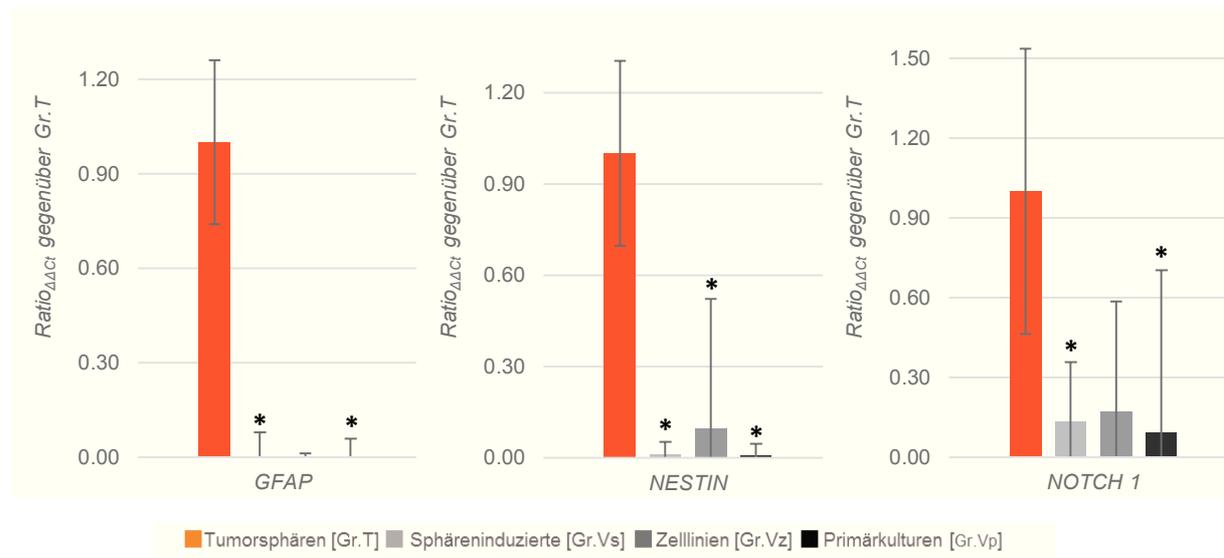


Abb. 28: Ratio der weiteren Entwicklungsmarker

Die dargestellte Ratio der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte richtete die Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T aus. [*] Unterschied ist signifikant gegenüber Gr.T; [\perp] Standardabweichung.

Die weiteren Entwicklungsmarker wiesen in allen drei Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T eine teils deutlich niedrigere Expression auf.

GFAP war in Gr.V_P 856,26-fach ($R=0,001$; $p=0,004$) und in Gr.V_S ($R=0,001$; $p=0,008$) 705,2-fach signifikant, in Gr.V_Z um den Faktor 728,9 ($R=0,001$; $p=0,143$) unspezifisch vermindert exprimiert.

Die geringste *NESTIN*-Expression gegenüber Gr.T mit 151,55-facher Reduktion wies Gr.V_P ($R=0,007$; $p=0,004$) auf. Etwas weniger vermindert war die Expression in Gr.V_S (93,4-fach; $R=0,011$; $p=0,032$) und Gr.V_Z mit 10,6-facher Reduktion ($R=0,094$; $p=0,032$).

NOTCH-1 war signifikant um das 10,5-Fache in Gr.V_P ($R=0,095$; $p=0,01$), das 7,5-Fache in Gr.V_S ($R=0,134$; $p=0,032$) und das 5,9-Fache in Gr.V_Z ($R=0,171$; $p=0,057$) verringert (Abb. 28).

Der Proliferationsmarker *KI67* war in allen Gruppen mäßig gestreut im ΔCt -Wert mit 7,22 bis 11,25 exprimiert und nicht dargestellt. Gegenüber Gr.T war *KI67* in allen Vergleichsgruppen (R von Gr.V_Z/ V_P/ V_S =16,303; 4,362; 3,745) ohne Signifikanz verstärkt exprimiert (Gr.V_S $p=0,686$; V_P $p=0,352$; V_Z $p=0,057$). Zwischen den Vergleichsgruppen bestand diesbezüglich ebenfalls kein Unterschied (V_Z gegen V_S $p=0,486$; V_Z gegen V_P $p=0,171$ und V_P gegen V_S $p=0,915$).

Zueinander wiesen die drei Vergleichsgruppen Gr.V_Z, V_P und V_S keine statistisch relevanten Unterschiede aller der hier untersuchten Marker auf. Die jeweiligen zugehörigen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte sind in Tab. 14 niedergelegt.

Tab. 14: Überblick über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T

| $\Delta\Delta\text{Ct}$ | SOX2 | OCT4 | MUSASHI-1 | CD133 | GFAP | NESTIN | NOTCH-1 | KI67 |
|--|--------|--------|-----------|--------|-------|--------|---------|--------|
| Tumorsphären [Gr. T] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sphäreninduzierte [Gr. V _S] | 1,512 | 0,137 | 4,584 | 2,550 | 9,462 | 6,545 | 2,903 | -1,905 |
| Zelllinien [Gr. V _Z] | -0,198 | -0,542 | 9,412 | -4,602 | 9,510 | 3,411 | 2,549 | -4,027 |
| Primärkultur [Gr. V _P] | 3,684 | 0,257 | 5,113 | -3,631 | 9,742 | 7,244 | 3,389 | -2,125 |

4.3.3 Korrelationsbeurteilung

Die Marker *MUSASHI-1*, *NESTIN* und *NOTCH-1* stehen im direkten und indirekten Zusammenhang in der Zellentwicklung. Aus diesem Grund wurde eine Korrelationsanalyse nach *Spearman* in allen Kulturen mit den drei Markern durchgeführt.

Hiernach korrelierten jeweils hochsignifikant positiv ($p=0,000$) *MUSASHI-1* mit *NESTIN* 0,819 und *NOTCH-1* (0,659) sowie *NESTIN* mit *NOTCH-1* (0,777).

5 Diskussion

Einleitend wurde die Bedeutung von Sphären-Assays im Zusammenhang mit der Erforschung von tumorunterhaltenden, stammzellähnlichen Zellsubpopulationen und deren potentieller Bedeutung herausgearbeitet. Stammzellcharakterisierende Faktoren scheinen, unabhängig der Gliomätiologie, ein bedeutendes Attribut in der Tumorgenese darzustellen.

Ferner wurde dargelegt, dass Sphärenbildung von Zellkulturen in vitro, neben unbegrenzter Replikation und Ausdifferenzierung in vivo zum Ausgangstumor, ein stammzellcharakterisierendes Merkmale definiert.

In dieser Arbeit sollte nun die Aussagekraft bestimmte etablierter, molekularbiologischer Entwicklungsmarker in der Zusammenschau mit physiologischen und morphologischen Faktoren, bezüglich deren Möglichkeit stammzellpotente Kulturen in Sphären-Assays zuverlässiger hervorzuheben, analysiert werden. Dazu wurden Sphären- und adhärente Kulturen hochgradiger Gliome bzw. Glioblastome von unterschiedlicher Genese verglichen.

5.1 Methodische Bewertung

Alle Patientenproben umfassten histologisch gesicherte hochgradige Gliome, wobei neben einem anaplastischen Astrozytom und zwei Riesenzellglioblastomen ausschließlich primäre Glioblastome in die Analyse gingen. Das Patientenkollektiv reiht sich bezüglich der Alters- (Mittel 65, Median 67 Jahre) und Geschlechtsverteilung in eine Vergleichspopulation ein (Crocetti et al. 2012). Spezifische klinische Marker wie MGMT-Status und IDH-1/2- Mutation lagen für die eingesetzten Proben vor und gaben ein homogenes Bild ab. Dabei war in keinem Fall eine IDH-1 oder -2 Mutation nachweisbar. Der Methylierungsstatus der Promotorregion des MGMT-Gens war bis auf eine Probe positiv. Drei der eingesetzten Kulturen aus Gr.T waren positiv für 1p19q-Deletionen. Dennoch scheint diese molekulare Signatur bei Glioblastomen keinen positiven Effekt auf das Überleben der Patienten zu haben (Kaneshiro et al. 2009, Boots-Sprenger et al. 2013). Aus diesem Grund fanden diese Marker in dieser Analyse keine weitergehende Beachtung.

Ein Einfluss von gängigen Medikamenten, wie Dexamethason und Antikonvulsiva, konnte nicht ausgeschlossen werden, ist aber nicht zu beurteilen (Besteher 2013). Insbesondere Dexamethason, indiziert zur Kontrolle eines tumorbedingten perifokalen

Ödems, kann wohl Stammzellen aus dem Knochenmark rekrutieren (Nakamizo et al. 2005).

Ein weiterer Störfaktor ergibt sich bei Proben aus Rezidivoperationen mit vorweg stattgehabter Radio-Chemotherapie. Nach wissenschaftlichem Stand kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Tumoren stammzellähnliche Zellen eher positiv selektiert wurden (Reya et al. 2001, Liu et al. 2006, Bao et al. 2006), wobei hier nur eine Kultur in Gr.T betroffen war.

Die Passagierung mit der enzymatischen Anwendung von *Accutase* wie auch die Zentrifugation sind als Stressoren für die jeweiligen Zellkulturen mit Eingriff in die Zellbiologie anzusehen. Dies ist möglicherweise eine Ursache für die mangelnde vitale Passagierbarkeit von Sphärenkulturen, insbesondere der nach Stammzellisoliationsprotokoll erzeugten Tumorsphären Grad 2 bis 3. Bei der prophylaktischen Ciprofloxacin-Behandlung gegen mögliche unerkannte Mykoplasmeninfektionen der adhärenen Kryokulturen waren keine vordergründigen Auswirkungen auf die Zellkulturen zu erwarten (Schmitt et al. 1988).

Kryokonservierung bewirkt lt. vorangegangenen Studien keine Veränderungen im Geno- und Phänotyp möglicher stammzellähnlicher Populationen in Zellkulturen (Chong et al. 2009).

Die im Sphärenmedium eingesetzten Wachstumsfaktoren *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) sind etablierte Standardzusätze in Stammzellnährmedien, da sie in Bezug auf die Stabilisation der Zellen im undifferenzierten Stadium serumhaltigem Medium überlegen zu sein scheinen (Lee et al. 2006, Reynolds et al. 1992). Auch soll der gängige kommerzielle Zusatz von B27[®] im Sphärenmedium unklare Effekte durch serumhaltige Nährlösungen ersetzen und Sphärenformationen ausdauernd stabilisieren (Brewer et al. 1993, Chen et al. 2008a).

Die Wahl des MTT-Assays zur Objektivierung der Zellkulturviabilität basiert auf der Erkenntnis, dass die NADPH-abhängige Glykolyserate auch in Hirntumoren grundlegendes Fundament des Zellstoffwechsels ist (Marie und Shinjo 2011). Methodische Effekte auf den Metabolismus wurden bei Erhebung der Zellviabilität weitgehend durch die vorangehende drei- bis fünftägige Inkubation von Gr. V_Z und V_S im Sphärenmedium ausgeschlossen. Eine vergleichbare Ruhephase erhielten die Zellkulturen der Gr.T, um eine Verzerrung durch das strapazierende Isolationsgeschehen weitgehend auszuschließen.

Bei der Migrationsanalyse konnte durch eine hohe Anzahl von umfangreichen Einzelmessungen (70 je Kultur) der natürliche Fehler klein gehalten und somit eine statistisch solide Datenbasis erzielt werden. Herausfordernd war im Vermessungsverlauf bei einzelnen Kulturen mit kleinen sphäroiden Formationen die Festlegung des Mittelpunktes mit darauf aufbauender Ermittlung des Migrationsradius. Auch hier wurde der Fehler über Mehrfachmessungen somit weitgehend eingeschränkt.

Im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung war zu beachten, dass grundsätzlich die Fixierung mittels Paraformaldehydlösung bereits zu Anfang Membranproteine verändern und das Ergebnis einer anschließenden Behandlung verzerren könnte. Ebenso konnte der Effekt der Photobleichung (photochemische Destruktion des Fluorophors durch Aussetzung gegenüber Anregungslicht) erfolgreich gebundene Immunfluoreszenzantikörper kaschieren. Fixations- und Färbungsrückstände könnten in geringem Maße auf den Objektträgern eine Antikörperbindung bzw. auch die Lichtemission behindern oder ein Hintergrundsignal erzeugen. Überdies sollte eine mögliche Abnahme der Eintrittstiefe von Primär- und Sekundärantikörpern in große, dicht gepackte Sphärenformationen bedacht werden. Die Beurteilung der Präparate erfolgte daher unabhängig durch zwei Personen.

Der gliale Marker GFAP sowie der mesenchymale Marker Vimentin dienten als Positivkontrolle, Iba-1 zum Ausschluss von Mikroglia als Negativkontrolle. Das CD133-Immunfluoreszenzsignal entsprach allgemein bekannten Immunfluoreszenzmustern (Sherman et al. 2011, Yuan et al. 2004).

Für die RT-qPCR wurden die in der Literatur etablierten Primer nach *Primerblast NCBI* ausgewählt (siehe Tab. 6) und anhand eines Agarosegels getestet.

Um individuelle Schwankungen während der PCR systematisch auszuschließen, wurde das Procedere durchgehend von einer Person mit identischem Pipettensatz durchgeführt. Eine interne Kontrolle wurde mitgeführt. Über die Ermittlung der $\Delta\Delta C_t$ -Ratio ist eine Ausrichtung der Werte an Gr.T erfolgt.

Der regelhaften Gegenwart technisch bedingter systematischer Fehler in der Versuchsdurchführung konnte über die ausnahmslose Verwendung derselben Apparaturen begegnet werden.

5.2 Kernaussagen

Nach diesen Ergebnissen hoben sich die nach dem Stammzellisolationsprotokoll erzeugten Tumorsphären (Gr.T) deutlich von den drei Vergleichskulturen ab.

Gr.T zeigte signifikant einen im Mittel um 12 Tage länger dauernden Zeitraum bis zur Sphärenbildung sowie eine 10-fach niedrigere Zellviabilität. Des Weiteren wuchsen in dieser Gruppe größere Sphärenformationen, die mit einer verstärkten Tendenz zur Migration nach Mediumwechsel gegenüber den Vergleichsgruppen imponierten.

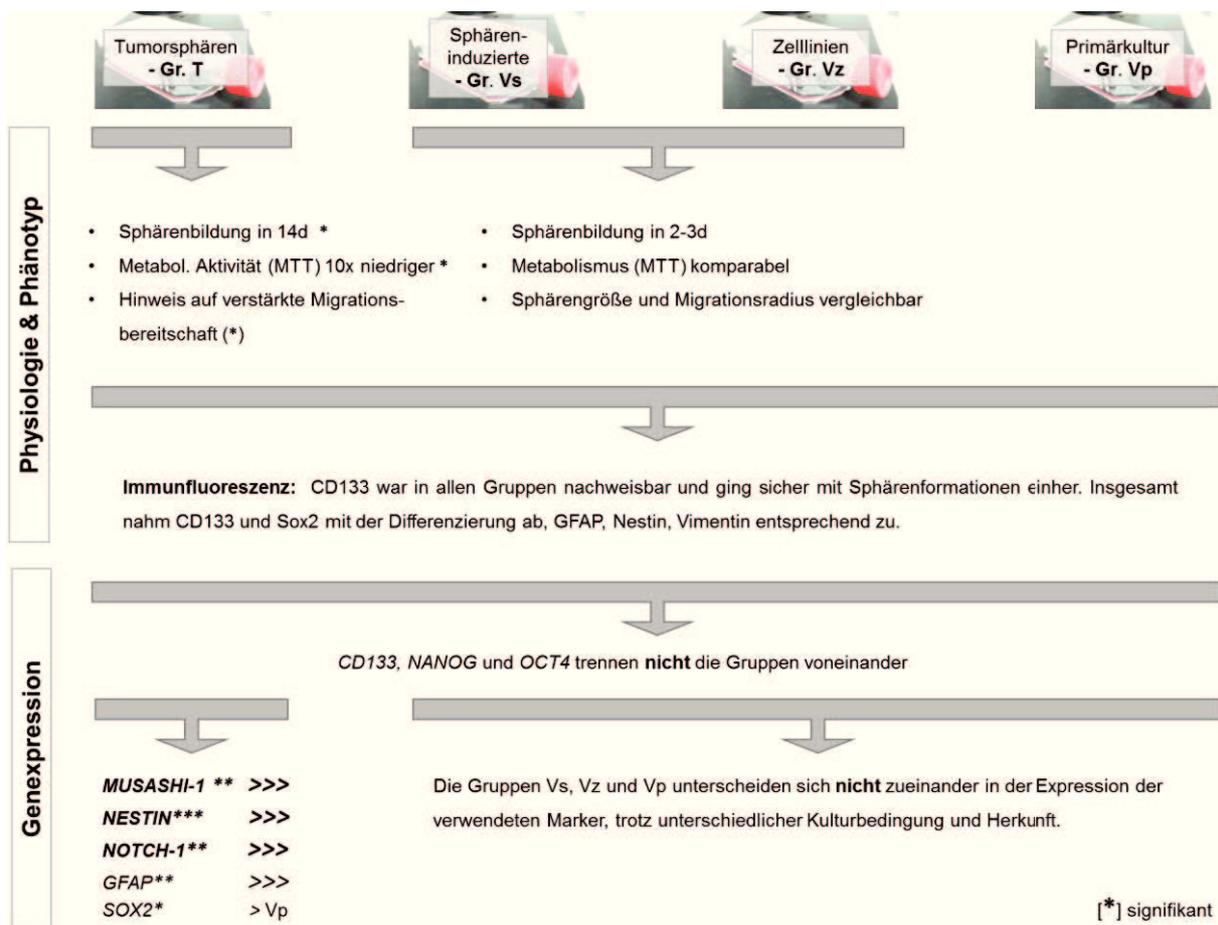


Abb. 29: Zusammenfassung der Ergebnisse

Auch auf der mRNA-Expressionsebene setzte sich dieser Unterschied gegenüber den drei Vergleichsgruppen mit einer z.T. 10- bis 700-fachen, meist signifikant verstärkten Expression der Marker *MUSASHI-1*, *NESTIN*, *NOTCH-1* und *GFAP* in Gr.T fort.

Aus diesen Daten lässt sich vorweg darlegen, dass die Isolation anhand des Stammzellisolationsprotokolls physiologisch wie ebenso genetisch divergente Sphärenkulturen gegenüber den adhärenenten Primärkulturen und kommerziellen

Zelllinien erbracht hat. Dabei zeigten diese Analysen keine greifbaren Unterschiede innerhalb der Vergleichskulturen in Bezug auf die untersuchten Faktoren (Abb. 29).

Schlussendlich können die einleitenden Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

5.2.1 Physiologisch-phänotypische Gegenüberstellung

Grundlegend sind Sphären-Assays als alleinige Methode zur Identifikation stammzellähnlicher Tumorzellpopulationen nicht unumstritten, so können sie nur retrospektive Bestimmungen leisten, u.a. durch Differenzierung zum Ausgangstumor, ohne die Beachtung von weiteren Faktoren (Cheng et al. 2009). Dennoch brachten Laks et al. Tumorsphären-Assays als unabhängigen, prospektiven In-vitro-Marker für den Behandlungsausgang ins Spiel, unabhängig vom Proliferationsindex Ki67 (Laks et al. 2009). Der nukleäre Faktor Ki67 in der Interphase des Zellzyklus ist ein bewährter Proliferationsmarker in der Routinediagnostik (Cattoretti et al. 1992). Die hier vorliegenden Ergebnisse, in denen Ki67 auf Protein- und mRNA-Ebene sowohl in Sphären als auch in den adhärent wachsenden Kulturen keine signifikanten Unterschiede zeigte, reihen sich bei *Laks et al.* ein. Andererseits gelten Tumorstammzellen, verglichen mit der Mehrheit der differenzierten Tumorzellen, eher als ruhende Zellpopulationen (Shay und Wright 2010). Potentiell deutet die Gr.T mit der niedrigsten *Ki67*-Expression gegenüber den anderen Gruppen, zwar ohne Signifikanz, dies an.

Sphären-Assays generieren eine hohe Streubreite bezüglich der Sphärogenesedauer in vitro (Germano et al. 2010), wie sie gleichfalls in dieser Arbeit zwischen einem bis 37 Tagen anzutreffen war. Vergleichbare Betrachtungen beschrieben ebenso binnen sieben bis 14 Tagen eine Sphärenausbeute von 41% (Hasselbach et al. 2014). Hier gelang eine primäre Sphärenkultivierung im selben Ausmaß, wobei sich letztendlich 18% der Sphärenkulturen als ausdauernd stabil erwiesen. Die OP-Proben waren in Größe und Vitalität von unterschiedlicher Qualität, da das Resektionsgebiet naturgemäß nekrotische, hämorrhagische und proliferative Areale umfasste, die unter Operationsbedingungen nicht immer sicher zu differenzieren waren. Bedeutender könnte diesbezüglich jedoch die reduziertere Ausbeute, neben dem strapaziösen Isolationsprocedere an sich, im Zusammenhang mit der Vorbehandlung durch der Radikale erzeugenden 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) stehen, wozu Hasselbach et al. keine Stellung nehmen. Die präoperativ verabreichte 5-ALA könnte unter Beleuchtung, sei es im OP-Feld oder im Laborumfeld, reaktive Sauerstoffradikale gebildet und somit zum Zellverlust in der Aufarbeitung geführt haben.

Die 5-Aminolävulinsäure ist ein Substrat im Porphyrinsynthese-Zyklus und wird mit aufsteigendem Gliomgrad sukzessiv in den neoplastischen Zellen angereichert, was zur gesteigerten Synthese des Zwischenproduktes Protoporphyrin IX führt. Als neurochirurgisches Standardverfahren wird intraoperativ Protoporphyrin IX unter ultraviolettem Licht zur Emission von rot-violettem Licht angeregt, um maligne Zellnester gegen visuell unberührtes Parenchym abzugrenzen. So soll eine zuverlässigere und schonendere Resektion gewährleistet werden (Zhao et al. 2013). Die Bewertung von 5-ALA im Hinblick auf die Biologie stammzellähnlicher Tumorzellen fällt in der Literatur unterschiedlich aus und scheint noch nicht abgeschlossen. CD133 positive Zellpopulationen sollen zum größten Teil 5-ALA überstehen (Rampazzo et al. 2014). Ferner fanden Piccirillo et al. zwar keinen direkt schädigenden Einfluss von 5-ALA auf tumorinitiierende Zellpopulationen bezüglich der Sphärogenese und u.a. den Markern Sox2, GFAP, Nestin und Notch-2 (Piccirillo et al. 2012). Jedoch wurde in der Vergangenheit generell ein toxischer Effekt auf Tumorzellen nachgewiesen (Coupienne et al. 2011). Dahingehend wird 5-ALA mittlerweile nicht nur als intraoperatives Diagnostikum, sondern auch als photodynamisches Therapieverfahren diskutiert (Teng et al. 2011). Dennoch ist die beschriebene Wirkung auf Gliomsphärenkulturen weiterhin widersprüchlich (Kamoshima et al. 2011).

Im Gegensatz zur stammzellisolierten Gr.T waren alle im serumfreien Sphärenmedium kultivierten Proben der Gr.Vz und Vs durch eine rasche Sphärenbildung binnen weniger Tage gekennzeichnet. In der Literatur wurden unterschiedliche Genesezeiten für kommerzielle Zelllinien (U373, U87), binnen Tagen (Iacopino et al. 2014) bis mehrere Wochen mit langsamem Sphärenwachstum, insbesondere von U87, angegeben (Hong et al. 2012). Hong et al. ermittelte zwar, dass die im serumhaltigen Medium erzeugten Sphärenkulturen der Zelllinien stabiler ausfielen, was hier nicht zutraf. Jedoch nutzte Hong et al. hier nur ein bedingt vergleichbares Verfahren mit anti-adhäsionsbeschichteten Kulturbodenflaschen sowie ein verändertes serumfreies Nährmedium ohne B27®-Zusatz.

Für neurale Progenitorzellen, gewonnen aus adulten Primärkulturen, liegen in der Literatur beschriebene Zeiten bis zur Sphärenbildung zwischen vier bis sieben Tage vor (Kabos et al. 2002). Für Zellen aus Gliomresektaten mit vergleichbaren Stammzellisoliationsprotokollen werden sieben bis zehn Tage genannt (Azari et al. 2011). Aus diesen vorgenommenen Betrachtungen ist die Kulturausbeute der Isolate mit Sphärenbildung in dieser Arbeit insgesamt als realistisch zu werten.

Die Viabilitätsprüfung auf eine vorher festgelegte Zellzahl stellte die metabolische Aktivität der Zellen der Gr.T den sphäreninduzierten Gr.V_Z und V_S gegenüber. Ein geringerer Umsatz der stammzellisolierten Zellen der Gr.T gilt aufgrund von früheren Versuchen mit der Zelllinie U87 (Vlashi et al. 2011) als möglich. Die simultane Abnahme der Glykolyserate in beiden Vergleichsgruppen (Gr.V_Z, V_S) könnte dem limitierenden Verbrauch an Nährstoffsubstrat über den Zeitraum geschuldet sein. Dergleichen halten vor allem Gliomzellen mit geringerem Zellumsatz die Fähigkeit zur Selbsterhaltung und Langlebigkeit inne verglichen mit sich selbsterschöpfenden Populationen mit aktiverem Zellumsatz (Richichi et al. 2013). Wie oben bereits angerissen wird grundsätzlich angenommen, dass stammzellassozierte Tumorzellen eher ruhende Zellpopulationen (Shay und Wright 2010) mit wesentlich geringerer metabolischer Aktivität verkörpern (Pattabiraman und Weinberg 2014). Diese signifikanten Unterschiede wiesen hier in ähnliche Richtung. Durchaus besteht die Möglichkeit, dass sich der niedrigere Umsatz in der verlängerten Sphärenbildung in Gr.T gegenüber den Vergleichsgruppen widerspiegelt.

Auch die Migrationsbereitschaft und damit die Proliferationstendenz unter verändertem, serumhaltigem Nährmedium waren in der Gr.T gegenüber beiden sphäreninduzierten Vergleichsgruppen (V_Z und V_S) verstärkt (Kapitel 4.1.3). Dieser Trend isolierter Sphären der Gr.T gegenüber denen kommerzieller Zelllinien (U87) bestätigte sich in vergleichbaren Analysen (Hong et al. 2012). Gr.T bildete im Vergleich zu den verwendeten Zelllinien (Gr.V_Z) ca. 78% größere Sphärenradien und die Zellen migrierten mit knapp 80% signifikant weiter allseitig im selben Zeitraum aus. In ähnlicher Weise fand sich eine Tendenz gegenüber Gr. V_S mit noch ca. 15% größeren Sphären mit einer ca. 42%igen weiteren Migration. Der durchschnittliche Radius (Gr.T) von 90µm entspricht Daten älterer Studien mit stammzellassozierten Sphären (Azari et al. 2011, Johnson et al. 2013). Die stammzellisolierten Tumorsphären behielten signifikant ihren Migrationsvorsprung gegenüber den zusammgelegten Werten der sphäreninduzierten Vergleichsgruppen (V_Z, V_S) wie auch im Sphärenausmaß neutralisierten Migrationsratio. Diese Tendenz könnte mit einer Erhöhung der Anzahl an Sphärenkulturen weiter erhärtet werden.

Insgesamt lag eine positive Korrelation zwischen Sphärengroße und dem Proliferationstrieb vor. Stammzellähnliche Tumorzellen sollen sich generell durch eine vergleichsweise erhöhte Proliferationsneigung unter entsprechenden Bedingungen auszeichnen (Nduom et al. 2012).

Ein Zusammenhang mit der *NOTCH-1*-Expression kann vorliegen (Mori et al. 2006). So hatte Zhnag et al. bereits eine verstärkte Migrationsbereitschaft in Zelllinien mit einer verstärkten Notch-Expression in Zusammenhang gebracht (Zhang et al. 2012). Simultan präsentierten die ermittelten Daten hier ebenfalls eine sechs- bzw. siebenfach gesteigerte *NOTCH-1*-Expression in Gr.T gegenüber Gr. V_Z und V_S.

5.2.2 Einordnung der Immunfluoreszenz- und Genexpressions- ergebnisse

Auf mRNA-Ebene waren die ausgewählten Marker, abgesehen von *NANOG*, in allen Gruppen nachweisbar, *CD133* in der Hälfte in den jeweiligen Sphäregruppen.

In der Immunfluoreszenz wurden die eingesetzten Marker *CD133*, *Sox2*, *Nestin*, *GFAP*, *Vimentin* und *Ki67* in allen Vergleichsgruppen mit unterschiedlicher Verteilung nachgewiesen. In allen Gruppen war weithin die Tendenz zum Rückgang von *CD133* und *Sox2* im Rahmen der Ausdifferenzierung zu beobachten.

Die Organisation von *GFAP*- und *Vimentin*-Strukturfilamenten in den Zellkörpern belegen sicher, zusammen mit flächigem Auswachsen, ein differenziertes bzw. adhärentes Kulturstadium (Reifenberger et al. 1989, Tso et al. 2006). Dies konnte auch in der Immunfluoreszenzanalyse dokumentiert werden (Kapitel 4.2). In der Immunfluoreszenzanalyse gelang es weiterhin, ein undifferenziertes (Gr.T, V_S, V_Z) von einem differenzierten Stadium (Gr.V_P, Gr.T nach 24h im Differenzierungsmedium) durch die *GFAP*- und *Vimentin*-Expressionen voneinander zu unterscheiden, wobei *Nestin* analog exprimiert wurde (Abb. 4, 21 - 23).

Die Expression von *CD133* in Tumorsphären, ausgehend von adhärenen Primärkulturen durch Induktion über ein entsprechendes Kulturmedium, ist bekannt und entsprach in dieser Arbeit Gr.V_S.

Pavon et al. privilegiert sogar sphäreninduzierte Kulturen aufgrund des erhöhten *CD133*-Anteils auf Proteinebene gegenüber Stammzellisolierten (Pavon et al. 2014). Auch in dieser Arbeit fand sich *CD133* zuverlässig in allen Sphäregruppen. So gelang in dieser Analysen, gegenteilig zu Pavon et al., in allen Einzelkulturen der stammzellisolierten Gr. T, wie auch vollständig in Gr.V_S und noch in zwei Zelllinienkulturen (Gr.V_Z, A172, U373), der Nachweis einer *CD133*-Oberflächenexpression. In den ausdifferenzierenden oder adhärenen Kulturen war *CD133* auf Proteinebene fast verschwunden. Der *CD133*-Verlust in differenzierten Kulturen ist aufgrund von Vorarbeiten erwartet worden (Caldera et al. 2011). Lediglich

in einzelnen Zellclustern blieb ein CD133-Signal bei je einer ausdifferenzierten Kultur in Gr.T (T20) und Gr.V_P (V3) erhalten (Abb. 18).

Entgegen den vermehrten stammzellassozierten physiologischen Eigenschaften und der verstärkten mRNA-Expression weiterer Entwicklungsmarker wie *MUSASHI-1* und *NESTIN* in Gr.T erlaubte der Stammzellmarker *CD133* auf mRNA-Ebene zwischen den Gruppen keinerlei Trennung und war unspezifisch verteilt, ohne dass sich eine Gruppe signifikant absetzte. Widersprüchlich war zudem, dass im selben Nährmedium auf Proteinebene alle Kulturen der Gr.T CD133-positiv waren, auf Transkriptionsebene jedoch nur zwei von fünf. Auch ließ sich *CD133* nur noch in einem Drittel der sphäreninduzierten Gr.V_S nachweisen. Dabei war die mRNA-Expression in denselben, aber adhärenenten Kulturen (Gr.V_P) sogar gesteigert und in vier der sechs Proben dieser Vergleichsgruppe vorhanden.

Grundsätzlich bestehen vielfältige zelluläre Rückkopplungseffekte zwischen Proteinebene und Transkriptions- wie Translationsebene. Möglicherweise könnte eine ausreichende Sättigung auf der Zelloberfläche der Sphären, wie in der Immunfluoreszenz nachgewiesen, die Menge der Transkripte reduziert haben. Auch in Tumorstammzellen in Kolonkarzinomkulturen konnten unterschiedliche Effekte auf Proteinebene bei stabiler mRNA-Expression von *CD133* in differenzierten Kulturen nachvollzogen werden. Dabei wurde auch eine Veränderung der Glykosylierung des CD133-Epitops in der Differenzierung propagiert (Kemper et al. 2010).

CD133 wird, trotz unklarer Funktion, als Stammzellmarker angesehen (Kapitel 1.4.1). Nichtsdestoweniger ist seine Bewertung mittlerweile uneinheitlich. Zweifel am Charakterisierungspotential des Oberflächenmarkers CD133 klangen bereits einleitend an. So zeigten murine Implantationsexperimente, dass auch CD133-negative stammzellisolierte Zellpopulationen CD133-positive Tumore hervorbringen konnten. Zusätzlich war es möglich, in vivo CD133-unabhängig heterogenetische Tumore zu erzeugen (Joo et al. 2008, Ogden et al. 2008). Dies führte zur Annahme, dass CD133 eher im Rahmen des Tumorprogresses mit einhergehender Neovaskulisation von Bedeutung ist als bei Tumorunterhaltung oder -induktion (Wang et al. 2008a). Des Weiteren haben auch CD133-negative Zellkulturen Tumorsphären bzw. tumorunterhaltende Zellen gebildet (Chen et al. 2010).

Auch bewerten diverse Autoren das Transmembranprotein als potenten Einzelmarker zurückhaltender (Venere et al. 2011). Neuste Publikationen wie von Teodorczyk und Schmidt nahmen jüngst gänzlich Abstand (Teodorczyk und Schmidt 2014) oder geben

CD133 in erster Linie in Korrelation mit Nestin einen prognostischen Aussagewert in hochgradigen Gliomen (Dahlrot et al. 2014).

Die Pluripotenzmarker *NANOG*, *SOX2* und *OCT4* waren auf mRNA-Ebene nicht reguliert. Ihnen wird derzeit ein stammzellidentifizierender Charakter eingeräumt (Germano und Binello 2014). Die Pluripotenzfaktoren *SOX2* und *OCT4* hoben sich in dieser Analyse nicht gegenüber den Kohorten ab. Sox2 war morphologisch im Sphärenmedium in allen Gruppen mehrheitlich nachweisbar, wobei Gliome allgemein eine unspezifisch erhöhte Sox2-Expression gegenüber Normalgewebe besitzen (Schmitz et al. 2007, Du et al. 2009). Eine Sox2-Blockade führte in vorangegangenen Arbeiten zum Proliferationsstopp in tumorinitiierenden Gliomzellen (Gangemi et al. 2009).

In dieser Arbeit war das Sox2-Signal innerhalb der Sphärenformation gering ausgeprägt. Auf Proteinebene erschien es in den ausdifferenzierenden Sphären oder im Sphärenmedium eher sphärenpedal, insbesondere bei den Tumorsphären der Gr.T. Zugleich fand sich eine beginnende Organisation von Intermediärfilamenten, wie etwa von GFAP, Nestin und Vimentin. Einzig die Gr.T exprimierte auf Transkriptionsebene gegenüber den adhärenen Kulturen (Gr.V_P) signifikant verstärkt *SOX2*. Somit weisen diese Daten eventuell darauf hin, dass Sox2 hier vorrangig als differenzierendes, anstatt pluripotentes Element der Sphärenbiologie fungiert und somit in diesem Zusammenhang eine Rolle während der Ausdifferenzierung spielen könnte.

5.2.3 Einordnung der stammzellisolierten Sphären (Gr.T) bezüglich ihres Differenzierungsstandes

Wie soweit ausgeführt, erbrachte die Stammzellisolation, modifiziert nach Azari et al. und Lee et al. (Azari et al. 2011, Lee et al. 2006), Zellkulturen (Gr.T) mit größtenteils signifikanten sphärenphysiologischen und metabolischen Unterschieden gegenüber den Referenzgruppen, die als stammzellassoziierte Eigenschaften zu werten sind. Diese Differenzen setzten sich in der vielfach verstärkten mRNA-Expression des neurogenen Stammzellmarkers *MUSASHI-1*, des Vorläufermarkers *NESTIN* mit den Markern *NOTCH-1* und *GFAP* fort.

Dennoch könnte bei dem zuletzt genannten differenzierungsassoziierten Marker *GFAP* und dem nur marginalen *CD133*-Nachweis auf mRNA-Ebene argumentiert werden, dass die Tumorsphären der Gr.T das Stadium einer stammzellähnlichen

Zellpopulation bereits zu Gunsten eines differenzierenden Stadiums aufgegeben haben. Dem entgegensteht, dass die ebenfalls im serumfreien Sphärenmedium gehaltenen Zelllinien (Gr. V_Z) und sphäreninduzierten Primärkulturen (Gr. V_S) aufgrund ihres vorangegangenen adhärenen Status eine mit Gr.T vergleichbare Differenzierungsneigung hätten widerspiegeln müssen, auf physiologischer wie auch auf genetischer Ebene. Warum traf dies nicht zu?

Gr. V_S ging aus unselektierten, ausdifferenzierten Gliomkulturen aus aufgearbeitetem OP-Material (Gr. V_P) hervor, die im Wechsel der Kulturbedingungen im serumfreiem Sphärenmedium phänotypische Merkmale einer stammzellähnlichen Population durch das Merkmal *Sphärenbildung* (Gr. V_S) annahmen. Im Gegensatz zu den isolierten Kulturen der Gr. T war indes keine erhöhte Stammzellichte zu erwarten, ebenso wenig in Gr. V_Z , wobei U373 mit beschriebenem erhöhten Stammzellpotential hier wahrscheinlich eine Sonderstellung einnimmt (Hong et al. 2012). Dies spiegelte sich in den vorweg diskutierten sphärenphysiologischen und metabolischen Veränderungen wider.

Insgesamt zeigten alle drei Vergleichsgruppen V_Z , V_S , und V_P zueinander, trotz verschiedener Herkunft oder Kulturbedingungen, diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede.

Die GFAP-Expression auf Proteinebene der Kulturen im serumhaltigen Differenzierungsmedium war charakteristisch für Gr.T und die adhärenen isolierten Kulturen V_P , ließ sich aber ebenso in den Zelllinien (Gr. V_Z) im selben Nährmedium in eingeschränktem Maße nachweisen. Jenes entsprach Ergebnissen vorausgehender Veröffentlichungen (Iacopino et al. 2014, Lee et al. 2006). Bekannt ist, dass GFAP keineswegs zwischen stammzellassozierten CD133-positiven und -negativen Kohorten trennt (Beier et al. 2007). Es zeichnete sich hier vielmehr eine räumliche Abgrenzung zwischen eher sphärenzentralen CD133- und vorwiegend am Rand liegenden Intermediärfilament-Signalen wie GFAP oder Nestin (Kapitel 4.2). Insbesondere in Gr.T fanden sich solche Phänomene (Abb. 17). Morphologisch waren somit am Sphärenrand, mit direktem Kontakt zum Nährmedium, deutliche Signale einer Ausdifferenzierung der Zellkörper zu erkennen (Abb. 22).

Dessen ungeachtet irritierte die deutlich verstärkte mRNA-Expression dieses Differenzierungsmarkers (*GFAP*) in Gr.T zuerst. Jedoch machten Gursel et al. ähnliche Beobachtungen, wo stammzellisolierte Kulturen eine verstärkte *GFAP*-Expression zusammen mit einer gesteigerter *NESTIN*- wie *MUSASHI-1*-Expression zeigten

(Gursel et al. 2011). Die in der Literatur beschriebene parallele Expression von Vorläufermarkern wie Nestin und dem Differenzierungsmarker GFAP (Kyurkchiev 2014) bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Es bleibt weiterhin zu beachten, dass das Isolationsprotokoll markerunabhängig nach Zellgröße und -dichte selektierte. Es lag daher sicherlich eine Mischkultur aus stammzellähnlichen, differenzierenden und ausdifferenzierten Glioblastomzellen vor. Dergleichen existieren Hinweise, dass sich GFAP-positive Zellen um GFAP-negative Tumorstammzellen gruppieren (Kanemura et al. 2001). Ob die Zellen der Gr.T potentiell proliferative „Ableger“ hervorbrachten oder die stammzellähnlichen Zellen in Wechselwirkung standen, ist an dieser Stelle nicht zu beurteilen.

Andererseits könnte vielmehr ein indirekter, methodisch bedingter Effekt in den Vergleichskulturen vorliegen, da bekanntlich eine verringerte *GFAP*-Expression potentiell im Zusammenhang mit ansteigenden Passagierungsraten der verwendeten kryokonservierten und kommerziellen Vergleichszellkulturen steht (Sergent-Tanguy et al. 2006, Pekny et al. 1998). Kommerzielle Zelllinien zeichnen sich durch einen Signalverlust der Intermediärfilamente GFAP und Nestin aus, insbesondere U87 (Restrepo et al. 2011), deren Signal auch in dieser Analyse schwächer gegenüber Gr.T ausfiel.

Gleichwohl signalisierte dennoch die verstärkte Expression von *GFAP* sowie insbesondere von *NESTIN* und *NOTCH-1*, die im Zusammenhang mit neuronaler Migration (Tohyama et al. 1992) und Invasivität in Gliomen stehen (Ishiwata et al. 2011, Zhang et al. 2012), in Gr.T bereits auf mRNA-Ebene, trotz „ruhender“ metabolischer Aktivität, eine stärkere Proliferationsbereitschaft gegenüber den Vergleichsgruppen. Ein verstärkter Expansionstrieb wird unter optimalen Bedingungen (hier serumhaltiges Nährmedium) in der Migrationsanalyse offensichtlich wirksam und bescheinigt diesen Zellen eine verstärkte Proliferationsneigung. Hierzu wurde eingangs bereits dargelegt (Kapitel 1.3), dass eine verstärkte *Proliferation* gegenüber Vergleichspopulationen ein beschriebenes Schlüsselattribut stammzellähnlicher Tumorzellen repräsentiert (Nduom et al. 2012).

Dies begründet nach vielen Übersichtsarbeiten die rasche Tumorprogression samt der schlechteren Prognose mit expansiven, stammzellassozierten Zellsubpopulationen im Glioblastom (Germano und Binello 2014, Seymour et al. 2015, Jackson et al. 2015, Kong et al. 2008).

5.2.4 Resultierende Zielmarker

Die 10- bis 150-fache, durchgehend signifikant erhöhte *NESTIN*-Expression in den Zellen der Gr.T ist augenfällig. Der neuronale Vorläufermarker wurde in vergangenen Arbeiten als Malignitätsfaktor angesehen und mit einer schlechten Prognose bei aufsteigendem Gliomgrad assoziiert (Strojnič et al. 2007, Wan et al. 2011). Nestin geht auf mRNA-Ebene mit einer Gliomprogression ins umliegende Gewebe einher (Kong et al. 2008). Andererseits sprach eine multivariate Studie Nestin diese Korrelation auf Basis der immunhistochemischen Analysen von Gewebeproben wieder ab (Kim et al. 2011), was deren abschließende Bedeutung in Hinsicht von selektierten In-vitro-Isolaten keinesfalls klärt. Dennoch trat Nestin in der Kombination mit CD133 als prognostischer Faktor hervor und gilt weiterhin als vielversprechender Marker (Dahlrot et al. 2013a, Zhang et al. 2008). Nestin scheint dabei als Marker für stammzellassoziierte Sphärenkulturen sogar gänzlich unabhängig von CD133 zu sein (Wang et al. 2008a).

Zwar ist es möglich Gr.T eine grundsätzliche Differenzierungsbereitschaft im Sphärenmedium auf Transkriptionsebene, durch die Kenntnis der Expression der anderen Marker (*GFAP* und *NOTCH-1*), zu unterstellen. Jedoch war dies bei Gr.V₂ und V₃ nicht reproduzierbar und könnte ein Effekt der voraus bemerkten höheren Dichte oder Potenz von Tumorstammzellen sein.

Bereits in Studien mit In-vitro-Substanztests (TGF- β) konnte gezeigt werden, dass eine *MUSASHI-1/NESTIN*-Expression mit einem sphärenstabilisierenden Effekt einherging (Penuelas et al. 2009). Kürzlich postulierte Jin et. al Nestin als vielversprechenden Oberflächenmarker zur Isolation und Charakterisierung von Gliomstammzellen (Jin et al. 2013).

Musashi-1 scheint auch nach diesen Daten ein sicherer Marker für stammzellassoziierte Tumorzellen zu sein. Dies wird durch die starke Expression in der stammzellisolierten, wie auf physiologischer Ebene stammzellpotenteren, Gr.T gegenüber den Referenzgruppen gestützt.

MUSASHI-1 soll auf mRNA-Ebene bereits in der Frühphase eines infiltrierenden Gliomstadiums verstärkt exprimiert sein, wie auch gesteigert in der Progression (Kong et al. 2008). Mehrere Arbeiten bescheinigten optimistisch Musashi-1 eine prognostische Bedeutung, obwohl Metaanalysen dies nicht belegen konnten (Dahlrot et al. 2013a). Insgesamt ist derzeit die Datenlage diesbezüglich aber noch nicht so umfangreich wie bei CD133. Unbestritten ist der neurogene Vorläufermarker Musashi-

1 ein Kennzeichen für physiologische Progenitor- wie Tumorstamm- bzw. Progenitorzellen (Kanemura et al. 2001) und besitzt entscheidenden Einfluss zur Bildung und Erhaltung von Sphärenformationen (Sakakibara et al. 2002). Auch in stammzellähnlichen Bronchialkarzinomkulturen konnte über die Herunterregulation von Musashi-1 durch virale Transfektion mit shRNA (*Small hairpin RNA*) eine sphäroide Entwicklung gebremst werden (Wang et al. 2013). Gleichfalls reguliert Musashi-1 über Notch(-1) und den Wnt-Signalweg die Expansion und Migration von physiologischen Progenitorzellen (Wang et al. 2008b).

Allerdings war auch in allen kommerziellen Zelllinien (Gr.V_Z) eine mRNA-Expression für dieses RNA-bindende Protein belegbar, aber nur die Hälfte exprimierte *CD133*, sodass diese Zellen sich keineswegs von den anderen Gruppen abhoben. Gr.V_Z schien mit einer 680-fach niedrigeren Musashi-1-Expression gegenüber Gr.T das geringste Stammzellpotential zu besitzen. In der Literatur wird das Stammzellpotential kommerzieller Zelllinien kontrovers diskutiert, ließen sich doch in gegensätzlichen Kulturbedingungen Stammzellfaktoren, auch Musashi-1, nachweisen (Kondo et al. 2004, Iacopino et al. 2014, Hong et al. 2012). Die Zelllinie U373 weist jedoch offensichtlich darunter eine verstärkte Expression stammzellassoziierender Faktoren auf (Hong et al. 2012), wie sich hier in der vergleichbaren *CD133*- und *MUSASHI-1*-Expression bestätigt.

Daneben gab es nur eine geringe Divergenz zwischen der adhärennten Gr.V_P und ihrem sphäreninduzierten Zwilling Gr.V_S, was eher gegen eine alleinige Induktion von Musashi-1 infolge des Nährmediumwechsels spricht.

Muto et al. hatte ebenfalls über eine Musashi-1-Blockade mit Einbringen von shRNA in Zelllinien das Überleben der Sphären signifikant reduziert, die Größe verringert und den Notch-Signalweg mit Notch-1 herunterreguliert (Muto et al. 2012). Beide Faktoren wurden so wiederholt in Abhängigkeit gebracht. Aufgrund der alternierenden verstärkten Expression beider Faktoren gegenüber den Vergleichsgruppen erscheint diese Abhängigkeit auch nach dieser Studie denkbar.

Notch-1 wurde eingangs als Differenzierungsfaktor besprochen und unter dieser Unterstellung mit einbezogen, insbesondere da seine Aktivität die Differenzierung von physiologischen Stammzellen anschiebt.

Jedoch bewiesen bereits Shih und Holland, dass eine verstärkte Notch-1-Expression bei weitem noch keine Zellexpansion verursacht, sondern die Nestin-Expression stimuliert, sodass sie Notch-1 vielmehr als stammzellcharakterisierenden Faktor

vermuteten (Shih und Holland 2006). Weitere Daten weisen in die gleiche Richtung, die zeigen, dass seine Aktivität ebenfalls ein undifferenziertes Stadium stammzellassoziierter Gliomzellen in vitro aufrechterhält (Fan et al. 2006).

Auch in diesen Untersuchungen ging die vergleichsweise stärkste *NOTCH-1*-Expression mit den eher im Zellstoffwechsel ruhenden Sphärenkulturen der stammzellisolierten Gr.T einher. Dementsprechend scheint Notch-1 in neuronalen Stammzellen ein undifferenziertes Zellstadium unter Hypoxie, über Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor *Hypoxie-induzierter Faktor-Alpha* (HIF1 α), aufrecht zu erhalten (Gustafsson et al. 2005). Ebenfalls wurden in dieser Arbeit alle Sphärenkulturen durch Stickstoffzufuhr unter sauerstoffarmen Bedingungen inkubiert. Daneben existieren neuerdings Hinweise, dass Notch eine generelle Bedeutung zur Sphärenentwicklung bei stammzellähnlichen Gliomzellen hat (Gunther et al. 2008).

Zwar zeigten auch die im Sphärenmedium kultivierten Vergleichsgruppen V_S und V_Z gegenüber der adhärennten Gr. V_P eine erhöhte *NESTIN* und *NOTCH-1*-Expression, jedoch mit z.T. marginalen Unterschieden und ohne Signifikanz. Dagegen war die Expression der *NESTIN-NOTCH-1*-Korrelation von Gr.T (ΔCt 3,13/5,46) entgegengesetzt zu Gr. V_P und V_S (ΔCt 10,37/8,85 bzw. 9,67/8,36), sodass zu erwägen ist, die *NOTCH-1*-Expression eher als intrinsische Eigenschaft von Gr.T zu bewerten. Insgesamt werden den einzelnen Notch-Signalkomplexen derzeit vielschichtige Rollen in Bezug zu stammzellähnlichen Tumorzellen zugerechnet (Teodorczyk und Schmidt 2014). Die Inhibition von Notch-1 in Zelllinien führt zu vermehrter Apoptose (Purow et al. 2005), verminderter Expression von GFAP und Vimentin sowie zum Proliferationsstopp (Kanamori et al. 2007), dagegen fördert es Migration und Invasivität in kommerziellen Zelllinien (Zhang et al. 2012).

Zusammengefasst unterstützen die signifikant positiven *Spearman*-Korrelationen zumindest die Abhängigkeit dieser drei Faktoren *MUSASHI-1*, *NESTIN* und *NOTCH-1*. Unter Kenntnisnahme der Literatur lässt sich vereinfacht formulieren, dass Musashi-1 Notch-1 reguliert (Muto et al. 2012) und Notch-1 die Nestin-Expression gleichgerichtet beeinflusst (Shih und Holland 2006). In dieser Überlegung würde Musashi-1 etwaig als Ausgangspunkt der erhöhten Expression beider anderen Faktoren in Gr.T gegenüber den Vergleichsgruppen fungieren.

5.3 Ausblicke

Grundsätzlich umfasst die Implementierung erweiterter Therapiestrategien gegen radio- wie chemoresistente, stammzellähnliche Gliomzellen vorangehende Kenntnisse über deren Biologie.

Zukünftige Therapieansätze werden unter anderem über den indirekten Angriff auf stammzellfördernde Faktoren, wie beispielsweise die Neoangiogenese (VEGF), Signalverstärkung (mTOR), Apoptose (p53 und STAT3) und Hypoxie-induzierende Faktoren (HIF), gesehen. Weitere Möglichkeiten eröffnen sich eventuell bei der induzierten Ausdifferenzierung dieser Population (Germano und Binello 2014).

Die Tumore scheinen nach tumorbiologischer Auslese zur Erhaltung ihrer Vitalität auf individuelle Faktorenkombinationen zuzugreifen, wobei wohl die Charakterisierung eines übergreifenden Musters, anstatt einzelner Marker, von Bedeutung ist (Gunther et al. 2008, Dahlrot et al. 2013, Venere et al. 2011).

In Bezug zu dieser Arbeit sollte daher die Anzahl der untersuchten Proben erhöht werden, um die Resultate zu erhärten und Tendenzen zu festigen. Dafür ist es vorteilhaft, in der Betrachtung multiple stammzellcharakterisierende Marker weiterhin zu korrelieren und gegebenenfalls das Markerspektrum zu erweitern. Es ist angebracht, die Verifizierung des Faktorenverhältnisses auf Proteinebene beispielsweise via Westernblot an- und im Mausmodell abzuschließen.

Für die weiterführenden Arbeiten am Sphärenmodell hinsichtlich Tumorstammzellmarker als Therapietarget oder In-vivo-Verhalten im Tiermodell sind diese Faktoren mit zu berücksichtigen. Den Vorteil der sphäreninduzierten Kulturen aus adhärennten Primärkulturen stellt die zügigere Generierung der Sphärenformationen mit dem Oberflächenmarker CD133 dar. Jedoch besteht die Gefahr, dass im Zuge der Generationszeiten die Fähigkeit, Sphären zu bilden, verloren geht. Im Zusammenhang mit der Anwesenheit von CD133 auf Proteinebene sind sie kommerziellen Zelllinien, abgesehen von U373, voraus. Gleichwohl reicht das sphäreninduzierte Modell, auch aufgrund der Ergebnisse dieser Studie, nicht an stammzellisolierte Kulturen heran.

Weitere Möglichkeiten bietet ein neues Verfahren zur Indizierung von Stammzellenspezifika in somatischen Zellen durch modifizierte mRNA (Mandal und Rossi 2013, Miller et al. 2013), was schon mit Pluripotenzfaktoren erfolgreich in vitro durchgeführt wurde (Mormone et al. 2014). Transfektionsstudien würden sich

gleichermaßen für Notch, wenn auch indirekt über Transkription fördernde Moleküle wie *Bcl-w* (Lee et al. 2014) für Musashi-1, anbieten. Somit könnten ausdauernde Kulturen für weitergehende pharmakologische In-vitro-Analysen, beispielsweise mit dem erwähnten 5-ALA, bestimmten mTOR-Inhibitoren (Daniele et al. 2015) oder den neuen Immuntherapiestrategien durch Gebrauch onkozytärer viraler Vektoren (Calinescu et al. 2015), erzeugt werden.

In Metaanalysen wird Musashi-1 derzeit in anaplastischen Astrozytomen als prognostisch ungünstiger Marker, paradoxerweise in Glioblastomen eher als günstiges Kriterium betrachtet. Ungünstige Prognosen ergaben sich für hochgradige Gliome gleichfalls bezüglich der Nestin-Expression, auch in der Kombination mit CD133 (Dahlrot et al. 2013b).

Übersichtsarbeiten sehen die Möglichkeit, die rezidivfreie Zeit über einen Eingriff in den Notch-Signalweg zu verlängern (Kalkan 2015). Einige Autoren sehen den an der Zelloberfläche lokalisierten und mit dem Notch-Rezeptor korrespondierenden Transmembranliganten *Jagged1* als zukünftiges Therapieziel (Dai et al. 2014). Aussagen zur Bedeutung von Notch als prognostischen Marker oder Therapietarget sind derzeit spärlich. Eine Arbeit favorisiert Notch-1 als unabhängigen, prognostischen Faktor, wobei die zunehmende Expressionsstärke mit einem schlechteren Outcome einherging (Li et al. 2011). Andererseits ist dieser Faktor Gegenstand intensiver Forschung personalisierter Therapien (Teodorczyk und Schmidt 2014).

6 Schlussfolgerung

Zusammengefasst ist die Fähigkeit zur Sphärenbildung als alleiniges Kriterium zur Definition stammzellähnlicher Tumorzellen unzureichend.

Sphärogenese gelang in Abhängigkeit der Kulturbedingung unabhängig von der Ausgangzellkultur in diesem Fall durch ein serumfreies Sphärenmedium.

Die nach einem beschriebenen Stammzellisoliationsprotokoll generierten Tumorsphären (Gr.T) unterschieden sich wiederum von den vorweg adhären, sphäreninduzierten Referenzgruppen (Zelllinien und Primärkulturen) signifikant auf zellulärer Ebene durch stammzellassozierte Merkmale, wie einer niedrigen metabolischen Aktivität mit längerer Sphärogenesedauer und stärkerer Migrationstendenz. Dies setzte sich signifikant bei einer Reihe der analysierten Entwicklungsmarker auf Ebene der Genexpression in den Stammzellisolierten gegenüber allen drei Vergleichsgruppen fort, wobei Letztgenannte sich auf allen untersuchten Ebenen nicht voneinander abgrenzten.

Dieser Sachverhalt ist bei künftigen Fragestellungen weiter zu beachten. Mit Blickpunkt auf stammzellassozierte Zellkulturen präferiert diese Arbeit die Anzucht auf der Grundlage von Stammzellisoliationsprotokollen.

Die Ergebnisse belegen erneut, dass Tumorsphären, unabhängig von ihrer Ausgangskultur, CD133 auf Proteinebene exprimieren. CD133 war hier, für sich genommen oder unter der Beachtung der hier zusätzlich untersuchten stammzellassozierten Faktoren, selbst kein Marker stammzellpotente Tumorsphären herauszustellen.

Die signifikant vermehrte Expression des neurogenen Stammzellmarkers *MUSASHI-1* in den isolierten Tumorsphären (Gr.T) war kennzeichnend für diese Zellisolation und lässt ein hohes Potential stammzellähnlicher Zellen in diesen Sphären vermuten. Musashi-1 bestätigte sich folglich als vielversprechender Stammzellmarker dieser Studie.

Die verstärkte Expression der Marker *NESTIN* und *NOTCH-1* trat in diesem Zusammenhang signifikant hervor und schien mit diesen Kulturen assoziiert zu sein.

Schlussendlich ist es für die weiterführenden Arbeiten am Sphärenmodell angebracht, Musashi-1 als potentiellen Referenzmarker zu betrachten und weiter hervorgetretene Marker, wie Nestin und Notch-1, zusätzlich mit einzubeziehen und deren Rolle durch fortgehende Arbeiten zu klären.

Anhang

I. Literaturverzeichnis

- Aaberg-Jessen C, Norregaard A, Christensen K, Pedersen CB, Andersen C, Kristensen BW. 2013. Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. *Int J Clin Exp Pathol*, 6 (4):546-560.
- Azari H, Millette S, Ansari S, Rahman M, Deleyrolle LP, Reynolds BA. 2011. Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp*, (56):e3633.
- Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25 (2):500-510.
- Bansal N, Banerjee D. 2009. Tumor initiating cells. *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (2):192-196.
- 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 (7120):756-760.
- Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. 2005. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 65 (8):3025-3029.
- Beckman G, Beckman L, Ponten J, Westermark B. 1971. G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells. *Hum Hered*, 21 (3):238-241.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, 67 (9):4010-4015.
- Bernstein A. 2007. Cancer stem cells: the centrality of translational research to cancer control. *CMAJ*, 176 (1):29-30.
- Besteher B. 2013. Migrationsanalysen an den humanen Glioblastomzelllinien U373MG und U87MG unter Anwendung von Medikamenten des klinischen Alltags. [Dissertation]: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bigner DD, Bigner SH, Ponten J, Westermark B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ. 1981. Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 40 (3):201-229.
- Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3 (7):730-737.
- Boots-Sprenger SH, Sijben A, Rijntjes J, Tops BB, Idema AJ, Rivera AL, Bleeker FE, Gijtenbeek AM, Diefes K, Heathcock L, Aldape KD, Jeuken JW, Wesseling P.

-
2013. Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. *Mod Pathol*, 26 (7):922-929.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35 (5):567-576.
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. 2007. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc*, 82 (10):1271-1286.
- Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Lanotte M, Cassoni P, Schiffer D. 2011. Antigenic and Genotypic Similarity between Primary Glioblastomas and Their Derived Neurospheres. *J Oncol*, 2011:314962.
- Calinescu AA, Kamran N, Baker G, Mineharu Y, Lowenstein PR, Castro MG. 2015. Overview of current immunotherapeutic strategies for glioma. *Immunotherapy*, 7 (10):1073-1104.
- Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, Bonatto D. 2013. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev*, 22 (9):1455-1476.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168 (4):357-363.
- 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, VandenBerg 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 (4):362-375.
- Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, Hell JW. 2008a. NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. *J Neurosci Methods*, 171 (2):239-247.
- Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH. 2008b. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*, 3 (7):e2637.
- Cheng JX, Liu BL, Zhang X. 2009. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat Rev*, 35 (5):403-408.
- Chong YK, Toh TB, Zaiden N, Poonepalli A, Leong SH, Ong CE, Yu Y, Tan PB, See SJ, Ng WH, Ng I, Hande MP, Kon OL, Ang BT, Tang C. 2009. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells*, 27 (1):29-39.
- Christie KJ, Turnley AM. 2012. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci*, 6:70.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66 (19):9339-9344.

-
- Coupienne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J. 2011. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci*, 10 (12):1868-1878.
- Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, Weber DC, Ricardi U, Slowinski J, Brandes A, group Rw. 2012. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*, 48 (10):1532-1542.
- Croteau D, Mikkelsen T. 2001. Adults with newly diagnosed high-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol*, 2 (6):507-515.
- Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW. 2013a. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol*, 6 (3):334-348.
- Dahlrot RH, Hansen S, Herrstedt J, Schroder HD, Hjelmberg J, Kristensen BW. 2013b. Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. *J Neurooncol*, 115 (3):453-461.
- Dahlrot RH, Hansen S, Jensen SS, Schroder HD, Hjelmberg J, Kristensen BW. 2014. Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int J Clin Exp Pathol*, 7 (7):3739-3751.
- Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. 1992. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*, 52 (19):5334-5341.
- Dai Y, Wilson G, Huang B, Peng M, Teng G, Zhang D, Zhang R, Ebert MP, Chen J, Wong BC, Chan KW, George J, Qiao L. 2014. Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 5:e1170.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, 58:267-284.
- Daniele S, Costa B, Zappelli E, Da Pozzo E, Sestito S, Nesi G, Campiglia P, Marinelli L, Novellino E, Rapposelli S, Martini C. 2015. Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells. *Sci Rep*, 5:9956.
- de Tribolet N, Martin-Achard A, Diserens AC, Schnegg JF, Zander E. 1979. [Cultures of tissue from central nervous system tumors. Part 1. Neuroglial tumors]. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr*, 125 (1):59-71.
- Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A. 2009. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia*, 57 (7):724-733.
- Elsir T, Edqvist PH, Carlson J, Ribom D, Bergqvist M, Ekman S, Popova SN, Alafuzoff I, Ponten F, Nister M, Smits A. 2014. A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: identification of Nanog as a predictor of survival. *Int J Cancer*, 134 (5):1123-1131.
- Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG. 2006. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*, 66 (15):7445-7452.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 65 (20):9328-9337.

-
- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26 (8):1931-1938.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64 (19):7011-7021.
- 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 (1):40-48.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300 (5618):489-492.
- Germano I, Swiss V, Casaccia P. 2010. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology*, 58 (6):903-910.
- Germano IM, Binello E. 2014. Stem cells and gliomas: past, present, and future. *J Neurooncol*, 119 (3):547-555.
- Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Hohn J, Freund D, Giesen K, Fischer J, Kogler G, Wernet P. 2004. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 104 (8):2332-2338.
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Jr., Mehta MP. 2014. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, 370 (8):699-708.
- Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. 2008. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27 (20):2897-2909.
- Gursel DB, Beyene RT, Hofstetter C, Greenfield JP, Souweidane MM, Kaplitt M, Arango-Lievano M, Howard B, Boockvar JA. 2011. Optimization of glioblastoma multiforme stem cell isolation, transfection, and transduction. *J Neurooncol*, 104 (2):509-522.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 9 (5):617-628.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hasselbach LA, Irtenkauf SM, Lemke NW, Nelson KK, Berezovsky AD, Carlton ET, Transou AD, Mikkelsen T, deCarvalho AC. 2014. Optimization of high grade glioma cell culture from surgical specimens for use in clinically relevant animal models and 3D immunochemistry. *J Vis Exp*, (83):e51088.

-
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (25):15178-15183.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*, 25 (1):55-57.
- Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. 2012. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int J Oncol*, 41 (5):1693-1700.
- Hough SR, Clements I, Welch PJ, Wiederholt KA. 2006. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem Cells*, 24 (6):1467-1475.
- Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. 2007. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol*, 17 (3):191-203.
- Hueng DY, Sytwu HK, Huang SM, Chang C, Ma HI. 2011. Isolation and characterization of tumor stem-like cells from human meningiomas. *J Neurooncol*, 104 (1):45-53.
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*, 23 (8):1035-1043.
- Iacopino F, Angelucci C, Piacentini R, Biamonte F, Mangiola A, Maira G, Grassi C, Sica G. 2014. Isolation of cancer stem cells from three human glioblastoma cell lines: characterization of two selected clones. *PLoS One*, 9 (8):e105166.
- Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K. 2007. Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Curr Opin Oncol*, 19 (6):606-611.
- Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. 2011. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem*, 286 (48):41434-41441.
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. 1999. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*, 9 (3):469-479.
- Ishiwata T, Teduka K, Yamamoto T, Kawahara K, Matsuda Y, Naito Z. 2011. Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncol Rep*, 26 (1):91-99.
- Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. 2015. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*, 36 (2):177-185.
- Jin X, Jin X, Jung JE, Beck S, Kim H. 2013. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 433 (4):496-501.
- Johnson S, Chen H, Lo P-K. 2013. In vitro tumorsphere formation assays. *Bio-protocol*, 3 (3):2/5/2013.
- Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, Park WY, Lee DS, Kim H, Nam DH. 2008. Clinical and

- biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest*, 88 (8):808-815.
- Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS. 2002. Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp Neurol*, 178 (2):288-293.
- Kalkan R. 2015. Therapeutic Potential of Glioblastoma Stem Cells. *MOJ Cell Science & Report* 2,2:24.
- Kamoshima Y, Terasaka S, Kuroda S, Iwasaki Y. 2011. Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Neurol Res*, 33 (7):739-746.
- Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, Pieper RO. 2007. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 106 (3):417-427.
- Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H. 2000. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*, 22 (1-2):139-153.
- Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N. 2001. Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation*, 68 (2-3):141-152.
- Kaneshiro D, Kobayashi T, Chao ST, Suh J, Prayson RA. 2009. Chromosome 1p and 19q deletions in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17 (6):512-516.
- Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP. 2010. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res*, 70 (2):719-729.
- Kim KJ, Lee KH, Kim HS, Moon KS, Jung TY, Jung S, Lee MC. 2011. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology*, 31 (5):494-502.
- Kondo T, Setoguchi T, Taga T. 2004. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (3):781-786.
- Kong DS, Kim MH, Park WY, Suh YL, Lee JI, Park K, Kim JH, Nam DH. 2008. The progression of gliomas is associated with cancer stem cell phenotype. *Oncol Rep*, 19 (3):639-643.
- Kyurkchiev D. 2014. Cancer stem cells from glioblastoma multiforme: culturing and phenotype. *OA Stem Cells*, 2014 Feb 10; :2(1):3.
- la Fougere C, Suchorska B, Bartenstein P, Kreth FW, Tonn JC. 2011. Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations. *Neuro Oncol*, 13 (8):806-819.
- Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, Angenieux B, Orozco NM, Foran I, Yong WH, Vinters HV, Liau LM, Lazareff JA, Mischel PS, Cloughesy TF, Horvath S,

- Kornblum HI. 2009. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells*, 27 (4):980-987.
- Lathia JD, Hitomi M, Gallagher J, Gadani SP, Adkins J, VasANJI A, Liu L, Eyler CE, Heddeleston JM, Wu Q, Minhas S, Soeda A, Hoepfner DJ, Ravin R, McKay RD, McLendon RE, Corbeil D, Chenn A, Hjelmeland AB, Park DM, Rich JN. 2011. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis*, 2:e200.
- 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 (5):391-403.
- Lee WS, Kwon J, Yun DH, Lee YN, Woo EY, Park MJ, Lee JS, Han YH, Bae IH. 2014. Specificity protein 1 expression contributes to Bcl-w-induced aggressiveness in glioblastoma multiforme. *Mol Cells*, 37 (1):17-23.
- Lehrer S. 2010. Anopheles mosquito transmission of brain tumor. *Med Hypotheses*, 74 (1):167-168.
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. 2012. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, 31 (11):1354-1365.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60 (4):585-595.
- Li J, Cui Y, Gao G, Zhao Z, Zhang H, Wang X. 2011. Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma. *J Surg Oncol*, 103 (8):813-817.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5:67.
- Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, Junker M, Oefner PJ, Bogdahn U, Wischhusen J, Spang R, Storch A, Beier CP. 2010. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res*, 70 (5):2030-2040.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2):97-109.
- Lu H, Searle K, Liu Y, Parker T. 2012. The effect of dimensionality on growth and differentiation of neural progenitors from different regions of fetal rat brain in vitro: 3-dimensional spheroid versus 2-dimensional monolayer culture. *Cells Tissues Organs*, 196 (1):48-55.
- Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. 1990. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*, 8 (7):1277-1280.
- Mandal PK, Rossi DJ. 2013. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat Protoc*, 8 (3):568-582.
- Marie SK, Shinjo SM. 2011. Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo)*, 66 Suppl 1:33-43.

-
- Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. 2012. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 38 (3):271-291.
- McComb RD, Burger PC. 1985. Pathologic analysis of primary brain tumors. *Neurol Clin*, 3 (4):711-728.
- Miller G. 2009. Brain cancer. A viral link to glioblastoma? *Science*, 323 (5910):30-31.
- Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim JW, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L. 2013. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*, 13 (6):691-705.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90 (12):5013-5021.
- Morgan TH. 1917. The theory of the gene. *The American Naturalist*, 51:513-544.
- Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, Okano H, Taya M, Kanemura Y. 2006. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res*, 84 (8):1682-1691.
- Mormone E, D'Sousa S, Alexeeva V, Bederson MM, Germano IM. 2014. "Footprint-free" human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes for in vivo cell-based therapy. *Stem Cells Dev*, 23 (21):2626-2636.
- Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Okano H. 2012. RNA-binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways. *PLoS One*, 7 (3):e33431.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*, 65 (8):3307-3318.
- Nduom EK, Hadjipanayis CG, Van Meir EG. 2012. Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment. *Cancer J*, 18 (1):100-106.
- Neuzil J, Stantic M, Zabalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, Dong L, Andera L, Ralph SJ. 2007. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun*, 355 (4):855-859.
- Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, Kang J, Assanah M, McKhann GM, Sisti MB, McCormick PC, Canoll P, Bruce JN. 2008. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*, 62 (2):505-514; discussion 514-505.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19 (4):764-772.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, 88 (4):844-856.
- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280 (7):5307-5317.

-
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. 2013. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*, 15 Suppl 2:ii1-56.
- Pan G, Thomson JA. 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*, 17 (1):42-49.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. 2011. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8 (5):486-498.
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. 2014. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*, 13 (7):497-512.
- Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Malheiros SM, Brandt RA, Cavalheiro S, Gamarra LF. 2014. In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front Neurol*, 4:214.
- Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C. 1998. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Experimental Cell Research*, 239 (2):332-343.
- Penuelas S, Anido J, Prieto-Sanchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, Garcia-Dorado D, Poca MA, Sahuquillo J, Baselga J, Seoane J. 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell*, 15 (4):315-327.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6):509-515.
- Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, Jacobsen SE, Nuber UA. 2007. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res*, 67 (12):5727-5736.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, 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 (3):157-173.
- Piccirillo SG, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, Watts C. 2012. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer*, 107 (3):462-468.
- Ponten J, Macintyre EH. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 74 (4):465-486.
- Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. 2005. Expression of

- Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res*, 65 (6):2353-2363.
- Rampazzo E, Della Puppa A, Frasson C, Battilana G, Bianco S, Scienza R, Basso G, Persano L. 2014. Phenotypic and functional characterization of Glioblastoma cancer stem cells identified through 5-aminolevulinic acid-assisted surgery. *J Neurooncol*, 116 (3):505-513.
- Rappa G, Mercapide J, Anzanello F, Prasmickaite L, Xi Y, Ju J, Fodstad O, Lorico A. 2008. Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets. *Exp Cell Res*, 314 (10):2110-2122.
- Rees JH, Smirniotopoulos JG, Jones RV, Wong K. 1996. Glioblastoma multiforme: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, 16 (6):1413-1438; quiz 1462-1413.
- Reifenberger G, Bilzer T, Seitz RJ, Wechsler W. 1989. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in ethylnitrosourea-induced rat gliomas and glioma cell lines. *Acta Neuropathol*, 78 (3):270-282.
- Restrepo A, Smith CA, Agnihotri S, Shekarforoush M, Kongkham PN, Seol HJ, Northcott P, Rutka JT. 2011. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. *Neuro Oncol*, 13 (1):42-50.
- Reuss D, von Deimling A. 2009. Hereditary tumor syndromes and gliomas. *Recent Results Cancer Res*, 171:83-102.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414 (6859):105-111.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 12 (11):4565-4574.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445 (7123):111-115.
- Richichi C, Brescia P, Alberizzi V, Fornasari L, Pelicci G. 2013. Marker-independent method for isolating slow-dividing cancer stem cells in human glioblastoma. *Neoplasia*, 15 (7):840-847.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280 (26):24731-24737.
- Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, Ueda S, Uchiyama Y, Noda T, Okano H. 2002. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (23):15194-15199.
- Scherer HJ. 1940. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry*, 3 (2):147-177.
- Schmitt K, Daubener W, Bitter-Suermann D, Hadding U. 1988. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods*, 109 (1):17-25.

-
- Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, Wehner R, Schackert G, Schackert HK, Fussel M, Bachmann M, Rieber EP, Weigle B. 2007. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*, 96 (8):1293-1301.
- Scott CS, Jinot J. 2011. Trichloroethylene and cancer: systematic and quantitative review of epidemiologic evidence for identifying hazards. *Int J Environ Res Public Health*, 8 (11):4238-4272.
- Seaberg RM, van der Kooy D. 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*, 26 (3):125-131.
- Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P. 2006. Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of Nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *Journal of Neuroscience Research*, 83 (8):1515-1524.
- Seymour T, Nowak A, Kakulas F. 2015. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Oncol*, 5:159.
- Shay JW, Wright WE. 2010. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *Febs Letters*, 584 (17):3819-3825.
- Sherman JH, Redpath GT, Redick JA, Purow BW, Laws ER, Jane JA, Jr., Shaffrey ME, Hussaini IM. 2011. A novel fixative for immunofluorescence staining of CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Neurosci Methods*, 198 (1):99-102.
- Shibahara I, Sonoda Y, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Watanabe T, Ishioka C, Tominaga T. 2013. The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence. *Neuro Oncol*, 15 (9):1151-1159.
- Shih AH, Holland EC. 2006. Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia*, 8 (12):1072-1082.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63 (18):5821-5828.
- Stiles CD, Rowitch DH. 2008. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*, 58 (6):832-846.
- Strojnik T, Rosland GV, Sakariassen PO, Kavalar R, Lah T. 2007. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol*, 68 (2):133-143; discussion 143-134.
- Stupp R, Weber DC. 2005. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*, 28 (6-7):315-317.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiation Oncology G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 10 (5):459-466.

- Tang H, Gong Y, Mao Y, Xie Q, Zheng M, Wang D, Zhu H, Wang X, Chen H, Chen X, Zhou L. 2012. CD133-Positive Cells Might Be Responsible for Efficient Proliferation of Human Meningioma Cells. *Int J Mol Sci*, 13 (5):6424-6439.
- Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. 2011. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer*, 104 (5):798-807.
- Teodorczyk M, Schmidt MH. 2014. Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. *Front Oncol*, 4:341.
- Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn JC, Goldbrunner R. 2010. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci*, 43 (1):51-59.
- Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ. 1992. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest*, 66 (3):303-313.
- Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, Chen Z, Yoshimoto K, Mischel PS, Cloughesy TF, Liao LM, Nelson SF. 2006. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res*, 4 (9):607-619.
- Tsutsui Y. 2009. Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development. *Congenit Anom (Kyoto)*, 49 (2):47-55.
- Uchida K, Mukai M, Okano H, Kawase T. 2004. Possible oncogenicity of subventricular zone neural stem cells: case report. *Neurosurgery*, 55 (4):977-978.
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (26):14720-14725.
- van den Bent MJ, Wefel JS, Schiff D, Taphoorn MJ, Jaeckle K, Junck L, Armstrong T, Choucair A, Waldman AD, Gorlia T, Chamberlain M, Baumert BG, Vogelbaum MA, Macdonald DR, Reardon DA, Wen PY, Chang SM, Jacobs AH. 2011. Response assessment in neuro-oncology (a report of the RANO group): assessment of outcome in trials of diffuse low-grade gliomas. *Lancet Oncol*, 12 (6):583-593.
- Venere M, Fine HA, Dirks PB, Rich JN. 2011. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia*, 59 (8):1148-1154.
- Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. 2015. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*, 3 (7):95.
- Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F. 2011. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (38):16062-16067.
- Walker C, Baborie A, Crooks D, Wilkins S, Jenkinson MD. 2011. Biology, genetics and imaging of glial cell tumours. *Br J Radiol*, 84 Spec No 2:S90-106.
- Wan F, Herold-Mende C, Campos B, Centner FS, Dictus C, Becker N, Devens F, Mogler C, Felsberg J, Grabe N, Reifenberger G, Lichter P, Unterberg A,

-
- Bermejo JL, Ahmadi R. 2011. Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomarkers*, 16 (2):136-143.
- Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PO. 2008a. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 122 (4):761-768.
- Wang XY, Yin Y, Yuan H, Sakamaki T, Okano H, Glazer RI. 2008b. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. *Mol Cell Biol*, 28 (11):3589-3599.
- Wang XY, Yu H, Linnoila RI, Li L, Li D, Mo B, Okano H, Penalva LO, Glazer RI. 2013. Musashi1 as a potential therapeutic target and diagnostic marker for lung cancer. *Oncotarget*, 4 (5):739-750.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (23):12425-12430.
- Weiß C. 2010. *Basiswissen medizinische Statistik*. 5.Auflage: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hrsg. 2015. Weller, M.; *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie Gliome*. Herausgegeben von der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, [1]: 46.
- Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. 2010. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol*, 28 (11):1963-1972.
- Wilczynska KM, Singh SK, Adams B, Bryan L, Rao RR, Valerie K, Wright S, Griswold-Prenner I, Kordula T. 2009. Nuclear factor I isoforms regulate gene expression during the differentiation of human neural progenitors to astrocytes. *Stem Cells*, 27 (5):1173-1181.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360 (8):765-773.
- Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GD. 1994. Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas. *Mol Chem Neuropathol*, 21 (2-3):155-176.
- Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, Zhang XM, Li SN, Lahn BT, Xiang AP. 2008. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol*, 61 (4):467-473.
- Yang Y, Shao N, Luo G, Li L, Zheng L, Nilsson-Ehle P, Xu N. 2010. Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate. *Anticancer Res*, 30 (3):981-985.

- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23 (58):9392-9400.
- Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK. 2000. Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*, 127 (11):2367-2382.
- 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. *J Exp Clin Cancer Res*, 27:85.
- Zhang X, Chen T, Zhang J, Mao Q, Li S, Xiong W, Qiu Y, Xie Q, Ge J. 2012. Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation. *Cancer Sci*, 103 (2):181-190.
- Zhao S, Wu J, Wang C, Liu H, Dong X, Shi C, Shi C, Liu Y, Teng L, Han D, Chen X, Yang G, Wang L, Shen C, Li H. 2013. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*, 8 (5):e63682.

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Glioblastom | 2 |
| Abb. 2: Magnetresonanztomographieaufnahme | 3 |
| Abb. 3: Modell zur Tumorunterhaltung | 6 |
| Abb. 4: Ausgewählte Entwicklungsmarker mit deren schematischer Positionierung auf unterschiedlichen zellulären Ebenen | 11 |
| Abb. 5: Schema der Sphäreninduktion durch Nährmediumwechsel | 12 |
| Abb. 6: Versuchsaufbau | 24 |
| Abb. 7: Ermittlung des Migrationsausmaßes | 28 |
| Abb. 8: Beurteilungsschema für ausdifferenzierende Sphärenformationen | 29 |
| Abb. 9: Überblick zu Histologie und Patientenalter | 34 |
| Abb. 10: Kulturausbeute auf Grundlage des Stammzellisoliationsprotokolls (Gr.T) .. | 35 |
| Abb. 11: Dauer der Sphärogenese [d] | 36 |
| Abb. 12: Zellviabilitätsdarstellung im MTT-Assay | 37 |
| Abb. 13: Migrationsanalyse | 39 |
| Abb. 14: Migrationsratio | 40 |
| Abb. 15: CD133 und Nestin in Tumorsphären (Gr.T)..... | 41 |
| Abb. 16: CD133 in den sphäreninduzierten Kulturen..... | 42 |
| Abb. 17: LSM-Aufnahme durch das Sphärenzentrum bei ausgewählten Kulturen ... | 43 |
| Abb. 18: Adhärenente Zellkultur | 43 |
| Abb. 19: Sox2-Expression in Gr.T | 44 |
| Abb. 20: Sox2-Expression | 45 |
| Abb. 21: Vimentin | 45 |
| Abb. 22: GFAP | 46 |
| Abb. 23: Nestin | 47 |
| Abb. 24: Ki67 | 48 |
| Abb. 25: Darstellung der delta-CT Werte (Δ CT) | 49 |
| Abb. 26: Ratio der Pluripotenzmarker..... | 50 |
| Abb. 27: Ratio der Stammzellmarker | 50 |
| Abb. 28: Ratio der weiteren Entwicklungsmarker | 51 |
| Abb. 29: Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 56 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Chemikalien..... | 15 |
| Tab. 2: Hergestellte Lösungen..... | 17 |
| Tab. 3: Nährmedien | 18 |
| Tab. 4: Fertigprodukte | 18 |
| Tab. 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 19 |
| Tab. 6: Primerliste | 21 |
| Tab. 7: Antikörper der Immunfluoreszenz..... | 22 |
| Tab. 8: Beurteilungsschema von Sphärenkulturen | 26 |
| Tab. 9: Inkubationskomponenten der reversen Transkription..... | 31 |
| Tab. 10: Sphärenbildung Gr.T in [d] | 35 |
| Tab. 11: Sphärenbildung Gr.V _S in [d]..... | 36 |
| Tab. 12: Sphärenbildung Gr.V _Z in [d]..... | 36 |
| Tab. 13: p-Werte der Vergleichsgruppen der einzelnen MTT-Messzeitpunkte | 38 |
| Tab. 14: Überblick über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Vergleichsgruppen gegenüber Gr.T | 52 |

IV. Danksagung

Vorangestellt sei der tiefe Dank an meine Familie, insbesondere an meine Eltern, die mich in vielerlei Hinsicht, unabhängig von dieser Arbeit, auf meinem Lebensweg stets liebevoll unterstützen sowie stetiger Ratgeber und Zuhörer sind.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rolf Kalff danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik laborieren zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christian Ewald für meine kontinuierliche Betreuung und den zahlreichen Besprechungen, die dankbarerweise jederzeit möglich waren, sowie für die zügigen und kritischen wie furchtlosen Betrachtungen meiner Skripte.

Außerordentlicher Dank gilt Frau Dipl.-Biol. Diana Freitag. Ohne ihre Sachkenntnis zu Thema und Methodik, ihre Flexibilität, geduldige Unterstützung und direkte Betreuung wäre diese Arbeit undenkbar gewesen.

Sie hat bei vielfältigen Herausforderungen zur Seite gestanden, half den Roten Faden nie aus den Augen zu verlieren und war immer Motivation, aber auch Vorbild in der wissenschaftlichen Arbeit.

Ebenfalls gilt Dank Herrn Dr. rer. pol. Thomas Lehmann für die freundliche und verständnisvolle statistische Beratung und Frau Dr. rer. nat. Silke Keiner für die Einarbeitung an das LSM.

Nicht unerwähnt sollen an dieser Stelle Herr Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, Frau Dr. rer. nat. Bärbel Spies-Weißhart, Herr Mike Fischer, Herr Dr. med. Jakob Hammersen, Frau Heike Thieme und Frau Katja Schubert aus dem Forschungszentrum Lobeda für Rat und freundliche Unterstützung sowie die vertrauensvolle Überlassung diverser Gerätschaften sein.

V. Lebenslauf

VI. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Fritz Klippel, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

apl. Professor Dr. med. habil. Christian Ewald

Dipl.-Biol. Diana Freitag

Dr. rat. pol. Thomas Lehmann (Statistik)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben,

die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche,

eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den ____ . ____ . ____

Fritz Klippel