

Aus der Klinik für Neurochirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Ch. Nimsky
und
aus der Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Timmermann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Rolle des DDR1 beim Glioblastoma multiforme

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Kien Alex Duong Phu aus Berlin, Deutschland
Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

10.07.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Jörg Walter Bartsch und Prof. Dr. Herwig Strik

1. Korreferent: Prof. Dr. Axel Pagenstecher

**Meiner Ehefrau Sarah für Ihre Geduld,
Unterstützung und Unermüdlichkeit.**

**Meiner Betreuerin Ricarda Hannen
für Ihre Zeit.**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Glioblastoma multiforme.....	4
1.1.1 Hirntumore und deren Einteilung nach der WHO-Klassifikation.....	4
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie.....	4
1.1.3 Symptome und Diagnostik	5
1.1.4 Behandlung.....	6
1.1.5 Prognose.....	8
1.2 Tumorstammzellen.....	9
1.2.1 Adulte und embryonale Stammzellen.....	9
1.2.2 Symmetrische und asymmetrische Zellteilung.....	9
1.2.3 Die Rolle der Stammzellen in Tumoren.....	10
1.3 Discoidin Domain Receptor 1.....	12
1.3.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	12
1.3.2 Entdeckung und Funktion des Discoidin Domain Rezeptors	13
1.3.3 Bedeutung von Kollagen und DDR1 im GBM.....	14
1.4 Ziel der Doktorarbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Substanzen	18
2.1.2 Standardlösungen und Puffer.....	19
2.1.3 Antikörper.....	20
2.1.4 Primer.....	20
2.1.5 Kits.....	20
2.1.6 Laboreinrichtung und Geräte	20
2.1.7 Verbrauchsmaterial.....	21

2.2	Methoden	22
2.2.1	Beschichtung von Zellkulturgefäßen.....	22
2.2.2	Aufreinigung von Tumormaterial.....	22
2.2.3	Kultivieren und Passagieren von Zellen	23
2.2.4	RNA-Isolierung und Reverse Transkription	23
2.2.5	Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion	24
2.2.6	Immunofluoreszenz	25
2.2.7	Immunhistochemie	26
2.2.8	Herstellung von Proteinlysaten	28
2.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.10	Western Blot.....	30
2.2.11	Mikroskopie und Bildanalyse.....	31
3	Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1	Immunhistochemischer Nachweis der GBM SZ und ihrer DDR1-Expression.....	33
3.2	Immunfluoreszenz basierter Nachweis der DDR1-Expression von GBM SZ und differenzierten Zellen	40
3.3	DDR1-Genexpressionanalyse in GBM SZ und differenzierten Zellen	44
3.4	Analyse der Inhibition des DDR1 in GBM SZ über das Western Blot-Verfahren.....	46
4	Ausblick.....	50
5	Referenzen.....	52
6	Anhang.....	I
I.	Abkürzungsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	III
III.	Tabellenverzeichnis	IV
IV.	Tabellarischer Lebenslauf	V
V.	Verzeichnis akademischer Lehrer.....	VI
VI.	Danksagung.....	VII
VII.	Ehrenwörtliche Erklärung	VIII

Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der aggressivste (WHO Grad IV) und der häufigste hirneigene Tumor. Die Standardtherapie beim GBM besteht aus einer größtmöglichen und sicheren Tumorresektion gefolgt von einer adjuvanten Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ). Trotz der konsequenten Therapie hat das GBM mit einer medianen Überlebensrate von 14-15 Monaten eine schlechte Prognose.

Die Zellen dieses extensiv infiltrierenden Tumors interagieren mit dem Kollagen der extrazellulären Matrix. Stammzellen des GBM (GBM SZ) sind in kollagenreichen Nischen vor antineoplastischen Behandlungen geschützt.

Die hier vorgelegte Arbeit untersuchte die Rolle des Discoidin-Domain-Receptor-1 (DDR1), einem Kollagen-Rezeptor, in der Biologie maligner Gliome. Hierbei wurde die Interaktion zwischen GBM SZ und der Kollagenmatrix über diesen Rezeptor näher betrachtet.

Dabei konnte mit immunhistochemischer Markierung bestätigt werden, dass sich die GBM SZ in unmittelbarer Nähe zum Kollagen befinden und diese auch DDR1 exprimieren. Zudem wurde die Aberranz von GBM SZ und dem DDR1-Expressionsprofil in patienten-gematchten Proben von Primus und Rezidiv miteinander verglichen. Es konnte kein Unterschied im DDR1-Expressionsstatus und in den Stammzell-Akkumulationen zwischen Tumorgewebe aus Primus und Rezidiv demonstriert werden.

Um nachzuweisen, dass die DDR1 Expression charakteristisch für den Stammzellphänotyp im GBM ist, wurde sowohl die DDR1-Expression auf Proteinebene über einen Immunfluoreszenz-basierten Nachweis als auch der DDR1-Genexpressionsstatus über die quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) analysiert. Hierbei wurden primäre humane Zellen verglichen, die einerseits unter Stammzellbedingungen und andererseits unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden. Es konnte zwischen differenzierten und unter Stammzellbedingungen kultivierten Zellen in der DDR1-Expression ein geringer Unterschied beobachtet werden, ein größerer zeigte sich vor allem in der Membran-Lokalisation von DDR1. Es ließ sich jedoch kein quantifizierbarer Unterschied in der DDR1-Genexpression zwischen beiden Zelltypen feststellen.

Weiterhin wurde die inhibitorische Wirkung eines DDR1-Inhibitors auf primäre humane GBM SZ über das Western Blot-Verfahren studiert, indem vor allem die Wirkungskinetik des DDR1-Inhibitors via Phosphorylierungsstatus des DDR1 überprüft wurde. Da die Analyse des DDR1-Phosphorylierungsstatus noch nicht ausreichend etabliert werden konnte, lieferte die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des genutzten DDR1-Inhibitors keine verwertbaren Ergebnisse.

Die hier vorgestellten Ergebnisse bieten die Rationale für weitere Untersuchungen, insbesondere von Dosis-Wirkungs-Kurven zum Vergleich einer Kombinationsbehandlung aus DDR1-Inhibitor und TMZ mit einer Behandlung aus TMZ allein, um zu klären, ob die Kombinationsbehandlung der Monotherapie aus TMZ überlegen ist. Damit könnte die wissenschaftliche Grundlage für eine Verbesserung der Wirksamkeit der zytotoxischen Chemotherapie in der klinischen Routine gelegt werden.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is not only the most aggressive (WHO Grade IV) but also the most common type of malignant brain tumors. The current standard GBM therapy consists of a maximal and safe resection of the tumor, followed by combined adjuvant therapy with radiation and chemotherapy using temozolomide (TMZ). Despite this intense therapy regimen, GBM still has a bad prognosis with a median survival rate of only 14-15 months.

It is an accepted concept that in GBM tumor cells can interact with collagen, a component of the extracellular matrix. In particular, tumor stem cells in GBM (GBM SCs) can anchor to collagen-rich niches in order to protect themselves against treatment-induced cell death. This thesis examines the role of the collagen receptor Discoidin-Domain-Receptor 1 (DDR1), for the interaction between GBM SCs and collagen.

The localization of GBM SCs in a collagenous environment and their abundant DDR1 expression was confirmed with immunohistochemistry. Moreover, the aberrance of GBM SC and DDR1 expression status in patient-matched samples, which consist of tissue of primary and recurrent tumor, was analyzed. No significant difference, however, of DDR1 expression and accumulation of GBM SCs between both tumor tissues was found.

In order to prove DDR1 expression as a distinctive feature of the stem cell phenotype, DDR1 expression levels on protein and messenger RNA (mRNA) were analyzed by immunofluorescence and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), respectively. For this analysis, primary human GBM SCs, cultivated both under stem cell conditions and differentiation conditions, were used. The difference in DDR1 expression between both types of cells was minor and most prominent at the DDR1 localization at the cell membrane. However, there was no quantitative difference in DDR1 gene expression as determined by qPCR.

In addition, the inhibitory effect of a DDR1 inhibitor on primary human GBM SCs was evaluated by western blot using an antibody against phosphorylated DDR1. This analysis however yielded no useful results as a consequence of problems establishing this method.

Taken together, the results of this work give rise to further examinations, especially for functional studies with dose-response curves to compare a combined therapy including DDR1 inhibitor and TMZ with a monotherapy consisting of TMZ only to investigate an eventual advantage of combined treatment. This might provide the scientific base to enhance the efficacy of antineoplastic chemotherapy.

1 Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Hirntumore und deren Einteilung nach der WHO-Klassifikation

Hirntumore gehören zu den Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS) und umfassen eine Vielzahl an Tumoren des Gehirns oder des umliegenden Gewebes wie z.B. den Hirnhäuten oder der peripheren Nerven. Derzeit sind mehr als 100 verschiedene primäre Hirntumore in der Literatur beschrieben (Sathornsumetee & Rich, 2006). 2006 fanden sich 25 Pathologen und Genetiker im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zusammen. Mit 50 weiteren Autoren entwarfen sie die vierte Auflage des „Blue Book“ zur Klassifikation der Tumore des ZNS nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO), welches im Jahr 2007 veröffentlicht wurde. Die Überlegung zur Einteilung der Hirntumore im Rahmen der WHO-Klassifikation geht bis auf das Jahr 1956 zurück, in dem der Exekutivrat (Executive Board) der WHO eine weltweit einheitliche Klassifikation der humanen Tumore zu etablieren anstrebte (Louis et al., 2007). Die auf histologische Kriterien beruhende Klassifikation der Tumore in Grad I bis IV (Louis et al., 2007) ermöglicht nicht nur eine Vorhersage über den Erfolg von unterschiedlichen Behandlungsstrategien, sondern und vor allem auch über die Prognose der Patienten. 2016 wurde die Klassifikation von 2007 insofern geändert, dass zusätzlich zu den histologischen Eigenschaften nun auch molekulargenetische Aspekte eine Rolle spielen (Louis et al., 2016), da Hirntumore sowie deren genetische Veränderungen auf molekularer Ebene besser verstanden wurden (Vigneswaran et al., 2015).

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Das in dieser Arbeit untersuchte GBM gehört zu der Gruppe der Gliome. Der Ursprung bzw. die Ursprungszelle für die Gliome ist bis heute ungeklärt (Jiang & Uhrbom, 2012). Je nach Phänotyps der Zellen und der Ähnlichkeit zu den körpereigenen Zellen, wie den Astro-, Oligodendrozyten oder Ependymzellen werden die Tumore Astrozytome, Oligodendrozytome oder Ependymome genannt (Louis et al., 2001).

GBMs gehören nicht nur zu den aggressivsten (WHO Grad IV), sondern auch zu den häufigsten bösartigen hirneigenen Tumoren (Jukich et al., 2001). Sie machen ca. 65 % aller Gliome aus (Ohgaki & Kleihues, 2005). Allerdings ist die Inzidenz mit 3,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr (Ostrom et al., 2015) im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wie dem Bronchialkarzinom mit ca. 42 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer in Ländern mit hohem

Human Development Index (Cheng et al., 2016) oder dem Mammakarzinom mit ca. 72 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in den Industrienationen (Tao et al., 2015), eher niedrig. Das Manifestationsalter liegt bei 50-70 Jahren. Das Glioblastom kann zum einen de novo oder als Folge einer Tumorprogression bzw. aus niedergradigen Tumoren entstehen (Ohgaki & Kleihues, 2013). Hier unterscheidet man zwischen dem primären GBM und dem sekundären GBM. Die sehr schnell fortschreitende de novo-Entstehung des primären GBMs lässt eine lange präklinische Anamnese bis zur Diagnosestellung aus. Das primäre GBM kommt in der Regel bei älteren Patienten vor, wohingegen Patienten mit sekundärem GBM meist jünger sind und ihre Prognose signifikant besser ist (Ohgaki & Kleihues, 2013).

1.1.3 Symptome und Diagnostik

In Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung können GBMs verschiedene neurologische Symptome hervorrufen. Häufig klagen Patienten über Kopfschmerzen, Bewusstseinsstörungen oder Übelkeit und Erbrechen aufgrund intrakranieller Drucksteigerung (Tao et al., 2015). Direkte Irritationen des Hirngewebes können fokalneurologische Ausfälle wie Sprach- oder Sehstörungen auslösen (Davis, 2016). Es können aber auch epileptische Anfälle, sogar psychiatrische Symptome wie Halluzinationen, Persönlichkeitsveränderungen und Psychosen auftreten, die des Öfteren zu Fehldiagnosen führen (Boele et al., 2015).

Besteht nun der Verdacht auf einen zerebralen Tumor, ist die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) das bedeutendste diagnostische Hilfsmittel (Nelson & Cha, 2003). Im Falle eines GBM zeigt sich in der MRT-Untersuchung eine Raumforderung, die aufgrund von zentraler Nekrose, intratumoralen Einblutungen oder zystischen Komponenten ein heterogenes Binnensignal aufweisen kann (Hanif et al., 2017; Upadhyay & Waldman, 2011). In der T1 gewichteten, Kontrastmittel verstärkten Aufnahme wird aufgrund zahlreicher Neovaskularisationen meist eine randständige Kontrastmittelanreicherung beobachtet (Abb. 1A); für gewöhnlich werden Gadolinium-haltige Kontrastmittel wie Gadopentetat-Dimeglumin für die bildgebende Untersuchung benutzt (Kalpathy-Cramer et al., 2014). In der T2-Wichtung hingegen zeigt sich das Ausmaß des peritumoralen Ödems, welches als eine Wassereinlagerung im interstitiellen Raum definiert ist (Schneider et al., 2010) (Abb. 1B).

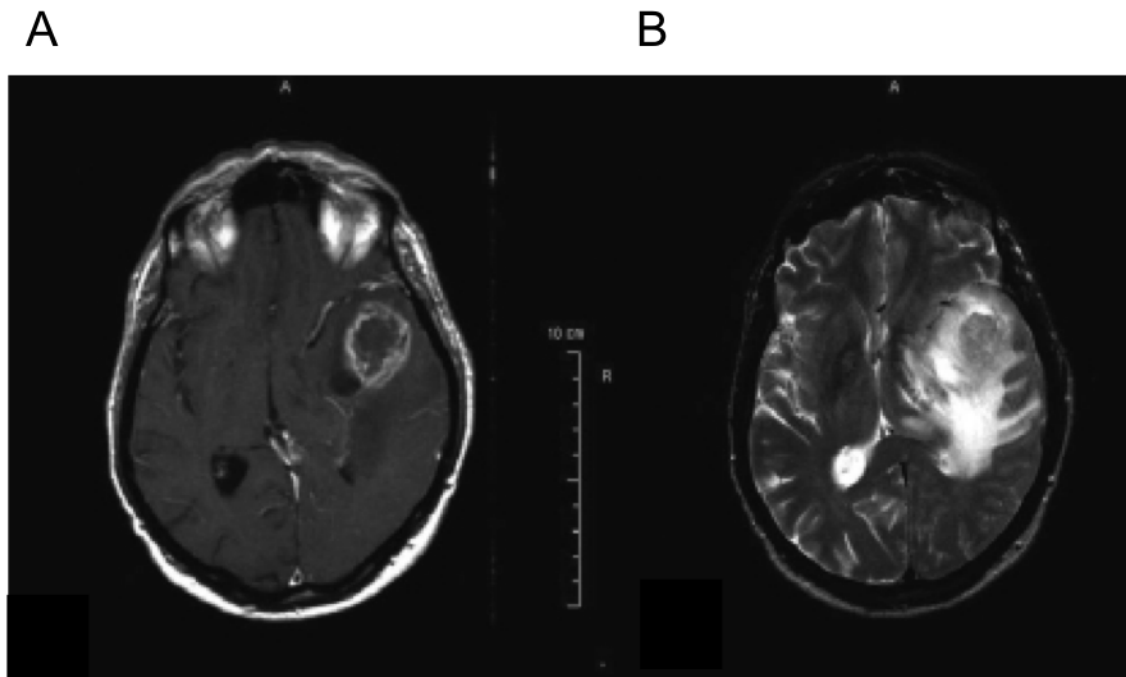


Abb. 1: Beispielhafte MRT-Bilder eines GBMs, nach Schneider et al., 2010.

(A) In der T1-Wichtung mit Kontrastmittel zeigt sich typischerweise eine randständige Kontrastmittelanreicherung und ein heterogenes Binnensignal. **(B)** In der T2-Wichtung ist ein deutliches perifokales Ödem zu erkennen.

1.1.4 Behandlung

Die derzeitige Standardtherapie des GBMs beschränkt sich auf drei Säulen: die maximal sichere Tumorresektion, sowie eine adjuvante Radio- und Chemotherapie. Das Ziel der Resektion ist es, so viel Tumorgewebe wie möglich zu entfernen und dabei gleichzeitig den Erhalt der neurologischen Funktionen zu sichern. Da das GBM diffus infiltrativ wächst, ist es nicht möglich den Tumor operativ vollständig zu entfernen. Um die Tumormasse während der Resektion optisch besser darzustellen, kann dem Patienten einige Stunden vor der Operation 5-Aminolävulinsäure (ALA) per os verabreicht werden. Diese körpereigene Substanz wird in der Häm-Biosynthese zu dem fluoreszierenden Protoporphyrin IX (Pp IX) metabolisiert (Bottomley & Muller-Eberhard, 1988), welches in Tumoren akkumuliert. Tumorzellen haben einen anderen Metabolismus als normale Zellen, dies ist ein Kennzeichen bzw. ein „Hallmark“ für tumorogene Zellen. Daher können sie das Pp IX aufgrund einer Reduktion des zuständigen Enzyms, Ferrochelatase (Teng et al., 2011), nicht weiter verstoffwechseln, wodurch die Pp IX-Akkumulation zu erklären ist. Das Emissionslicht des Pp IX hat eine Wellenlänge von 635 nm und lässt den Tumor somit intraoperativ rot erscheinen (Roberts et al., 2018). Das resezierte Material wird anschließend für diagnostische Zwecke histologisch und molekulargenetisch

untersucht: Es wird unter anderem der Proliferationsmarker Ki-67 als Parameter für die Proliferation der Tumorzellen genutzt (Hu et al., 2013). Ki-67 ist ein nukleares Protein und kommt in Wachstumsphasen der Zellen vor, d.h. in den aktiven Phasen des Zellzyklus, der G1-, S-, G2- und M-Phase (Li et al., 2015). Dadurch können Zellen mit hoher Proliferationsaktivität von ruhenden, sich nicht teilenden Zellen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, unterschieden werden. Die Ki-67-Färbung wird quantifiziert und der entsprechende Wert in Prozent angegeben und mit niedrig, mittel und hoch bewertet (Jonat & Arnold, 2011). In einer Metaanalyse zeigte sich, dass die Expression von Ki-67 vermutlich ein wichtiger prognostischer Faktor für Patienten mit GBM ist (Chen et al., 2015). Untersucht wird auch, ob eine Überexpression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) vorliegt. Der EGFR gehört zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und ist häufig in malignen Tumorentitäten einschließlich des GBMs überexprimiert (Gullick, 1991 zitiert in Hatanpaa et al., 2010). Ein erhöhtes Vorliegen dieses Rezeptors beeinflusst das Überleben, die Proliferation und Invasivität der malignen Zellen (Bertotti et al., 2009 zitiert in Xu et al., 2017). Mehrere Studien zeigten eine Assoziation zwischen Mutationen im EGFR-Gen mit folgender Amplifizierung dieses Gens bei GBM-Patienten und einem kürzeren Intervall für Rezidivierung und einer schlechteren Überlebensrate (Shinojima et al., 2003 zitiert in Hu et al., 2013).

Des Weiteren wird der Status der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Promotor-methylierung untersucht (Hu et al., 2013). Damit wird bestimmt, inwiefern eine Chemotherapie mittels TMZ wirksam wäre. Das MGMT-Gen codiert für ein gleichnamiges DNA-Reparaturprotein, welches die von TMZ induzierten DNA-Schäden reparieren kann (Hegi et al., 2008). Demnach kann eine erhöhte Expression des MGMT-Proteins eine erhöhte DNA-Reparaturaktivität bedeuten (Hegi et al., 2005). Da die Transkription bei einer Promotormethylierung nicht stattfinden kann und somit auch weniger funktionelles Protein produziert wird, ist eine MGMT Promotormethylierung ein positiver prognostischer Faktor bei Patienten mit GBM.

Zu den weiteren Säulen der GBM-Behandlung gehört wie bereits oben erwähnt die Chemotherapie, hierbei wird standardmäßig TMZ verwendet. Das Medikament gehört zur Gruppe der Alkylanzien, die Alkylgruppen auf die DNA proliferierender Zellen übertragen. Bei TMZ ist es eine Methylgruppe, die auf die Basen der DNA transferiert wird, im Falle des TMZ an der O⁶-Position des Guanins (Abb. 2). Durch diese Schädigung der DNA kann die Replikation nicht fehlerfrei durchgeführt werden und die Zellen leiten die Apoptose ein, worauf der zytotoxische Effekt von TMZ beruht.

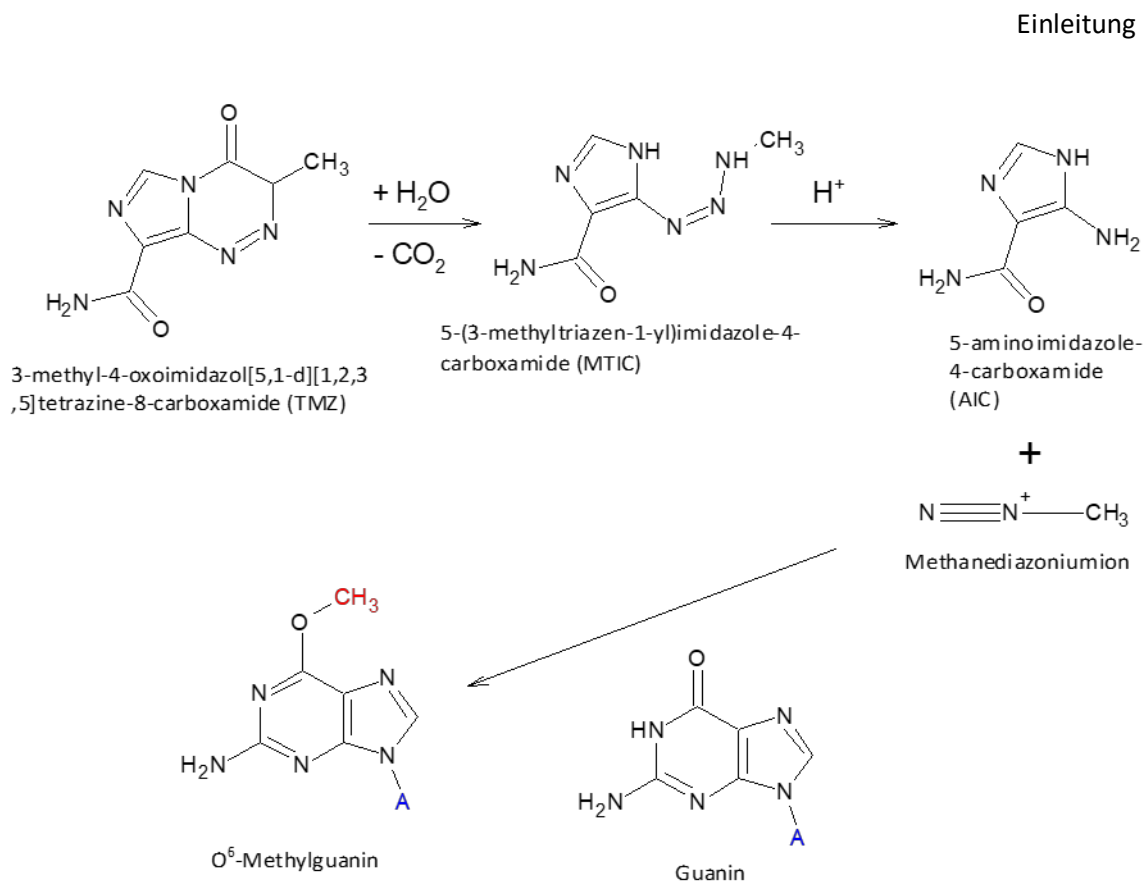


Abb. 2: Chemische Struktur des TMZ und sein Wirkungsmechanismus.

Durch eine Decarboxylierung des TMZ entsteht mit dem MTIC ein Dacarbazin-Derivat, welches unter Freisetzung des Methanediazoniumions zerfällt. Die zytotoxische Wirkung des TMZ wird über die Methylierung an der O⁶-Position des Guanins, welches Teil der DNA (A) ist, übermittelt (Aktories, Förstermann, Hofmann, & Starke, 2013).

GBM-Patienten wird während der 6 Wochen dauernden Bestrahlung täglich eine Dosis von 75 mg TMZ pro qm Körperoberfläche verabreicht. Die Bestrahlung erfolgt mit einer Tagesdosis von 1,8- 2 Gy, die dem Patienten an 5 von 7 Tagen der Woche verabreicht wird.

Nach einer vierwöchigen Pause folgt eine adjuvante Chemotherapie mit höher dosiertem TMZ 150 für 5 Tage pro Woche. Danach folgen weitere 5 Zyklen mit 200 mg pro qm Körperoberfläche im Abstand von 28 Tagen (Stupp et al., 2005).

1.1.5 Prognose

Trotz konsequenter Therapie, die mit Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Fatigue-Syndrom oder Blutbildveränderungen (Yovino & Grossman, 2012) einhergehen kann, ist die Prognose für GBM-Patienten schlecht. Die mittlere Überlebensrate beträgt nach Diagnosestellung ca. 15 Monate (Thakkar et al., 2014). Dies liegt vor allem an der hohen Rezidivrate von 90 % (Hochberg und Pruitt, 1980 zitiert in Liang et al., 1991)). Die Ursache der

häufigen Rezidivierung ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Tumorstammzellen (TSZ), welche Resistenzen gegenüber der Standardtherapie entwickeln können und diese somit überleben, im Laufe der Zeit zur erneuten Entstehung einer Tumormasse führen.

1.2 Tumorstammzellen

1.2.1 Adulte und embryonale Stammzellen

Eine Stammzelle besitzt spezifische Eigenschaften, die es ihr ermöglichen sich in eine beliebige Zelle bzw. eine Zelle eines spezifischen Gewebetyps zu entwickeln (Biehl & Russell, 2009). Die Organe des menschlichen Körpers besitzen organspezifische, adulte Stammzellen. Dies sind Zellen, die das Organgewebe kontinuierlich erneuern und regenerieren, jedoch sind sie auf ihr jeweiliges Endorgan determiniert (Sobhani et al., 2017). Neben den adulten Stammzellen gibt es die embryonalen Stammzellen, die sich in Zellen aller drei Keimblätter, Entoderm, Mesoderm und Ektoderm, entwickeln können (Chagastelles & Nardi, 2011). Diese Eigenschaft wird Pluripotenz genannt. Die embryonalen Stammzellen gehen aus der totipotenten befruchteten Eizelle hervor, die die Fähigkeit besitzt einen vollständigen Organismus zu bilden.

1.2.2 Symmetrische und asymmetrische Zellteilung

Des Weiteren wird bei beiden Stammzelltypen die asymmetrische von der symmetrischen Zellteilung unterschieden. Bei der symmetrischen Zellteilung gehen aus der Zelle zwei identische Tochterzellen hervor (Doe, 2008), die den Stammzellpool somit erweitern. Die asymmetrische Teilung dient sowohl der Selbsterneuerung als auch der Differenzierung (Abb. 3). Dabei gehen aus einer Mutterzelle zwei ungleiche Tochterzellen hervor (Clevers, 2005). Zum einen wird eine Tochterzelle gebildet, die ein klonales Replikat der Mutterzellen ist, zum anderen entsteht eine differenzierte Vorläuferzelle, auch Progenitorzelle genannt. Die Progenitorzelle besitzt im Vergleich zu einer embryonalen Stammzelle nur ein unipotentes Differenzierungspotential. Das heißt, dass die Differenzierungsrichtung hierbei determiniert ist.

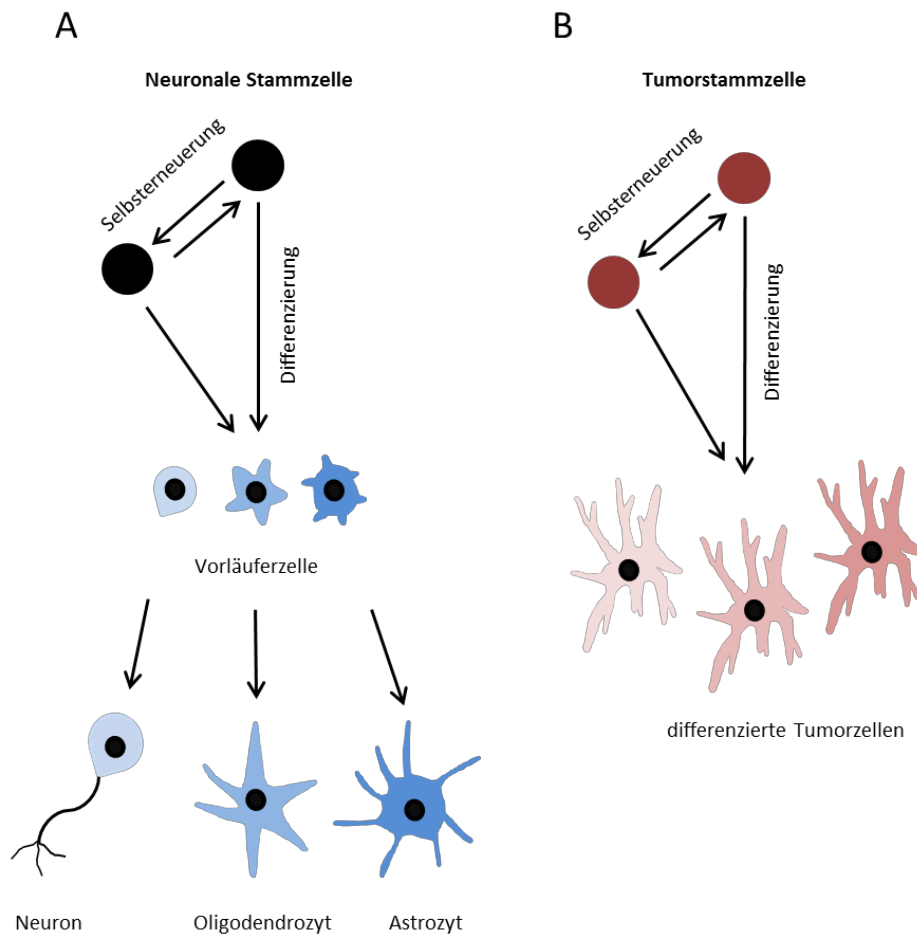


Abb. 3: Darstellung der asymmetrischen Zellteilung bei Stammzellen.

(A) Eine neuronale Stammzelle kann bei der asymmetrischen Zellteilung sowohl ihren Stammzellpool erweitern, als auch Vorläuferzellen generieren, die sich bei weiterer Differenzierung zu somatische Zellen, wie Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten, entwickeln (Walker et al., 2016). **(B)** Eine TSZ kann sich ebenfalls selbsterneuern und in differenzierte Tumorzellen übergehen, die zum Beispiel den Astrozyten oder Oligodendrozyten ähneln können (Louis et al., 2001).

1.2.3 Die Rolle der Stammzellen in Tumoren

Betrachtet man nun maligne Tumore als abnormales Organ, besitzt auch ein Tumor Stammzellen, die sogenannten TSZ. Die Tumorstammzellhypothese besagt, dass ein Tumor aus einer kleinen Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzellcharakter hervorgeht (Zhou & Zhang, 2008). Diese Subpopulation bildet ein Reservoir an Zellen, die eine hohe Regenerationsfähigkeit und Widerstandsfähigkeit besitzen und so den Tumor aufrechterhalten (Clarke et al., 2006). 1997 publizierten Wissenschaftler der Universität Toronto eine bahnbrechende Studie, die diese Hypothese unterstrich. Sie isolierten Zellen aus Patienten, die

an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt waren, und unterteilten diese anhand ihres Expressionslevels für bestimmte Oberflächenproteine, den sogenannten Cluster of Differentiation (CD). Es handelte sich dabei um die Marker CD34 und CD38, wobei die isolierten Zellen das CD34 stark und das CD38 schwach exprimierten. Wurden diese Zellen in Mäuse injiziert, entwickelte sich bei einer Vielzahl der Mäuse eine akute myeloische Leukämie (AML). Bei Injektion von Zellen, die umgekehrt das CD34 schwach und das CD38 stark exprimierten, wurde keine AML-Erkrankung erzielt, dies war selbst bei einer höheren Zellzahl nicht der Fall (Bonnet & Dick, 1997). Daraus zogen die Wissenschaftlicher die Erkenntnis, dass es Zellen gibt, die eine onkologische Erkrankung, wie hier als Beispiel die AML, initiieren können und sich diese von anderen Zellen über das Expressionsprofil von Oberflächenmarkern abgrenzen lassen. Es sind genau diese Zellen, die als TSZ bezeichnet werden.

Ein ähnliches Experiment wurde 2004 mit Zellen von Hirntumoren, unter anderem von Medulloblastomen und GBMs, durchgeführt. Das Oberflächenprotein war diesmal das CD133. Hier zeigte sich nach Injektion von nur ca. 100 Zellen, welche das CD133 exprimierten, in immun-supprimierten Mäuse eine Hirntumorinitiierung, während eine Injektion von mehreren tausend Zellen ohne den Oberflächenmarker kein Tumor erzeugte (Singh et al., 2004).

Neben dem Reservoir an TSZ werden in deutlich größeren Mengen differenzierte Tumorzellen gebildet, die im Zuge der Differenzierung ihre Regenerationsfähigkeit und Widerstandsfähigkeit verlieren. Diese nicht tumorigenen Zellen machen zahlenmäßig den Hauptbestandteil des Tumors aus (Clarke et al., 2006).

Aus therapeutischer Sicht ist es von Wichtigkeit, die wenigen TSZ zu eliminieren, denn sie besitzen ein hohes Potenzial an Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Resistenzentwicklung. Des Weiteren sind die auf Grund ihres tumorigenen Potenzials die Ursache für die Entstehung von Rezidiven (Dalerba et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Auswirkungen des direkten Umfeldes der TSZ auf deren Therapieresistenz untersucht werden. Hierbei soll die spezifische Bindung des DDR1 an Kollagenfasern und der Einfluss dieser Verankerung im Fokus stehen. Es wird angenommen, dass genau diese Interaktion zwischen TSZ und dem Kollagen im Tumormikromilieu es den Zellen ermöglicht, sich den aggressiven Behandlungen zu entziehen und in einem geschützten Bereich Resistenzen zu entwickeln, die die bisherigen Therapien deutlich einschränken (Vehlow et al., 2019).

1.3 Discoidin Domain Receptor 1

1.3.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Um ihre physiologische Funktionen ausüben zu können, benötigen Zellen Mechanismen zur Aufnahme, Verarbeitung und Antwort auf extrazelluläre Messenger (Ségaliny et al., 2015). Dies wird unter anderem von einer Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), vermittelt. Dabei fungieren sie als Signalmodulatoren, um Signale von der Zelloberfläche aus bis ins Zellinnere weiterzuleiten. Die Signale können funktionell vielfältig sein und Einfluss auf Prozesse wie das Zellwachstum, die Differenzierung, die Zelladhäsion oder den Zelltod nehmen (Robinson et al., 2000). Trotz der funktionelle Vielfältigkeit besitzen alle RTKs ein gemeinsames Strukturprinzip: Sie bestehen aus einer intrazellulären ATP-bindenden Domäne, die die enzymatische Funktion der Tyrosinkinase ausübt, einer Transmembranregion und einer extrazellulären, ligandenbindenden Domäne (Johnson et al., 1993) (Abb. 4). RTKs sind sogenannte „single-pass“ Transmembranproteine und durchqueren die Zellmembran lediglich ein einziges Mal (He & Hristova, 2012).

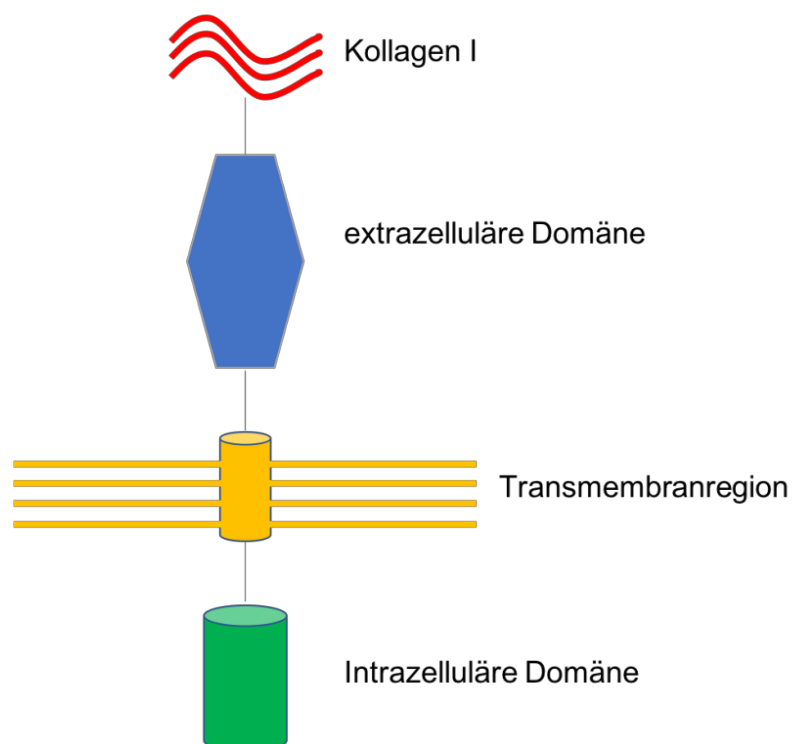


Abb. 4: Allgemeiner Aufbau einer RTK.

Als Beispiel wird hier Kollagen I als Ligand an der extrazellulären Domäne gebunden, wie es für DDR1 der Fall ist.

Zu den RTKs gehören unter anderem Wachstumsfaktor-, Zytokin- oder Hormonrezeptoren. Die RTKs werden nach ihrer Aminosäurehomologie, ihrer dreidimensionalen Proteinstruktur und der Affinität gegenüber spezifischen Liganden in vier Klassen eingeteilt. Während die Rezeptoren der Klasse I, III und IV Monomere sind, bestehen RTKs der Klasse II aus einem Tetramer, hierzu gehört zum Beispiel der Insulinrezeptor.

Derzeit sind 90 Gene für Tyrosinkinase im humanen Genom identifiziert, davon codieren 58 für RTKs, die wiederum in 20 Subfamilien unterteilt werden (Robinson et al., 2000). Die anderen 32 Gene codieren für zytoplasmatische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase und teilen sich in 10 Subfamilien auf.

Trotz der Vielzahl der Rezeptoren lässt sich der Aktivierungsmechanismus gut verallgemeinern: Bindet ein für den Rezeptor spezifischer Ligand an die extrazelluläre Domäne, findet eine Dimerisierung benachbarter RTKs statt. Dabei kann es zunächst zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne kommen, sodass Interaktionsstellen frei werden, um eine Assoziation mit einem weiteren Rezeptor zu ermöglichen (Garrett et al., 2003). Ein Ligand kann aber auch an zwei Monomere gleichzeitig binden und diese so dimerisieren. Eine Dimerisierung bewirkt eine Annäherung der intrazellulären Domänen beider Rezeptoren, sodass sich ihre Tyrosinkinase nun gegenseitig phosphorylieren können. Die aktivierte Form der Tyrosinkinase ist nun in der Lage Phosphatgruppen auf weitere Tyrosinreste des Rezeptors zu übertragen. Signalübertragende Proteine können über die sogenannte pY (phosphoryliertes Tyrosin) bindende Domäne, auch SH2 (Src-homology 2) Domäne genannt, an diese phosphorylierten Tyrosinreste binden. Dies bewirkt schließlich eine Aktivierung der Signaltransduktionsmoleküle, welche weitere Signalkaskaden in Gang setzen. Damit das Signal nicht kontinuierlich über einen zu langen Zeitraum übermittelt wird, werden zur Signalabschaltung die RTKs in der Zellmembran endozytotisch in Vesikel überführt und verschmelzen entweder mit Endosomen, um die Rezeptoren wieder zurück zur Zellmembran zu führen, oder mit Lysosomen, in denen die Rezeptoren über mehrere abbauende Enzyme in ihre einzelnen Bestandteilen zerlegt werden (Gur et al., 2013).

1.3.2 Entdeckung und Funktion des Discoidin Domain Rezeptors

Discoidin-Domain-Rezeptoren (DDR) gehören der Familie der RTKs an und leiten sich aufgrund der Ähnlichkeit einer spezifischen Region in ihrer extrazellulären Domäne von dem Discoidin I-Protein ab (Vogel et al., 1997). Das Discoidin I-Protein ist ein Lektin und hat seinen Namen vom Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Springer et al., 1984). Wie bereits erwähnt bindet die extrazelluläre Domäne eines RTK einen spezifischen Liganden. Im Fall des DDR handelt es sich

hierbei um Kollagen; ein dreisträngiges Protein, welches das Grundgerüst von Bindegewebsfasern in der extrazellulären Matrix darstellt (Robinson et al., 2000). Es gibt zwei verschiedene DDR-Typen, die in besonderer Relation zueinanderstehen: DDR1 wird häufig in epithelialen Zellen exprimiert, DDR2 findet sich in mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten (Labrador et al., 2001; Vogel et al., 1997). Während der DDR1 primär durch Kollagen I-IV und VIII aktiviert wird, bindet DDR2 vor allem an Kollagen I, jedoch nicht an Kollagen IV (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). Diese zwei DDR-Typen wurden zunächst als zwei Isoformen dieser Rezeptorfamilie aus epithelialen Tumoren identifiziert und dann als MCK-10 (mammary carcinoma kinase 10) und als CCK-2 (colon carcinoma kinase 2) bezeichnet (Alves et al., 1995). Hinsichtlich des DDR1 wurde seine Expression bereits im GBM nachgewiesen (Ram et al., 2006; Weiner et al., 1996), sodass hier nun auch über seine funktionelle Rolle diskutiert wird.

1.3.3 Bedeutung von Kollagen und DDR1 im GBM

In dieser Arbeit wird die Bedeutung der Interaktion zwischen Kollagen und dem DDR1 bei TSZ des GBM untersucht. Gliomzellen stehen in enger Nachbarschaft und Abhängigkeit mit den Bestandteilen des Tumormikromilieus wie der extrazellulären Matrix (EZM) (Payne & Huang, 2013). Die EZM der Hirntumore besteht aus verschiedensten Proteinen: Kollagenen, Laminin, Fibronectin, Hyaluron, Vitronectin, etc. (Payne & Huang, 2013).

Das Kollagen besteht aus dem Tropokollagen, welches die Grundeinheit bildet und aus drei gleich langen Polypeptidketten besteht. Diese besitzen ca. 1000 Aminosäuren, wobei sich die Tripeptidsequenz Gly-X-Y sehr häufig wiederholt. X und Y können jede beliebige Aminosäure sein, jedoch kommen für X in 28 % der Fälle Prolin und für Y in 38 % der Fälle Hydroxyprolin vor. Die Polypeptidketten liegen in linksgängigen Helices vor, die sich schlussendlich als rechtsgängiges Bündel formieren (Shoulders & Raines, 2009). Es sind insgesamt 29 unterschiedliche Kollagentypen bekannt. Das Kollagen I zum Beispiel gehört zu der Klasse der fibrillären Kollagenen, welche am häufigsten vorkommen (Payne & Huang, 2013).

Im GBM übernimmt das Kollagen mehrere Aufgaben: Es hat sowohl die Aufgabe das Gewebe als Gerüstprotein aufrecht zu erhalten und somit seine strukturelle Integrität zu bewahren (Gelse et al., 2003), als auch zelluläre Signalwege für Zellwachstum oder -differenzierung über verschiedene Rezeptoren anzutreiben (Leitinger, 2011). Auch dient Kollagen als Reservoir für Proteine der EZM, sodass in Abhängigkeit der Kollagensynthese EZM-Proteine als Antwort auf biologische Änderungen vom Kollagen gespeichert oder abgegeben werden können (Payne & Huang, 2013).

DDR1, welches das Kollagen als seinen Liganden erkennt, wurde in pädiatrischen höhergradigen Gliomen gefunden: Dabei wurde die mRNA des DDR1 über das Northern Blot-Verfahren in 6 von 7 Patienten nachgewiesen (Weiner et al., 1996). In der Arbeit von Ram et al. wurde die DDR1-Expression im GBM sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Ram et al., 2006): Eine qPCR-Analyse zeigte eine signifikant höhere Expression der DDR1 mRNA in 14 humanen GBM-Gewebefragmenten als in 6 Kontrollproben gesunden Hirns. Zum anderen zeigte sich in immunhistochemischen Untersuchungen, dass in 19 von 24 GBM-Proben DDR1 stark exprimiert war, während in tumorfreien Gebieten das DDR-Expressionsniveau niedriger war. Somit wurde eine Hochregulation des DDR1-Proteins im GBM nachgewiesen.

Die Arbeit von Vehlow et al. (2019) hat sich mit dem Mechanismus der Interaktion zwischen Kollagen und DDR1 beschäftigt. Es wird angenommen, dass die TSZ des GBM in sogenannten Nischen des Tumormikromilieus, die sehr reich an Kollagen sind, verweilen und so die aggressiven Behandlungen dort nicht nur überleben können, sondern verantwortlich für die Entstehung von Rezidiven sind. Wenn DDR1 von TSZ an Kollagen bindet, wird ein 14-3-3/Beclin-1/Akt1-Proteinkomplex gebildet (Vehlow et al., 2019) (Abb. 5). Analog zu der SH2-Domäne von signalübertragenden Proteinen, die phosphorylierte Tyrosinreste erkennt, besitzt auch das 14-3-3 Protein eine Domäne, die jedoch ein phosphoryliertes Serin des DDR1 erkennt (Obsilova et al., 2014). In der Arbeit von Vehlow et al. wurde angenommen, dass sogar zwei Bindungsstellen am DDR1 für das 14-3-3 Protein vorliegen (R-X-X-S448 und R-X-X-S889). Das Protein 14-3-3 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Beclin-1, einem Protein für die Steuerung der Autophagozytose. Eine Inhibition des 14-3-3 hat eine Reduktion des Beclin-1 zur Folge, während eine Hochregulation von 14-3-3 analog zu einer Induktion von Beclin-1 führt (Wang et al., 2010). Das Beclin-1 kann mit mehreren anderen Proteinen, wie dem Vps34 und dem ATG14, einen Proteinkomplex bilden, welcher die Vesikelnukleation bei der Autophagozytose vorantreibt (Zhong et al., 2009). Jedoch wird die Komplexbildung verhindert, so lange Beclin-1 an 14-3-3 gebunden ist, welches wiederum an phosphoryliertem DDR1 gebunden hat. Somit wird durch die Aktivierung von DDR1 die Autophagozytose unterdrückt.

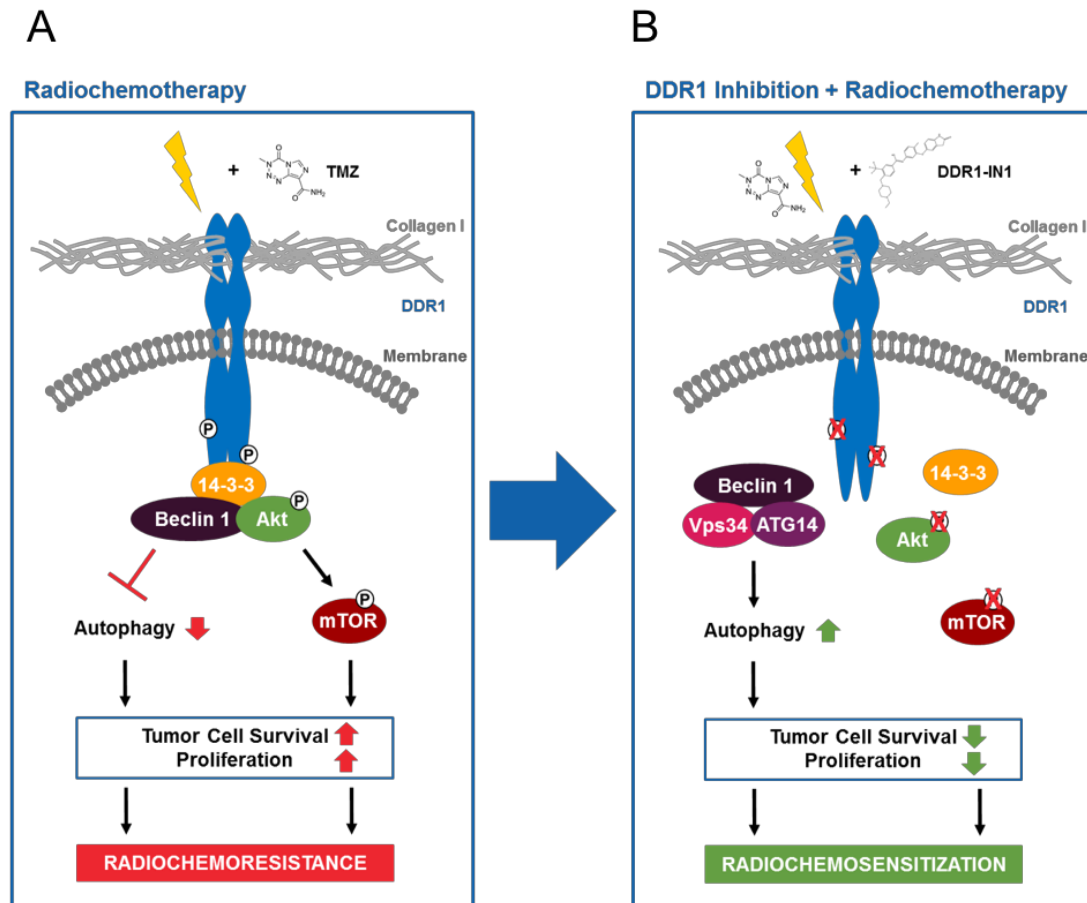


Abb. 5: Interaktion des DDR1 mit Kollagen 1 und die Bildung des 14-3-3/Beclin-1/Akt1-Proteinkomplexes und der Effekt der DDR1-Inhibition, nach Vehlow et al., 2019.

(A) Der durch das Kollagen 1 aktivierte DDR1 bietet eine Andockstelle für das 14-3-3 Protein, sodass Beclin-1 und Akt mit dem Rezeptor interagieren können. Dies führt über weitere Schritte in den Signalkaskaden zu einer Resistenz gegenüber der Radiochemotherapie. **(B)** Wird der DDR1 inhibiert (hier über den exogenen Inhibitor DDR1-IN1), fällt das 14-3-3 Protein als Bindungsstelle weg. Zum einen kann Beclin-1 mit weiteren Proteinen, wie Vps34 und ATG14, Autophagosomen bilden, zum anderen bleibt der Akt1/mTOR-Signalweg aus, sodass die TSZ schlussendlich sterben.

Neben Beclin-1 kann auch Akt an das 14-3-3 Protein binden (Vehlow et al., 2019). Akt1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine entscheidende Rolle in der Proliferation, im Zellwachstum und im Überleben von Tumorzellen spielt (Rivas et al., 2018). Es hemmt die Apoptose, indem es pro-apoptische Proteine, wie zum Beispiel Bax, inhibiert. Des Weiteren kann Akt mTORC1 aktivieren, welches weitere Proteine wie 4E-BP1 oder S6K phosphorylieren kann und die Translation und die Proteinbiosynthese antreibt (Jossé et al., 2016).

Aufgrund dieser verschiedenen Signalkaskaden können die TSZ durch Bindung an Kollagen über den DDR1 den toxischen Wirkungen von Radio- und Chemotherapie mit TMZ entgehen und die adjuvante Therapie überleben. Somit stellt DDR1 ein mögliches therapeutisches Target dar, welches im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll.

1.4 Ziel der Doktorarbeit

Um zu verstehen, welche Rolle DDR1 beim GBM spielt, wird sich die Arbeit zunächst dem DDR1-Expressionsprofil der TSZ widmen. Hierzu soll untersucht werden, ob es einen Unterschied in der DDR1-Expression zwischen primären, humanen TSZ und daraus generierten, differenzierten Tumorzellen gibt. Weiterhin soll herausgefunden werden, ob sich eine DDR1-Expression spezifisch in TSZ in kollagenreichen Nischen nachweisen lässt. Hierbei sollen zudem Unterschiede in der Expression zwischen Primärtumor von rezidiertem Tumor analysiert werden. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob Unterschiede in der Größe der GBM SZ-Population zwischen Primärtumor und Rezidiv vorkommen, da diese die Standardtherapie im Vergleich zu anderen Tumorzellen überleben und damit im Rezidiv eventuell in höherer Aberranz vorkommen. Dafür stehen patient-matched Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte zur Verfügung. Außerdem soll der Phosphorylierungsstatus des DDR1-Proteins in Abhängigkeit eines Inhibitors in primären, humanen GBM-TSZ analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Substanzen

Accutase, Cell Detachment Solution (sterile-filtered)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Ammonium persulfate 98+%	Sigma-Aldrich GmbH, München
BSA (Albumin bovine Fraction V pH = 7)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
B27 Supplement (50x) minus Vitamin A	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Bromphenolblau	Honeywell Riedel-deHaën AG, Seelze
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Collagen I from rat tail	Sigma-Aldrich GmbH, München
DAPI (bisBenzimid H33258)	Sigma-Aldrich GmbH, München
DDR1-IN-1 Tocris Stock solution 50 mM	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
Dimethyl Sulfoxid	Sigma-Aldrich GmbH, München
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol absolut $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich GmbH, München
Ethylenediaminstetraacetic acid disodium salt dihydrate	Sigma-Aldrich GmbH, München
Eukitt®-quick hardening mounting medium	Sigma-Aldrich GmbH, München
FCS Superior	Biochrom GmbH, Berlin
Gentamycin	Biochrom GmbH, Berlin
Gibco Amphotericin B	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, München
Glycin	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
H ₂ O ₂ (30 %)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Hämalaunlösung	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
HCL	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, München
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma	Sigma-Aldrich GmbH, München
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH, München
Milchpulver	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	VWR International GmbH, Darmstadt
Nonidet® P 40 Substitute	Sigma-Aldrich GmbH, München
PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ , low endotoxin	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin
Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
1,10-Phenanthroline monohydrate	Sigma-Aldrich GmbH, München
Precision FAST MasterMix with ROX	Primer Design, Southampton
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
Recombinant Human FGF-basic	PeproTech GmbH, Hamburg
Recombinant Murin EGF	PeproTech GmbH, Hamburg
Red Cell Lysis Puffer	Sigma-Aldrich GmbH, München
RNase-free water	Qiagen GmbH, Hilden

Rotiphorese®Gel 30	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Temozolomid	Sigma-Aldrich GmbH, München
Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich GmbH, München
tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS-hydrochlorid	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Acros Organics, New Jersey
Tween	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Xylol (Isomere) ROTIPURAN® >99 %	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.2 Standardlösungen und Puffer

Trenngel (10 %):	1,668 ml	30 % Polyacrylamid
	1,875 ml	Trenngelpuffer 1mM Tris-HCl pH 8,8
	1,367 ml	H ₂ O
	40 µl	10 %APS
	50 µl	10 %SDS
	4 µl	TEMED
Sammelgel (10 %):	0,2664 ml	30 % Polyacrylamid
	0,25 ml	Sammelgelpuffer 1 mM Tris-HCl pH 6,8
	1,4511 ml	H ₂ O
	20 µl	10 %APS
	20 µl	10 %SDS
	2 µl	TEMED
Laemmli:	60 mM	Tris-HCl pH 6,8
	2 %	SDS
	10 %	Glycerol
	5 %	B-Mercaptoethanol
	0,01 %	Bromphenol-Blau
RIPA:	50 mM	HEPES pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	0,5 %	Natriumdeoxycholat
	Unmittelbar vor Nutzung zugeben:	
	0,1 %	SDS
	10 mM	Phenanthrolin
	10 mM	EDTA
	1 x	Complete
	1 x	PhosStop
Transferpuffer:	25 mM	Tris Base
	190 mM	Glycin
	20 %	Methanol
Laufpuffer:	25 mM	Tris Base
	190 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
TBST	0,1 %	Tween 20 in TBS

Citratpuffer 10 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat in ddH₂O (pH =6)

2.1.3 Antikörper

Name	Firma	Verwendung	Verdünnung	Herkunft/Wirt
Anti-DDR1 antibody [C1C3]	GeneTex	Immunhistochemie	1:10	Rabbit
Anti-Nestin, clone 10C2	EMD Millipore Corporation	Immunhistochemie	1:200	Mouse
Beta Tubulin Antibody	Novus Biologicals	Western Blot	1:2000	Rabbit
DDR1 (D1G6) XP Rabbit mAb #5583	Cell Signaling Technology	Western Blot	1:1000	Rabbit
Dnk pAb to Rb IgG (Dylight®488)	Abcam	Immunofluoreszenz	1:1000	Donkey

2.1.4 Primer

Gen	Sequenz bzw. Firma	Verdünnung
Xs 13 fwd	5'-TGG GCA AGA ACA CCA TGA TG-3'	0,1 µM
Xs 13 rev	5'-AGT TTC TCC AGA GCT GGG TTG T-3'	0,1 µM
DDR1	QuantiTect Qiagen Cat. No. QT00092701	10x

2.1.5 Kits

RNA to cDNA EcoDry™ Premix	Takara Bio USA, Mountain View
ImmPACT™ DAB	Vector Laboratories, Burlingame
ImmPACT™ VIP	Vector Laboratories, Burlingame
Picosirius Red Stain Kit	Polysciences, Inc., Warrington
VectaStain Elite ABC Kit Mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame
VectaStain Elite ABC Kit Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame

2.1.6 Laboreinrichtung und Geräte

Biofuge 13 Centrifuge	Heraeus Group, Hanau
Chemostar Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Comb, 10 well	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
Cooling & Heating Block Model HB-202	Hangzhou Bioer Technology Co, Hangzhou
Dispergiergerät T10 basic Ultra-Turrax®	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Durchlichtmikroskop Labovert FS	Leitz
Eppendorf Reference Pipette	Eppendorf AG, Hamburg

Electrophoresis Chambers	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
FLUOstar Optima Microplate Reader	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Glass plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
NuAire DH Autoflow 5500 air jacket CO ₂ incubator	NuAire, Plymouth
Magnetrührer MR 2002	Heidolph GmbH & Co.KG, Schwabach
Mikrowelle Model No: MS-1937-C	LG Electronics Germany GmbH, Frankfurt
Mini Rocker MR-1	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoPhotometer® NP80	Implen GmbH, München
Pipettierhilfe N15-189	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
Präzisionswaage BP211D	Sartorius AG, Göttingen
Reinwasseranlage Astacus	Membrapure, Hennigsdorf Berlin
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Sterilwerkbank Microflow Laminar Flow Cabinet	Nunc GmbH & Co KgG, Wiesbaden
Thermocycler peqSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortexmischer REAX 1	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach
Wasserbad Modell 3047	Köttermann GmbH & Co, Uetze
Wiedfieldmicroscope Leica DM 5500	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Zeiss Imager M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zellzählkammer nach Neubauer	W. Schreck, Hofheim
Zentrifuge Rotina 38	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

2.1.7 Verbrauchsmaterial

6- und 96-Well Multiply Fast PCR-Platte	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 10, 20, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Cell Strainer (40 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen 24 x 32 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Eppendorf Tubes 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Falcon Röhrchen 15 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Filter-Pipettenspitzen 10, 20, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire
Pipettenspitzen 10, 20, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
qPCR ahäsive Folie	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 und 10 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Wägebapier 10 x 13 cm	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
x-well Zellkulturkammern	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

2.2 Methoden

2.2.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Für einige Experimente ist es essentiell, dass die Zellen adhärent und nicht in dreidimensionalen Sphäroiden wachsen. Dies wurde durch ein Beschichten der entsprechenden Zellkultur-Gefäße mit Kollagen oder Laminin erreicht. Hierzu wurden die Plastikoberflächen mit Verdünnungen von 20 µg/ml in PBS bei Laminin und 50 µg/ml in 0,01 M HCl bei Kollagen bedeckt. Für das Beschichten mit Laminin erfolgte eine Inkubation von 3 h und bei Kollagen von 1 h bei 37° C. Vor Aussaat der Zellen in die entsprechend beschichteten Wells wurden diese 2 Mal mit PBS ausgewaschen.

2.2.2 Aufreinigung von Tumormaterial

Mit Genehmigung durch das positive Ethikvotum der Philipps-Universität Marburg aus dem Jahr 2012 (Aktenzeichen 185/11) wurde das im Rahmen von neurochirurgischen Resektionen gewonnene Tumormaterial von GBMs der WHO Klasse IV zur Isolierung von Zellen genutzt.

Das Tumormaterial wurde unmittelbar nach Resektion in eiskaltem PBS gehalten, bevor es im Labor ein weiteres Mal in PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Skalpell mechanisch in circa 1 mm³ kleine Fragmente zerlegt und durch Accutase enzymatische verdaut. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C wurden 5 ml Medium hinzugegeben, um die Wirkung der Accutase ab zu stoppen. Anschließend wurde durch einen Filter mit 40 µm großen Poren filtriert, um Gewebsfragmente zu entfernen und eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 220 g, wonach zunächst ein rötliches Pellet zu sehen war. Die rötliche Farbe besteht aufgrund der Gegenwart von Erythrozyten, die es bei der Aufreinigung zu entfernen gilt. Dazu wurde 1 ml des Erythrozyten-Lyse-Puffers auf das Pellet gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation und deutlicher Abnahme der Rotfärbung des Pellets wurden die Zellen in einem mit Laminin beschichteten 6-Well ausgesät. Die Zellen wurden standardmäßig in DMEM/F12 (GlutaMAX) Medium mit 2 % B27 Supplement, 1 % Amphotericin B, sowie 0,5 % HEPES und 0,1 % Gentamycin kultiviert. Der Zusatz der Wachstumsfaktoren, EGF (Epidermal Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), in einer Konzentration von 0,02 ng/µl erfolgte direkt durch Zugabe in das entsprechende Zellkulturgefäß.

2.2.3 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Stammzellen wurden auf Gewebekulturschalen bei 37° C und einer 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Sofern für das Experiment nicht anders angegeben, wurden 2 Millionen Zellen in 10 ml Medium mit den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF ausgesät (siehe 2.2.2). Nach 7-11 Tagen wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst in ein 15 ml Falcon überführt und anschließend für 5 min bei 220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen, sodass ein Zellpellet übrig blieb. Die GBM SZ wachsen in multizellulären Tumorsphäroiden, die separiert werden müssen. Um die Zell-Zell-Verbände aufzulösen, wurde das Pellet in 1 ml Accutase resuspendiert und für 20 min bei 37° C inkubiert. Für das Abstoppen der Wirkung der Accutase wurden 3 ml Medium hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend je nach Größe in 3-5 ml frischem Medium resuspendiert. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl der Einzelzellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben und nach etablierten Verfahren gezählt.

2.2.4 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Es wurden jeweils 2 Millionen Zellen auf eine Kultivierungsschale unter Zusatz von 0,02 ng/µl EGF und bFGF bzw. 10 % FCS (Fetales Kälberserum) ausgesät. Die Zugabe von FCS bewirkt, dass die Zellen einen Differenzierungsprozess durchlaufen und den Stammzellcharakter verlieren. Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml QIAzol Lysis Reagent versetzt. Dieses Reagenz enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und des Weiteren RNasen inaktiviert.

Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 30 sec gevortext und für 3-5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4° C konnte eine Phasentrennung der vorher homogenen Lösung observiert werden. Die untere Phase besteht aus dem organischen Lösungsmittel Chloroform und enthält unter anderem die zellulären Proteine. Die DNA befindet sich in der Interphase und die obere, wässrige Phase beinhaltet die zu untersuchende RNA. Letztere wurde in ein neues Eppendorf Tube gegeben und mit 500 µl Isopropanol versetzt.

Danach wurde das Gefäß zehn Mal invertiert, für 10 min bei RT inkubiert und wieder für 15 min bei 12.000 g und 4° C zentrifugiert. Das zuvor zugegebene Isopropanol dient zur Präzipitation der RNA in der wässrigen Lösung, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Das resultierende Pellet wurde mit 1 ml 75 % EtOH in RNase freiem Wasser gewaschen. Nach einer wiederholten Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das RNA enthaltene Pellet auf einem Heizblock bei 37° C getrocknet. Das trockene, farblose

Pellet wurde in 10-20 μl RNase freies Wasser gelöst. Mithilfe des Nano Drop Spektralphotometers wurde die Konzentration der aufgereinigten RNA quantifiziert, indem 1 μl der Probe auf den Sockel des Geräts pipettiert wurde. Das Gerät berechnet dann automatisch anhand der Absorption die Konzentration der Probe in $\text{ng}/\mu\text{l}$. Außerdem wird über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der RNA angezeigt. Optimalerweise sollte dieser bei einem Wert von 2 liegen.

Um die RNA nun in cDNA umzuschreiben, wurde das Prinzip der reversen Transkription angewandt. Dem Kit „RNA to cDNA EcoDry™ Premix“, welches die notwendigen Primer, die DNA-Polymerase und Nukleotide beinhaltet, wurden 2 μg RNA in 20 μl RNase freiem Wasser zugegeben. Im Anschluss wurde die RNA im Thermocycler folgendermaßen umgeschrieben:

Schritt	Temperatur	Zeitintervall
Reverse Transkription	42 °C	60 min
Inaktivierung	70 °C	10 min
Stopp und Lagerung	4 °C	∞

Zuletzt wurde die cDNA mit 180 μl RNase-freiem Wasser verdünnt.

2.2.5 Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion

Um die Bedeutung des DDR1 für den Stammzellcharakter von GBM Zellen zu demonstrieren, wurde das Genexpressionsniveau des DDR1 sowohl in GBM SZ (Kultivierung mit EGF und bFGF) als auch in differenzierten Zellen (Kultivierung mit 10 % FCS) bestimmt und miteinander verglichen.

Dafür wurde eine qPCR durchgeführt. Das Prinzip der qPCR basiert auf einer Amplifikation einer spezifischen Sequenz der eingesetzten cDNA. Dafür werden wie bei einer gängigen PCR die cDNA (siehe 2.2.5), DNA-Polymerasen, für das untersuchende Gen spezifische Primer und Nukleotide benötigt. Um nun die Expression des zu amplifizierenden Gens zu quantifizieren, macht man sich die Eigenschaften des DNA-Farbstoffes SYBR Green zu Nutze. Das SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich interkalierend in die DNA einlagert. Je mehr Target-DNA nun von Zyklus zu Zyklus vervielfältigt wird, desto stärker steigt die Fluoreszenz des SYBR Greens, welche in Echtzeit gemessen wird.

Für die Durchführung wurden 2 μl von der verdünnten cDNA (siehe 2.2.5) in die entsprechenden Wells einer 96-Well Multiply-Fast PCR-Platte hinein pipettiert. Die Quantifizierung wurde in Triplikaten vollzogen. Als Kontrolle dienen Wells mit 2 μl RNase freiem Wasser statt cDNA. Anschließend wurde ein Mastermix aus 10 μl eines 2-fach konzentrierten SYBR Green Mix, 2 μl DDR1 Primer und 6 μl RNase freiem Wasser hergestellt.

Dieser Mastermix wurde dann in die Wells gegeben, wodurch ein Endvolumen von 20 µl pro Well erhalten wurde. Die Quantifizierung der Target-DNA erfolgt relativ zu einem Gen, welches unabhängig von Zellzyklus und externen Einflüssen exprimiert wird. Hier wurde als so genanntes Housekeeping Gen das ribosomale XS-13 genutzt. Bei den Primern für das XS-13 wurde aufgrund höherer Konzentration nur 0,2 µl verwendet und die Menge des Wassers im Mastermix entsprechend angepasst.

Die Platte wurde mit einer adhäsiven Folie versiegelt und am StepOnePlus™ Real-Time PCR System mit folgendem Programm untersucht:

Temperatur	Zeit	
95° C	10:00 min	} 40 Zyklen
95° C	00:15 min	
60° C	01:00 min	
95° C	00:15 min	
60° C	01:00 min	

2.2.6 Immunofluoreszenz

Um zu überprüfen, ob die GBM SZ den DDR1 exprimieren, wurde das Verfahren der indirekten Immunofluoreszenz angewandt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob es im DDR1-Expressionsprofil einen Unterschied zwischen GBM SZ und jenen Zellen, die unter Zusatz von FCS für sieben Tage einen Differenzierungsprozess durchlaufen haben, gibt. Des Weiteren sollte der Einfluss des DDR1-Inhibitors auf Lokalisation und Expressionsniveau des Proteins analysiert werden.

Die GBM SZ 2016/175 wurden zum einen unter Anwesenheit von EGF und bFGF (SZ) und zum anderen unter Anwesenheit 10 % FCS (differenzierte Zellen) kultiviert. Nach sieben Tagen und anschließendem Passagieren der Zellen wurden 50.000 Zellen pro Well auf 4 Wells einer 8-Well Kammer auf Glas ausgesät. Die Wells wurden zuvor bereits mit Laminin beschichtet. Nach eintägiger Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurden in 2 Wells der DDR1-Inhibitor in einer Endkonzentration von 0,5 µM dazugegeben:

FCS	EGF/bFGF
unbehandelt	unbehandelt
FCS	EGF/bFGF
0,5 µM DDR1-Inhibitor	0,5 µM DDR1-Inhibitor

Nach einer weiteren Inkubation von 48 h wurden die Wells drei Mal mit PBS gewaschen. Der Waschvorgang wurde bei jedem weiteren Schritt dieses Versuches wiederholt. Um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren wurden die Wells mit -20° C kaltem Methanol vollständig bedeckt. Die Permeabilisierung ist insofern wichtig, weil der primäre Antikörper, der für die Detektion des DDR1 eingesetzt wurde, nur intrazellulär bindet. Die Wells wurde mit einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10 in PBS bedeckt und für 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung in PBS zugeben. Der sekundäre Antikörper ist direkt an das Fluorochrom Dylight 488 gekoppelt, welches bei Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert. Ab diesem Schritt wurde das Präparat lichtgeschützt gehalten, um ein Ausbleichen zu verhindern. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welcher sich in der doppelsträngigen DNA in Bereichen mit viel Adenin einlagert und bei ultravioletter Anregung blau fluoresziert. Zuletzt wurde der Objektträger mit Mounting Medium eingedeckt und lichtgeschützt gelagert.

2.2.7 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurde Tumormaterial von 5 Patienten verwendet. Es wurde von allen 5 Patienten sowohl Tumormaterial des Primärtumors, als auch vom rezidierten Tumor genutzt („patient matched“). Das Tumormaterial wurde zur Konservierung in der Klinik für Neuropathologie postoperativ in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die im Folgenden beschriebene Färbung wurden 3 µm dünne Schnitte von diesem Gewebe angefertigt.

Auf den Schnitten sollten nun die GBM SZ in ihren kollagenreichen Nischen dargestellt werden, hierzu wurde eine Co-Färbung gewählt, die auf einem Schnitt sowohl das Kollagen, als auch die GBM SZ detektiert. Es wurde eine Piko-Siriusrot-Färbung für die Detektion von Kollagen I in Kombination mit einer Immuno-DAB-Färbung für die Detektion des neuronalen Stammzellmarkers Nestin durchgeführt.

Des Weiteren sollte ein Vergleich des DDR1-Expressionsprofils im Primärtumor und im Rezidivtumor ermöglicht werden, hierfür wurde das DDR1 über die Immuno-DAB-Färbung und im selben Schnitt der Stammzellmarker Nestin über die VIP-Färbung detektiert.

Zu Beginn wurden die Schnitte für 45 min bei 60° C entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 2x10 min in Xylol, 2x5 min in 100 % Ethanol, 2x5 min in 96 % Ethanol, 2x5 min in 70 % Ethanol. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang 2x5 min mit bidestilliertem Wasser und ein Kochen der Schnitte für 20 min in Citratpuffer. Dies dient dazu Epitope zu demaskieren, sodass die Bindungsstellen für die einzusetzenden Antikörper frei vorliegen.

Nach dem Abkühlen wurde mit einer Inkubation von 30 min in 1 % H₂O₂ in Methanol die endogene Peroxidase geblockt. Dies ist erforderlich, da die Färbung auf einer enzymatischen Substratumsetzung der Horseradish Peroxidase (HRP) basiert. Das dabei verwendete Substrat kann auch von der endogenen Peroxidase umgesetzt werden, wodurch es ein falsch positives Signal gäbe, wenn diese nicht geblockt würde.

Nach einem Waschen von 2x5 min in PBS, wurde eine 1,5 % Lösung aus Blockserum (Vecta Stain Elite Kit) in PBS für 30 min auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Lösung des primären Antikörpers (DDR1 1:10 in PBS, Nestin 1:200 in PBS) bedeckt und über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte, nach zweimaligem Waschen in PBS, für 30 min mit einer Lösung aus sekundärem, biotinyliertem Antikörper bedeckt.

Als nächstes wurde das ABC Reagenz, welches mindestens 30 min vor Einsatz angesetzt wurde, auf die Schnitte pipettiert. Das ABC Reagenz besteht aus Avidin und der biotinylierten HRP. Das Avidin besitzt 4 Bindungsstellen und hat eine hohe Affinität zu Biotin. So kann das Avidin Molekül zum einen am biotinylierten sekundären Antikörper binden, zum anderen weitere freie Biotin Moleküle aufnehmen. So können am Avidin Molekül bis zu 3 HRP Moleküle binden, was zu einer Signalamplifikation führt. Im nächsten Schritt wurde das Diaminobenzidin aus dem ImmPACT DAB Substrate Kit auf die Schnitte gegeben. Dieses chromogene Substrat wird durch die HRP in einen bräunlichen Farbstoff umgewandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser einmal für 5 min gewaschen. Das weitere Prozedere wird nun für die jeweiligen Co-Färbungen getrennt beschrieben.

DAB-/Pikro-Siriusrot-Färbung:

Nach dem Waschen wurde mit Hämalun für 5 min gegen gefärbt und anschließen für 15 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung dient dazu die Zellkerne zu visualisieren und erfolgt zuerst im sauren Milieu, erst durch das Erhöhen des pH-Wertes mit Leitungswasser entsteht die blaue Färbung, sodass das Waschen in Leitungswasser umgangssprachlich auch „Bläuen“ genannt wird.

Um das Kollagen I im Schnitt darzustellen, wurde nun die Picro-Siriusrot-Färbung angeschlossen, hierzu wurde das Picrosirius Red Stain Kit genutzt. Nach Angaben des Herstellers wurden die Schnitte für 2 min mit der Solution A (Molybdatophosphorsäure) bedeckt. Im Anschluss wurde ein Waschvorgang von 5 min in bidestilliertem Wasser vollzogen und danach die Solution B (Picrosirius Red F3BA Stain) auf die Schnitte pipettiert. Die Solution B enthält den eigentlichen Farbstoff für das Kollagen. Die molekulare Interaktion zwischen Picro-Siriusrot und Kollagen basiert auf den im Kollagen zahlreich vorkommenden basischen Aminosäuren. Diese können mit den 6 Sulfonylgruppen des Picrosirius Red interagieren, sodass sich der Farbstoff schrittweise längs anlagert. Damit verstärkt sich die Doppelbrechung des Kollagens und zeigt unter dem Polarisationsmikroskop eine gelb-orange Färbung des Kollagens I und eine grüne Färbung des Kollagens III. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Schnitte für 2 min mit 0,1 N Salzsäure bedeckt und anschließend in bidestilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert: 2x5 min 70 % Ethanol, 2x5 min 96 % Ethanol, 2x5 min 100 % Ethanol und 2x10 min Xylol. So wurden die Schnitte schlussendlich in Eukitt eingedeckt und für 24 h luftgetrocknet.

DAB-/VIP-Färbung:

Um zusätzlich zur DAB-Färbung des DDR1 noch eine VIP-Färbung des Nestins durchzuführen, wurden die Schnitte erneut mit einer 1,5 %igen Lösung des Blockserums bedeckt. Es folgt die Inkubation mit dem gegen Nestin gerichteten Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS über Nacht. Die VIP-Färbung beruht auf demselben Prinzip wie die Immuno-DAB-Färbung, es wird lediglich statt des Diaminobenzidins ein violette VIP-Substrat dazugegeben und für 2-15 min inkubiert. Sobald sich eine intensive violette Färbung zeigte, wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen und wie bereits beschrieben mit Hämalaun gegengefärbt. Die Schnitte wurden zum Schluss mit Mounting Medium eingedeckt und für 24 h luftgetrocknet.

2.2.8 Herstellung von Proteinlysaten

Um die Expression des DDR1 unter verschiedenen Bedingungen auf Proteinebene zu bestimmen, sollte ein Western Blot durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst die entsprechenden Protein Lysate hergestellt, indem jeweils Protein aus einem zu ca. 80 % konfluenten 6-Well der GBM SZ 2016/175 isoliert wurde. Die Hälfte der Wells wurden zuvor mit Kollagen beschichtet, die andere Hälfte wurde unbehandelt belassen. Insgesamt wurden 300.000 Zellen in 2 ml Medium pro Well ausgesät. Am Folgetag wurden in jeweils ein beschichtetes und ein unbeschichtetes Well der DDR1-Inhibitor in zwei unterschiedlichen

Konzentrationen (0,5 μM und 1 μM) zugegeben und über verschiedene Zeiträume, 48 h, 1 Woche und 2 Wochen, bei 37 °C inkubiert.

ungecoatet, unbehandelt	ungecoatet, 0,5 μM DDR1-Inhibitor	ungecoatet, 1 μM DDR1-Inhibitor
Kollagen, unbehandelt	Kollagen, 0,5 μM DDR1-Inhibitor	Kollagen, 0,5 μM DDR1-Inhibitor

Nach der Inkubationszeit wurden die Lysate hergestellt. Die sich in Suspension befindenden Zellen wurden zunächst für 5 min bei 220 g zentrifugiert und das Zellpellet in 200 μl RIPA Puffer gelöst. Für die auf Kollagen adhärent wachsenden Zellen wurde die gleiche Menge RIPA Puffer nach Verwerfen des Mediums direkt in das Well gegeben. Ab diesem Schritt wurde das Zellmaterial auf Eis gehalten, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4° C und konstantem Schütteln wurde die homogenisierte Lösung mit einer Injektionskanüle (26G) mehrere Male aufgezogen, sodass ein Scheren der DNA erreicht wurde. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min auf dem Laborschüttler wurde das Lysat für 5 min mit 13.000 g bei 4° C zentrifugiert, so dass der Zelldebris entfernt werden konnte. Der Überstand, welcher alle Proteine der Zellen enthält, wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80° C gelagert.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für eine SDS-PAGE wurden 10,5 μl der Protein Lysate mit 3 μl eines 5x Laemmli Puffers und 1,5 μl eines 10x Sample Reducing Agent versetzt. Als Nächstes wurden die Proben gevortext, zentrifugiert und auf einem Heizblock für 5 min bei 95° C erhitzt. Diese Schritte dienen zum einen zur Denaturierung der Proteine in ihre primäre Aminosäuresequenz, außerdem erhalten die Proteine durch Anlagerung des im Laemmli-Puffer enthaltene SDS eine negative Ladung, sodass es zu einer Überlagerung der endogenen Proteinladung kommt und alle Proteine ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen.

Für die Auftrennung der Proteine wurden 10 %ige Gele verwendet. Diese wurden nach dem unter 2.1.2 aufgeführten Rezept gegossen.

Die Proben wurden mit einer Hamiltonspritze in die hierfür vorgesehenen Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichts-Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) in eine Tasche geladen, um die später aufgetrennten Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu identifizieren. Das im Gel vorliegende Polyacrylamid sorgt für eine hohe Quervernetzung, welche wie ein Sieb wirkt, durch das die Proteine bei einer angelegten Spannung wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist antiproportional zur Masse der

Proteine, so dass kleine Proteine schneller wandern als große. Die bereits erwähnte stark negative Ladung der Proteine durch das SDS verhindert bei der Wanderung den Einfluss unterschiedlicher Ladungen der jeweiligen Proteine. Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Laufpuffer umgeben und eine Spannung von zunächst 80 V und nach Erreichen des Trenngels von 120 V für ca. 2 h angelegt.

2.2.10 Western Blot

Nach dem Auftrennen der Proteine nach ihrer Masse durch die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierfür wurde das sogenannte „Western-Blot“ Verfahren angewandt. Hierbei wird ein pufferdurchtränktes Sandwich aus Whatman-Papier, Membran, SDS Gel, und wiederum einem Whatman-Papier zusammengesetzt. Dieses wurde in der dafür vorgesehenen Apparatur gefüllt mit Transferpuffer für 2 h einer Spannung von 200 V ausgesetzt.

Der Proteintransfer erfolgt folgendermaßen: Es werden für die Elution der Proteine aus dem Gel und für die Adsorption auf die Membran unterschiedliche Bedingungen benötigt. Der Transferpuffer stimmt mit der Ionenstärke, dem pH-Wert und vor allem der SDS-Konzentration mit dem Laufpuffer überein. Dies sind gute Bedingungen für die Elution aus dem Gel. Der Proteintransfer sollte SDS-frei ablaufen, sodass nun das Methanol im Transferpuffer eine Rolle spielt. Durch die Hydrophilie des SDS kann das ebenfalls hydrophile Methanol das SDS von den Proteinen trennen. Durch starke Wechselwirkung zwischen Proteinen und Membran wird der Proteintransfer ermöglicht.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 1 h mit 5 % Milch in TBST geblockt. Dies ist erforderlich, um die Membran abzusättigen und somit unspezifische Bindungen des anschließend eingesetzten primären Antikörpers zu vermeiden. Für den DDR1-Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:1000 in 5 % BSA in TBST und für die Ladungskontrolle beta-Tubulin eine Verdünnung von 1:2000 in 5 % Milch in TBST gewählt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Membran zunächst mit TBST gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, in einer Verdünnung von 1:2000 in 5 % Milch in TBST für 1 h. Der sekundäre Antikörper erkennt speziesspezifisch den primären Antikörper und bindet an diesen. Ersterer ist an das Enzym HRP gekoppelt ist, welches beim Entwickeln das dazugegebene Substrat Luminol in seine oxidierte Form umsetzt. Dieses Reaktionsprodukt kann an der entsprechenden Stelle in Form von Lumineszenz detektiert werden.

Zum Entwickeln wurde die Membran mit dem Westernbright Chemilumineszenz Substrat Sirius bedeckt und in eine Dunkelkammer gelegt. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des Entwicklers und des Programms INTAS beobachtet und dokumentiert.

2.2.11 Mikroskopie und Bildanalyse

Für die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Aufnahmen mit dem Weitfeldmikroskop DM5500 von Leica und der dazu gehörenden Software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) angefertigt. Es wurden die Kanäle Alexa Fluor 488 und DAPI ausgewählt und mit dem Tool „Z-Stack“ gearbeitet, sodass in einem ausgewählten Bereich des Wells mehrere Aufnahmen übereinander in 1 µm Abständen gemacht wurden. Hierdurch lässt sich nach der Aufnahme mittels des „3D Deconvolution“ Tools die Bildqualität verbessern. Die Software wendet dabei einen mathematischen Algorithmus an, der es erlaubt das Signal der darüber und darunter liegenden Schichten rauszurechnen und somit das Rauschen zu reduzieren. Es wurden sowohl ein 40er Öl-Immersionsobjektiv für Nahaufnahmen als auch ein 20er Objektiv für Übersichtsaufnahmen eingesetzt.

Für die nachträgliche Bildbearbeitung wurde mit dem Programm FIJI Image J (NIH) gearbeitet. Kontrast und Helligkeit wurden angepasst und eine Scale bar wurde eingefügt.

Von den DAB und VIP gefärbten Schnitten wurden Bilder mit dem Mikroskop Imager M2 der Firma Zeiss und der Software Stereo Investigator (MBF Bioscience) aufgenommen. Zunächst wurde das ganze Gewebe mit einem 2,5er Objektiv konturiert, um dieses anschließend mit der Funktion „Virtual Tissue Scan“ und einem 10er Objektiv in jedem einzelnen Gesichtsfeld manuell zu fokussieren. Daraufhin folgte das Scannen des Gewebes, sodass aus den einzelnen Gesichtsfeldern am Ende vollautomatisch eine Rekonstruktion des gesamten Schnittes angefertigt wurde. Für detailreichere Nahaufnahmen wurden Bilder mit einem 40er Öl-Immersionsobjektiv angefertigt.

Die Bildanalyse erfolgte hier ebenfalls mit dem Programm FIJI Image J (NIH). Dabei wurde zunächst der Dateityp der Bilder in RGB Color geändert, um eine „Color Deconvolution“ zu starten. Dieses Tool ermöglicht es die Aufnahmen in die einzelnen Farben, Hämatoxylin und DAB bzw. VIP, zu unterteilen, so dass am Ende drei einzelne Bilder erhalten werden. Für jedes dieser Einzelbilder werden vom Programm Werte für die Farben red, green und blue festgelegt. Als Nächstes wurde von der Aufnahme des DAB Kanals ein zweites Bild angefertigt, indem der Kontrast und die Helligkeit manuell angepasst wurden. Anhand dieses Bildes wurde die Akkumulationsfläche des DAB Signals berechnet. Hierzu wurden zunächst manuell die

Zonen konturiert, die nach subjektiver Einschätzung eine im Gegensatz zum Hintergrund deutlich intensiverer Färbung zeigten. Die addierte Fläche dieser Zonen wurde dann in Pixeln berechnet, ebenso wurde mit der Gesamtfläche des Gewebes verfahren, um am Ende die Akkumulationsfläche der DAB Färbung als prozentualen Wert der Gesamtfläche auszudrücken zu können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Immunhistochemischer Nachweis der GBM SZ und ihrer DDR1-Expression

FFPE-Gewebeschnitte von 5 verschiedenen Patienten, bei denen sowohl Material des primären, als auch des rezidierten Tumors vorhanden war, wurden in einer immunhistochemischen Färbung bezüglich des Gehalts an TSZ in kollagenreichen Nischen und deren DDR1-Expression untersucht. Bei allen 5 Patienten wurde ein GBM WHO° IV histopathologisch bestätigt. Weitere Daten, sowie die Ergebnisse der molekulargenetischen und histologischen Untersuchungen sind in Tab. 1 gelistet.

Tab. 1: Patientendaten, molekulargenetische und histologische Charakterisierung des Tumormaterial der resezierten GBMs.

Das angegebene Alter des Patienten bezieht sich auf das Alter zu Beginn der Operation des Primärtumors. Das Gesamtüberleben umfasst die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Tag des Todes, während die Latenzzeit das Zeitintervall zwischen OP des Primärtumors und des Rezidivs darstellt. Die MGMT ist ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf die Behandlung mit Alkylanzien (siehe 1.1.4). Das Expressionsniveau für das Reparaturenzym wird über den Promoter des MGMT-Gens reguliert. Ist dieser methyliert, wird das Gen abgeschaltet, sodass keine MGMT exprimiert wird und ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika erwartet werden kann (Gilbert et al., 2013). Das Expressionsniveau des Epidermal Growth Factor variant III (EGF-R-VIII) wird untersucht, weil eine Amplifizierung dieses Gens mit einer schlechteren Prognose einhergeht (siehe 1.1.4). Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor und seine Inaktivierung spielt eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese: Kommt es zu Mutationen seines Gens, dem *TP53*-Tumorsuppressor-Gen, führt dies sehr häufig zu einer Akkumulation des mutierten p53 in den Tumorzellen, wobei die tumorsuppressiven Eigenschaften nicht nur verloren gehen, sondern auch onkogene Merkmale, wie Wachstum und Proliferation, in Erscheinung treten (Rivlin et al., 2011). Der Proliferationsmarker Ki-67 zeigt die Höhe der Teilungsbereitschaft der Tumorzellen und ist somit ebenfalls ein wichtiger Marker für die Aggressivität des Tumors (siehe 1.1.4). Die Punktmutation der Isocitrat-Dehydrogenase 1 an der Position 132 (IDH1 R132H), an der ein Arginin durch ein Histidin substituiert wurde, ist ein prognostischer Marker für das Überleben der Patienten mit Gliomen. Eine IDH1 R132H Mutation ist mit einem besseren Gesamtüberleben bei GBM-Patienten assoziiert (Khan et al., 2017).

Patient	Geschlecht	Alter in Jahren	Gesamt-überleben in Tagen	Latenzzeit in Tagen	MGMT Promoter	EGF-R-vIII	p53 Akkumulation	Ki-67	IDH1 R132H
A	weiblich	53	nicht bekannt	305	methyliert	negativ	kräftig akkumuliert	Primus: 50 % Rezidiv: 5 %	negativ
B	weiblich	51	445	147	nicht methyliert	negativ	akkumuliert	Primus: 20 % Rezidiv: 5 %	negativ
C	männlich	71	532	357	nicht methyliert	negativ	kräftig akkumuliert	Primus: 50 % Rezidiv: 50 %	negativ
D	männlich	57	343	288	nicht methyliert	negativ	akkumuliert	Primus: bis 50 % Rezidiv: 10 %	negativ
E	männlich	32	760	491	nicht methyliert	negativ	fokal akkumuliert	Primus: 75 % Rezidiv: 20 %	negativ

Um die GBM SZ in ihren vermuteten kollagenreichen Nischen optisch darzustellen, wurde eine DAB-Markierung für den Stammzellmarker Nestin für die Detektion der GBM SZ und eine Pikrosirius-Rot-Färbung für das Kollagen auf einem FFPE-Gewebeschnitt kombiniert. Zudem wurde eine Kombination aus einer DAB-Färbung für den DDR1 und einer VIP-Färbung für das Nestin durchgeführt, damit die DDR1-Expression spezifisch in GBM SZ auf Proteinebene analysiert werden konnte. Die beiden kombinierten Färbemethoden wurden bei allen 5 Patienten sowohl in Gewebeschnitten von Primärtumor und Rezidiv angewandt, um die Frage zu beantworten, ob Unterschiede in der DDR1-Expression und der Nestin-Akkumulationen in beiden Gewebetypen vorhanden sind. Die Abbildung 7 zeigt einige Ausschnitte der untersuchten Proben, in denen klare Nestin-positive Bereiche mit kollagenreicher Umgebung in der DAB-/Pikrosirius-Rot-Färbung beobachtet wurde. Anschließend wurde der gleiche Bereich im Schnitt mit der DAB-/VIP-Färbung ermittelt, um zu klären, ob die detektierten Nestin-positiven Zellen im Akkumulationsbereich eine höhere DDR1-Expression im Vergleich zu anderen Tumorzellen aufweisen.

In der Abbildung 7A, E und G werden Areale der bearbeiteten Schnitte gezeigt, in denen deutliche Bereiche von braun gefärbten Zellen zu sehen sind. Die Vergrößerung zeigt in Abbildung 7A und B die ausgeprägte Detektion von Nestin-positiven Zellen in kollagenreicher Umgebung (Abb. 7C und D). Die Nestin-markierten Zellen zeigen im Unterschied zu den anderen Zellen in der Umgebung ebenfalls eine bräunliche Färbung mit dem DDR1-Antikörper (Abb. 7A und C). In Abbildung 7F ist das ganze Areal sehr diffus bräunlich gefärbt, wobei in 7H keine bräunlichen Zellen zu finden sind. Weder in Abbildung 7B, D, F noch H lässt sich eine violette VIP-Färbung des eingesetzten Nestins erkennen

DAB-Färbung Nestin
Pikrosirius-Rot-Färbung Kollagen

DAB-Färbung DDR1 +
VIP-Färbung Nestin

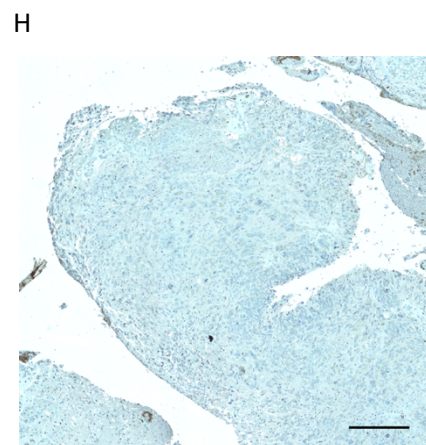
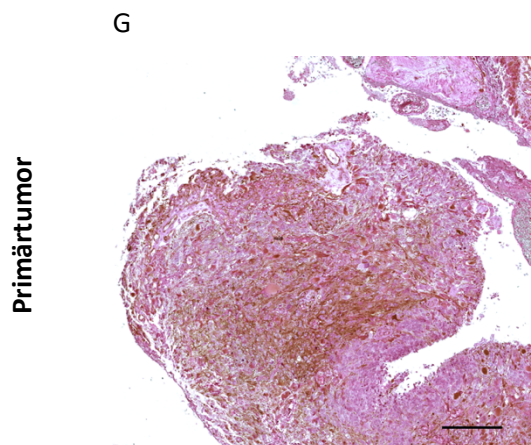
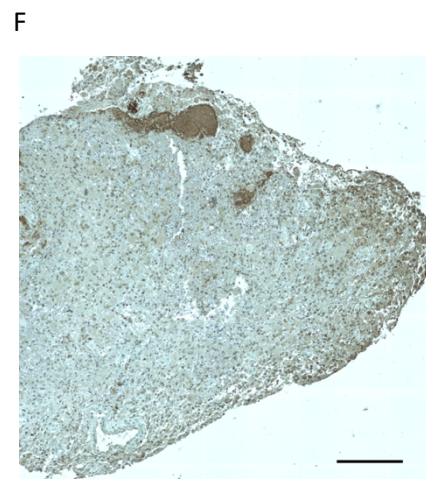
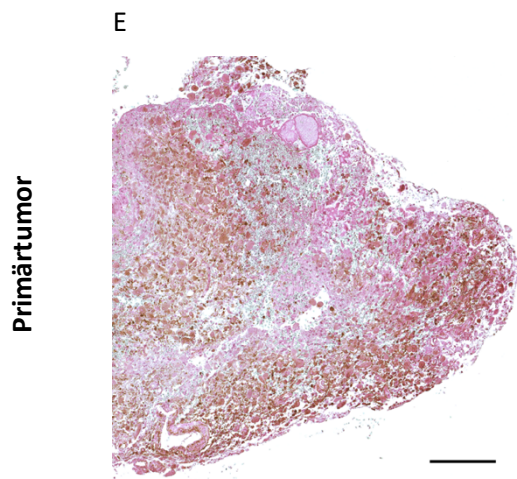
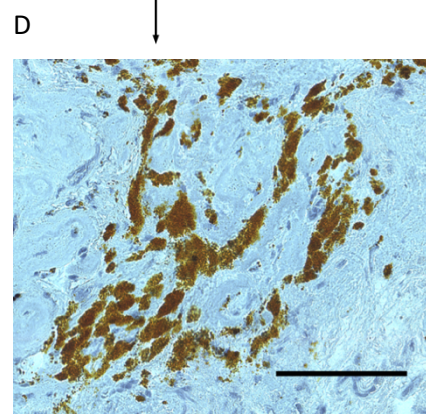
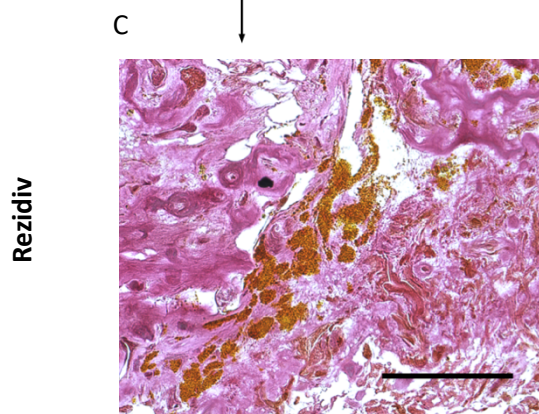
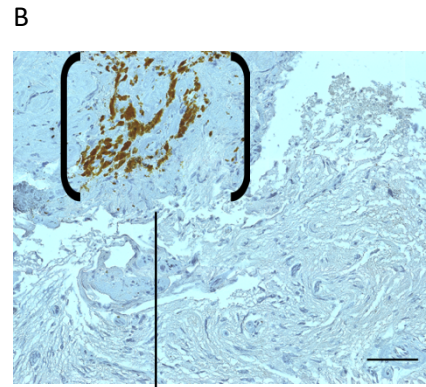
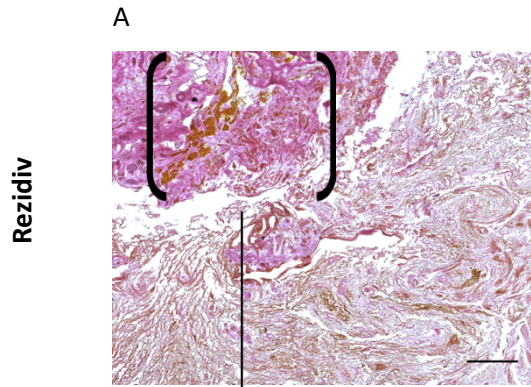


Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von Nestin und Kollagen, sowie DDR1 und Nestin in FFPE-GBM-Schnitten, der Maßstabsbalken für alle Bilder beträgt 100 µm, Nestin (braun) und Kollagen (rot) in (A), (C), (E) und (G), DDR1 (braun) und Nestin (violett) in (B), (D), (F) und (H).

Dargestellt sind die jeweils gleichen Regionen in zwei benachbarten Schnitten, Nestin und Kollagen Färbung (linke Spalte) bzw. Nestin und DDR1 Färbung (rechte Spalte) unterzogen wurden. Vergrößerung in C und D handelt es sich um vergrößerte Ausschnitte von A bzw. B, dies ist durch Pfeile entsprechend angedeutet.

In Abbildung 7A, C, E und G ist zu sehen, dass sich die GBM SZ, die über den neuronalen Stammzellmarker Nestin (Jin et al., 2013) detektiert wurden, in kollagenreichen Nischen befinden. Dies ist gut durch die braune Färbung der Nestin-positiven Zellen in einer pink/rot gefärbten Umgebung zu erkennen.

Dass nun die GBM SZ über den DDR1 mit dem Kollagen interagieren, kann allein mit diesem Versuch nicht bewiesen werden. Hierfür wurde in einem benachbarten Schnitt eine Co-Markierung mit Nestin und DDR1 durchgeführt. Dabei zeigte sich in einigen Schnitten, dass in genau den Zellen, die zuvor als Nestin positiv identifiziert wurden (Abb. 7A und C) nun auch eine hohe DDR1-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 7B und D).

Jedoch lässt sich dies nicht verallgemeinern, da auch Nestin-Areale gefunden wurden, die eine geringe (Vgl. Abb. 7E und F) oder keine (Vgl. Abb. 7G und H) DDR1-Expression aufwiesen. Dass die Detektion von GBM SZ über Nestin mittels VIP-Färbung (Abb. 7 rechte Spalte) ungenügend erfolgte, könnte an der Kombination mit der DAB-Färbung, die möglicherweise die VIP-Färbung abschwächte, liegen. Diese mögliche Komplikation wurde zwar bedacht, indem zuerst die DAB-Färbung und anschließend die VIP-Färbung vollzogen wurde, da sich diese Reihenfolge in zuvor durchgeführten Etablierungsstudien als bessere Variante herausstellte. Die Kombination der beiden Markierungen ist noch verbesserungswürdig und könnte beispielsweise durch eine stärkere Verdünnung des Antikörpers für die DAB-Färbung oder einen anderen Nestin-Antikörper modifiziert werden. Die gewonnenen Informationen aus den zwei Färbekombinationen reichen aber aus, da bereits in der DAB-/Pikrosirius-Rot-Färbung das Nestin detektiert werden konnte.

Um nun zu analysieren, ob ein Unterschied zwischen der DDR1-Expression im Primärtumor und im Rezidiv vorliegt, wurde die Gesamtakkumulationsfläche des mit DAB-gefärbten DDR1 in allen 5 patient-matched Schnitten berechnet. Ist der DDR1 für die GBM SZ wichtig für das Überleben der Radiochemotherapie, wäre es interessant herauszufinden, ob es möglich ist, eine Erhöhung der DDR1-Expression im rezidierten Tumor nachzuweisen. Dafür wurden bei

dieser Berechnung die DAB-gefärbten Flächen und die Gesamtgewebeschnittflächen in Pixel aufgefasst und der prozentuale Anteil daraus ermittelt. Dies wird in Tabelle 2 veranschaulicht.

Tab. 2: Berechnung der Fläche der gesamten DAB-gefärbten DDR1-Akkumulationen in der DAB-/VIP-Färbung

Patient	Gewebetyp (Primärtumor/Rezidiv)	Gesamtarealgröße in Pixel	Gesamtakkumulationsfläche DDR1 in %
A	Primärtumor	762460668	4,07
	Rezidiv	1323731358	2,81
B	Primärtumor	307556231	42,81
	Rezidiv	312902838	24,29
C	Primärtumor	1529363714	15,15
	Rezidiv	1229048440	14,29
D	Primärtumor	770148740	10,62
	Rezidiv	1700350206	12,69
E	Primärtumor	1046195808	0,37
	Rezidiv	1562326126	5,08

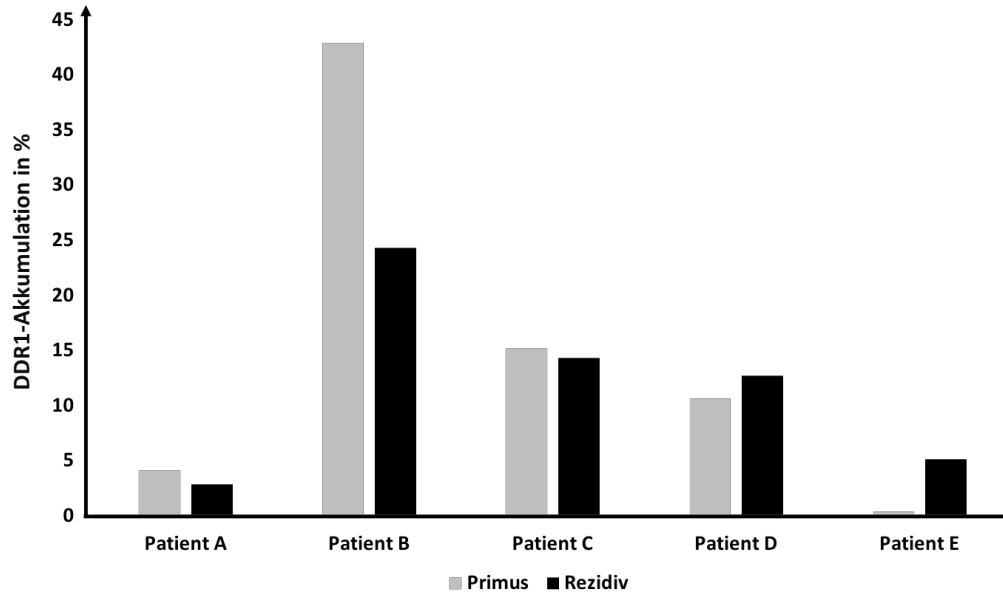
Um zu klären, ob neben einer möglichen Erhöhung der DDR1-Expression auch eine Vermehrung der GBM SZ, die für Therapieresistenz und Überleben stehen, nachgewiesen werden kann, wurden außerdem die Nestin-Areale in allen Schnitten untersucht und der prozentuale Anteil der somit detektierten Stammzellen im Tumorgewebeschnitt analog berechnet (Tab. 3)

Tab. 3: Berechnung der Fläche der gesamten DAB-gefärbten Nestin-Akkumulationen in der DAB-/Pikrosirius-Rot-Färbung

Patient	Gewebetyp (Primärtumor/Rezidiv)	Gesamtarealgröße in Pixel	Gesamtakkumulationsfläche Nestin in %
A	Primärtumor	748212005	19,04
	Rezidiv	1255793688	1,43
B	Primärtumor	300975974	47,23
	Rezidiv	312891774	90,0
C	Primärtumor	1003252506	9,59
	Rezidiv	813720930	65,18
D	Primärtumor	1544611177	2,88
	Rezidiv	923013842	10,66
E	Primärtumor	1878893793	23,86
	Rezidiv	748212005	19,04

Alle berechneten Ergebnisse der Tabelle 2 und 3 sind in Abb. 8 in Form eines Säulendiagramms zusammengefasst worden.

A



B

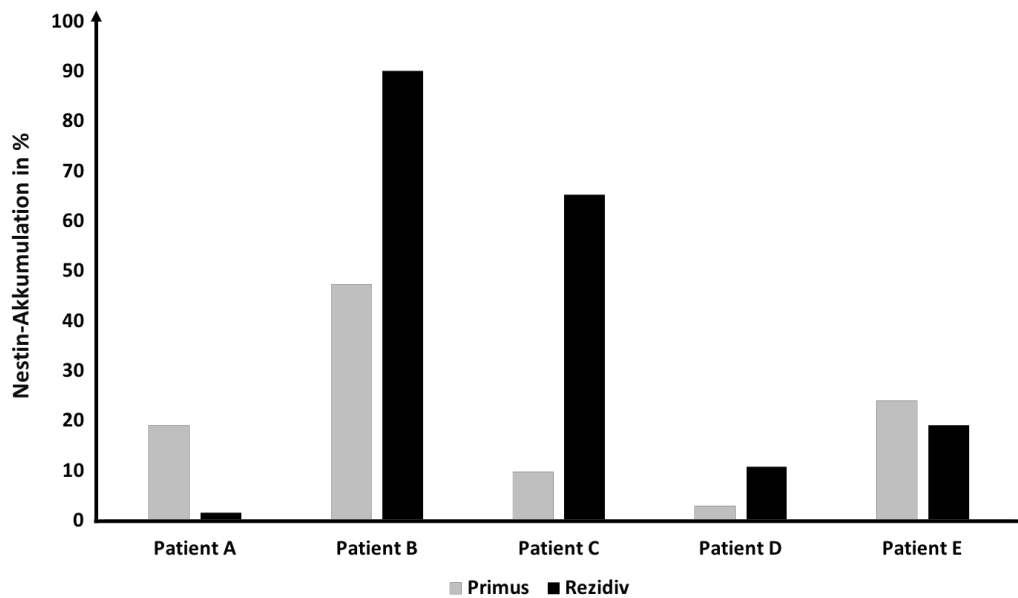


Abb. 8: Vergleich der DDR1-Akkumulation (A) bzw. der Nestin-Akkumulationen (B) im Primärtumor und im Rezidiv.

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Gesamtschnittfläche, der sich in der DAB Färbung als braun und somit positiv für DDR1 bzw. Nestin darstellt, im Vergleich Primus und Rezidiv (patient-matched).

Die Interpretation dieser Berechnungen sollte mit Vorsicht erfolgen: Resultate wie in Tab. 8 bei Patient B und C, die einen prozentualen Stammzellanteil von über 65 % (Patient C) und sogar 90 % (Patient B) ergeben, entsprechen nicht der physiologischen Situation. In der Literatur wird beschrieben, dass es sich bei den TSZ nur um einen kleinen Anteil von unter 1 % der gesamten Tumormasse handelt (Enderling, 2015; Kasai et al., 2014). Bei jeder immunhistochemischen Untersuchung sind die äußeren Faktoren, wie Aufbewahrung der frischen oder bereits gefärbten FFPE-Gewebeproben, Inkubationszeit der einzelnen Färbeschritte, Kreuzreaktionen von Reagenzien oder Beurteilung und Interpretation der Resultate, mögliche Fehlerquellen. Als potentiell methodische Ursachen für die hohen Nestin-Akkumulationen zählen hierbei eine Kreuzreaktion des eingesetzten Nestin-Antikörpers mit weiteren unbekanntem Epitopen oder eine zu lange Inkubationszeit bei der Gabe des ImmPACT™ DAB. Außerdem sollte die Berechnung der Akkumulationsflächen als weitere Fehlerquelle diskutiert werden. Die markierten Nestin-Akkumulationsbereiche wurden von einem Untersucher interaktiv markiert, anschließend wurden deren Flächen über das Programm ImageJ berechnet. Dabei kann eine gewisse Ungenauigkeit nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die teilweise hohen Nestin-Akkumulationsflächen ist die Quantifizierung der Akkumulationsbereiche für DDR1 und Nestin und nicht der absoluten DDR1- bzw. Nestin-positiven Zellzahl. Eine Erfassung der absoluten Zellzahl wäre genauer gewesen, da Strukturen wie Blutgefäße, Mesenchymzellen etc. anders als beim Markieren der Akkumulationsbereiche nicht toleriert werden müssen. Jedoch ist diese Analysemethode aufgrund der Anzahl und Größe der Gewebeschnitte deutlich aufwändiger und würde keinen eindeutigen Vorteil für das Ergebnis bieten.

Unter Berücksichtigung dieser Auswertemethode zeigte die Berechnung der Nestin-Akkumulationen im Rezidiv bei 3 von 5 Patienten (Tab. 3, B, C und D) eine erhöhte Fläche an Nestin-markierten Zellen. Die DDR1 Markierung zeigte im Rezidiv lediglich bei 2 von 5 Patienten (Tab. 2, D und E) eine erhöhte Gesamtakkumulationsfläche an DDR1 DAB-gefärbten Zellen. In beiden Tabellen zeigt sich kein deutlicher Trend für eine erhöhte Expression von DDR1 in GBM SZ vom Primärtumor zum Rezidiv. Die Analyse des Verlaufs bei einzelnen Patienten zeigt sich nur bei einem einzigen Patienten (D) sowohl eine Erhöhung der Nestin-Akkumulationen als indirektes Zeichen für ein erhöhtes Vorkommen der GBM SZ, und der DDR1-Expression. Somit konnte die Hypothese, dass im Rezidiv die überlebenden GBM SZ vermehrt und mit höherer DDR1-Expression vorliegen (siehe 1.4), in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

Anhand der Tabelle 2 erschließt sich, dass bei dem Patienten B der größte prozentuale Anteil und bei Patient E der kleinste prozentuale Anteil an DDR1-Akkumulationen vorliegt. Dies ist

insofern interessant, wenn ein höheres DDR-Expressionsniveau auf eine kürzere Latenzzeit für die Bildung eines Rezidivs hinweist: Im Jahr 2006 wurde eine Studie durchgeführt, in der bei 19 Patienten, die an einem Gliom erkrankten, eine DDR1-Expression mit qPCR- und die immunhistochemischer Markierung untersucht wurde. Es stellte sich heraus, dass eine DDR1-Expression mit einer schlechteren Prognose des Gesamtüberlebens korreliert (Yamanaka et al., 2006). Im Falle des Ameloblastoms, einem invasiv wachsenden Tumors der zahnschmelzenden Ameloblasten, war eine höhere DDR1-Expression mit einer höheren Rezidivrate assoziiert (Yang et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein ähnliches Bild. Patient B mit dem höheren DDR1-Expressionsniveau im Primärtumor wurde nach 147 Tagen ein weiteres Mal operiert, wohingegen Patient E mit dem geringsten DDR1-Expressionslevel im Primärtumor erst nach 491 Tagen am Rezidiv operiert wurde (siehe Tab. 1 und Tab. 2). Parallel dazu ist Patient B mit der frühzeitigsten Rezidiv-OP und dem zweitschlechtesten Gesamtüberleben (siehe Tab. 1) auch der Patient, der den höchsten Anteil an Nestin-Akkumulationen (siehe Tab. 3) sowohl im Primärtumor, als auch im Rezidiv besitzt. Unter der Voraussetzung, dass alle berechneten Nestin-Akkumulationsflächen eher leicht überschätzt sind, zeigt sich anhand der wenigen untersuchten Patienten auch in der hier vorgelegten Studie der Trend zu einer schlechteren Prognose bei erhöhtem Vorkommen an TSZ (Rothenberg & Clarke, 2009).

3.2 Immunfluoreszenz basierter Nachweis der DDR1-Expression von GBM SZ und differenzierten Zellen

Für diesen Versuch wurden die bereits etablierten GBM SZ 2016/175, die aus Patientenmaterial gewonnen und unter Stammzellbedingungen gehalten wurden, eingesetzt. Daten zu dem Patienten, den molekulargenetischen und histopathologischen Eigenschaften sind in Tab. 4 zusammengefasst. Es sollten die unbehandelten GBM SZ mit den GBM SZ, die über sieben Tage einen Differenzierungsprozess durchliefen, in ihrer DDR-Expression verglichen werden, um die Frage, ob ein Unterschied in der DDR1-Expression zwischen der Ursprungszelle und ihrer differenzierten Zelle besteht, zu beantworten. Hierbei wäre ein höheres Expressionsniveau in GBM SZ im Vergleich zu den differenzierten Tumorzellen zu erwarten.

Gleichzeitig sollte herausgefunden werden, ob eine Inhibition des DDR1-Proteins eine Auswirkung auf die Detektion des DDR1 hat. Hierzu wurden die Zellen vor dem Färben für 48 h mit einem exogenen Inhibitor behandelt.

Tab. 4: Patientendaten, molekulargenetische und histologische Charakterisierung des Tumormaterials, aus dem die GBM SZ 2016/175 gewonnen wurden.

Das angegebene Alter bezieht sich auf das Lebensjahr bei der Operation. Die Bedeutung der angegebenen Parameter wie Ki-67, EGF-R-vIII, MGMT Promoter, p53 und IDH1 R132H ist in Tab. 1 beschrieben.

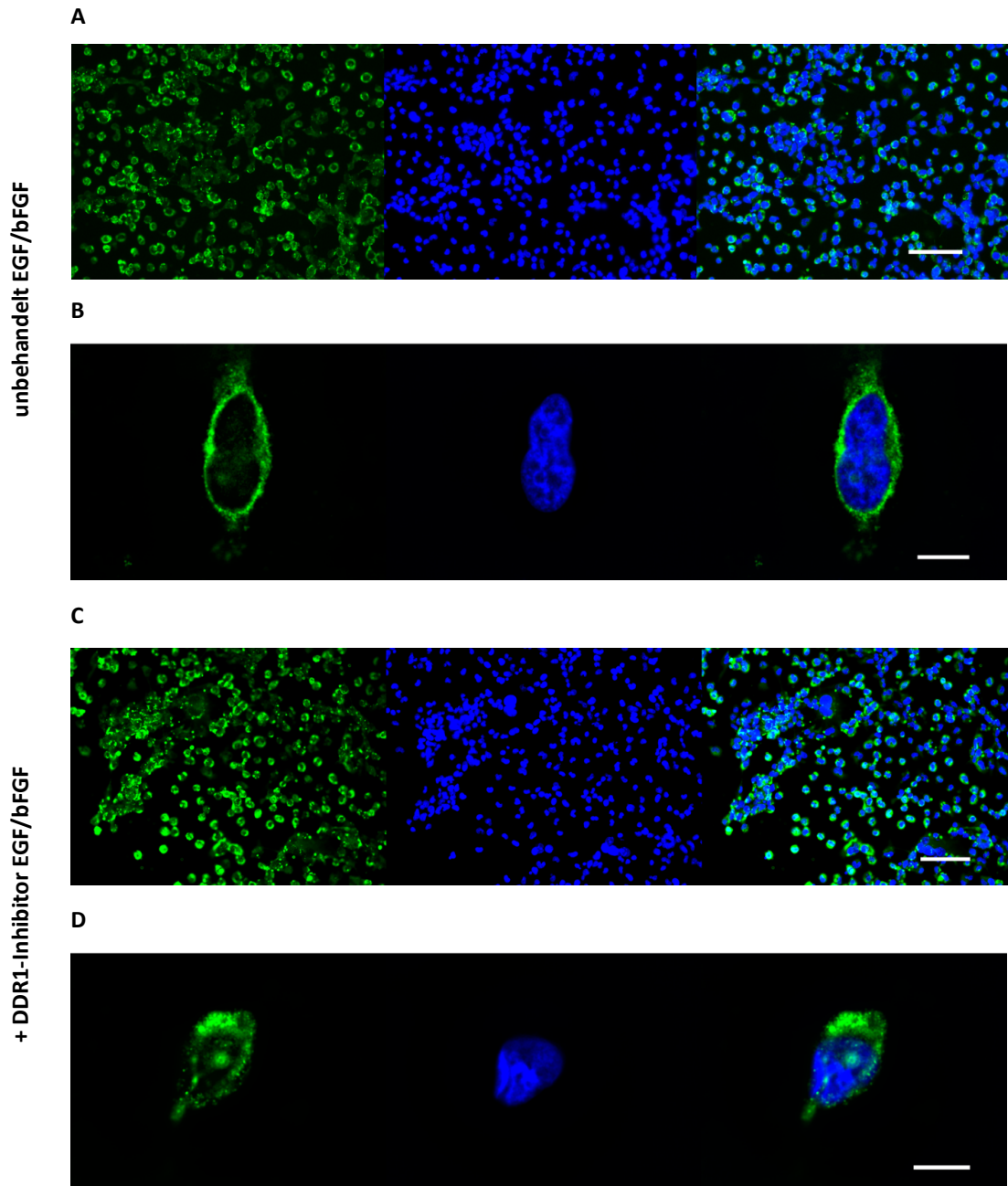
Nummer	Geschlecht	Alter in Jahren	Ki-67	EGF-R-vIII	MGMT Promoter	p53 Akkumulation	IDH1 R132H
GBM SZ 2016/175	m	65	30 %	negativ	methyliert	kräftig akkumuliert	negativ

In Abbildung 9 sind die Aufnahmen der Zellen zu sehen. Bei den Darstellungen wird deutlich, dass die unter EGF und bFGF kultivierten GBM SZ nicht in Sphäroiden vorkommen. Dies wurde bewusst durch Zusatz von einem Laminin-Coating verhindert. Der Grund ist eine Optimierung einer realistischen Einschätzung der Unterschiede zwischen GBM SZ und differenzierten Zellen. Da die differenzierten Zellen adhären wachsen wird durch ein Laminin-Coating ebenfalls eine Adhärenz bei den GBM SZ erzeugt, sodass nun der Vergleich unter gleichen Bedingungen vollzogen werden kann.

Bei den GBM SZ (Abb. 9A und B) die unter Zusatz von EGF und bFGF ihren Stammzellcharakter behielten, zeigt sich im Vergleich zu den differenzierten Zellen (Abb. 9E und F) eine stärkere Fluoreszenz. Zwar sollte berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Fluorophore durch Anregung mit Licht individuell nach unterschiedlichen Zeitspannen verblassen können. Jedoch ließen sich die beiden Fluoreszenzbilder unter dem Mikroskop voneinander unterscheiden, was für ein höheres Expressionsniveau bei den GBM SZ spricht.

Der Vergleich der unbehandelten GBM SZ (Abb. 9A und B) mit den GBM SZ unter Einfluss eines DDR1-Inhibitors (Abb. 9C und D) zeigt keinen Unterschied in der DDR1-Expression. Dies konnte vermutet werden, da der DDR1-Inhibitor nur die Phosphorylierung des Rezeptors hemmt und der im Versuch eingesetzte DDR1-Antikörper sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes DDR1 erkennen kann.

Kultivierungs- bedingungen	DDR1 Kanal 1 488nm	DAPI Kanal 2	Merged Kanal 1 und 2
-------------------------------	-----------------------	-----------------	-------------------------



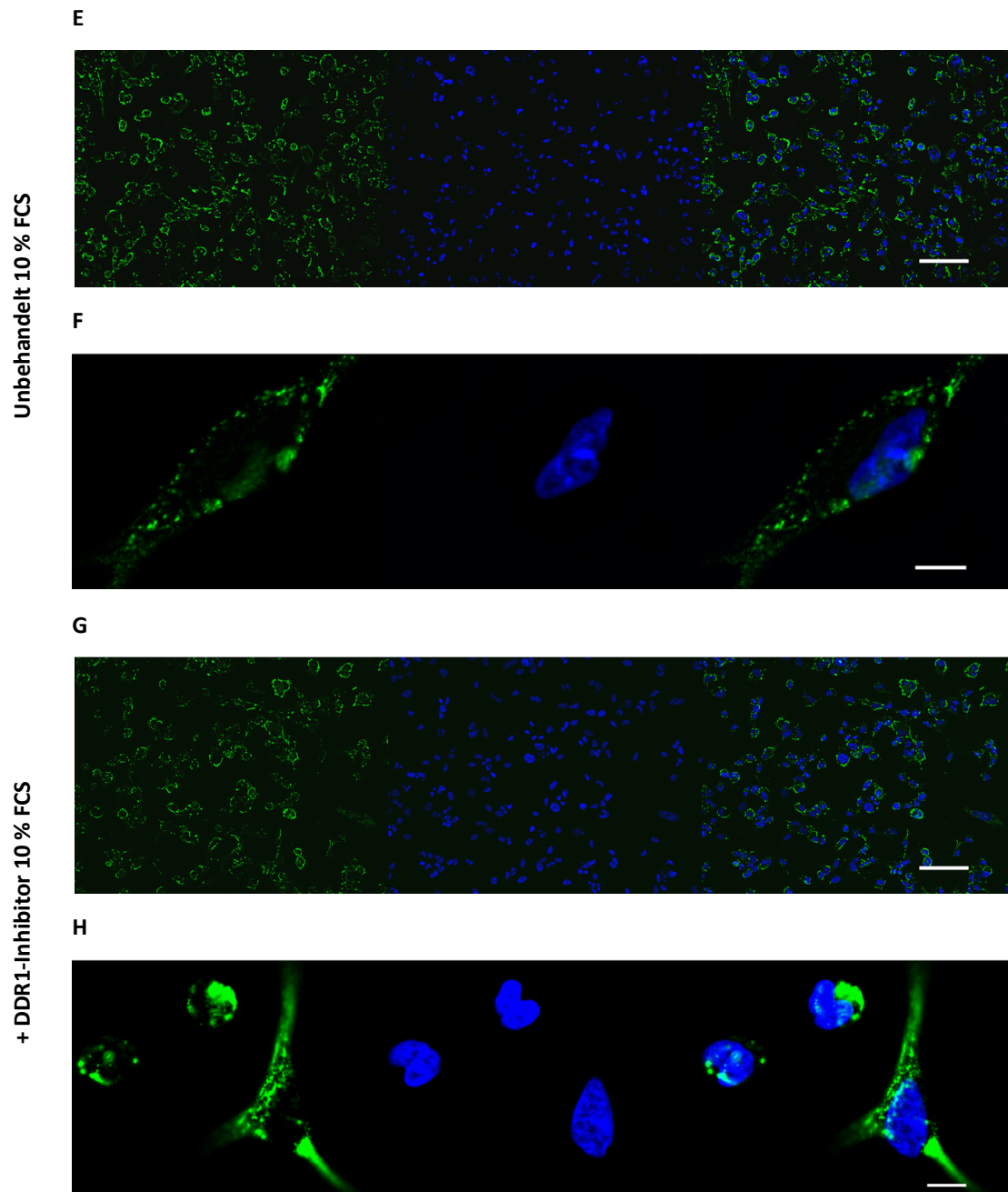


Abb. 9: Immunofluoreszenz basierter Nachweis der DDR1-Expression von kultivierten GBM SZ und differenzierten Zellen, der Maßstabsbalken für Bild (A), (C), (E) und (G) beträgt 100 μm und für (B), (D), (F) und (H) 10 μm .

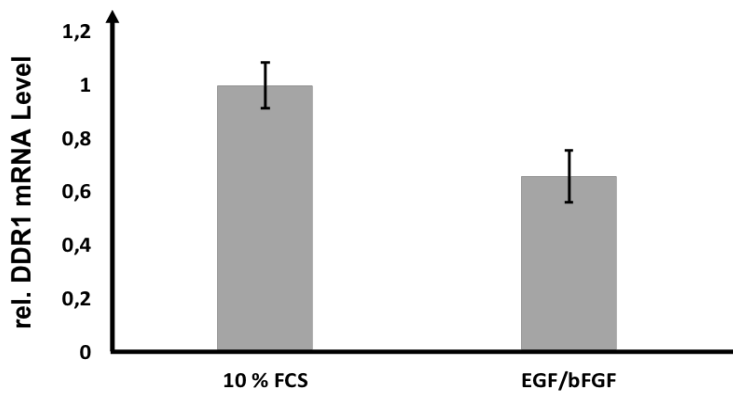
Es wurden für jede Kultivierungsbedingung Aufnahmen in 2 unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht: die Bilder (A), (C), (E), und (G) wurden im Dienst eines besseren Überblick angefertigt, um anschließend daraus eine einzelne Zelle, Bilder (B), (D), (F) und (H), aufnehmen zu können.

Interessant sind unter anderem die vergrößerten Aufnahmen der Fluoreszenzbilder. Hier lässt sich zunächst der Differenzierungsprozess der GBM SZ unter 10 % FCS klar erkennen (Abb. 9F und H) Die differenzierten Zellen zeigen im Vergleich zu den GBM SZ einen anderen Phänotyp und mit der Beobachtung feiner distaler Ausläufer ein astrozytäres Differenzierungsbild (Merighi et al., 2018). Außerdem kann eine unterschiedliche Art der Lokalisierung des DDR1-Proteins vermutet werden, welches sich am besten im Vergleich von Abbildung 9B und F nachvollzogen lässt: in Abbildung 9B wird eine in der Membran durchgängige Fluoreszenz beobachtet, wohingegen in Abbildung 9F mehrere einzelne Regionen punktuell positiv erscheinen. Inwiefern unterschiedliche Lokalisierungen des DDR1 eine Rolle in der Funktion des Rezeptors spielen ist zwar nicht bekannt, jedoch wäre es sehr aufschlussreich herauszufinden, ob diese Form der allgegenwärtigen Präsenz des DDR1 in der Zellmembran der GBM SZ in auch mit einer höheren Rezeptordichte einhergeht. Eine höhere Dichte eines Rezeptors bedeutet auch eine höhere Effizienz des Agonisten bzw. des Substrats, in diesem Falle des Kollagens (Kenakin, 2004) und würde in diesem Fall die Hypothese, dass das DDR1 eine entscheidende Rolle beim GBM in der Therapieresistenz spielt (Vehlow et al., 2019), bekräftigen. Die hier genutzte Methode der Immunfluoreszenz eignet sich jedoch nicht für derartige Quantifizierungen.

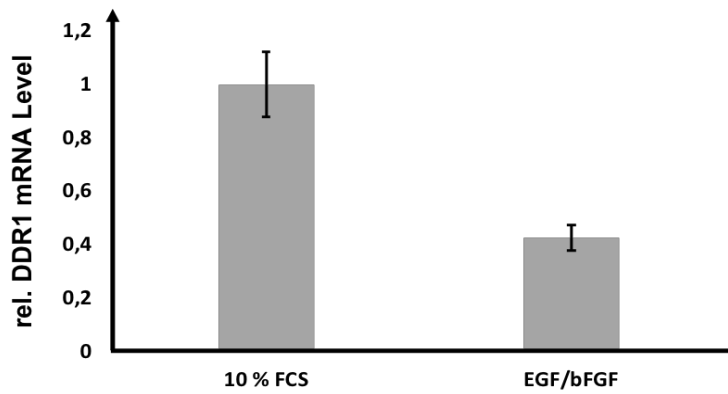
3.3 DDR1-Genexpressionanalyse in GBM SZ und differenzierten Zellen

Um mögliche Expressionsunterschiede des DDR1 in GBM SZ und differenzierten Zellen bestimmen zu können, wurde in einem analogen experimentellen Setup eine qPCR durchgeführt. Hierbei handelt es sich zwar um eine quantitative Methode auf mRNA-Ebene, da Unterschiede in der mRNA-Menge nicht zwingend Unterschiede in der Menge des funktionellen Proteins bedingen, sollte dieser Versuch auf Protein-Ebene zum Vergleich durchgeführt werden, welches bereits in 3.2 beschrieben wird. In Abbildung 10 sind die gewonnenen Daten aus der qPCR-Analyse in Form von Balkendiagrammen zusammengefasst worden.

A



B



C

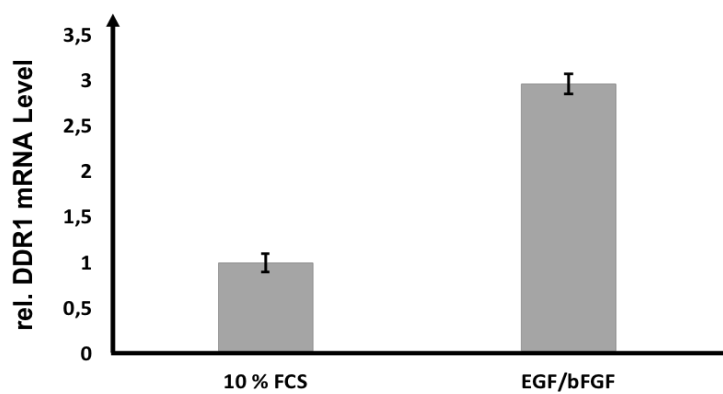


Abb. 10: Darstellung der DDR1-Expression von GBM SZ und differenzierten GBM-Zellen mittels qPCR-Analyse.

Die angegebenen Werte in den Diagrammen (A), (B) und (C) sind Mittelwerte von technischen Replikaten (MW n=3) mit \pm Standardabweichung, das Experiment wurde in Triplikaten, deren Ergebnisse hier einzeln dargestellt werden, durchgeführt.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen lieferten die drei unabhängigen Experimente jeweils recht unterschiedliche Ergebnisse. In den ersten beiden Versuchen zeigte sich eine geringere DDR1-Expression in den unter Stammzellbedingungen (EGF/bFGF) gehaltenen Zellen im Vergleich zu den differenzierten Zellen (10 % FCS). Hierbei lag die Reduktion bei 34 bzw. 57 %. Beim dritten Versuch war der Trend entgegengesetzt, so dass die DDR1-Expression in den unter Stammzellbedingungen gehaltenen Zellen um 297 % höher ist als in den differenzierten Zellen. Somit zeigen 2 von 3 Genexpressionsanalysen entgegen der Erwartung eine geringere DDR1-Genexpression in GBM SZ als bei differenzierten Zellen. Dieser Verlauf scheint zum einen wegen der Resultate der Immunofluoreszenz (siehe 3.2), und zum anderen aufgrund des entgegengesetzten Ergebnisses im dritten Versuch sehr fragwürdig. Die Ergebnisse ließen sich hierbei nicht reproduzieren, obwohl die Versuchsbedingungen in allen drei Analysen konstant gehalten wurden. Es ist eher davon auszugehen, dass alle drei Analysen keinen signifikanten Unterschied in der DDR1-Genexpression von GBM SZ und differenzierten GBM-Zellen aufweisen und die unterschiedlichen Ergebnisse nur leichte Schwankungen in ihren DDR1-Genexpressionen darstellen. Möglicherweise unterscheiden sich sowohl die GBM SZ als auch die differenzierten Zellen in ihrer DDR1-Genexpression nur geringfügig, sodass weitere Analysen im Mittel vermutlich ein ausgewogenes Verhältnis zwischen beiden Zelltypen aufzeigen würden.

3.4 Analyse der Inhibition des DDR1 in GBM SZ über das Western Blot-Verfahren

Wird davon ausgegangen, dass die Interaktion zwischen dem DDR1 und dem Kollagen des Tumormikromilieus eine Auswirkung in der Therapieresistenz des GBM besitzt, wäre es für die Entwicklung einer klinischen Relevanz unentbehrlich, die Inhibition dieses Rezeptors zu untersuchen. Mit dem Western Blot-Verfahren wurde versucht, sowohl unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes DDR1 in GBM SZ zu detektieren. Zuerst wurde ein Teil der GBM SZ während der Kultivierung auf Kollagen-gecoateten Wells gehalten. Ein anderer Teil wurde ohne Kollagen-Coating kultiviert, sodass durch die Proteinanalyse bestätigt werden kann, dass eine Bindung an Kollagen mit einer Aktivierung bzw. Phosphorylierung des Rezeptors einhergeht. Außerdem wurden die kultivierten GBM SZ mit unterschiedlichen Dosen des DDR1-Inhibitors über verschiedene Zeiträume behandelt: Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen des Inhibitor verwendet (0,5 μ M und 1 μ M) und mit einer unbehandelten Probe verglichen, um herauszufinden, ab welcher Dosis ein Effekt zu beobachten ist. Die Zeiträume der DDR1-Inhibitor-Behandlung betragen 48 h, 1 Woche und 2 Wochen, um

anschließend über den DDR1-Phosphorylierungsstatus zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt keine Reduktion des aktiven, phosphorylierten DDR1 mehr zu erkennen ist. Dies könnte Informationen geben, zu welchem Zeitpunkt eine erneute Gabe des DDR1-Inhibitors notwendig wäre.

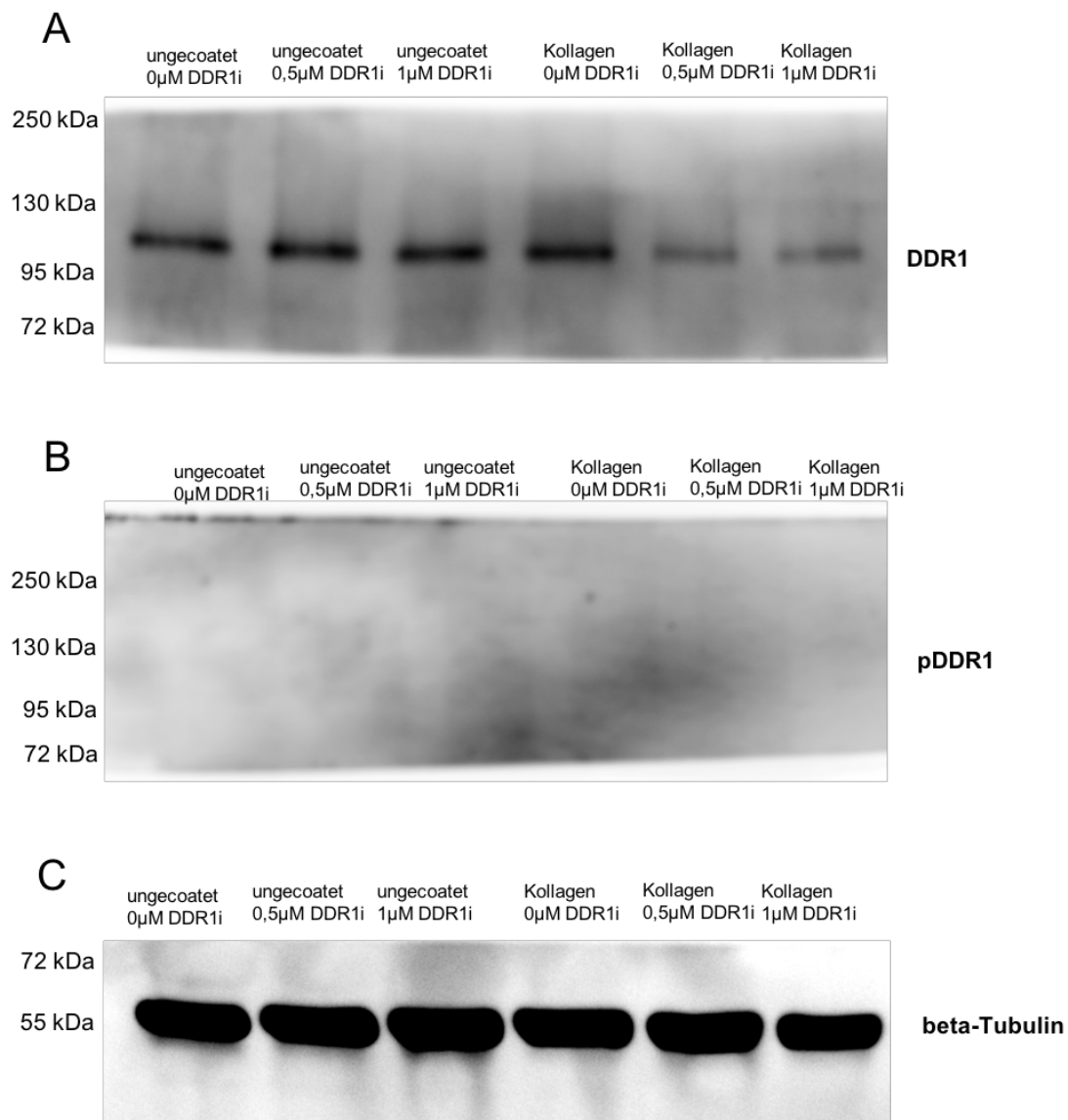


Abb. 11: Proteinbioanalyse des DDR1 und des pDDR1 mit beta-Tubulin als Ladungskontrolle, bei einer DDR1-Inhibitor-Behandlung über einen Zeitraum von 48 h.

Abgebildet ist die Detektion der Proteine nach einer 48-stündigen Behandlung mit dem DDR1-Inhibitor. **(A)** zeigt den Nachweis des DDR1-Protein, bei dem sowohl unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes DDR1 mit dem eingesetzten Antikörper detektiert werden sollte. **(B)** zeigt den Blot bei dem Versuch der pDDR1-Detektion, welches hierbei nicht erfolgreich war, da keine einzige Bande zu beobachten war. **(C)** bildet die Ladungskontrolle ab, indem ein ubiquitär vorhandenes Protein nachgewiesen wird. Alle Banden sind in ihrer Signalstärke ähnlich, sodass von einer gleichen

Gesamtproteinmenge ausgegangen werden kann.

In diesem Versuch konnte mit dem verwendeten pDDR1-Antikörper das pDDR1-Protein nicht detektiert werden. Das zeigt Abbildung 11B, in der keine Banden zu erkennen sind. Es wurde in der Arbeit sowohl mit der von der Firma angegebenen Verdünnung (1:1000), als auch mit einer niedrigeren Verdünnung (1:500) gearbeitet. Jedoch zeigte sich bei keinem der Versuche eine Detektion einer Bande für das pDDR1. Somit konnte der Nachweis der Phosphorylierung des DDR1 über das Kollagen-Coating nicht realisiert werden. Eine Auswertung der Analyse der Inhibitionskinetik nach einer DDR1-Inhibitor-Behandlung über verschiedene Zeiträume konnte somit gleichermaßen nicht erfolgen. Da dieses Nachweisverfahren äußerst abhängig von der Wahl der primären Antikörper ist, könnte ein möglicher Grund für den Misserfolg sein, dass der Antikörper das pDDR1-Protein nicht als Antigen erkennt. Ein weiterer potentieller Fehler stellt die Wahl der Antikörperkonzentration dar. Es wurde zwar eine doppelte Konzentration mit der 1:500 Verdünnung versucht, jedoch könnte die Antikörpermenge dafür noch nicht ausreichend gewesen sein. Andererseits könnte die verwendete Proteinmenge im eingesetzten Lysat nicht ausreichend gewesen sein, so dass dies unter der Nachweisgrenze für das pDDR1-Protein lag.

Einzig und allein der Einsatz des Antikörpers für DDR1, welches neben den unphosphorylierten auch den phosphorylierten DDR1 als Antigen erkennt, erwies sich als erfolgreich, welches in Abbildung 11A zu sehen ist. Bei Beobachtung der Banden ohne Kollagen-Coating wird kein Unterschied in deren Signalstärken wahrgenommen. Daraus lässt sich schließen, dass der eingesetzte DDR1-Inhibitor keine Auswirkungen auf die gesamte DDR1-Detektion hat. Dies war auch zu erwarten, weil ohne das Kollagen-Coating auch keine DDR1 Phosphorylierung ermöglicht wird und nur das unphosphorylierte DDR1 nachgewiesen wurde. Interessant ist der Vergleich dieser drei Banden mit den anderen, bei dem eine Phosphorylierung des DDR1 angenommen werden kann, da hier Kollagen anwesend ist. Die Bande mit Kollagen-Coating und ohne Gabe von DDR1-Inhibitor ist ähnlich signalstark wie die bereits erwähnten. Dies impliziert eine mögliche Detektion des DDR1 in beiden Phosphorylierungszuständen und da die Anzahl an Rezeptoren durch die Ladungskontrolle mit beta-Tubulin als vergleichbar angenommen werden kann, konnte auch eine ähnlich starke Bande erwartet werden. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Banden für DDR1 beim Kollagen-Coating mit beiden Dosen DDR1-Inhibitor (0,5 μM und 1 μM) von der Signalintensität schwächer sind als die anderen benachbarten Banden. Wird davon ausgegangen, dass eine Inhibition des pDDR1 mit einem Unterbinden seines Nachweises bei Einsatz des DDR1-Antikörpers einhergeht, könnte die Reduktion der Signalstärke beider Banden damit begründet und somit auch die

inhibitorische Wirkung des DDR1-Inhibitors bestätigt werden. Dies ist jedoch nur eine Vermutung und sicherlich wäre die direkte Detektion des pDDR1 und dessen Reduktion bei DDR1-Inhibitor Gabe ausdrucksvoller, jedoch konnte dies wie bereits erwähnt nicht realisiert werden. Beim Vergleichen beider signalschwächeren Banden kann kein großartiger Unterschied wahrgenommen werden, sodass eine Erhöhung auf 1 μM des DDR1-Inhibitors anscheinend keinen zusätzlichen Effekt bringt.

4 Ausblick

Diese Arbeit versucht den Weg zu einer Verbesserung der bisherigen Standardbehandlung des GBM mit TMZ zu ebnet. Die unternommenen Experimente könnten dahingehend erweitert werden, dass die Detektion von Stammzellarealen in den FFPE Gewebeschnitten optimiert wird. Hierbei ergaben sich mit dem verwendeten Nestin-Antikörper unrealistisch große Akkumulationsbereiche. Es sollte daher auf zusätzlich weitere Marker für die GBM-TSZ-Analyse zurückgegriffen werden. In der Literatur werden mehrere Marker beschrieben: unter anderem SOX2 (Song et al., 2016), NANOG (Niu et al., 2011), Musashi-1 (Chen et al., 2017) und CD44 (Fakhari et al., 2018). Wird eine Zelle im GBM-Gewebe anhand dieser zahlreich beschriebenen Marker detektiert, hat dies eine hohe Aussagekraft über ihren Stammzellcharakter. Jedoch sollte nicht nur die Wahl der Antikörper und Marker bei diesem Versuch bedacht werden, denn um bei den Ergebnissen eine signifikante Aussage treffen zu können, sollte der Patientenpool von fünf Patienten vergrößert werden. Die Stichprobe von 5 Patienten war zu klein, um klare Unterschiede in der DDR1-Expression zwischen primärem und rezidiviertem Tumor nachzuweisen. Daher sollten Proben von zusätzlichen Patienten untersucht werden, um eine Differenz in der Aberranz von TSZ und deren DDR1-Expression zwischen Primärtumor und Rezidiv herauszuarbeiten.

Ein weiterer Punkt der diskutiert werden sollte ist die Detektion des Kollagens über die Pikrosirius-Rot-Färbung. Zwar zeigten sich bei der Detektion des Kollagens viele Kollagen-negative Bereiche, die Kollagen-positive Bereiche sind teilweise jedoch so extrem angefärbt, dass man mittels anderer Kollagenfärbungen wie die ebenfalls Pikrinsäure-basierte Van-Gieson-Färbung oder die Masson-Trichrom-Färbung die Ergebnisse der angewandten Färbung validieren könnte.

Um den Unterschied in der Immunofluoreszenz-markierten DDR1-Expression zwischen GBM SZ und differenzierten GBM-Zellen möglicherweise besser zu verdeutlichen, wäre eine stärkere Verdünnung des DDR1-Antikörpers von 1:10 zu erwägen. Damit würde die Signalstärke des eingesetzten Fluorophors Dylight[®]488 generell sinken, jedoch könnten Unterschiede beider Zelltypen in der DDR1-Expression gegebenenfalls besser nachgewiesen werden. Sowohl bei diesem Nachweis der DDR1-Expression auf Proteinebene als auch bei der Analyse der DDR1-Genexpression mittels qPCR-Methode sollte neben der Untersuchung der etablierten GBM SZ 2016/175 die Zahl an untersuchten Patienten erweitert werden, damit die gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden können.

Beim Western Blot war die Detektion des phosphorylierten DDR1 mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich. Um dies dennoch mit dem gewählten pDDR1-Antikörper zu

ermöglichen, könnte eine Erhöhung der Zellzahl bei der Herstellung der Lysate zum Erfolg führen. Dies würde auch die Menge an pDDR1 erhöhen und somit könnte gegebenenfalls die Nachweisgrenze erreicht werden. Ansonsten sollte ein anderer pDDR1-Antikörper gewählt werden. Wichtig ist, dass bei den verwendeten Antikörpern eine Positivkontrolle für die Detektion des gesuchten Proteins durchgeführt wird. Dies ist notwendig, um zu ermitteln, ob das verwendete Material für den Versuch geeignet ist.

Die hier vorgelegten Versuche haben grundlegende erste Erkenntnisse über die Rolle des DDR1 beim GBM gelegt. Falls der DDR1 wirklich mitverantwortlich für die Therapieresistenz und das darauffolgende Überleben der GBM SZ ist, stellt dieser Rezeptor ein interessantes Zielmolekül für die Therapie des GBM dar. In weiterführenden Arbeiten sollte mittels Dosiswirkungskurven ermittelt werden, inwiefern eine Kombinationsbehandlung aus dem Standardtherapeutikum TMZ und einem DDR1-Inhibitor einen Vorteil gegenüber einer Monotherapie mit TMZ bietet. Dies sollte nicht nur in kultivierten Primärkulturen, sondern später auch im Mausmodell untersucht werden. Zeigen diese Untersuchungen ein deutlich besseres Therapieansprechen bei kombinierter DDR1-Inhibition, wäre damit die Rationale für eine klinische Anwendung an Patienten gegeben.

5 Referenzen

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., & Starke, K. (Eds.). (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Urban & Fischer.
- Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Höfler, H., & Ullrich, A. (1995). Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene*, *10*(3), 609–618.
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*, *24*(2), 98–105. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Boele, F. W., Rooney, A. G., Grant, R., & Klein, M. (2015). Psychiatric symptoms in glioma patients: from diagnosis to management. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 1413–1420. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65874>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, *3*(7), 730–737.
- Bottomley, S. S., & Muller-Eberhard, U. (1988). Pathophysiology of heme synthesis. *Seminars in Hematology*, *25*(4), 282–302.
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, *1*(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chen, H.-Y., Lin, L.-T., Wang, M.-L., Laurent, B., Hsu, C.-H., Pan, C.-M., ... Chiou, S.-H. (2017). Musashi-1 Enhances Glioblastoma Cell Migration and Cytoskeletal Dynamics through Translational Inhibition of Tensin3. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09504-7>
- Chen, W.-J., He, D.-S., Tang, R.-X., Ren, F.-H., & Chen, G. (2015). Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *16*(2), 411–420.
- Cheng, T.-Y. D., Cramb, S. M., Baade, P. D., Youlden, D. R., Nwogu, C., & Reid, M. E. (2016). The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *11*(10), 1653–1671. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.021>
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., ... Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, *66*(19), 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>
- Clevers, H. (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature Genetics*, *37*(10), 1027–1028. <https://doi.org/10.1038/ng1005-1027>
- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*, *58*, 267–284.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.062105.204854>
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5 Suppl), S2-8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- Doe, C. Q. (2008). Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 135(9), 1575–1587. <https://doi.org/10.1242/dev.014977>
- Enderling, H. (2015). Cancer stem cells: small subpopulation or evolving fraction? *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 7(1), 14–23. <https://doi.org/10.1039/c4ib00191e>
- Fakhari, S., Mehrjardi, A. Z., & Noori, M. (2018). Expression of CD44 and CD133 in Glioma Stem Cells. *International Journal of Tumor Therapy*, 7(1), 27–33.
- Garrett, T. P. J., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., ... Ward, C. W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular Cell*, 11(2), 495–505.
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K. D., Stupp, R., Hegi, M. E., Jaeckle, K. A., ... Mehta, M. P. (2013). Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 4085–4091. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.6968>
- Gullick, W. J. (1991). Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *British Medical Bulletin*, 47(1), 87–98. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072464>
- Gur, G., Zwang, Y., & Yarden, Y. (2013). *Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases: Implications for Signal Transduction by Growth Factors*. Landes Bioscience.
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A. A. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(9), 675–684.
- He, L., & Hristova, K. (2012). Physical-chemical principles underlying RTK activation, and their implications for human disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818(4), 995–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.044>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New*

- England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hegi, M. E., Liu, L., Herman, J. G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., ... Gilbert, M. R. (2008). Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), 4189–4199. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.5964>
- HU, X., MIAO, W., ZOU, Y., ZHANG, W., ZHANG, Y., & LIU, H. (2013). Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncology Letters*, 6(1), 130–134. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1317>
- Jiang, Y., & Uhrbom, L. (2012). On the origin of glioma. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 113–121. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.658976>
- Jin, H., Ham, I.-H., Oh, H. J., Bae, C. A., Lee, D., Kim, Y.-B., ... Hur, H. (2018). Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Prevents Stroma-Induced Peritoneal Metastasis in Gastric Carcinoma. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0710>
- Jin, X., Jin, X., Jung, J.-E., Beck, S., & Kim, H. (2013). Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(4), 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.021>
- Johnson, J. D., Edman, J. C., & Rutter, W. J. (1993). A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5677–5681.
- Jonat, W., & Arnold, N. (2011). Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Annals of Oncology*, 22(3), 500–502. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq732>
- Jossé, L., Xie, J., Proud, C. G., & Smales, C. M. (2016). mTORC1 signalling and eIF4E/4E-BP1 translation initiation factor stoichiometry influence recombinant protein productivity from GS-CHOK1 cells. *Biochemical Journal*, 473(24), 4651–4664. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160845>
- Jukich, P. J., McCarthy, B. J., Surawicz, T. S., Freels, S., & Davis, F. G. (2001). Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994. *Neuro-Oncology*, 3(3), 141–151.
- Kalpathy-Cramer, J., Gerstner, E. R., Emblem, K. E., Andronesi, O., & Rosen, B. (2014). Advanced Magnetic Resonance Imaging of the Physical Processes in Human Glioblastoma. *Cancer Research*, 74(17), 4622–4637. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0383>
- Kasai, T., Chen, L., Mizutani, A., Kudoh, T., Murakami, H., Fu, L., & Seno, M. (2014). Cancer Stem Cells Converted from Pluripotent Stem Cells and the Cancerous Niche. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 10(1), 2–7.
- Kenakin, T. (2009). *A Pharmacology Primer: Theory, Application and Methods*. Academic Press.
- Khan, I., Waqas, M., & Shamim, M. S. (2017). Prognostic significance of IDH 1 mutation in

- patients with glioblastoma multiforme. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(5), 816–817.
- Labrador, J. P., Azcoitia, V., Tuckermann, J., Lin, C., Olaso, E., Mañes, S., ... Klein, R. (2001). The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Reports*, 2(5), 446–452. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve094>
- Leitinger, B. (2011). Transmembrane Collagen Receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 265–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154013>
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Liang, B. C., Thornton, A. F., Sandler, H. M., & Greenberg, H. S. (1991). Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *Journal of Neurosurgery*, 75(4), 559–563. <https://doi.org/10.3171/jns.1991.75.4.0559>
- Louis, D. N., Holland, E. C., & Cairncross, J. G. (2001). Glioma Classification. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 779–786.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Mansouri, A., Karamchandani, J., & Das, S. (2017). Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In S. De Vleeschouwer (Ed.), *Glioblastoma*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469981/>
- Merighi, S. H., Natasha Moser, Hannsjörg Schröder, Bruno Cozzi, Alberto Granato and Adalberto. (n.d.). *Neuroanatomie des Menschen*. Springer-Verlag.
- Nelson, S. J., & Cha, S. (2003). Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 9(2), 134–145.
- Niu, C.-S., Li, D.-X., Liu, Y.-H., Fu, X.-M., Tang, S.-F., & Li, J. (2011). Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncology Reports*, 26(3), 593–601. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1308>
- Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., Kacirova, M., Kylarova, S., Rezabkova, L., & Obsil, T. (2014). Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiological Research*, 63 Suppl 1, S155-164.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta*

- Neuropathologica*, 109(1), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*, 17(Suppl 4), iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Payne, L. S., & Huang, P. H. (2013). The pathobiology of collagens in glioma. *Molecular Cancer Research : MCR*, 11(10). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0236>
- Ram, R., Lorente, G., Nikolich, K., Urfer, R., Foehr, E., & Nagavarapu, U. (2006). Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *Journal of Neuro-Oncology*, 76(3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-6874-1>
- Rivas, S., Gómez-Oro, C., Antón, I., & Wandosell, F. (2018). Role of Akt Isoforms Controlling Cancer Stem Cell Survival, Phenotype and Self-Renewal. *Biomedicines*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010029>
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., & Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes & Cancer*, 2(4), 466–474. <https://doi.org/10.1177/1947601911408889>
- Roberts, D. W., Olson, J. D., Evans, L. T., Kolste, K. K., Kanick, S. C., Fan, X., ... Paulsen, K. D. (2018). Red-light excitation of protoporphyrin IX fluorescence for subsurface tumor detection. *Journal of Neurosurgery*, 128(6), 1690–1697. <https://doi.org/10.3171/2017.1.JNS162061>
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548–5557. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203957>
- Rothenberg, M., & Clarke, M. F. (2009). Chapter 53 - Cancer Stem Cells. In R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, E. D. Thomas, ... I. Wilmut (Eds.), *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)* (pp. 467–483). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374729-7.00053-6>
- Sathornsumetee, S., & Rich, J. N. (2006). New approaches to primary brain tumor treatment. *Anti-Cancer Drugs*, 17(9), 1003–1016. <https://doi.org/10.1097/01.cad.0000231473.00030.1f>
- Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., & Firsching, R. (2010). Gliomas in adults. *Deutsches Arzteblatt International*, 107(45), 799–807; quiz 808. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0799>
- Ségaliny, A. I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M.-F., & Heymann, D. (2015). Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of Bone Oncology*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>

- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., ... Ushio, Y. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, *63*(20), 6962–6970.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T. E., ... Yancopoulos, G. D. (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular Cell*, *1*(1), 25–34.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani, S., & Sargolzaei Aval, F. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*, *55*(1), 6–23.
- Song, W.-S., Yang, Y.-P., Huang, C.-S., Lu, K.-H., Liu, W.-H., Wu, W.-W., ... Chen, M.-T. (2016). Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, *79*(10), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.03.010>
- Springer, W. R., Cooper, D. N. W., & Barondes, S. H. (1984). Discoidin I is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of dictyostelium discoideum and resembles fibronectin. *Cell*, *39*(3), 557–564. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90462-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90462-8)
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *72*(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
- Teng, L., Nakada, M., Zhao, S.-G., Endo, Y., Furuyama, N., Nambu, E., ... Hamada, J.-I. (2011). Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *British Journal of Cancer*, *104*(5), 798–807. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.12>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *23*(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- Upadhyay, N., & Waldman, A. D. (2011). Conventional MRI evaluation of gliomas. *The British Journal of Radiology*, *84*(Spec Iss 2), S107–S111. <https://doi.org/10.1259/bjr/65711810>
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme – an

- overview. *Contemporary Oncology*, 18(5), 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Vigneswaran, K., Neill, S., & Hadjipanayis, C. G. (2015). Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Annals of Translational Medicine*, 3(7). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57>
- Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F., & Pawson, T. (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Molecular Cell*, 1(1), 13–23.
- Walker, T., Huang, J., & Young, K. (2016). Neural Stem and Progenitor Cells in Nervous System Function and Therapy. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1890568>
- Wang, B., Ling, S., & Lin, W.-C. (2010). 14-3-3 τ Regulates Beclin 1 and Is Required for Autophagy. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010409>
- Weiner, H. L., Rothman, M., Miller, D. C., & Ziff, E. B. (1996). Pediatric brain tumors express multiple receptor tyrosine kinases including novel cell adhesion kinases. *Pediatric Neurosurgery*, 25(2), 64–71; discussion 71-72. <https://doi.org/10.1159/000121099>
- Yamanaka, R., Arao, T., Yajima, N., Tsuchiya, N., Homma, J., Tanaka, R., ... Nishio, K. (2006). Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene*, 25(44), 5994–6002. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209585>
- Yang, J., Liu, J., Zhong, M., Chen, Y., Song, M., & Du, Y. (2014). Discoidin domain receptors: a promoter of the aggressive behavior of ameloblastomas. *IUBMB Life*, 66(4), 292–299. <https://doi.org/10.1002/iub.1265>
- Yovino, S., & Grossman, S. A. (2012). Severity, etiology and possible consequences of treatment-related lymphopenia in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. *CNS Oncology*, 1(2), 149–154. <https://doi.org/10.2217/cns.12.14>
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., ... Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, 11(4), 468–476. <https://doi.org/10.1038/ncb1854>
- Zhou, J., & Zhang, Y. (2008). Cancer stem cells: Models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(10), 1360–1370. <https://doi.org/10.4161/cc.7.10.5953>

6 Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

ALA	5-Aminolävulinsäure
AML	akute myeloischen Leukämie
ATRX	alpha-thalassemia/mental retardation syndrome x-linked
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CCK-2	colon carcinoma kinase 2
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	Discoidin-Domain-Receptor
DDR1	Discoidin-Domain-Receptor-1
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-R-vIII	Epidermal Growth Factor variant III
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettet
GBM	Glioblastoma multiforme
GBM SCs	glioblastoma multiforme stem cells
GBM SZ	Glioblastom-Stammzellen
HRP	Horseradish Peroxidase
IDH1 R132H	Isocitrat-Dehydrogenase 1 R123H
LAS AF	Leica Application suite Advanced Fluorescence
MCK-10	mammary carcinoma kinase 10
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Pp IX	Protoporphyrin IX
pY	phosphoryliertes Tyrosin
qPCR	quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	Src-homology 2

TSZ	Tumorstammzelle
TMZ	Temozolomid
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispielhafte MRT-Bilder eines GBMs, nach Schneider et al., 2010.	6
Abb. 2: Chemische Struktur des TMZ und sein Wirkungsmechanismus.	8
Abb. 3: Darstellung der asymmetrischen Zellteilung bei Stammzellen.....	10
Abb. 4: Allgemeiner Aufbau einer RTK.....	12
Abb. 5: Interaktion des DDR1 mit Kollagen 1 und die Bildung des 14-3-3/Beclin-1/Akt1-Proteinkomplexes und der Effekt der DDR1-Inhibition, nach Vehlow et al., 2019.....	16
Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von Nestin und Kollagen, sowie DDR1 und Nestin in FFPE-GBM-Schnitten, der Maßstabsbalken für alle Bilder beträgt 100 µm, Nestin (braun) und Kollagen (rot) in (A), (C), (E) und (G), DDR1 (braun) und Nestin (violett) in (B), (D), (F) und (H).36	
Abb. 8: Vergleich der DDR1-Akkumulation (A) bzw. der Nestin-Akkumulationen (B) im Primärtumor und im Rezidiv.....	38
Abb. 9: Immunofluoreszenz basierter Nachweis der DDR1-Expression von kultivierten GBM SZ und differenzierten Zellen, der Maßstabsbalken für Bild (A), (C), (E) und (G) beträgt 100 µm und für (B), (D), (F) und (H) 10 µm.	43
Abb. 10: Darstellung der DDR1-Expression von GBM SZ und differenzierten GBM-Zellen mittels qPCR-Analyse.....	45
Abb. 11: Proteinbioanalyse des DDR1 und des pDDR1 mit beta-Tubulin als Ladungskontrolle, bei einer DDR1-Inhibitor-Behandlung über einen Zeitraum von 48 h.	47

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientendaten, molekulargenetische und histologische Charakterisierung des Tumormaterial der resezierten GBMs.....	33
Tab. 2: Berechnung der Fläche der gesamten DAB-gefärbten DDR1-Akkumulationen in der DAB-/VIP-Färbung.....	37
Tab. 3: Berechnung der Fläche der gesamten DAB-gefärbten Nestin-Akkumulationen in der DAB-/Pikrosirius-Rot-Färbung	37
Tab. 4: Patientendaten, molekulargenetische und histologische Charakterisierung des Tumormaterials, aus dem die GBM SZ 2016/175 gewonnen wurden.....	41

IV. Tabellarischer Lebenslauf

Name: Kien Alex Duong Phu
Geburtsdatum: 23.09.1991
Geburtsort: Berlin, Deutschland
Wohnort: 35037 Marburg, Gladenbacher Weg 18
Eltern: Xuan Duong Phu, Chi Thuy Ly-Duong Phu
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Berufliche Laufbahn:

21.11.2017 Erteilung der Approbation als Arzt, Frankfurt, Deutschland

Bildungsweg:

seit 2/2018 Promotionsstudium an der Philipps Universität Marburg
10/2010 – 11/2017 Studium der Humanmedizin an der Philipps Universität Marburg
09/2003 – 07/2010 Hannah-Arendt-Gymnasium Berlin, Abschluss:
Allgemeine Hochschulreife
09/1996 – 07/2003 Grundschule am Fliederbusch Berlin

V. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Alter, Bartsch, Baum, Becker, Best, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, del Rey, Feuser, Gress, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kann, Kill, König, Koolmann, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Moll, Müller, Neubauer, Nimsky, Pagenstecher, Preisig-Müller, Renz, Richter, Ruchholtz, Schieffer, Seitz, Sekundo, Strik, Tackenberg, Teymoortash, Timmermann, Vogelmeier, Wagner, Weber, Weihe, Westermann und Wulf in Marburg.

VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen, die mich in dieser Arbeit unterstützt haben, danken. Zuallererst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bartsch, Herrn Prof. Dr. Strik und Herrn Prof. Dr. Nimsky, die mir die Möglichkeit gegeben haben, an diesem Projekt zu arbeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Hannen, die mich von Anfang bis zum Ende dieser Arbeit unterstützt hat. Ohne ihre Geduld, ihr Engagement und ihren Drang nach guter Zusammenarbeit und Vermittlung zahlreicher Fähigkeiten hätte das Gelingen dieser Arbeit nicht ermöglicht werden können.

Weiterhin danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bartsch: Frau Stei für die Erklärung und Hilfe bei der Mikroskopie der immunhistochemischen Färbungen, Frau Cook für die alltägliche Hilfe im Labor und die oftmalige Diskussion der Daten, Herrn Li und Herrn Dr. Schlomann, die mir die Arbeit im Labor um viele Male erleichtert haben.

Außerdem möchte ich der Arbeitsgruppe Oertel für die Bereitstellung des Mikroskops für die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen und anderer wichtiger Labormaterialien danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Pagenstecher für die Hilfe und Beratung während der Etablierung der Färbemethoden.

Weiterhin möchte ich meinen Freunden für den emotionalen Rückhalt während des Studiums und dieser Arbeit danken.

Auch möchte ich meinem Schwiegervater Volker Manz für die Überprüfung der Referenzen und das zusätzliche Korrekturlesen danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Ehefrau Sarah Christine Duong Phu, die mir immer zur Seite stand und mir besonders in schwierigen Zeiten Mut zusprechen konnte. Ebenso gilt mein Dank meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich in allen meinen Entscheidungen unterstützt haben.

VII. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Rolle des DDR1 beim Glioblastoma multiforme“ in der Klinik für Neurochirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Ch. Nimsky mit Unterstützung der in der Danksagung erwähnten Kollegen und Arbeitsgruppen ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum, Unterschrift Promovend (K. A. Duong Phu)

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer (Prof. Dr. J. W. Bartsch)