

Aus dem Labor für Tumorimmunologie,
LIFE-Zentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

**Identifizierung von tumorinitiierenden Zellen
in einem transgenen neuroendokrinen
Magenkarzinommodell der Maus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Mira Simone Kronast
aus
Freiburg im Breisgau

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus Guba

Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl

Priv. Doz. Dr. Christian Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2016

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) des gastro-entero-pankreatischen Systems (GEP) stellen eine Gruppe sehr heterogener Tumore dar, deren Häufigkeit aktuell zunimmt. Die einzige kurative Therapie stellt noch immer die Operation dar, jedoch werden vor allem nicht-funktionelle GEP-NEN häufig erst in metastasiertem, unresektablen Stadium diagnostiziert. Die 5-Jahres-Überlebensrate von GEP-NEN-Patienten beträgt in Deutschland 33 %. Aufgrund dieser Tatsachen ist es wichtig, neue zielgerichtete Therapien zu entwickeln, um GEP-NEN bereits im Ursprung zu bekämpfen.

Als Tumormodell eines neuroendokrinen Magenkarzinoms wurde in dieser Arbeit das transgene CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodell ausgewählt. Bisher konnten in diesem Modell keine *Lgr5*-exprimierenden Tumorzellen als mögliche Abkömmlinge von LGR5-positiven Pylorusstammzellen nachgewiesen werden. Somit bleibt die Frage nach der Ursprungszelle in diesem Modell unbeantwortet.

Die Tumorstammzelltheorie geht davon aus, dass Tumore hierarchisch organisiert sind und nur eine kleine Anzahl sogenannter Tumorstammzellen (CSC) die Eigenschaften zur Tumorbildung besitzt und das Wachstum des Tumors aufrechterhält. Diese CSC sind in der Lage, zu proliferieren, zu differenzieren und weisen sich durch ihre hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung aus.

Ziel dieser Arbeit war es, die Karzinome dieses Modells zu phänotypisieren, potentielle Ursprungszellen und Tumorstammzellen dieses Karzinoms zu identifizieren sowie diese zu charakterisieren. Zur Charakterisierung der Ursprungszelle dieses Modells wurden Kryoschnitte der Magenkarzinome angefertigt und diese immunhistochemisch auf die Expression von c-KIT und PDGFRA hin überprüft. Beide Proteine stellen Marker für Zelltypen dieses Magenbereichs dar, die als Ursprungszellen in Frage kommen.

Um des Weiteren potentielle CSC-Populationen zu charakterisieren, ist die Kenntnis von Markern für CSC unabdingbar. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden CSC-Kandidatenmarker auf von CEA424-TAg-Magenkarzinomen abgeleiteten Tumorzellen (mGC-Zellen) mittels Transkriptomanalyse und Durchflusszytometrie identifiziert und Marker-positive Subpopulationen von Tumorzellen auf Stammzeleigenschaften hin *in vitro* und *in vivo* untersucht. *In vitro* konnte eine CXCR4-positive Subpopulation (mGC3 0,4 %; mGC8 0,3 %) innerhalb der mGC-Zellen identifiziert werden. Diese CXCR4-positive Subpopulation zeigte *in vivo* eine erhöhte Proliferationskapazität bei subkutaner Injektion in syngene Mäuse. Für eine CXCR4-positive tumorinitiierende Subpopulation sprach außerdem die signifikante Anreicherung CXCR4-positiver Zellen unter Einfluss verschiedener Chemotherapeutika.

Langfristig erhoffen wir uns von der Kenntnis der Ursprungszelle des neuroendokrinen Magenkarzinoms sowie der Charakterisierung der Tumorstammzellen die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe und damit Erfolge bei dessen Therapie.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Neuroendokrine Neoplasien	1
1.2	Die Rolle von Stammzellen des Magens in Selbsterneuerung und der Entstehung von Tumoren	2
1.2.1	LGR5 als Marker für epitheliale Pylorusstammzellen.....	3
1.2.2	Die Rolle des Wnt-Signalweges in der Stammzellregulation und der Entstehung von Tumoren... ..	4
1.3	Ursprungszellen von Tumoren und Tumorstammzellen	5
1.4	Tumorstammzellen: Stand der Forschung	10
1.4.1	CSC im hämatopoetischen System	10
1.4.2	CSC in soliden Tumoren.....	11
1.4.3	CSC in neuroendokrinen Tumoren	12
1.5	Methoden zur Identifikation von Tumorursprungszellen und CSC.....	13
1.5.1	Identifikation über Markerexpression.....	13
1.5.2	Colony Formation Assay	15
1.5.3	Anreicherung resistenter CSC mittels Chemotherapeutika	16
1.5.4	In-vivo-Tumorwachstum	17
1.5.5	Lineage tracing in transgenen Mausmodellen zur Identifizierung von Tumorursprungszellen	18
1.6	Das transgene CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodell	19
1.6.1	Die Frage nach der Ursprungszelle des CEA424-SV40 T-Antigen Mausmodells.....	20
1.7	CSC als Target in der Tumorthherapie	22
1.8	Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL.....	27
2.1	Geräte.....	27
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	29
2.4	Antikörper.....	31
2.4.1	Primärantikörper	31
2.4.2	Sekundärantikörper und Isotypkontrollen	31
2.5	Vektoren und Reporterplasmide	31
2.6	Oligonukleotide	32
2.7	Zelllinien	32

2.8	Bakterienstämme	32
2.9	Kits	33
2.10	Mausstämme	33
2.11	Software und Internet	33
3	METHODEN	35
3.1	Zellbiologische Methoden	35
3.1.1	Auftauen, Kultivieren und Einfrieren der Zellen	35
3.1.2	Passagieren von Zellen	36
3.1.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	36
3.1.4	Herstellung von Zytospins	36
3.1.5	Transiente Transfektion von Zellen	37
3.1.6	Zellvitalitätsassay	37
3.1.7	Zytotoxizitätsassay	38
3.1.8	Anreicherung resistenter Subpopulationen	39
3.1.9	<i>Colony formation assay</i>	39
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	DNA-Restriktionsendonukleasenverdau	40
3.2.2	DNA-Dephosphorylierung	40
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	41
3.2.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten	42
3.2.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA	42
3.2.6	Herstellung von <i>Blunt-end</i> -DNA mit der Klenow-Polymerase	42
3.2.7	Ligation	43
3.2.8	Transformation kompetenter Bakterien	43
3.2.9	Anzucht und Stammhaltung von <i>E.-coli</i> -Transformanten	44
3.2.10	Kolonie-PCR	44
3.2.11	Präparation kleiner (Miniprep) und großer Plasmidmengen (Maxiprep)	46
3.2.12	DNA-Sequenzierung	46
3.3	Immunologische Methoden	46
3.3.1	Durchflusszytometrie (FACS) und Immunfluoreszenz	46
3.3.2	Überprüfung der Spezifität der anti-CXCR4 und CD117-Antikörper	48
3.3.3	Bestimmung der Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität	49
3.3.4	Zellsortierung mit dem MoFlo-Sorter	49
3.3.5	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten	49
3.3.6	Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten	50
3.4	Proteinbiochemische Methoden	51
3.4.1	Der Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay	51
3.5	Tierexperimentelle Methoden	53

3.5.1	Zucht.....	53
3.5.2	Subkutane Injektion von Tumorzellen in syngene Mäuse.....	53
3.5.3	Kontrolle des Wachstumsverlaufs der Tumoren.....	54
3.5.4	Präparation von Mausgewebe	54
3.5.5	Kryoeinbettung.....	54
3.5.6	Schneiden von Kryogewebe	54
3.6	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	55
3.7	Statistische Auswertung.....	55
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Eingrenzung der Ursprungszelle des CEA424-TAg-Karzinoms	57
4.1.1	Neuroendokrine CEA424-TAg-Karzinome weisen eine hohe Proliferationsaktivität auf	57
4.1.2	Tumorzellen weisen immunhistochemisch keine Expression von c-KIT und PDGFRA auf	58
4.1.3	SV40-T-Antigen besitzt aktivierenden Einfluss auf die Expression von <i>LGR5</i>	60
4.1.4	Charakterisierung der spindelförmigen T-Antigen-positiven Zellen in der <i>Muscularis mucosae</i> der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion.....	66
4.2	Eingrenzung der Tumorstammzelle des CEA424-TAg-Karzinoms	71
4.2.1	Subpopulationen der CEA424-TAg-Tumorzelllinien besitzen Stammzeleigenschaften	71
4.2.2	mGC-Zellen exprimieren potentielle Tumorstammzellmarker	73
4.2.3	mGC8-Zellen besitzen die Kapazität zur Tumorbildung in syngenem Mäusen	76
4.2.4	CXCR4-positive Tumorzellen bilden früher Tumoren in syngenem Mäusen.....	77
4.2.5	Bestimmung der IC ₅₀ -Konzentrationen für die Inhibition von mGC3 und mGC8 durch Imatinib und Epirubicin.....	80
4.2.6	Resistente Tumorzellen exprimieren verstärkt den Tumorstammzellmarker CXCR4	82
4.2.7	Resistente Tumorzellen exprimieren vermindert CD117 unter Imatinib-Behandlung	84
4.2.8	Resistente Tumorzellen weisen keine Änderung der Expression von CD166, ALDH und EpCAM auf	86
5	DISKUSSION.....	87
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	109
8	DANKSAGUNG	111
9	PUBLIKATIONEN.....	113
10	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 EINLEITUNG

1.1 Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) des gastro-entero-pankreatischen Systems (GEP) beinhalten ein großes Spektrum heterogener Tumore mit sehr unterschiedlichem biologischen Verhalten und unterschiedlicher Prognose. Sie entstehen aus dem diffusen neuroendokrinen Zellsystem. Es gibt funktionelle NEN, die verschiedene Hormone sezernieren und sich mit passenden Symptomen präsentieren sowie die größte Gruppe der nicht-funktionellen NEN, etwa 60 % (Landerholm et al., 2010; Pape et al., 2008). GEP-NEN stellen eine seltene Tumorentität mit einer jährlichen Inzidenz von 5/100.000 Personen sowie einer Prävalenz dar, die höher ist als die jedes anderen Tumors des oberen Gastrointestinaltrakts. Sowohl Inzidenz als auch Prävalenz sind aktuell steigend (Modlin et al., 2008; Yao et al., 2008). Die WHO klassifizierte sie 2010 in gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) G1 oder G2 und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) G3. In Bezug auf ihre Proliferation sind alle NEC proliferationsaktive G3-Karzinome (Proliferationsrate, gemessen anhand des Anteils Ki-67-positiver Tumorzellen, > 20 %) (Bosman et al., 2010). Die Prognose der NEN ist stark von der Proliferationsrate des Tumors abhängig (Ki-67-Frequenz). Noch immer ist die Resektion des Tumors sowie seiner Metastasen die einzige kurative Therapie. 50-60 % der Patienten stellen sich allerdings mit bereits unresektablem metastasiertem Tumor vor, da nicht-funktionelle NEN nicht durch Frühsymptome auffallen (Hauso et al., 2008; Modlin et al., 2008). Therapien mit radioaktiv markierten oder unmarkierten Somatostatinanaloga, Chemotherapeutika und Interferonen bringen noch keine Heilung. Neue spezifische molekulare Wirkstoffe (Everolimus, Sunitinib) verbessern zwar das Gesamtüberleben der Patienten, dennoch ist eine dauerhafte Heilung auch unter diesen neuen Wirkstoffen noch nicht erreicht. Die Tumore weisen eine Resistenz sowohl gegenüber klassischen Chemotherapeutika, Somatostatinanaloga sowie den neuen spezifischen Wirkstoffen auf. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit G3-Karzinom, dem histologisch schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinom des Magens, beträgt in Deutschland aktuell 33 % (Begum et al., 2012). Man steht hier therapeutisch noch immer vor einer großen Herausforderung, da Tumore möglicherweise ausweichend alternative Signalwege zum weiteren Wachstum verwenden können. Es werden spezifische Wirkstoffe gegen neue molekulare Zielstrukturen benötigt, um personalisierte erfolgreiche Therapie der NEN zu ermöglichen und in diesem Feld Fortschritte zu erzielen.

1.2 Die Rolle von Stammzellen des Magens in Selbsterneuerung und der Entstehung von Tumoren

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts benötigt aufgrund ihrer starken Beanspruchung eine tägliche Erneuerung ihrer Zellen (Leushacke and Barker, 2012). Für die Homöostase des Gewebes sind Stammzellen verantwortlich, die in anatomisch-definierten Regionen des jeweiligen Gewebes lokalisiert sind (Barker et al., 2010a). Um die Homöostase des Gewebes aufrechtzuerhalten, besitzen Stammzellen die Eigenschaft zur Selbsterneuerung sowie zur Bildung und Erneuerung aller differenzierteren Zellen des Gewebes, dem sie angehören (Abbildung 1).

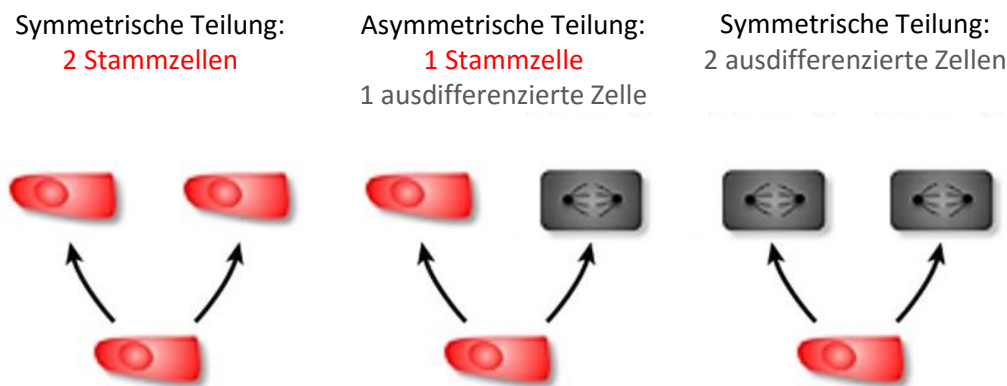


Abbildung 1: Symmetrische und asymmetrische Teilung adulter Stammzellen. Stammzellen (rot) erneuern sich beständig selbst und bilden ausdifferenziertere Zellen (grau), sogenannte *transit-amplifying cells*. Die *transit-amplifying cells* teilen sich erst mehrmals, bevor sie komplett differenzierte reife Gewebszellen bilden, die die Gewebshomöostase aufrechterhalten (modifiziert nach Barker and Clevers, 2010).

Das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung ist streng durch verschiedene Signalwege wie z.B. den Wnt-, Notch- sowie Hedgehog-Signalweg kontrolliert (Sancho et al., 2003). Abnorme Differenzierung des Magenepithels durch zum Beispiel Deregulierungen der Signalwege führt zum Entstehen von Tumoren. Das Epithel des Magens besteht aus vielen Drüsenläuchen, die von Stromazellen umgeben sind. Die Anatomie der Drüsenläuche variiert zwischen den verschiedenen Arealen des Magens. Sie wird in drei Abschnitte untergliedert: den Isthmus (Engstelle am Übergang zu den Drüsenläuchen), den Hals des Drüsenläuches sowie die Basis der Drüsen (vgl. Abbildung 2 A). Die Drüsenläuche enthalten je nach Lokalisation im Magen verschiedene ausdifferenzierte Zelltypen wie hormonbildende endokrine, schleimbildende (Nebenzellen), säureproduzierende (Belegzellen) sowie zymogenproduzierende Zellen (Hauptzellen) (Lee, 1985). Alle Zellen der Magenschleimhaut entstehen auf dem Boden von Stammzellen (Bjerknes and Cheng, 2002). Epitheliale Magenstammzellen haben viele Gemeinsamkeiten mit denen des Darms, die bereits sehr gut erforscht sind. Es wurde allerdings auch klar, dass sich die Stammzellen des Magens in wichtigen Punkten von denen des Darms unterscheiden.

1.2.1 LGR5 als Marker für epitheliale Pylorusstammzellen

LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*) ist ein Protein, das im menschlichen Körper in zahlreichen Geweben gebildet wird.

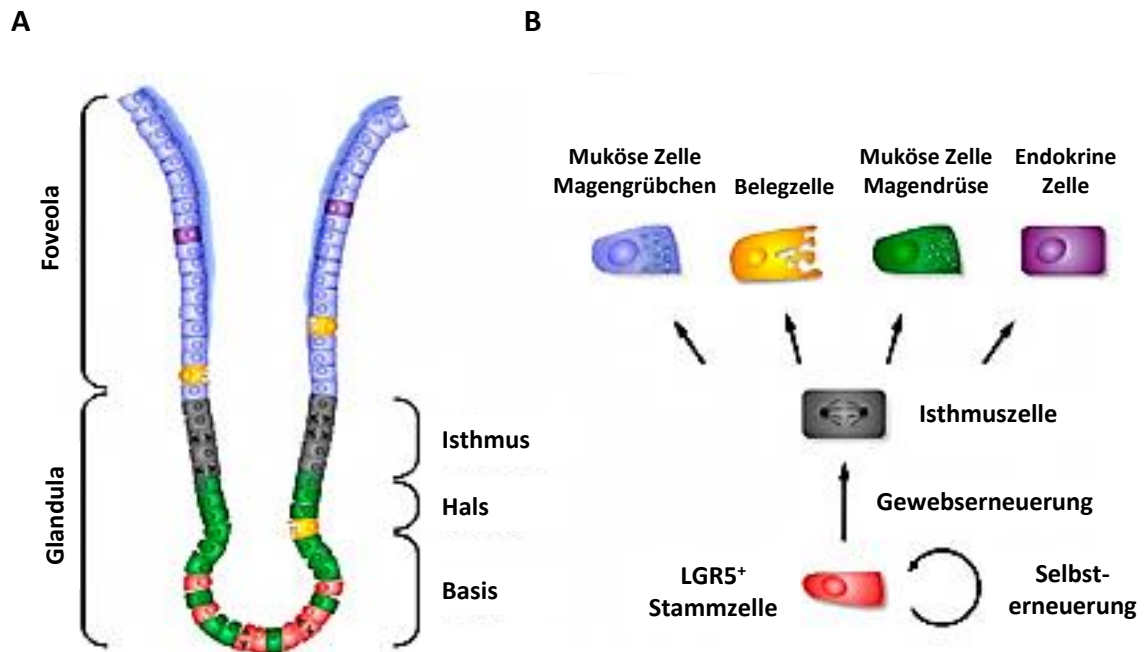


Abbildung 2: LGR5-positive adulte Stammzellen sichern die Gewebshomöostase der Pylorusregion des Magens. (A) Architektur des Pylorusepithels. Proliferierende LGR5-positive adulte Stammzellen sind am Grund der Drüsenschläuche lokalisiert. (B) Übersicht über die von den LGR5-positiven Stammzellen ausgehenden Zelltypen des Pylorus. LGR5-positive Pylorusstammzellen sind in der Lage, alle Zelltypen des Pylorusepithels zu bilden sowie sich selbst zu erneuern (modifiziert nach Leushacke and Barker, 2012).

2010 konnten Barker et al. zeigen, dass alle Zellen des Pylorus aus proliferierenden LGR5-positiven Zellen in der Basis des Drüsenschlauches entstehen (vgl. Abbildung 2 B) (Barker et al., 2010b). Dazu verwendete er den aktuellen Goldstandard zur Identifizierung von Stammzellen, das *lineage tracing*. *Lineage tracing* erlaubt die Stammzellaktivität einzelner Zellen bzw. Subpopulationen von Zellen im Gewebe zu analysieren. Dazu muss ein transkriptionell blockiertes Reportergen in der zu untersuchende Zellpopulation vorhanden sein. Nach gezieltem Deblockieren in der Zielzelle mittels Rekombination ermöglicht dies anhand der Expression des Reportermoleküls, die modifizierte Stammzelle sowie alle daraus entstehenden Tochterzellen nachzuverfolgen und darzustellen (Reya et al., 2001). Die LGR5-positiven Zellen des Pylorus fungieren als multipotente Zellen. Sie können sich selbst erneuern und sind an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Epithels der Pylorusregion beteiligt (Barker et al., 2010b). Außer für LGR5-positive Zellen konnte im Pylorus des Magens bisher nur noch für Villin-exprimierende Zellen gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, alle Zelltypen der Magenschläuche zu bilden. Villin ist ein gewebsspezifisches, Aktin-bindendes Protein. Die Villin-positiven Zellen stellen allerdings eine rare Zellentität in Magendrüsen dar und scheinen nur unter spezifischer Stimulation

mit Interferon- γ das Magengewebe zu erneuern. Villin scheint deshalb kein geeigneter Marker für alle Stammzellen des Pylorus zu sein, sondern vielmehr in Gewebeschäden aktiv zu werden (Qiao et al., 2007).

1.2.2 Die Rolle des Wnt-Signalweges in der Stammzellregulation und der Entstehung von Tumoren

Der kanonische Wnt-Signalweg stellt einen von vielen Signaltransduktionswegen des menschlichen Körpers dar. Er ist in der embryonalen Entwicklung, der Gewebshomöostase und zur Aufrechterhaltung von Stammzellen sowie ihrer Funktionen wichtig (Clevers, 2006; MacDonald et al., 2009; Nusse et al., 2008). Im inaktiven Zustand wird die Konzentration des Transkriptionskoaktivators β -Catenin gering gehalten, in dem β -Catenin phosphoryliert und durch Proteasomen abgebaut wird (Abbildung 3). Dies geschieht durch Einschluss in einen Komplex zusammen mit GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3), Axin, APC (adenomatöse *Polyposis coli*) und anderen Komponenten (Reya and Clevers, 2005). Die Transkription von Zielgenen des β -Catenins wird im Zellkern durch den T-Zell-Faktor (TCF) inhibiert (Nelson and Nusse, 2004). Bei Bindung von Wnt-Liganden an die Rezeptoren des Signalweges (Frizzled und LRP5/6) kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, in der es zur Verhinderung des β -Catenin-Abbaus kommt (Tolwinski and Wieschaus, 2004). Erhöhte β -Catenin-Konzentrationen führen dazu, dass sich β -Catenin im Zellkern anreichert und mit TCF und LEF (*lymphoid enhancer factor*) interagiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene wie z.B. *LGR5* (Van der Flier et al., 2007). Es wurde bald gezeigt, dass epitheliale Pylorusstammzellen einen aktivierten Wnt-Signalweg benötigen, um die Gewebshomöostase aufrechtzuerhalten (Barker et al., 2010b). Dies konnte auch dadurch untermauert werden, dass die Transkription von Wnt-Zielgenen in LGR5-positiven Pylorusstammzellen stark erhöht war und Wnt-Liganden in erhöhten Konzentrationen in der Basis der Drüsenschläuche, wo die Stammzellen lokalisiert sind, aktiv waren (Van der Flier et al., 2007). Demgegenüber können ein deregulierter Wnt-Signalweg und die damit einhergehende Deregulierung der Stammzellfunktionen und der Gewebshomöostase zu der Entstehung von Magenkarzinomen vor allem der Pylorusregion führen (Clements et al., 2002; Park et al., 1999). Barker *et al.* konnten die LGR5-positive Pylorusstammzelle 2010 als potentielle Ursprungszelle von Wnt-getriggerten Magentumoren etablieren.

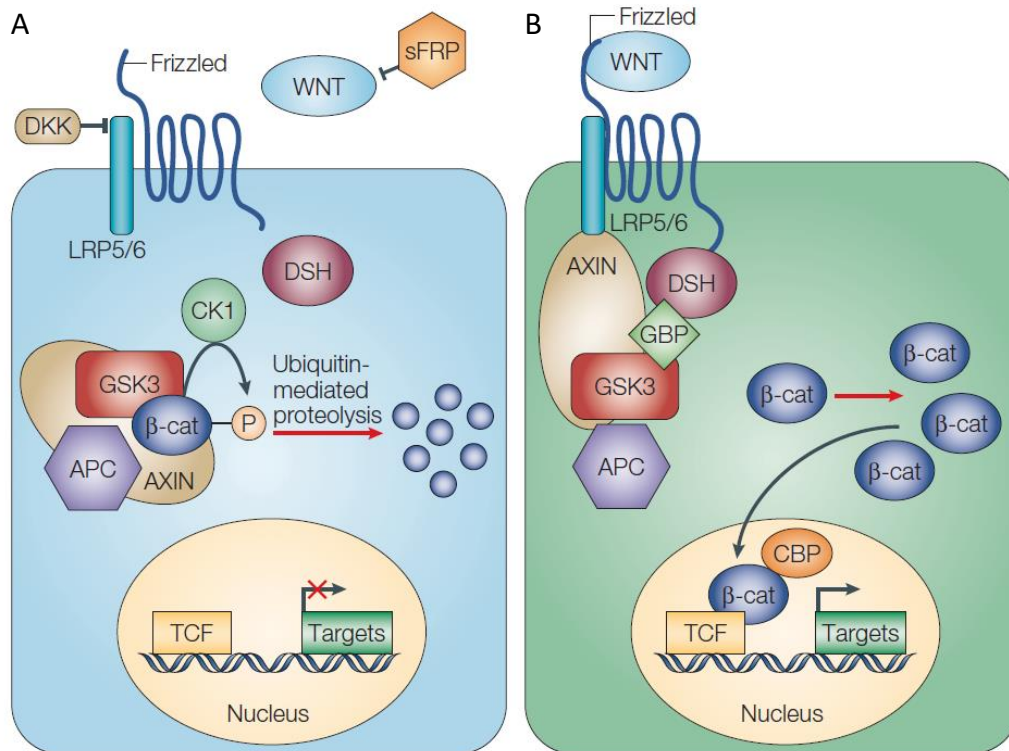


Abbildung 3: Kanonischer Wnt-Signalweg. (A) Inaktiver Signalweg. In Abwesenheit von aktiven WNT-Liganden kommt es zur Degradierung von β -Catenin (β -Cat) innerhalb eines Abbau-Komplexes, der APC und AXIN enthält, die die Phosphorylierung von β -Catenin erleichtern. Es kommt zur Ubiquitinierung und zur Degradation von β -Catenin. Die nachgeschalteten Zielgene bleiben durch TCF und LEF, beides Transkriptionsfaktoren, sowie durch weitere Korepressoren unterdrückt. (B) Aktiver Signalweg. Wenn die Konzentration an WNT-Liganden die Pufferkapazität durch WNT-Inhibitoren übersteigt, interagieren WNT-Liganden mit den Frizzled-Rezeptoren, die Signalkaskade wird aktiviert und führt über mehrere Schritte zur Bindung von AXIN und zu dessen Degradierung. Die β -Catenin-Phosphorylierung und Degradierung wird dadurch gehemmt. Die erhöhte β -Catenin-Konzentration führt zu dessen Akkumulation im Zellkern. β -Catenin bindet dort an TCF und LEF und es kommt zur Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene. CBP, CREB-Bindeprotein; CK, Casein-Kinase; DKK, Dickkopf; DSH, *Dishevelled*; GBP, GSK3-Bindeprotein; GSK, Glykogen-Synthase-Kinase; LRP, LDL receptor-related protein; P, Phosphorylierung; sFRP, secreted Frizzled-related protein (Moon et al., 2004).

1.3 Ursprungszellen von Tumoren und Tumorstammzellen

Die Beobachtung, dass nicht alle Zellen eines Tumors gleich sind, legte den Grundstein für das Tumorstammzellmodell (*cancer stem cell*; CSC). Tumorzellen innerhalb eines Tumors zeigen häufig diverse funktionelle Eigenschaften und exprimieren unterschiedliche Oberflächenproteine und Marker (Fidler and Hart, 1982; Fidler and Kripke, 1977; Nowell, 1976). Dieser intratumoralen Heterogenität steht eine intertumoralen Heterogenität gegenüber. Verschiedene Tumorsubtypen innerhalb eines Organs zeigen oft einen sehr unterschiedlichen Phänotyp sowie ein unterschiedliches Tumorverhalten (Marusyk and Polyak, 2010). So führen z.B. unterschiedliche Mutationen innerhalb einer einzelnen Zelle zu verschiedenen Tumorsubtypen oder Mutationen verschiedener Zellen führen zu unterschiedlichen Tumorsubtypen (Abbildung 4 A). Letzteres würde verschiedene Ursprungszellen für jeden Subtyp bedeuten. Man kann davon ausgehen, dass beide Wege

parallel existieren. Außerdem spielen auch die Umgebung der Zellen im Gewebeverband (Abbildung 4 B) sowie extrinsische Faktoren eine große Rolle in der Tumorgenese und der Heterogenität von Tumoren (Bissell and Labarge, 2005; Tlsty and Coussens, 2006).

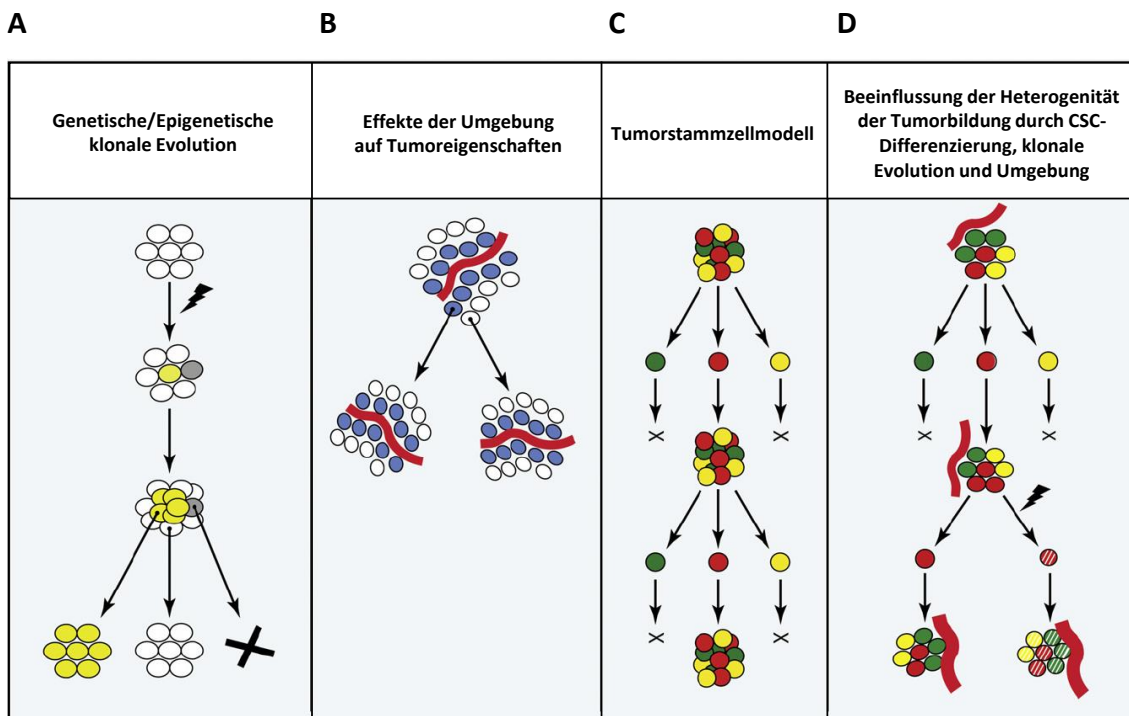


Abbildung 4: Verschiedene Mechanismen zur Heterogenitätentstehung innerhalb eines Tumors. (A) Die Heterogenität innerhalb eines Tumors kann durch zufällige genetische sowie epigenetische Veränderungen entstehen, die zu phänotypischen sowie funktionellen Unterschieden führen. (B) Tumorzellen lassen sich durch ihre Umgebung stark beeinflussen. Zum Beispiel erlangen Tumorzellen (blau) in der Nähe eines Blutgefäßes (rot) andere Eigenschaften als Tumorzellen (grau), die weiter von Blutgefäßen entfernt lokalisiert sind. (C) Tumoren, die dem CSC-Modell folgen, enthalten tumorinitiierende Zellen (rot) sowie ausdifferenzierte Tumorzellen (grün, gelb). Die tumorinitiierenden Zellen bilden neue tumorinitiierende Zellen sowie ausdifferenzierte Tumorzellen innerhalb einer hierarchischen Organisation aus. (D) Tumore, die dem Stammzellmodell folgen, unterliegen auch Einflüssen der Umgebung sowie der klonalen Evolution. Die Ursprünge der Heterogenität eines Tumors müssen sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern leisten alle einen Beitrag in der Tumorbildung (modifiziert nach Magee et al., 2012).

Es ist wichtig, die normale Hierarchie eines Gewebes zu verstehen, um die Hierarchie innerhalb eines Tumors nachvollziehen zu können. Die Stammzelle eines Gewebes war relativ früh als Zelle auserkoren, die den Ursprung eines Tumors bilden kann. Durch ihre Kapazität zur Selbsterneuerung und ihre Langlebigkeit ist sie Angriffspunkt für die Ansammlung multipler Mutationen, die letztendlich zur Tumorbildung führen. Andererseits können auch andere Zellen innerhalb der Hierarchie Tumorursprungszellen sein, sofern sie Mutationen treffen, die ihnen die Selbsterneuerungskapazität zurückgeben (Barker et al., 2009; Merlos-Suarez et al., 2011).

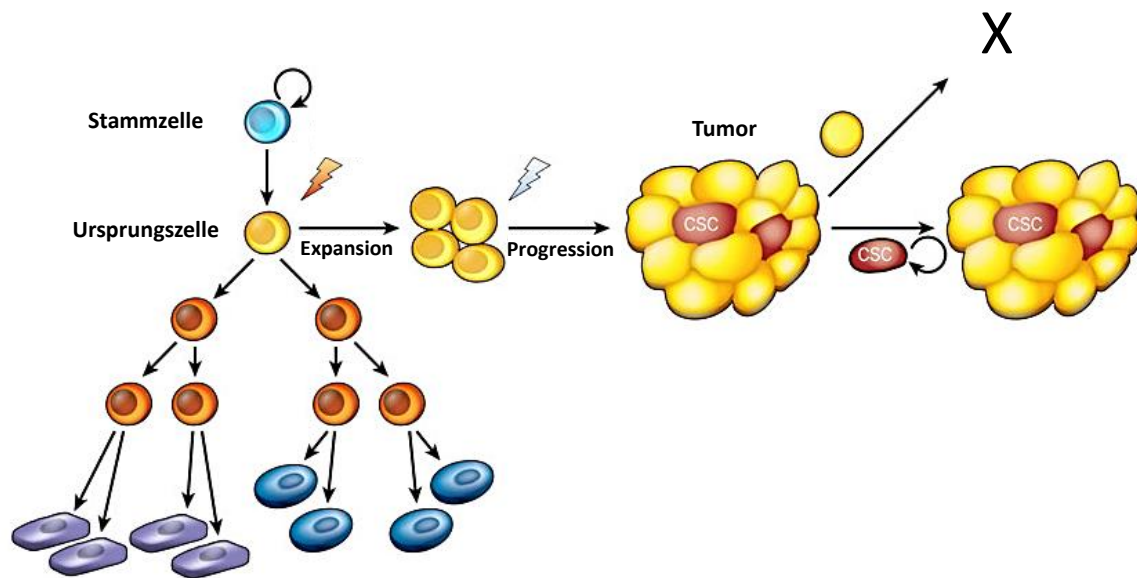


Abbildung 5: Die normale Zellhierarchie und die Tumorentstehung. Auf der linken Seite ist die Stammzelle (hellblau) dargestellt, die über differenziertere Progenitorzellen (orange) ausdifferenzierte Zellen (lila, dunkelblau) bildet. Die Ursprungszelle eines Tumors kann z.B. eine Progenitorzelle sein. Durch Ansammlung von Mutationen kann es dann zur Bildung von CSC (rot) kommen. In diesem Modell ist nur die Tumorstammzelle in der Lage, die Tumorbildung aufrechtzuerhalten und nicht die differenzierten Tumorzellen (gelb). Diese CSC muss nicht die gleiche Zelle sein, aus der der Tumor entstanden ist (Ursprungszelle) (modifiziert nach Visvader, 2011).

Dem Tumorstammzellmodell liegt nun zu Grunde, dass nicht alle Tumorzellen eines Tumors gleichermaßen dazu in der Lage sind, neue Tumorzellen zu bilden, sondern dass sich eine kleine Subpopulation der Tumorzellen als einzige selbst erneuern kann (Abbildung 4 C). Diese Zellen werden als Tumorstammzellen bezeichnet. Sie bilden nur einen verhältnismäßig kleinen Anteil der Tumormasse (Abbildung 5). Den Großteil der Tumormasse bilden weiter differenzierte Tumorzellen, die nicht dazu in der Lage sind, das Wachstum des Tumors aufrechtzuerhalten (Bonnet and Dick, 1997; Kelly et al., 2007; Neering et al., 2007). Diese Differenzierung von CSC zu sich nicht selbst erneuernden Tumorzellen lässt wie in normalen Geweben auch im Tumor eine hierarchische Organisation entstehen (Dick, 2008; Reya et al., 2001; Shackleton et al., 2009). CSC besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sonst den Stammzellen vorbehalten sind. Sie sind in der Lage, sich selbst zu erneuern sowie andere ausdifferenziertere Tumorzellen zu bilden, also heterogen zu proliferieren (durch symmetrische sowie asymmetrische Teilung). Des Weiteren besitzen CSC eine besonders ausgeprägte Resistenz gegenüber Strahlen- sowie Chemotherapie. Für das weit fortgeschrittene Mammakarzinom konnte beobachtet werden, dass sich CSC unter zytotoxischer Chemotherapie anreicherten, während die Hauptmasse des Tumors abgetötet werden konnte (Li et al., 2008). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei CML gemacht werden. Leukämienstammzellen zeigten eine höhere Resistenz gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, während

ausdifferenzierte Leukämiezellen sensibel waren (Goldman, 2010; Oravec-Wilson et al., 2009; Perrotti et al., 2010). Bei diskontinuierlicher Imatinibbehandlung trat folgende Situation ein: in auftretenden Rezidiven waren CSC resistent gegenüber Imatinib. Differenziertere Tumorzellen erwiesen sich weiterhin als sensibel (Barnes and Melo, 2006; Druker et al., 2006; Ross et al., 2011). Eine solche Resistenz konnte auch für CSC in Gliomzellen und bei der Myelodysplasie beobachtet werden (Bao et al., 2006; Tehranchi et al., 2010).

Analog zu normalen Stammzellen gelangen CSC zu dieser Resistenz aufgrund eines verlangsamten Zellzyklus, einer erhöhten Expression von Membrantransportern, die Giftstoffe aus der Zelle heraustransportieren können, einer hohen Expression anti-apoptotischer Proteine sowie der Verhinderung dauerhafter DNA-Schäden (Bao et al., 2006; Dean et al., 2005; Diehn et al., 2009; Zhou et al., 2009) (Abbildung 6).

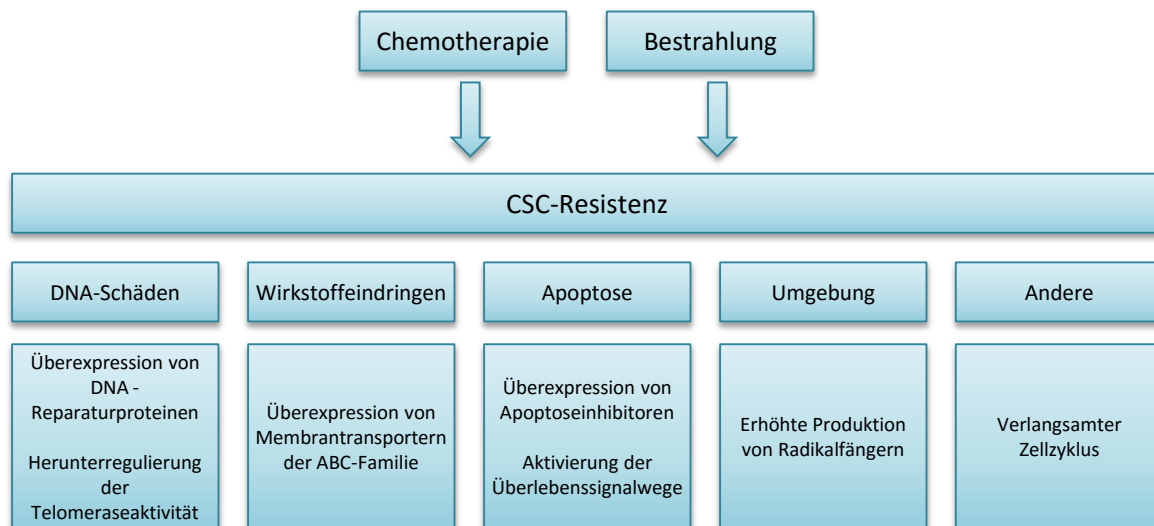


Abbildung 6: Resistenzmechanismen von CSC gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung

Das Tumorstammzellmodell kann ein Phänomen erklären, welches häufig in der Therapie von Tumorerkrankungen auftritt. Nach Chemo- oder Strahlentherapie kommt es bei vielen Patienten nach einiger Zeit zu einem Rezidiv oder zum Auftreten von Tumormetastasen. Einzelne resistente CSC haben vermutlich überlebt und bilden nun wieder einen Tumor (Abbildung 7). Aus diesem Grund kann man nicht von Heilung nach diesen Therapieformen sprechen. Mit Hilfe des Tumorstammzellmodells könnten in Zukunft effektive und gezielte Therapiemöglichkeiten gegen CSC gefunden werden, anstatt die Tumormasse zu therapieren, die nicht an der Entstehung und dem Fortbestehen des Tumors beteiligt ist.

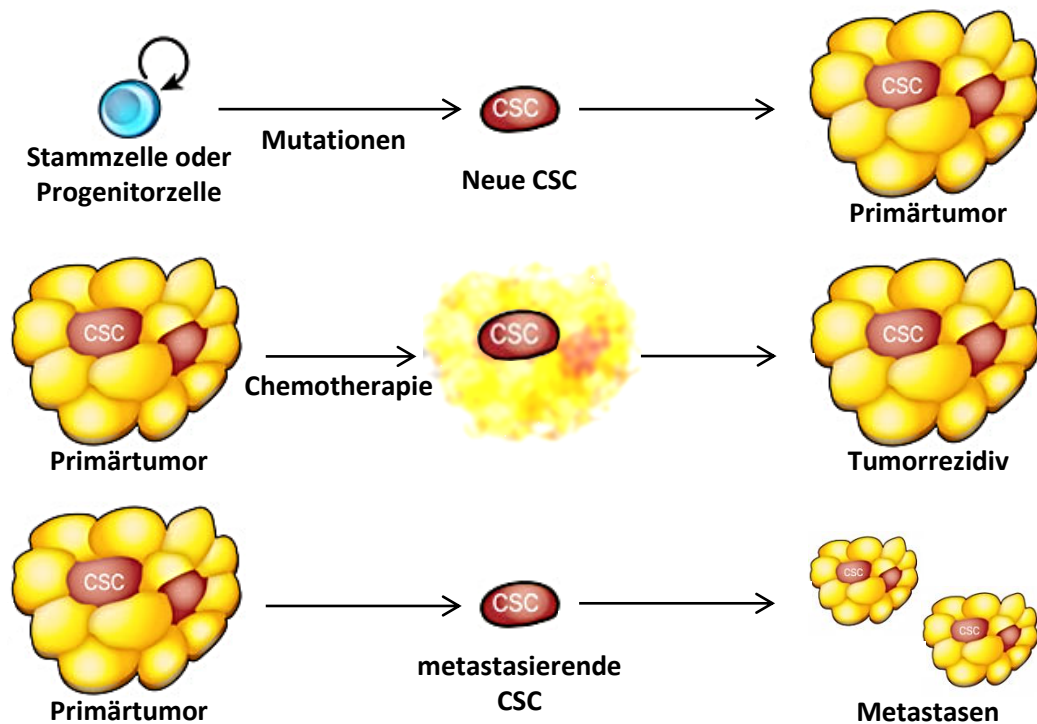


Abbildung 7: Rolle von CSC bei Rezidivbildung und Metastasierung. Für Tumoren, die dem Tumorstammzellmodell folgen, gelten die hier dargestellten Abläufe in Tumorbildung, Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Metastasierung (in Anlehnung an Jordan et al., 2006).

Ein anderes Modell der Tumorentstehung basiert auf der Annahme, dass Tumorzellen durch zusätzliche Mutationen einen Wachstumsvorteil erlangen können und stärker proliferieren als andere Tumorzellen. Dieses Modell der klonalen Evolution geht davon aus, dass alle Tumorzellen homogen sind und ein ähnliches Tumorbildungspotential besitzen (Nowell, 1976). Damit knüpft es an die Evolutionstheorie Darwins an, die im 19. Jahrhundert die Entstehung der biologischen Arten erklärte (Darwin, 1859). Eine Tumorzelle, die einen Wachstumsvorteil gewinnt, bildet Klone mit der gleichen Eigenschaft der Ursprungszelle. Ein weiteres zufälliges Ereignis, das nun eine Zelle dieses Klons trifft, kann Nachkommen dieser Zelle möglicherweise einen weiteren Wachstumsvorteil verleihen und damit zur Tumorbildung führen (stochastisches Modell) (Reya et al., 2001). Nach diesem Modell sollte eine Anreicherung oder Isolierung von CSC anhand ihres Phänotyps oder ihrer funktionellen Eigenschaften keinen Unterschied in der Tumorbildungskapazität zeigen.

Beide Konzepte zur Tumorentstehung scheinen eine Rolle in der Tumorbildung des Menschen zu spielen. Dabei müssen sie sich nicht gegenseitig ausschließen. Zum Beispiel konnte für Leukämienstammzellen gezeigt werden, dass sie einer klonalen Evolution unterzogen sind (Barabe et al., 2007). Durch Mutation dieser ersten CSC kann eine zweite, aggressivere Tumorstammzelle entstehen. Ein Hinweis darauf ist die Beobachtung, dass es nach Serientransplantationen von CSC zur Anreicherung von aggressiveren CSC *in vivo* kam (Clark et al., 2000).

Es ist zu beachten, dass die Tumorstammzelle nicht gleichzeitig auch die Ursprungszelle eines Tumors sein muss. Als Ursprungszelle wird die Zelle bezeichnet, die die erste genetische Mutation erlangt. Die CSC muss auch nicht zwingend aus normalen Stammzellen entstehen. Sie kann aus Progenitorzellen oder ausdifferenzierteren Zellen entstehen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangt haben. Einige Studien über die CSC verschiedener Leukämieformen zeigen, dass CSC aus Progenitorzellen sowie differenzierteren Zellen entstehen, die Selbsterneuerungssignalwege aktivieren konnten (Cozzio et al., 2003; Jamieson et al., 2004; Krivtsov et al., 2006).

Bisher sind CSC in soliden Tumoren noch nicht sehr genau definiert. Deshalb steht noch offen, welchen Zelltypen die CSC am ehesten ähneln.

1.4 Tumorstammzellen: Stand der Forschung

1.4.1 CSC im hämatopoetischen System

Bereits vor 160 Jahren vermutete Rudolph Virchow, Gründer der modernen Pathologie, in seiner Schrift über die zelluläre Pathologie, dass Tumore aus unreifen Zellen entstehen. Erst vor etwa 50 Jahren gab es genauere Hinweise auf die Existenz von CSC, als nach einer Erklärung für die Heterogenität innerhalb von Tumoren gesucht wurde (Bruce and Van Der Gaag, 1963). Der erste Beweis für das Entstehen einer Neoplasie aus einer einzelnen genetisch mutierten Zelle kam aus dem hämatopoetischen System, der chronisch myeloischen Leukämie (Baikie et al., 1960). Weitere Studien über akute myeloische Leukämie zeigten, dass nicht alle Leukämiezellen *in vivo* proliferierten und dass nur eine kleine Subpopulation der Zellen in der Lage war, *in vitro* Kolonien zu bilden (Clarkson et al., 1967). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass leukämische Zellen genau wie gesunde hämatopoetische Zellen hierarchisch organisiert sind. Nur eine kleine Subpopulation ist in der Lage, differenziertere, nicht weiter proliferierende Leukämiezellen nachzubilden. Erst 1997 gelang es Dick *et al.* über direkte Xenotransplantation von Leukämiezellsubpopulationen in NOD/SCID-Mäuse die Existenz von Leukämienstammzellen nachzuweisen. Mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) konnte er erstmals verschiedene Subpopulationen der Leukämiezellen isolieren und zeigen, dass nur die Tumorzellen mit dem Phänotyp CD34⁺/CD38⁻ tumorinitiierend sind. Diese kleine Subpopulation war als einziges dazu in der Lage, Leukämie in Mäusen zu bilden sowie das Wachstum aufrechtzuerhalten (Bonnet and Dick, 1997). Diese Ergebnisse beweisen die hierarchische Organisation innerhalb der Leukämiezellen analog zum hämatopoetischen System. Die Tumorstammzellhypothese wurde mit diesen Studien das erste Mal bewiesen. In Patienten wurden CSC das erste Mal im Jahr 2000 in Leukämiepatienten identifiziert (Cobaleda et al., 2000).

1.4.2 CSC in soliden Tumoren

Der erste solide Tumor, in dem CSC entdeckt wurden, war 2003 das Mammakarzinom (Dontu et al., 2003). 2003 konnten außerdem das erste Mal CSC aus einem soliden Tumor, ebenfalls dem Mammakarzinom, isoliert werden (Al-Hajj et al., 2003). Al-Hajj *et al.* zeigten, dass die CD44⁺/CD24⁻-Subpopulation nach Transplantation in NOD/SCID-Mäuse tumorinitiierende Fähigkeiten besaß. Nur 100 Zellen dieser Population waren in der Lage, einen Tumor ähnlich dem Primärtumor in NOD/SCID-Mäusen nachzubilden, während es 10.000 Zellen anderen Phänotyps nicht waren. In Übereinstimmung mit der Tumorstammzellhypothese bildete die CD44⁺/CD24⁻-Subpopulation Tumore, die der Heterogenität des Primärtumors glichen.

Nach diesen beiden bahnbrechenden Publikationen wurden CSC nach und nach in immer weiteren soliden und hämatopoetischen Neoplasien entdeckt. Den meisten Studien ist gemeinsam, dass ein Marker bzw. eine Markerkombination gefunden wurde, die im Tumor von einem Anteil der Tumorzellen, also heterogen, gebildet wurde. Auf der Basis dieses Markers konnten mittels FACS Subpopulationen aus Primärtumoren sortiert und in immunkompromittierte Mäuse transplantiert werden. Einige Zeit später wurde dann Tumorstammzellwachstum erreicht. Unterschiede in der Tumorbildungsgeschwindigkeit der Subpopulationen können dann die Existenz von CSC innerhalb des Primärtumors und ihre Anreicherung in einer der Subpopulationen beweisen. Inzwischen wurde eine Reihe weiterer Marker beschrieben, die tumorinitiierende Subpopulationen identifizieren konnten (Abbildung 8). Sie erlaubten die Identifikation von CSC in Neoplasien des Gehirns, des Kolons, der Haut, des Pankreas, der Prostata, des Ovars, der Leber, der Lunge, des Magens, der Schilddrüse sowie der Niere (Grande et al., 2012). Wichtig dabei ist, dass für einige Tumore unterschiedliche Marker zur Identifikation der CSC herangezogen werden konnten. Z.B. wurde auch der ALDH1⁺-Phänotyp beschrieben, mit tumorinitiierenden Zellen im Brusttumor assoziiert zu sein (Ginestier et al., 2007). Es zeigten jedoch nur 1 % der Tumorzellen simultane Expression beider beschriebenen CSC-Marker (ALDH1⁺ sowie CD44⁺/CD24⁻). Diese Tatsache kann verschiedene Gründe haben. Zum einen können unterschiedliche Validierungsmethoden eine Rolle spielen. Zum anderen wurden möglicherweise verschiedene CSC-Subpopulationen charakterisiert, die innerhalb eines Tumors koexistieren. Auch die Tumorentitäten sind selten komplett uniform. Auch das Mammakarzinom konnte in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Verschiedene CSC-Populationen scheinen mit verschiedenen Tumorsubtypen assoziiert zu sein (Baccelli and Trumpp, 2012). Auch der prozentuale Anteil von CSC zwischen Tumoren des gleichen Typs ist variabel (Bonnet and Dick, 1997). Allen Studien ist jedoch gemeinsam, dass nur eine Subpopulation innerhalb der Tumorzellen dazu in der Lage ist, einen neuen Tumor zu bilden. Zusammengefasst untermauern diese Daten die Tumorstammzellhypothese.

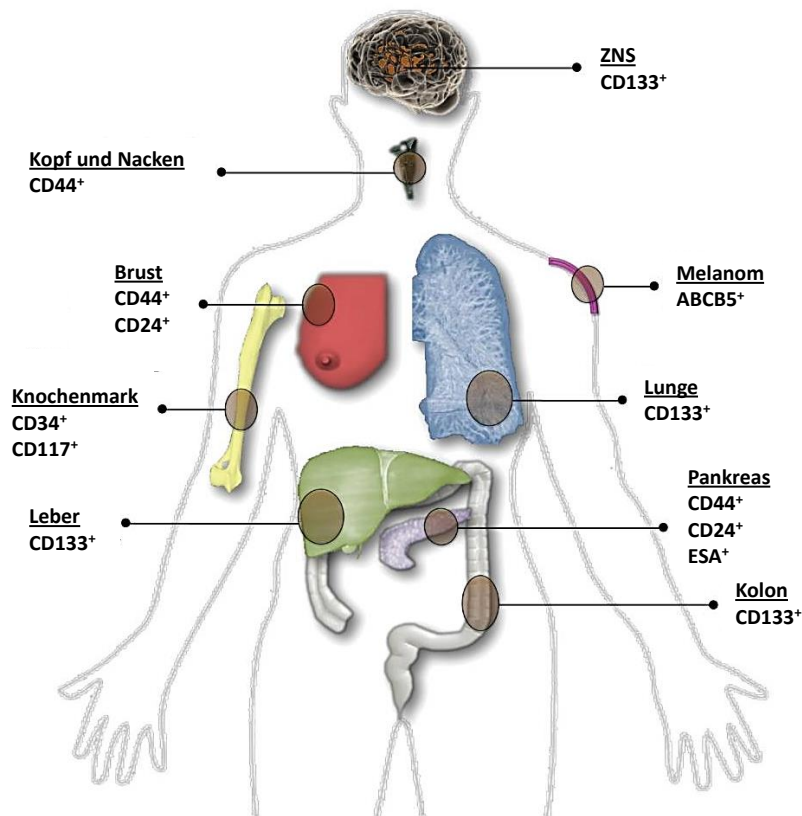


Abbildung 8: Phänotyp von CSC in verschiedenen Organen. Eine Zusammenfassung einiger CSC-Oberflächenmarker, die in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert wurden (modifiziert nach Morrison et al., 2011).

1.4.3 CSC in neuroendokrinen Tumoren

Bis heute gibt es noch keine überzeugenden Studien, in denen Tumorstammzellen in neuroendokrinen Neoplasien des gastro-entero-pankreatischen Systems identifiziert und isoliert werden konnten. Allerdings gibt es Hinweise auf ihre Existenz. Unter anderem konnte eine Dysregulation wichtiger embryologischer Stammzell-Signalwege in GEP-NEN nachgewiesen werden (Fendrich et al., 2007; Kunnimalaiyaan and Chen, 2007). Bekannt ist, dass die Aktivierung embryologischer Signalwege bei Erwachsenen häufig mit gestörtem Zellwachstum und der Bildung von Tumoren einhergeht. 2006 konnten Su *et al.* einen aktiven Wnt-Signalweg in 91 gastrointestinalen und 26 extragastrointestinalen NEN nachweisen (Su et al., 2006). Wie unter 1.2.2 beschrieben, spielt der Wnt-Signalweg eine Schlüsselrolle in Zellproliferation und in der durch Stammzellen aufrechterhaltenen Gewebshomöostase. Aktuell stehen genauere Analysen zur Rolle des Wnt-Signalweges in GEP-NEN noch aus. Eine Identifikation von CSC in GEP-NEN kann in Zukunft die Grundlage zur gezielten Suche nach neuen Therapeutika in dieser Tumorentität, die bisher besondere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie neuerer Wirkstoffe gezeigt hat, sein.

1.5 Methoden zur Identifikation von Tumorursprungszellen und CSC

1.5.1 Identifikation über Markerexpression

Wie unter 1.4 beschrieben konnten viele Hinweise und Beweise für die Existenz von CSC im hämatopoetischen System sowie in soliden Tumoren gefunden werden. Eine Möglichkeit CSC zu identifizieren ist die Analyse ihres Phänotyps. CSC stellen eine Subpopulation innerhalb von Tumorzellen dar, die anhand ihrer spezifischen Markerexpression identifiziert werden können. In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Marker benutzt, um die Existenz von CSC in unterschiedlichen Tumoren nachzuweisen. Zuerst wurden Marker wie z.B. CD133 und CD166 benutzt, die spezifisch von normalen Stammzellen oder Progenitorzellen des entsprechenden Organs bzw. Gewebes exprimiert werden. Des Weiteren konnten CSC in Subpopulationen angereichert werden und Marker dieser Subpopulationen zur Identifikation der CSC herangezogen werden. Aktuell werden vor allem Marker zur Identifikation und Isolierung von CSC benutzt, von denen bekannt ist, dass sie in anderen Tumoren CSC-Marker darstellen, z.B. EpCAM, CD44, CD117, ALDH1, CXCR4. Außerdem werden Marker untersucht, die nicht ubiquitär in bestimmten Geweben vorkommen, sondern ausschließlich von einigen wenigen Zellen des Gewebes gebildet werden. Anhand dieser selektiv exprimierten Marker erwartet man, CSC identifizieren zu können.

Eine Übersicht über die Marker, die aktuell herangezogen werden, ist in Tabelle 1 dargestellt (Clarke et al., 2006; Visvader and Lindeman, 2008). Die funktionelle Bedeutung dieser Marker für CSC ist damit noch nicht bestätigt. Viele Marker kommen in unterschiedlichen, auch gesunden Geweben vor und sind damit nicht spezifisch und ausschließlich von CSC gebildet. Ein Beispiel dafür ist CD133. Mittels CD133 konnten CSC in Gehirntumoren identifiziert werden. Allerdings bilden auch normale Gehirnzellen und viele andere gesunde Zellen verschiedener Gewebe CD133. Nach erfolgreicher Isolierung von Subpopulationen anhand solcher Marker muss immer noch ein Assay angeschlossen werden, um die Selbsterneuerungs- sowie die Tumorbildungskapazität der Zellen zu überprüfen.

Im Folgenden sind Marker genauer dargestellt, die sich in der Identifikation von CSC bewährt haben:

- **CD166 (ALCAM = *activated leukocyte cell adhesion molecule*)** ist ein transmembranäres Glykoprotein, das eine Rolle in Zelladhäsion, Wachstum und der Homöostase von normalem Gewebe spielt. CD166 wurde unter anderem in CSC des Kolonkarzinoms sowie des Prostatakarzinoms angereichert gefunden (Dalerba et al., 2007; Jiao et al., 2012). In Tumoren der Haut, Prostata, Brust, des Ovars und

Ösophagus korrelierte die CD166-Expression mit aggressivem Tumorwachstum (Burkhardt et al., 2006; Kristiansen et al., 2003; Mezzanica et al., 2008; van den Brand et al., 2010; Verma et al., 2005).

- **CD117 (c-KIT)**, eine Rezeptortyrosinkinase, ist ein Marker für embryonale, hämatopoetische sowie mesenchymale Stammzellen. CD117 spielt eine Rolle in Selbsterneuerung sowie der Aufrechterhaltung der Homöostase von Stammzellen (Hassan and El-Sheemy, 2004; Lu et al., 2007; Palmqvist et al., 2005). CD117 konnte als Marker für Tumorstammzellen des Ovars (Kurrey et al., 2009; Luo et al., 2011; Zhang et al., 2008), der Lunge (Levina et al., 2010), des hämatopoetischen Systems (Guibal et al., 2009), der Knochen (Adhikari et al., 2010), der Prostata (Liu et al., 2010) sowie der Speicheldrüse (Shen et al., 2011) identifiziert werden.
- **EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*)**, ein Transmembranprotein mit ursprünglich vermuteter Zelladhäsionsfunktion, wird in den meisten Epithelien exprimiert. Typischerweise ist EpCAM in Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert. EpCAM^{hoch}-Tumorzellen stellen tumorinitiierende Zellen im kolorektalen Karzinom (Dalerba et al., 2007), in manchen Mammakarzinomen sowie im hepatozellulären Karzinom dar (Al-Hajj et al., 2003; Yamashita et al., 2012).
- **CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4)** ist ein Rezeptorprotein für CXCL12, das für seine Rolle in der Proliferation und Metastasierung vieler Tumorentitäten (Lunge Brust, Prostata) wichtig ist (Balkwill, 2004; Ehtesham et al., 2006; Pituch-Noworolska et al., 2003; Zou et al., 1998). CXCR4 wird häufig in CSC-Populationen gebildet und CXCR4-positive Zellen markieren innerhalb der CSC-Subpopulation die Zellen, die dazu in der Lage sind zu metastasieren (Hermann et al., 2007; Nian et al., 2011). Des Weiteren verstärken sich die Hinweise, dass CXCR4 unentbehrlich für die Aufrechterhaltung und das Wachstum von CSC ist. Dies konnte für CSC der Brust, der Prostata, der Lunge, der Leber sowie der Niere bestätigt werden (Dubrovskaya et al., 2012a; Dubrovskaya et al., 2012b; Gassenmaier et al., 2013; Jung et al., 2013; Yang et al., 2012).

Tabelle 1: Übersicht über gängige Marker zur Identifikation von CSC

CSC Marker		Tumorentität	Referenz
ALDH	Aldehyddehydrogenase	Brust	(Ginestier et al., 2007)
CD24	Sialoglykoprotein	Pankreas	(Li et al., 2007)
CD44	Transmembran-Glykoprotein, bindet Hyaluronan	Brust, Magen, Kolon	(Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; Takaishi et al., 2009)
CD117 (c-KIT)	Rezeptortyrosinkinase Rezeptor für SCF (Stammzellefaktor)	Ovar	(Kurrey et al., 2009)
CD133	Prominin, Glykoprotein	Gehirn, Pankreas, Kolon	(Bao et al., 2006; Hermann et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007)
CD166 (ALCAM)	<i>Activated leucocyte-cell adhesion molecule</i>	Lunge	(Zhang et al., 2012b)
CXCR4	Chemokinrezeptor 4	Pankreas, Lunge (NSCLC), Niere	(Gassenmaier et al., 2013; Vandercappellen et al., 2008)
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>	Kolon	(Dalerba et al., 2007)

1.5.2 Colony Formation Assay

Es gab immer wieder Zweifel, ob die Analyse von Tumorzelllinien *in vitro* im Gegensatz zu frisch isolierten Tumorzellen Sinn macht (Pardal et al., 2003). Diese Zweifel beruhten vor allem auf Unsicherheit über mögliche Effekte, die *In-vitro*-Kultivierung von Zellen auf ihre Eigenschaften haben kann (Burdall et al., 2003). Es stellte sich die Frage, ob die ursprüngliche Hierarchie der Zellen und damit symmetrische sowie asymmetrische Proliferation der Zellen *in vitro* erhalten bleibt. Trotzdem stellen *In-vitro*-Analysen natürlich eine simple Methode dar und ermöglichen andere Herangehensweisen, als es mit *In-vivo*-Analysen möglich wäre. Gerade auch die Analyse von Stammzeleigenschaften von Tumorzellen kann durch *In-vitro*-Versuche immens vereinfacht werden (Cheng, 2004). Mehrere Studien legten nahe, dass Tumorzelllinien tatsächlich ihr Stammzellverhalten *in vitro* aufrechterhalten. Zum Beispiel konnten mehrere Subpopulationen maligner Zelllinien beschrieben werden, die unterschiedliche Expressionen von Stammzell-Charakteristika wie Entgiftungspumpen zeigten (Hirschmann-Jax et al., 2004; Setoguchi et al., 2004). Die Zelllinien wiesen weiterhin heterogene Zellpopulationen u.a. mit unterschiedlicher Proliferationskapazität auf.

Um Beweise für die Aufrechterhaltung der hierarchischen Struktur innerhalb maligner Zelllinien zu bekommen, können Zellen auf ihre Koloniebildungskapazität hin im *colony formation assay* untersucht werden. Die Heterogenität der Zellen spiegelt sich in der heterogenen Form der *in vitro* gebildeten Kolonien wider (Abbildung 9). Die Kolonieformen

werden als Holoklone, Meroklone sowie Paraklone bezeichnet und entstehen vermutlich durch klonales Wachstum aus Tumorstammzellen, weiter differenzierten sowie ausdifferenzierten Zellen (Barrandon and Green, 1987). Es konnte bewiesen werden, dass die Zellen innerhalb von Holoklonen Stammzeleigenschaften besitzen. Zum Beispiel waren nur sie in der Lage, alle Koloniefornen nachzubilden und verstärkt Stammzellmarker zu exprimieren (Locke et al., 2005). Der *colony formation assay* stellt folglich ein geeignetes Werkzeug dar, um Tumorzelllinien auf die Existenz von CSC hin zu untersuchen. Weiterführende Experimente ermöglichen dann die Charakterisierung der Tumorstammzellen innerhalb der Holoklone.

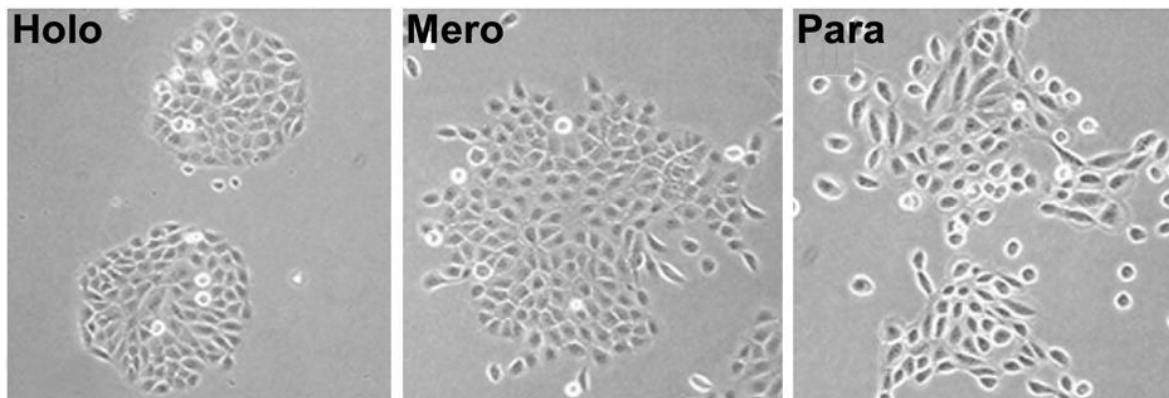


Abbildung 9: Verschiedene Koloniefornen der oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie VB6. Holoklone (Tumorstammzellen), Meroklone (differenziertere Zellen), Paraklone (ausdifferenzierte Zellen). In Anlehnung an Locke et al., 2005.

1.5.3 Anreicherung resistenter CSC mittels Chemotherapeutika

Wie bereits unter 1.3 beschrieben, besitzen CSC ähnlich zu Stammzellen besondere Resistenzen gegenüber konventionellen Tumorthapeutika. Vor allem ihre erhöhte Expression von Membrantransportern, die Giftstoffe (Chemotherapeutika, etc.) aus der Zelle heraustransportieren, gilt als Ursache für diese besondere Resistenz. Diese Eigenschaft kann man sich zur Identifikation von CSC-Markern zu Nutze machen. Es konnte gezeigt werden, dass sich CSC durch Therapie mit verschiedenen Tumormedikamenten anreichern lassen. Durch Behandlung von Tumorzellen mit verschiedenen Tumorthapeutika lassen sich Tumorzellen, die keine Stammzeleigenschaften besitzen, leichter abtöten. Die resistenteren CSC überleben die Behandlung und sind eventuell sogar noch dazu in der Lage, zu proliferieren. Eine Anreicherung von CSC unter Chemotherapie wurde unter anderem in Pankreastumoren (Gemcitabin), kolorektalen Karzinomen (Cyclophosphamid) und Bronchialkarzinomen (Cisplatin, Doxorubicin, Methotrexat) beobachtet (Dylla et al., 2008; Levina et al., 2008; Mueller et al., 2009). Anhand der Markerexpression der resistenten Subpopulation kann nun auf den Phänotyp der CSC geschlossen werden. Im FACS lässt sich eine Anreicherung der markerpositiven Fraktion erkennen.

1.5.4 *In-vivo*-Tumorwachstum

Der Goldstandard zur Identifizierung von CSC ist die Transplantation von potentiellen CSC in Mäuse (Abbildung 10). Zu injizierende Subpopulationen wurden vorher durch FACS isoliert. So kann überprüft werden, ob bestimmte Marker-exprimierende Subpopulationen die Eigenschaft zur Tumorentstehung sowie zur Selbsterneuerung *in vivo* besitzen. Tumore, die aus diesen transplantierten Zellen entstehen, sollten außerdem wieder die Heterogenität des Primärtumors ausbilden. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sowohl murine als auch menschliche Zellen transplantiert werden können. Zu beachten ist dabei allerdings, dass bei der Transplantation von menschlichen Zellen in Mäuse starke Immunreaktionen auftreten, wobei die transplantierten Zellen abgetötet werden (Auchincloss, 1988). Deshalb müssen diese Transplantationen in immunkompromittierten Mäusen, wie NOD/SCID, stattfinden. Aber auch hier ist die Speziesbarriere nicht aufgehoben. Inkompatibilitäten von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Gewebestruktur und, je nach Immundefizienzmodell unterschiedlich, überlebende Immunzellen haben weiterhin Einfluss auf das Verhalten der transplantierten Zellen und dürfen nicht außer Bedacht gelassen werden (de Visser et al., 2006; Kuperwasser et al., 2004; Manz, 2007). Probleme, die diese Speziesbarriere mit sich bringt, können durch Transplantation von murinen Tumorzellen in syngene Mäuse umgangen werden. Der Anteil der anwachsenden Tumorzellen kann damit signifikant erhöht werden (Krivtsov et al., 2006; Yilmaz et al., 2006).

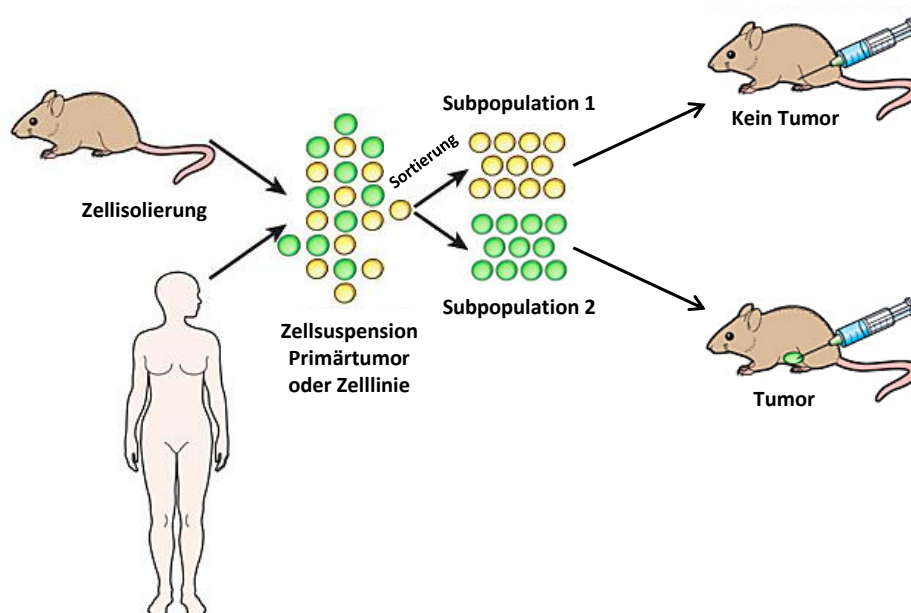


Abbildung 10: Identifizierung von CSC durch Transplantation verschiedener Subpopulationen der Tumorzellen in Mäuse. Tumorzellen werden zuerst aus dem humanen oder murinen Primärtumor isoliert und in Einzelzellsuspension gebracht. Alternativ können Zelllinien aus Primärtumoren oder Metastasen für die Einzelzellsuspension verwendet werden. Anhand potentieller CSC-Marker werden Subpopulationen der Tumorzellen mittels FACS sortiert. Sortierte und isolierte Tumorzellen werden anschließend zum Beispiel subkutan in (immunkompromittierte) Mäuse injiziert. Das Wachstumsverhalten der Tumore wird anschließend analysiert und CSC (grüne Zellen) können identifiziert werden (in Anlehnung an Visvader, 2011).

1.5.5 Lineage tracing in transgenen Mausmodellen zur Identifizierung von Tumorursprungszellen

Um die Ursprungszelle von Tumoren zu finden, sind genetisch manipulierte Mausmodelle unverzichtbar. Es werden transgene Mäuse verwendet, um durch Expression von Onkogenen wie z.B. *SV40-T-Antigen* oder durch Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. *Tp53* gezielt Tumore zu induzieren. Dazu werden zelltypspezifische Promotoren benötigt, die eine direkte Expression des Onkogens oder eine durch das Cre/lox-P-System induzierte Deletion eines Tumorsuppressors *in vivo* ermöglichen (Abbildung 11). Es wird angenommen, dass diese Tumormodelle den Phänotyp menschlicher Tumore nachbilden. Ein Nachteil dieser Modelle ist, dass nicht für alle Zelltypen spezifische Promotoren verfügbar sind (Visvader, 2011).

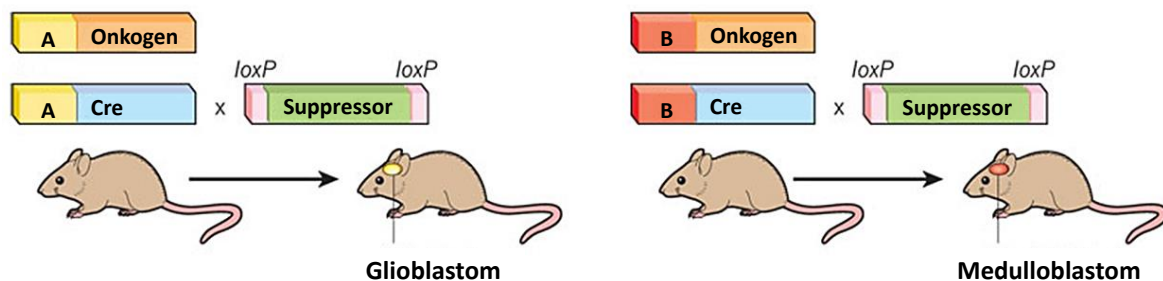


Abbildung 11: Mausmodelle zur Expression von Onkogenen bzw. Deletion von Tumorsuppressorgenen unter der Kontrolle von zelltypspezifischen Promotoren. Hier sind vergleichbare Modelle mit zwei verschiedenen Promotoren (A oder B) dargestellt. Nach Expression des gleichen Onkogens kommt es unter Promotor A zur Ausbildung eines Glioblastoms, während es unter Promotor B zur Ausbildung eines Medulloblastoms kommt. A und B sind in unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns aktiv. Durch Einkreuzen von Mäusen mit einem Cre/lox-P-System kann gezielt promotorabhängig die Zelltyp-spezifisch Deletion eines Tumorsuppressors *in vivo* erfolgen (modifiziert nach Visvader, 2011).

Lineage tracing ermöglicht die Nachverfolgung von Zellen *in vivo*, die durch Zellteilung aus einer Elternzelle hervorgegangen sind. Die Elternzelle kann eine normale oder transformierte Stammzelle sein. Zum Start des *Tracing*-Vorgangs verwendet man meist ein Tamoxifen induzierbares Cre-Rekombinase-Östrogenrezeptor-Fusionsprotein (CreER^{T2}), dessen Expression ebenfalls durch einen zelltypspezifischen Promotor gesteuert wird. Dies wird durch die irreversible Entfernung eines Transkriptionsblocks vor einem Markergen, das z.B. für ein fluoreszierendes Protein kodiert, ermöglicht. Dieses System ermöglicht zudem durch Variation der Tamoxifen-Dosis, die den Mäusen zugeführt wird, die Kontrolle der Anzahl der Zellen, in denen eine Rekombination erfolgt. Dieses Modell stellt aktuell den Goldstandard zur Identifikation der Ursprungszelle von Tumoren dar (Hayashi and McMahon, 2002; Metzger and Chambon, 2001). 2009 gelang Barker *et al.* die Kreation eines Mausmodells, mit dem sie beweisen konnten, dass der LGR5-Stammzellmarker in den Krypten des Darms auch eine Subpopulation von Adenomzellen markiert, die wiederum für das Adenomwachstum den Ursprung bildet (Barker *et al.*, 2009). Damit konnten sie LGR5 als CSC-Marker in Adenomen des Kolons etablieren.

1.6 Das transgene CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodell

Wie bereits unter 1.5.5 beschrieben dienen transgene Tumormausmodelle dazu, als Modelle für menschliche Tumoren zu fungieren, um die Biologie und Therapie von Tumoren einfacher analysieren zu können. Ein solches Modell stellt das CEA424-SV40-T-Antigen (CEA424-TAg) Mausmodell dar. Zur Generierung dieses Modells wurde das SV40-*large*-T-Antigen (SV40-TAg) transgen unter die Kontrolle eines CEA (*carcinoembryonic antigen*) Minimalpromotors gebracht (Thompson et al., 2000). Das membrangebundene Protein CEA ist ein weit verbreiteter Tumormarker für unter anderem fast alle kolorektalen Adenokarzinome, Bronchial-, Brust- und Pankreaskarzinome (Ballesta et al., 1995). CEA wird auf der Oberfläche der Tumorzellen sowie auf normalen Epithelzellen des Kolons, des Dünndarms, der Lunge und des Magens exprimiert (Thompson, 1995).

Simian Virus 40 large T antigen (SV40-TAg) ist ein sehr potentes Onkoprotein, das in verschiedenen Mausmodellen zuverlässig Tumorbildung hervorruft. Dazu inaktiviert SV40-TAg Tumorsuppressoren wie TP53 und Retinoblastomproteine (pRB, p107, p130) in der Zelle. Die Inaktivierung der RB-Proteine führt zum Verlust der Inhibierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Expression von Zellzyklus-aktivierenden Genen. Die Inaktivierung von TP53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, ermöglicht ruhenden Zellen die Umgehung von Apoptose, in dem sie wieder in die S-Phase eintreten (Ahuja et al., 2005). Aufgrund der gewebsspezifischen Expression von CEA in transgenen Mäusen kommt es unter der Kontrolle des CEA-Promotors in den transgenen CEA424-TAg-Mäusen zur Bildung von Tumoren in spezifischen Organen. Darunter konnte eine Mauslinie generiert werden, die ausschließlich und zuverlässig invasive CEA-positive Magenkarzinome entwickeln (Thompson et al., 2000). 100 % der Mäuse dieses Modells entwickeln im Alter von 30 Tagen (d) multifokale Tumore in der Pylorusregion des Magens, die in invasive Magenkarzinome übergehen. Im Alter von ca. 100 d werden diese Mäuse moribund und versterben aufgrund von Unterernährung, die vermutlich durch den Verschluss des Pylorus durch Tumorgewebe in den transgenen Mäusen auftritt (Thompson et al., 2000). Viele transgene Tumormausmodelle unter anderem für Magen, Kolon, Prostata und Lunge wurden so generiert und etabliert (Furth, 1998; Saenz Robles and Pipas, 2009). Überraschenderweise entwickelten die meisten dieser Tumormodelle neuroendokrine Tumoren (Chiaverotti et al., 2008; Czeh et al., 2010; Gum et al., 2004; Reiner et al., 2007; Syder et al., 2004; Ulanet and Hanahan, 2010). Diese Häufigkeit steht weit über der des Vorkommens neuroendokriner Tumore im Menschen (1-3 %) (Vinik et al., 2010). Zuerst wurden die Tumore aufgrund ihrer Expression von EpCAM, eines Markers für Epithelien, und von transgenem CEA, welches auch epithelspezifisch exprimiert wird, als Adenokarzinome klassifiziert (Nockel et al., 2006; Thompson et al., 2000). Diese Klassifikation musste später aufgrund eines großen Anteils neuroendokriner Tumorzellen

sowie dem Fakt, dass sich die Tumore histologisch kaum differenziert darstellen, überdacht werden. Transkriptomanalysen der Tumore zeigten eine im Vergleich zu normalem Magengewebe starke Hochregulierung vieler Gene (u.a. für Chromogranin A und B, Sekretin, Glukagon, Tryptophanhydroxylase), die typisch für neuroendokrine Zellen sind (Ihler et al., 2012). Beachtenswert war bei diesen Analysen die starke Expression des Gens des Transkriptionsfaktors ETV1, einem wichtigen Regulator in der Bildung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (Chi et al., 2010), in Tumoren 90 d alter Mäuse (Ihler et al., 2012). Man geht davon aus, das GIST aus interstitiellen Cajalzellen (ICC) entstehen. ICC sind neuronale Zellen eines komplexen Nervensystems, welches die Kontraktion des Gastrointestinaltrakts steuert und damit die Magen- und Darmmotilität reguliert.

Mittels Elektronenmikroskopie ließen sich in CEA424-TAg-Tumoren sekretorische Granula in den Tumorzellen nachweisen, die typischerweise von neuroendokrinen Zellen gebildet werden und Synaptophysin und Chromogranin A enthalten. Auch immunhistologische Analysen (Chromogranin A und B) bestätigten einen neuroendokrinen Phänotyp von Magentumoren 30 d, 60 d und 90 d alter Mäuse. Der neuroendokrine Phänotyp der CEA424-TAg-Tumoren konnte damit bewiesen werden (Ihler et al., 2012).

1.6.1 Die Frage nach der Ursprungszelle des CEA424-SV40 T-Antigen Mausmodells

Der Tumorzellursprung des CEA424-TAg-Tumormodells konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Aufgrund des neuroendokrinen Phänotyps der Tumoren stellt sich die Frage nach der Relation der Tumorzellen zu den interstitiellen Cajalzellen. Mittels Immunhistochemie konnten bei 19 d alten CEA424-TAg-Mäusen T-Antigen-positive Zellen in der Mukosa der Pylorusregion in direkter Nachbarschaft zu ICC gefunden werden. Diese Zellen waren ebenso spindelförmig wie die ICC. Mit zunehmendem Alter der Mäuse konnte eine Invasion dieser Tumorzellen in lumennähere Schichten der Mukosa des pylorusnahen Duodenums beobachtet werden (Vetter, 2015). Aufgrund der anatomischen Nähe der ICC zu diesen T-Antigen-positiven Tumorzellen sowie der morphologischen Ähnlichkeit der Tumorzellen zu ICC stellt sich die Frage nach der Relation zwischen diesen Zellen. Möglicherweise entstehen beide Zellentitäten aus einer Progenitorzelle. Die ICC könnten auch, wie beim neuroendokrinen GIST (Corless et al., 2011), in diesem Modell potentielle Ursprungszellen darstellen.

Ein weiterer Kandidat bei der Frage nach der Ursprungszelle des CEA424-SV40 T-Antigen-Mausmodells stellt die LGR5-positive Tumorstammzelle dar. Für Adenome des Kolons konnte bereits mittels APC-Suppressorgen-Inaktivierung, begleitet von *lineage tracing*, gezeigt werden, dass die Tumore aus LGR5-positiven Stammzellen (*crypt base columnar*

cells) des Kolons entstehen (Barker et al., 2009). Es konnte auch gezeigt werden, dass Adenome des Kolons zu 5-10 % LGR5-positive Zellen enthalten, die aus den LGR5-positiven Stammzellen entstanden waren und dass die differenzierten Adenomzellen ebenfalls aus diesen LGR5-positiven Adenomzellen entstanden waren. Diese Beobachtung passt zur Tumorstammzellhypothese und beweist in diesem Modell, dass alle differenzierten Tumorzellen aus wenigen LGR5-positiven Tumorstammzellen entstehen. LGR5 stellt somit einen geeigneten Marker für Tumorstammzellen in Adenomen des Kolons dar (Schepers et al., 2012). Die Pylorusregion des Magens, in dem die neuroendokrinen Tumore des CEA424-TAg-Mausmodells entstehen, weist ebenso wie das Kolon LGR5-positive Stammzellen auf. In Vorarbeiten von Elena Vetter (Labor für Tumorummunologie, LIFE-Zentrum, Klinikum der Universität, LMU München) konnten in Tumoren des Pylorus *Lgr5*-EGFP-IRES-CreER^{T2} x *CEA424*-TAg doppeltransgener Mäuse keine LGR5-positiven Tumorstellen nachgewiesen werden (Vetter et al., 2015). *Lgr5*-EGFP-IRES-CreER^{T2}-Mäuse enthalten ein *Lgr5*-knock-in-Allel, das erlaubt, LGR5-positive Stammzellen durch Nachweis des verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein* [EGFP]) sichtbar zu machen (Barker et al., 2007). Dieses Experiment schließt aus, dass LGR5-positive Pylorusstammzellen Zielzellen für die Transformation durch TAg darstellen und dabei ihre Eigenschaft, LGR5 zu produzieren, nicht verlieren. Um auszuschließen, dass die Transformation von LGR5-positiven Stammzellen mit einem Verlust der *Lgr5*-Expression einhergeht, wurde in jungen dreifachtransgenen *Lgr5*-EGFP-IRES-CreER^{T2} x *CEA424*-TAg x *ROSA*-tdRFP-Mäusen durch Tamoxifeninjektion Rekombination am *ROSA*-Lokus ausgelöst, die zu einer irreversiblen Aktivierung eines rot fluoreszierenden Protein-Gens (*RFP*) führte. Falls TAg die LGR5-positive Stammzelle transformiert und die Tamoxifengabe zu einem Zeitpunkt erfolgt, an dem *Lgr5* in der transformierten Zelle aktiv ist, sollte die *Lgr5*-exprimierende Ursprungszelle und alle von ihr abstammenden Tochterzellen im Tumor selbst bei fehlender kontinuierlicher *Lgr5*-Expression durch ihre rote Fluoreszenz zu sehen sein. Dies war nicht der Fall; es wurden keine rot fluoreszierenden Tumorstellen gesehen (Vetter et al., 2015). Die Frage nach den Ursprungszellen dieses neuroendokrinen Karzinommodells ist daher nach wie vor unbeantwortet.

Um die Möglichkeit zu haben, dieses Modell genauer untersuchen zu können, wurden Zelllinien aus den spontan gebildeten Tumoren der *CEA424*-SV40-TAg transgenen Mäuse etabliert. Dazu gehören die Zelllinien mGC3, mGC5 sowie mGC8, die in der Lage sind, Tumoren sowohl in syngenem C57BL/6- als auch in transgenen *CEA424*-SV40-TAg-Mäusen zu initiieren (Nockel et al., 2006). Die Zelllinien sowie die Primärtumoren des transgenen Mausmodells zeigen viele Charakteristika neuroendokriner Karzinome des Menschen und bilden so ein geeignetes System zur Analyse dieser Tumorentität sowie der Ursprungszellen dieses Tumors (Ihler et al., 2012).

1.7 CSC als Target in der Tumorthherapie

Aufgrund der erhöhten Resistenz der CSC gegenüber Chemotherapie sowie Bestrahlung, die diese speziellen Zelleigenschaften bereits von Beginn der Exposition mit Chemotherapeutika besitzen (primäre Resistenzen) (vgl. Abbildung 6), kommt es unter diesen Therapien häufig zur Anreicherung von CSC. Durch langfristige Exposition der CSC gegenüber Chemotherapeutika können durch Reaktionen der CSC außerdem neue Resistenzen (sekundäre Resistenzen) entstehen. Es kann zur Selektion von resistenteren genetischen Tumorzellvarianten kommen. Beweise für eine Anreicherung von CSC unter Chemo- und Strahlentherapie gibt es unter anderem in Tumoren des Gehirns sowie der Brust (Blazek et al., 2007; Eyer and Rich, 2008; Woodward et al., 2007).

Die Anreicherung von CSC kann die Ursache dafür sein, dass herkömmliche Tumorthérapeutika primär ansprechen und differenzierte Tumorzellen abtöten, dann allerdings langfristig aufgrund der Resistenz der CSC erfolglos bleiben. Aktuell sind CSC-spezifische Wirkstoffe in der Entwicklung, die sowohl primäre als auch sekundäre Resistenzen der CSC umgehen können. Eine Reihe von Patientenstudien zur Untersuchung der Verträglichkeit und Wirksamkeit von auf die Elimination von CSC gerichteten Therapien werden zurzeit durchgeführt (ClinicalTrials.gov).

Derartige Therapiemöglichkeiten bieten großes Potential, ein Wiederauftreten eines Tumors nach vorangegangener Therapie sowie weitere Metastasierungen zu verhindern. Zum Beispiel konnten Sung *et al.* eine Anreicherung von CSC in Pankreastumoren nach Therapie mit Gemcitabin beobachten. Diese Resistenz gegenüber Gemcitabin konnte mit CD44- oder ABC-Transporter-Inhibitoren überwunden werden (Hong et al., 2009). Ein anderes Beispiel wurde von Wang *et al.* berichtet, die gezielt CD133-positive Glioblastomstammzellen eliminieren konnten. Dies gelang durch Hyperthermiebehandlung von CD133-positiven Zellen. Mit Hilfe von CD133-Antikörpern konnten vorher die Zellen, die durch einen Infrarotlaser zerstört werden sollten, gezielt bestimmt werden. Diese Technik brachte große Fortschritte in der Therapie des Glioblastoms (Wang et al., 2011).

Ein weiterer Ansatzpunkt, CSC zu eliminieren, ist die Hemmung von CSC-Signalwegen, die wichtig für ihr Überleben sind. Dazu gehören Wnt-, Notch- sowie Hedgehog-Signalwege. Des Weiteren können CSC gegenüber Chemotherapeutika sensibilisiert werden, indem Entgiftungsenzyme wie Aldehyddehydrogenasen oder Membrantransporter wie ABCG2 gezielt blockiert werden (Lou and Dean, 2007). Bei allen Ansätzen gilt es zu beachten, dass die jeweiligen Angriffspunkte nicht immer ausschließlich in CSC, sondern auch in normalen Stammzellen existieren und die genannten Signalwege häufig auch in normalen Stammzellen aktiv sind. Um unerwünschte Wirkungen auf die Proliferation normaler

Stammzellen zu verhindern, müssen CSC gut definiert, isoliert und von den normalen Stammzellen abgegrenzt werden können. Die Elimination dieser resistenten Subpopulation verspricht einen großen Fortschritt in der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die neuroendokrinen Karzinome im Pylorusbereich des transgenen CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodells zu phänotypisieren, potentielle Ursprungszellen dieses Karzinoms zu identifizieren sowie diese zu charakterisieren. Des Weiteren sollten potentielle Tumorstammzellen identifiziert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Charakterisierung potentieller CSC-Populationen stellt die Kenntnis von Markern für CSC dar. Ihre Identifikation ist unabdingbar, um mit zielgerichteter Therapie CSC eradizieren zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten CSC-Kandidatenmarker identifiziert und Marker-positive Subpopulationen von Tumorzellen auf Stammzeleigenschaften hin untersucht werden.

Da in Vorarbeiten keine *Lgr5*-exprimierenden Zellen als mögliche Abkömmlinge von normalen Pylorusstammzellen in den Tumoren nachgewiesen werden konnten, bleibt die Frage nach den Ursprungszellen dieses neuroendokrinen Karzinommodells unbeantwortet.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob es durch Expression von SV40-T-Antigen zu einer Herunterregulierung der Expression des Wnt-Zielgenes *Lgr5* bzw. des Wnt-Signalweges im Tumor kommt. Außerdem sollten die SV40-T-Antigen-positiven Zellen innerhalb der Mukosa der Pylorusregion, die eine zweite, räumlich von den in der Magenmukosa gefundenen SV40-T-Antigen exprimierenden Zellen abgrenzbare Zellpopulation darstellen, genauer untersucht werden, um Aussagen über einen potentiellen Ursprung dieser Zellen aus Vorläuferzellen von interstitiellen Cajalzellen oder anderen Zelltypen in diesem Magenbereich treffen zu können.

Langfristig erhoffen wir uns von der Kenntnis der Ursprungszelle des neuroendokrinen Magenkarzinoms sowie der Charakterisierung von häufig therapieresistenten Tumorstammzellen die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe und damit Erfolge in dessen Therapie.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Geräte	Firma
Analysewaage MC1	Sartorius AG, Göttingen
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
Elektrophoresekammer, horizontal	Gibco BRL, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35	Zeiss, München
Fluorometer FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Fotokamera Nikon Eclipse E800 Digital Sight DS-5M-L1	Nikon, Düsseldorf
Geldokumentationssystem Fluor-S Multimager™	Bio-Rad, München
Heizblock-Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubationsschrank	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Kryotom LEICA CM 350	Leica Microsystems
Laborkühlschrank UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Light Cycler Centrifuge Adapters™ und Kühlblock	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Light Cycler®	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminometer	Microlumat Plus LB96V; Berthold, Bad Wildenbach, Germany
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Mikroskop Leica TCS SP5 DMI 6000 CS	Leica, Heidelberg
Mikroskop Olympus CH	Olympus, Hamburg
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Pipettierassistent Pipetboy accu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Präzisionswaage BP2100	Sartorius AG, Göttingen
Rasierapparat	Wella AG, Darmstadt
S.O.C.-Medium	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Schublehre (ABSOLUTE Digimatic Solar Caliper)	Mitutoyo Deutschland, Neuss
Schüttler CERTOMAT® H	B. Braun Biotech International, Melsungen
Spektrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Wilmington/USA
Sterilbank HERA safe HS12	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau

Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim. Sulzbach
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., Watertown, USA
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad Julabo 19	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer Neubauer	Optik Labor, Friedrichsdorf
Zellsortierer MoFlo™ Legacy	Beckman Coulter, Miami, Florida, USA
Zentrifuge DNA Speed Vac DNA110	Savant Instruments, New York
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Zentrifuge MIKRO 20	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Shandon Cytospin 2	Thermo, Langenselbold
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Gläser, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Einfrierröhrchen CryotubeVials	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Einmalhandschuhe Sempercare	Semperit Technische Produkte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich
Einmalkanülen 23G, 24G, 25G	BD Biosciences,
Einmalspritzen, 1 ml (Omnifix-F)	Braun Melsungen AG, Melsungen
FACS-Röhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kryoeinbettformen (Cryomolds Biopsy)	Miles Inc. Elkhast, IN, USA
Kulturplatten Nunclon Surface	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Objektträger Superfrost Ultra Plus®	Menzel-Gläser, VWR International GmbH, Ismaning
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml; Lid _{Bac})	Eppendorf AG, Hamburg
Skalpelle	PFM – Produkte für die Medizin, Köln
Sterile Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen BD Falcon™	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (6-well, 96-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Chemikalien	Firma
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose (Electrophoresis Grade)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD, Heidelberg
3 Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antarctic Phosphatase (5 U/μl)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Aqua dest (Chomasolv)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquatex®	Merck, Darmstadt
BSA (Bovines Serumalbumin, Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VECTASHIELD® Mounting Media	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
DNA-Größenmarker 100-bp-Leiter (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)	Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte
DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	NEB, Frankfurt am Main
dNTPs	Fermentas, Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Epirubicin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Ethylaminocarbazol	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
FACS flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FCS	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FGF, murin rekombinant	PeproTech, Hamburg
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Formalin 4 %, neutral, gepuffert mit PBS	Apotheke Innenstadt
FuGENE® HD	Promega, Mannheim
Glyzerin	VWR International, Darmstadt
HEPES, 1 M	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Imatinib	LC Laboratories, Woburn, USA
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt
LB-Trockenpulver	Sigma-Aldrich , Taufkirchen

Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Matrigel (Basement Matrix High Concentration, LDEV-free)	Corning, BD, Heidelberg
Mayers Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Gibco BRL, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (10 mM)	Fermentas, Thermo Scientific, VWR International - Germany GmbH, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Pyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
PBS, 10x	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin/Glutamin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Innenstadt, München
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Restriktionsenzyme (<i>Pst</i> I, FastDigest® <i>Bam</i> HI)	Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI 1640, Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Select Agar	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Soft Agar	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
<i>Taq</i> -Polymerase	Fermentas, Thermo Scientific, VWR International - Germany GmbH, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Thermo Scientific, VWR International - Germany GmbH, Darmstadt
TAE-Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, VWR International GmbH, Darmstadt
ToPro3	Life Technologies, Karlsruhe
TransFast™	Promega, Mannheim
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30 % (w/v)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD117 (c-Kit)	Ratte anti-Maus	3C11	IgG2b	APC	Miltenyi Biotech
CD117 (c-Kit)	Ziege anti-Maus	Keine Angabe	IgG	-	Santa Cruz
CD166 (ALCAM)	Ratte anti-Maus	eBioALC48	IgG2a, κ	Phycoerythrin (PE)	eBioscience
CD184 (CXCR4)	Ratte anti-Maus	2B11	IgG2b, κ	PE	eBioscience
CD184 (CXCR4)	Maus anti-Mensch	12G5	IgG2a, κ	PE	BD Pharmingen
CD326 (EpCAM)	Ratte anti-Maus	G8.8	IgG2a, κ	-	BD Pharmingen
Ki-67	Ratte anti-Maus	TEC-3	IgG2a	-	Dako
PDGFRA	Ratte anti-Maus	APA5	IgG2a, κ	-	eBioscience
SV40-T-Antigen	Kaninchen anti-Maus	-	IgG	-	Santa Cruz

2.4.2 Sekundärantikörper und Isotypkontrollen

Antigen	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
IgG	Huhn anti-Kaninchen	IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	Life Technologies
IgG	Esel anti-Ziege	IgG (H+L)	Alexa Fluor 594	Life Technologies
IgG	Ziege anti-Ratte	IgG (H+L)	Alexa Fluor 555	Life Technologies
IgG	Ratte	IgG1, κ	biotinyliert	BD Pharmingen
IgG	Maus	IgG ₁ , κ	-	BD Pharmingen
IgG	Maus	IgG ₁ , κ	PE	BD Pharmingen
IgG	Ziege anti-Ratte	polyklonal	Cy2	Jackson ImmunoResearch

2.5 Vektoren und Reporterplasmide

Vektor	Hersteller
pZIPtex-SV40-T-Antigen	Wolfgang Deppert (Jat et al., 1986)
pCMV-SPORT6-CXCR4 (murin)	Source Bioscience
CXCR4 (human)	Mira Kronast
pCMV-SPORT6-Kit (murin)	Source Bioscience
pCMV-SPORT6-delta-X-E	Mira Kronast, diese Arbeit

pSuper-8xFOPFlash	Randy Moon University of Washington, HHMI
pSuper-8xTOPFlash	Randy Moon University of Washington, HHMI
Pcl-neo- β -catenin D45	Bert Vogelstein, USA
phRL-tk-TBEmut	Andreas Jung, Pathologisches Institut, LMU, München
pcDNA3.1(+)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
pcDNA3.1(+)-SV40-T-Antigen	Mira Kronast, diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-SV40-T-Antigen rev.	Mira Kronast, diese Arbeit

2.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
1247-f	GGGATGTACTTGGAAATTCAG
1538-r	TGGGCAACAAACAGTGTAGC
424-	TAATGGACCTTCTAGGTCTTGA
424+	AATTCTGAAGGAAAGTCCTTGG
pcDNA rev.	GGATCCAGACATGATAA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

2.7 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Herkunft
HEK293	Fetale Niere (Mensch); Transformation mit Adenovirus-5-Genomfragment	E. Nössner, Helmholtz-Zentrum, München
HEK293T	Fetale Niere (Mensch); Transformation mit Adenovirus-5-Genomfragment und SV40-T-Antigen-Gen	LTI, LIFE-Zentrum, LMU, München
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom (Mensch)	LTI, LIFE-Zentrum, LMU, München
mGC3	Neuroendokrines Magenkarzinom (Maus)	LTI, LIFE-Zentrum, LMU, München (Nockel et al., 2006)
mGC5	Neuroendokrines Magenkarzinom (Maus)	LTI, LIFE-Zentrum, LMU, München (Nockel et al., 2006)
mGC8	Neuroendokrines Magenkarzinom (Maus)	LTI, LIFE-Zentrum, LMU, München (Nockel et al., 2006)

2.8 Bakterienstämme

XL1-Blue Competent cells	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
--------------------------	------------------------------------

2.9 Kits

Kit	Hersteller
ALDEFLUOR Assay	STEMCELL Technologies SARL, Köln
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
DNA Purification	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
ImmPRESS™	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Impress Reagent Anti-Rat Ig Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, USA
MycoAlert Assay Control Set	Lonza
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.10 Mausstämme

C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
CEA424-SV40-T-Antigen C57BL/6	LTl, LIFE-Zentrum, LMU, München (Thompson et al., 2000)

2.11 Software und Internet

Ensembl	http://www.ensembl.org
Network Protein Sequence Analysis (NPS@)	Pôle BioInformatique Lyonnais
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/
TierBase	Walter-Brendel-Zentrum, LMU, München
Vector NTI™	Invitrogen, Karlsruhe
FlowJo	Tree Star, San Carlos, USA
GraphPadPrism	La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Auftauen, Kultivieren und Einfrieren der Zellen

Auftauen

Die bei -196 °C in Kryoröhrchen konservierten Zellen wurden zum Auftauen bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Nach Verflüssigung wurde der Inhalt der Kryoröhrchen zügig in 15 ml auf Raumtemperatur erwärmtes Zellkulturmedium überführt und zur Entfernung von überschüssigem Einfriermedium 5 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das verbleibende Zellsediment in frischem Kulturmedium resuspendiert, die Zellen gezählt und diese anschließend je nach Zellzahl in 25-cm^2 -, 75-cm^2 - oder 175-cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium zum Entfernen toter Zellen erneuert.

Kultivierung

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Zellkulturmedium bei 37 °C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen oder Kulturplatten in einem Inkubator. Als Standardkulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und je 1% Na-Pyruvat, nichtessenziellen Aminosäuren (MEM NEAA) und Penicillin-Streptomycin-Glutamin verwendet. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz über 90% wurden die Zellen passagiert oder zu Versuchen eingesetzt. Bei Kultivierung der Zellen in *96-well*-Platten erfolgte die Temperierung auf einem Gestell in rostfreien Edelstahl-Boxen mit wasserbedecktem Boden im Inkubator, um Randeffekte durch übermäßiges Verdunsten von Wasser des Kulturmediums zu vermeiden.

Einfrieren

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mittels Trypsinierung von der Kulturoberfläche gelöst und quantifiziert (vgl. 3.1.2 und 3.1.3). Anschließend wurden bis zu 5×10^6 Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), 20% FCS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. DMSO verhindert die Bildung großer Eiskristalle während des Einfrierprozesses und somit die Zerstörung der Zellen. Die Zellen wurden zunächst für 12-24 h bei -80 °C eingefroren. Die Kryokonservierung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C .

3.1.2 Passagieren von Zellen

Prinzip

Zur Überführung von adhärennten Zellen in neue Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten müssen diese von der Kunststoffoberfläche gelöst werden. Die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung führt zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche. Dies geschieht durch proteolytische Spaltung von Proteinen, die Adhäsion vermitteln, sowie durch die Komplexbildung von Ca^{2+} -Ionen, die für die Interaktion von Cadherinen verantwortlich sind.

Durchführung

Nach Absaugen des alten Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Serumbestandteile (z.B. Proteaseinhibitoren) zu entfernen. Die Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Untergrund gelöst. Nach 5 min wurde die Trypsin/EDTA-Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium und den darin enthaltenen Proteaseinhibitoren gestoppt. Zur Entfernung von Trypsinrückständen wurden die Zellen bei 400 x g (1500 rpm) für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in neuen Kulturflaschen ausgesät. Die semiadhärennten HEK293/HEK293T-Zellen konnten allein durch Spülen mit PBS abgelöst und direkt neu ausgesät werden.

3.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Trypanblau ermöglicht die Differenzierung zwischen vitalen und nicht vitalen Zellen, indem die Zellen mit defekter Plasmamembran angefärbt werden. Die Bestimmung der genauen Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu gibt man 0,4 % Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 zur Zellsuspension dazu. Nach Auftragen auf die Zählkammer und Auszählen der Zellen in den 4 Großquadranten kann die Zellzahl folgendermaßen errechnet werden:

$$\text{Zellen/ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Quadrant} \times 2 \times 10^4 \text{ (ml}^{-1}\text{)}$$

Die Vitalität der Zellen berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellvitalität [\%]} = [\text{vitale Zellen (ungefärbt)} \div \text{Zellen (gefärbt und ungefärbt)}] \times 100$$

3.1.4 Herstellung von Zytospins

Für die Herstellung von Zytospins wurden die Zellen abtrypsiniert, in PBS resuspendiert und gezählt. Es wurden 4×10^4 Zellen in 100 μl PBS pro Objektträger vorbereitet. Die Zellsuspension wurde auf 12 Objektträger in der Shandonzentrifuge geschleudert. Nach dem Schleudervorgang wurden die fertigen Zytospins für 2-4 h bei Raumtemperatur getrocknet und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Transiente Transfektion von Zellen

Prinzip

Unter transienter Transfektion versteht man die temporäre Aufnahme von (zirkulärer) Fremd-DNA durch eukaryotische Zellen. In der Regel ist die zu transfizierende DNA in ein Vektorsystem eingebaut, das ein bakteriell exprimierbares Antibiotikum-Resistenzgen als Selektionsmarker sowie eukaryotische Promotor- und Polyadenylierungssignalsequenzen und dazwischen mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme für die Aufnahme der zu exprimierenden cDNA enthält. Bei der Methode der Lipofektion wird die negativ geladene DNA von einem synthetischen kationischen Lipid umhüllt, das mit der negativ geladenen Zellmembran fusioniert und dabei die DNA ins Innere der Zelle überführt. Durch den starken eukaryotischen Promotor kommt es im Kern der Zelle zur Transkription der kodierenden DNA sowie zur anschließenden RNA-Prozessierung und Translation in Protein. Durch Zellteilung geht die genetische Information bei der transienten Transfektion wieder verloren, da die DNA in der Regel nicht ins Genom aufgenommen wird.

Durchführung

Für die Lipofektion von HEK293-, HEK293T- und HepG2-Zellen wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in 6-*well*-Platten ausgesät und 24 h bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurden 96-*well*-Platten mit entsprechend weniger Zellen und Lösungen verwendet. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurde die eigentliche Transfektion begonnen. Pro Vertiefung wurden 95 µl RPMI, 3 µl FuGENE® HD bzw. TransFast™ und 2 µl (2 µg) DNA gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die 100-µl-Transfektionslösungen mit je 1 ml RPMI aufgefüllt. Das Medium in den Vertiefungen der 6-*well*-Platte wurde vorsichtig abgesaugt und je 1 ml der Transfektionsmischung zugegeben. Abschließend wurden die Zellen 48 h bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Durchflusszytometrie oder Immunzytochemie kontrolliert.

3.1.6 Zellvitalitätsassay

Prinzip

Mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Zellvitalitätsassays lässt sich die metabolische Kapazität von Zellen bestimmen und daraus auf die „Lebendigkeit“ der Zellen schließen. Das Prinzip des Assays basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen, den gering fluoreszierenden blauen Farbstoff Resazurin zu dem stark fluoreszierenden Endprodukt Resorufin (579 nm_{Exzitation}/584 nm_{Emission}) zu reduzieren (Abbildung 12). Nicht lebensfähige Zellen verlieren diese Eigenschaft frühzeitig und produzieren somit kein Fluoreszenzsignal. Das Fluoreszenzsignal kann von einem Fluorometer detektiert werden. Da das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl lebender Zellen ist, kann so ihr Anteil in der Probe bestimmt werden.

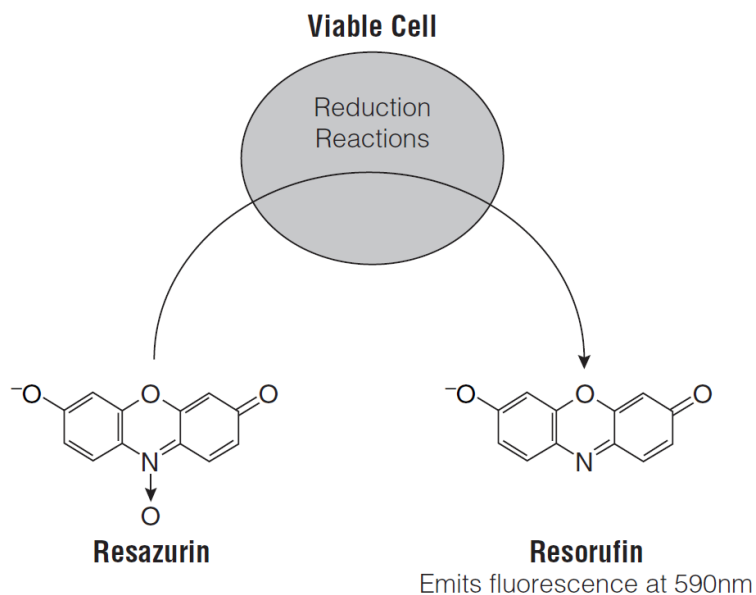


Abbildung 12: Schematische Darstellung der dem CellTiter-Blue®-Zellvitalitätsassay zugrunde liegenden chemischen Reaktion. Das Produkt Resorufin emittiert Licht der Wellenlänge 584 nm nach Anregung durch Licht kürzerer Wellenlänge (www.promege.com).

Durchführung

Um die Lebendigkeit von Zellen mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Assays zu bestimmen, wurden die Zellen in 96-well-Platten in je 100 µl normalem Zellkulturmedium (mit Phenolrot) gehalten. Pro Vertiefung wurden 20 µl CellTiter-Blue®-Reagent direkt zu den Zellen gegeben und 10 s vorsichtig mit dem Medium vermischt. Nach der Inkubation der Platten bei 37 °C unter Zellkulturbedingungen für 1 h wurde die Fluoreszenz bei 560 nm_{Exzitation}/590 nm_{Emission} mit dem Fluorometer FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) ausgelesen. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden Vertiefungen mit ausschließlich Zellkulturmedium gemessen. Jeder Test wurde in mindestens drei Replikaten durchgeführt. Es wurden also jeweils mindestens 3 verschiedene wells pro Probe auf der gleichen Platte ausgewertet. Der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz muss vom Fluoreszenzwert der getesteten Zellen subtrahiert werden. Der so errechnete Fluoreszenzwert (F) ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

3.1.7 Zytotoxizitätsassay

Um die Zytotoxizität von Chemotherapeutika (Imatinib, Epirubicin) auf mGC-Zellen zu bestimmen, wurden 6.000 mGC3- bzw. mGC8-Zellen pro Vertiefung in 96-well-Platten ausgesät und 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Das Medium der nun angehefteten Zellen wurde entweder mit frischem Medium oder mit Medium, das verschiedene Chemotherapeutikakonzentrationen enthielt, ausgetauscht. Jeder Test wurde dreifach angesetzt und 72 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde wie unter 3.1.6 beschrieben mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Assays die Vitalität der

Zellen nach Chemotherapeutikaeinwirkung bestimmt. Die Lebendigkeit der Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellvitalität [\%]} = 100 \times \left[\frac{F_{\text{behandelte Zellen}}}{F_{\text{unbehandelte Kontrollzellen}}} \right]$$

Graphisch wurde die Vitalität der Zellen gegen die Konzentration des Chemotherapeutikums aufgetragen. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) ist definiert als die Konzentration eines Chemotherapeutikums, das für eine 50%ige Reduktion der Vitalität der Zellen benötigt wird. Dieser Wert konnte auf dem Graphen abgelesen werden.

3.1.8 Anreicherung resistenter Subpopulationen

Zur Anreicherung von therapieresistenten Subpopulationen wurden jeweils 2×10^6 mGC3- und mGC8-Zellen in 10 ml Zellkulturmedium in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch mit Chemotherapeutikum (Imatinib, Epirubicin) versetztes Medium ersetzt. Es wurde jeweils die für die Zelllinie und das Therapeutikum im Zytotoxizitätsassay ermittelte IC_{50} verwendet (vgl. 3.1.7). Das Medium wurde nach 72 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen abgesaugt und die Zellen zur Entfernung von Resten des Therapeutikums zweimal mit PBS gewaschen. Bei Langzeitexperimenten mit bis zu 14-tägiger Inkubation der Zellen mit Imatinib wurde das Medium inkl. Imatinib ebenfalls alle 72 h gewechselt. Anschließend wurden die Zellen nach Färbung mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw. nach der Durchführung des ALDEFLUOR™-Assays (STEMCELL Technologies) im Durchflusszytometer auf die Expression der Marker hin analysiert (vgl. 3.3.1).

3.1.9 Colony formation assay

Prinzip

Der *colony formation assay* dient der Messung des proliferativen Potentials von Tumorzellen. Es wird angenommen, dass nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen die Kapazität zur homogenen und heterogenen Proliferation, also zur Ausbildung nicht differenzierter sowie differenzierterer Tumorzellen und zur Bildung von morphologisch differenzierten Kolonieförmungen besitzt (Harper et al., 2007). Sogenannte *holoclones*, streng abgegrenzte kompakte Kolonien, sollten danach nur von den als Tumorstammzellen bezeichneten Zellen gebildet werden. Anhand dieser Methode kann unter anderem der Anteil an Tumorstammzellen in verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt werden.

Durchführung

Zur Überprüfung der Koloniebildungskapazität der Tumorzellen wurden mGC3- und mGC8-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen (16-2.000 Zellen pro Vertiefung) in 100 µl

Standardmedium in 96-well-Platten ausgesät. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Unter dem Lichtmikroskop wurde alle drei Tage die Bildung der verschiedenen Kolonieförmigkeiten beobachtet und dokumentiert. Nach 22 Tagen wurde der Versuch beendet, die Kolonien fotografiert und ausgezählt und die prozentuale Verteilung der Kolonieförmigkeiten berechnet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Restriktionsendonukleasenverdau

Prinzip

Der Restriktionsendonukleasenverdau beruht auf einer sequenzspezifischen Spaltung von doppelsträngiger DNA durch bakterielle Restriktionsendonukleasen (REN). Typ-II-REN binden spezifisch an palindromische Sequenzen und schneiden innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des Palindroms. Der Schnitt kann entweder gerade (*blunt ends*) oder versetzt sein (*sticky ends*).

Durchführung

Der Restriktionsendonukleasenverdau wurde für folgende Zwecke eingesetzt:

- Zum Herausschneiden des DNA-Inserts SV40-TAg aus dem Plasmid pZIPtex-SV40-T-Antigen mittels *Fast Digest BamHI* (Fermentas)
- Zum Öffnen des Vektors pcDNA3.1 (+) für die spätere Ligation mit dem DNA-Insert SV40-TAg ebenfalls mittels *Fast Digest BamHI*
- Zur Analyse der Orientierung des DNA-Inserts im klonierten pcDNA3.1(+)-SV40-TAg-Expressionsplasmid über *PstI* (Fermentas)
- Zum Herausschneiden des murinen cDNA-Inserts Kit aus dem Reporterplasmid pCMV-SPORT6-Kit mittels *XhoI und EcoRI* (Fermentas)

Der Verdau der Reporterplasmide wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für eine Stunde in einem Thermoblock. *BamHI* wurde nach der Reaktion durch Erhitzen auf 80 °C für 10 min inaktiviert.

3.2.2 DNA-Dephosphorylierung

Prinzip

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten dient der Inhibierung von Ligrationsreaktionen. Sie wird angewendet, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation korrespondierender Vektorenden geschnittener Plasmide zu minimieren. Die

Phosphatasen zur Durchführung dieser Reaktion besitzen die Fähigkeit zur Abspaltung 5'-terminaler Phosphatgruppen.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde die inaktivierbare *Antarctic Phosphatase* von New England BioLabs (NEB) in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

Komponenten	Volumen
Vektor (REN-Verdauansatz)	30 µl
Antarctic Phosphatase Reaction Buffer, 10x	4 µl
Antarctic Phosphatase (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	5 µl

Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65 °C für 5 min inaktiviert.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Prinzip

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe zu trennen und ihre Größe anhand eines Vergleichs mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Dazu wird die DNA in ein Agarosegel aufgetragen, an das ein elektrisches Feld angelegt wird. Das elektrische Feld führt zur Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelmatrix in Richtung der Anode. Die Flusseigenschaften werden wesentlich von der Molekülgröße bestimmt. Kleine Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel, was zu einer Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe führt. Der Einsatz einer DNA-Leiter, einem Gemisch größenbekannter doppelsträngiger Nukleinsäureketten, ermöglicht eine Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente. Die Zugabe von DNA-interkalierendem Ethidiumbromid in das Gel ermöglicht die Visualisierung der Nukleinsäurebanden. Die Fluoreszenzemission des Ethidiumbromids unter UV-Licht (302 nm) erlaubt die Analyse der Größen der DNA-Fragmente sowie das Herausschneiden von Fragmenten aus dem Gel.

Durchführung

Die Agarose (1-2 %) wurde durch Erhitzen in Elektrophoresepuffer (1x TAE) gelöst und nach Abkühlung unter ca. 60 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Die Gelpolymerisation fand in horizontalen Gelkammern statt. Die zu trennenden bzw. zu analysierenden DNA-Fragmente wurden mit Bromphenolblau-haltigem Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen aufgetragen. Parallel dazu wurde eine jeweils passende DNA-Leiter als Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 100 V für 1-2 h in

1x TAE mit 0,1 µg/ml EtBr als Laufpuffer statt. Nach Separation konnten die DNA-Fragmente mittels UV-Licht visualisiert, fotografiert und aus dem Gel mit Hilfe eines sterilen Skalpell herausgeschnitten werden.

3.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten

Die Extraktion der DNA aus den Gelstücken erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

3.2.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Prinzip

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt photometrisch durch Ausnutzung des Absorptionsverhaltens der Desoxyribonukleosid-Monophosphate, deren Maximum im Mittel bei 260 nm liegt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz korreliert die Konzentration linear mit der Absorption (Optische Dichte [OD]) bei einer Wellenlänge von 260 nm:

$$C_{\text{Nukleinsäure}} [\mu\text{g/ml}] = \text{Absorptionskoeffizient}_{\text{Nukleinsäure}} \cdot OD_{260}$$

Für doppelsträngige DNA ist der Absorptionskoeffizient 50. Die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm. Da die proteintypische Absorption ein Maximum bei 280 nm aufweist, kann bei einem Quotienten $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ von nicht bis nur minimal verunreinigten DNA-Proben ausgegangen werden.

Durchführung

Die Konzentration und Reinheit der DNA-Proben wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington/USA) direkt bestimmt.

3.2.6 Herstellung von *Blunt-end*-DNA mit der Klenow-Polymerase

Prinzip

Um einen Vektor mit nicht übereinstimmenden *sticky ends* ligieren zu können, müssen die Enden vorher zu *blunt ends* aufgefüllt werden. Durch die Klenow-Polymerase können überhängende 3'-Enden abgebaut sowie überhängende 5'-Enden durch Verlängerung des 3'-Endes des Gegenstrangs „geglättet“ werden. Die dadurch entstehenden *blunt ends* können in der späteren Ligasereaktion miteinander verknüpft werden.

Durchführung

Die DNA wurde in 1x NEBuffer gelöst. Pro μg DNA wurde 1 U Klenow-Polymerase dem Reaktionsansatz hinzugefügt und 15 min bei 25 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Polymerase wurden 10 mM EDTA dazugegeben und 20 min bei 75 °C inkubiert.

3.2.7 Ligation

Prinzip

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente mittels eines Enzyms, der Ligase. Korrespondierende komplementäre Schnittenden (*sticky ends*) werden miteinander verknüpft. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäurefragmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Es können auch stumpfe Enden (*blunt ends*) miteinander verknüpft werden.

Durchführung

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wurde das SV40-TAg-Insert in den linearen Vektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das molare Verhältnis des Vektors zu dem zu integrierenden DNA-Insert war 1:3. Die Ligationsreaktion wurde folgendermaßen angesetzt:

Komponenten (Konzentration Stammlösung)	Volumen
Lineare Vektor-DNA (50 ng)	1-fach molares Äquivalent
DNA Fragment	3-fach molares Äquivalent
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 μl
T4-DNA-Ligase (5 U/ μl)	0,5 μl
Volumen pro Ansatz (H ₂ O-Zugabe ad)	20 μl

Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 22 °C.

3.2.8 Transformation kompetenter Bakterien

Prinzip

Unter einer Transformation versteht man die Übertragung von freier DNA (Plasmid) in kompetente Bakterien. Durch einen kurzen Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C entstehen Poren in der Membran, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann. Diese Plasmid-DNA wird anschließend von den Bakterien repliziert. Ein integriertes Antibiotika-Resistenzgen ermöglicht die Selektion plasmidtragender Bakterien auf Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten.

Durchführung

Die Transformation wurde mit Hilfe kompetenter *Escherichia-coli*-Bakterien (*E. coli*) durchgeführt. Zu 20 µl Bakterien wurden 2 µl aus dem Ligationsprodukt gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock bei 42 °C für exakt 45 sec im Wasserbad durchgeführt und der Ansatz erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 125 µl S.O.C.-Medium zum Ansatz dazugegeben und dieser für eine Stunde bei 37 °C und 650 U/min im Thermomixer inkubiert. Der Ansatz wurde auf Agarplatten (LB-Medium, 1,5 % Select Agar, 1 µl/ml Ampicillin) ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C zur Expansion der Bakterienkolonien im Brutschrank inkubiert.

3.2.9 Anzucht und Stammhaltung von *E.-coli*-Transformanten

Prinzip

Zur Vermehrung und Asservierung rekombinanter Plasmide dienen Prokaryoten wie *E. coli*. Der verwendete *E.-coli*-Stamm zeichnet sich durch seine hohe Aufnahmekapazität für Plasmide sowie durch seine hohe Proliferationsrate aus.

Durchführung

Zur kurzfristigen Asservierung plasmidtragender Bakterienkolonien dienen die mit Antibiotika versehenen Agarplatten (vgl. 3.2.8). Diese konnten bei 4 °C bis zu 6 Wochen aufbewahrt werden. Zur Vermehrung einzelner Bakterienkolonien zur Analyse der Plasmide wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen und in Eppendorf-Gefäße mit luftdurchlässigem Membrandeckel und je 2 ml LB-Ampicillin-Selektionsmedium (LB-Medium, 1,5 % Select Agar, 0,1 % Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml 70 % Ethanol) überführt. Die Bakterien wurden für ca. 18 h bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Zur langfristigen Asservierung plasmidtragender Bakterienkulturen wurden 470 µl einer LB-Medium-Kultur mit 100 µl Glycerin (87 %) vermischt und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde die übrige LB-Medium-Kultur entweder zur analytischen Isolierung der Plasmide verwendet (Miniprep) oder zur Anzucht einer LB-Medium-Kultur zur präparativen Plasmidisolierung (Maxiprep) in 200 ml LB-Ampicillin-Selektionsmedium überführt und 12 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

3.2.10 Kolonie-PCR

Prinzip

Mit Hilfe der Kolonie-PCR kann der Erfolg einer Ligation überprüft werden. Einzelkolonien der transformierten Bakterien dienen als DNA-Matrize. Die Kolonien können so auf die Präsenz des Plasmids mit dem korrekten Insert hin überprüft werden. Wie die

Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auch die Kolonie-PCR auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, ausgehend von einem Matrizenstrang die Synthese komplementärer DNA-Stränge in 5'→3'-Richtung zu katalysieren. Dazu werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und ein entsprechendes Primerpaar benötigt, welches das nachzuweisende DNA-Fragment umrahmt. Der Reaktionszyklus besteht aus der Auftrennung der Doppelstrangstruktur der DNA bei 95 °C (Denaturierung), spezifischer Anlagerung der Primer (*annealing*) an die entstehenden Einzelstränge sowie der Synthese der korrespondierenden DNA-Stränge unter Einbau der dNTPs (Elongation). Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt und endet mit einem finalen Elongationsschritt.

Durchführung

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil jeder zu analysierenden Bakterienkolonie entnommen und in den jeweiligen PCR-Ansatz überführt. Die Kolonie-PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Tabelle 2: Zusammensetzung des Ansatzes der Kolonie-PCR

Komponenten (Stoffmengenkonzentration Stammlösung)	Volumen
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
Primer f (10 µM)	1 µl
Primer r (10 µM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,13 µl
DNA/Bakterienkolonie	1 µl
Volumen pro Ansatz (H ₂ O-Zugabe ad)	25 µl

Tabelle 3: Schritte der Kolonie-PCR

Versuchsschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
30 Zyklen	Denaturierung	94 °C
	Primeranlagerung	60 °C
	Elongation	72 °C
Finale Elongation	72 °C	10 min

Zum visuellen Nachweis der amplifizierten DNA-Stränge diente eine DNA-Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.2.3).

3.2.11 Präparation kleiner (Miniprep) und großer Plasmidmengen (Maxiprep)

Prinzip

Zur Gewinnung der amplifizierten Plasmide aus transformierten *E. coli* können diese durch Zentrifugation geerntet und in alkalischem Milieu lysiert werden. Anschließend können die Plasmide mit Hilfe von DNA-bindenden Silikamembranen von anderen Zellbestandteilen gereinigt werden.

Durchführung

Zur Präparation kleiner Plasmidmengen wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Große Plasmidmengen wurden mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Die Isolierung der Plasmide wurde in beiden Fällen gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde nach der „Cycle-Sequenzierungsmethode“ (Sanger et al., 1977) von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 µg DNA in einem Eppendorfgemäß eingesendet. Zur Überprüfung der Korrektheit der Sequenz wurde die *Network Protein Sequence Analysis* (NPS@) des Pôle BioInformatique Lyonnais verwendet. Sequenzen für den Vergleich wurden der NCBI-Sequenzdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie (FACS) und Immunfluoreszenz

Prinzip

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* [FACS]) erlaubt die Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Lichtstreuungseigenschaften und emittierten Fluoreszenzstrahlung. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern, die entweder direkt oder über Sekundärantikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert. Jede einzelne Zelle passiert in der Trägerflüssigkeit einen Laserstrahl. Das entstehende Streulicht und Fluoreszenzsignal wird mittels Photomultipliern detektiert und ausgewertet. Das in flachem Winkel gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* [FSC]) bezeichnet und ist ein Maß für das Volumen der Zelle. Das rechtwinklig gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter* [SSC]) bezeichnet und hängt von der Granularität der Zelle ab. Zusätzlich wird das von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht detektiert. In Tabelle 4 sind die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome dargestellt.

Tabelle 4: Absorptions- und Emissionswellenlängen von für die Durchflusszytometrie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen (<http://www.biotech.iastate.edu/facilities/flow/Fluorochromes.pdf>)

Detektionskanal	Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	Cy2	489 nm	506 nm
FL2	Phycoerythrin (PE)	480 nm, 565 nm	575 nm
FL2	Alexa 647	650 nm	668 nm
FL3	Propidiumiodid (PI)	536 nm	617 nm
FL3	7-Aminoactinomycin (7-AAD)	546 nm	647 nm
FL4	Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

Durchführung

Zur Analyse von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen wie oben beschrieben abgelöst und gezählt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer (PBS, 5 % FCS) wurden bis zu 500.000 Zellen in je 100 µl eiskaltem FACS-Puffer in einem FACS-Röhrchen resuspendiert. Anschließend wurden den Zellen entweder direkt fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Primärantikörper ohne Fluorochrom zugesetzt und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die mit Primärantikörper gefärbten Zellen wurden einem weiteren Färbeschritt mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper unterzogen und nach einmaligem Waschen analysiert. Die direkt fluoreszenzmarkierten Zellen konnten sofort analysiert werden. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Färbekonzentrationen der Antikörper.

Tabelle 5: Im FACS verwendete Antikörper und Verdünnungen

Antikörper	Konzentration (mg/ml)	Verdünnung
CD117-APC	0,03	1:10
CD166-PE	0,2	1:100
CXCR4-PE	0,2	1:10
EpCAM/Cy2	0,5	1:100
IgG/Cy2	0,5	1:100

Zur Diskriminierung von toten Zellen im FACS wurde den Zellen vor der Analyse Propidiumiodid (PI) bzw. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml bzw. 1,25 µg/ml zugegeben. Diese Nukleinsäureinterkalatoren können die perforierte Zellmembran toter Zellen durchdringen und diese Zellen anfärben. Der Vorteil von 7-AAD beruht auf der Tatsache, dass dieses Fluorochrom aufgrund seines Fluoreszenzspektrums besser mit dem Fluorochrom PE kombiniert werden kann. Alle

Messungen wurden mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet. Durch das Setzen von Fenstern (*gates*) wurde die Analyse der Zellpopulationen immer auf lebende Zellen beschränkt.

3.3.2 Überprüfung der Spezifität der anti-CXCR4 und CD117-Antikörper

Die Spezifität der anti-CXCR4 und CD117-Antikörper sollte im Detail überprüft werden. Dazu wurden transiente Transfektionen mit CXCR4- und c-KIT-Expressionsplasmiden durchgeführt. Als Kontrollvektor wurde pCMV-SPORT6-delta-X-E eingesetzt (Abbildung 13).

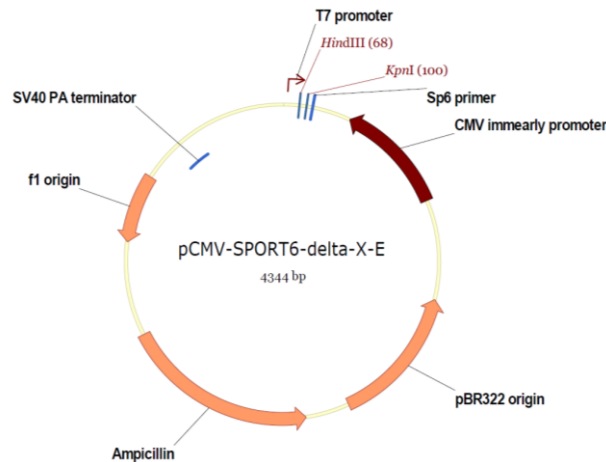


Abbildung 13: pCMV-SPORT6-delta-X-E als Kontrollvektor von pCMV-SPORT6-mCXCR4 und pCMV-SPORT6-mKIT. Für beide Transfektionen wurde pCMV-SPORT6-mKit mit *XhoI* und *EcoRI* verdaut. Die c-KIT-cDNA wurde herausgeschnitten, die *sticky ends* mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und der Vektor anschließend mit der T4-DNA-Ligase ligiert und in *E.-coli*-Bakterien eingeschleust.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Antikörper c-KIT bzw. CXCR4 spezifisch binden (Abbildung 14). Für die anderen Antikörper standen keine entsprechenden Expressionsplasmide für Positivkontrollen zur Verfügung.

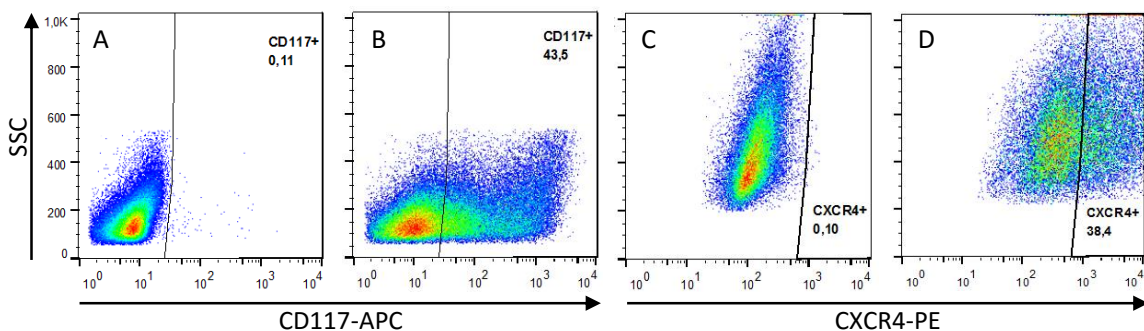


Abbildung 14: Die verwendeten Antikörper CXCR4-PE sowie CD117-APC binden spezifisch. Durchflusszytometrie-Analysen von HEK293T-Zellen, die zuvor mit pCMV-SPORT6-mKIT (B), mit pCMV-SPORT6-mCXCR4 (D) bzw. mit dem Kontrollvektor pCMV-SPORT6-delta-X-E transfiziert (A, C) und dann mit CD117-APC- (A, B) bzw. CXCR4-PE-Antikörpern (C, D) gefärbt wurden. m, murin.

3.3.3 Bestimmung der Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität

Mit Hilfe des ALDEFLUOR™ Kits (STEMCELL Technologies) können Zellen identifiziert werden, die bestimmte Aldehyddehydrogenasen (ALDH1A1/ALDH1A3) exprimieren. Dazu wurden 5×10^5 Zellen in 500 μ l ALDEFLUOR™-Assay-Puffer überführt und bei 37 °C für 30 min mit 1,5 mM ALDH-Substrat BAAA (BODIPY®-Aminoacetaldehyd) inkubiert. Das ungeladene Substrat diffundiert in die Zellen. Zellen mit hoher ALDH-Aktivität wandeln BAAA in einen negativ geladenen grün fluoreszierenden Farbstoff (BAA⁻) um. Die ALDH-positiven Zellen können so bei 515-545 nm anhand ihrer grünen Fluoreszenz detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde einer Probe der mit BAAA inkubierten Zellen sofort nach Zugabe des Substrates der ALDH-Inhibitor 4-Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) hinzugegeben. DEAB verhindert die Bildung von fluoreszierendem BAA⁻. Nach Waschen und Resuspension der Zellen in ALDEFLUOR™-Assay-Puffer wurden die toten Zellen wie unter 3.3.1 beschrieben mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurden die lebenden Zellen im FACS analysiert.

3.3.4 Zellsortierung mit dem MoFlo-Sorter

Zur Sortierung der mGC8-Zellen wurde ein MoFlo-Sortierer benutzt. Dieser Sortierer ermöglicht es, die zuvor mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbte Zellpopulationen nach verschiedenen Parametern aufzutrennen und zu sortieren. Danach können die Zellen einzeln in kleinen Tröpfchen separiert und über elektrostatische Aufladung in verschiedene Gefäße abgelenkt werden. Dazu wurden die mGC8-Zellen mit CD117-APC und PI bzw. CXCR4-PE und 7-AAD gefärbt (vgl. 3.3.1) und in FACS-Puffer ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) resuspendiert. Tote Zellen und Dubletten wurden ausgeschlossen. Bei CD117 wurden die jeweils 5 % am stärksten und am schwächsten fluoreszierenden Zellen (CD117^{hoch} und CD117^{niedrig}) in zwei Röhrchen in Zellkulturmedium (inkl. 20 % FCS) aufgefangen. Bei CXCR4 wurden die positive Population und der negativste Anteil (5 %) der CXCR4 negativen Population aufgefangen (CXCR4⁺ und CXCR4⁻). Die Subpopulationen wurden anschließend zur Injektion in syngene Mäuse vorbereitet. Die Sortierung der Zellen mit dem MoFlo wurde freundlicherweise von Dr. Joachim Ellwart am Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtzzentrum, München durchgeführt.

3.3.5 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Zur Analyse der subkutan gewachsenen Tumoren und von Tumoren aus CEA424-SV40-T-Antigen-Mäusen wurden immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Zuerst wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträger für 7 min in Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger in PBS wurde die endogene Peroxidase mittels PBS mit 3 % (v/v) H₂O₂ und 10 % (v/v) Methanol blockiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Blockierung der Fc-Rezeptoren mittels 2.5%igem (v/v) Pferdeserum/Ziegenserum des ImmPRESS™-Kits von Vector Laboratories während 20 min. Das Serum wurde mit der Pipette wieder abgenommen und der Primärantikörper bzw. die jeweilige Isotypkontrolle aufgetragen. Die optimalen Konzentrationen wurden in Titrationsversuchen ermittelt und sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der mit Meerrettichperoxidase (*horse-radish peroxidase* [HRP]) gekoppelte Sekundärantikörper aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte nun die 15-minütige Peroxidasefärbung in 50 ml Färbelösung bestehend aus 4 ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; 16 mg AEC in 4 ml Dimethylformamid) und 46 ml Acetat-Puffer, pH 5,2 (10,75 g Na-Acetat·3H₂O, 1,21 ml Essigsäure ad 1 L) mit 60 µl 30 % (w/v) H₂O₂. Nach einem weiteren Waschgang wurde mit Hämalaun für max. 30 s gegengefärbt und in fließendem Leitungswasser für 5 min gewässert. Die gefärbten Schnitte wurden nun mit Aquatex eingedeckelt und konnten unter dem Mikroskop analysiert werden.

Tabelle 6: In der Immunhistochemie verwendete Antikörper und Konzentrationen (n.a. nicht angegeben)

Antikörper	Konzentration	Verdünnung
Ki-67	n. a.	1:400
SV40-T-Antigen	0,2 mg/ml	1:500

3.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Zur Analyse des Expressionsmusters verschiedener Oberflächenproteine auf Tumorzellen der CEA424-SV40-T-Antigen-Mäuse wurden 20-25 µm dicke Kryoschnitte des Magens mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten bei Raumtemperatur aufgetaut, 1 min mit Formaldehyd (4 %) in PBS nachfixiert und zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Zum Blocken von unspezifischen Reaktionen wurden die Schnitte anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS mit 3 % BSA, 1 % Saponin sowie 1 % Triton-X inkubiert. In diesem Puffer wurden auch alle Antikörperfärbungen durchgeführt. Die Inkubation der Schnitte mit den Primärantikörpern erfolgte bei 4 °C für 72 h im Dunkeln in einer Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte 4 Mal je 30 min in PBS mit 3 % BSA gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte für 48 h bei 4 °C. Zur Färbung der Kerne wurde TO-PRO-3 (1 mM) in einer Verdünnung von 1:1000 zur Antikörperlösung dazugegeben. Nach fünf weiteren Waschschritten, der letzte davon nur 10 min in PBS ohne Zusätze, wurden die Schnitte mit einem Tropfen Einbettmedium (VECTASHIELD® Mounting Media) und einem Objektträger bedeckt und mit schwarzem Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C für max. 7 d. Die Schnitte wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-

Mikroskop analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen sowie die mikroskopischen Analysen konnten freundlicherweise im Labor von Prof. Dr. Saur, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt werden.

Tabelle 7: Konzentrationen der in der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Farbstoffe

Antikörper	Konzentration	Verdünnung
CD117-APC	0,03 mg/ml	1:100
Esel anti-Ziege Alexa Fluor 594	2 mg/ml	1:200
Huhn anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488	2 mg/ml	1:200
Ki-67	n. a.	1:400
PDGFRA	0,5 mg/ml	1:150
SV40-T-Antigen	0,2 mg/ml	1:200
ToPro3	1mM	1:1000

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Der Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Prinzip

Reporter-Gen-Assays ermöglichen die Untersuchung von regulatorischen Genabschnitten und daran bindenden Transkriptionsfaktoren. Dazu werden Luciferase-Reporterplasmide verwendet, die den zu untersuchenden Promotor vor dem promotorlosen Luciferase-Reporter-Gen enthalten. Entsprechend der transkriptionellen Aktivität des Promotors wird dann das Reporter-Gen transkribiert, die resultierende mRNA translatiert und die Menge des Proteinprodukts kann mit einem geeigneten Assay gemessen werden. Der Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay ermöglicht die Expression und Detektion von zwei unterschiedlichen Luciferasen. Dabei korreliert die Aktivität der ersten Luciferase, der Glühwürmchen-Luciferase, mit der Aktivität des zu untersuchenden Promotors. Die Aktivität der zweiten konstitutiv exprimierten, zumindest theoretisch durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nicht beeinflussten Luciferase, der Renilla-Luciferase, dient als interne Kontrolle. So können experimentelle Schwankungen minimiert werden, die z.B. durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz und der Zellvitalität entstehen können. In unseren Versuchen wurde das Reporterplasmid pSuper-8xTOPFlash (TOP) verwendet, welches mehrere *T cell factor* (TCF)-Bindestellen und einen *Herpes-simplex-Virus* (HSV) Thymidinkinase (TK) Minimalpromotor, gefolgt von einem Luciferase-Reporter-Gen des Glühwürmchens enthält (Korinek et al., 1997) und damit ermöglicht, die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges von damit transfizierten Zellen

zu testen (Veeman et al., 2003). Die Aktivierung des Promoters erfolgt durch die Bindung von TCF/ β -Catenin-Komplexen (siehe Abbildung 3). Als Kontrolle diente hierbei eine Transfektion mit pSuper-8xFOPFlash (FOP), welches mutierte nicht mehr bindende TCF-DNA-Sequenzen enthält (Veeman et al., 2003). Bei Aktivität des Wnt-Signalweges exprimieren TOP-transfizierte Zellen nun das Enzym Glühwürmchen-Luciferase. Die Luciferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird sichtbares Licht emittiert, welches von einem Luminometer gemessen werden kann. Die Menge an messbarem Licht ist proportional zur vorhandenen Luciferase und damit proportional zur Aktivität des Wnt-Signalweges. Parallel zur Transfektion der Zellen mit TOP-Vektoren wurde pHRL-tk-TBEmut transfiziert. Das enthaltene Luciferase-Reportergen der Oktokorallenart *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors des HSV-Thymidinkinasegens führt zur Expression der zweiten messbaren Luciferase, der *Renilla*-Luciferase, die aus ihrem Substrat Coelenterazin blaues Licht erzeugt. Die Lichtemission der *Renilla*-Luciferase gibt Aufschluss über die Transfektionseffizienz und kann als interne Kontrolle zur Normalisierung der einzelnen Versuche verwendet werden. Eine zufällig in diesem Reporterplasmid außerhalb des Promotors liegende TCF-Bindestelle wurde mutiert, um eine Interferenz mit den in den TOP-Vektoren befindlichen TCF-Bindestellen zu vermeiden (A. Jung, persönliche Mitteilung). Als Positivkontrolle diente die Transfektion mit Pcl-neo- β -catenin D45 (β -Catenin D45). Dies ist eine β -Catenin-Mutante, die in HCT116-Zellen (humanen Kolonkarzinomzellen) exprimiert wird. Sie enthält eine 3 bp Deletion (Kodon S45-Deletion). Diese Mutation führt zu einer vermehrten Expression und einem vermehrt aktiven β -Catenin in den Zellen und somit zu einem konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg (Morin et al., 1997).

Durchführung

Die Durchführung erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers. HEK293-Zellen wurden in 96-well-Platten analog zu 3.1.5 je nach zu untersuchender Probe mit je 0,9 μ g des zu untersuchenden Reporterplasmids pcDNA3.1(+)-SV40-TAg, 0,9 μ g TOP/FOP, 0,1 μ g β -catenin D45 sowie 0,1 μ g pHRL-tk kotransfiziert. Als Kontrolle diente jeweils 0,9 μ g pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev, das eine inverse Orientierung der TAg-cDNA aufweist und somit diese nicht exprimiert. Es wurde bei jedem Versuch eine exakt gleiche Menge an DNA (2 μ g) eingesetzt. Um die Gesamtmenge der DNA immer zu halten, wurden die Proben um das Plasmid pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev ergänzt. Die transfizierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Passiv-Lyse-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dem Zelllysate wurde anschließend im Luminometer *Luciferase Assay Substrat* zugesetzt. Nach 2 sec wurde die Lichtreaktion der Glühwürmchen-Luciferase gemessen (RLU, *relative light units*) und sofort *Stop & Glow Reagent* zugesetzt. Wiederum nach 2 sec wurde die

Aktivität der Renilla-Luciferase anhand des produzierten Lichts (RLU) gemessen. Jede Transfektion wurde mindestens dreifach durchgeführt und gemessen. Von den Messwerten wurde vor der Analyse der Hintergrund der Glühwürmchen- sowie der Renilla-Luciferase abgezogen. Diese Werte wurden in Kontrollen mit untransfizierten Zellen bestimmt, die ansonsten in jedem Versuchsschritt gleich behandelt wurden.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Zucht

Die verwendeten Mäuse wurden richtlinienkonform im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums gehalten. Die Haltung fand unter pathogenfreien (*specific pathogen free*; SPF) Bedingungen statt. Im Alter von vier Wochen wurden die Tiere von der Mutter getrennt, an den Ohren markiert und genotypisiert. Für die Tierexperimente lag eine Genehmigung von der Regierung von Oberbayern vor (Az: 55.2-1-54-2531-44-10).

3.5.2 Subkutane Injektion von Tumorzellen in syngene Mäuse

Die aus der Zellsortierung (vgl. 3.3.4) gewonnenen CD117^{hoch}- und CD117^{niedrig}-Zellen bzw. CXCR4⁺- und CXCR4⁻-Zellen wurden gezählt und nach zweimaligem Waschen in PBS in der gewünschten Konzentration in Injektionsmedium (RPMI, 5 % Pyruvat, 5 % nichtessenzielle Aminosäuren, 1 % HEPES (Stammlösung 1 M), pH 7.2) resuspendiert. Zu den Proben wurde Matrigel im Verhältnis 1:1 gegeben und mit der Zellsuspension vermischt. Alle aufgeführten Schritte fanden auf Eis statt. Matrigel wurde 24 h vor Verwendung von -20 °C auf Eis in einem 4 °C Kühlschrank gestellt und dadurch verflüssigt.

Vor der subkutanen Tumorzellinjektion wurden die Mäuse an den zu injizierenden Stellen (rechte und linke Flanke) rasiert und desinfiziert. Die Zellsuspension wurde jeweils mit einer 24-G-Kanüle in eine 1 ml Spritze aufgezogen. Um Konzentrationsschwankungen zu vermeiden wurde die Suspension luftblasenfrei aufgezogen. Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension subkutan an die rechte und linke Flanke der Mäuse injiziert. Dazu wurde eine Hautfalte gebildet und die Zellen darin vorsichtig unter Bildung einer „Tasche“ injiziert. Zur Kontrolle wurden außerdem unsortierte mGC8-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen subkutan ebenfalls in Mäuse injiziert. Es wurden bei CD117 weibliche sowie männliche Mäuse zu gleichen Anteilen, bei CXCR4 ausschließlich weibliche Mäuse injiziert. Zum Zeitpunkt der Injektion hatten die Mäuse ein Alter zwischen 67 und 203 d. Bei der Versuchsdurchführung wurde auf eine gleiche Altersstruktur der Mäuse der zu vergleichenden Gruppen geachtet.

3.5.3 Kontrolle des Wachstumsverlaufs der Tumoren

Zur Kontrolle des Wachstums der subkutan injizierten Tumorzellen wurde der Längs- und Breitendurchmesser der entstandenen Tumore dreimal pro Woche gemessen. Mit einer elektronischen Schublehre konnten die Messungen mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ mm durchgeführt werden. Dies erleichterte die vorherige Rasur der Flanken. Als untere zuverlässige Messgrenze wurde ein Tumordurchmesser von 1,5 mm definiert. Jede Einzelmessung wurde dreifach durchgeführt und der Mittelwert zur Berechnung des Tumolvolumens herangezogen. Das Tumolvolumen berechnete sich nach folgender Formel: $V_{\text{Tumor}} = 0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$. Nach 30 d wurde überprüft, in welchen Mäusen Tumorstadium eingetreten war. Hierfür wurde als untere Sensitivitätsgrenze wieder der minimale Tumordurchmesser von 1,5 mm verwendet. Nach einer Wachstumsperiode der Tumoren von 50 Tagen bzw. einem Gewichtsverlust der Maus von über 15 % wurden die Mäuse getötet und die Entnahme und Präparation der subkutanen Tumoren durchgeführt.

3.5.4 Präparation von Mausgewebe

Zur Entnahme der subkutan gewachsenen Tumoren bzw. Mausgewebe wurden die Mäuse unter Anästhesie mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde zur Entnahme von Magengewebe das Abdomen von ventral eröffnet. Nach kranial wurde der Magen vom Ösophagus und nach kaudal vom Duodenum abgetrennt und mit PBS mehrfach durchgespült. Die subkutan gewachsenen Tumoren wurden mit dem Skalpell vom umliegenden Gewebe getrennt und ebenfalls mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe eingebettet.

3.5.5 Kryoeinbettung

Zur Kryoeinbettung wurden die in PBS gespülten Gewebe abgetrocknet. Anschließend wurden sie in Plastikformen positioniert und in Tissue Tek O.C.T.-Medium eingebettet und durch vorsichtiges Eintauchen des unteren Teils der Plastikformen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Schneiden der Gewebe wurden diese bei -80 °C gelagert.

3.5.6 Schneiden von Kryogewebe

Vor dem Schneiden wurden die in Tissue Tek O.C.T.-Medium eingebetteten Gewebe für 1-2 h im Kryotom (Cryostat CM3050, Leica) gelagert, damit sie die Kammertemperatur (-23 °C) annehmen konnten. 8-10 μm bzw. 20-25 μm dicke Schnitte wurden bei einer Gewebetemperatur von -19 °C angefertigt. Die fertigen Schnitte wurden auf beschichtete Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen und bis zum Färben kurzzeitig bei -20 °C gelagert.

3.6 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Mit dem Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Japan) wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte analysiert und Fotos der Schnitte mit der digitalen Kamera Nikon Digital Sight DS-L1 erstellt. Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops Leica TCS SP5 DMI 6000 CS (Leica, Heidelberg) analysiert. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten im Labor von Prof. Dr. Saur, II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Microsoft Office.

3.7 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Hierbei galt ein p-Wert < 0.05 als statistisch signifikant. Um das Tumorwachstum zu beschreiben, wurde eine exponentielle Wachstumskurve durch die Daten gelegt. Die Generationszeit wurde hierbei als über die Zeit konstant angenommen. Alle Analysen wurden mittels GraphPad Prism (Version 4.03, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Eingrenzung der Ursprungszelle des CEA424-TAg-Karzinoms

4.1.1 Neuroendokrine CEA424-TAg-Karzinome weisen eine hohe Proliferationsaktivität auf

Zur Untersuchung der Proliferationsaktivität des neuroendokrinen Primärtumors wurden zunächst immunhistochemische Peroxidasefärbungen von Magengewebe von CEA424-TAg-Mäusen mit Antikörpern gegen SV40-T-Antigen (TAg) sowie den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Die Magentumore von 59 d, 83 d sowie 100 d alten CEA424-TAg-Mäusen wiesen sehr hohe Proliferationsraten zwischen 35-90 %, gemessen anhand des Anteils Ki-67-positiver Zellen, auf (Abbildung 15). Dies stimmt mit der Klassifizierung der CEA424-TAg-Tumore als neuroendokrine Karzinome aufgrund ihres *grading* (G3) überein. Definitionsgemäß weisen neuroendokrine Karzinome einen Anteil von ≥ 20 % Ki-67-positiven Tumorzellen auf (Bosman et al., 2010). Mit zunehmendem Alter der Mäuse und Progression der Tumore sank die Proliferationsrate der Tumore deutlich, blieb aber durchgehend über 20 % (Abbildung 15).

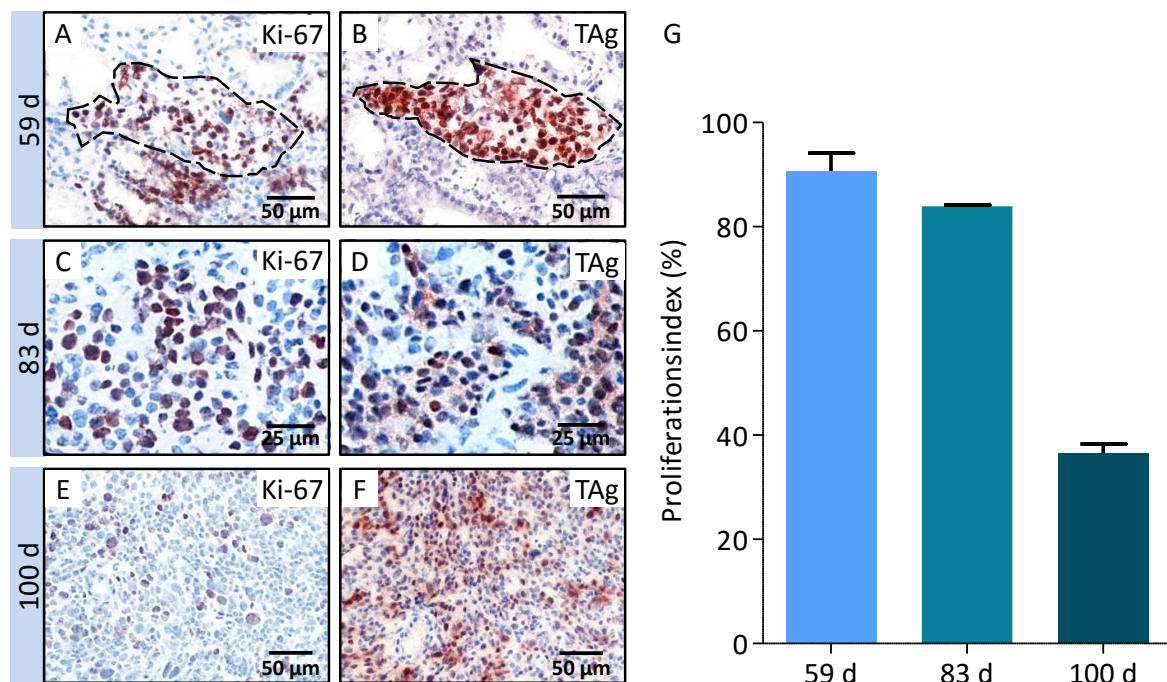


Abbildung 15: Neuroendokrine CEA424-TAg-Karzinome des Magens weisen eine hohe Proliferationsrate auf. Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 (braune Zellkernfärbung; A, C, E) und TAg (braune Zellkernfärbung; B, D, F) in Magenkarzinomzellen von 59 d, 83 d und 100 d alten CEA424-TAg-Mäusen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden benachbarte parallele Kryoschnitte von Magenkarzinomgewebe verwendet. (G) Proliferationsindices (Zahl der Ki-67-positiven Zellen/Zahl der TAg-positiven Zellen im gleichen Tumoreal (in A, B mit gestrichelter Linie umrandet) x 100) der Magenkarzinome wurden durch Auszählen von mindestens 100 TAg-positiven Tumorzellen in je 3 Arealen je einer 59 d, 83 d und 100 d alten Maus bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

4.1.2 Tumorzellen weisen immunhistochemisch keine Expression von c-KIT und PDGFRA auf

C-KIT/CD117 ist neben einem Stammzell- bzw. Tumorstammzellmarker außerdem ein Marker zur Identifikation von interstitiellen Cajalzellen (*interstitial Cajal cells*, ICC), die Ursprungszellen für gastrointestinale Stromatumoren (GIST) darstellen. PDGFRA (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) ist wie c-KIT eine Rezeptortyrosinkinase und besitzt viele Ähnlichkeiten zu c-KIT. PDGFRA spielt ebenfalls eine große Rolle in der Entstehung von GIST (Corless et al., 2011). Oligonukleotid-Mikroarrayanalysen der CEA424-TAg-Tumorzelllinien mGC4, mGC5 und mGC8 (Ihler et al., 2012) wiesen auf mRNA-Ebene eine deutliche c-Kit- und geringe Pdgfra-Expression auf (Abbildung 16). Die Daten wurden freundlicherweise von F. Ihler und G. Enders (Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Klinikum der Universität, LMU München) zur Verfügung gestellt.

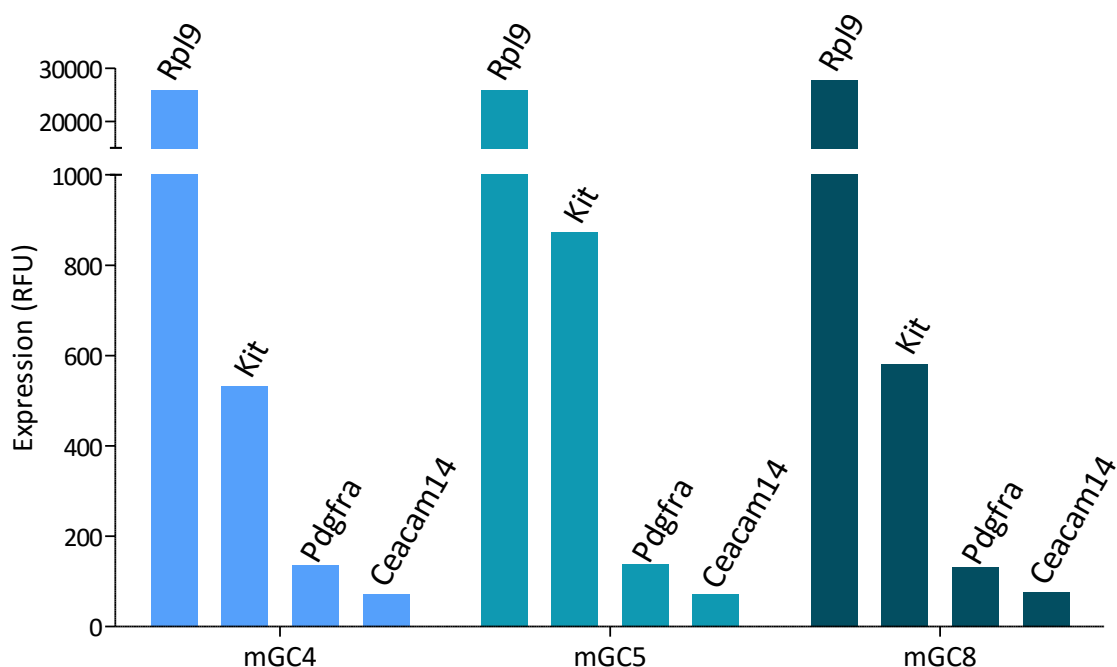


Abbildung 16: Die potentiellen Tumorstammzellmarkergene *c-Kit* und *Pdgfra* werden in mGC-Zellen exprimiert. Das Transkriptom der Zelllinien mGC4, mGC5 und mGC8 wurde mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrayanalysen (n=1) bestimmt (Ihler et al., 2012). Die mGC-Zellen zeigen ein ähnliches Expressionsprofil der getesteten Gene. Erkennbar ist eine deutliche mRNA-Expression des konstitutiv exprimierten *Rpl9*-Gens (ribosomales Protein L9), welches für die Proteinbiosynthese der Zellen benötigt wird. *Rpl9*-mRNA-Quantifizierung dient in dieser Analyse als Positivkontrolle. Transkripte von *Ceacam14* (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 14*), ein plazentaspezifisch exprimiertes Gen (Zebhauser et al., 2005), stellt die Negativkontrolle mit einer RFU (relativer Fluoreszenzeinheit) < 80, dar. Die *probe set numbers* der Analyse sind GI_14149646-S (*Rpl9*), scl27701.21_88-S (*Kit*), scl27703.26_20-S (*Pdgfra*) und scl33030.3.1_40-S (*Ceacam14*).

Um der Frage eines möglichen Ursprungs der CEA424-TAg-Tumore aus ICC oder ICC-Progenitorzellen nachzugehen, wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von Kryoschnitten des Tumorgewebes mit Antikörpern gegen TAg und c-KIT bzw. PDGFRA

angefertigt. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops konnte gleichzeitig die Expression der beiden Marker in einzelnen Zellen betrachtet werden.

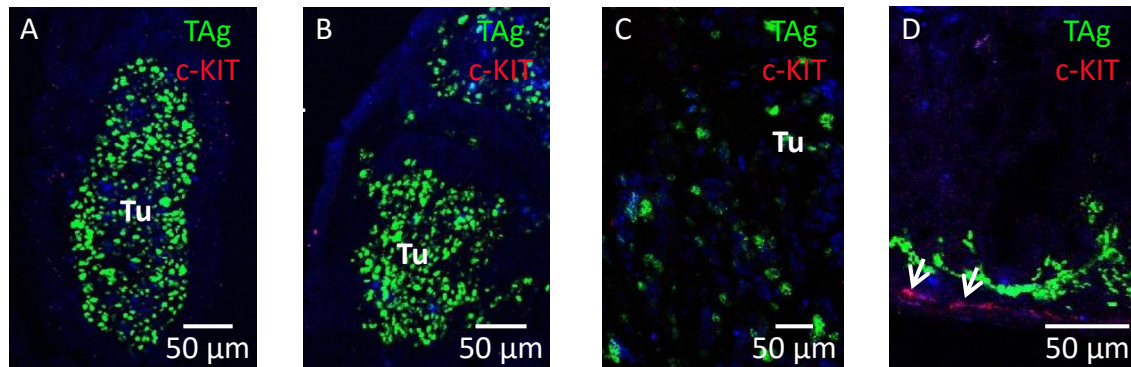


Abbildung 17: C-KIT wird in CEA424-TAG-Tumorzellen der Pylorusregion nicht exprimiert. Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten von Tumorarealen (Tu) in der Mukosa der Pylorusregion einer 59 d (A, B) sowie 100 d alten CEA424-TAG-Maus (C). Die Pfeile in D zeigen interstitielle Cajalzellen (c-KIT-positive Zellen mit roter Fluoreszenz) als Positivkontrolle für c-KIT. Grün: TAG, rot: c-KIT, blau: Zellkerne/ToPro3.

Eine Expression von c-KIT konnte in TAG-positiven Tumorzellen im Magen bei 59 d und 100 d alten Mäusen nicht festgestellt werden (Abbildung 17). C-KIT erweist sich daher im CEA424-TAG-Magenkarzinommodell als unwahrscheinlicher Marker zur Identifikation der Ursprungszelle.

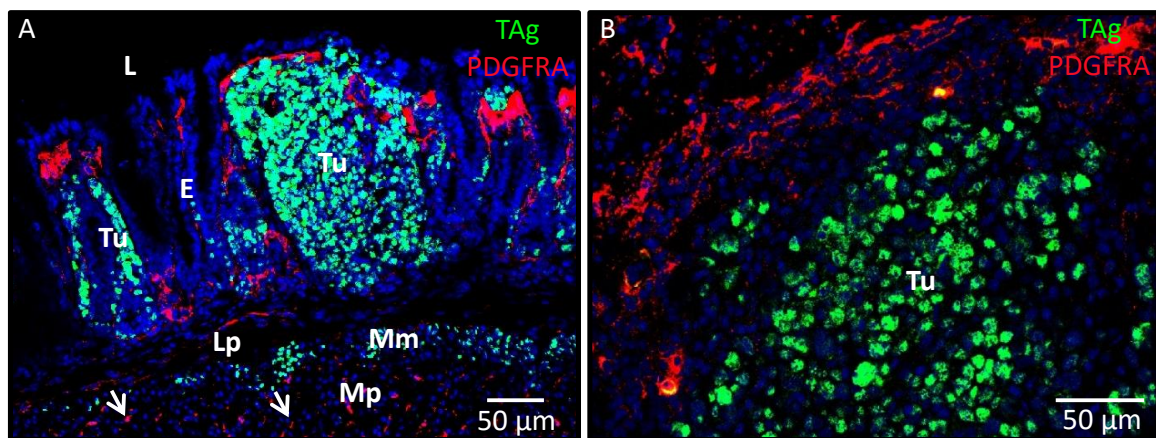


Abbildung 18: PDGFRA wird in CEA424-TAG-Tumorzellen der Pylorusregion nicht exprimiert. Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten von Tumorgewebe 41 d (A) sowie 59 d alter CEA424-TAG-Mäuse (B). TAG-positive Tumorzellen (grün) befinden sich im Epithel der Mukosa (E) sowie bandförmig in der *Muscularis mucosae* (Mm). Die *Lamina propria* (Lp) ist frei von Tumorzellen. PDGFRA-positive-Zellen werden in der *Muscularis propria* (Mp) wie erwartet gefunden (Pfeile). PDGFRA und TAG werden in den Magenkarzinomzellen nicht koexprimiert. Tu: Tumorareal, L: Magenlumen, rot: PDGFRA, grün: TAG, blau: Zellkerne/ToPro3.

Wie erwartet wurden die bekanntermaßen PDGFRA-positiven-Zellen in der *Muscularis propria* gefärbt (Heinrich et al., 2003). Keine PDGFRA-Färbung konnte in den TAG-positiven Magenkarzinomzellen (Abbildung 18) gefunden werden. Damit können PDGFRA-exprimierende Zellen als Ursprungszellen im CEA424-TAG-Magenkarzinommodell ebenfalls als unwahrscheinlich betrachtet werden.

4.1.3 SV40-T-Antigen besitzt aktivierenden Einfluss auf die Expression von *LGR5*

Da die Frage nach der Ursprungszelle des neuroendokrinen Karzinommodells noch unbeantwortet ist, wurde ein weiterer Fokus auf den Stammzellmarker sowie Tumorursprungsmarker des Kolonkarzinoms *LGR5* gesetzt. Da *LGR5* auch in der Pylorusregion des Magens der Maus Stammzellen markiert, stellen die *LGR5*-positiven Zellen potentiell Tumorursprungszellen im Magenkarzinom dar. Bisher konnte in dem hier verwendeten Magentumormodell keine *Lgr5*-Expression in Tumorzellen nachgewiesen werden (1.6.1). Es sollte daher untersucht werden, ob eine Inhibition der *Lgr5*-Expression durch SV40-T-Antigen in diesem transgenen Mausmodell existiert und diese dadurch in den SV40-T-Antigen-Karzinomen des Magens nicht mehr nachweisbar ist.

4.1.3.1 Klonierung der Expressionsplasmide pcDNA3.1(+)-SV40-TAg und pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev

Das Ziel der Klonierung war die Konstruktion eines Plasmids, das die Expression des Onkogens SV40-T-Antigen in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Das Plasmid sowie das Kontrollplasmid beruhen auf der Basis des pcDNA3.1(+)-Vektors. Das Kontrollplasmid enthielt das Onkogen SV40-T-Antigen in inverser und somit nicht exprimierbarer Ausrichtung, um eine optimale Kontrolle gewährleisten zu können und möglichst wenige Interferenzen durch Sequenzunterschiede zu haben. Für die Klonierung wurde das Expressionsplasmid pZIPNeoSV(X)1-TAg mit der benötigten cDNA des SV40-T-Antigen-Onkogens (TAg), also ohne das auf genomischer Ebene vorhandene Intron, verwendet (Jat et al., 1986). Die TAg-cDNA war an beiden Seiten von einer *Bam*HI-Schnittstelle flankiert. Durch Verdau mit *Bam*HI konnte die TAg-cDNA aus dem Expressionsplasmid herausgeschnitten werden und nach DNA-Gelelektrophorese anhand ihrer Länge vom Vektor getrennt werden (Abbildung 19 A). Der Basisvektor pcDNA3.1(+), der nur eine *Bam*HI-Schnittstelle enthielt, wurde zur Linearisierung ebenfalls mit *Bam*HI verdaut und zur Verhinderung einer Religation mit Hilfe der *antarctic phosphatase* dephosphoryliert. Anschließend wurden die cDNA sowie der linearisierte Vektor aus dem Gel extrahiert (Abbildung 19 A) und anhand ihrer *sticky ends* miteinander ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetenten *E.-coli*-Bakterien transformiert. Eine Kolonie-PCR mit den Primern 424+ sowie 424- und anschließender Gelelektrophorese der Produkte ermöglichte die Identifikation der Kolonien, die ein Vektor-cDNA-Konstrukt enthielten. Amplifiziert wurden hier 387 bp der SV40-T-Antigen-cDNA. Da die Ligation der cDNA in den Basisvektor nicht zielgerichtet stattfand, konnte in der Gelelektrophorese nur auf die Anwesenheit der TAg-cDNA hin untersucht werden. 13 der 16 getesteten Kolonien enthielten TAg-cDNA. Die Orientierung der cDNA innerhalb des Vektors konnte in einem Verdau mit *Pst*I analysiert werden. Die drei im Konstrukt vorhandenen *Pst*I-Schnittstellen erlaubten anhand der Länge

der entstandenen DNA-Stücke die Identifikation des Konstrukts mit richtig orientierter cDNA (pcDNA3.1(+)-SV40-TAg) sowie mit invers orientierter, nicht expressionsfähiger cDNA (pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev) (Abbildung 19 B, Abbildung 20 A, B).

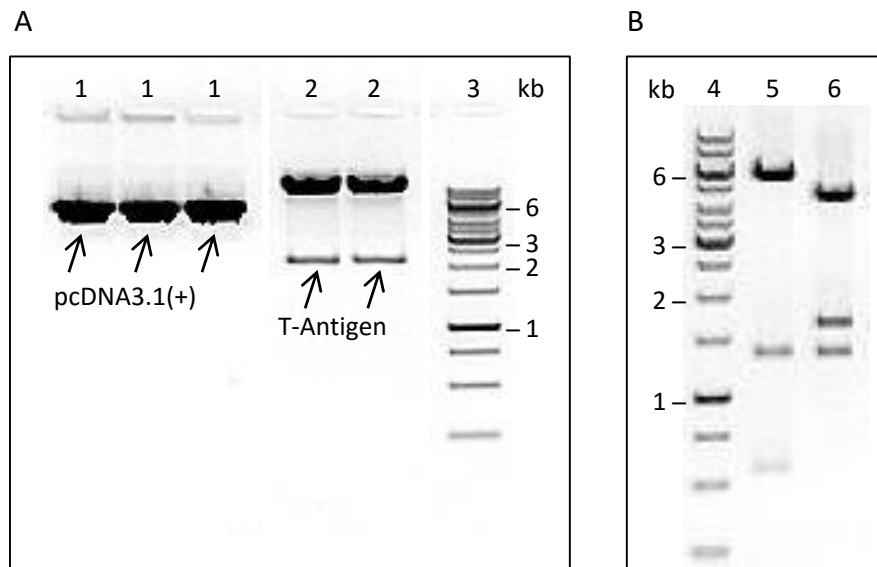


Abbildung 19: Generierung von pcDNA3.1(+)-SV40-TAg und pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev. (A) Agarosegel-Elektrophorese nach Verdau von pcDNA3.1(+) und pZIPNeoSV(X)1-TAg mit *Bam*HI: (1) Verdau des Basisvektors pcDNA3.1(+), (2) Verdau von pZIPNeoSV(X)1-TAg, (3) 1 kb-DNA-Standard. (B) Agarosegel-Elektrophorese nach Verdau rekombinanter Plasmide mit *Pst*I: (4) 1 kb-DNA-Standard, (5) drei Fragmente des Plasmids pcDNA3.1(+)-SV40-TAg mit Größen von 5752, 1355 und 547 bp, (6) drei Fragmente des Plasmids pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev mit Längen von 4649, 1650, 1355 bp.

In den anschließenden Versuchen wurde pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev als Kontrollplasmid eingesetzt. Die Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters der TAg-cDNA mit einer Größe von 2131 bp sowie die flankierenden Sequenzen mit den für die Klonierung verwendeten *Bam*HI-Restriktionsendonuklease-Schnittstellen bestätigte die erfolgreiche Klonierung. In der Sequenzierung wurden keine Abweichungen zur ursprünglichen TAg-cDNA gefunden. Die Expression des Konstrukts in HEK293-Zellen konnte durch transiente Transfektion der Zellen mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAg und anschließender Immunzytochemie mit dem SV40-TAg-Antikörper bestätigt werden. Transfizierte Zellen exprimierten nach Transfektion TAg (Abbildung 20 A, C). Als Negativkontrolle dienten hierbei mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev transfizierte Zellen, die sich nicht mit dem TAg-Antikörper anfärben ließen, also kein TAg exprimieren (Abbildung 20 B, D). Die Spezifität des gegen SV40-TAg gerichteten Antikörpers konnte so ebenfalls geprüft und bestätigt werden.

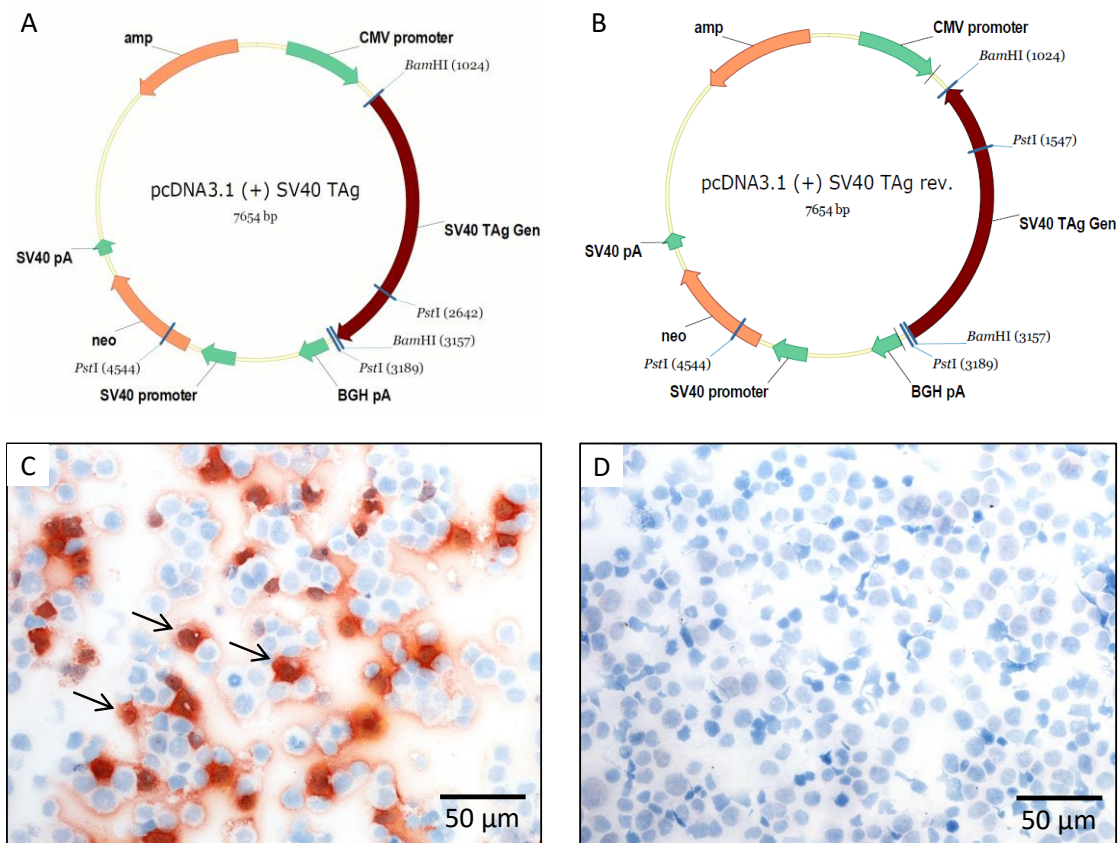


Abbildung 20: Transfektion von HEK293-Zellen mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAG führt zur Expression von TAG. Vektorkarten der klonierten Expressionsplasmide pcDNA3.1(+)-SV40-TAG (A) und pcDNA3.1(+)-SV40-TAG rev (B). Immunzytochemie von HEK293-Zellen mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen anti-TAG-Antikörpers (1 µg/ml) nach transienter Transfektion mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAG (C) und dem Mock-Vektor pcDNA3.1(+)-SV40-TAG rev (D). Die mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAG transfizierten Zellen lassen sich anfärben (Pfeile), während sich mit dem Mock-Vektor transfizierte Zellen nicht mit dem anti-TAG-Antikörper anfärben lassen.

4.1.3.2 SV40-T-Antigen wirkt aktivierend auf den Wnt-Signalweg

Um eine mögliche Beeinflussung der *Lgr5*-Expression durch das SV40-T-Antigen zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit pcDNA3.1(+)-SV40-TAG (TAG) und TOP-Flash-Vektoren transfiziert. Letzter erlaubt die Messung der Aktivität wichtiger am Ende der Wnt-Signalkette stehender Transkriptionsfaktoren, wie z.B. der des β -Catenins komplexiert mit TCF-Transkriptionsfaktoren (siehe 3.4.1) über die Expressionssteuerung des Glühwürmchen-Luciferase-Markergens. Die Messung der Luciferase-Aktivität mit Hilfe des Luciferase-Assays diente demnach der Analyse der Beeinflussung des Wnt-Signalwegs sowie indirekt der möglichen Beeinflussung der Expression von *LGR5*, einem bekannten Zielgen des Wnt-Signalwegs, durch das SV40-T-Antigen. Als Positivkontrolle des Assays diente die Kotransfektion des TOP-Plasmids mit einem Expressionsplasmid für β -Catenin D45, einem konstitutiv aktiven β -Catenin (TOP/ β -Catenin D45). Als Negativkontrolle wurde das FOP-Plasmid mit mutierten TCF-Bindungssequenzen und β -Catenin D45 verwendet. Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass, wie erwartet, die Transfektion der Zellen mit β -Catenin D45 die Expression der Luciferase in TOP rund 1000-

fach erhöht (Abbildung 21). Die endogene Aktivität des Wnt-Signalweges in den HEK293-Zellen (Transfektion mit TOP alleine) ist demnach sehr schwach ausgeprägt. Sie wies keinen signifikanten Unterschied zur Transfektion mit FOP/ β -Catenin D45 (Negativkontrolle) auf ($p = 0,31$).

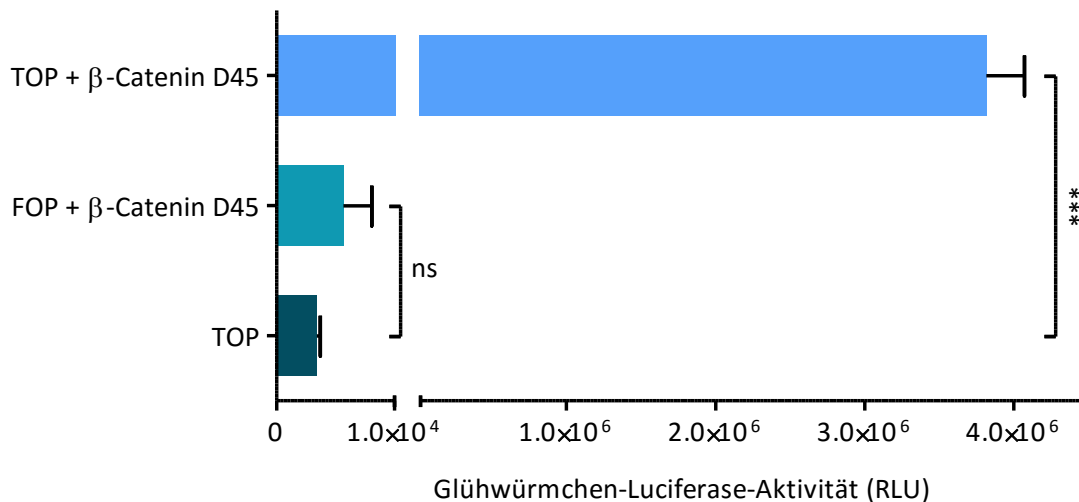


Abbildung 21: Nachweis der Aktivität der endogenen Wnt-Signaltransduktion in HEK293-Zellen. Zur Bestimmung des Aktivierungszustands des endogenen Wnt-Signalweges in HEK293 erfolgte eine Transfektion bzw. Kotransfektion der Zellen mit TOP- und β -Catenin-D45- (Positivkontrolle), FOP- und β -Catenin-D45- Expressionsplasmiden (Negativkontrolle) bzw. TOP alleine (endogene Aktivität des Wnt-Signalweges in HEK293-Zellen). Nach 48 h wurde die Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von Messungen von je 3 Proben. *** $p < 0,001$. ns, nicht signifikant.

Anschließend wurde der Einfluss von SV40-T-Antigen auf die Aktivität des Wnt-Signalweges anhand der Luciferaseexpression getestet (Abbildung 22). Nach Transfektion der HEK293-Zellen mit TOP- und TAg-Expressionsplasmiden war die Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase im Vergleich zur Transfektion mit TOP und pcDNA3.1(+)-SV40-TAg rev (TAg rev) statistisch signifikant erhöht (2,75-fach). Auch im konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg unter Kotransfektion mit TOP und β -Catenin D45 erwies sich die Glühwürmchen-Luciferase nach Transfektion mit TAg im Vergleich zu TAg rev als statistisch signifikant erhöht (3-fach). Interessanterweise zeigte sich auch bei FOP + TAg/TAg rev eine 1,8-fach erhöhte Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase durch Transfektion mit TAg. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Abbildung 23).

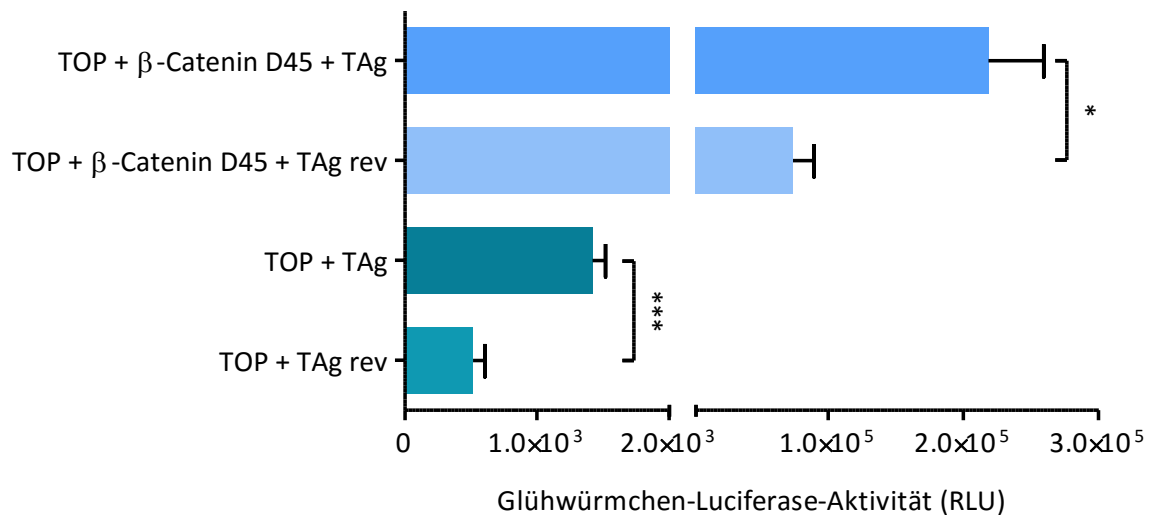


Abbildung 22: SV40-T-Antigen aktiviert den Wnt-Signalweg. Zur Bestimmung des Einflusses von SV40-T-Antigen auf die Aktivität des konstitutiv aktiven bzw. endogenen Wnt-Signalweges wurden HEK293-Zellen mit TOP-, TAg- und β-Catenin-D45-, TOP-, TAg rev- und β-Catenin-D45- bzw. TOP- und TAg- sowie TOP- und TAg rev-Plasmiden transient transfiziert, und die TOP-Promotoraktivierung anhand der Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität nach 48 h gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von Messungen von je 4 Proben. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und ergab jeweils signifikante Aktivitätsänderungen. * p = 0,016; *** p = 0,0005. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment.

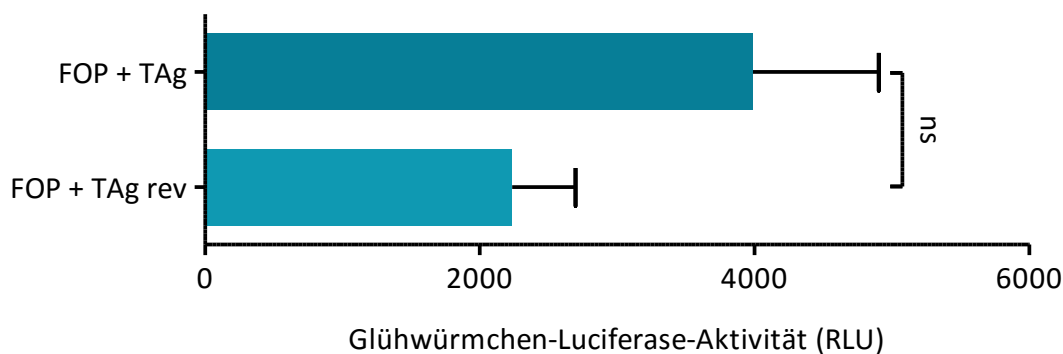


Abbildung 23: SV40-T-Antigen stimuliert die Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase auch über FOP. Zur Bestimmung des Einflusses von SV40-T-Antigen auf die Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase wurden HEK293-Zellen mit FOP + TAg und FOP + TAg rev transient transfiziert, und die FOP-Promotoraktivierung anhand der Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität nach 48 h gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von Messungen von je 4 Proben. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und ergab jeweils in die gleiche Richtung weisende Aktivitätsänderungen. p = 0,14. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment. ns, nicht signifikant.

Als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Renilla-Luciferase-Aktivität herangezogen. Das entsprechende Kontrollplasmid enthält Renilla-Luciferase-cDNA, deren Expression durch einen modifizierten *Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinasegen*-Promoter (HSV-tk-Promoter) gesteuert wird. Hier konnte festgestellt werden, dass unter Einfluss von SV40-T-Antigen nicht nur die Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase, sondern ebenfalls die der Renilla-Luciferase erhöht wurde (vgl. Abbildung 24). Es ergab sich eine 1,4-fache

Erhöhung bei den TOP + β -Catenin D45 + TAg/TAg rev- sowie eine signifikante 2,5-fache Erhöhung bei den TOP + TAg/Tag rev-Versuchen.

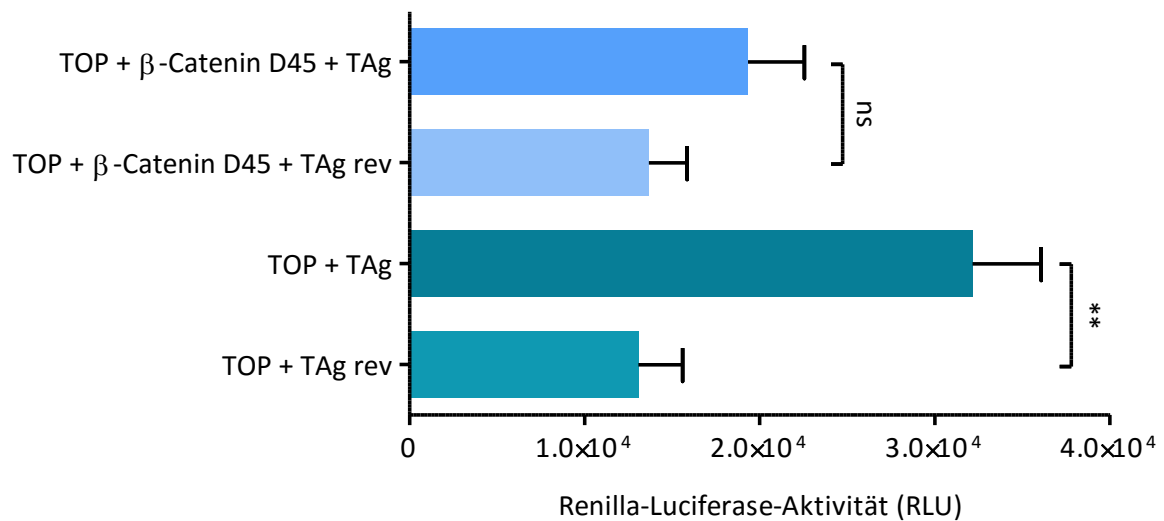


Abbildung 24: Nachweis der Expressionsaktivierung der Renilla-Luciferase durch SV40-T-Antigen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Kotransfektion von HEK293-Zellen mit dem Renillaexpressionskonstrukt phRL-tk TBE mut und TOP und TAg sowie TOP und TAg rev (Kontrolle) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von Messungen je 4 unabhängiger Proben. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und ergab jeweils statistisch signifikante Aktivitätsänderungen bei TOP + TAg/Tag rev. ** p = 0,007; ns, nicht signifikant (p=0,20).

Da der Standardfehler der Messreihen innerhalb eines Versuchs klein war, wurden die Renilla-Werte nicht, wie ursprünglich geplant, als interne Kontrolle verwendet.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass SV40-T-Antigen in der Lage ist, unterschiedliche Promotoren, unter anderem den TK-Promotor, zu stimulieren. Allerdings könnten sich die beobachteten Effekte auch dadurch erklären, dass SV40-T-Antigen generell einen aktivierenden Einfluss auf Zellproliferation sowie Vitalität hat.

4.1.3.3 SV40-T-Antigen wirkt aktivierend auf die Zellvitalität

Um der Frage nach einer generellen Aktivierung von Zellproliferation und Zellvitalität durch SV40-T-Antigen nachzugehen, wurden HEK293-Zellen mit TAg transfiziert und die Vitalität der Zellen anschließend im Vergleich zur Kontrolle bzw. mit TOP transfizierten Zellen gemessen (vgl. Abbildung 25). Es konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der Zellen nach TAg-Transfektion signifikant erhöht war im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollvektoren (TAg rev bzw. TOP) transfiziert wurden (1,6-fach). Zusammengenommen legen diese Experimente daher nahe, dass SV40-T-Antigen die Vitalität/Proliferation von HEK293-Zellen (1,6-fach) fördert, jedoch keinen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des Wnt-Signalweges und somit vermutlich auch nicht auf die Expression von LGR5 hat.

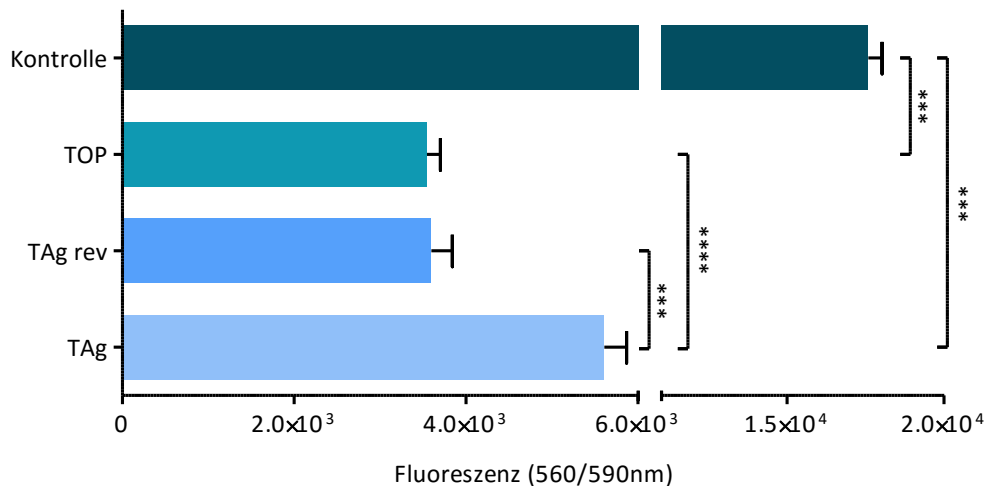


Abbildung 25: SV40-T-Antigen steigert die Vitalität von HEK293-Zellen. Die Vitalität von HEK293-Zellen wurde 48 h nach Transfektion mit TAg, TAg rev oder TOP mit Hilfe des CellTiter-Blue-Assays bestimmt. Um den Einfluss der Transfektion auf die Zellvitalität zu bestimmen, wurden untransfizierte Zellen ebenfalls getestet (Kontrolle). Untransfizierte Zellen wiesen eine 5-fach höhere Vitalität als mit Kontrollvektoren (TOP oder TAg rev) transfizierte Zellen auf. Dargestellt sind Mittelwerte aus je 6 Messungen mit Standardfehler. *** $p < 0.001$; **** $p < 0,0001$.

4.1.4 Charakterisierung der spindelförmigen T-Antigen-positiven Zellen in der *Muscularis mucosae* der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion

4.1.4.1 Die SV40-T-Antigen-exprimierenden Tumorzellen der *Muscularis mucosae* sind stark proliferativ und infiltrieren die Mukosa

Zur Charakterisierung der in der *Muscularis mucosae* der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion lokalisierten SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen und Analyse ihrer möglichen Bedeutung als Vorläuferzellen für die sich in der Magenmukosa bildenden neuroendokrinen Karzinome wurden Peroxidasefärbungen mit TAg- und Ki-67-spezifischen Primär- und Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörpern durchgeführt. Die Tumorzellen in der *Muscularis mucosae* sowie in den soliden Tumoren der Mukosa waren bei 59 d alten Mäusen zum Großteil Ki-67 positiv (Abbildung 26 B, D). Dies zeigt, dass die Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt stark proliferieren. Durch Vorarbeiten von Elena Vetter war bekannt, dass die SV40-T-Antigen-positive Zellpopulation in der *Muscularis mucosae* bei sehr jungen Mäusen (19 d) nur aus einigen wenigen Zellen besteht (Vetter et al., 2015). Bei 59 d alten Mäusen waren diese spindelförmigen Tumorzellen bereits deutlich zahlreicher und in lumennäheren Schichten der Mukosa vorzufinden. Die SV40-T-Antigen-positiven Zellen schienen folglich invasiv in die Mukosa einzuwachsen.

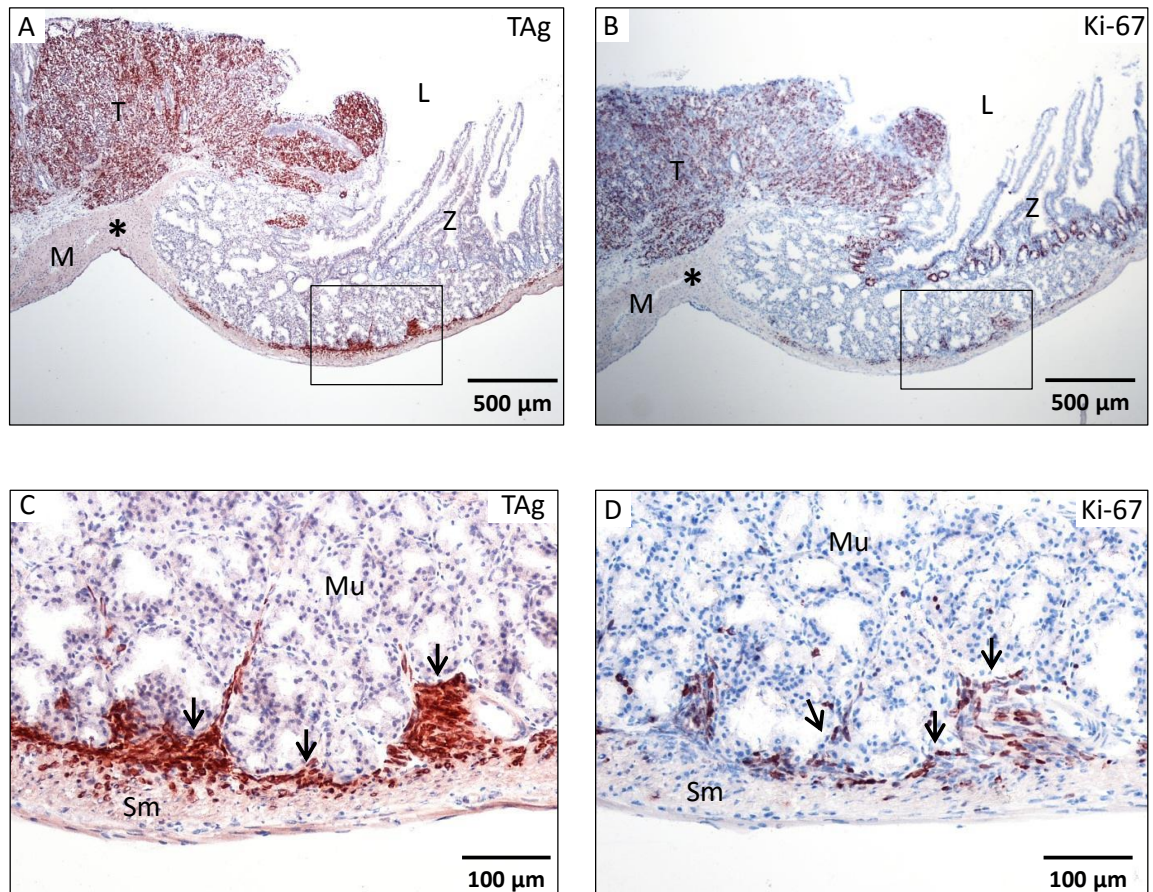


Abbildung 26: Nachweis stark proliferierender Tumorzellen in der Mukosa der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion. Immunohistochemische Färbungen von benachbarten Kryoschnitten des Magens einer 59 d alten CEA424-TAg-Maus für TAg (A, C) und Ki-67 (B, D) wurden angefertigt. (A, B) Übersicht über die Pylorus-Duodenum-Übergangsregion mit Übergang vom Magen (links im Bild) zum Duodenum (rechts). (*) Pylorus; (L) Lumen; (Z) Duodenale Zotten. Linksseitig erkennt man ein ausgedehntes Tumorareal (T) in der Mukosa der Pylorusregion mit strikter Trennung zur *Muscularis* (M). Rechts im Bild erkennbar sind spindelförmige TAg- und Ki-67-positive Tumorzellen (Pfeile) in der Mukosa über der Submukosa (Sm) des pylorusnahen Duodenums, die in lumennähere Schichten der Mukosa (Mu) infiltrieren. Neben Tumorzellen exprimieren auch Zellen in den Krypten des Duodenums Ki-67 (B). (C, D) Vergrößerte Ausschnitte aus (A, B). (A, C) TAg-Färbung. (B, D) Ki-67-Färbung.

Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden Schnitte von Magengewebe älterer Mäuse angefertigt und ebenso gefärbt. Es konnte eine Zunahme der SV40-T-Antigen-positiven Zellpopulation in der *Muscularis mucosae* mit fortschreitendem Alter der Mäuse sowie eine scheinbare Migration/Invasion in lumennähere Schichten der Mukosa gefunden werden (Abbildung 27). Es handelt sich bei diesen Zellen vermutlich ebenfalls um proliferierende Tumorzellen. Das Progenitor (Tumorzellen in der *Muscularis mucosae*)-Tochterzellen (Zellen in den soliden Tumorarealen in lumennahen Schichten der Mukosa)-Verwandtschaftsverhältnis bleibt allerdings ungeklärt.

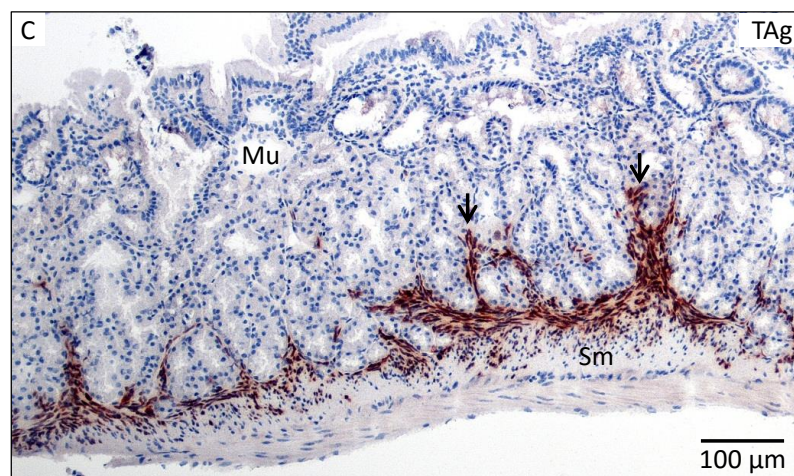
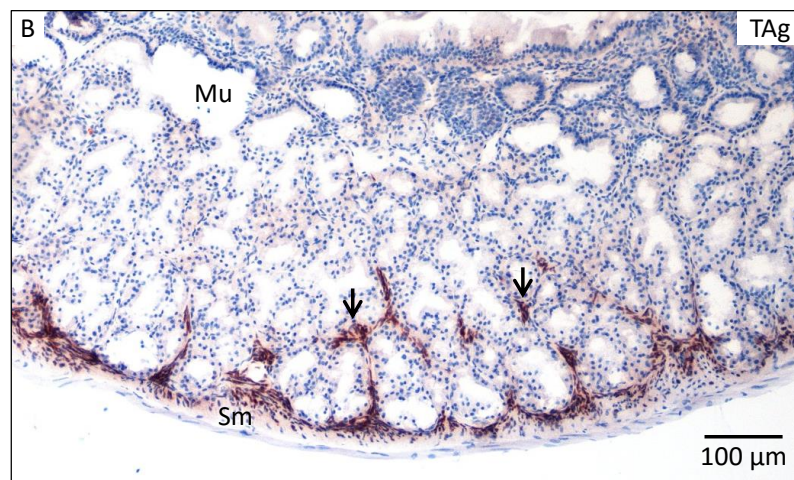
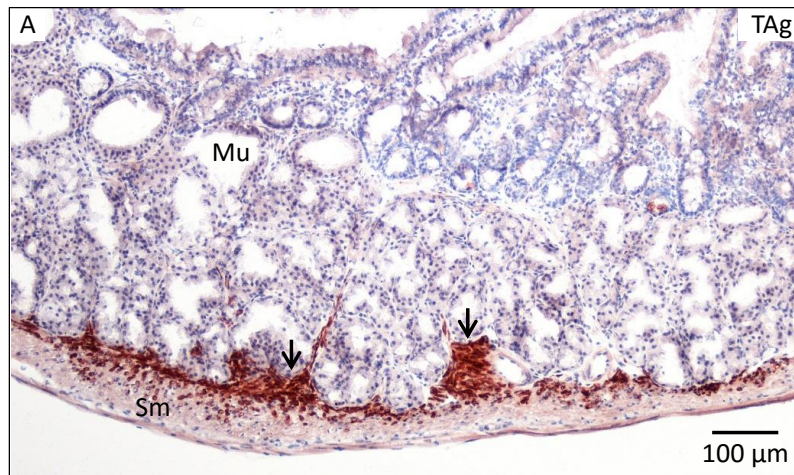


Abbildung 27: SV40-T-Antigen-positive Tumorzellen der *Muscularis mucosae* infiltrieren die Mukosa der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen mit anti-TAg-Antikörpern von Kryoschnitten der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion von CEA424-TAg-Mäusen im Alter von 59 d (A), 83 d (B) und 100 d (C). Man beachte in jüngeren Mäusen (A) die Lokalisation eines Großteils der Tumorzellen in der *Muscularis mucosae* über der Submukosa (Sm), während die Tumorzellen in älteren Mäusen hauptsächlich in lumennäheren Schichten der Mukosa (Mu) zu finden sind (Pfeile; B, C).

4.1.4.2 Tumorzellen der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion der *Muscularis mucosae* exprimieren kein c-KIT

Die infiltrativ wachsenden SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen in der *Muscularis mucosae* der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion zeigten eine große morphologische Ähnlichkeit zu interstitiellen Cajalzellen (ICC). ICC, mögliche Ausgangszellen für die Entstehung von GIST, exprimieren das Protoonkogen *c-Kit* (Hirota et al., 1998; Huizinga et al., 1995). Um zu untersuchen, ob die SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen der *Muscularis mucosae* in Relation zu interstitiellen Cajalzellen stehen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen den ICC-Marker c-KIT angefertigt. Ein möglicher Ursprung der Tumorzellen aus ICCs sollte anhand dieser Färbungen überprüft werden. Es wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen SV40-T-Antigen und c-KIT angefertigt. Als Positivkontrolle der Färbung dienten die ICC, die im Gastrointestinaltrakt in der *Muscularis propria* und um den myenterischen Plexus lokalisiert sind. Wie erwartet ließen sich ICC in der Fluoreszenzfärbung spezifisch mit dem Antikörper für c-KIT färben (Abbildung 28). Es konnte jedoch keine Koexpression mit c-KIT in den T-Antigen-positiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Die spindelförmigen Tumorzellen waren bei 59 d alten Mäusen innerhalb der *Muscularis mucosae* lokalisiert. Die Zellschicht war ein- bis zweilagig und infiltrierte an manchen Stellen bereits die *Lamina propria* der Mukosa. Bei älteren Mäusen (100 d) war die Infiltration der Mukosa durch die Tumorzellen bereits weiter in lumennähere Regionen fortgeschritten. Die Zellen schienen im Vergleich zu den jüngeren Mäusen dorthin zu migrieren. Auch hier war keine Koexpression der SV40-T-Antigen-positiven Zellen mit c-KIT nachweisbar. Die Schichten der jeweiligen Zellentitäten konnten klar voneinander abgegrenzt werden. Somit besteht kein Hinweis auf einen Ursprung der SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen aus ICC, in der Annahme, dass c-KIT-Expression als typisches Merkmal nach Transformation durch SV40-T-Antigen beibehalten wird.

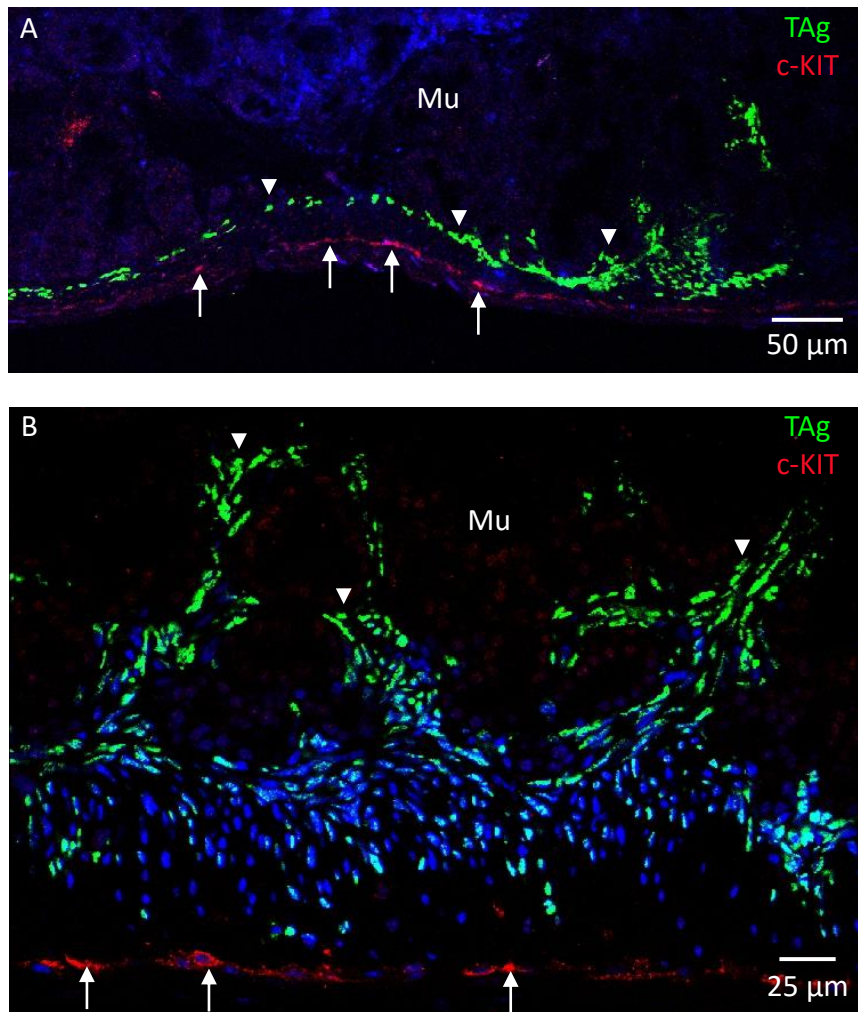


Abbildung 28: SV40-T-Antigen-positive Tumorzellen lassen sich klar von interstitiellen Cajalzellen abgrenzen. Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion von CEA424-TAg-Mäusen. In der *Muscularis propria* des Duodenums liegen die interstitiellen Cajalzellen (c-KIT-positive Zellen mit roter Fluoreszenz, Pfeile). Bei der 59 d alten Maus (A) liegen die spindelförmigen SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen (grüne Fluoreszenz, Pfeilspitzen) fast ausschließlich direkt oberhalb der Submukosa in der *Muscularis propria*. Bei der 100 d alten Maus (B) zeigt sich eine deutliche Infiltration des Mukosa (Mu) des Duodenums. Die Kerne wurden mit ToPro-3 gefärbt und erscheinen blau.

4.1.4.3 Tumorzellen der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion der *Muscularis mucosae* exprimieren kein PDGFRA

Neben den interstitiellen Cajalzellen wurden Zellen der Nervenplexus der *Muscularis propria* beschrieben, die nicht c-KIT, sondern PDGFRA exprimieren. PDGFRA ist ein Onkoprotein, welches in den GIST eine Mutation aufweist, in denen *c-KIT* nicht mutiert ist (Heinrich et al., 2003). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Zellen und den SV40-T-Antigen-positiven Zellen zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen SV40-T-Antigen sowie PDGFRA angefertigt (Abbildung 29).

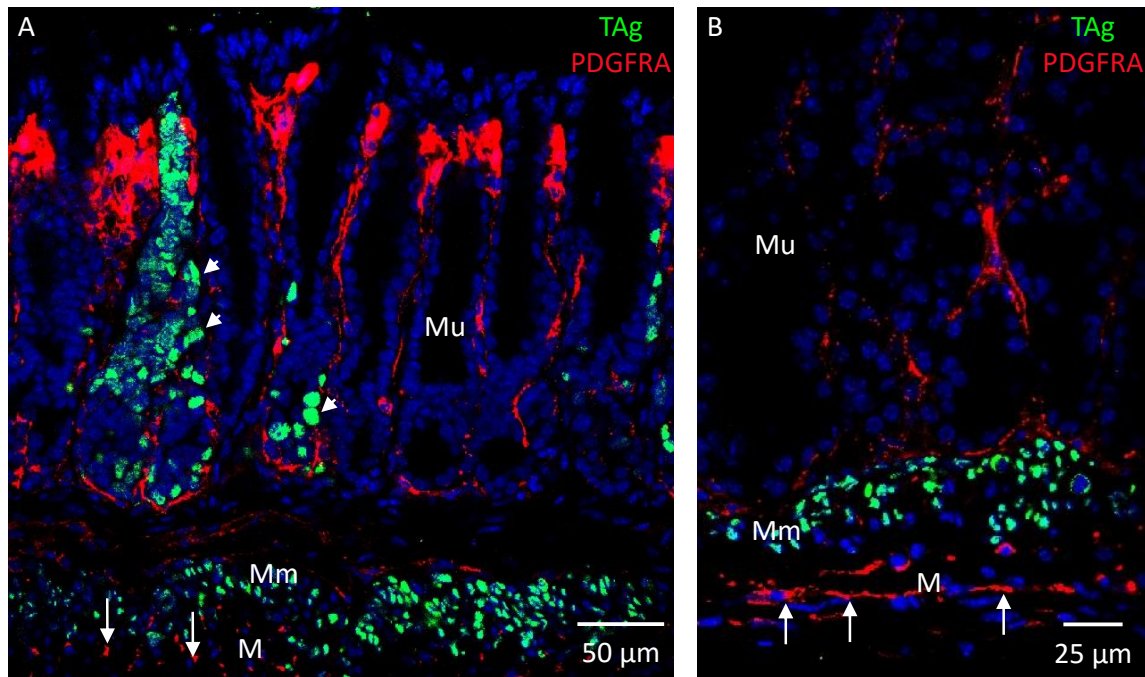


Abbildung 29: SV40-T-Antigen-positive Tumorzellen lassen sich klar von PDGFRA exprimierenden Zellen abgrenzen. Zur Darstellung von PDGFRA (rote Fluoreszenz) und SV40-T-Antigen (grüne Fluoreszenz) wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten der Pylorus-Duodenum-Übergangsregion von 41 d (A) und 59 d alten CEA424-TAG-Mäusen (B) angefertigt. In der *Muscularis propria* (M) liegen quer (A, Pfeile) sowie längs (B, Pfeile) angeschnitten die PDGFRA-positiven Nervenplexuszellen. Es ist keine Koexpression von PDGFRA in SV40-TAG-positiven Tumorzellen (A, kurze Pfeile) der Mukosa (Mu) sowie der *Muscularis mucosae* (Mm) erkennbar. Blau: ToPro3 gefärbte Kerne.

Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen der Pylorusregion kein PDGFRA exprimieren. Dies macht eine Relation zwischen diesen beiden Zellentitäten bzw. einen möglichen Ursprung der Tumorzellen aus den PDGFRA-positiven Nervenplexuszellen unwahrscheinlich, wieder unter der Voraussetzung, dass eine solche Eigenschaft durch SV40-T-Antigen-Expression nicht verlorengeht.

4.2 Eingrenzung der Tumorstammzelle des CEA424-TAG-Karzinoms

4.2.1 Subpopulationen der CEA424-TAG-Tumorzelllinien besitzen Stammzeleigenschaften

Die Fähigkeit von Tumorstammzellen, sich selbst zu erneuern sowie zu differenzieren, kann im *colony formation assay* abgebildet werden (siehe 1.5.2). *In vitro* zeigt sich dies durch die Bildung von Kolonien mit heterogener Morphologie, sogenannter Holo- und Paraklone. Nur die sehr kompakt wachsenden Holoklone, die in der Regel nur von einer Subpopulation maligner Zelllinien gebildet werden können, besitzen die Kapazität zur Selbsterneuerung und stellen somit vermutlich Tumorstammzellen dar (Locke et al., 2005).

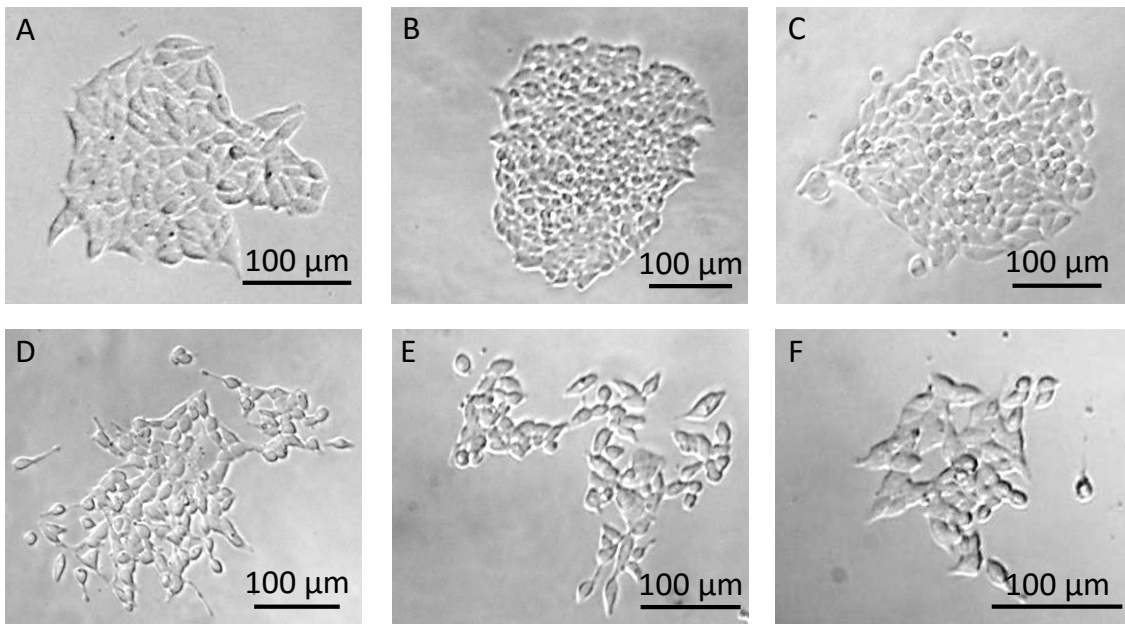


Abbildung 30: Nachweis von Kolonien unterschiedlicher Morphologie in den mGC8-Magenkarzinomzelllinien. Dargestellt sind die unterschiedlichen Koloniemorphologien nach 22 Tagen. Beispiele für Holoklone mit kompakt wachsenden, adhärennten Zellen (A, B, C) und Paraklone mit einem lockeren Verband häufig spindelförmiger Zellen (D, E, F).

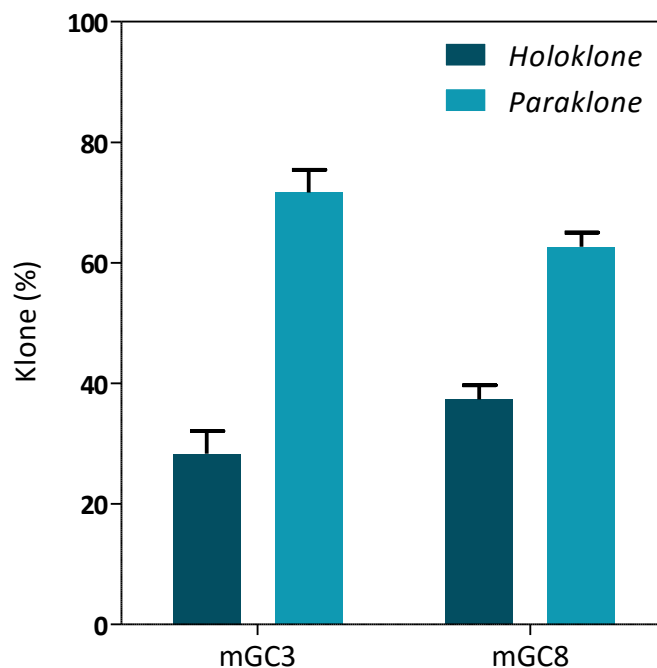


Abbildung 31: mGC-Magenkarzinomzelllinien enthalten einen hohen Anteil an Holoklonen. Ausgesät wurden zu Beginn des Experiments absteigende Zellkonzentrationen von 2000 – 16 Zellen pro well in einer 96-well-Platte. Die Kolonien mit Holoklon- und Paraklon-Morphologie wurden nach 20 Tagen separat ausgezählt. Ausgewertet wurden je 10 wells mit einer Anfangskonzentration von 63 Zellen pro well. Bei dieser Konzentration war die Zahl der gebildeten Klone nicht zu hoch, um zu verschmelzen und die Dichte der Zellen ausreichend, um genug Wachstumsreize zum Zellwachstum bekommen. In den ausgezählten wells war die Klonierungseffizienz 50 % (mGC3) sowie 36 % (mGC8). Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von potentiellen Tumorstammzellen wurden die Magenkarzinomzelllinien mGC3 und mGC8 mit Hilfe des *colony formation assays* untersucht (Abbildung 30). Beide Linien bildeten nach Aussaat in niedriger Dichte nach 4 Tagen erste Kolonien aus. Hier konnte bereits ein Unterschied in der Morphologie der Kolonien nachgewiesen werden. Diese blieb im Verlauf konstant. Kolonienmischformen, sogenannte Meroklone, waren nur vereinzelt vorhanden. Sie wurden den Paraklonen zugeordnet. Im Verlauf vergrößerten sich die Holoklone deutlich, während die Paraklone im Wachstum annähernd stagnierten. Nach 20 Tagen war der Anteil an Holoklonen $28 \pm 6,5 \%$ in mGC3 bzw. $37 \pm 4 \%$ in mGC8 (Abbildung 31).

4.2.2 mGC-Zellen exprimieren potentielle Tumorstammzellmarker

Zur Klärung der Frage, ob CEA424-TAg-Tumorzelllinien aus der Literatur bekannte Tumorstammzellmarker exprimieren (vgl. 1.4), wurde die Expression der Gene für Kandidatenmarker auf mGC-Zellen mittels Transkriptomanalyse untersucht (Abbildung 16, Abbildung 32). Die Daten hierzu wurden freundlicherweise von Fritz Ihler und Georg Enders zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

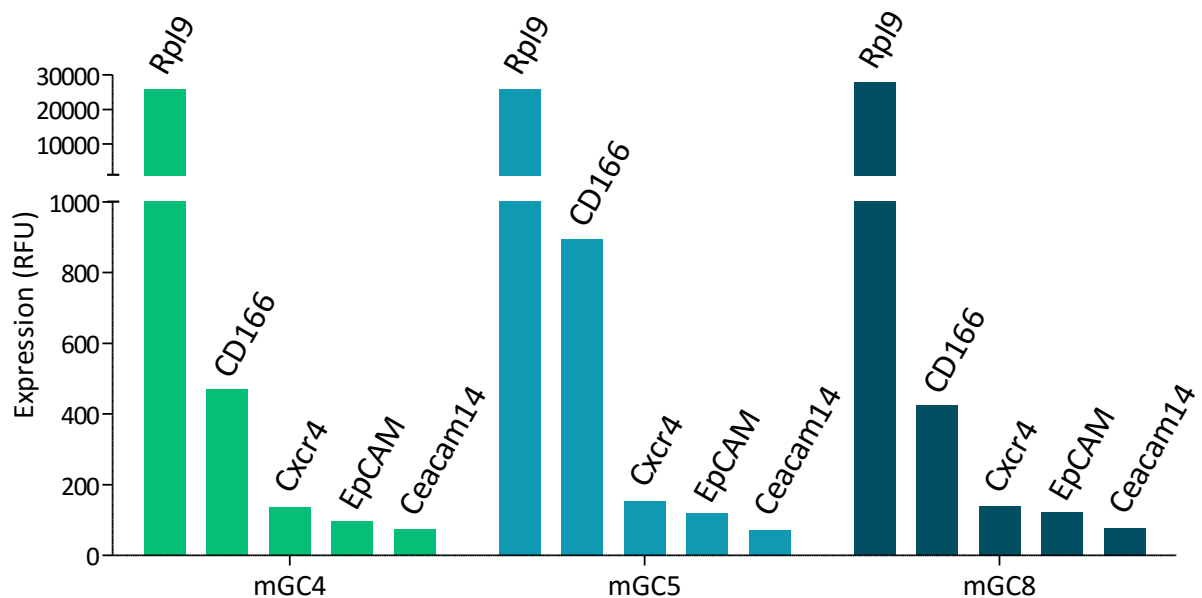


Abbildung 32: CD166, CXCR4 und EpCAM lassen sich auf mRNA-Ebene in mGC-Zellen nachweisen. Transkriptomanalyse der Zelllinien mGC4, mGC5 und mGC8 wurde mit Hilfe der Illumina-Plattform durchgeführt (Sentrix Mouse-6 Expression Beadchips (Ihler et al., 2012)). Die mGC-Zellen zeigen ein ähnliches Expressionsprofil der getesteten Gene. Erkennbar ist eine deutliche Expression des konstitutiv exprimierten Gens für Rpl9 (ribosomales Protein L9), welches für Proteinbiosynthese der Zellen benötigt wird. Rpl9 dient in dieser Analyse als Positivkontrolle. Das Gen für Ceacam14 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 14*), ein plazentaspezifisches exprimiertes Gen (Zebhauser et al., 2005), stellt die Negativkontrolle mit einer RFU (relativer Fluoreszenzeinheit) < 80, dar. Die Expression von CD166-mRNA, CXCR4-mRNA sowie EpCAM-mRNA lässt sich in allen drei Zelllinien nachweisen.

Fritz Ihler und Georg Enders konnten in den getesteten mGC-Zellen mittels Oligonukleotid-Microarrayanalyse die Expression der Gene für c-KIT, CXCR4, CD166 und EpCAM nachweisen.

Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob Subpopulationen der CEA424-Tag-Tumorzelllinien mGC3- und mGC8 diese Kandidatenmarker exprimieren. Nach Setzen der optimalen Auswertungsfenster (*Gating*, Abbildung 33) konnten die mittels spezifischer Antikörper gefärbten Zellen analysiert werden.

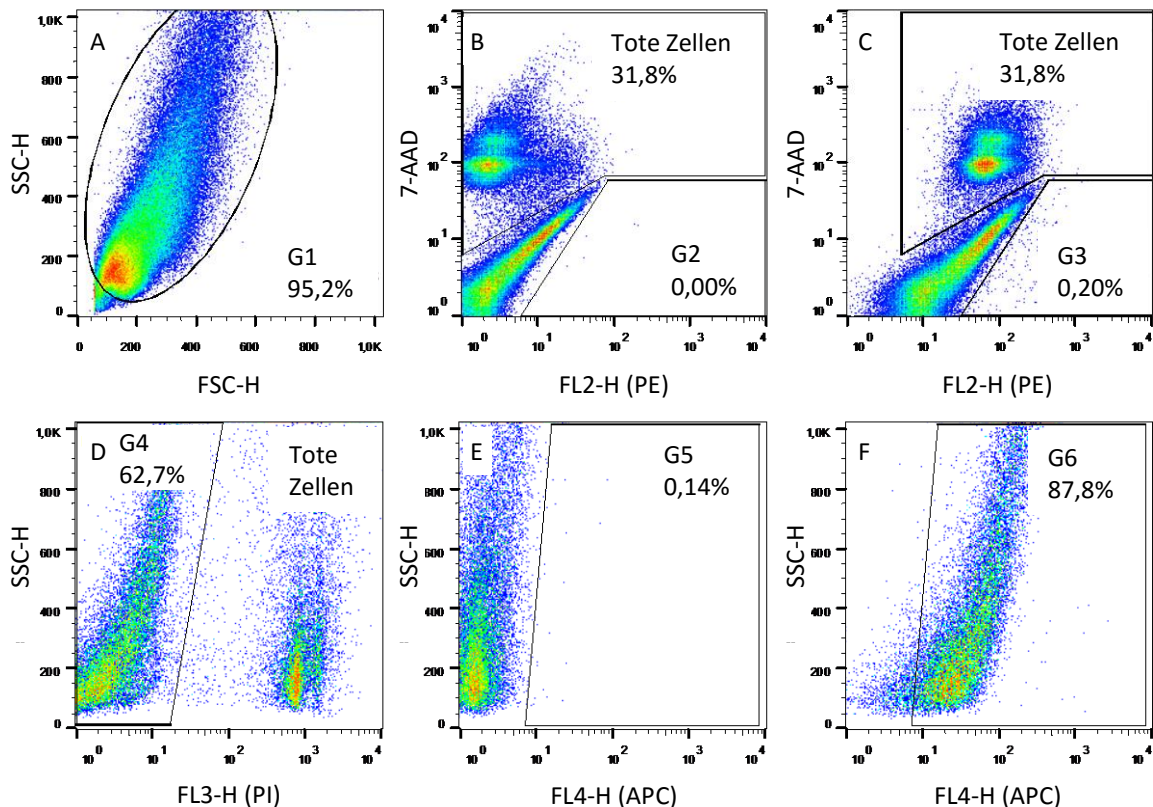


Abbildung 33: *Gating*-Strategie zur Analyse der Magenkarzinomzellen auf CSC-Marker-Expression mittels Durchflusszytometrie. (A) Zuerst wurde die Vorwärtsstreuung (FSC-H) gegen die Seitwärtsstreuung (SSC-H) aufgetragen und die Hauptpopulation ausgewählt (*gate* 1, G1). In der unteren linken Ecke befinden sich kleine Zellbruchstücke, die ausgeschlossen wurden. (B) 7-AAD gefärbte, tote Zellen sollten ebenfalls nicht mit in die Analyse einfließen und wurden im *plot* von FL3-H (7-AAD) gegen FL2-H (PE) dargestellt, ausgeschlossen (tote Zellen) und nicht weiter mitanalysiert. Zur Unterscheidung der Antikörper-positiven Zellen wurden als Kontrolle Zellen mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps inkubiert und dann das *gate* für die positive Population gesetzt (G2). (C) Da die Zellen der mit anti-CXCR4-Antikörpern gefärbten Probe (sowohl die toten, als auch die lebenden Zellen) regelmäßig einen *shift* auf der FL2-H-Achse, also eine leicht erhöhte Fluoreszenz aufwiesen, jedoch nur die stark positive, separate Population im Hinblick auf CXCR4 untersucht werden sollte, wurde dieser *shift* beim Setzen des Marker-positiven *gates* bei Färbungen mit anti-CXCR4-Antikörpern berücksichtigt. Der Anteil stark positiver Zellen (stark positive Subpopulation, G3) konnte in der gefärbten Probe so mit dem in der Isotypkontrolle (B) definierten *gate* bestimmt werden, das entsprechend dem *shift* verschoben wurde. Für die Analyse aller weiteren Oberflächenmarker mittels APC-markierter Primärantikörper wurden die Zellbruchstücke in gleicher Weise ausgeschlossen, wie unter A dargestellt. Da hier keine separaten stark positiven Subpopulationen gefunden wurden, wurden jeweils die Marker-positivsten Zellen analysiert. (D) Propidiumiodid-gefärbte, tote Zellen (FL3-H) wurden gegen SSC-H aufgetragen, um wiederum die toten Zellen auszuschließen (G4). (E) Anschließend wurde mittels Isotypkontrollen für jeden Antikörper ein *gate* gesetzt (G5). (F) Die mit den zu analysierenden Antikörpern gefärbten Zellen wurden anschließend mit dem in der Kontrolle gesetzten *gate* analysiert (G6).

Die Zelllinien mGC3 sowie mGC8 wurden auf Oberflächenexpression der Marker CXCR4, CD117/c-KIT, EpCAM sowie CD166 hin untersucht. Die Aktivität der intrazellulär lokalisierten Aldehyddehydrogenase (ALDH) wurde mit Hilfe des ALDEFLUOR-Assays bestimmt (Abbildung 34).

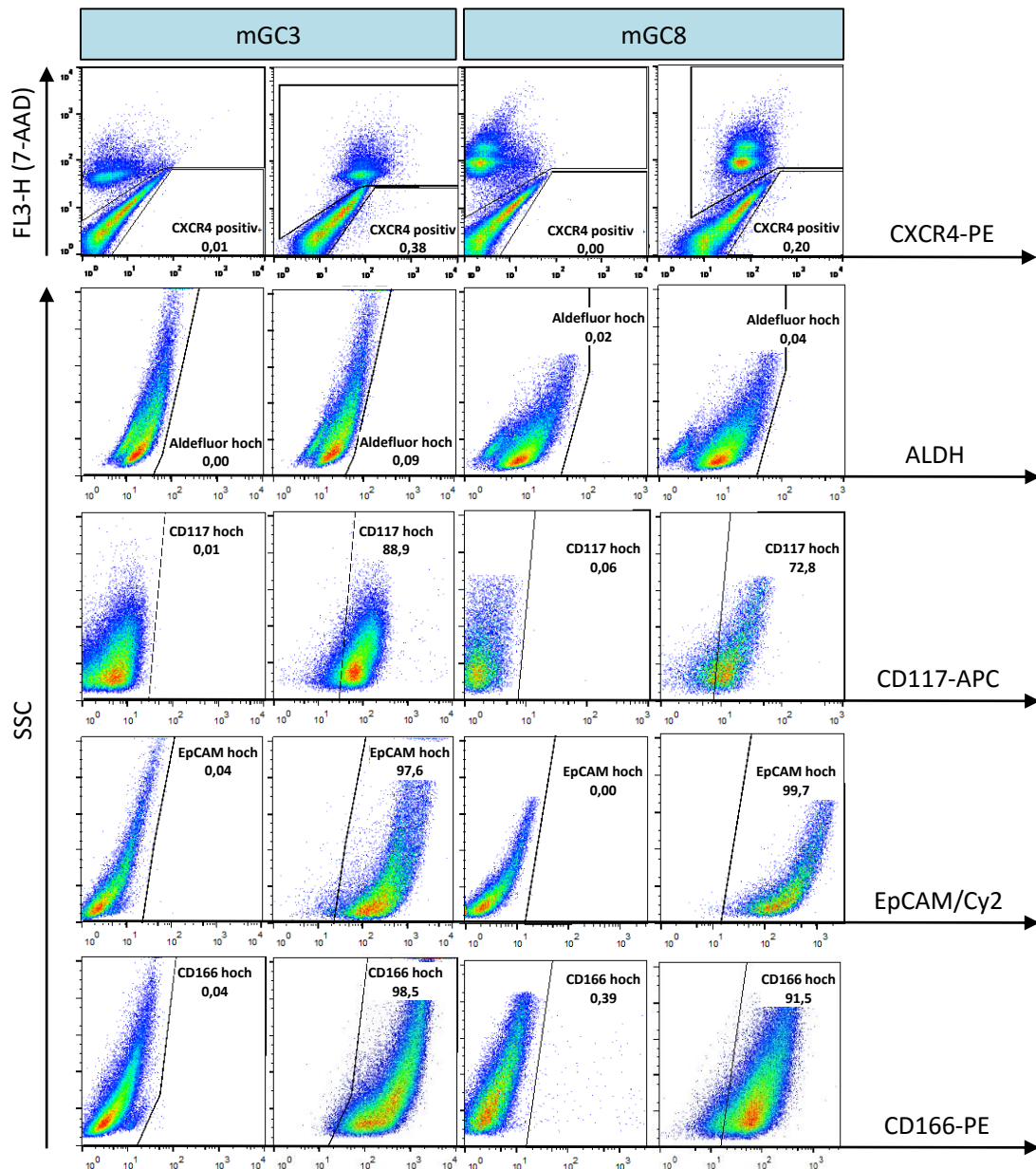


Abbildung 34: Magenkarzinomzelllinien exprimieren potentielle CSC-Marker – CXCR4-positive Zellen bilden eine kleine abgegrenzte Subpopulation. Die Expression der putativen CSC-Marker in mGC3 sowie mGC8 wurde nach Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Marker bzw. nach Färbung mit Hilfe des ALDEFLUOR®-Kits (ALDH) mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse sind als dot plots dargestellt. Zum Nachweis CXCR4-positiver Zellen wurde die Fluoreszenz von PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern gegen die von 7-AAD aufgetragen, für ALDH, CD117, EpCAM und CD166 wurde jeweils die Seitwärtsstreueung gegen die Fluoreszenz des jeweiligen Antikörpers dargestellt. Das gating der Zellen erfolgte wie in Abbildung 33 dargestellt. Jeweils linke Spalte: Isotypkontrollen bzw. ALDEFLUOR®-Signal in Gegenwart des ALDH-Inhibitors DEAB, jeweils rechte Spalte: Markerexpressionsanalysen mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern. SSC: Seitwärtsstreueung.

EpCAM sowie CD166 konnten bei beiden Zelllinien stark auf der Oberfläche exprimiert (*mean fluorescence intensity* (MFI) 488 und 590 als repräsentatives Beispiel vs. Isotypkontrolle 7,2 und 11,4) nachgewiesen werden. CD117 wird auf der Zelloberfläche beider Zelllinien weniger stark exprimiert (MFI 161 vs. Isotypkontrolle 8,7). ALDH wird kaum exprimiert (MFI 34,0 vs. Inhibitorkontrolle 23,9). Starkpositive CXCR4-exprimierende Zellen ließen sich als kleine abgegrenzte Subpopulation von dem Rest schwach positiver Zellen in beiden Zelllinien abgrenzen. Es war deutlich erkennbar, dass sich die beiden Zelllinien, wie aufgrund ihrer sehr ähnlichen Transkriptome erwartet (F. Ihler und G. Enders, Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Klinikum der Universität, LMU München), in der Expression der Marker ebenfalls sehr ähnlich sind (Abbildung 35). Aufgrund der in Kultur beobachteten etwas höheren Proliferationskapazität der mGC8-Zellen wurden diese vorrangig in weiteren Versuchen verwendet.

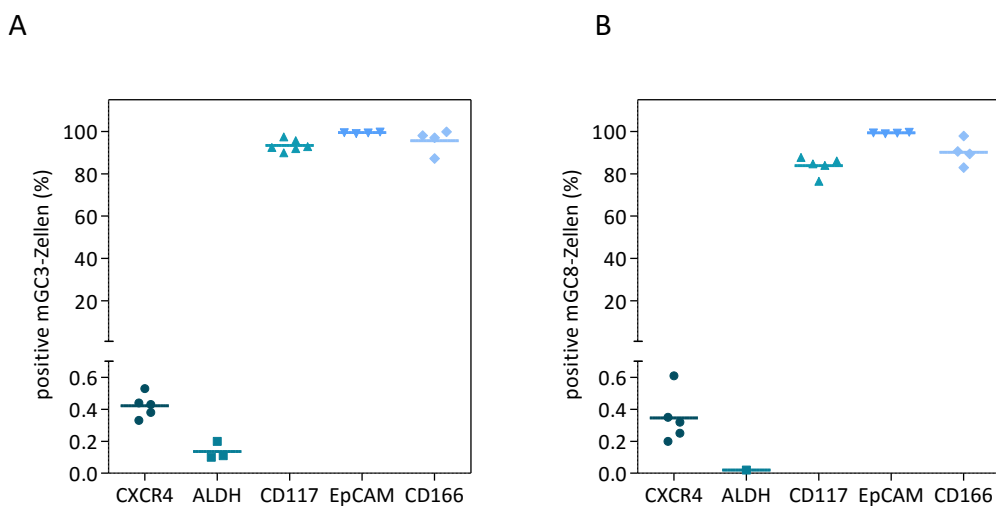


Abbildung 35: mGC3 und mGC8 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster potentieller Tumorstammzellmarker. Dargestellt wurde der Mittelwert des Anteils Marker-positiver Zellen für mGC3 sowie mGC8 (Versuchsdurchführung siehe Abbildung 35). Jeder Punkt steht für je ein unabhängiges Experiment.

CXCR4 war der einzige Marker in diesem Modell, der eine abgegrenzte Subpopulation positiver Zellen, also potentielle Tumorstammzellen, aufwies. Aufgrund dieser Beobachtung und eines möglichen Zusammenhangs interstitieller Cajalzellen mit den zu untersuchenden Tumorzellen schienen CXCR4 und CD117 als ICC-Marker für weitere Analysen am vielversprechendsten.

4.2.3 mGC8-Zellen besitzen die Kapazität zur Tumorbildung in syngenem Mäusen

Anhand vorangegangener Experimente wurden die potentiellen Tumorstammzellmarker CXCR4 sowie c-KIT ausgewählt, um Versuche zur Tumorbildungskapazität der Marker-positiven Tumorzellen durchzuführen. Zuerst sollte die Tumorbildungsfähigkeit von mGC8 überprüft werden. Dazu wurden 30.000, 100.000 sowie 300.000 mGC8-Zellen subkutan in

syngene Mäuse injiziert und das Wachstum der Tumore nachverfolgt. Nach 14 d war bei allen Proben ein Wachstum des Tumors eingetreten. Abbildung 36 zeigt den Zeitpunkt an, an dem die Tumoren ein Volumen von 20 mm^3 erreichten. Mit steigender Zellzahl war die Geschwindigkeit des Tumorwachstums erhöht. Das Erreichen des Tumolvolumens von 20 mm^3 traf umso früher ein, je mehr Zellen injiziert wurden. Bei 300.000 injizierten Zellen erreichte der subkutan gewachsene Tumor bereits nach 5 Tagen ein Tumolvolumen von 20 mm^3 , während er bei nur 30.000 injizierten Zellen 20,5 Tage benötigte.

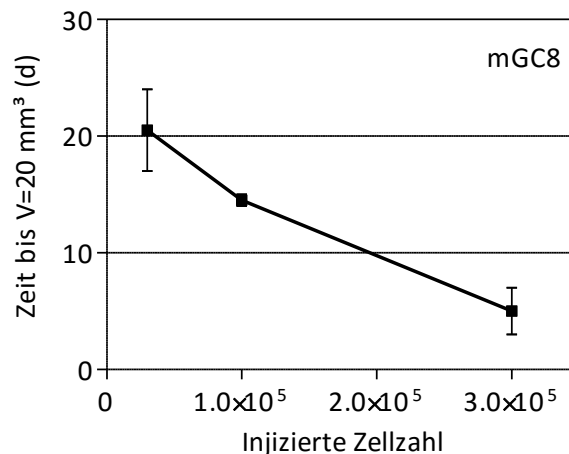


Abbildung 36: Die Wachstumsgeschwindigkeit subkutaner Tumore korreliert mit der injizierten Zellzahl. Dargestellt ist der Zeitpunkt des Erreichens eines Tumolvolumens (V) von 20 mm^3 von subkutan in syngene Mäuse injizierten mGC8-Zellen. Es wurden 30.000, 100.000 sowie 300.000 Zellen injiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n=2$).

4.2.4 CXCR4-positive Tumorzellen bilden früher Tumoren in syngenem Mäusen

Als einer der beiden aussichtsreichsten CSC-Marker nach durchflusszytometrischen Analysen wurde zuerst die Tumorbildungskapazität von $\text{CD117}^{\text{hoch}}$ - bzw. $\text{CD117}^{\text{niedrig}}$ -Subpopulationen untersucht. Dazu wurden mGC8-Zellen nach Färbung mit anti-CD117-APC in eine $\text{CD117}^{\text{hoch}}$ - und $\text{CD117}^{\text{niedrig}}$ -Subpopulation mittels FACS getrennt. Es wurden jeweils die 5 % positivsten sowie die 5 % negativsten Zellen aufgefangen (Abbildung 37 A). Vor der Sortierung wurden tote Zellen, Zellbruchstücke sowie Dubletten (paarweise zusammenklebende Zellen) durch Setzen geeigneter Fenster ausgeschlossen, um ein optimales Sortierergebnis zu erzielen. Analog wurde mit dem CSC-Marker CXCR4 verfahren, der ein weiterer CSC-Kandidatenmarker in diesem Mausmodell war. Im Gegensatz zu CD117 konnten bei der Sortierung von CXCR4-exprimierenden mGC8-Zellen eine relativ gut abgegrenzte CXCR4-positive Zellpopulation mit Hilfe des MoFlo-Sortierers getrennt und aufgefangen werden (Abbildung 37 B). Da die CXCR4-positive Population unter einem Prozent der Zellen ausmachte, wurde die gesamte Population aufgesammelt. Von der negativen Population wurden nur die negativsten 5 % aufgesammelt (Abbildung 37 B).

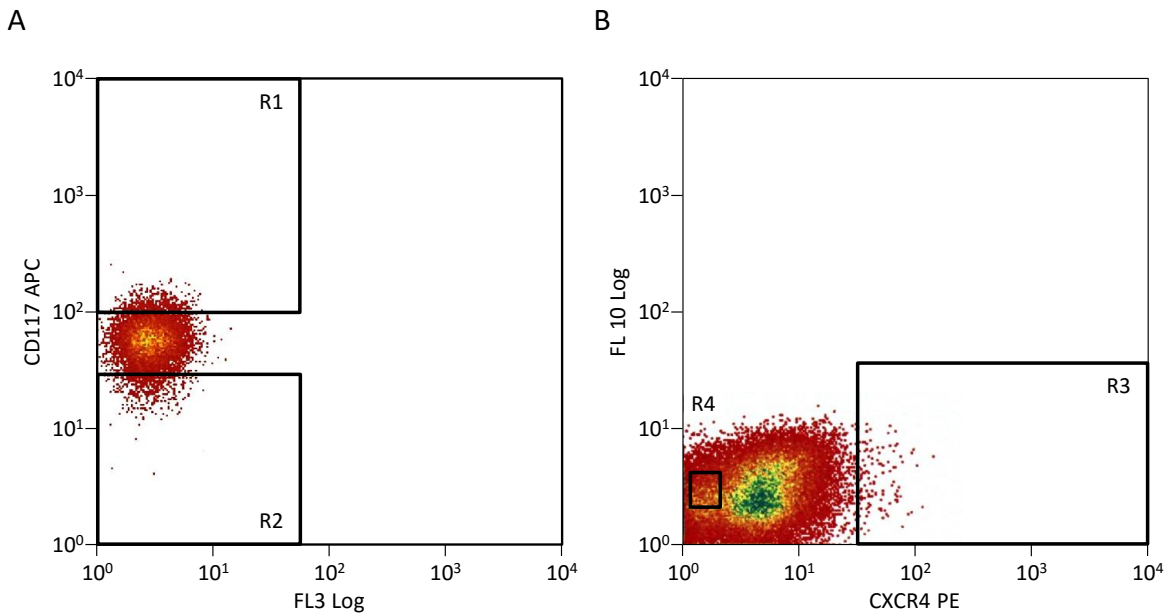


Abbildung 37: Zellsubpopulationen-Sortierung anhand der CSC-Marker CD117 und CXCR4. Nach Färbung von mGC8-Zellen mit anti-CD117- (A) bzw. anti-CXCR4-Antikörpern (B) wurden CD117^{hoch}- (R1) und CD117^{niedrig}-Subpopulationen (R2) sowie CXCR4-positive (R3) und CXCR4-negative Zellen (R4) sortiert.

Nach Überprüfung der Vitalität der Zellen sowie Bestimmung der Zellzahl wurden die jeweiligen Subpopulationen in unterschiedlichen Konzentrationen mit Matrigel® versetzt und subkutan in syngene C57BL/6-Mäuse injiziert. Beide injizierten Zellsubpopulationen (CD117^{hoch} bzw. CD117^{niedrig}) waren in der Lage, unabhängig von der verwendeten Zellzahl (zwischen 1.200-200.000), Tumore in syngenen Mäusen zu bilden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Tumorbildung von CD117^{niedrig}- und CD117^{hoch}-mGC8-Subpopulationen 30 Tage nach Injektion in syngene Mäuse

Injizierte Zellzahl	Probenanzahl CD117 ^{niedrig} -Zellen	Tumorstadium nach 30 Tagen (%)	Probenanzahl CD117 ^{hoch} -Zellen	Tumorstadium nach 30 Tagen (%)
1.200	4	4/4 (100)	4	4/4 (100)
6.600	3	3/3 (100)	3	3/3 (100)
10.000	2	2/2 (100)	2	2/2 (100)
16.000	2	2/2 (100)	2	2/2 (100)
30.000	2	2/2 (100)	2	2/2 (100)
100.000	2	2/2 (100)	2	2/2 (100)
200.000	1	1/1 (100)	2	2/2 (100)

Tabelle 9: Tumorbildung von CXCR4-positiven und CXCR4-negativen mGC8-Subpopulationen 30 Tage nach Injektion in syngene Mäuse

Injizierte Zellzahl	Probenanzahl CXCR4 ⁻ -Zellen	Tumorstadium nach 30 Tagen (%)	Probenanzahl CXCR4 ⁺ -Zellen	Tumorstadium nach 30 Tagen (%)
1.000	12	0/12 (0,0)	11	3/11 (27,3)
10.000	8	4/8 (50,0)	8	7/8 (87,5)

Die Tumorstadiumskurven der CD117^{hoch}- bzw. CD117^{niedrig}-Subpopulationen wiesen keinen Unterschied in Tumorercheinungen oder Wachstumsgeschwindigkeit auf (Abbildung 38 A, B). Eine deutlich gesteigerte Tumorstadiumsgeschwindigkeit zeigte jedoch die CXCR4-positive Subpopulation. Nach Injektion von 1.000 bzw. 10.000 CXCR4-positiven mGC8-Zellen konnte 30 d nach Injektion vermehrt Tumorbildung im Vergleich zur Tumorbildung von CXCR4-negativen Zellen beobachtet werden. Werden (Tabelle 9) Die durchschnittliche Tumorstadiumgröße 50 d nach Injektion von 10.000 Tumorstadiumzellen war bei CXCR4-positiven mGC8-Zellen mit 146 mm³ mehr als doppelt so groß wie bei CXCR4-negativen mGC8-Zellen mit nur 68 mm³ (Abbildung 38 D). Bei Abschluss des Experiments war die Tumorstadiumgröße der CXCR4-positiven Subpopulation signifikant erhöht im Vergleich zur CXCR4-negativen Subpopulation. Bei niedriger Zellzahl (1.000 injizierte Zellen) zeigte sich initial ein früherer Beginn des Tumorstadiumwachstums bei der CXCR4-positiven Subpopulation (Tabelle 9). Dieser Unterschied in der Tumorstadiumwachstumsgeschwindigkeit blieb im Verlauf nicht bestehen. Die Wachstumskurven bei nur 1.000 injizierten Zellen waren für beide Subpopulationen praktisch identisch (Abbildung 38 C).

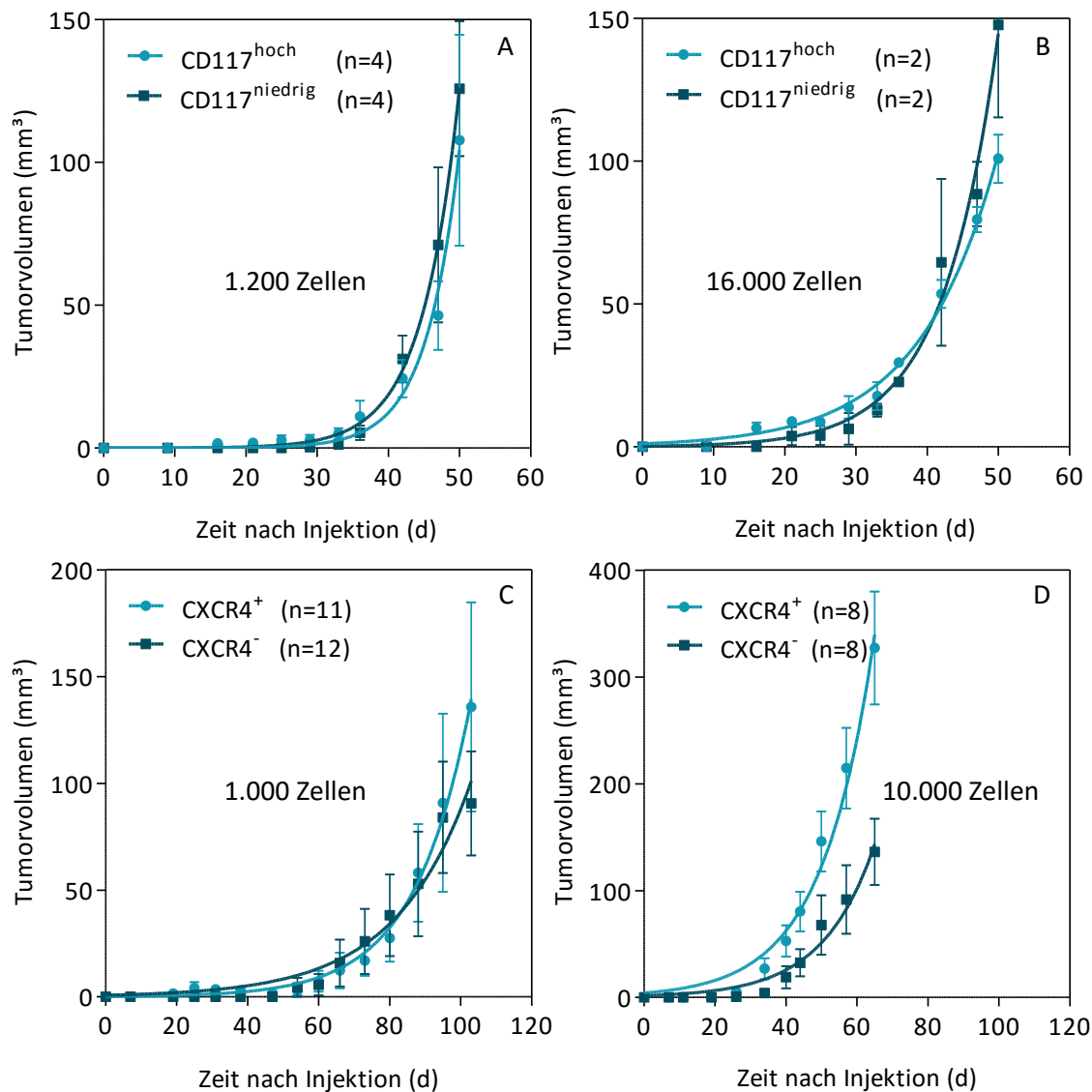


Abbildung 38: Tumorbildungsvermögen von CSC-Marker-positiven und -negativen mGC8-Subpopulationen. Dargestellt sind Wachstumskurven von Tumoren aus subkutan injizierten mGC8-Zellen. Tumore der Subpopulationen CD117^{hoch} bzw. CD117^{niedrig} hatten einen Beobachtungszeitraum von 50 d. Tumore entstanden aus der CXCR4⁺- bzw. CXCR4⁻- Subpopulation wurden bis zu 103 d beobachtet. Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven nach Injektion von je 1.200 bzw. 16.000 (CD117; A und B) sowie 1.000 bzw. 10.000 Zellen (CXCR4; C und D). Die Tumorumfänge nach Injektion von 10.000 injizierten CXCR4⁺-Zellen sind bei Abschluss des Experiments (65 d) statistisch signifikant größer im Vergleich zur CXCR4⁻-Subpopulation ($p=0,037$). Bei niedriger Zellzahl (1.000 injizierte Zellen) konnte bei CXCR4 bei Abschluss des Experiments (103 d) kein Unterschied in den Tumorumfängen gezeigt werden ($p=0,37$). Die Wachstumskurven der CD117^{hoch}- bzw. CD117^{niedrig}-Zellen zeigten jeweils über den gesamten Versuchszeitraum von 50 d keinen signifikanten Unterschied (1.200 injizierte Zellen: $p=0,70$, 16.000 injizierte Zellen: $p=0,30$). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler.

4.2.5 Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen für die Inhibition von mGC3 und mGC8 durch Imatinib und Epirubicin

Da erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika eine der charakteristischen Eigenschaften von Tumorstammzellen ist, sollte es unter Behandlung der Magenkarzinomzelllinien mit Chemotherapeutika zur Anreicherung der

Tumorstammzellpopulationen kommen, während differenzierte Nichtstammzell-Tumorzellen vermehrt absterben oder in ihrer Proliferation gehemmt werden. Um dies zu überprüfen, kann die resistente Zellpopulation anschließend auf die Expression von Tumorstammzellmarkern hin untersucht werden. Um putative Tumorstammzellen durch Behandlung mit dem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Imatinib sowie dem Anthracyclin Epirubicin anreichern zu können, sollte zuerst die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der beiden Therapeutika im Zellvitalitätsassay bestimmt werden. IC_{50} wurde gewählt, um einerseits eine ausreichend hohe Konzentration an Chemotherapeutika zu verwenden, um einen Effekt sehen zu können, also resistente Zellen anreichern zu können. Andererseits sollten genügend Zellen überleben, damit die Bildung einzelner resistenter Zellen durch Mutationen verhindert wird. Es wurden mGC3- sowie mGC8-Zellen für 72 h mit aufsteigenden Therapeutika-Konzentrationen behandelt. Anschließend konnte mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Assays die Vitalität der Zellen bestimmt und die IC_{50} -Werte aus den Kurven abgelesen werden (Abbildung 39).

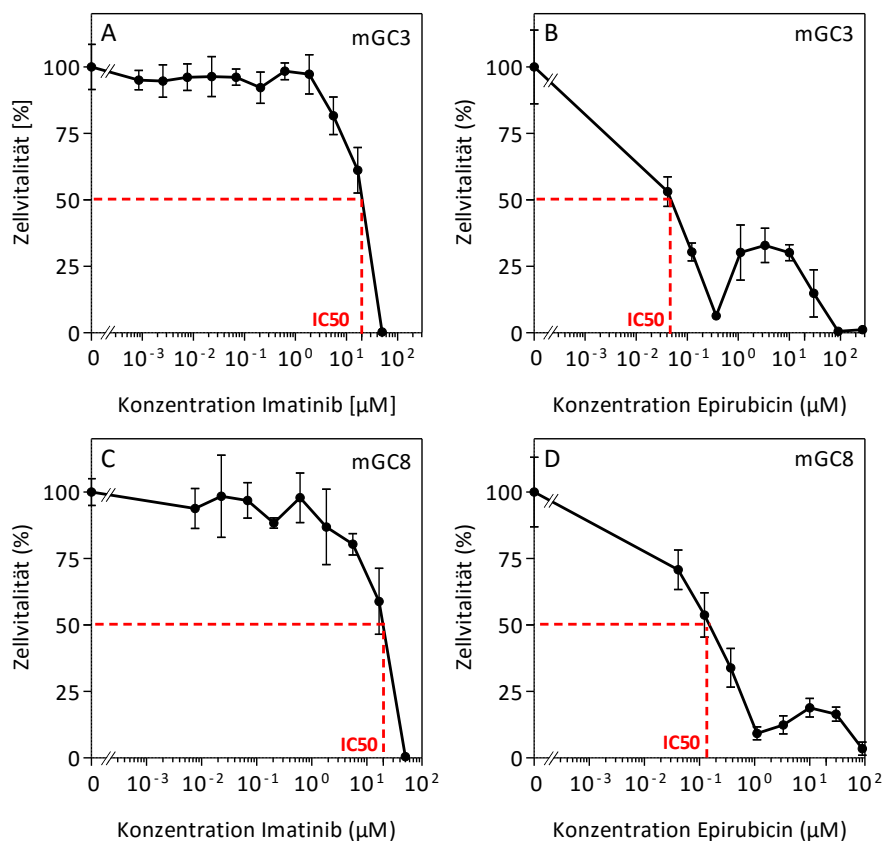


Abbildung 39: Inhibition der Zellvitalität von mGC3 und mGC8 durch Imatinib und Epirubicin. Die Zellen wurden 72 h mit den angegebenen Konzentrationen behandelt und ihre Vitalität mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Assays relativ zu Zellen ohne Hemmstoff bestimmt und die Vitalität dieser als 100%ige Vitalität definiert. Aufgetragen wurden Mittelwerte aus je 3 Messungen mit Standardfehler. Die roten gestrichelten Linien geben die IC_{50} -Werte an.

Unter Imatinibbehandlung ergaben sich für mGC3 und mGC8 IC_{50} -Werte von jeweils 17 μ M. Die Sensitivität der mGC-Zellen für Imatinib war damit deutlich geringer als bei anderen gastrointestinalen Tumorzelllinien beobachtet. Imatinib-sensitive Zelllinien weisen im Vergleich dazu IC_{50} -Werte zwischen 1 nM-1 μ M auf (Dupart et al., 2009; Gupta et al., 2010; Sakurama et al., 2009). Nach Entfernen des Inhibitors erholte sich ein Großteil der Zellen. Gegenüber Epirubicin erwiesen sich mGC3 sowie mGC8 als deutlich sensibler. Nach 72 h Inkubation mit IC_{50} -Konzentrationen dieses Chemotherapeutikums konnte sich nur ein geringerer Anteil der Zellen erholen und weiter proliferieren. Die Dosis-Wirkungskurven für Epirubicin zeigten einen unerwarteten biphasischen Verlauf (Abbildung 38 C, D), deren Ursache nicht weiter untersucht wurde. Möglicherweise interferiert die Fluoreszenz des in DNA interkalierten Epirubicins mit der bei 560/590 nm gemessenen Fluoreszenz des im CellTiter Blue-Assay gebildeten Farbstoffs. Dies könnte den Anstieg der Fluoreszenz bei höheren Epirubicin-Dosen erklären. Möglicherweise ist der erneute Fluoreszenzabfall bei Konzentrationen > 10 μ M durch den DNA-Abbau in apoptotischen/nekrotischen Zellen bedingt. Die IC_{50} von mGC3 mit 0,05 μ M gegenüber Epirubicin war etwas niedriger als die IC_{50} von mGC8 mit 0,13 μ M. Generell proliferierten die mGC8-Zellen schneller, mussten häufiger gesplittet werden und erwiesen sich als robuster als die mGC3-Zellen.

4.2.6 Resistente Tumorzellen exprimieren verstärkt den Tumorstammzellmarker CXCR4

Der Tumorstammzellmarker CXCR4 erwies sich aufgrund der starken Expression in einer abgegrenzten Zellpopulation der mGC-Zellen sowie der signifikant erhöhten Tumorbildungskapazität *in vivo* als interessantester Kandidatenmarker zur weiteren Analyse. Da Tumorstammzellen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika besitzen, sollte nun die Resistenz der CXCR4-positive Subpopulation gegenüber den beiden Tumortheraeutika untersucht werden. Die Expression des Markers wurde in resistenten Magenkarzinomzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Im Durchflusszytometer zeigte sich für mGC3 und mGC8 eine deutliche Anreicherung der CXCR4-positiven Zellpopulation nach Behandlung mit Imatinib sowie mit Epirubicin (Abbildung 40). Die Selektion von resistenten Zellen wurde für beide Chemotherapeutika mindestens dreimal wiederholt. Es zeigte sich durchgehend eine erhöhte Expression von CXCR4 in der resistenten Population, sowohl unter Imatinib als auch unter Epirubicin. In Abbildung 41 sind die Ergebnisse aller durchflusszytometrischen Analysen zusammengefasst. Für mGC3 bzw. mGC8 kam es unter Imatinibtherapie zu einer 2,6-fachen bzw. 2,2-fachen Anreicherung der CXCR4⁺-Zellen. Unter Epirubicin wurde die CXCR4-Expression um das 1,8-Fache für mGC3 und sogar um das 4-Fache für mGC8 gesteigert. CXCR4 wird von der resistenten Zellpopulation verstärkt exprimiert. Dies unterstützt die

bisherigen Ergebnisse, dass CXCR4 einen geeigneten Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen im CEA424-SV40-T-Antigen Magenkarzinommodell darstellt.

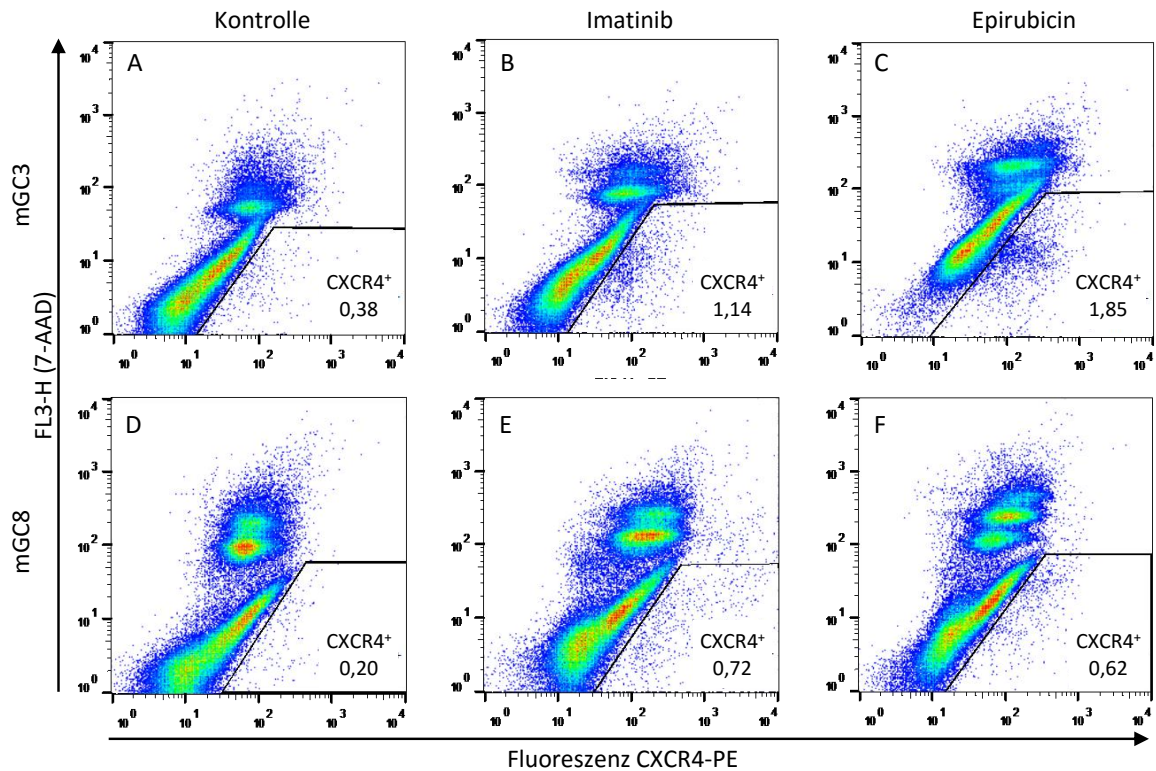


Abbildung 40: CXCR4-positive Zellen sind resistenter gegen Chemotherapeutika. Der Gehalt an CXCR4-positiven Zellen von mGC3- (A, B, C) sowie mGC8-Zellen (D, E, F) ohne Einwirkung von Chemotherapeutika (A, D), mit dreitägiger Inkubation mit Imatinib (B, E) bzw. Epirubicin (C, F) wurde durch Durchflusszytometrie mittels PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern bestimmt. Es wurde jeweils die IC₅₀ verwendet. Der Anteil der positiven Zellen ist in % angegeben. Beispielhaft sind die Ergebnisse eines Versuchs von 3 identisch durchgeführten Versuchen dargestellt. Das Fenster mit positiven Zellen wurde wie in Abbildung 33 dargestellt gesetzt.

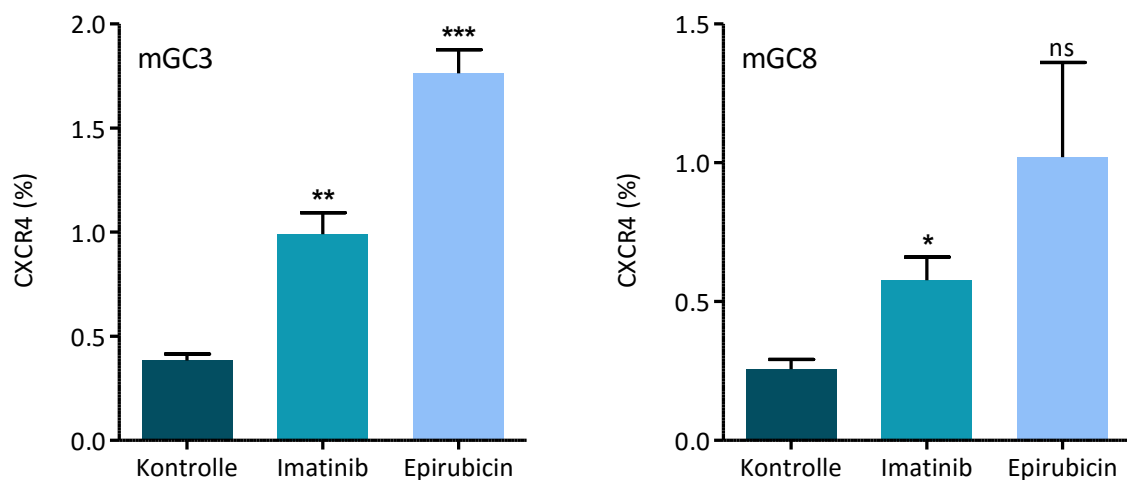


Abbildung 41: Unter Hemmstoffbehandlung kommt es zur Anreicherung der CXCR4-positiven Subpopulation in mGC-Zellen. Nach 72 h Inkubation von mGC3 bzw. mGC8 mit Imatinib oder Epirubicin (IC₅₀) nimmt der Anteil CXCR4-positiver Zellen signifikant in der Population überlebender Zellen zu. mGC3: p (Imatinib) = 0,005, p (Epirubicin) = 0,0003; mGC8: p (Imatinib) = 0,024, p (Epirubicin) = 0,09. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils 3 unabhängigen Messungen mit Standardfehler.

4.2.7 Resistente Tumorzellen exprimieren vermindert CD117 unter Imatinib-Behandlung

CD117-hochexprimierende Zellen zeigten in vorangegangenen Experimenten *in vivo* keine verbesserte Tumorbildungskapazität. Des Weiteren zeigten sich CXCR4-positive Zellen sowohl in der CD117^{hoch}-Population als auch in der CD117^{niedrig}-Population (Abbildung 42). Daher stellt CD117 in diesem Modell wahrscheinlich keinen adäquaten Marker für Tumorstammzellen dar.

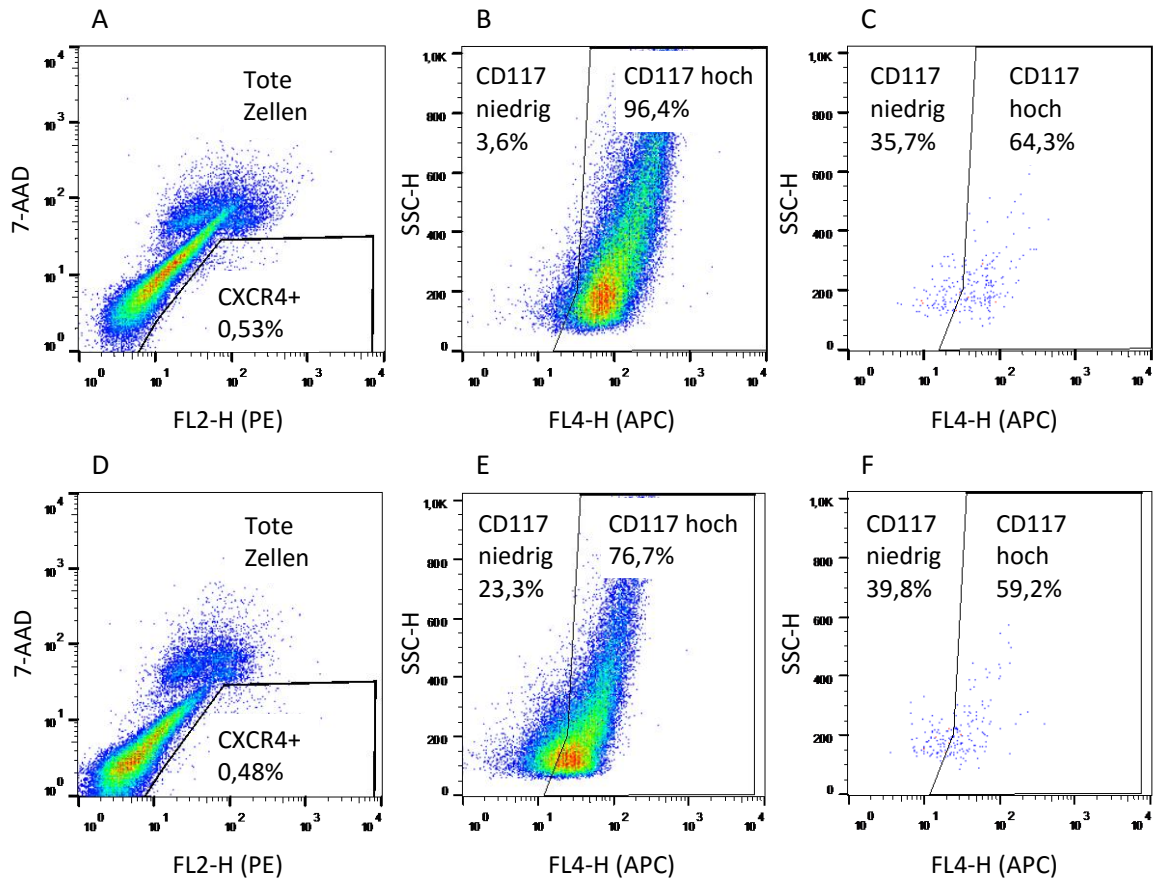


Abbildung 42: CXCR4-positive Zellen weisen unterschiedliche CD117-Expression auf. Durchflusszytometrie-Analysen des Gehalts an CXCR4-positiven Zellen innerhalb der CD117^{hoch}- sowie der CD117^{niedrig}-Population (C, F). Mittels PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern sowie APC-markierten anti-CD117-Antikörpern wurden Doppelfärbungen von mGC3- (A, B, C) sowie mGC8-Zellen (D, E, F) gemacht. Die *gates* für Zellbruchstücke, tote Zellen und positive Populationen wurde wie in Abbildung 33 dargestellt gesetzt. Der Anteil der positiven Zellen ist in % angegeben. (A, D) Anteil lebender CXCR4-positiver Zellen an der gesamten Probe. (B, E) CD117^{hoch}- und CD117^{niedrig}-Population innerhalb lebender Zellen. (C, F) Anteil der CD117^{hoch}- sowie der CD117^{niedrig}-Population innerhalb der CXCR4-positiven Population.

Als Kontrolle wurden die resistenten mGC-Zellen ebenfalls auf die Expression von CD117 hin untersucht. Unter der Annahme, dass CD117 nicht bevorzugt auf CSC exprimiert ist, sollte es zu keiner Anreicherung der CD117-positiven Zellen unter der Behandlung mit Imatinib oder Epirubicin kommen. Tatsächlich zeigte sich unter Imatinibtherapie eine statistisch signifikante, allerdings nur geringe Verminderung der Expression in den mGC8-Zellen (Abbildung 43). Die mGC3-Zellen wiesen unter Imatinib ebenfalls eine Verminderung

ihrer CD117-Expression auf, hier kam es jedoch zu einer deutlichen Schwankung der Expression zwischen verschiedenen Experimenten und dadurch zu keiner signifikanten Änderung. Epirubicin hatte in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Expression dieses Markers.

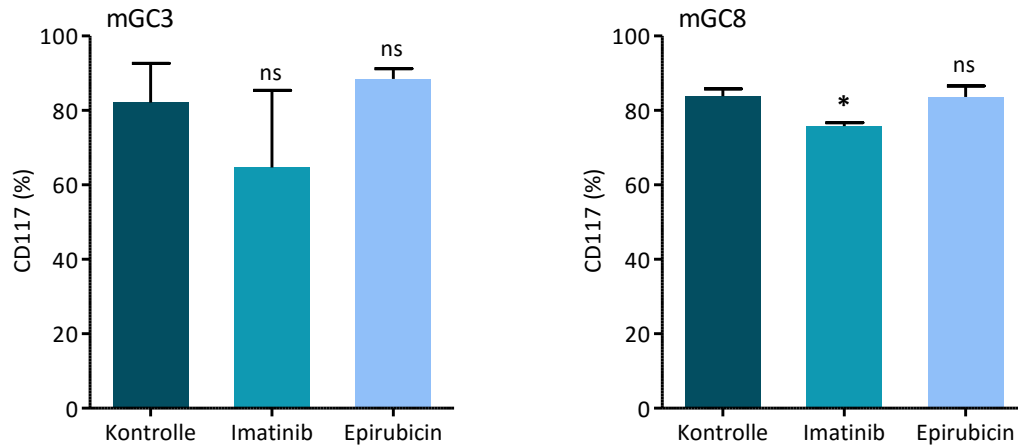


Abbildung 43: Unter Imatinib-Behandlung kommt es zur Abnahme der CD117-Expression in resistenten Magenkarzinomzellen. Analysen mittels Durchflusszytometrie zeigten nach 3-tägiger Inkubation von mGC8 mit Imatinib (IC_{50}) eine signifikante Verminderung des prozentualen Anteils CD117-positiver Zellen (p (Imatinib) = 0,011). Auch mGC3 zeigte eine Verminderung der CD117-Expression nach Inkubation mit Imatinib. Aufgrund großer Schwankungen zeigt sich hier keine signifikante Änderung der Expression (p (Imatinib) = 0,42). Unter 3-tägiger Inkubation mit Epirubicin (IC_{50}) kam es zu keiner signifikanten Änderung der CD117-Expression in mGC3 (p (Epirubicin) = 0,70) und mGC8 (p (Epirubicin) = 0,95). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Messungen mit Standardfehler.

Eine verlängerte Inkubation der mGC3-Zellen mit Imatinib (IC_{50}) zeigte eine weitere starke Abnahme der CD117-Expression (Abbildung 44).

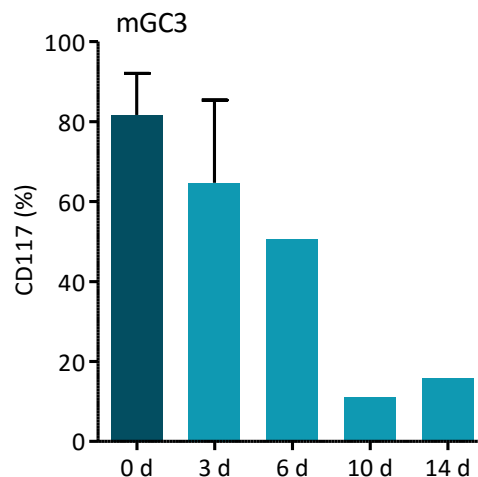


Abbildung 44: Unter andauernder Imatinibbehandlung kommt es zu starker Abnahme der CD117-Expression. Dargestellt sind durchflusszytometrische Messungen des prozentualen Anteils der CD117-positiven lebenden mGC3-Zellen (PI-negativ) nach Behandlung mit Imatinib (IC_{50}) für bis zu 14 d. Der Anteil PI-positiver Zellen nach 14-tägiger Imatinibbehandlung betrug 27,1 %, während in der unbehandelten Gruppe 22,8 % PI-positiv Zellen nachweisbar waren. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 6 (0 d) bzw. 3 (3 d) unabhängigen Messungen mit Standardfehler. Für 6 d, 10 d und 14 d ist jeweils der Messwert angegeben ($n=1$).

4.2.8 Resistente Tumorzellen weisen keine Änderung der Expression von CD166, ALDH und EpCAM auf

Die Expression der CSC-Kandidatenmarker CD166, ALDH und EpCAM nach Behandlung mit Imatinib bzw. Epirubicin ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Keiner dieser Marker zeigte eine statistisch signifikante Expressionsänderung nach Behandlung mit einem der beiden Chemotherapeutika.

Tabelle 10: Die resistenten Tumorzellen zeigen keine Änderung in der Expression von CD166, ALDH und EpCAM. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile (\pm Standardfehler) der markerpositiven Zellen in mGC3 sowie mGC8 nach 3-tägiger Inkubation mit Imatinib bzw. Epirubicin (IC_{50}). Als Kontrolle dienten mitgeführte unbehandelte Zellen. -, nicht durchgeführt.

mGC3	Kontrolle		Imatinib		Epirubicin	
Marker	N	Mittelwert +- SEM	N	Mittelwert +- SEM	N	Mittelwert +- SEM
CD166	4	95,59 \pm 2,84	3	92,77 \pm 6,06	3	86,47 \pm 3,94
ALDH	5	0,35 \pm 0,26	4	0,69 \pm 0,30	1	0,0
EpCAM	6	99,43 \pm 0,18	4	99,48 \pm 0,32	2	99,15 \pm 0,15

mGC8	Kontrolle		Imatinib		Epirubicin	
Marker	N	Mittelwert +- SEM	N	Mittelwert +- SEM	N	Mittelwert +- SEM
CD166	6	92,67 \pm 1,67	3	90,50 \pm 2,69	3	83,27 \pm 7,65
ALDH	-	-	-	-	-	-
EpCAM	2	99,35 \pm 0,05	-	-	2	99,10 \pm 0,10

Zusammenfassend erweist sich CXCR4 als guter Marker zur Identifikation von resistenten Tumorzellen sowie für Zellen, die Vorteile in der Tumorbildungskapazität und der Tumorstammzellwachstumsgeschwindigkeit haben. Da diese Eigenschaften auf Tumorstammzellen zutreffen, kann CXCR4 als Tumorstammzellmarker im CEA424-SV40-T-Antigen Tumormodell gelten.

5 DISKUSSION

Es gibt immer mehr Hinweise auf die Existenz einer kleinen Subpopulation von Tumorzellen innerhalb eines Tumors mit Stammzeleigenschaften, die für das Wachstum und die Aggressivität der Tumore verantwortlich ist. Ihre Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung führt dazu, dass Tumorpatienten oft nur eine sehr schlechte Prognose haben. Solche CSC müssen daher als Angriffspunkte für eine gezielte und effiziente Tumorthherapie in Betracht gezogen werden (Zhou et al., 2009). Um CSC gezielt angreifen zu können, müssen verlässliche Marker gefunden werden, um diese sicher zu identifizieren. Ein Weg hierzu stellt die Identifikation der Ursprungszelle des Tumors dar. Dies basiert auf der Annahme, dass Tumoren ihren Ursprung durch die Entartung (d.h. Akkumulation von kritischen Mutationen) von stammzellähnlichen Zellen nehmen und Tumorstammzellen viele Eigenschaften der Ursprungszellen beibehalten (1.3). Bisher wurde erst in wenigen Systemen mit Hilfe von *lineage tracing* die Ursprungszelle der jeweiligen Tumore identifiziert (1.5.5). Für kolorektale Tumore konnte gezeigt werden, dass ihre tumorinitiierenden Zellen ähnliche Expressionsprofile wie intestinale Stammzellen haben (Merlos-Suarez et al., 2011). Die Expression des Stammzellmarkers LGR5 war sowohl in den normalen Stammzellen als auch in den tumorinitiierenden Zellen hoch. Dieser Marker gilt damit sowohl als Stammzell- als auch als CSC-Marker für kolorektale Tumore. Potentielle Kandidaten für die Ursprungszelle in Magenkarzinomen stellen die 2010 von Barker et al. identifizierten, ebenfalls LGR5-positiven Zellen der Pylorusregion dar, aus denen alle Zelltypen dieses Magenbereichs entstehen (Barker et al., 2010b).

In dieser Arbeit sollten potentielle Ursprungszellen und CSC-Marker des CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodells genauer eingegrenzt und charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene potentielle Stammzellmarker getestet. Die Tatsache, dass LGR5-positive Zellen in Vorarbeiten mittels *lineage tracing* in diesem Modell nicht als Ursprungszellen identifiziert werden konnten (Vetter et al., 2015), warf die Frage auf, ob es durch Expression von SV40-T-Antigen zur Herunterregulierung der Expression des Wnt-Zielgenes *Lgr5* bzw. des Wnt-Signalweges im Tumor kommt. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des Luciferase-Assays gezeigt werden, dass SV40-T-Antigen keinen hemmenden Einfluss auf den TCF/ β -Catenin-Transkriptionsfaktor-Komplex des Wnt-Signalweges hat. Die Expression von SV40-T-Antigen führte vielmehr im Luciferase-Assay zur erhöhten Aktivität eines durch den TCF/ β -Catenin-Transkriptionsfaktor-Komplex des Wnt-Signalweges steuerbaren Promotors, was durch eine erhöhte Expression der Glühwürmchen-Luciferase messbar war. Interessanterweise kam es ebenfalls zu einer erhöhten Expression der Renilla-Luciferase. Außerdem kam es durch Transfektion mit SV40-T-Antigen im Zellvitalitätsassay 48 h später zu signifikant erhöhter Vitalität der transfizierten Zellen. Es kann daraus geschlossen werden, dass SV40-T-Antigen insgesamt aktivierend auf die Zellvitalität sowie

auch auf den Wnt-Signalweg und damit vermutlich auch auf die Expression von *Lgr5* wirkt. Welcher Mechanismus hier aktiv ist, ist bisher noch unklar. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch die Wirkungen von SV40-T-Antigen, welches über verschiedene Angriffspunkte, unter anderem auch transkriptionelle Kofaktoren wie p300 und CBP, bindet. Durch Bindung an p300 und CBP kommt es zu einer Steigerung der Expression ihrer Zielgene (Kasper et al., 2006; Vo and Goodman, 2001). Des Weiteren wirkt SV40-T-Antigen aktivierend auf viele verschiedene virale und zelluläre Promotoren, unter anderem auf den TK-Promotor (Anderson et al., 1996; Stuart et al., 1985). Die Konstrukte des Luciferase-Assays TOP, FOP sowie phRL-tk-TBEmut haben jeweils einen TK- bzw. TK-Minimalpromotor, was die vermehrte Expression der von ihnen gesteuerten Gene ebenfalls erklären kann. Mit diesen Versuchen konnte nahegelegt werden, dass SV40-T-Antigen nicht zur Inhibierung des Wnt-Signalwegs und somit zur Hemmung der Expression des Wnt-Zielgens *Lgr5* führt. *Lgr5*-exprimierende Pylorusstammzellen als potentielle Ursprungszellen der Tumore können somit nach diesen sowie den *Lineage-Tracing*-Versuchen in diesem neuroendokrinen Magenkarzinommodell als wenig wahrscheinlich erachtet werden. Die Tatsache, dass es im CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodell keine Bestätigung für LGR5-positive Zellen als Ursprungszellen gibt, steht in Einklang mit einer kürzlich erschienenen Studie, die zeigt, dass LGR5-negative Zellen ebenso wie LGR5-positive Zellen als Ursprungszellen für Adenome des Darms innerhalb des Wnt-Signalwegs fungieren können (Schwitalla et al., 2013). Zur Tumorbildung kam es nach Differenzierung von LGR5-negativen in LGR5-positive Zellen. Beide Subpopulationen waren gleichfalls dazu in der Lage, sogenannte Spheroide zu bilden. Dieses Verhalten stellt eine Stammzeleigenschaft dar. Es zeigt, dass einige Subtypen von Adenomen nicht strikt hierarchisch organisiert sind, sondern beispielsweise nicht tumorpropagierende Zellen in tumorbildende Zellen übergehen können. Ein möglicher Weg läuft beispielsweise über die Bildung von LGR5-positiven Zellen, die bei Gewebeverletzung aus LGR5-negativen Zellen entstehen können und für die Regeneration und Gewebshomöostase verantwortlich sind (Huch et al., 2013). Da in CEA-SV40-T-Antigen-Karzinomen keine LGR5-positiven Tumorzellen gefunden wurden (Vetter et al., 2015), legen die Luciferase-Expressionsversuche dieser Arbeit nahe, dass die Zielzelle für die Transformation durch SV40-T-Antigen möglicherweise eine differenzierte LGR5-negative Zelle ist (in der der CEA-Minimalpromotor aktiv ist), die zu Zellen mit Stammzeleigenschaften „redifferenziert“. Solche Übergänge von differenzierten, langsam wachsenden Zielzellen in aggressiv wachsende Tumorzellen durch sogenannte Transdifferenzierung wurde in der Tat in verschiedenen SV40-T-Antigen-Modellen beobachtet (Czeh et al., 2010; Syder et al., 2004). Daher gilt es aktuell, weitere mögliche Kandidatenmarker zu finden, um die Ursprungszelle, die möglicherweise durch die Expressierbarkeit des CEA-Minimalpromotors charakterisiert ist, in diesem CEA-SV40-T-Antigen-Modell identifizieren zu können.

Dazu wurden in dieser Arbeit die SV40-T-Antigen-positiven Zellen innerhalb der Mukosa der Pylorusregion als mögliche Vorläuferzellen der pylorusnahen neuroendokrinen Karzinome genauer untersucht, um Aussagen über einen potentiellen Ursprung dieser Zellen aus Progenitorzellen von interstitiellen Cajalzellen (ICC) oder anderen Zelltypen in diesem Magenbereich treffen zu können. Bei GIST wurde bereits ein Ursprung der Tumoren aus ICC bewiesen (Corless et al., 2011). In dieser Arbeit erscheint aufgrund von Immunfluoreszenzfärbungen eine Verbindung mit bzw. ein Ursprung von diesen Zellen als wenig wahrscheinlich, da die SV40-T-Antigen-positiven Tumorzellen weder c-KIT, einen Marker für Cajalzellen, noch PDGFRA, einen Marker für *fibroblast-like cells* (Kurahashi et al., 2011) exprimieren.

In dieser Arbeit konnten die oben genannten Kandidaten als Ursprungszellen des CEA424-SV40-T-Antigen-Mausmodells unter der Annahme, dass nach SV40-TAg-Transformation die für diese Zellen typische Markerexpression (c-KIT, PDGFRA) erhalten bleibt, weitgehend ausgeschlossen werden. Ein weiterer bisher noch nicht untersuchter Kandidat stellt BMI1 dar. *Bmi1* gehört zur *Polycomb group gene family* und spielt eine wichtige Rolle in der Selbsterneuerung verschiedener Zellen (Lessard and Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2003). BMI1-positive Zellen wurden als alternative intestinale Stammzellen sowie Ursprungszellen für intestinale Adenome identifiziert (Sangiorgi and Capecchi, 2008; Tian et al., 2011). Sie konnten bisher im proximalen Dünndarm nachgewiesen werden, also in der Nähe der Pylorusregion, die auch bei diesem Tumormodell relevant ist. Da die Frage nach der Ursprungszelle in diesem Mausmagentumor nach wie vor offen bleibt, ist es für weitere Arbeiten und Untersuchungen in diesem Modell interessant, die Rolle von BMI1-positiven Stammzellen bei der Tumorentstehung genauer zu untersuchen.

Obwohl die Ursprungszelle eines bestimmten Tumors eine Stammzelle oder Vorläuferzelle eines Gewebes sein kann, können epigenetische Veränderungen dieser Vorläuferzellen zur Entstehung von CSC führen. Diese CSC sind wiederum für die Aufrechterhaltung der Tumorbildung ausschlaggebend und können sich anhand verschiedener Eigenschaften von der Ursprungszelle unterscheiden (Jamieson et al., 2004). Deshalb genügt es nicht, die Ursprungszelle des Tumors zu kennen. Es ist wichtig, CSC identifizieren zu können, um einen Angriffspunkt für die Therapie der Tumore zu haben. Hierfür ist es notwendig, verlässliche Marker für CSC zu finden.

Bisher wurden Tumorstammzellen in GEP-NEN noch nicht überzeugend identifiziert (Grande et al., 2012). Um der Identifikation von CSC in GEP-NEN näher zu kommen, wurden in dieser Arbeit 5 verschiedene potentielle CSC-Marker auf ihre Expression und Relevanz im CEA424-TAg-Tumormodell getestet. Es wurde mittels *colony formation assay* herausgefunden, dass Subpopulationen der CEA424-TAg-Tumorzelllinien Stammzeleigenschaften besitzen. CD117, ein etablierter CSC-Marker (1.5.1), der u.a. auch

in einem anderen transgenen SV40-TAg-Mausmodell als CSC-Marker identifiziert wurde (Yamazaki et al., 2009), erwies sich im CEA424-SV40-T-Antigen Magenkarzinommodell als unwahrscheinlicher Marker für CSC. Es konnte gezeigt werden, dass CD117^{hoch}-Zellen der Zelllinie mGC8 keine erhöhte Tumorbildungskapazität im Vergleich zu CD117^{niedrig}-Zellen besitzen. Außerdem erwiesen sich die CD117^{hoch}-Zellen nicht resistenter als CD117^{niedrig}-Zellen gegenüber Chemotherapie. Vielmehr zeigte sich unter Imatinib-Therapie, nicht jedoch unter Epirubicin-Therapie, eine Abnahme der CD117-Expression sowohl in mGC3 als auch in mGC8. Diese Verminderung der CD117-Expression kann auf eine Herabregulation bzw. Blockade des CD117-Signalweges durch den CD117/c-KIT-Inhibitor Imatinib zurückgeführt werden (D'Allard et al., 2013). Dagegen erwies sich CXCR4 als vielversprechender Marker. CXCR4 stellt einen putativen Tumorstammzellmarker in vielen verschiedenen Tumoren dar, unter anderem in Tumoren der Lunge, der Brust, des Pankreas, der Prostata sowie der Niere. Bislang scheint CXCR4 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Stammzellfunktionen von Tumorstammzellen zu spielen (Dubrovskaja et al., 2012a; Dubrovskaja et al., 2012b; Ehteshami et al., 2006; Gassenmaier et al., 2013; Hermann et al., 2007; Jung et al., 2013; Ping et al., 2011; Zhang et al., 2012a), jedoch ist diese noch nicht genau verstanden. In dieser Arbeit konnte die Expression von CXCR4 innerhalb einer kleinen separaten Subpopulation der CEA424-TAg-Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Diese CXCR4-positiven Zellen zeigten mittels FACS sortiert eine höhere Tumorbildungskapazität und Wachstumsgeschwindigkeit *in vivo* verglichen mit CXCR4-negativen Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass chemotherapieresistente mGC-Zellen einen erhöhten Anteil an CXCR4-exprimierenden Zellen aufweisen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CXCR4-positive Zellen Tumorstammzellen mit Tumorbildungskapazität in dem GEP-NEC-Modell der CEA424-TAg-Mäuse darstellen und möglicherweise eine wichtige Rolle bei Therapieresistenz spielen. Zur Überprüfung dieser Annahme stehen weitere Schritte, unter anderem *Knock-down*-Experimente mit Cxcr4-spezifischer siRNA, aus.

In einem Großteil der veröffentlichten Studien über Tumorstammzellen werden diese als kleine Subpopulationen von Zellen innerhalb der Masse der Tumorzellen definiert (Meacham and Morrison, 2013). Passend dazu konnten in dieser Arbeit CXCR4-positive Zellen als kleine separate Subpopulation in den CEA424-TAg-Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Die mGC3-Zellen enthielten 0,6 %, die mGC8-Zellen 0,4 % CXCR4-positive Zellen. Eine geringe, jedoch eindeutige Expression von CXCR4 in diesen Zelllinien (belegt durch den sogenannten *present call*, einen Expressionsqualitätsnachweis bei Oligonukleotid-Microarrays) konnte mittels Transkriptomanalyse der Zelllinien auf RNA-Ebene bestätigt werden.

Die Tumorbildungskapazität ist eine der Stammzeleigenschaften von CSC. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEA424-TAg-Zelllinien diese Eigenschaft besitzen und dass mittels FACS sortierte CXCR4-positive Tumorzellen *in vivo* eine höhere Tumorbildungskapazität und *In-vivo*-Wachstumsgeschwindigkeit als CXCR4-negative Zellen besitzen. Bei 7/8 Injektionen mit je 10.000 CXCR4-positiven Zellen kam es zur Tumorbildung nach 30 Tagen, während es bei den CXCR4-negativen Zellen nur bei 4/8 Injektionen zur Bildung eines Tumors im gleichen Zeitraum kam. Bei kleinen Zellzahlen (1000 Zellen pro Injektion) kam es bei den CXCR4-positiven Zellen bei 3/11 Injektionen zur Tumorbildung, bei den CXCR4-negativen Zellen fand nach 30 Tagen keine Tumorbildung statt. Somit kann festgehalten werden, dass CXCR4-positive Zellen sowohl bei Injektion von hohen als auch von niedrigen Zellzahlen früher Tumore in syngen Mäusen bilden als CXCR4-negative Zellen. Die Wachstumsgeschwindigkeit war bei 10.000 injizierten Zellen in der CXCR4-positiven Gruppe signifikant höher als bei der CXCR4-negativen Gruppe. Eine Ausnahme stellt die Wachstumskurve nach Injektion von wenigen Zellen (1000 Zellen) dar. Hier gab es, mit Ausnahme des früheren Beginns des Tumorwachstums bei CXCR4-positiven Zellen, über die Zeit keinen Unterschied im Tumorwachstum zwischen CXCR4-positiven und CXCR4-negativen Zellen. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Notta et al., die humane B-ALL-Zellen eines Patienten in limitierenden und nicht-limitierenden Zellkonzentrationen in Mäuse transplantierten. Bei unterschiedlichen Konzentrationen waren unterschiedliche Klone leukämogen und dominant (Notta et al., 2011). Durch ein ungünstiges Milieu sowie durch aktivierte Immunzellen der Mäuse kann es zur Verhinderung des Tumorwachstums durch CSC kommen, die potentiell dazu in der Lage wären, Tumore zu bilden. Tumorwachstum kann so in verschiedenen Milieus gegebenenfalls inhibiert sein (Hanahan and Coussens, 2012). Bei den LGR5-positiven Stammzellen des Dünndarms konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren der Panethschen Körnerzellen entscheidend für das Stammzellpotential und somit die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase sind (Sato et al., 2011). Die Mikroumgebung von Tumoren besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, u.a. Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen und extrazellulärer Matrix-Komponenten etc. (Balkwill et al., 2012). Bisher ist dieses Milieu für die meisten Tumorentitäten noch undefiniert. Ob das Milieu in diesem Modell durch Wnt und andere essentielle Wachstumsfaktoren aufrechterhalten wird, die von umgebenden Zelltypen oder von Zelltypen der Submukosa unterstützt werden, gilt es noch herauszufinden. Durch Mangel an autokrin bzw. parakrin sezernierten Wachstumsfaktoren und damit einem ungünstigen Milieu und deutlich verlängerter Latenzzeit bis Tumorwachstum beobachtbar ist (33 statt 15 Tage; Abbildung 38), kommt es möglicherweise bei Injektion sehr geringer Zellzahlen zur Umbildung von CXCR4-negativen Zellen in CXCR4-positive Zellen (Gupta et al., 2011; Meacham and Morrison, 2013). Lagadec et al. konnten bei Mammakarzinomzellen zeigen, dass in initial nicht-tumorinitiierenden

Zellen nach Radiotherapie die Expression von Stammzellfaktoren wie SOX2, OCT4, KLF4 und Nanog hochreguliert wurde und es zur Ausbildung einer tumorbildenden Kapazität dieser Zellen *in vivo* kam. Dies konnte von Ghisolfi et al. bei zwei Zelllinien von hepatozellulären Karzinomen bestätigt werden (Ghisolfi et al., 2012; Lagadec et al., 2012). In diesem Modell wird dadurch die Beobachtung unterstützt, dass CXCR4-negative Zellen dazu in der Lage sein können, Tumore zu bilden, wenn die Voraussetzungen des Milieus stimmen. Die genau aufeinanderliegenden Wachstumskurven bei den Tumorwachstumsversuchen mit CD117 zeigen, dass die Versuche generell exakt und valide durchgeführt wurden. Dies bestätigt, dass der Unterschied der Wachstumskurven bei Injektion einer ausreichenden Menge an CXCR4-positiven Zellen nicht auf Zufall beruht, sondern auf tatsächliche Wachstumsvorteile der CXCR4-positiven Zellen zurückzuführen ist. Diese Daten weisen stark darauf hin, dass die Anwesenheit von CXCR4-positiven Zellen entscheidend für das Tumorbildungspotential sowie die Wachstumsgeschwindigkeit von CEA424-TAg-Tumoren ist.

Ebenfalls wird durch diese Arbeit die Hypothese gestützt, dass der CSC-Status stark von dem jeweiligen Milieu beeinflusst wird. Zur Testung des tumorbildenden Potentials von Subpopulationen von potentiellen CSC ist es demnach wichtig, ein möglichst „permissives“ Milieu bereitzustellen. In vielen Studien werden stark immunkompromittierte Mäuse für Xenotransplantationen verwendet, um ein Anwachsen der fremden Zellen zu ermöglichen und eine Abstoßung durch das fremde Immunsystem zu verhindern. Dennoch besitzen diese Mäuse noch eine gewisse immunologische Barriere (z.B. NK-Zellen im Fall von NOD/SCID-Mäusen) und es ist schwierig, Zellen auf ihr Tumorbildungspotential hin zu untersuchen, wenn diese von einem xenogenen Immunsystem abgetötet werden (Shultz et al., 2007). Zusätzlich können fehlende Wachstumsfaktoren (nicht alle Mauswachstumsfaktoren können von korrespondierenden menschlichen Rezeptoren gebunden werden), eine unterschiedliche Gewebearchitektur und weitere fehlende Voraussetzungen für Tumorwachstum dafür sorgen, dass Analysen von CSC mittels Xenotransplantation aufgrund des nicht-permissiven Milieus ihr Potential nicht adäquat widerspiegeln (Kuperwasser et al., 2004; Manz, 2007). Um diese Faktoren von vorneherein auszuschalten, wurde in dieser Arbeit mit zu dem CEA424-TAg-Mausmagentumormodell syngenen C57BL/6-Mäusen gearbeitet. Die aus CEA424-TAg-Magenkarzinomen etablierten mGC-Zellen exprimieren mit Ausnahme des SV40-T-Antigens keine fremden, durch das Immunsystem dieser Mäuse erkennbaren Antigene, sodass von einem bestmöglichen Milieu für die Analyse der Zellen ausgegangen werden kann. In der Tat haben Vorarbeiten (Nockel et al., 2006) und Versuche dieser Arbeit (Abbildung 36; Vetter et al., 2015) gezeigt, dass trotz des potentiellen Tumorantigens SV40-T-Antigen die Tumorzellen problemlos in C57BL/6-Mäusen anwachsen und ihre SV40-T-Antigen-Expression beibehalten.

Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie ist eine weitere Eigenschaft der CSC. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CXCR4-positive Tumorzellen resistenter gegenüber den Chemotherapeutika Epirubicin und Imatinib waren als CXCR4-negative Tumorzellen. Dies weist darauf hin, dass CXCR4-positive Zellen in mGC-Zelllinien Zellen mit Stammzeleigenschaften darstellen.

Zusammengenommen liefern diese Ergebnisse den ersten Beleg dafür, dass die CXCR4-Expression möglicherweise ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Tumorzellen des CEA424-TAg-Modells spielt, wie kürzlich von unserer Gruppe über Nierenzellkarzinomstammzellen berichtet wurde (Gassenmaier et al., 2013). Gezielte Therapien gegen CXCR4 können somit eine sinnvolle und wirksame Möglichkeit darstellen, CSC zu bekämpfen und damit wesentlich zur Heilung von Tumorpatienten beizutragen. Dennoch werden weitere Analysen benötigt, um diese Beobachtungen zu stärken. Es ist sinnvoll, unter anderem die Zellen im Rahmen des *colony formation assays* mit Antikörpern gegen CXCR4 und verschiedene Stammzellefaktoren wie *musashi*, SOX2 und OCT4 zu färben, um zu untersuchen, ob Holoklone eine Anreicherung dieser Marker zeigen. Des Weiteren ist es sinnvoll, *sphere formation assays* unter permissiven Bedingungen (z.B. in Gegenwart von Serum) durchzuführen, um einen erwarteten Vorteil CXCR4-positiver Zellen bei der Bildung von *spheres* zu sehen. Auch sollten CXCR4-negative und CXCR4-positive Subpopulationen auf ihre Expression von Stammzellefaktoren hin untersucht werden. Denn erst wenn das Verhalten der CSC in ausreichendem Maße verstanden ist, wird es möglich sein, effektive und vor allem dauerhaft wirksame Therapien für Tumorpatienten zu finden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adhikari, A.S., Agarwal, N., Wood, B.M., Porretta, C., Ruiz, B., Pochampally, R.R., and Iwakuma, T. (2010). CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res* 70, 4602-4612.
- Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T., and Pipas, J.M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24, 7729-7745.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Anderson, M.M., Chen, J., Cole, C.N., and Conrad, S.E. (1996). Activation of the human thymidine kinase (TK) promoter by simian virus 40 large T antigen requires both the T antigen pRb family-binding domain and TK promoter sequences resembling E2F-binding sites. *J Virol* 70, 6304-6313.
- Auchincloss, H., Jr. (1988). Xenogeneic transplantation. A review. *Transplantation* 46, 1-20.
- Baccelli, I., and Trumpp, A. (2012). The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 198, 281-293.
- Baikie, A.G., Court-Brown, W.M., Buckton, K.E., Harnden, D.G., Jacobs, P.A., and Tough, I.M. (1960). A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature* 188, 1165-1166.
- Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14, 171-179.
- Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125, 5591-5596.
- Ballesta, A.M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., and Gimenez, N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biol* 16, 32-41.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Barabe, F., Kennedy, J.A., Hope, K.J., and Dick, J.E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 316, 600-604.
- Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H. (2010a). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell* 7, 656-670.
- Barker, N., and Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138, 1681-1696.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., *et al.* (2010b). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25-36.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608-611.

- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* *449*, 1003-1007.
- Barnes, D.J., and Melo, J.V. (2006). Primitive, quiescent and difficult to kill: the role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle* *5*, 2862-2866.
- Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 2302-2306.
- Begum, N., Maasberg, S., Plockinger, U., Anlauf, M., Rinke, A., Popperl, G., Lehnert, H., Izbicki, J.R., Krausch, M., Vashist, Y.K., *et al.* (2012). [Neuroendocrine Tumours of the GI Tract - Data from the German NET Registry]. *Zentralbl Chir* *137*, e1.
- Bissell, M.J., and Labarge, M.A. (2005). Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* *7*, 17-23.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2002). Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *283*, G767-777.
- Blazek, E.R., Foutch, J.L., and Maki, G. (2007). Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *67*, 1-5.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* *3*, 730-737.
- Bosman, F.T., World Health Organization., and International Agency for Research on Cancer. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system, 4th edn (Lyon: International Agency for Research on Cancer).
- Bruce, W.R., and Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells capable of Proliferation in vivo. *Nature* *199*, 79-80.
- Burdall, S.E., Hanby, A.M., Lansdown, M.R., and Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res* *5*, 89-95.
- Burkhardt, M., Mayordomo, E., Winzer, K.J., Fritzsche, F., Gansukh, T., Pahl, S., Weichert, W., Denkert, C., Guski, H., Dietel, M., *et al.* (2006). Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol* *59*, 403-409.
- Cheng, T. (2004). Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene* *23*, 7256-7266.
- Chi, P., Chen, Y., Zhang, L., Guo, X., Wongvipat, J., Shamu, T., Fletcher, J.A., Dewell, S., Maki, R.G., Zheng, D., *et al.* (2010). ETV1 is a lineage survival factor that cooperates with KIT in gastrointestinal stromal tumours. *Nature* *467*, 849-853.
- Chiaverotti, T., Couto, S.S., Donjacour, A., Mao, J.H., Nagase, H., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., and Balmain, A. (2008). Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am J Pathol* *172*, 236-246.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., and Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* *406*, 532-535.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* *66*, 9339-9344.

- Clarkson, B., Ohkita, T., Ota, K., and Fried, J. (1967). Studies of cellular proliferation in human leukemia. I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine. *J Clin Invest* 46, 506-529.
- Clements, W.M., Wang, J., Sarnaik, A., Kim, O.J., MacDonald, J., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J., and Lowy, A.M. (2002). beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* 62, 3503-3506.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., and Sanchez-Garcia, I. (2000). A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95, 1007-1013.
- Corless, C.L., Barnett, C.M., and Heinrich, M.C. (2011). Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 11, 865-878.
- Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17, 3029-3035.
- Czeh, M., Loddenkemper, C., Shalapour, S., Schon, C., Robine, S., Goldscheid, E., Stein, H., Schuler, T., Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2010). The immune response to sporadic colorectal cancer in a novel mouse model. *Oncogene* 29, 6591-6602.
- D'Allard, D., Gay, J., Descarpentries, C., Frisan, E., Adam, K., Verdier, F., Floquet, C., Dubreuil, P., Lacombe, C., Fontenay, M., *et al.* (2013). Tyrosine kinase inhibitors induce down-regulation of c-Kit by targeting the ATP pocket. *PLoS One* 8, e60961.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10158-10163.
- Darwin (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, Albemarle Street, London.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6, 24-37.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., *et al.* (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 780-783.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36 *Suppl 1*, 59-72.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., *et al.* (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355, 2408-2417.

- Dubrovskaja, A., Elliott, J., Salamone, R.J., Telegeev, G.D., Stakhovsky, A.E., Schepotin, I.B., Yan, F., Wang, Y., Bouchez, L.C., Kularatne, S.A., *et al.* (2012a). CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells. *PLoS One* 7, e31226.
- Dubrovskaja, A., Hartung, A., Bouchez, L.C., Walker, J.R., Reddy, V.A., Cho, C.Y., and Schultz, P.G. (2012b). CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *Br J Cancer* 107, 43-52.
- Dupart, J.J., Trent, J.C., Lee, H.Y., Hess, K.R., Godwin, A.K., Taguchi, T., and Zhang, W. (2009). Insulin-like growth factor binding protein-3 has dual effects on gastrointestinal stromal tumor cell viability and sensitivity to the anti-tumor effects of imatinib mesylate in vitro. *Mol Cancer* 8, 99.
- Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., *et al.* (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 3, e2428.
- Ehteshami, M., Winston, J.A., Kabos, P., and Thompson, R.C. (2006). CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* 25, 2801-2806.
- Eyler, C.E., and Rich, J.N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26, 2839-2845.
- Fendrich, V., Waldmann, J., Esni, F., Ramaswamy, A., Mullendore, M., Buchholz, M., Maitra, A., and Feldmann, G. (2007). Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocr Relat Cancer* 14, 865-874.
- Fidler, I.J., and Hart, I.R. (1982). The development of biological diversity and metastatic potential in malignant neoplasms. *Oncodev Biol Med* 4, 161-176.
- Fidler, I.J., and Kripke, M.L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893-895.
- Furth, P.A. (1998). SV40 rodent tumour models as paradigms of human disease: transgenic mouse models. *Dev Biol Stand* 94, 281-287.
- Gassenmaier, M., Chen, D., Buchner, A., Henkel, L., Schiemann, M., Mack, B., Schendel, D.J., Zimmermann, W., and Pohla, H. (2013). CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 31, 1467-1476.
- Ghisolfi, L., Keates, A.C., Hu, X., Lee, D.K., and Li, C.J. (2012). Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS One* 7, e43628.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567.
- Goldman, J.M. (2010). Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol* 47, 302-311.
- Grande, E., Capdevila, J., Barriuso, J., Anton-Aparicio, L., and Castellano, D. (2012). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cancer stem cells: do they exist? *Cancer Metastasis Rev* 31, 47-53.
- Guibal, F.C., Alberich-Jorda, M., Hirai, H., Ebralidze, A., Levantini, E., Di Ruscio, A., Zhang, P., Santana-Lemos, B.A., Neuberg, D., Wagers, A.J., *et al.* (2009). Identification of a myeloid

committed progenitor as the cancer-initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 114, 5415-5425.

Gum, J.R., Jr., Hicks, J.W., Crawley, S.C., Yang, S.C., Borowsky, A.D., Dahl, C.M., Kakar, S., Kim, D.H., Cardiff, R.D., and Kim, Y.S. (2004). Mice expressing SV40 T antigen directed by the intestinal trefoil factor promoter develop tumors resembling human small cell carcinoma of the colon. *Mol Cancer Res* 2, 504-513.

Gupta, A., Roy, S., Lazar, A.J., Wang, W.L., McAuliffe, J.C., Reynoso, D., McMahon, J., Taguchi, T., Floris, G., Debiec-Rychter, M., *et al.* (2010). Autophagy inhibition and antimetastatics promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14333-14338.

Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 146, 633-644.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309-322.

Harper, L.J., Piper, K., Common, J., Fortune, F., and Mackenzie, I.C. (2007). Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 36, 594-603.

Hassan, H.T., and El-Sheemy, M. (2004). Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *J R Soc Med* 97, 465-471.

Hauso, O., Gustafsson, B.I., Kidd, M., Waldum, H.L., Drozdov, I., Chan, A.K., and Modlin, I.M. (2008). Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America. *Cancer* 113, 2655-2664.

Hayashi, S., and McMahon, A.P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244, 305-318.

Heinrich, M.C., Corless, C.L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C.J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D.J., Haley, A., Town, A., *et al.* (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299, 708-710.

Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323.

Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., *et al.* (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-580.

Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A., and Brenner, M.K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14228-14233.

Hong, S.P., Wen, J., Bang, S., Park, S., and Song, S.Y. (2009). CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 125, 2323-2331.

- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., *et al.* (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247-250.
- Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H.B., and Bernstein, A. (1995). W/kif gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373, 347-349.
- Ihler, F., Vetter, E.V., Pan, J., Kammerer, R., Debey-Pascher, S., Schultze, J.L., Zimmermann, W., and Enders, G. (2012). Expression of a neuroendocrine gene signature in gastric tumor cells from CEA 424-SV40 large T antigen-transgenic mice depends on SV40 large T antigen. *PLoS One* 7, e29846.
- Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., *et al.* (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351, 657-667.
- Jat, P.S., Cepko, C.L., Mulligan, R.C., and Sharp, P.A. (1986). Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol Cell Biol* 6, 1204-1217.
- Jiao, J., Hindoyan, A., Wang, S., Tran, L.M., Goldstein, A.S., Lawson, D., Chen, D., Li, Y., Guo, C., Zhang, B., *et al.* (2012). Identification of CD166 as a surface marker for enriching prostate stem/progenitor and cancer initiating cells. *PLoS One* 7, e42564.
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355, 1253-1261.
- Jung, M.J., Rho, J.K., Kim, Y.M., Jung, J.E., Jin, Y.B., Ko, Y.G., Lee, J.S., Lee, S.J., Lee, J.C., and Park, M.J. (2013). Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 32, 209-221.
- Kasper, L.H., Fukuyama, T., Biesen, M.A., Boussouar, F., Tong, C., de Pauw, A., Murray, P.J., van Deursen, J.M., and Brindle, P.K. (2006). Conditional knockout mice reveal distinct functions for the global transcriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development. *Mol Cell Biol* 26, 789-809.
- Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L., and Strasser, A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317, 337.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.
- Kristiansen, G., Pilarsky, C., Wissmann, C., Stephan, C., Weissbach, L., Loy, V., Loening, S., Dietel, M., and Rosenthal, A. (2003). ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate* 54, 34-43.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2007). Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *Oncologist* 12, 535-542.

- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4966-4971.
- Kurahashi, M., Zheng, H., Dwyer, L., Ward, S.M., Koh, S.D., and Sanders, K.M. (2011). A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol* *589*, 697-710.
- Kurrey, N.K., Jalgaonkar, S.P., Joglekar, A.V., Ghanate, A.D., Chaskar, P.D., Doiphode, R.Y., and Bapat, S.A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* *27*, 2059-2068.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012). Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* *30*, 833-844.
- Landerholm, K., Falkmer, S., and Jarhult, J. (2010). Epidemiology of small bowel carcinoids in a defined population. *World J Surg* *34*, 1500-1505.
- Lee, E.R. (1985). Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: I. Architecture of antral units. *Am J Anat* *172*, 187-204.
- Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* *423*, 255-260.
- Leushacke, M., and Barker, N. (2012). Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene* *31*, 3009-3022.
- Levina, V., Marrangoni, A., Wang, T., Parikh, S., Su, Y., Herberman, R., Lokshin, A., and Gorelik, E. (2010). Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop. *Cancer Res* *70*, 338-346.
- Levina, V., Marrangoni, A.M., DeMarco, R., Gorelik, E., and Lokshin, A.E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One* *3*, e3077.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* *67*, 1030-1037.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* *100*, 672-679.
- Liu, T., Xu, F., Du, X., Lai, D., Liu, T., Zhao, Y., Huang, Q., Jiang, L., Huang, W., Cheng, W., *et al.* (2010). Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem* *340*, 265-273.
- Locke, M., Heywood, M., Fawell, S., and Mackenzie, I.C. (2005). Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* *65*, 8944-8950.
- Lou, H., and Dean, M. (2007). Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* *26*, 1357-1360.
- Lu, M., Glover, C.H., Tien, A.H., Humphries, R.K., Piret, J.M., and Helgason, C.D. (2007). Involvement of tyrosine kinase signaling in maintaining murine embryonic stem cell functionality. *Exp Hematol* *35*, 1293-1302.

Luo, L., Zeng, J., Liang, B., Zhao, Z., Sun, L., Cao, D., Yang, J., and Shen, K. (2011). Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol* 91, 596-602.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.

Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283-296.

Manz, M.G. (2007). Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26, 537-541.

Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805, 105-117.

Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328-337.

Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Cespedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Munoz, P., *et al.* (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8, 511-524.

Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71-80.

Mezzanzanica, D., Fabbi, M., Bagnoli, M., Staurengo, S., Losa, M., Balladore, E., Alberti, P., Lusa, L., Ditto, A., Ferrini, S., *et al.* (2008). Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14, 1726-1733.

Modlin, I.M., Oberg, K., Chung, D.C., Jensen, R.T., de Herder, W.W., Thakker, R.V., Caplin, M., Delle Fave, G., Kaltsas, G.A., Krenning, E.P., *et al.* (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 9, 61-72.

Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691-701.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.

Morrison, R., Schleicher, S.M., Sun, Y., Niermann, K.J., Kim, S., Spratt, D.E., Chung, C.H., and Lu, B. (2011). Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011, 941876.

Mueller, M.T., Hermann, P.C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S.F., Huber, S., Ellwart, J.W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D'Haese, J.G., *et al.* (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137, 1102-1113.

- Neering, S.J., Bushnell, T., Sozer, S., Ashton, J., Rossi, R.M., Wang, P.Y., Bell, D.R., Heinrich, D., Bottaro, A., and Jordan, C.T. (2007). Leukemia stem cells in a genetically defined murine model of blast-crisis CML. *Blood* *110*, 2578-2585.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* *303*, 1483-1487.
- Nian, W.Q., Chen, F.L., Ao, X.J., and Chen, Z.T. (2011). CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line have cancer metastatic stem cell characteristics. *Mol Cell Biochem* *355*, 241-248.
- Nockel, J., van den Engel, N.K., Winter, H., Hatz, R.A., Zimmermann, W., and Kammerer, R. (2006). Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene. *BMC Cancer* *6*, 57.
- Notta, F., Mullighan, C.G., Wang, J.C., Poepl, A., Doulatov, S., Phillips, L.A., Ma, J., Minden, M.D., Downing, J.R., and Dick, J.E. (2011). Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* *469*, 362-367.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23-28.
- Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., ten Berge, D., and Kalani, Y. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *73*, 59-66.
- Oravec-Wilson, K.I., Philips, S.T., Yilmaz, O.H., Ames, H.M., Li, L., Crawford, B.D., Gauvin, A.M., Lucas, P.C., Sitwala, K., Downing, J.R., *et al.* (2009). Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Cell* *16*, 137-148.
- Palmqvist, L., Glover, C.H., Hsu, L., Lu, M., Bossen, B., Piret, J.M., Humphries, R.K., and Helgason, C.D. (2005). Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem Cells* *23*, 663-680.
- Pape, U.F., Berndt, U., Muller-Nordhorn, J., Bohmig, M., Roll, S., Koch, M., Willich, S.N., and Wiedenmann, B. (2008). Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* *15*, 1083-1097.
- Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* *3*, 895-902.
- Park, W.S., Oh, R.R., Park, J.Y., Lee, S.H., Shin, M.S., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Lee, H.K., Kim, P.J., Oh, S.T., *et al.* (1999). Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* *59*, 4257-4260.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., and Skorski, T. (2010). Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* *120*, 2254-2264.
- Ping, Y.F., Yao, X.H., Jiang, J.Y., Zhao, L.T., Yu, S.C., Jiang, T., Lin, M.C., Chen, J.H., Wang, B., Zhang, R., *et al.* (2011). The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *J Pathol* *224*, 344-354.
- Pituch-Noworolska, A., Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Baj-Krzyworzeka, M., Urbanowicz, B., Malec, E., and Ratajczak, M.Z. (2003). Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and

neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity. *Folia Histochem Cytobiol* 41, 13-21.

Qiao, X.T., Ziel, J.W., McKimpton, W., Madison, B.B., Todisco, A., Merchant, J.L., Samuelson, L.C., and Gumucio, D.L. (2007). Prospective identification of a multilineage progenitor in murine stomach epithelium. *Gastroenterology* 133, 1989-1998.

Reiner, T., de Las Pozas, A., Parrondo, R., and Perez-Stable, C. (2007). Progression of prostate cancer from a subset of p63-positive basal epithelial cells in FG/Tag transgenic mice. *Mol Cancer Res* 5, 1171-1179.

Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

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

Ross, D.M., Hughes, T.P., and Melo, J.V. (2011). Do we have to kill the last CML cell? *Leukemia* 25, 193-200.

Saenz Robles, M.T., and Pipas, J.M. (2009). T antigen transgenic mouse models. *Semin Cancer Biol* 19, 229-235.

Sakurama, K., Noma, K., Takaoka, M., Tomono, Y., Watanabe, N., Hatakeyama, S., Ohmori, O., Hirota, S., Motoki, T., Shirakawa, Y., *et al.* (2009). Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 8, 127-134.

Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15, 763-770.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.

Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337, 730-735.

Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., *et al.* (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25-38.

Setoguchi, T., Taga, T., and Kondo, T. (2004). Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 3, 414-415.

Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822-829.

- Shen, S., Yang, W., Wang, Z., Lei, X., Xu, L., Wang, Y., Wang, L., Huang, L., Yu, Z., Zhang, X., *et al.* (2011). Tumor-initiating cells are enriched in CD44(hi) population in murine salivary gland tumor. *PLoS One* 6, e23282.
- Shultz, L.D., Ishikawa, F., and Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7, 118-130.
- Stuart, P., Ito, M., Stewart, C., and Conrad, S.E. (1985). Induction of cellular thymidine kinase occurs at the mRNA level. *Mol Cell Biol* 5, 1490-1497.
- Su, M.C., Wang, C.C., Chen, C.C., Hu, R.H., Wang, T.H., Kao, H.L., Jeng, Y.M., and Yuan, R.H. (2006). Nuclear translocation of beta-catenin protein but absence of beta-catenin and APC mutation in gastrointestinal carcinoid tumor. *Ann Surg Oncol* 13, 1604-1609.
- Syder, A.J., Karam, S.M., Mills, J.C., Ippolito, J.E., Ansari, H.R., Farook, V., and Gordon, J.I. (2004). A transgenic mouse model of metastatic carcinoma involving transdifferentiation of a gastric epithelial lineage progenitor to a neuroendocrine phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4471-4476.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S.A., Shimada, Y., and Wang, T.C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27, 1006-1020.
- Tehranchi, R., Woll, P.S., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Mizukami, T., Mead, A.J., Astrand-Grundstrom, I., Strombeck, B., Horvat, A., Ferry, H., *et al.* (2010). Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission. *N Engl J Med* 363, 1025-1037.
- Thompson, J., Epting, T., Schwarzkopf, G., Singhofen, A., Eades-Perner, A.M., van Der Putten, H., and Zimmermann, W. (2000). A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *Int J Cancer* 86, 863-869.
- Thompson, J.A. (1995). Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 16, 10-16.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255-259.
- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1, 119-150.
- Tolwinski, N.S., and Wieschaus, E. (2004). Rethinking WNT signaling. *Trends Genet* 20, 177-181.
- Ulanet, D.B., and Hanahan, D. (2010). Loss of p19(Arf) facilitates the angiogenic switch and tumor initiation in a multi-stage cancer model via p53-dependent and independent mechanisms. *PLoS One* 5, e12454.
- van den Brand, M., Takes, R.P., Blokhoel-deRuyter, M., Slootweg, P.J., and van Kempen, L.C. (2010). Activated leukocyte cell adhesion molecule expression predicts lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 46, 393-398.
- Van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., *et al.* (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132, 628-632.

- Vandercappellen, J., Van Damme, J., and Struyf, S. (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 267, 226-244.
- Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H., and Moon, R.T. (2003). Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 13, 680-685.
- Verma, A., Shukla, N.K., Deo, S.V., Gupta, S.D., and Ralhan, R. (2005). MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 68, 462-470.
- Vetter, E. (2015). Leiten sich Tumorzellen des CEA424-SV40-T-Antigen-Magenkarzinoms von LGR5-positiven Pylorusstammzellen ab? Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Vetter, E., Kronast, M., Tolge, M., and Zimmermann, W. (2015). Lgr5-expressing stem cells are not the cells-of-origin of pyloric neuroendocrine carcinomas in mice. *J Pathol*.
- Vinik, A.I., Woltering, E.A., Warner, R.R., Caplin, M., O'Dorisio, T.M., Wiseman, G.A., Coppola, D., Go, V.L., and North American Neuroendocrine Tumor, S. (2010). NANETS consensus guidelines for the diagnosis of neuroendocrine tumor. *Pancreas* 39, 713-734.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Vo, N., and Goodman, R.H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276, 13505-13508.
- Wang, C.H., Chiou, S.H., Chou, C.P., Chen, Y.C., Huang, Y.J., and Peng, C.A. (2011). Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine* 7, 69-79.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., and Rosen, J.M. (2007). WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 618-623.
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S.S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., *et al.* (2012). Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*.
- Yamazaki, J., Mizukami, T., Takizawa, K., Kuramitsu, M., Momose, H., Masumi, A., Ami, Y., Hasegawa, H., Hall, W.W., Tsujimoto, H., *et al.* (2009). Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 114, 2709-2720.
- Yang, W., Wang, C., Lin, Y., Liu, Q., Yu, L.X., Tang, L., Yan, H.X., Fu, J., Chen, Y., Zhang, H.L., *et al.* (2012). OV6(+) tumor-initiating cells contribute to tumor progression and invasion in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 57, 613-620.
- Yao, J.C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J.E., Abdalla, E.K., Fleming, J.B., Vauthey, J.N., Rashid, A., *et al.* (2008). One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 26, 3063-3072.

- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* *441*, 475-482.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T., and Zimmermann, W. (2005). Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* *86*, 566-580.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H., and Nephew, K.P. (2008). Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* *68*, 4311-4320.
- Zhang, S.S., Han, Z.P., Jing, Y.Y., Tao, S.F., Li, T.J., Wang, H., Wang, Y., Li, R., Yang, Y., Zhao, X., *et al.* (2012a). CD133(+)CXCR4(+) colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med* *10*, 85.
- Zhang, W.C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., Soh, B.S., Sun, L.L., Tai, B.C., Nga, M.E., *et al.* (2012b). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* *148*, 259-272.
- Zhou, B.B., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K.G., Grindley, J.C., and Dirks, P.B. (2009). Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 806-823.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595-599.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALCAM	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
APC	Allophycocyanin

B

BAAA	BODIPY®-Aminoacetaldehyd
β-Catenin D45	β-Catenin mit S45-Deletion
β-Cat	β-Catenin

C

Ceacam14	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 14
CreERT2	Tamoxifen induzierbares Cre-Rekombinase-Östrogenrezeptor-Fusionsprotein
CSC	<i>cancer stem cell</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

D

d	Tag(e) (<i>day</i>)
DEAB	4-Diethylaminobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia-coli</i> -Bakterien
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EtBr	Ethidiumbromid

F

F	Fluoreszenzwert
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FOP	pSuper-8xFOFlash
FSC	<i>forward scatter</i>

G

GEP	gastro-entero-pankreatisches System
GEP-NEC	neuroendokrines Karzinom des gastro-entero-pankreatischen Systems
GEP-NEN	neuroendokrine Neoplasie des gastro-entero-pankreatischen Systems
GEP-NET	neuroendokriner Tumor des gastro-entero-pankreatischen Systems
GIST	gastrointestinaler Stromatumor

H

HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
HSV	<i>Herpes-simplex-Virus</i>

I	
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICC	Interstitiellen Cajalzellen
L	
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LGR5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
M	
M	<i>Muscularis mucosae</i>
MEM NEAA	nichtessenzielle Aminosäuren
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
Mu	Mukosa
N	
NEB	New England Biolabs
NEC	neuroendokrines Karzinom
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
O	
OD	optische Dichte
P	
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
R	
REN	Restriktionsendonukleasen
RFP	rot fluoreszierendes Protein-Gen
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
<i>Rpl9</i> -Gens	ribosomales Protein L9
S	
Sm	Submukosa
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SV40-TAg	<i>Simian Virus 40 large T antigen</i>
T	
TAg	SV40-T-Antigen
TCF	T-Zell-Faktor
TK	Thymidinkinase
TOP	Reporterplasmid pSuper-8xTOPFlash
V	
V	Tumorvolumen

8 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Wolfgang Zimmermann, der mir dieses Projekt ermöglichte. Während der gesamten Arbeit unterstützte er mich umfassend, sei es mit seinem hervorragenden akademischen Rat während zahlreicher Diskussionen, seiner konstruktiven Kritik sowie seinen stets motivierenden Worten.

Besonderer Dank gilt außerdem Dr. Rainer Riesenberg, der mir mit viel Geduld die für diese Arbeit notwendigen Methoden beibrachte und mich an seiner umfangreichen Erfahrung teilhaben ließ. Ich möchte mich auch bei Elena Vetter für ihre Unterstützung in der Einarbeitungsphase bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank PD Dr. Alexander Buchner, der das ein oder andere Computerproblem für mich gelöst hat. Bedanken möchte ich mich außerdem bei PD Dr. Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Michael Heide, Dr. Joachim Ellwart, Lynette Henkel sowie Claudia Fahney für ihre Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung. Bei allen Kollegen des LTI möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Saur für seinen Rat bezüglich der Ursprungszellen des Magenkarzinommodells sowie bei Sabine Klein für ihre Unterstützung bei den Immunfluoreszenzfärbungen.

Bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Dissertation im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare und Systembiologische Medizin“ durchführen konnte.

In besonderem Maße möchte ich mich auch bei Maximilian Gassenmaier, Verena Passerini und Chiara Bellio bedanken. Die Zusammenarbeit mit Ihnen und der kurzweilige Austausch bereiteten mir immer viel Freude.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für ihre Motivation zur richtigen Zeit bedanken, sei es durch gemeinsam in der Bibliothek verbrachte Zeit oder durch gemeinsame Freizeitaktivitäten, die mir eine Balance zur wissenschaftlichen Arbeit brachten.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie, die mir stets den Rücken gestärkt hat und mit Interesse den Fortschritt dieser Arbeit verfolgt hat. Ohne ihre materielle sowie moralische Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können. Vielen herzlichen Dank!

9 PUBLIKATIONEN

Vetter E*, **Kronast M***, Tölge M, Zimmermann W. Lgr5-expressing stem cells are not the cells-of-origin of pyloric neuroendocrine carcinomas in mice. *J Pathol.* 2015 Sep 3. doi: 10.1002/path.4629. [Epub ahead of print]

* These authors contributed equally to this work

Hartmann, T., Xu, X., **Kronast, M.**, Muehlich, S., Meyer, K., Zimmermann, W., Hurwitz, J., Pan, Z.Q., Engelhardt, S., and Sarikas, A. (2014). Inhibition of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 by simian virus 40 large T antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3371-3376.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Identifizierung von tumorinitiierenden Zellen in einem transgenen neuroendokrinen Magenkarzinommodell der Maus“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand