

Tag des Kolloquiums: 21.05.2008

Dekan: Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Meese

Prof. Dr. M. Löbrich

**Einfluss extrinsischer Faktoren auf die
Glioblastomzelle:
Untersuchungen zu den Auswirkungen
von Hypoxie auf genetische Veränderungen,
sowie von Bestrahlung auf die Stammzellpopulation**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und
Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

**von
Jens Radermacher**

Homburg, 2007

meiner Familie

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.
(Aristoteles)*

Während der Dauer der Promotion sind folgende Publikationen entstanden:

Diesel B, Seifert M, Radermacher J, Fischer U, Tilgen W, Reichrath J, Meese E. 2004. Towards a complete picture of splice variants of the gene for 25-hydroxyvitamin D3 α -hydroxylase in brain and skin cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90(1-5):527-32.

Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, Fischer U, Meese E. 2005. Vitamin D (3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin Cancer Res* 11(15):5370-80.

Radermacher J, Diesel B, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J, Fischer U, Meese E. 2006. Expression analysis of CYP27B1 in tumor biopsies and cell cultures. *Anticancer Res* 26(4A):2683-6.

Fischer U, Radermacher J, Mayer J, Mehrain Y, Meese E. 2008, Tumor hypoxia: impact on gene amplification in glioblastoma., *Int. J Onc.* ; *accepted*

Teile der Arbeit wurden bei folgender Tagung vorgestellt:

Radermacher J

Influence of the 12q13-15 amplification on the double-strand repair.

Vortrag durch J. Radermacher im Rahmen des Minisymposiums „Genomic recombination and checkpoint control“ des Graduiertenkollegs „Zelluläre Regulation und Wachstum“, 15. und 16. Dezember 2004, Homburg/Saar, Deutschland

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2004 bis 2007 am Institut für Humangenetik, Universitätskliniken des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Prof. E. Meese

Herrn Prof. E. Meese danke ich für die Themenstellung. Besonders danke ich ihm für seine ständige Unterstützung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an die Hedwig-Stalter-Stiftung. Durch die Verleihung eines Promotionsstipendiums war es mir möglich meine Doktorarbeit erfolgreich durchzuführen.

Bei Prof. M. Löbrich bedanke ich mich besonders für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und für die Bereitschaft zur Begutachtung der vorliegenden Arbeit. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Biophysik, Universitätskliniken des Saarlandes, für die freundliche Aufnahme.

Bei Frau H. Hussong und Roswitha Schepp bedanke ich mich für die Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Bestrahlung der Zellen.

Allen meinen Kollegen am Institut für Humangenetik danke ich für das gute Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft. Im Besonderen bedanke ich mich bei Frau Dr. A. Ruggieri für viele anregende Diskussionen; bei Frau S. Heisel, Frau S. Rheinheimer und Frau A. Flockerzi für die zahlreichen Tipps bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Dem Institut für Experimentelle Chirurgie danke ich für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit zur Zellelanalyse am Durchflusszytometer. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau R. Nickels, die mich in die Technik der Durchflusszytometrie eingewiesen hat.

Den Mitarbeitern der Molekularen Zellbiologie, Universitätskliniken des Saarlandes, danke ich für die freundliche Kooperation und die Möglichkeit zur Aufnahme der Neurospherebilder mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie.

Meiner Familie bin ich sehr dankbar für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Außerdem danke ich allen Freunden sehr für ihre Freundschaft und moralische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 8 -
1.1 Gehirntumore	- 10 -
1.2 Hypoxie und Bestrahlung von Hirntumoren.....	- 14 -
1.3 Neurale Tumorstammzellen.....	- 19 -
1.4 Zielsetzung	- 25 -
2. Material und Methoden.....	- 27 -
2.1 Zellkulturmethoden.....	- 27 -
2.1.1 Eukaryotische Zellkulturen.....	- 27 -
2.1.1.1 Kultivierung von adhärennten Zellen.....	- 27 -
2.1.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen.....	- 27 -
2.1.1.3 Kultivierung von Primärzellkulturen aus Glioblastomen.....	- 30 -
2.1.1.4 Aphidicolin und mini-Hypoxie Behandlung von Zellen.....	- 30 -
2.1.1.5 Langzeitlagerung von Zellen.....	- 31 -
2.1.1.6 Auftauen von Zellen.....	- 31 -
2.1.2 Chromosomenpräparation und G-Bänderung.....	- 32 -
2.1.2.1 Chromosomenpräparation.....	- 32 -
2.1.2.2 Giemsa-Färbung.....	- 33 -
2.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	- 34 -
2.2 Fluoreszenzmikroskopie	- 35 -
2.2.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	- 36 -
2.2.1.1 Fixierung von Zellen auf Glasplättchen.....	- 36 -
2.2.1.2 Immunfärbung.....	- 38 -
2.2.1.3 Silanisierung von Objektträgern.....	- 38 -
2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 39 -
2.2.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	- 42 -
2.3 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie und magnetischer Zellsortierung	- 41 -
2.3.1 Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	- 42 -
2.3.1.1 Messung extrazellulärer Epitope.....	- 44 -
2.3.1.2 Messung intrazellulärer Epitope.....	- 45 -
2.3.2 Magnetic activated cell sorting (MACS)	- 46 -

2.4	Antikörper	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.	Ergebnisse	- 48 -
3.1	Auswirkungen von Aphidicolin und reduziertem Sauerstoffpartialdruck auf Tumorzellen	- 48 -
3.1.1	Untersuchungen der Morphologie anhand der Glioblastomzelllinie TX3868.....	- 48 -
3.1.2	Charakterisierung der <i>homogeneously staining region</i> (HSR) in der Glioblastomzelllinie TX3868	- 51 -
3.1.2.1	Behandlung von TX3868-Zellen mit Aphidicolin	- 52 -
3.1.2.3	Behandlung von TX3868-Zellen unter mini-Hypoxie	- 60 -
3.2	Neurale Tumorstammzellen in Zelllinien des <i>Glioblastoma multiforme</i>	- 71 -
3.2.1	Charakterisierung von Glioblastomzellen.....	- 71 -
3.2.1.1	Unterscheidung von Glioblastomzelllinien anhand der Zellmorphologie.....	- 72 -
3.2.1.2	Charakterisierung von Glioblastomzelllinien anhand des Nachweises der Expression und der Immunfluoreszenz von Markerproteinen.....	- 76 -
3.2.2	Identifizierung der neuralen Tumorstammzelle in den Glioblastomzelllinien T6433 und TX3868 mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren.....	- 87 -
3.2.2.1	Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	- 89 -
3.2.2.2	Nachweis mittels Durchflusszytometrie.....	- 91 -
3.2.3	Anreicherung von neuralen Tumorstammzellen.....	- 97 -
3.2.3.1	Induktion und Anreicherung der neuralen Tumorstammzellen in der Glioblastomzelllinien T6433 durch den Einsatz selektiver Medien.....	- 97 -
3.2.3.2	Nachweis der Stammzellpotenz durch Differenzierung der induzierten neuralen Tumorstammzellsphäroide.....	- 105 -
3.2.3.3	Induktion von Tumorsphäroiden mittels mini-Hypoxie in der Zelllinie T6433.....	- 108 -
3.2.3.4	Anreicherung der neuralen Stammzellen aufgrund Röntgenbestrahlung in TX3868.....	- 111 -

4. Diskussion	- 112 -
4.1 Auswirkungen von mini-Hypoxie und Aphidicolin auf den X-chromosomalen HSR in der Glioblastomzelllinie TX3868....	- 115 -
4.2 Charakterisierung des Phänotyps verschiedener Glioblastom- zelllinien.....	- 122 -
4.3 Neurale Tumorstammzellen.....	- 128 -
4.4 Ausblick	- 147 -
5. Zusammenfassung.....	- 151 -
5. Conclusion.....	- 152 -
6. Literaturverzeichnis	- 152 -
7. Anhang	- 170 -
7.1 Chromosomale Modifikationen bei den mit unterschiedlichen	Medien etablierten T6433-Zellen..... - 170 -
7.2 Fallzahlen der vollstationär aufgenommenen Patienten für die	ICD10 Position C71 (<i>Glioblastoma multiforme</i>)* - 172 -
7.3 MACS-Sortierung der durch Bestrahlung angereicherten	neurale Tumorstammzellen in TX3868 - 174 -

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAD	Amino-Actinomycin D
°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Aphidicolin
BFB cycle	<i>breakage-fusion-bridge cycle</i>
bp	Basenpaare
ca.	circa
C	Cytosin
CFS	<i>common fragile sites</i>
Chr.	Chromosom
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
d.h.	das heißt
DM	<i>double-minute</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)

FGF	<i>fibroblastic growth factor</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
for	<i>forward</i> (vorwärts)
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Gravitation (zur Angabe der RCF eines Rotors)
G	Guanin
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
h	Stunde
HIF	<i>Hypoxia Inducable Factor</i>
HRE	<i>hypoxia response elements</i>
HRF	<i>HIF-related factor</i>
HSR	<i>homogeneously staining region</i>
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
l	Liter
LoH	<i>Loss of Heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
μ	mikro-
m	milli-
M	molar
min	Minute(n)
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorter</i>
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MTX	Methotrexat
n	nano-
NaAc	Natriumacetat
NHEJ	nicht-homologes Endjoining
NM	Normalmedium
NSC	<i>neural stem cell</i>
NSP	<i>neurosphere</i>
OD	optische Dichte

p	pico- oder Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms (<i>petit</i>)
P	Passage
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms (<i>queue</i>)
RFS	<i>rare fragile sites</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SCM	Stammzellmedium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	<i>sodium chloride, sodium citrate</i> (Natriumchlorid, Natriumcitrat) oder side-scatter
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i>
U	unit(s) (Einheit(en))
u.a.	unter anderem
ü.N	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

Abb. 1.1: Darstellung des <i>breakage-fusion-bridge cycle</i> (BFB cycle) Mechanismus.....	- 15 -
Abb. 3.1: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von TX3868-Zellen, die für 18 h mit 1,0 µg/µl Aphidicolin Endkonzentration behandelt wurden bzw. unbehandelte Zellen	- 48 -
Abb. 3.2: TX3868-Zellen im Durchlichtmikroskop.....	- 49 -
Abb. 3.3: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der X-chromosomalen homogeneously staining region (HSR) in der Glioblastomzelllinie TX3868.-	51 -
Abb. 3.4: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von TX3868-Zellen die für 18h mit APC in einer Endkonzentration von 1,0 µg/µl behandelt wurden; DM-Induktion I.	- 53 -
Abb. 3.5: Aufnahme einer FISH von APC-behandelten TX3868-Zellen; variable DM-Induktion II.....	- 54 -
Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TX3868-Zellen die für 18 h mit 1,0 µg/µl APC behandelt wurden; variable DM-Induktion III.....	- 55 -
Abb. 3.7: Aufnahme der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von mit APC-behandelten TX3868-Zellen mit einer Änderung der HSR-Struktur.....	- 57 -
Abb. 3.8: Fluoreszenz in situ Hybridisierung von APC-behandelten TX3868-Zellen mit DM-Reintegration.....	- 59 -
Abb. 3.9: TX3868-Zellen, die 24 h unter mini-Hypoxie kultiviert wurden; DM-Induktion.....	- 62 -
Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TX3868-Zellen, die für 24 h unter mini-hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden; Änderung der HSR-Struktur.....	- 63 -
Abb. 3.11: FISH von kultivierten TX3868-Zellen nach 24 h-stündiger mini-Hypoxie; chromosomaler Bruch I.....	- 66 -
Abb. 3.12: Fluoreszenz in situ Hybridisierung einer mini-Hypoxie-Präparation (Dauer 24 h) von behandelten TX3868-Zellen; chromosomaler Bruch II	- 67 -
Abb. 3.13: Fluoreszenz in situ Hybridisierung von TX3868-Zellen, die 24 h unter mini-hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden; chromosomaler Bruch III	- 68 -
Abb. 3.14: Durchlichtmikroskopische Darstellung von kultivierten Glioblastomzelllinien	- 72 -
Abb. 3.15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Immunfärbungen der untersuchten Markergene	- 83 -

Abb. 3.16: Nachweis von neuronalen Tumorstammzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von T6432-Zellen.	- 88 -
Abb. 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer neuronalen T6433-Tumorstammzelle	- 89 -
Abb. 3.18: Identifizierung der CD133-positiven Tumorzellen innerhalb der zu untersuchenden Zellpopulationen.	- 91 -
Abb. 3.19: Darstellung der CD133-positiven Zellpopulationen innerhalb der Gesamtlebendpopulationen von unbehandelten und bestrahlten TX3868-Zellen.	- 93 -
Abb. 3.20: CD133-positiv Zellpopulationen innerhalb der Gesamtlebendpopulationen von unterschiedlich kultivierten T6433-Zellen.....	- 94 -
Abb. 3.21: Etablierung der Glioblastomzelllinie T6433 unter Anwendung unterschiedlicher Kulturmedien.	- 97 -
Abb. 3.22: Vergleich der relativen Größe neu induzierter (kleiner Sphäroid) und bereits für einen längeren Zeitraum (großer Sphäroid) kultivierten Neurosphäroide.....	- 99 -
Abb. 3.23: Identifizierung der CD133+/Nestin- - bzw. CD133+/Nestin+-Zellen.	- 101 -
Abb. 3.24: Analyse des Gehaltes an CD133-positiven Stammzellen zum Zeitpunkt der NSP-Induktion und nach weiterer Kultivierung der induzierten NSPs als Suspensionskultur.	- 102 -
Abb. 3.25: Morphologische Charakterisierung der Tumorsphäroide nach Zugabe der Differenzierungsmedien.....	- 106 -
Abb. 3.26: Anteil an CD133-positiven Zellen innerhalb der unter mini-Hypoxie entstandenen Neurosphäroide.	- 108 -
Abb. 3.27: Anteil an CD133-positiven Zellen innerhalb der mini-Hypoxie Neurosphäroide nach weiterer mini-Hypoxie.	- 109 -
Abb. 3.28: Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen nach Bestrahlung.	- 110 -

Tab. 3.1: Auswertung der durch die APC-Behandlung induzierten chromosomalen Veränderungen bei TX3868-Zellen.....	- 60 -
Tab. 3.2: Auswertung der unter mini-Hypoxie entstandenen chromosomalen Brüche bei TX3868-Zellen.....	- 69 -
Tab. 3.3: Ergebnisse der durchflusszymetrischen Messungen der Expression der untersuchten Gene in der Glioblastomzelllinie T3095.	- 76 -
Tab. 3.4: Darstellung der Resultate der durchflusszymetrischen Messungen der Expression der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie TX3095.....	- 77 -
Tab. 3.5: Darstellung des Expressionsmuster der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie T3868. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer.	- 78 -
Tab. 3.6: Darstellung der Messungen der Expression der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie TX3868.	- 79 -
Tab. 3. 7: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Messwerte der Expression der untersuchten Gene in der Glioblastomzelllinie H346.	- 80 -
Tab. 3.8: Aufstellung der durchflusszymetrischen Messdaten der Expression der Markergene in der Glioblastomzelllinie T6217.	- 81 -
Tab. 3. 9: Durchflusszytometrie verschiedener Marker nach Differenzierung von Neurosphäroiden.	- 104 -

1. Einleitung

Die Funktionalität von Geweben wird durch ein Gleichgewicht aus Zellvermehrung (Proliferation), Zelldifferenzierung und Zellabbau (Apoptose) gewährleistet. Gesteuert wird dies durch die Aktivität proliferationsfördernder und proliferationshemmender Gene. Hierbei werden zwei Klassen von Genen unterschieden, die Tumorsuppressorgene und die Onkogene.

Ein theoretisches Modell geht davon aus, dass normale Zellen aberrierende Zyklen der Zellteilung, die durch krebsfördernde Stimuli, wie etwa eine fehlerhafte Aktivierung von Onkogenen, detektieren und stoppen können (Venkitaraman, 2005). Kommt es allerdings aufgrund von Mutationen oder Deletionen zur Akkumulation von Veränderungen im Genom, so kann dies zum Verlust der genetischen Proliferationskontrolle führen. Dies kann letztlich in der neoplastischen Entwicklung eines Tumors enden (Seemayer & Cavenee, 1989; van der Kelft, 1997). Es zeigte sich in tierischen Tumormodellen, dass solche Veränderungen Onkogene hervorbringen können, die einen dominanten Funktionszugewinn (*gain of function*) aufweisen, zusätzlich jedoch auch Tumorsuppressorgene entstehen, bei denen ein rezessiver Funktionsverlust (*loss of function*) zu verzeichnen ist (Weinberg, 1996).

Während des Vorganges der Tumorprogression kommt es sehr häufig zur Mutation von Onkogenen, die im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung überexprimiert bzw. auch amplifiziert werden können. Dabei stellen Amplifikationen Kopienzahlerhöhungen von DNA-Bereichen dar. Allerdings können auch andere Mechanismen zur Tumorentstehung beitragen. So führen neben strukturellen Änderungen (Translokationen, Deletionen und Inversionen) auch numerische Genkopienveränderungen die Expression von Tumorsuppressor- und Onkogenen.

So wurde die Amplifikation von Onkogenen in humanen soliden Tumoren in Zusammenhang mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Tumorprogression gebracht. In Brusttumoren wurde eine erhöhte Amplifikationsrate für das Gen ERBB2 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) beschrieben (Tripathy und Bent, 1992), während die Amplifikation des Gens

MDM2 (*murine double minute 2*) mit einer Verschlechterung der Prognose in Gliomen korreliert (Schiebe et al., 2000) werden konnte. Somit kann es aufgrund von Genkopiererhöhung zu einer gesteigerten Genexpression kommen.

Diese veränderte Genexpression konnte allerdings zur Identifizierung von verschiedenen Onkogenen genutzt werden. So zum Beispiel für das Gen EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). EGFR liegt in 40 bis 50 % der Glioblastome in einem amplifizierten Zustand vor (Van der Kelft, 1997).

1.1 Gehirntumore

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist überwiegend aus zwei verschiedenen Zelltypen aufgebaut, den Nervenzellen und den Gliazellen, die das Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems darstellen. Die von ihnen ausgehenden Tumore des ZNS werden daher als „Gliome“ bezeichnet. Zu den Gliomen werden neben den Astrozytomen noch die Oligodendrogliome gezählt. Gliome zeigen meist ein schlecht begrenzendes Wachstum gegenüber angrenzende Gehirngewebe und weisen nicht selten ein, in das benachbarte normale Gehirngewebe, infiltrierendes Wachstum auf (Burger et al., 1988; Kaba und Kyritsis, 1997). Aufgrund der vermehrten räumlichen Ausdehnung und der Infiltration von normalen Hirngeweben kommt es daher oft zu motorischen und sensorischen Defiziten, Kopfschmerzen, epileptischen Anfällen und Wesensveränderungen.

Tumore des Gehirns und des Rückenmarkes werden im Allgemeinen als primäre Geschwülste des ZNS angesehen und entstehen im Hirn, während die sekundären Geschwülste als metastasierende Zellen in das Gehirn gelangen. Zu den primären Tumoren werden sowohl gutartige, als auch bösartige Geschwülste gezählt. Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, wie z.B. Lungen-, Darm- oder Brusttumoren, kommen Tumore des Gehirns wesentlich seltener vor und stellen nach Angaben der WHO (*World Health Organization*) weniger als 2 % der malignen Neoplasien dar (Kleihues et al., 2000). Die Häufigkeit an einem Gliom zu erkranken, liegt bei fünf bis zehn aus 100.000 Menschen und somit stellt dieser Tumor die häufigste intrakraniale Neoplasie dar (Behin et al., 2003). Im Jahr 2005 sind in Deutschland 26.521 Menschen neu an einer bösartigen Neubildung des Gehirns oder des Rückenmarkes erkrankt, wobei mehr Menschen an einem primären Tumor des Gehirns erkranken und Männer insgesamt häufiger betroffen sind als Frauen (Quelle: Statistisches Bundesamt, Krankenhausdiagnosestatistik © Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2007; eine detaillierte Auslistung ist dem Anhang zu entnehmen). Tumore des Rückenmarks und des Gehirns können prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, am häufigsten finden sie sich jedoch zwischen dem 5. und dem 7. Lebensjahrzehnt (Preusser et al., 2006). Daneben wird auch ein geringer Teil dieser Tumore bei Kindern diagnostiziert. Auffällig ist bei Kindern die hohe Inzidenz dieser Erkrankung. Hier stehen Gehirntumore nach Leukämien an

zweiter Stelle in der WHO-Häufigkeitsstatistik. Allerdings bleibt der Grund warum Gehirntumore bei Kindern häufiger auftreten als bei Erwachsenen bislang ungeklärt (Maher und Raffel., 2004).

Die klassifizierende Einteilung der diffus infiltrierenden Astrozytome erfolgt anhand histopathologischer Merkmale. Die WHO unterteilt diesen Tumortyp in vier Gruppen (Louis et al., 2007), bei dem eine schlechtere Prognose für den Patienten mit einem höheren Grad im Zusammenhang steht. Die Aufteilung umfasst pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), diffuse Astrozytome (WHO Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und das *Glioblastoma multiforme* (GBM, WHO Grad IV).

Pilozytische Astrozytome (WHO Grad I) zeigen die geringste Malignität und sind in den meisten Fällen benigne. Sie stellen zudem die häufigste Art des Hirntumors bei Kindern dar (Klein et al., 2006) und sie unterscheiden sich anhand von Merkmalen wie der Lokalisation, dem genetischen Profil, der Morphologie und den klinischen Charakteristika, von den höhergradigen Astrozytomen (Cavenee, 2000).

Die diffusen Astrozytome (WHO Grad II) und die anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) werden vermehrt im Erwachsenenalter zwischen dem 30. und dem 40. bzw. dem 40. und dem 45. Lebensjahr diagnostiziert und zeichnen sich durch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Rezidivbildung aus. Zusätzlich kann es innerhalb von wenigen Jahren zur Progression eines diffusen Astrozytoms zum anaplastischen Astrozytom kommen (van Deimling et al., 1994).

Tumore des WHO Grades II umfassen 10 – 15 % der astrozytären Gliome und weisen neben einer niedriggradigen Malignität auch einen langsamen klinischen Verlauf auf, sind jedoch nicht mittels chirurgischer Intervention therapierbar. Anaplastische Tumore des Grades III sind dagegen maligne und kennzeichnen sich durch eine starke, feingewebliche Anaplasie aus. Diese geht mit einem raschen Tumorwachstum einher und führt innerhalb weniger Jahre zum Tode. Sowohl das diffuse, als auch das anaplastische Astrozytom neigen zur spontanen Entwicklung in ein hochmalignes Glioblastom (Reifenberger et al., 2004).

Das *Glioblastoma multiforme* (WHO Grad IV) stellt den malignesten Tumortyp unter den diffus infiltrierenden Astrozytomen dar. Es tritt bevorzugt im Großhirn von Erwachsenen zwischen dem 45. und dem 70. Lebensjahr auf und zeichnet sich durch pathologische Merkmale wie zelluläre Polymorphismen, Kernatypien und einer auffallend hohen mitotischen Aktivität aus. Die mittlere Überlebensdauer liegt bei etwa 12 Monaten (Krex et al., 2007). Für die schlechte Prognose nach Diagnosestellung eines GBMs sind mehrere Faktoren verantwortlich. So tragen die starke Tendenz zur schnellen Infiltration benachbarter Strukturen und das hohe Potential zur mitotischen Teilung wesentlich zu dieser Problematik bei (Buerger et al., 1988).

Das Glioblastom ist zudem durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen gekennzeichnet, die sich sowohl auf molekularer, als auch auf zytogenetischer Ebene manifestieren. Dies spiegelt sich auch im klinischen Erscheinungsbild wider (Noble und Dietrich, 2004).

Für die Entwicklung eines Glioblastoms gibt es zwei grundlegend verschiedene Entstehungsmöglichkeiten. Das primäre Glioblastom tritt bevorzugt bei älteren Personen im sechsten Lebensjahrzehnt auf und entsteht *de novo*. Das sekundäre Glioblastom wiederum entwickelt sich meist aus präexistierenden niedriggradigen Astrozytomen und tritt im vierten bis fünften Lebensjahrzent auf (Reifenberger et al., 2004). Hierbei unterscheidet sich das primäre Glioblastom mit einer schlechteren Prognose und unterschiedlichen genetischen Veränderungen vom sekundären Glioblastom.

Das primäre Glioblastom wird durch typische Veränderungen des Gens EGFR gekennzeichnet, bei denen sich neben der Amplifikation auch häufig Überexpressionen dieses Gens zeigen. Zusätzlich zu EGFR finden sich auch vermehrt PTEN (*phosphatase and pensin homolog deleted on chromosome ten*)-Mutationen, homozygote Deletionen von p16 und Amplifikationen bzw. Überexpressionen des MDM2-Gens (Kleihues und Ohgaki, 2000). Als signifikante zytogenetische Aberrationen werden in über 80 % der primären Glioblastome Verluste eines Chromosoms 10 (*Loss of heterozygosity on chromosome 10*, LOH #10) nachgewiesen (Horiguchi et al., 1999; Fujisawa et al., 2000). Ein weitere typische Veränderung in Glioblastomen stellen Deletionen eines kurzen Arms von Chromosom 9 dar (Louis, 1997).

Sekundäre Glioblastome entwickeln sich aufgrund der Anhäufung von genetischen Veränderungen aus niedergradigen, diffus infiltrierenden Astrozytomen der WHO-Grade II und III (Daumas-Duport et al., 1988, Reifenberger et al., 2004) und sind vermehrt bei jüngeren Patienten zu finden (Westermarck und Nister, 1995). Hier finden sich meist Mutationen bzw. Deletionen des p53-Gens (Kleihues und Ohgaki, 1999; Collins, 2004).

1.2 Hypoxie und Bestrahlung von Hirntumoren

Glioblastome weisen vielfältige genetische Veränderungen auf. So kommt es häufig zur Bildung von Amplifikationseinheiten. Eine solche Einheit findet sich mit der chromosomalen Region 7p11-12, die in 40 % der Glioblastome vertreten ist. Spezifische Veränderungen des Gens EGFR werden dabei als wesentliche Kennzeichen für die Transformation in ein malignes Glioblastom angesehen (Diedrich et al., 1995; Lopez-Gines et al., 2005). Eine weitere wichtige Amplifikationseinheit stellt die Region 12q13-14 dar. In 14 % der Glioblastome konnte eine Amplifikation bzw. Überexpression von zumindest einem der darin liegenden Gene nachgewiesen werden (Reifenberger et al., 1995). Die Gene CDK4 (*cyclin dependant kinase4*), SAS (*sarcoma amplified sequence*), sowie das Gen MDM2 (*murine double minute 2*) liegen hier vermehrt in einer amplifizierten Form vor, wobei SAS und CDK4 meist co-amplifiziert sind. CDK4 und MDM2 stellen wichtige Gene der Zellproliferation und des Zellzyklus dar, wobei MDM2 als ein bedeutender Faktor bei der Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 identifiziert werden konnte (Reifenberger et al., 1996).

Neben molekularen Veränderungen, können in Glioblastomen auch zytogenetische Aberrationen auftreten. So wird die Bildung von *double-minutes* (DMs) bzw. einer *homogeneously staining region* (HSR) als Charakteristika von Glioblastomen angesehen. DMs entstehen durch extra-chromosomale Mechanismen und sind in etwa 50 % der Glioblastome zu finden. DMs sind instabile Genamplifikationen, bei denen zusätzliche Genkopien extrachromosomal vorliegen (Voigt et al., 2004; Shimizu et al., 2005). Eine HSR stellt hingegen ein stabiles Amplifikationsereignis dar, bei dem zusätzliche Genkopien innerhalb des Chromosoms verbleiben, diese allerdings häufig entfernt vom Ursprungsort wieder reintegriert werden (Schwab et al., 1984). Die Entstehung eines HSRs ist durch sich wiederholende Zyklen von Chromosomenbrüchen, Fusionen von Chromosomenabschnitten und der Bildung von Anaphasebrücken, dem sogenannten *breakage-fusion-bridge cycle* (BFB cycle), gekennzeichnet (Bigner et al., 1990, Coquelle et al., 1997; Debatisse et al., 1998; Lim et al., 2005).

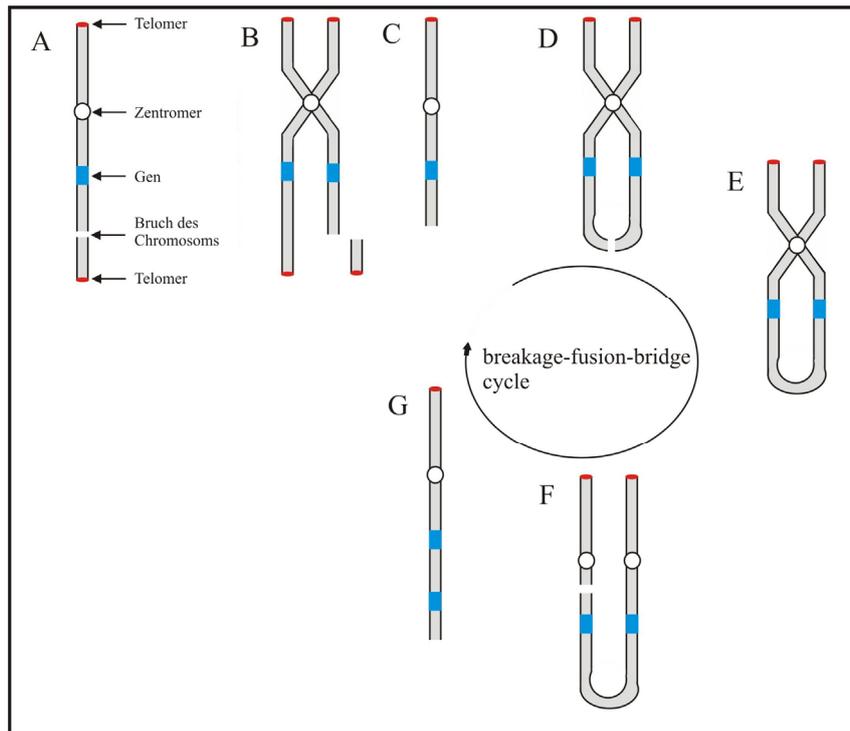


Abb. 1.1: Darstellung des *breakage-fusion-bridge cycle* (BFB cycle) Mechanismus.

Gezeigt ist der initiale Bruch des Chromosoms (A) der zum Verlust des Gens in einem homologen Chromosom führt (C). Nach der Fusion der Chromatiden an der Bruchstelle (D+E) kommt es in der Mitose zu einem erneuten Bruch (F) der fusionierten Chromatiden. Dieser resultiert im Verlust eines Chromosomenabschnittes in der einen Tochterzelle bzw. in der Duplikation eines Chromosomenabschnittes in der anderen Tochterzelle (G). Anhand sich wiederholender Zyklen kann dies zur Anhäufung von Genkopien führen

Der Vorgang des BFB-Mechanismus erfolgt entweder durch eine Fusion von gebrochenen Schwesterchromatiden oder einen initialen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) (s. Abb. 1.1). Dieser kann an einer zufälligen Stelle im Genom stattfinden, allerdings besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass ein Doppelstrangbruch an einer Art Sollbruchstelle, einer so genannten *fragile site*, eintritt. *Fragile sites* stellen zerbrechliche Stellen im Chromosom dar, an denen sich Brüche ereignen können (Coquelle et al., 2002). Die Klassifizierung dieser *fragile sites* erfolgt anhand ihrer Häufigkeit innerhalb der Bevölkerung und teilt sie in *common* und *rare fragile sites* ein. *Common fragile sites* (CFS) sind in nahezu 100 % der Menschen vertreten, während *rare fragile sites* (RFS) lediglich in 5 % der Bevölkerung zu finden sind (Demirhan et al., 2006). Die Aktivierung von *fragile sites* kann wiederum zur Bildung von *double-minutes* führen. Ciullo und Mitarbeiter konnten die Initiierung des BFB-Mechanismus anhand der Aktivierung einer CFS in menschlichen Tumoren nachweisen (Ciullo et al., 2002). CFS sind in somatischen Zellen stabil (Glover et al., 2006), können allerdings durch die Kultivierung von Zellen unter stressvollen

Konditionen (Hypoxie, Temperaturerhöhung, -erniedrigung) induziert werden (Glover et al., 2005). Weitere Aktivoren von *fragile sites* sind neben Aphidicolin (APC), einem Inhibitor der eukaryotischen DNA-Replikation (Glover et al., 1984), auch Chemikalien, die in der Chemotherapie Verwendung finden. Zu diesen Stoffen gehören u.a. Methotrexat (MTX) oder N-(phosphonacetyl)-L-aspartat (PALA) (Coquelle et al., 2002).

Für die Amplifikation von Genen wird als weiterer Faktor die Mikroumgebung des Tumors angesehen. Aufgrund der schnell voranschreitenden Vaskularisierung können die neu gebildeten Gefäße, deren Funktionalität stark reduziert ist, die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht gewährleisten und daher ist die cerebrale Durchblutung in malignen Glioblastomen herabgesetzt und es kommt somit zur Hypoxie (Raza et al., 2002; Brat und Mapstone, 2003). Diese Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes begünstigt wiederum genomische Instabilitäten und kann außerdem sehr spezifisch *fragile sites* induzieren (Coquelle et al., 1998). Coquelle und Mitarbeiter beschrieben einen Zusammenhang zwischen Hypoxie, der Aktivierung fragiler Stellen im Genom und dem Mechanismus der Genamplifikation. Daneben konnten sie zeigen, dass Hypoxie die Fusion von DMs bewirken kann. In einer späteren Studie konnten sie die gezielte Reintegration dieser DMs in ein Chromosom induzieren. Ein solcher Prozess kann dann seinerseits die Entstehung eines HSRs begünstigen. Zusätzlich konnten sie noch einen durch die Hypoxie induzierten Zusammenbruch der HSR-Struktur nachweisen (Coquelle et al., 2002).

Eine Hypoxie wird ausgelöst, wenn Zellen in einer Entfernung von 100 - 150 μm zu Blutgefäßen liegen. Dies stellt die maximale Entfernung dar, die Sauerstoff durch das Gewebe hindurch diffundieren kann. Kommt es, aufgrund eines größeren Abstandes zu den Sauerstoff führenden Gefäßen, zur Unterversorgung mit Sauerstoff, kann dies zur chronischen Hypoxie führen. Allerdings kann es in den Tumor umgebenden Blutgefäßen zur zeitweiligen Unterbrechung der Blutversorgung und somit zur akuten Hypoxie kommen (Höckel und Vaupel, 2001a, b). Dieser Zustand ist jedoch reversibel und nach erneuter Etablierung der Sauerstoffversorgung kommt es zur Reoxygenierung des Tumors. Der Wechsel von Hypoxie und Reoxygenierung kann jedoch zur Ansammlung von freien Radikalen und somit zu Schädigungen des Gewebes

führen (Guo und Bhat, 2006). Aufgrund des Wechsels von Hypoxie und Reoxygenierung kommt es auch zu einer Aktivierung von Hypoxie Reaktionselementen (HRE, *hypoxia response elements*), um die Aufrechterhaltung des Metabolismus zu gewährleisten (Toescu, 2004).

Die durch die Hypoxie bedingten Veränderungen verursachen neben einer Zunahme der Aggressivität und malignen Progression des Tumors (Vaupel, 2004a) auch eine Resistenz gegenüber Bestrahlung (Greco et al, 2003; Marples et al., 2003; Vaupel, 2004b; Semenza, 2004; Zagórska und Dulak, 2004). Ein wichtiger Faktor spielt hierbei die Aktivierung von so genannten Hypoxie induzierbaren Faktoren (HIF, *Hypoxia Inducible Factor*). Diese Faktoren werden durch den Prozess der Reoxygenierung aktiviert, und führen zur Ansammlung von ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Michiels et al., 2002; Hammond et al., 2003). Der Haupttranskriptionsregulator der Hypoxie stellt HIF-1 dar. HIF-1 aktiviert die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie etwa VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Epo (*Erythropoietin*) und FGF (*fibroblast growth factor*) (Harris, 2002; Moeller et al., 2004) und induziert somit die Angiogenese (Jain et al., 2007). Neben HIF-1 gibt es noch weitere durch Hypoxie induzierbare Faktoren, bei denen ein Zusammenhang mit der Tumorentstehung beschrieben werden konnte. Zu ihnen zählen HIF2 α , HRF (*HIF-related factor*) und HIF-3 α (Semenza, 2000; Zagórska und Dulak, 2004; Lofstedt et al., 2007; Liao und Johnson, 2007).

Aufgrund eines reduzierten Sauerstoffpartialdruckes kommt es zur Resistenz gegenüber Bestrahlung (Greco et al, 2003; Marples et al., 2003; Semenza, 2004), Neben dem Einsatz von Chemotherapeutika, wie etwa Temozolomid (TMZ) (Mirimanoff, 2006) stellt die Bestrahlungstherapie den Standardtherapieansatz zur Behandlung von Glioblastomen dar. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit TMZ bei einem Teil der Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom mit einer erhöhten Überlebenszeit korrelierte (Parlato et al., 2006; de la Fuente, 2007). Der Effekt des TMZ könnte hierbei auf eine epigenetische Inaktivierung des DNA-Reparaturenzyms Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) zurückzuführen sein. Zusätzlich wurde auch nachgewiesen, dass nicht alle Glioblastom-Patienten von einer ergänzenden Therapie mit TMZ zur Bestrahlungstherapie profitierten. So zeigte sich in einer Vergleichsstudie mit

Patienten, die zusätzlich noch eine MGMT-Promotormethylierung aufwiesen, dass bei diesen Patienten die Kombination aus Strahlentherapie und Temozolomidgabe, mit der höchsten Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden konnte (Palanichamy et al., 2006). Anhand vorklinischer Studien konnte in Zelllinien, die von Gliomen abstammten, ein synergetischer Effekt von Bestrahlung und Temozolomid gefunden werden (Stupp et al., 2005). Daher wurde in den letzten Jahren eine Kombination aus Radiotherapie und Chemotherapie, die so genannte Chemoradiotherapie, erfolgreich eingesetzt (Stupp et al., 2007).

Bei der Behandlung von Gehirntumoren steht neben der Zerstörung von Tumorzellen, als weiteres Therapieziel die Eliminierung von Endothelzellen der Blutgefäße. Die Effekte der Bestrahlung, also die Zerstörung der Blutgefäße und Tumorzellen, sowie die Bildung von ROS und damit einhergehend die Aktivierung von HIF-1, sind höchstwahrscheinlich die Gründe für die bei Glioblastomen auftretende Resistenz gegenüber Bestrahlung (Semenza et al., 2004). Für HIF-1 α sind über 60 putative Zielgene identifiziert worden, die allesamt eine HIF-1 α -Bindestelle aufweisen (Semenza et al., 1992). Weiterhin ist HIF-1 aufgrund der intratumoralen Hypoxie in vielen humanen Tumoren überexprimiert und führt aufgrund von Mutationen zu Funktionszugewinnen in Onkogenen (z.B. ERBB2), allerdings auch zu Funktionsverlusten in Tumorsuppressorgenen (z.B. VHL und PTEN). Zusätzlich konnte eine HIF-1 Überexpression mit einem Ausbleiben eines Behandlungserfolges und einer erhöhten Mortalität assoziiert werden (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000). Daher wird vermutet, dass Hypoxie selbst als selektierende Kraft bei der fortschreitenden Tumorprogression bzw. Angiogenese fungiert (Semenza et al., 2003, Jain et al., 2007). So konnte auch gezeigt werden, dass Mauszellen, bei denen die Funktion des Gens HIF-1 α ausgeschaltet wurde, eine erhöhte Strahlensensibilität aufweisen (Unruh et al., 2003). In Tumorexograftmodellen konnte zudem nachgewiesen, dass Bestrahlung zur Aktivierung von HIF führt, was wiederum eine erhöhte Expression der Gene VEGF und bFGF zur Folge hatte und somit zum Schutz vor strahlungsbedingtem Zelltod der hier eingesetzten endothelialen Zellen führte (Moeller et al., 2004). Dieser Effekt wurde vor kurzem auch für neurale Tumorstammzellen nachgewiesen (Rich, 2007).

1.3 Neurale Tumorstammzellen

Bei neuronalen Stammzellen wurden Untersuchungen zu den Auswirkungen der Hypoxie auf die Proliferation und die Differenzierung durchgeführt (Zhu et al., 2005). So zeigte sich, dass neurale Stammzellen (NSC, *neural stem cell*) sowohl im embryonalen, als auch im adulten Gehirn in einer physiologischen Hypoxie, mit einem Gehalt von 1 - 5 % Sauerstoff, vorkommen können. Daneben konnte die Arbeitsgruppe von Zhu nachweisen, dass aufgrund starker Hypoxie sowohl die Überlebensrate, als auch die Proliferation und die Differenzierung der NSCs positiv beeinflusst wurden. Eine milde Hypoxie könnte wiederum die Proliferation begünstigen und somit Einfluss auf den potenten Status der NSCs *in vitro* nehmen. Als Normoxie wurde in dieser Studie ein 20 %-iger Gehalt von Sauerstoff angesehen, während ein Sauerstoffgehalt von 6 % im Gewebe als milde Hypoxie, ein 2 %-iger Sauerstoffgehalt als mini Hypoxie und ein 1 % Sauerstoff als komplette Hypoxie bezeichnet wurden. Außerdem konnte hier für HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Zellen, die einer milden Hypoxie ausgesetzt wurden, nachgewiesen werden.

Embryonalen als auch adulten Stammzellen werden anhand ihrer einzigartigen Fähigkeit definiert, ein Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung (*self-renewal*) und Differenzierung aufrechtzuerhalten (Weissman, 2000). Allein durch dieses Gleichgewicht ist es möglich, dass ausgereifte Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Gewebefunktion notwendig sind, gebildet und ersetzt werden können, ohne dass dies zu einer Auszehrung des Stammzellreservoirs führt. Ein weiteres Kriterium, das Stammzellen von allen anderen Zellarten im Körper unterscheidet, ist die Potenz zur Differenzierung in spezialisierte Zelltypen (Terskikh, et al., 2006).

Es gibt verschiedene Typen von Stammzellen. Die totipotente Stammzelle stellt hierbei die Grundform aller Stammzellen dar. Es handelt sich dabei um die Zygote, welche die Fähigkeit zur Entwicklung des Embryos und der Plazenta besitzt. Aus ihr entstehen alle embryonalen und adulten Zelltypen und daneben werden aus ihr sämtliche Gewebetypen des Organismus gebildet. Die weiteren

Stammzelltypen sind in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung begrenzt. So besitzt die embryonale Stammzelle lediglich eine Pluripotenz. Aus ihr entsteht der Embryo. Diese Zelle kann sich in die drei somatischen Keimblätter differenzieren, die den späteren Organismus ausmachen, Mesoderm (Knochen, Blut, Muskeln, etc.), Ektoderm (Neurone, Haut, etc.) und Endoderm (Leber, Lunge, Pankreas, etc.). Aus den multipotenten Stammzellen wiederum können sich nur noch somatische Zellen und Zellen der Keimbahn entwickeln (Morrison et al., 1997). Eine neuere Entdeckung galt den gewebsbezogenen Stammzellen (TCSC, *tissue committed stem cells*). Diese sind für die Entwicklung einzelner Gewebe verantwortlich (Lemoli et al., 2005).

Bislang war nur von wenigen Geweben bekannt, dass sie Stammzellen enthalten. Mittlerweile wird jedoch davon ausgegangen, dass wahrscheinlich alle Gewebe eine Stammzellpopulation enthalten, die für das Wachstum und die Regeneration dieser Gewebe verantwortlich ist (Majka et al., 2005). So wurden in zahlreichen Organen spezifische Stammzellen entdeckt, z.B. neuronale Stammzellen in Hirngeweben (Eriksson et al., 1998; Johansson et al., 1999), ovale Stammzellen in Lebergeweben (Alison et al., 1996; 2004) oder aber auch cardiale Stammzellen in Herzgeweben (Beltrami et al., 2003; Laugwitz et al., 2005). Die am besten studierte Stammzelle stellt allerdings die hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) dar. Diese vermag sich in alle Blutzelllinien, sowohl myeloider, als auch lymphoider Herkunft, zu differenzieren.

Die Teilung von Stammzellen selbst erfolgt auf zwei Wegen. Durch eine symmetrische Teilung entstehen zwei neue, identische Stammzellen mit all den Fähigkeiten der Ursprungszelle. Durch eine asymmetrische Teilung hingegen verbleibt eine Zelle im Stadium der Ausgangszelle, während die andere Zelle in die Differenzierung gezwungen wird (Ulloya-Montoya, 2005). Mit Hilfe von Mausversuchen konnte für die hämatopoetischen Stammzellen eine hierarchische Architektur des gesamten hämatopoetischen Systems entwickelt werden. Durch den Einsatz von spezifischen Oberflächenmarkern (z.B. CD34) konnte hier die Existenz von Vorläuferzellen und mindestens acht ausdifferenzierten Blutzellen nachgewiesen und somit Bezeichnungen für die einzelnen Zelltypen entwickelt werden (Spangrude et al., 1988; Bhatia et al., 1997). Ähnliche Versuche wurden auch für andere adulte Stammzellen durchgeführt, so z.B. für neurale Stammzellen (Vescovi et al., 2001; Galli et al.,

2003). Diese entwickeln sich aufgrund von Differenzierungsprozessen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Galli et al., 2003; Doetsch, 2003).

Bis vor wenigen Jahren noch galt das Dogma, dass im erwachsenen Gehirn keine Neuroneogenese stattfindet. Dies wurde mit der Entdeckung proliferierender Vorläuferzellen, widerlegt, die zu Neuronen ausdifferenzierten (Gross, 2000). Sowohl in der subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels (Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Seri et al., 2006), als auch in der subgranulären Zone (SGZ) des Dentate Gyrus (DG) (Gueneau et al., 1982) konnte dieser Prozess nachgewiesen werden. Die Neuroblasten die im SVZ entstanden, wanderten in einem Verbund entlang des *Rostral Migratory Stream* (RMS) zum olfaktorischen System (*Olfactory Bulb*, OB) und differenzierten dort zu Interneuronen. Manche der in der SVZ neu entstandenen Zellen wanderten in die granuläre Zone des DG und entwickelten sich hier zu Neuronen. Diese beiden, hier beschriebenen Mechanismen der adulten Neuroneogenese konnten sowohl in Primaten, als auch in Menschen detektiert werden (Eriksson et al., 1998; Pencea et al., 2001).

Der Prozess der Differenzierung von neuronalen Stammzellen wird durch ein Gleichgewicht von Wachstumsfaktoren gewährleistet. Hier werden die extrinsischen, also von außen kommenden, und die intrinsischen, die auf innere Vorgänge beschränkten, Faktoren unterschieden.

Zu den extrinsischen Faktoren werden neben FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (Gritti et al., 1995 & 1999) auch EGF (*epidermal growth factor*) (Vescovi et al., 1993) und TGF- α (*transforming growth factor α*) (Zhou und Skalli, 2000) gezählt. Die Proliferation und im besonderen Maße die Selbsterneuerung spielen dabei eine wichtige Rolle, sowohl bei neuronalen Stammzellen (Shi et al., 2007), als auch bei neuronalen Tumorstammzellen (Lee et al., 2006). In den letzten Jahren wurde auch der Einfluss von TGF- β (Roberts und Sporn, 1993; Golestaneh und Mishra, 2005) diskutiert. TGF- β und die zugehörigen Signalwege sind häufig in Vorgängen des Wachstums und der Differenzierung von Zellen involviert (Gold, 1999). Über die Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Proteine Smads, Smad2 und Smad3 aktiviert TGF- β das Protein TGF- α , indem es an dessen Rezeptor T β RI (*TGF- β type I receptor*) bindet. Der Name SMAD leitet sich ab von MAD (*mothers against decapentaplegic*), einem Drosophila-Protein und

von SMA (*smaller worms*), einem Gen aus *Caenorhabditis elegans*. Für TGF- β konnte somit auch eine wichtige Rolle in der Steuerung der Proliferation und Selbsterneuerung von neuronalen Stamm- und Tumorstammzellen belegt werden (Wrana, 2000; Kesari et al., 2007).

Zu den intrinsischen Faktoren gehören in erster Linie epigenetische Modulationen wie etwa DNA-Methylierungen oder auch Acetylierungen der Histone H3 und H4 (Hattori et al., 2007). Mit Hilfe solcher Modifikationen kann das Entwicklungspotential von (neuronalen) Stammzellen gesteuert werden (Tang und Zhu, 2007; Shi et al., 2007).

Zusammen stellen die intrinsischen und die extrinsischen Faktoren Elemente dar, die neben der Zelldifferenzierung auch die Apoptose beeinflussen können. Derzeit werden weitere Signalwege untersucht, die neben der Selbsterneuerung auch die Differenzierung beeinflussen und kontrollieren können. Neben dem Notch Signalweg sind dies auch der Wnt-, der Sonic Hedgehog- (Shh) und der Smad Signalweg (Blank et al., 2007).

Seit vielen Jahren ist die Heterogenität menschlicher Tumore bekannt, was zu der Idee führte, dass eine sehr geringe Anzahl von Zellen die Fähigkeit besitzen muss, den Prozess der Karzinogenese zu initiieren. Diesen speziellen Zellen gaben Hager und Heppner den Namen „Krebsstammzelle“ (Hager und Heppner, 1983). Solche Tumorstammzellen führen dabei zur Bildung von anderen kanzerösen Zellen. Die derzeitige der Theorie der Entstehung einer Tumorstammzelle geht von einer Anhäufung von Mutationen in einer somatischen Stammzelle aus. Die könnte auch die These erklärt werden, warum viele Tumore mit heterogenen Phänotypen sowohl funktionelle als auch phänotypische Aspekte von normalen somatischen Zellen, von denen der Tumor abstammt, aufweisen (Sell und Pierce, 1994).

Krebsstammzellen scheinen selbst auch einige der Eigenschaften von Stammzellen zu besitzen, wie etwa die Potenz zur Bildung großer Zellpopulationen. (Khamsi, 2004). Werden die Signalwege, welche die normale Stammzellselbsterneuerung regulieren gestört, kann dies zur Tumorentstehung führen. Somit wären im Tumor die Stammzellen selbst das Ziel der Transformation. Zwei Aspekte stützen diese Theorie. Zum einen ist der Mechanismus der Selbsterneuerung bereits in Stammzellen aktiv und es ist

einfacher diesen Vorgang im aktiven Zustand zu belassen, als ihn in bereits differenzierten Zellen *de novo* zu aktivieren. Somit würde es weniger Mutationen benötigen, um diesen Status aufrechtzuerhalten, als ihn von anderer Stelle her zu aktivieren. Zum anderen überleben Stammzellen aufgrund der Selbsterneuerung für einen langen Zeitraum, anstatt wie ausgereifte Zellen nach einer kurzen Zeitspanne abzusterben. Somit unterliegen die Stammzellen aufgrund der langen Lebensspanne einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Akkumulation von Mutationen (Reya et al., 2001).

In Studien verschiedener Arbeitsgruppen wurde in verschiedenen Tumorarten Krebsstammzellen identifiziert. So etwa in Tumoren des Gehirns (Singh et al., 2003), der Brust (Al-Hajj et al., 2003) und des Blutes (Warner et al., 2004). Sowohl die neurale Stammzelle, als auch die neurale Tumorstammzelle werden durch die Expression der Markerproteine Nestin und CD133 charakterisiert und besitzt neben der Möglichkeit der Selbsterneuerung die Fähigkeit sich in Neurone und Gliazellen zu differenzieren (Pilkington, 2005, Singh et al., 2004 b).

Nestin gehört zur Klasse VI der Intermediärfilamente (Lendahl, 1990) und wird von Stamm- und Vorläuferzellen des humanen zentralen Nervensystems (ZNS) im Verlauf der embryonalen Entwicklung exprimiert. Im adulten ZNS ist Nestin lediglich in Stammzellen der SVZ zu finden (Dahlstrand, 1992). Zusätzlich konnte auch in verschiedenen morphologischen Einheiten, wie etwa der subependymalen Zone und der subgranulären Zone des Dentate Gyrus, die Expression von Nestin nachgewiesen werden (Morshead et al., 1994; Gu et al., 2002). In einer Studie von Rani und Mitarbeiter aus dem Jahr 2006 konnte entlang der paraventriculären Zone in human Föten und in gering, als auch hochgradig malignen Hirntumoren die Expression von Nestin nachgewiesen werden (Rani et al., 2006). Eine Nestinexpression zeigte sich hierbei unabhängig vom Grad der Malignität, so dass Rani und Mitarbeiter die Expression von Nestin als Merkmal für die Möglichkeit der Existenz von Tumorstammzellen in malignen Tumoren des ZNS deuteten.

Die Identifizierung der neuralen Tumorstammzelle gelang durch den Einsatz eines spezifischen Proteins, welches zuerst auf der Oberfläche anderer

Stammzellen im Körper identifiziert werden konnte (Weigmann et al., 1997; Miraglia et al., 1997). Das Protein CD133 (auch AC133 bzw. Prominin-1) konnte in Gewebeproben von kindlichen und erwachsenen Gehirntumoren nachgewiesen werden. Sowohl Zellen, die dieses Protein produzierten, als auch Zellen die keine CD133-Expression aufwiesen, wurden isoliert und in die Gehirne von Mäusen injiziert. Bei 16 von 19 Mäusen kam es nach Injektion dieser potenziellen Krebsstammzellen zur Ausbildung eines Glioblastoms, während alle Mäuse, in deren Gehirne CD133-negative Zellen injiziert wurden, keinerlei Anzeichen einer Tumorenstehung aufwiesen. Diese Ergebnisse unterstützten wiederum die Idee, dass solche Zellen eine Subpopulation von Hirnzellen darstellen, die durch eine Anhäufung von Mutationen zur Krebsstammzelle wurden und somit den Ausgang eines humanen Tumors darstellen (Singh et al., 2004; Galli et al., 2004).

1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten unter Einsatz von Aphidicolin und mini-Hypoxie die Mechanismen der Amplifikation näher untersucht werden. Hierzu sollten Amplifikationsmechanismen wie die Induktion von *fragile sites* oder die Reintegration induzierter *fragile sites* nachgewiesen werden. Der Einsatz der mini-Hypoxie bzw. von Aphidicolin erfolgte einerseits unter der Fragestellung, ob der Prozess der Amplifikation in einem tumorähnlichen Milieu wie der mini-Hypoxie induziert werden kann, andererseits um die Auswirkungen von Aphidicolin als bekannten *fragile site inducer* auf die Amplifikationseinheit 12q14-15 selbst bzw. den Amplifikationsmechanismus zu analysieren. Aphidicolin wirkt in ähnlicher Weise auf die Zelle wie manche für die Krebstherapie eingesetzte Chemotherapeutika, wie etwa Methotrexat (MTX) oder Cytarabin (Ara-c). Bislang waren die Untersuchungen über die Entstehung des Amplifikationsmechanismus auf drogen-selektionierte Mutanten begrenzt (Coquelle et al., 2002). Allerdings sind Amplifikationen in Tumoren, die nicht mit Chemotherapeutika behandelt wurden, weit verbreitet. Daher sollten Krebszellen in einem Milieu untersucht werden, welches die *in vivo* Situation eines Glioblastoms unter Chemotherapie imitiert. Somit könnten die durch die Behandlung mit Aphidicolin hervorgerufenen Veränderungen, mit denen der mini-Hypoxie verglichen werden.

In vorangegangenen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde erstmals die Existenz von Glioblastomstammzellen nachgewiesen, die das Wachstum eines Glioblastoms induzierten (Singh et al., 2003). Da diese Zellen eine zahlenmäßig kleine Population innerhalb der Tumorzellmasse darstellt, sollte in der vorliegenden Arbeit eine *in-vitro* Methode zur Induzierung, Kultivierung und Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen etabliert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die neuronalen Tumorstammzellen einer ersten Charakterisierung unterzogen werden und Methoden zur spezifischen Isolierung dieser Zellen etabliert werden. Zusätzlich sollten kultivierte Glioblastomzellen mit Röntgenstrahlen bestrahlt werden, um die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Anzahl der neuronalen Tumorstammzellen in Kultur zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden können als Grundlage für spätere Untersuchungen dienen. Im Hinblick auf die Therapie der Glioblastome wäre eine Charakterisierung der neuralen Tumorstammzellen vor und nach Bestrahlung mittels stammzellspezifischer Genexpressionsarrays von besonderer Wichtigkeit, um etwa das Verständnis der Strahlenresistenz der Glioblastome zu analysieren.

Material und Methoden

2.1 Zellkulturmethoden

2.1.1 Eukaryotische Zellkulturen

2.1.1.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die kultivierten adhärennten Glioblastomzellen wurden abhängig von ihrem jeweiligen Wachstum bis zu dreimal pro Woche passagiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Konfluenz 90 % nicht überstieg, da es bei zu engem Zellkontakt zu einer Kontaktinhibition kommen kann. Zur Passagierung wurden die Zellen zuerst mit 1x PBS (*phosphate buffered saline*, Invitrogen) gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden anschließend mit Trypsin/EDTA (Gibco BRL) abgelöst. Zur Vereinzelung der Suspensionszellen wurde Accutase (PAA) verwendet. Die vereinzelteten Zellen wurden anschließend in neuem Medium aufgenommen, in neue Zellkulturgefäße überführt (Greiner) und unter 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck kultiviert. Alle Arbeiten wurden ausnahmslos unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Abgelöste, vereinzeltete Zellen wurden in einer Neubauerkammer (Hämozytometer) durch den Einsatz eines Hellfeldmikroskops, gezählt. Zur Analyse der Lebendzellpopulation wurde Trypan-Blau (Gibco BRL) nach Herstellerangaben verwendet.

In Abhängigkeit der Fragestellung der Untersuchung erfolgte die Kultivierung der Glioblastomzelllinien in unterschiedlichen Medien. Dabei wurden alle Medien mit 100 U/ml Penicillin (PAA) und 100 µg/ml Streptomycin (PAA) versetzt, um Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern. Das Normalmedium (NM) bestand aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Invitrogen) mit 10 % hitzeinaktiviertem (25 min, 55 °C) fötalem Kälberserum (FCS, *fetal*

calf serum). Die Stammzellmedien (SCM, *stem cell medium*) setzten sich jeweils aus dem Medium DMEM/F-12 (Invitrogen) mit GlutaMax I zusammen, dem die Supplemente N2 und G5 (beide Invitrogen) zugesetzt wurden. Beide Supplemente dienen der speziellen Kultivierung neuraler bzw. glialer Zellen. Das Supplement G5 enthält die beiden Wachstumsfaktoren bFGF2 (*basic Fibroblast Growth Factor 2*) und EGF (*Epidermal Growth Factor*), die der Differenzierung der hier kultivierten Stammzellpopulationen entgegenwirken soll. Der Einsatz des Supplements N2 diene dabei der Aufrechterhaltung der Nährstoffversorgung der Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl ein Stammzellmedium ohne Serum (SCM 0 %), als auch ein Stammzellmedium mit 5 %-igem, nicht hitzeinaktiviertem Serum (SCM 5 %) eingesetzt.

2.1.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Durch die Kultivierung mit serumfreiem Stammzellmedium (SCM 0 %) entwickeln sich neurale Tumorstammzellen zu Tumorsphäroiden (NSP, *neurospheres*) und wachsen dann als Suspensionskultur (Moses et al., 2006; Hermann et al., 2006; Hung & Yang, 2006). Bei den induzierten Neurospheres wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel unter fünfminütiger Zentrifugation der Zellen bei 1.200 rpm durchgeführt. Das Pellet wurde danach mit neuem Medium versetzt und die Zellsuspension bei 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck kultiviert. Zur Induktion der NSPs wurden die T6433-Zellen in SCM 0 % Medium transferiert. Nach wenigen (2-6) Subkultivierungen nahmen die Zellen eine kleine, kugelartige Form an, die in der Ausbildung von sphäroidalen Strukturen endete. Diese lösten sich nach weiterer Kultivierung vom Boden des Kulturgefäßes ab und gingen in Suspension über.

2.1.1.3 Kultivierung von Primärzellkulturen aus Glioblastomen

Die Primärzellkulturen T6432 und T6433 wurden durch Ansetzen von frischem Biopsiematerial aus Glioblastomen etabliert. Hierzu wurden Gewebestücke des Tumors in Kulturschalen mit DMEM-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM NEAA (*non-essential amino acids*) gelegt, mit einem sterilen Skalpell bzw. Schere zerkleinert und in eine Kulturflasche mit einer Oberfläche von 25 cm² überführt. Die Zellen des Gewebes vermehren sich bei 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck (pCO₂) in den Kulturflaschen und bilden eine Monolayerkultur.

2.1.1.4 Aphidicolin und mini-Hypoxie Behandlung von Zellen

Zur Untersuchung des Effektes von Aphidicolin (APC) oder mini-Hypoxie auf die Amplifikation von Genen, wurden exponentiell wachsende TX3868-Zellen in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm in einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen ausgesät. Für die APC-Behandlung wurde das Kulturmedium mit 1,0 µg/µl Aphidicolin, gelöst in DMSO (*dimethyl sulfoxide*) versetzt und die Zellen für 18 h inkubiert (adaptiertes Protokoll aus Coquelle et al., 1998). Danach wurden die Zellen entweder geerntet oder für weitere 6 h in normalem Kulturmedium weiterkultiviert. Bei den Kontrollzellen der APC-Behandlung wurde das Medium nur mit DMSO versetzt.

Bei der mini-Hypoxie Behandlung wurden die Kulturgefäße für 24 h in Inkubationsbeutel (Anaerocult mini, Merck Biosciences, Germany) transferiert und nach Herstellerangaben verwendet (Heizmann and Werner et al., 1988). Innerhalb dieser Beutel wird der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) auf 5 % reduziert, während der CO₂-Partialdruck auf etwa 9 % erhöht wird. Die Kontrollzellen dieser Behandlung wurden bei 37 °C und einem pCO₂ von 5% kultiviert.

2.1.1.5 Langzeitlagerung von Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zellen, wurden diese zuerst mit 5 – 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA bzw. Accutase vom Kultivierungsgefäß abgelöst. Die Zellen wurden anschließend mit dem jeweiligen, gekühlten Kulturmedium mit 10 % DMSO vermischt und in geeignete Kryogefäße (Greiner) überführt. Danach wurden die Kryogefäße in einen Kryo-Einfrierbehälter (Qualilab, Bender & Hobein) transferiert. Dieser Behälter war mit Isopropanol gefüllt und wurde ü.N. bei -70 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in die Gasphase eines Stickstoffbehälters transferiert und dort gelagert.

2.1.1.6 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Da das in dem Einfriermedium enthaltene DMSO ein Zellgift darstellt, wurde der Auftauprozess möglichst kurz gehalten. Die Zellen wurden im Anschluss in das jeweilige Zellmedium überführt und für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet vorsichtig in neuem Medium resuspendiert und die Zellen in sterilen Kulturgefäßen ausgesät.

2.1.2 Chromosomenpräparation und G-Bänderung

2.1.2.1 Chromosomenpräparation

steriles Colcemid (10 µg/ml, Invitrogen)

Carnoy's Fixativ: (-20°C)

Methanol : Eisessig

3 : 1

Hypotonielösung: (37 °C)

0,075 M KCl

500 ml H₂O_{dd}

Für die Präparation von Metaphasenchromosomen aus einer Glioblastomzelllinie, wurden 40 µl steriles Colcemid zu 8 ml Kulturmedium (100 mm² Zellkulturschale) gegeben und diese für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde der Zellkulturüberstand in ein spitzen Zentrifugenröhrchen überführt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA vom Kultivierungsgefäß abgelöst und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 8 min bei 1.200 rpm pelletiert und der Überstand bis auf etwa 150 – 200 µl (1/3 der Spitze des Röhrchens) verworfen. Das Pellet wurde mit 2 ml vorgewärmter Hypotonielösung versetzt und vorsichtig gemischt. Die Dauer der Hypotonie richtete sich nach der Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert (8 min, 1.200 rpm) und der Überstand bis auf 150 – 200 µl (1/3 der Spitze des Röhrchens) verworfen, in dem die Zellen resuspendiert wurden. Anschließend wurden vier Tropfen der tiefgekühlten Fixativlösung zu den Zellen gegeben und diese vorsichtig, unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen, gemischt. Danach wurden zweimal 2 ml an Fixativlösung zugesetzt, die Zellen vorsichtig gemischt und für 45 min bei +4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für 8 min bei 1.200 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einer ausreichenden Menge an Fixativ aufgenommen, bis eine zur Präparation der Metaphasenchromosomen ausreichende Dichte erreicht war. Diese erfolgte durch Auftropfen der Zellsuspension auf einen gereinigten Objektträger (OT), der bei -20 °C in 50 %-igem Ethanol gelagert wurde. Um eine optimale

Spreitung der Chromosomen zu gewährleisten, wurde der Objektträger auf ein feuchtes Tuch gelegt. Zur Fixierung der Chromosomen auf dem Objektträger wurde dieser für 1 h bei 80 °C inkubiert.

2.1.2.2 Giemsa-Färbung

Sörensen-Lösung (500 ml)

Mischen von 233 ml Lösung A und 267 ml Lösung B

Lösung A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

(11,28 g auf 1l)

Lösung B

KHPO_4

(9,072 g auf 1l)

Mit der Giemsa-Färbung erhält man ein Hell-Dunkel-Bandenmuster. Das Färbverhalten beruht dabei auf der unterschiedlich starken Kondensation des Chromatins. Dabei zeichnen sich dunkle Banden durch einen hohen Gehalt an A-T Basen aus, helle Banden hingegen durch einen hohen G-C Gehalt.

Zur Anfärbung der Chromosomen muss die Sörensen-Färbelösung frisch angesetzt werden. Hierzu werden 95 ml der Sörensen-Lösung mit 5 ml Giemsa (Merck, Darmstadt) vermischt und filtriert. Während des Filtrationsprozess werden 70 ml einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung auf 37 °C temperiert, mit 500 µl Bacto-Trypsin (Becton-Dickinson) versetzt (entspricht 0,357 mg) und in eine Küvette überführt. Danach werden je zwei weitere Küvetten mit jeweils 70 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung bzw. $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gefüllt und die fertige Giemsa-Färbelösung in eine fünfte Küvette überführt.

Zur Färbung wird ein mit Metaphasenchromosomen bestückter Objektträger für 40 bis 50 sec in der 37 °C warmen NaCl-Trypsinlösung inkubiert. Danach wird der OT nacheinander 2-3 sec. in den beiden Küvette mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gespült und anschließend für 5 min in der Küvette mit der filtrierten Giemsa-Färbelösung inkubiert. Danach erfolgt eine kurze Waschung des OTs in den beiden Küvetten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$. Im Anschluss wird der OT getrocknet und zur späteren Analyse der Metaphasen mit Roti-Histokit (Roth) eingedeckt.

2.1.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Hybridisierungsmix

50% Formamid
2x SSC
50 mM Natriumphosphat-Puffer
10% Dextransulfat

Hybridisierungslösung

70 % Formamid
2x SSC
50 mM Natriumphosphat-Puffer

Nach Behandlung der TX3868-Zellen wurden diese zur nachfolgenden Metaphasenpräparation und FISH-Analyse (*fluorescence in situ hybridization*) für 2 h (APC) mit Nocodazole bzw. für 45 min (mini-Hypoxie) mit Colcemid inkubiert.

Für die Analyse der durch die Behandlungen ausgelösten Veränderungen des X-chromosomalen HSRs (*homogeneously staining region*) in den TX3868-Zellen wurden in der *in situ* Hybridisierung die Gene KUB3 (*Ku 70 binding protein 3*) bzw. GAS 41 (*glioma amplified sequence 41*) eingesetzt. Zur Untersuchung des KUB3 Locus wurde ein einziger BAC-Klon eingesetzt (BAC, *bacterial artificial chromosome*) (clone RP11-58A17, Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library), während für den GAS41 Locus ein BAC-Klon und ein Cosmid (BAC: RP11-159A18; Cosmid-Klon LLNLc132K1140Q2, RZPD, Deutschland) ausgewählt wurden. Die BAC und Cosmid Sonden wurden mit Hilfe des High Prime Labeling Systems (Roche, Mannheim, Deutschland) direkt markiert. Hierzu wurden jeweils 1 µg BAC-/Cosmid-DNA mit Cyanine-3-dCTP (Cy3) oder Cyanine-5-dCTP (Cy5) (PerkinElmer, Germany) nach Angaben des Herstellers markiert. Zur Sondenherstellung wurden 60 ng Cy3-markierter DNA (KUB3 oder GAS41), 100 ng Cy5-markierter DNA (KUB3 oder GAS41) und 1 µg Cot-1 DNA (Invitrogen) präzipitiert. Die Proben wurden in Hybridisierungsmix resuspendiert, für 5 min bei 75 °C denaturiert und anschließend für 30 bis 45 min bei 37 °C *preannealt*.

Zur Vorbehandlung der Metaphasenchromosomen wurden die Objektträger mit RNase (100 µg/ml RNaseA in 2x SSC für 1 h bei 37 °C) und Pepsin (0.005% in 0.01 M HCl, für 10 Minuten bei 37°C) behandelt. Die Postfixierung erfolgte durch Inkubation mit 1% Formaldehyd in 1x PBS bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die OTs in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % / 80 % / 96 %) dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Die Hybridisierung der Metaphasenchromosomen erfolgte unter Denaturierung für 90 sec in der Hybridisierungslösung bei 80 °C. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden, eiskalten Ethanolreihe (70 % / 80 % / 96 %; -20 °C) dehydriert. Der denaturierte Sondenmix wurde dann auf den OT aufgetragen, der auf einer 37 °C Heizplatte platziert wurde. Im Anschluss wurde der OT mit einem Deckglas bedeckt, mit FixoGum Papierkleber versiegelt und ü.N. in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 37 °C hybridisiert.

Die Waschungen zur Posthybridisierung erfolgte durch viermalige Inkubation für 5 min in 50 % Formamid/2x SSC bei 45 °C, gefolgt von drei Waschungen für 5 min in 0,1x SSC bei 60 °C.

Die DNA-Gegenfärbung wurde für 5 min bei RT mit DAPI (4',6'-**Diamidino-2-phenylindole**) (1 µg/ml in 1x PBS) durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate kurz in 1x PBS gewaschen und mit VectaShield *mounting medium* (Vector Laboratories, Orton Southgate, England) zur späteren Analyse am Fluoreszenzmikroskop eingedeckt.

2.2 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

2.2.1.1 Fixierung von Zellen auf Glasplättchen

Gereinigte und sterilisierte (2,5 h bei 180 °C) Glasplättchen (ø 12 mm) wurden so in 60 mm Kultivierungsschalen gelegt und mit Medium überschichtet, dass die Plättchenunterseite am Boden der Schalen anhaftete, damit nur auf der Oberseite Zellen wachsen. Exponentiell wachsende Zellen wurden in die Zellkulturschale überführt und inkubiert. Dabei muss beachtet werden, dass die Zellen nur bis zu einer Konfluenz von etwa 70 - 80 % wachsen, um Überlagerungen von Zellen zu vermeiden. Dies würde zu einer Verfälschung der Immunfluoreszenzfärbung führen bzw. die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erschweren. Nach 24 - 48 h wurden die auf den Glasplättchen gewachsenen Zellen weiterbehandelt. Dazu wurden die Zellen je nach Fragestellung entweder mit Paraformaldehyd/Triton X-100 oder mit Methanol fixiert.

Bei der Paraformaldehyd/Triton X-100-Fixierung werden quervernetzende Substanzen eingesetzt, die intermolekulare Brücken ausbilden und hierdurch ein Netzwerk von verbundenen Proteinen bilden. Vernetzende Fixative erhalten im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln wie Methanol den Gewebekontrast besser. Durch die Quervernetzung können jedoch gewisse Proteine unzugänglich werden. Des Weiteren führt die Fixierung mit Paraformaldehyd nicht zu einer Perforation der Membran, weshalb eine anschließende Behandlung mit nichtionischen Detergenzien wie etwa Triton X-100 erfolgen muss.

Zur Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 min mit 1x PBS gewaschen, um das Medium zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (in 1x PBS) überschichtet und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte drei weitere Waschschrte für jeweils 5 min mit kaltem (+4 °C) PBS. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in 1x PBS für 5 min bei RT. Im Anschluß wurden die Zellen erneut dreimal für 5 min mit kaltem PBS (+4 °C) gewaschen und bis zur Färbung mit 1x PBS überschichtet und bei +4 °C aufbewahrt.

Durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln, wie Alkohole (z.B. Methanol) und Aceton, entstehen präzipitierende Fixative. Dabei lösen sich die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur auf und fällen so die Proteine aus. Durch diese Fixierung können jedoch strukturelle Epitope zerstört werden.

Zur Fixierung der Zellen mit Methanol wurden diese dreimal für jeweils 5 min mit 1x PBS gewaschen, um das Medium zu entfernen. Zur gleichzeitigen Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese für 5 min mit eiskaltem Methanol (-20 °C) überschichtet. Im Anschluß wurden diese dreimal mit kaltem PBS (+4 °C) gewaschen und bis zur Färbung mit 1x PBS überschichtet und bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.2 Immunfärbung

Die auf den Glasplättchen fixierten Zellen wurden kurz vor der Färbung aus dem Kühlschrank und dem Puffer entnommen. Die Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer, um dem Austrocknen der Zellen entgegenzuwirken.

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Plättchen mit 50 µl Blockinglösung (1 % BSA in 1x PBS) überschichtet und für 15 min bei RT inkubiert.

Die verwendeten Antikörper wurden in 1 % BSA in 1x PBS verdünnt. Die Zellen wurden mit 50 µl der primären Antikörperverdünnung überschichtet und für 1h bei RT inkubiert. Danach wurden die Plättchen dreimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper ebenfalls in 1 % BSA in 1x PBS verdünnt und die Plättchen mit 50 µl der Verdünnung für 45 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nun dreimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen und anschließend die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-Dihydrochlorid, AppliChem) gegengefärbt (5 min bei RT; Konz.: 1 µg/ml). Die Plättchen wurden erneut dreimal mit 1x PBS für jeweils 10 min gewaschen, bevor sie auf gereinigten Objektträgern mit VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckt und fixiert wurden. Bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate bei +4 °C gelagert.

2.2.1.3 Silanisierung von Objektträgern

Die Objektträger wurden vor der Silanisierung für 30 min in absolutem Ethanol entfettet und gereinigt. Danach wurden die Objektträger für 5 min in 3 % Triethoxypropyl-Silan / Aceton silanisiert und anschließend zweimal kurz in Aceton und dann einmal in H₂O_{dd} geschwenkt. Zur Trocknung wurden die OTs für 1 h bei 43 °C in einem Trockenschrank inkubiert.

2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wird zur Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei ausnahmslos fixierte Präparate an einem Auflicht- bzw. Epifluoreszenzmikroskop (Olympus AX70 Provis) untersucht. Das Präparat wird hier von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensor fungiert, beleuchtet. Als Lichtquelle dient meist eine Quecksilberhöchstdrucklampe, welche die Anregungswellenlänge (360 nm bis 700 nm) des gewählten Fluorochroms enthalten muss. Mit Hilfe eines Eingangsfilters (Anregungsfilter) wird zuerst die anregende Wellenlänge für das gewählte Fluorochrom herausgefiltert. Diese gelangt auf einen dichromatischen Teilerspiegel, den das längerwellige Licht der Emissionsstrahlung passieren kann, während das Erregerlicht reflektiert wird. Dadurch gelangt die angeregte Strahlung durch das Objektiv hindurch auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches infolgedessen längerwelliges Licht emittiert. Dieses passiert nun den Teilerspiegel und trifft auf den Ausgangsperrfilter (Emissionsfilter), wo die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms gefiltert wird. Dies stellt das eigentliche Fluoreszenzbild dar, welches entweder durch das Okular betrachtet oder mit einer Kamera aufgezeichnet werden kann. Für die Fluoreszenzmikroskopie ist eine vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht essentiell zur optimalen Darstellung des Fluoreszenzbildes im Mikroskop.

Die Immunfluoreszenznachweise wurden in der vorliegenden Arbeit meist mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hier bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. In einem anschließenden Schritt wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter (Sekundär-)Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt. Im Vergleich zum Einsatz von ausschließlich direkt markierten Antikörpern, erlaubt diese Methode eine flexiblere Arbeitsweise, da eine Vielzahl an Primärantikörpern mit denselben markierten Sekundärantikörpern kombiniert werden können. Zudem ist diese Methode sensitiver, da hier verschiedene Sekundärantikörper mit den verschiedenen Primärantikörpern reagieren können. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich beim Nachweis der CD133-Expression neuraler Tumorstammzellen antikörperbedingte Kreuzreaktionen.

Um antikörper-bedingte Kreuzreaktionen zu verhindern, wurde ein mit Phycoerithrin (PE) konjugierter CD133-Antikörper zur direkten Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Dabei bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper direkt an das Antigen der Zelle und wird anschließend mittels Mikroskopie dargestellt.

Zur Analyse und Bearbeitung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) Präparate wurden diese mittels ISIS-Software (*in situ imaging software*) der Firma Metasystems 630-fach digital vergrößert aufgenommen. Um die Einflüsse der verschiedenen Behandlungen auf die *homogeneously staining regions* (HSRs) zu untersuchen, wurden die digitalen Bilder vierfach vergrößert, die HSRs manuell eingerahmt und durch die Software die relativen (rel. I.F.I.) bzw. absoluten (abs. I.F.I.) Fluoreszenzintensitäten berechnet.

2.2.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Bei konfokalen Mikroskopen können virtuelle optische Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden. Bei Untersuchungen mit einem normalen Fluoreszenzmikroskop wird das Fluoreszenzlicht auch von Molekülen emittiert, die unter- oder oberhalb der Brennebene liegen. Daher kommt es zu einer Überlagerung eines deutlichen und unscharfer Fluoreszenzbilder.

Beim konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM = *confocal laser scanning microscope*) wird dieses Problem in zweifacher Weise umgangen. Hier werden nur diejenigen fluoreszierenden Moleküle visualisiert, die in einer bestimmten Ebene liegen. Dadurch kann ein wesentlich schärferes Schnittbild erzeugt werden. Außerdem wird das emittierte Licht mit Hilfe eines Spiegels vom Anregungslicht separiert und gelangt auf eine Lochblende, wodurch die Strahlen fokussiert werden können. Hier liegen Anregungs- und Detektionsfokus übereinander, also konfokal. Daher gelangt nur Licht aus der Fokusebene zum Detektor, während Licht aus anderen Ebenen ausgeblendet wird.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Konfokalmikroskop stellt ein Laser-Scanning-Mikroskop dar. Es beruht auf dem Prinzip der so genannten *single-point scanning technology*. Dazu wird ein einzelner Laserstrahl eingesetzt, der Punkt für Punkt das Präparat entlang der Fokusebene scannt. Auf diese Weise wird eine punktweise Schichtaufnahme, ein optischer Schnitt, des Präparates erzeugt. Anschließend kann am Computer das eigentliche Bild, durch Zusammensetzen der aufgenommenen Einzelpunkte, rekonstruiert werden. Mit Hilfe spezieller Software kann so auch ein dreidimensionales Bild des Präparates generiert werden.

2.3 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie und magnetischer Zellsortierung

2.3.1 *Fluorescence activated cell sorting (FACS)*

1x PBS	<u>Fixierlösung (Cell-Fix):</u>
Cell-Fix	2,5 ml Formaldehyd (37 % p.a.)
1x Perm/Wash-Lösung	ad 100 ml H ₂ O _{dd}
CytoFix / CytoPerm – Kit	

Die Analyse der Intensitäten nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde an einem FACScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Durchflusszytometer, bei der die untersuchten Zellen von einem Laserlicht angestrahlt werden. Dadurch ist es möglich verschiedene Eigenschaften bei einer Zelle zu untersuchen. Je größer eine Zelle ist und je mehr intrazelluläre Strukturen sie aufweist, desto größer ist das entstehende Streulicht. Beim Kreuzen des Laserstrahls streut die Zelle das Licht in verschiedene Richtungen, dabei kann neben dem Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) auch das etwa im 90°-Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) detektiert werden. Das Vorwärtsstreulicht ist hauptsächlich von der Größe der Zelle abhängig. Kleine Zellen verursachen somit ein geringes Vorwärtsstreulichtsignal. Dagegen ist das Seitwärtsstreulicht nicht allein von der Größe der Zelle abhängig. Der Inhalt einer Zelle ist hier ausschlaggebend für den Grad der Streuung. Befinden sich in einer Zelle viele Lysozymen, also weist sie eine hohe Granularität auf, kommt es auch zu einer hohen Streuung des Lichts zur Seite.

Im Durchflusszytometer können Proben, bei denen eine Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wurde, anhand der Höhe der Expression von Oberflächenproteinen bzw. von intrazellulären Molekülen, analysiert werden.

Die Zellen werden dabei in einer Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Trifft der Laserstrahl auf ein Fluorochrom, so kommt es zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, woraufhin dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben wird und unter Abgabe von Photonen auf sein Ursprungsniveau zurückfällt. Diese emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Detektor registriert und verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Somit kann eine Aussage über die Expression des untersuchten Moleküls getroffen werden.

Um die Ergebnisse der Streulichtmessungen anschaulich darzustellen, werden die Daten in einem *dot plot* dargestellt. Dabei wird das Vorwärtsstreulicht (FSC) auf der x-Achse gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Tote Zellen weisen ein sehr geringes Vorwärts- wie Seitwärtsstreulicht auf und können somit leicht identifiziert werden.

Zur Auswertung der in der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten werden die Zellen in ein *Gate* gefasst. Das Ziel des Gatens ist es die Zellen auszuwählen, an deren Analyse man interessiert ist, während solche Zellen ausgeschlossen werden, die eine Auswertung stören würden. Dazu wird eine Region in das Streulichtdiagramm eingezeichnet, die nur die zu analysierenden Zellen enthält und als Region R1 gekennzeichnet. Mittels Computersoftware können nun im Fluoreszenz *dot plot* nur die Zellen aus dem Gate R1 dargestellt werden und somit getrennt ausgewertet werden.

Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Programm *Cell Quest Pro* an einem Durchflusszytometer (FACScan) der Firma Becton Dickinson.

Zur Analyse des Expressionsmusters der Markergene in den Glioblastomzelllinien wurden die Zellen mittels CytoFix/CytoPerm Kit (Becton Dickinson) permeabilisiert und fixiert. Im Anschluss erfolgte eine Anfärbung mittels spezifischer Antikörper. Extrazelluläre Epitope können dabei ohne Vorbehandlung analysiert werden, während bei intrazellulär gelegenen Epitopen erst eine Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich ist. Dies wird im Folgenden näher beschrieben.

2.3.1.1 Messung extrazellulärer Epitope

Vor der Messung extrazellulärer Epitope wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Kulturgefäß abgelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen an Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellmenge bestimmt. Danach wurden pro Reaktionsansatz 1×10^5 Zellen extrahiert und die Zellsuspension für 5 min bei 1.200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 50 µl PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Der primäre Antikörper wurde verdünnt (CD133 1:2; CD34 1:4) und 1,5 µl dieser Verdünnung zu 50 µl Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden nun für 45 min bei RT inkubiert und im Anschluss einmal mit PBS gewaschen (2 min, 2.000 rpm). Der Überstand wurde bis auf einen Rest von etwa 50 µl verworfen. Die sekundären Antikörper gegen CD133 bzw. CD34 (*goat anti-mouse*, Dianova) wurden 1:2 verdünnt und jeweils 1,5 µl dieser Verdünnung zu den Zellsuspensionen zugegeben. Die anschließende Inkubation (40 min bei RT) erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen, da der sekundäre Antikörper mit dem Fluorochrom Cy3 konjugiert ist. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (2 min, 2.000 rpm) und das Pellet zur Analyse im Durchflusszytometer in 500 µl Fixierlösung aufgenommen.

Zur genauen Ermittlung der Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Die Einstellung der Hintergrundstrahlung (threshold) der eingesetzten Fluorochrome erfolgte mit Hilfe von Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Bei der Färbung mit direkt markierten Antikörpern wurde hingegen eine Isotypkontrolle eingesetzt. Die hierbei ermittelten Messwerte mussten von den Messwerten der einzelnen Markergene subtrahiert werden.

2.3.1.2 Messung intrazellulärer Epitope

Um intrazelluläre Epitope anfärben zu können, muss die Zellmembran erst für die jeweiligen Antikörper durchlässig gemacht werden. Dazu wurden die Zellen analog zum Protokoll für die Messung extrazellulärer Epitope zuerst mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Kulturgefäß abgelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden danach in einem geeigneten Volumen an Medium aufgenommen und pro Reaktionsansatz 1×10^5 Zellen eingesetzt und für 5 min bei 1.200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde auch hier bis auf ein Restvolumen von etwa 50 μ l verworfen, mit 1 ml CytoFix / CytoPerm (Becton Dickinson) versetzt und für 45 min bei +4 °C inkubiert. Die CytoFix/CytoPerm-Lösung enthält Saponin, was zur Poren-Bildung in der Zellmembran führt, durch diese die Antikörper in das Zellinnere gelangen können. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zweimal für jeweils 5 min bei 1.200 rpm mit 5 ml 1x Perm/Wash gewaschen. Durch die fortwährende Benutzung der Perm/Wash-Lösung bei den Waschschritten, wurden die Poren in der Zellmembran offen gehalten. Vor der Färbung mit dem Primärantikörper wurden die Zellzahl mit 1x Perm/Wash auf jeweils 1×10^5 Zellen pro 50 μ l Volumen eingestellt und im Anschluss mit 1,5 μ l der Antikörperverdünnung versetzt. Dabei wurden die einzelnen Primärantikörper jeweils 1:5 verdünnt, zu den 50 μ l Zellsuspension gegeben und für 45 min bei +4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 2.000 rpm mit 1x Perm/Wash gewaschen und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 50 μ l verworfen. Zu der Zellsuspension wurden jeweils 1,5 μ l einer Sekundärantikörperverdünnung (*goat anti-mouse* bzw. *goat anti-rabbit*, Dianova, 1:2) gegeben und im Dunkeln für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Waschung der Zellen mit 1x PBS (2 min, 2.000 rpm), wodurch die Poren geschlossen wurden. Das Zellpellet wurde zur späteren Analyse im Durchflusszytometer in 500 μ l Fixierlösung resuspendiert.

Zur genauen Ermittlung der Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Die Einstellung der Hintergrundstrahlung (threshold) erfolgte mit Hilfe von Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Die hierbei ermittelten Messwerte mussten von den Messwerten der einzelnen Markergene subtrahiert werden.

2.3.2 *Magnetic activated cell sorting (MACS)*

MACS-Puffer: (+4 °C)

1x PBS

0,5 % BSA

2 mM EDTA

Das Ziel der magnetischen Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) stellt die Abtrennung einer Zielpopulation aus einem Zellgemisch dar. Das Prinzip der Sortierung erfolgt mittels der Erkennung spezifischer Epitope durch so genannte *MicroBeads*. Dabei handelt es sich um 50 nm große Magnetpartikel, an die spezifische Antikörper gebunden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene CD133-Antikörper der Firma miltenyi-biotec verwendet, um eine Sortierung neuraler Tumorstammzellen durchzuführen. Durch die Bindung der *MicroBeads* an die Zielzellpopulation werden die Zellen beim Durchfluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, im Magnetfeld arretiert. Durch diesen Vorgang werden die gesuchten Zellen von der restlichen Zellpopulation abgetrennt und ausschließlich unmarkierte Zellen werden beim Spülen der Säule ausgewaschen. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wird, kann die gesuchte Zielzellpopulation in einem weiteren Waschvorgang extrahiert werden. Zur Erhöhung der Reinheit der sortierten Zellen kann der Sortierungsvorgang wiederholt werden. Dienen die markierten Zellen als Zielzellen in weiteren Versuchen, so nennt man die Sortierung mittels MACS auch positive Selektion. Werden allerdings die unmarkierten Zellen für weitere Versuche eingesetzt, so wird dies als Abreicherung bezeichnet.

Zur MACS-Sortierung werden zu max. 1×10^8 Zellen, die in 300 μl MACS-Puffer gelöst wurden mit 100 μl FcR Blockingsreagenz versetzt. Das Blockingreagenz dient zur Inhibierung unspezifischer oder FcR-vermittelter Antikörperbindungen. Im Anschluss werden zur Anfärbung der Zellen 100 μl CD133 *MicroBeads* zugefügt, die Suspension gut gemischt und für 30 min bei +4 °C inkubiert. Die Zellen werden anschließend für 10 min bei 1.200 rpm mit 5 - 10 ml Puffer gewaschen, der Überstand abpipettiert und das Pellet in 500 μl Puffer resuspendiert. Zur Separation der Zielzellen wird eine Säule im

magnetischen Feld platziert und mit 500 μ l äquillibriert. Danach wird die mit den *MicroBeads* versetzte Zellsuspension auf die Säule gegeben und anschließend viermal mit 500 μ l Puffer gewaschen. Danach wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zielzellen unter dem Einsatz eines speziellen Aufsatzes mit 1 ml Puffer aus der Säule extrahiert.

Zur MACS-Sortierung standen für CD133 mehrere Antikörper (CD133/1 und CD133/2) zur Verfügung, die verschiedene Epitope von CD133 erkennen. Für CD133/2 bietet die Firma miltenyi-biotec zwei verschiedene Klone (AC141 und 293-C3) an.

Da die direkte Sortierung mittels magnetischer *MicroBeads* gegen CD133/1 und CD133/2 lediglich zu einer positiven Selektion von weniger als 10 % neuraler Tumorstammzellen führte, wurde eine Sortierung mittels indirekter Markierung durchgeführt. Dabei werden die Zielzellen mit einem PE-gelabelten CD133-Antikörper markiert und dieser im Anschluss mit anti-PE *MicroBeads* detektiert. Der Einsatz dieser Sortierungsmethode führte zwar zu einer Erhöhung des Reinheitsgrades auf Werte um 15 %, allerdings wäre dieser Wert für weitergehende Versuche zu gering, um eine erfolgreiche Auswertung zu garantieren.

Frühe apoptotische und tote Zellen zeigen eine hohe Affinität gegenüber Antikörpern. Infolgedessen kommt es zur unspezifischen Bindung von Antikörpern und ein großer Teil der sortierten Zellen wird falsch positiv selektioniert. Daher müssen diese Zellen vor der magnetischen Sortierung entfernt werden. Dieser Vorgang erfolgt analog zur MACS-Sortierung, wobei hier zur Sortierung ein Antikörper eingesetzt wird, der ein Epitop auf der Plasmamembran apoptotischer und toter Zellen erkennt und diese so selektiv extrahiert werden können.

2.4 Antikörper

Primäre Antikörper:

- Anti-CD133 (Mouse; Konz.: 1:50 IF; 1:70 FACS, miltenyi-biotec)
- Anti-CD34 (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:125 FACS; Chemicon)
- Anti-Nestin (Rabbit; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; R&D Systems)
- Anti-GFAP (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; Sigma)
- Anti-MAP-2 (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; Chemicon)
- Anti- β -Tubulin-III (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; Chemicon)
- Anti-Vimentin (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; Chemicon)
- Anti-Ki67 (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; Chemion)
- Anti-VEGF (Mouse; Konz.: 1:200; IF: 1:150 FACS; R&D Systems)

Sekundäre Antikörper:

- Alexa Fluor 488-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG (Konz.: 1:1.000 Invitrogen)
- Alexa Fluor 594-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG (Konz.: 1:1.000 Invitrogen)
- Alexa Fluor 488-conjugated Goat-Anti-Rabbit IgG (Konz.: 1:1.000 Invitrogen)
- Alexa Fluor 594-conjugated Goat-Anti-Rabbit IgG (Konz.: 1:1.000 Invitrogen)
- Goat-Anti-Mouse IgG-Cy3 (Konz.: 1:70, Jackson Immuno Research)
- Goat-Anti-Rabbit IgG-Cy3 (Konz.: 1:70, Jackson Immuno Research)

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Aphidicolin und reduziertem Sauerstoffpartialdruck auf Tumorzellen

3.1.1 Untersuchungen der Morphologie anhand der Glioblastomzelllinie TX3868

Für die folgenden Versuche wurden jeweils 5×10^5 Zellen verwendet, die in einem parallelen Ansatz in eine 100mm-Zellkulturschale ausgesät wurden.

Hierbei wurde eine Zellpopulation zur Behandlung mit Aphidicolin (APC) und die andere zur Kultivierung unter reduziertem Sauerstoffpartialdruck, im Folgenden kurz mini-Hypoxie genannt, eingesetzt. Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Antibiotikum, welches die eukaryotische DNA-Replikation inhibiert und fragile-sites induziert (Glover et al., 1984).

Die Unterschiede der einzelnen Behandlungen, sowie die genauen Bedingungen unter denen die Zellen kultiviert wurden, können dem Material- und Methodenteil entnommen werden. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen mittels Durchlichtmikroskopie im Hellfeld begutachtet und fotografisch dokumentiert (s. Abb. 3.1 und 3.2).

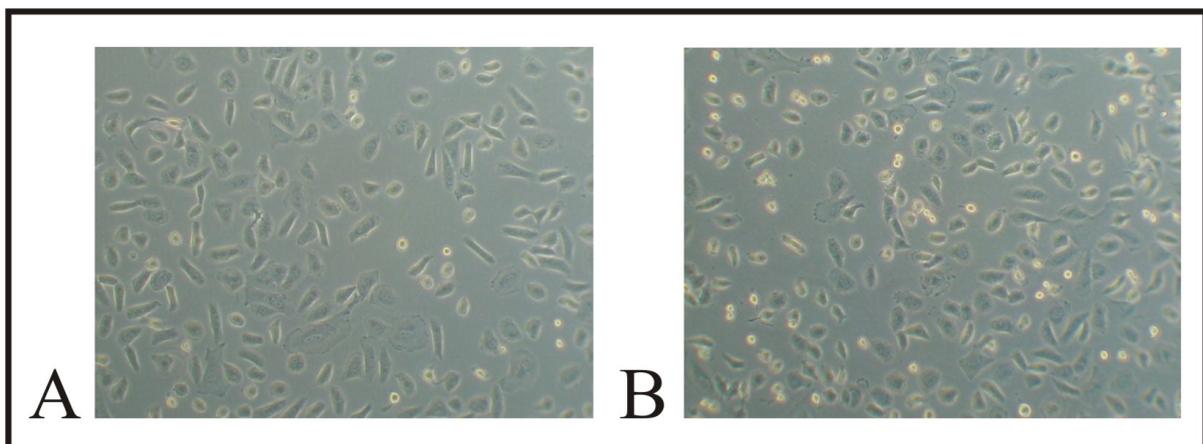


Abb. 3.1: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von TX3868-Zellen, die (A) für 18 h mit $1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Aphidicolin (APC) Endkonzentration behandelt wurden bzw. (B) unbehandelte Zellen
In der APC-behandelten Kultur (A) lässt sich eine Abnahme an mitotischen Zellen (klein, hell und rund) feststellen. Ein durch die Behandlung bedingte Änderung der Morphologie war nicht festzustellen. Vergrößerung 100-fach

Ein morphologischer Unterschied zwischen beiden Populationen konnte nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 3.1 A + B). Jedoch zeigte sich ein deutlicher Rückgang bei der Zahl der Zellen mit mitotischer Zellmorphologie nach APC-Behandlung. Diese Zellen stellen sich im Mikroskop als sehr kleine, kugelartige Gebilde dar und lösen sich zum Teil von der Oberfläche des Kultivierungsgefäßes ab. Daher erscheinen sie im Durchlichtmikroskop wesentlich heller als die sie umgebenden Zellen. In der Abbildung der Kontrollzellen ließen sich bei insgesamt 250 Zellen 43 Zellen dieses Typs (17,2 %) nachweisen. Die hier dokumentierte APC-behandelte Zellpopulation enthielt lediglich 11 Zellen dieses Typs bei insgesamt 198 Zellen (5,6 %). Im Verhältnis zur Kontrollpopulation entspricht dies einer Abnahme um den Faktor drei. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die den Arrest APC-behandelter Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklusses beschrieben (Mutomba & Wang, 1996). Durch die Behandlung wird ein großer Teil der Zellen vor der Mitose arretiert, was eine Reduktion der Anzahl mitotischer Zellen zur Folge hat.

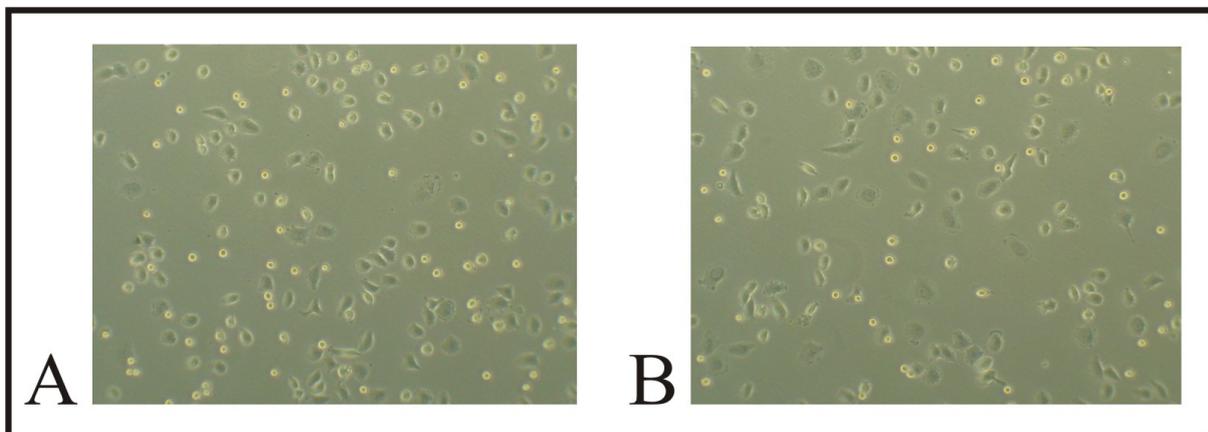


Abb. 3.2: TX3868-Zellen im Durchlichtmikroskop.

Population A wurde für 24 h in einem mini-hypoxischen Milieu kultiviert bzw. Population B für 24 h in einem parallelen Kontrollansatz. In der mini-Hypoxie Kultur zeigt sich eine geringfügige Anhäufung von mitotischen Zellen (klein, hell und rund) (25,3 % vs. 21,9 % in der Kontrollpopulation). Einen morphologischer Unterschied der Zellen ließ sich aufgrund der Behandlung nicht feststellen. Vergrößerung 100-fach

Bei der Behandlung von TX3868-Zellen mit mini-Hypoxie konnte ebenfalls kein Einfluss auf die Zellmorphologie festgestellt werden. Allerdings konnte mit 25,3 % (47 von 186 Zellen) eine minimale Veränderung des prozentualen Anteils an mitotischen Zellen detektiert werden, da in der Kontrollpopulation 21,9 % (33 von 151 Zellen) der Zellen eine kugelartige Zellmorphologie aufwiesen. Somit bedingte die mini-Hypoxie in diesem Fall einen Anstieg an mitotischen Zellen um den Faktor 1,2.

Im Vergleich der beiden Behandlungsformen konnte festgestellt werden, dass bei der mini-Hypoxie mehr Glioblastomzellen in der M-Phase der Mitose vorliegen, hingegen APC den Eintritt der TX3868-Zellen in die M-Phase inhibiert.

3.1.2 Charakterisierung der *homogeneously staining region* (HSR) in der Glioblastomzelllinie TX3868

Für die Versuche wurden wiederum 5×10^5 Zellen eingesetzt (s. Material- und Methodenteil). Die Auswirkungen von APC und mini-Hypoxie wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) analysiert.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die TX3868-Zellen bei der APC-Behandlung unmittelbar nach der Behandlung fixiert wurden. Die Zellen unter mini-Hypoxie wurden entweder analog behandelt oder erst nach zusätzlichen 24 h Reoxygenierung fixiert.

TX3868-Zellen tragen auf jedem X-Chromosom eine *homogeneously staining region* (HSR), die ursprünglich aus der Chromosomenregion 12q14-15 stammt (Gracia et al., 1996). In dieser Region liegen unter anderem die Gene GAS41 und KUB3, die hier näher untersucht wurden. Mit Hilfe dieser Gene wird im Folgenden der Nachweis auf Veränderungen innerhalb der HSR-Struktur geführt. Jedoch muss bedacht werden, dass hier ausschließlich chromosomale Veränderungen der Leiterstruktur des HSRs detektiert werden, welche die Gene GAS41 und KUB3 befassen.

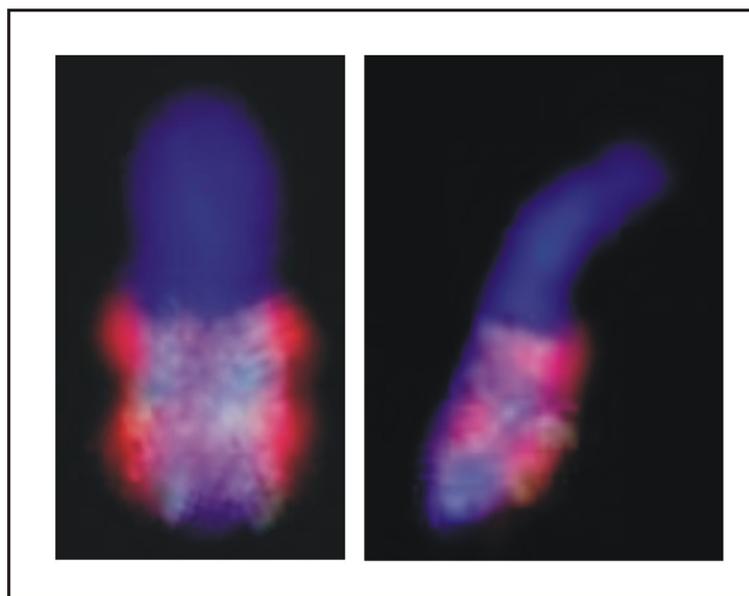


Abb. 3.3: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der X-chromosomalen homogeneously staining region (HSR) in der Glioblastomzelllinie TX3868.

Zu sehen ist die HSR-typische Leiterstruktur bei der sich die untersuchten Gene KUB3, in rot dargestellt, und GAS41, hier grün, abwechseln; rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung 1.000-fach

Die hier dargestellte Fluoreszenzaufnahme zeigt die X-chromosomale HSR der Glioblastomzelllinie TX3868 ohne Behandlung durch APC bzw. mini-Hypoxie. Die Hybridisierung mit Fluoreszenzsonden für die Gene KUB3 und GAS41 identifiziert eine für HSR typische Leiterstruktur. Zum Nachweis von KUB3 wurde eine BAC-Sonde und zum Nachweis von GAS41 eine Cosmid-Sonde eingesetzt, die mit Cy3 (rote Fehlfarbe) und Cy5 (grüne Fehlfarbe) markiert wurden. Die Fluoreszenzintensitäten der Fehlfärbungen wurden mit Hilfe der *In situ Imaging Software* (ISIS, Fa. Metasystems) gemessen. Die ermittelten Zahlenwerte werden mittels fluoreszenzspezifischen **absoluten Immunfluoreszenzintensitätswerten** (Cy3 bzw. Cy5 Abs. I.F.I) dargestellt. Allerdings werden in der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung keine Immunfluoreszenzen nachgewiesen. Daher ist der Begriff Immunfluoreszenzintensität etwas irreführend. Aus diesem Grund wird auf den nachfolgenden Seiten von Fluoreszenzintensitäten gesprochen. Weiterhin werden zur besseren Übersicht jeweils nur die ermittelten Zahlenwerte in Abhängigkeit mit der detektierten Fehlfarbe (Cy3 bzw. Cy5) dargestellt.

3.1.2.1 Behandlung von TX3868-Zellen mit Aphidicolin

Die Zellen der Glioblastomzelllinie TX3868 wurden für 18 h mit Aphidicolin in einer Endkonzentration von 1,0 µg/µl behandelt und unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit präpariert. Die Analyse der durchgeführten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen zeigte verschiedene Veränderungen innerhalb der Struktur der HSRs auf.

Es wurden insgesamt 84 Metaphasen von APC-behandelten TX3868-Zellen untersucht. Hierbei konnte bei 33 Präparaten die Induktion von double-minutes (DMs) und bei einem weiteren Präparat die Reintegration von induzierten DMs detektiert werden. DMs sind Doppel-Chromatidstücke, die als extra-chromosomale Amplifikate entstehen. Die Frequenz der DM-Induktion lag somit nach APC-Behandlung bei 39,3 %. Ferner konnte ein uneinheitliches Bild innerhalb der Gesamtheit der Präparate festgestellt werden. Es zeigte sich bei der Mehrheit der Präparate, dass exakt ein DM induziert wurde, jedoch enthielten diese einzelnen DMs nie stets das gleiche untersuchte Gen. Des

Weiteren wurde anhand der unterschiedlich starken Intensität der Fehlfarbe sichtbar, dass viele DMs eine variable Kopienzahl von KUB3- bzw. GAS41-Gensequenzen enthielten. Darüber hinaus wurden auch DMs detektiert, die sowohl eine grüne, als auch eine rote Färbung aufwiesen. Diese induzierten DMs enthalten sowohl KUB3- als auch GAS41-Genkopien. Letztlich konnten aufgrund der APC-Behandlung auch Metaphasen mit mehrfach induzierten DMs identifiziert werden. Im Folgenden werden diese Veränderungen näher beschrieben (s. Abb. 3.4 – 3.6).

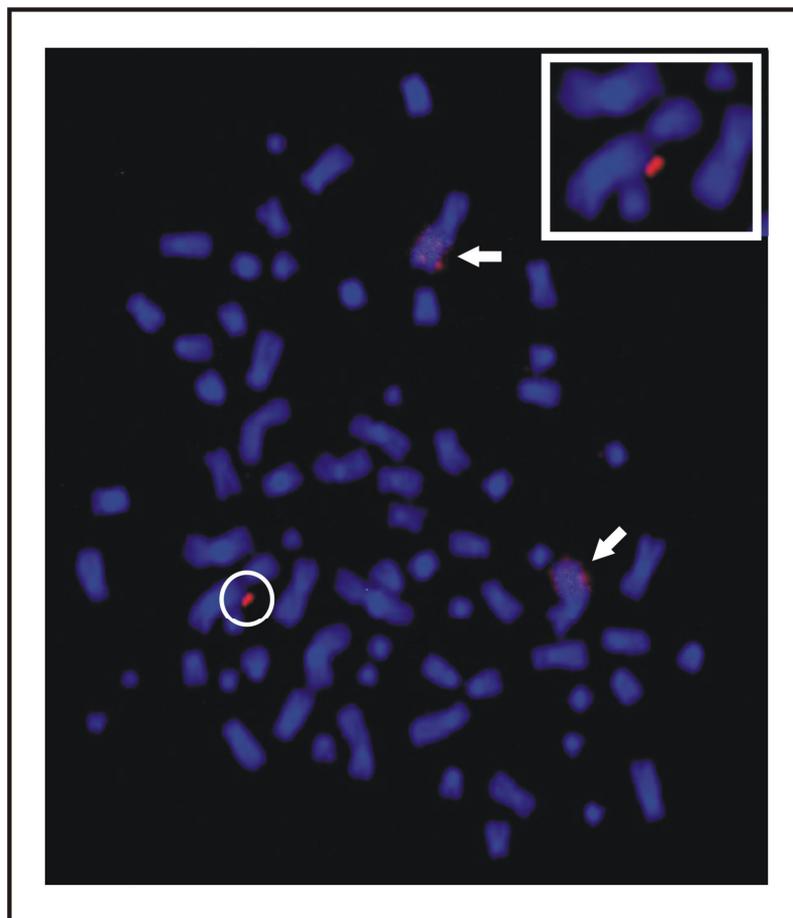


Abb. 3.4: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von TX3868-Zellen die für 18h mit APC in einer Endkonzentration von 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ behandelt wurden; DM-Induktion I.

Neben der relativ schwachen Färbung der beiden HSRs (s. Pfeile) ist in der unteren Hälfte eine induzierte DM mit der ihr eigenen, charakteristischen Struktur erkennbar (s. Kreis). In der Vergrößerung ist diese Struktur verdeutlicht. Es handelt sich hierbei um ein von beiden Chromatiden gleichzeitig ausgeschleuste Einheit, welches der Struktur der Ziffer „8“ ähnlich sieht; rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Durch die Behandlung mit APC wurde eine DM mit einer typischen Struktur induziert. Durch den parallel an beiden Chromatiden stattfindenden Prozess der DNA-Auschleusung wird dieses DNA-Material so zusammengerollt, dass eine

räumliche Struktur entsteht, die der Ziffer „8“ gleicht. In der Struktur eines HSRs, liegen auf einen räumlich sehr begrenzten Raum viele Genkopien vor. Dennoch zeigt sich hier nur eine schwache Färbung in rot. Im Fall der hier induzierten DM wurde allerdings eine im Verhältnis intensive Rotfärbung detektiert, was auf eine sehr hohe Kopienzahl des Gens KUB3 schließen lässt.

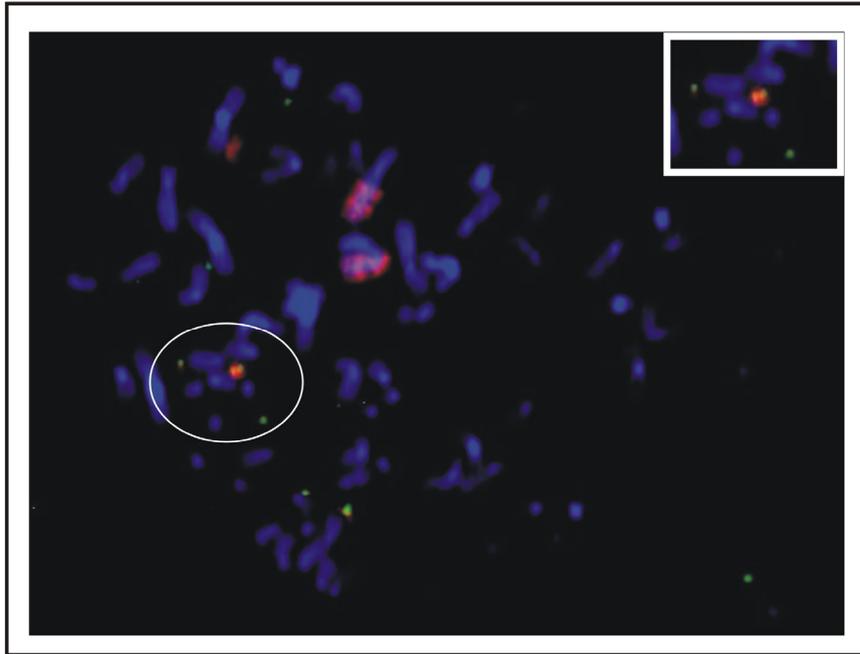


Abb. 3.5: Aufnahme einer FISH von APC-behandelten TX3868-Zellen; variable DM-Induktion II. Die Behandlung dauerte für 18 h an und wurde in einer Endkonzentration von 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ APC durchgeführt. Neben der roten Färbung der beiden HSRs zeigen sich viele induzierte DMs. Die Mehrheit dieser DMs beinhaltet eine hohe Kopienzahl an GAS41-Sequenzen, was an der intensiven Grünfärbung im Vergleich zum HSR sichtbar wird. Einige DMs zeigen auch eine Orange-Färbung (s. Ausschnittsvergrößerung), was einer gleichzeitigen Färbung von KUB3 und GAS41-Sequenzen durch die verwendeten Sonden entspricht; rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Nach APC-Behandlung finden sich nicht nur DMs, die mit KUB3 hybridisieren, sondern auch solche, die sowohl mit KUB3, als auch GAS41 hybridisieren (Orangefärbung, s. Ausschnittsvergrößerung). Auf die Größe des HSRs hatte die Behandlung in diesem Falle keinen messbaren Einfluss. Beide HSRs wiesen eine Länge von je 3,0 μm auf und variierten lediglich minimal in ihren Fluoreszenzintensitäten (3.545 Cy3 vs. 3.890 Cy3). Außerdem konnte festgestellt werden, dass durch die APC-Behandlung nicht nur spezifisch ein DM induziert wurde, sondern auch gleichzeitig zwei oder mehrere DMs (s. Abb. 3.5). Die Ausschnittsvergrößerung zeigt vier DMs, wobei hier zwei einzelne

DMs eine reine Grünfärbung aufwiesen und eine DM-Struktur sowohl grün, als auch rot angefärbt erschien. Dieser DM enthält somit neben GAS41- auch KUB3-Sequenzen. Im Vergleich zur Cy5-Fluoreszenzintensität bei den beiden einzelnen HSRs, lässt sich hier auch eine Zunahme der Cy5-Intensität feststellen (228 vs. 6 bzw. 8 Cy5), was auf einen höheren GAS41-Anteil hindeutet.

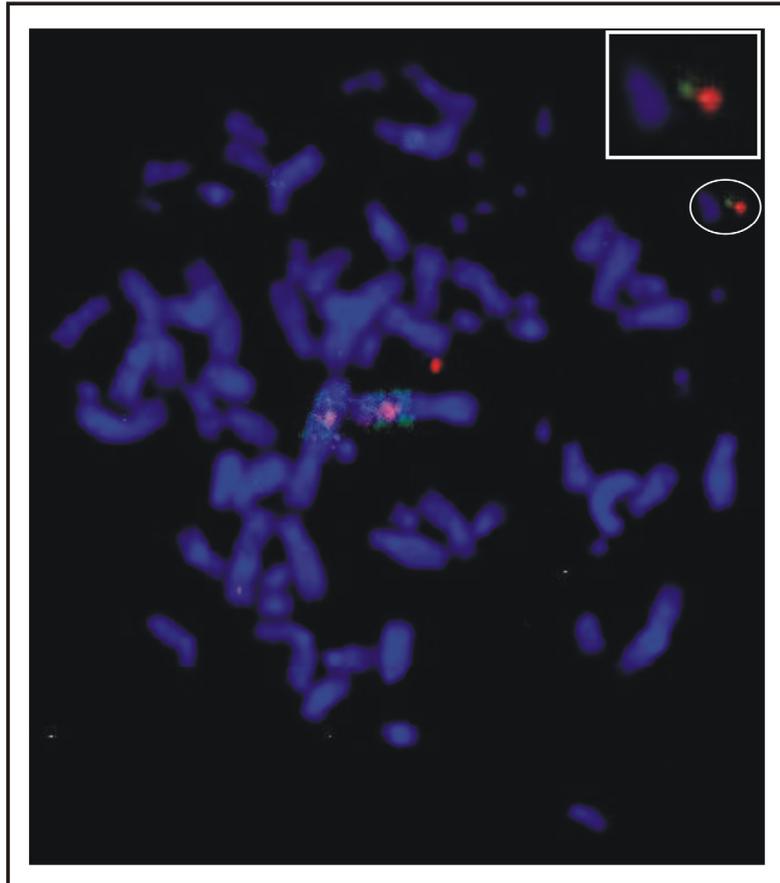


Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TX3868-Zellen die für 18 h mit 1,0 µg/µl APC behandelt wurden; variable DM-Induktion III.

Neben der geringen Größe der in roter Fehlfarbe dargestellten GAS41-Sequenzen des HSRs, konnte für KUB3 eine im Vergleich normale HSR-Struktur festgestellt werden. Weiterhin stellen sich hier zwei induzierte DMs mit hoher Kopienzahl an GAS41 und eine DM mit erhöhter KUB3-Kopienzahl dar. Der Ausschnitt zeigt eine gleichzeitige Induktion zweier DMs, bei der ein DM nur mit GAS41 und die andere nur mit KUB3 hybridisiert; rot (Cy3): GAS41, grün (Cy5): KUB3; Vergrößerung: 630-fach

In diesem Präparat wurden nach APC-Behandlung DMs detektiert, die entweder nur mit KUB3 hybridisierten oder nur mit GAS41.

Im Vergleich zu Abbildung 3.5 zeigt sich hiermit, dass die Induktion von DMs aus einer HSR-Struktur variabel in der Einbindung des chromosomalen Bereiches sein kann. Somit können hier Stellen im Genom betroffen sein, die sowohl ein einzelnes Gen, als auch mehrere Gene umfassen können.

Die DMs zeigten im Vergleich zu den HSRs eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität für diese Sonden. Weiterhin zeigte sich bei der Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der beiden HSRs, dass der flächenmäßige Anteil an GAS41 (rot) in hohem Maße reduziert vorlag.

Die Reduktion des Anteils an GAS41 am HSR nach APC-Behandlung zeigte sich ebenso bei der Auswertung der Fluoreszenzintensitäten. So konnte für GAS41 (rot) (851 bzw. 859 Cy5) eine starke Fluoreszenzreduktion im Verhältnis zu KUB3 (grün) (8.422 bzw. 7.787 Cy3) gemessen werden. Außerdem hybridisierte einzig die Sonde für KUB3 (grün) in der kompletten HSR-typischen Leiterstruktur.

In einem weiteren Beispiel wurde allerdings auch das Gegenteil beobachtet. Mit Hilfe der eingesetzten genspezifischen Sonden konnte der hohe Verlust von KUB 3 (grün) innerhalb der vorliegenden HSR-Struktur detektiert werden (s. Abb. 3.7 A+B, HSR II). Der Anteil an GAS41 hingegen blieb in etwa gleich.

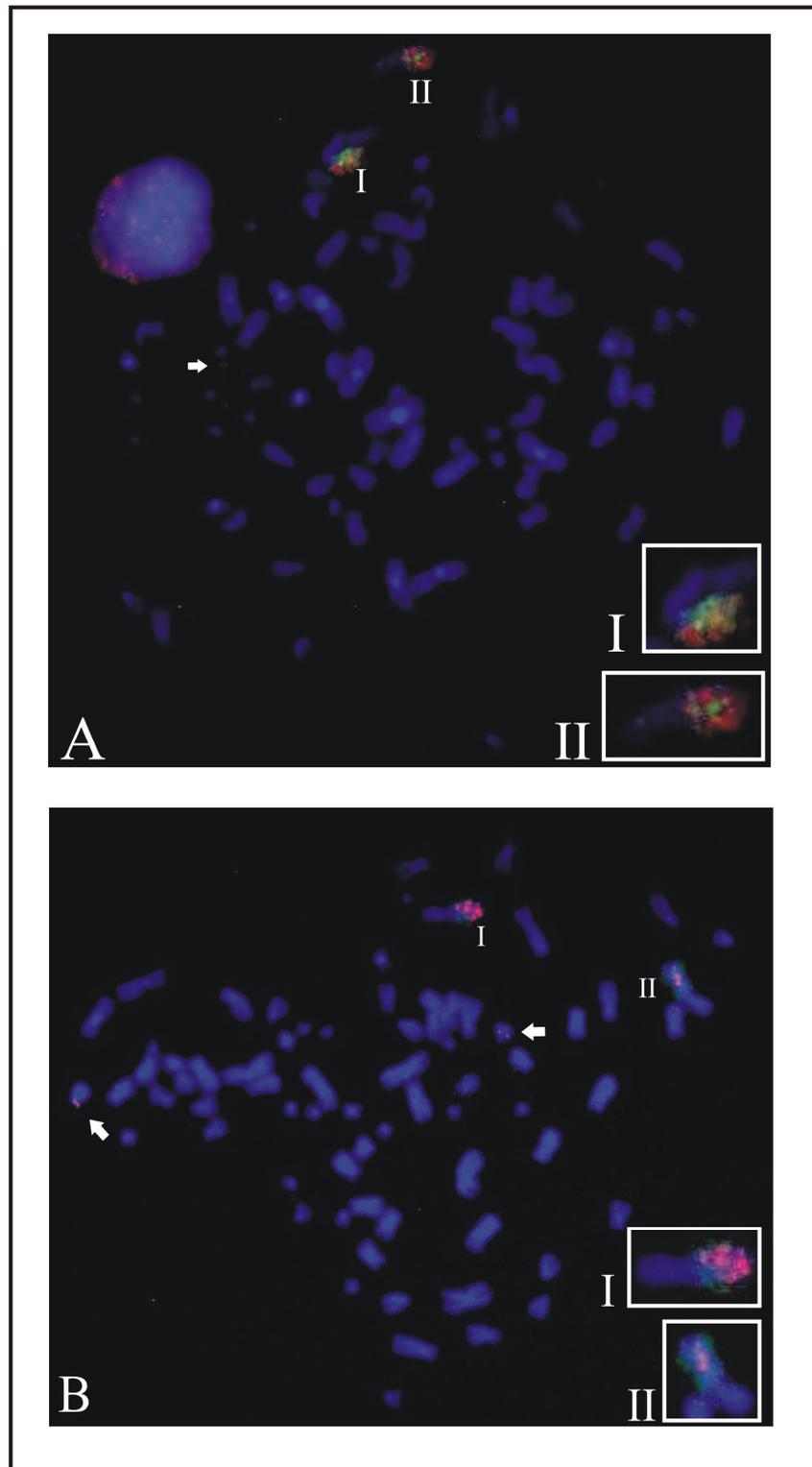


Abb. 3.7: Aufnahme der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von mit APC-behandelten TX3868-Zellen mit einer Änderung der HSR-Struktur (18h in einer Endkonzentration von 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ APC). Im Vergleich der beider HSRs untereinander (I+II), fällt (A) die unterschiedlich hohe Intensität an grüner Fehlfarbe, bei gleicher Intensität der roten Fehlfarbe, auf. Der Pfeil zeigt einen GAS41 *single-copy locus* auf Chromosom 12 an; rot (Cy3): GAS41, grün (Cy5): KUB3; Bei (B) zeigt sich der hohe Verlust an roter Fehlfarbe in HSR II. Der Gehalt an GAS41 in beiden HSRs blieb nahezu unverändert. Die beiden Pfeile zeigen KUB3 *single-copy loci* auf Chromosom 12 an; rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Die Auswertung der hier abgebildeten X-chromosomalen HSRs mittels ISIS-Software verdeutlichte, dass es signifikante Unterschiede der Anteile von KUB3 bzw. GAS41 innerhalb der homologen HSRs gab.

Bei HSR A-II zeigte sich im Vergleich zum homologen HSR (A-I) nur eine schwache grüne Fehlfärbung durch die KUB3-Sonde. Dies konnte anhand der gemessenen Werte der Fluoreszenzintensitäten bestätigt werden. So zeigte sich der Verlust an KUB3-Genkopien (grüne Fehlfarbe) in HSR A-II darin, dass nur noch 52,47 % der Cy5-Intensität von HSR A-I gemessen werden konnte (HSR A-I: 890 Cy5; HSR A-II: 467 Cy5). Der Anteil an roter Fehlfärbung hingegen blieb jedoch nahezu unverändert (HSR A-I: 5.116 Cy3; HSR A-II: 5.006 Cy3).

Im Vergleich der beiden HSRs der Teilabbildung B wurde ebenfalls ein Verlust an Genkopien durch die APC-Behandlung detektiert. Es zeigte sich hier (HSR B-II) eine Reduktion an roter Fehlfärbung, die wiederum einen hohen Verlust an KUB3-Genkopien (7.669 Cy3 vs. 3.095 Cy3) darstellt. Dieser Verlust konnte auf 40,35 % des Vergleichswertes des homologen HSRs (HSR B-I) berechnet werden. Die Kopienzahl an GAS41 in beiden HSRs blieb nahezu unverändert (271 Cy5 vs. 395 Cy5).

Somit könnte ein Einfluss der APC-Behandlung auf die chromosomale Struktur der HSRs angenommen werden. Ob und wie spezifisch dieser Einfluss auf ein ausgesuchtes Gen wirkt, konnte hier lediglich im Ansatz festgestellt werden. Jedoch konnte in beiden Fällen der Verlust an KUB3-Genkopien detektiert werden, der sich bis auf einen nahezu vollständigen Verlust des Anteils an KUB3 innerhalb eines HSRs ausweitete (HSR B-II).

Neben der Induktion von DMs gibt es weitere Hinweise für aktive Amplifikationsereignisse. So stellt die Reintegration von DMs an einen anderen chromosomalen Locus einen aktiven Vorgang der fragile-site Induktion dar. Die Behandlung mit APC induzierte diesen Vorgang spezifisch (s. Abb. 3.8).

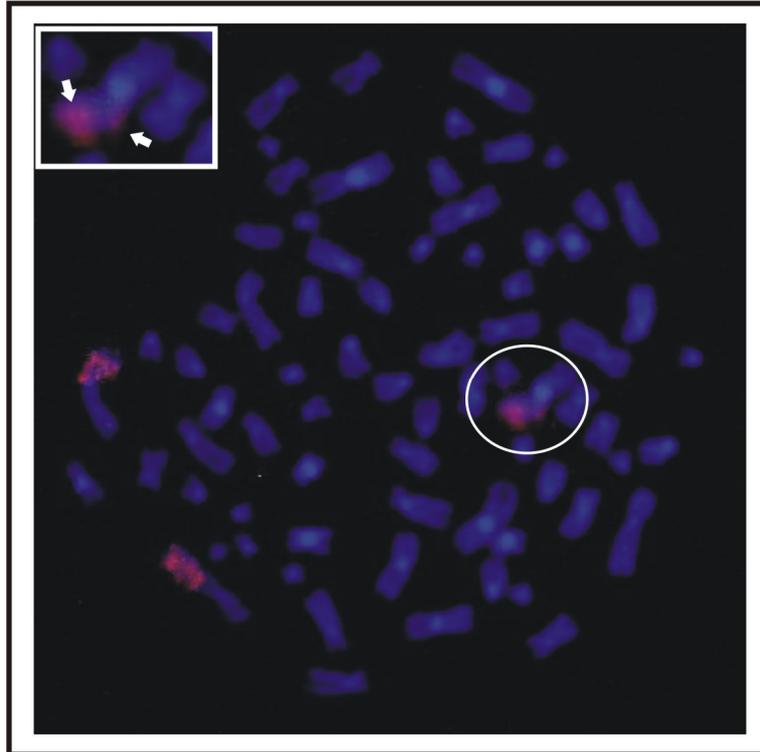


Abb. 3.8: Fluoreszenz in situ Hybridisierung von APC-behandelten TX3868-Zellen mit DM-Reintegration. Die Behandlung wurde für 18 h mit APC in einer Endkonzentration von $1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Auffallend ist die Rotfärbung in einem HSR-untypischen Muster an einem Chromosom. Dies konnte als doppelte chromosomale Reintegration von DMs an Chromosom 1 identifiziert werden. Die beiden Pfeile in der vergrößerten Ansicht zeigen die beiden chromosomalen Reintegrationsorte an Chromosom 1 an. Weiterhin konnte eine Verkleinerung des linken HSRs detektiert werden ($1,5 \mu\text{m}$ vs. $2,0 \mu\text{m}$); rot (Cy3): GAS41, grün (Cy5): KUB3; Vergrößerung: 630-fach

Die Auswertung der Metaphasenpräparation in Abbildung 3.8 zeigte, dass neben den beiden, für die Zelllinie TX3868, typischen HSRs noch eine weitere Hybridisierung durch die verwendete GAS41-Sonde stattfand. Der Ort der Reintegration wurde anhand zytogenetischer Merkmale als Chromosom 1 identifiziert. Da an diesem Chromosom die GAS41-Sonde an zumindest zwei Stellen gebunden hat, kann von mindestens zwei induzierten DMs ausgegangen werden, die an diesem Ort reintegriert wurden. Ein DM wurde hierbei etwas unterhalb des Centromers auf dem q-Arm reintegriert, während die Integration des zweiten DMs distal des ersten Integrationsortes stattfand. Es handelt sich hierbei um die unmittelbare Telomerumgebung.

Außerdem zeigte sich, dass der linke HSR, im Vergleich zum homologen HSR, einen Verlust in der Länge zu verzeichnen hat ($1,5 \mu\text{m}$ vs. $2,0 \mu\text{m}$). Es könnte also an dieser HSR ein Verlust an chromosomalem Material durch die APC-Behandlung stattgefunden haben und es wurde sehr wahrscheinlich an einem

anderen genomischen Locus reintegriert. Der größere Teil des reintegrierten DMs weist eine Größe von 0,5 μm auf.

Die Addition der Länge des integrierten HSR-Bestandteiles mit der Länge des linken, verkleinerten HSRs, ergibt in der Summe exakt die Größe des rechten unveränderten HSRs (2,0 μm). Dies stellt einen weiteren Hinweis auf den hier stattgefundenen möglichen Reintegrationsprozess dar.

Tab. 3.1: Auswertung der durch die APC-Behandlung induzierten chromosomalen Veränderungen bei TX3868-Zellen

APC-Behandlung	Beschreibung der Veränderung	Lokalisation des. HSRs in der Abbildung	gemessene Fläche [pix] bzw. [μm^2]	Cy3 Absolut I.F.I.	HSR-Länge [pix] bzw. [μm^2]	Quotient I.F.I. : μm^2	Chr.-Länge [pix] bzw. [μm]
Präparation 1	Bildung vieler DMs	HSR oben	676 / 3,0	3.545	34 / 2,3	1.181,7	31 / 2,1
		HSR unten	675 / 3,0	3.890	39 / 2,6	1.296,7	34 / 2,3
Präparation 2	Bildung von DMs und wenig HSR-Struktur	HSR links	748 / 3,4	8.422	36 / 2,4	2.477,1	36 / 2,4
		HSR rechts	624 / 2,8	7.787	34 / 2,3	2.781,1	35 / 2,4
Präparation 3	Veränderung der HSR-Struktur	HSR links unten	553 / 2,5	5.116	28 / 1,9	2.046,4	28 / 1,9
		HSR rechts oben	573 / 2,6	5.006	32 / 2,1	1.925,4	32 / 2,1
Präparation 4	Veränderung der HSRs und hoher Verlust bei einem HSR	HSR links	541 / 2,4	7.669	21 / 1,8	3.195,4	62 / 4,1
		HSR rechts	221 / 1,0	7.095	18 / 1,2	7.095,0	69 / 4,6
Präparation 5	Reintegration von DMs an einen anderen genomischen Locus	HSR links oben	503 / 2,3	2.429	31 / 2,1	1.056,1	73 / 4,9
		HSR rechts unten	550 / 2,5	2.686	32 / 2,2	1.074,4	74 / 4,9

3.1.2.3 Behandlung von TX3868-Zellen unter mini-Hypoxie

Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen der Glioblastomzelllinie TX3868 für 24 h unter mini-hypoxischen Bedingungen kultiviert.

Die Behandlung der TX3868-Zellen mittels mini-Hypoxie dient der Imitierung einer physiologischen *in vivo* Tumorsituation. Trotz starker Vaskularisierung können die neu gebildeten Gefäße, deren Funktionsfähigkeit stark reduziert ist, nur eine unzureichende Sauerstoffversorgung für die Zellen gewährleisten. Es kann so zu leicht hypoxischen Bedingungen innerhalb der betreffenden Region kommen (Semenza et al., 2004). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation erst durch den Prozess der Reoxygenierung entsteht.

Mit Hilfe der mini-Hypoxie Behandlung sollte die Auswirkung dieser Bedingungen auf die Struktur des X-chromosomalen HSRs in den TX3868-Zellen untersucht werden. Die Behandlung dauerte jeweils 24 h an. Nach der Inkubation erfolgte entweder direkt eine Präparation oder die Zellen erhielten weitere 24 h unter Normoxie (normaler physiologischer Sauerstoffgehalt), um so den möglichen Effekt der Reoxygenierung untersuchen zu können.

Der Nachweis chromosomaler Veränderungen wurde mit Hilfe von genspezifischen Locussonden durchgeführt. Wie sich nach Hybridisierung und Auswertung der Metaphasenpräparate zeigte, konnte nach mini-Hypoxie kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen mit und ohne Erholungsphase festgestellt werden.

Die Analyse der durchgeführten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit 24-stündiger mini-Hypoxie zeigte verschiedene Veränderungen der Struktur der HSRs an. Des Weiteren wurden auch chromosomale Brüche detektiert.

Im Gesamten wurden 45 Metaphasen nach Behandlung mit mini-Hypoxie ausgewertet. Es konnten sieben induzierte DMs und drei Brüche der HSR-Struktur detektiert werden. Jedoch wurden im Gegensatz zur APC-Behandlung keine Anzeichen einer DM-Reintegration gefunden.

Im Einzelnen zeigte sich, dass mini-Hypoxie zur Induktion von fragile-sites führt. Nach mini-Hypoxie kam es zu einer Reduktion des KUB3-Anteils innerhalb des einen homologen HSRs. Das ausgeschlossene DNA-Material enthielt Kopien von KUB3 und konnte mit Hilfe der KUB3-Sonde identifiziert werden.

Anzumerken ist die Frequenz der induzierten DMs. Während es nach APC-Behandlung in 39,3 % der Fälle zur Induktion von DMs kam, konnten infolge der mini-Hypoxie nur in 15,56 % der Fälle DMs detektiert werden.

Jedoch zeigten die Zellen unter mini-Hypoxie ein höheres Maß an Veränderungen innerhalb der HSR-Struktur. Auch wurden bei dieser Art der Behandlung die schwersten Auswirkungen detektiert. So konnte bei drei Präparaten ein Bruch innerhalb des HSRs festgestellt werden.

Bei näherer Untersuchung dieser Veränderungen stellte sich heraus, dass die Brüche nie am gleichen genomischen Locus induziert wurden. Während einer der Brüche den HSR in relativ gleich große Hälften zerteilte, fanden die beiden

anderen Brüchen am proximalen Ende des HSRs statt. In einem dieser Fälle teilte sich der HSR so, dass auf dem kleineren Bruchstück nur eine minimale Hybridisierung der Sonde stattfand. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auf diesem Stück nur verhältnismäßig kleine Anteile des HSRs verblieben sind. Im letzten Fall wurde die HSR in zwei Teile zerteilt, bei dem ein Stück fast die komplette HSR umfasste, während das andere Stück nahezu keine Hybridisierungsereignisse aufwies. Somit liegt der Schluss nahe, dass diese Bruchstelle am äußeren, proximalen Ende des HSRs gelegen hat.

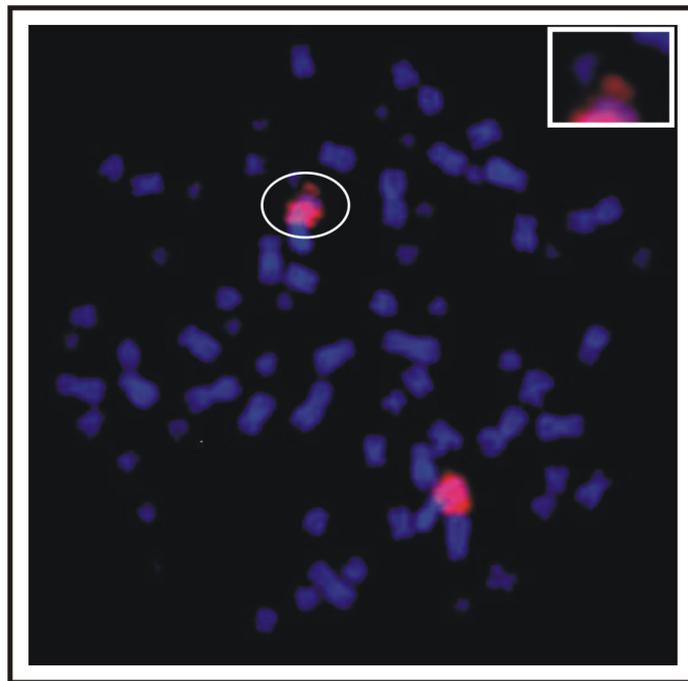


Abb. 3.9: TX3868-Zellen, die 24 h unter mini-Hypoxie kultiviert wurden; DM-Induktion
Dargestellt ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach *in situ* Hybridisierung. Induktion von fragile-sites (s. Kreis & Ausschnittsvergrößerung). Der HSR, an dem die DM-Induktion stattfand, wurde messbar verkleinert (1,4 μm vs. 1,9 μm zum homologen HSR). Die Summe aus der Länge des induzierten DM und dem veränderten HSR ergibt in etwa die gleiche Länge des unveränderten HSRs (1,8 μm vs. 1,9 μm); rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Analog zur APC-Behandlung konnte bei der Kultivierung der TX3868-Zellen unter mini-Hypoxie die Induktion von fragile-sites (s. Abb.3.9) detektiert werden. Hierbei war zu erkennen, dass der betreffende HSR, an dem die Induktion stattfand, im Vergleich zum homologen HSR einen Verlust in der Länge zu verzeichnen hatte. Diese Reduktion ließ sich auch mittels ISIS-Software nachweisen. So wies der entsprechende HSR nur eine Länge von 1,4 μm auf. Im Vergleich hierzu konnte bei dem unveränderten HSR eine Länge

von 1,9 μm gemessen werden. Ein weiterer Befund für die stattgefundene Auswirkung der mini-Hypoxie zeigte sich beim Vergleich der Länge der einzelnen HSRs an der Gesamtlänge ihrer jeweiligen Chromosomen. Der unveränderte HSR wies hierbei einen Anteil von 53 % an der Chromosomengesamtlänge auf (1,9 μm HSR-Länge bei 3,6 μm Gesamtlänge des Chromosoms). Der veränderte HSR hingegen wies bei einer Gesamtlänge des Chromosoms von 3,4 μm noch eine Länge von 1,4 μm auf. Dies entspricht einem Anteil von 41%. Die Messung des ausgeschlossenen DNA-Materials ergab eine Länge von 0,4 μm . Zusammen mit der Länge des veränderten HSRs ergibt dies fast die Gesamtlänge des unveränderten HSRs (1,8 μm zu 1,9 μm).

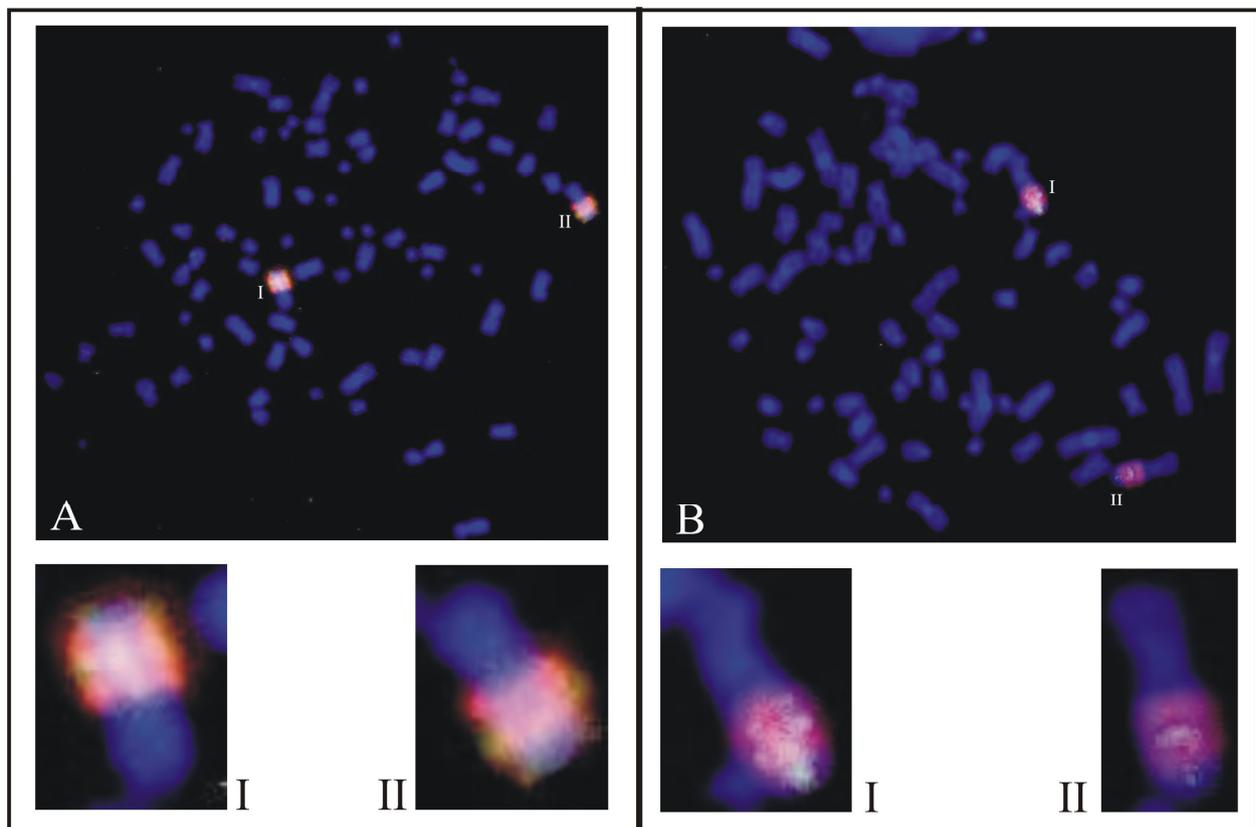


Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TX3868-Zellen, die für 24 h unter mini-hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden; Änderung der HSR-Struktur
Veränderung der HSR-Struktur im (A) rechten oberen HSR (vgl. A-II) bzw. (B) im unteren rechten HSR (vgl. B-II). (A): Zu sehen ist ein Verlust an KUB3. (B): Zu sehen ist ein Verlust an KUB3 und GAS41. Zur besseren Verdeutlichung der Veränderungen wurden die beiden HSRs jeweils vergrößert in den Bildausschnitten I bzw. II dargestellt; (A): rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; (B): rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Die 24-stündige Kultivierung von TX3868-Zellen unter mini-Hypoxie führte in beiden gezeigten Fällen (s. Abb. 3.10 A + B) zu einer deutlichen Veränderung eines der beiden homologen HSRs.

Hierbei konnte mit Hilfe der ISIS-Software ein Verlust an Cy3-Fluoreszenzintensität innerhalb des HSR A-II detektiert werden. Die Analyse zeigte eine Reduktion der KUB3-Sondenhybridisierung um 21 % von 116.084 Cy3 bei HSR A-II auf 91.653 Cy3 bei HSR A-I. Diese Tatsache wurde durch die Auswertung der errechneten Fluoreszenzintensität pro μm^2 HSR-Fläche bestätigt. Hier konnte für den HSR A-II der Wert 24.771,1 Cy3 Abs. I.F.I./ μm^2 und für den HSR A-I ein Wert von 34.142,4 Cy3 Abs. I.F.I./ μm^2 errechnet werden. Somit konnte hier der Verlust an Cy3-Fluoreszenzintensität über die Gesamtfläche der einzelnen HSRs auf 27,3 % ermittelt werden. Für die grüne Fehlfärbung bzw. die Hybridisierung der GAS41-Sonde konnte innerhalb der Präparation A keine Veränderung detektiert werden (HSR A-II: 22.526 Cy5 bzw. bei HSR A-I: 22.962 Cy5).

Bei dem Bildausschnitt B waren die Auswirkungen der mini-Hypoxie innerhalb der einzelnen HSRs wesentlich stärker sichtbar. Hier konnte jedoch im Gegensatz zum Bildausschnitt A eine eindeutige Veränderung beider Fehlfarben gemessen werden. Bei HSR B-II konnte eine absolute Cy3-Fluoreszenzintensität von 114.530 gemessen werden. Im Vergleich zu HSR B-I (150.684 Cy3) stellt dies eine Reduktion der absoluten Fluoreszenzintensität auf 76 % dar. Dieser Befund konnte durch die Betrachtung der Fluoreszenzintensität über die Gesamt-HSR-Fläche bestätigt werden. Der Verlust an Cy3-Intensität zeichnete sich hier deutlich ab (HSR B-I: 45.661,8 Abs. I.F.I./ μm^2 vs. HSR B-II 30.139,5 Abs. I.F.I./ μm^2) und stellt somit eine Reduktion auf 2/3 der Gesamtintensität im homologen HSR dar. Dies ist gleichbedeutend mit einem Verlust an KUB3-Genkopien in HSR B-II.

Jedoch konnte hier im Gegensatz zu Bildausschnitt A auch eine deutliche Veränderung der absoluten Cy5-Fehlfärbung (GAS41, grün) gemessen werden, die auf 27,2 % (Cy5 bei HSR B-I: 6.897 bzw. HSR B-II: 5.020) errechnet werden konnte. Dies konnte ebenfalls für die Cy5-Fluoreszenzintensität über die Gesamt-HSR-Fläche bestätigt werden. Hier lag der errechnete Wert der Abnahme bei 26,8 % (Cy5 I.F.I./ μm^2 bei HSR B-I: 2.090,0 vs. HSR-B-II: 1.321,1).

Diese Werte verdeutlichen auch in diesem Fall die negativen Auswirkungen der Kultivierung unter mini-Hypoxie auf die Kopienzahl der untersuchten Gene innerhalb des HSRs.

Die untersuchten Präparate weisen allerdings deutlich auf, dass die Kultivierung von Glioblastomzellen unter mini-hypoxischen Bedingungen nicht ausschließlich den Verlust eines speziellen Zielgenes bedingt. Es zeigte sich, dass neben Genkopien von KUB3 auch gleichzeitig GAS41-Sequenzen ausgeschleust werden.

In den bisherigen Versuchen zu den Auswirkungen der mini-Hypoxie zeigten sich unterschiedliche Veränderungen der chromosomalen Struktur einer oder beider HSRs. Jedoch konnten neben diesen noch weitere Auswirkungen der mini-Hypoxie auf die X-chromosomalen HSRs in den untersuchten TX3868-Zellpopulationen gefunden werden. Diese stellen sich weitaus mannigfaltiger und schwerer in ihrem Ausmaß dar, als im Vergleich hierzu die oben angesprochenen Veränderungen durch die APC-Behandlung. So kam es u.a. zu Brüchen innerhalb der HSR-Formation. Dies stellte zugleich die im Verlauf der Untersuchungen nachgewiesene größte chromosomale Beeinflussung durch die 24-stündige mini-Hypoxie dar.

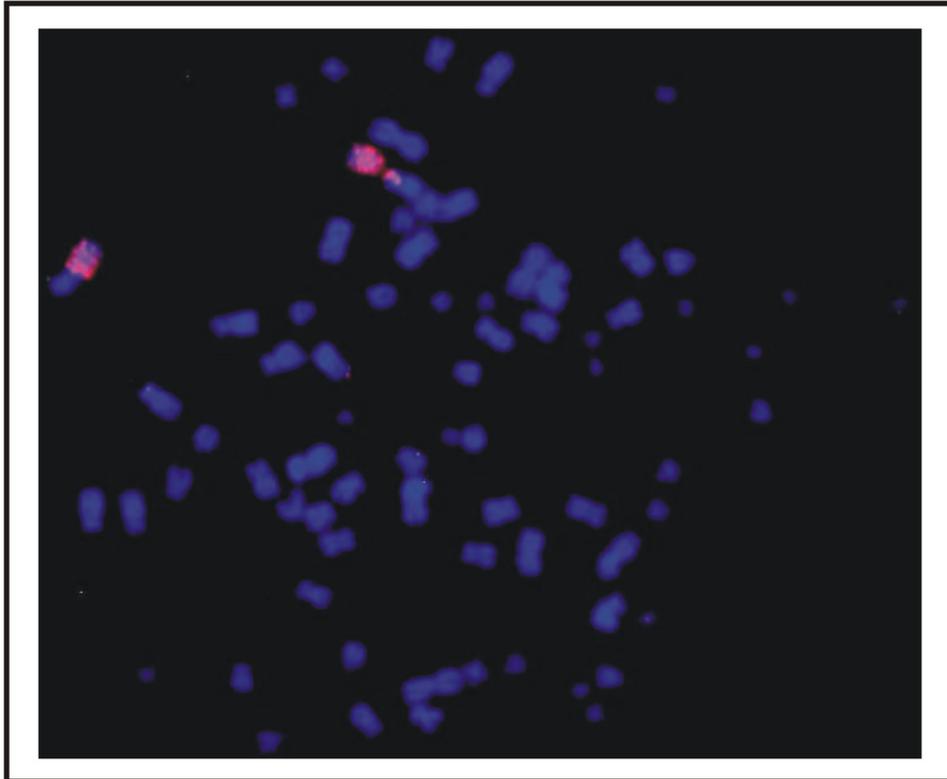


Abb. 3.11: FISH von kultivierten TX3868-Zellen nach 24 h-stündiger mini-Hypoxie; chromosomaler Bruch I
Chromosomaler Bruch proximal der rechten X-chromosomalen HSRs. Gleichzeitig zeigt sich ein Verlust an Cy3-Fluoreszenzintensität beim ungebrochenen HSR (102.714 vs. 87.370); rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Der Bruch des X-chromosomalen HSRs erfolgte an dessen proximalen Ende und zerteilte das Chromosom in zwei ungleichmäßige Bruchstücke. Hierbei wurde der HSR so zerteilt, dass eines der Bruchstücke den nahezu kompletten Anteil des HSRs aufwies. Mit Hilfe der ISIS-Software ergaben sich noch weitere Befunde (s. Tab. 3.2). So zeigte sich, dass die absoluten Cy3-Fluoreszenzintensitäten zwischen dem kompletten HSR und dem großen HSR-Bruchstück (Cy 3: 87.370 vs. 85.812) nahezu identisch waren. Jedoch muss zu dem HSR-Bruchstück noch das verbliebene Stück des HSRs hinzugerechnet werden, um die theoretische Gesamtfluoreszenzintensität dieses Total-HSRs vor dem Bruch zu berechnen. So ergeben sich für die beiden HSR-Bruchstücke eine Gesamt-Cy3 Abs. I.F.I. von 102.714. Verglichen mit dem unveränderten HSR entspricht dies einem Fluoreszenzintensitätszugewinn von 14,94 %. Addiert man die Größen der beiden Bruchstücke, so ergibt sich eine Gesamtchromosomenlänge von 3,6 μm , im Vergleich zu 3,5 μm bei dem unveränderten Chromosom. Dies würde bedeuten, dass an diesem HSR kein chromosomales Material durch den Bruch verloren gegangen wäre. Demnach

könnte das chromosomale Material am ungebrochenen HSR verloren gegangen sein. Somit wären beide HSR einer Veränderung durch die mini-Hypoxie unterworfen worden.

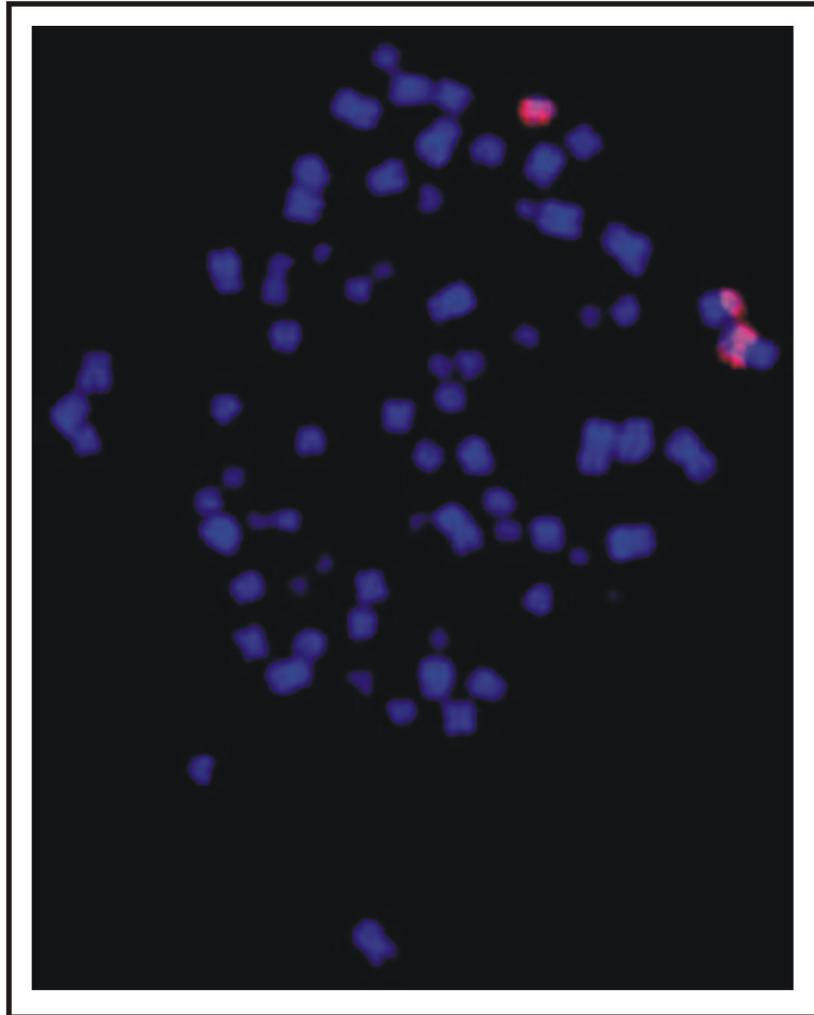


Abb. 3.12: Fluoreszenz in situ Hybridisierung einer mini-Hypoxie-Präparation (Dauer 24 h) von behandelten TX3868-Zellen; chromosomaler Bruch II Median gelegener chromosomaler Bruch des linken X-chromosomalen HSRs. Zuwachs an Cy3-Fehlfarbe in der Gesamtheit der beiden HSR-Bruchstücke (90.406 vs. 78.217 Cy3 Abs. I.F.I.); rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Neben einem proximal gelegenen Bruch des HSRs (s. Abb. 3.11) konnte als weiterer Befund der mini-Hypoxie Behandlung ein Bruch der HSR-Struktur detektiert werden, der median innerhalb des HSRs stattfand. Somit könnte der Bruch des HSRs kein lokal begrenztes Ereignis sein, der stets an der gleichen Stelle im HSR auftritt. Außerdem ließ sich feststellen, dass die Cy3-Gesamtfluoreszenzintensität, bei der Summe beider Bruchstücke, einen Zuwachs von 13,48 % (90.406 vs. 78.217 Cy3) im Vergleich zum kompletten HSR

aufwies (s. Tab. 3.2). Zusätzlich konnte in der Summe der Längen der Bruchstücke ein Unterschied von 0,3 μm festgestellt werden (Summe der Bruchstücke: 2,8 μm ; unveränderter HSR: 2,5 μm), was einem Längenzugewinn von 11,2 % entspricht.

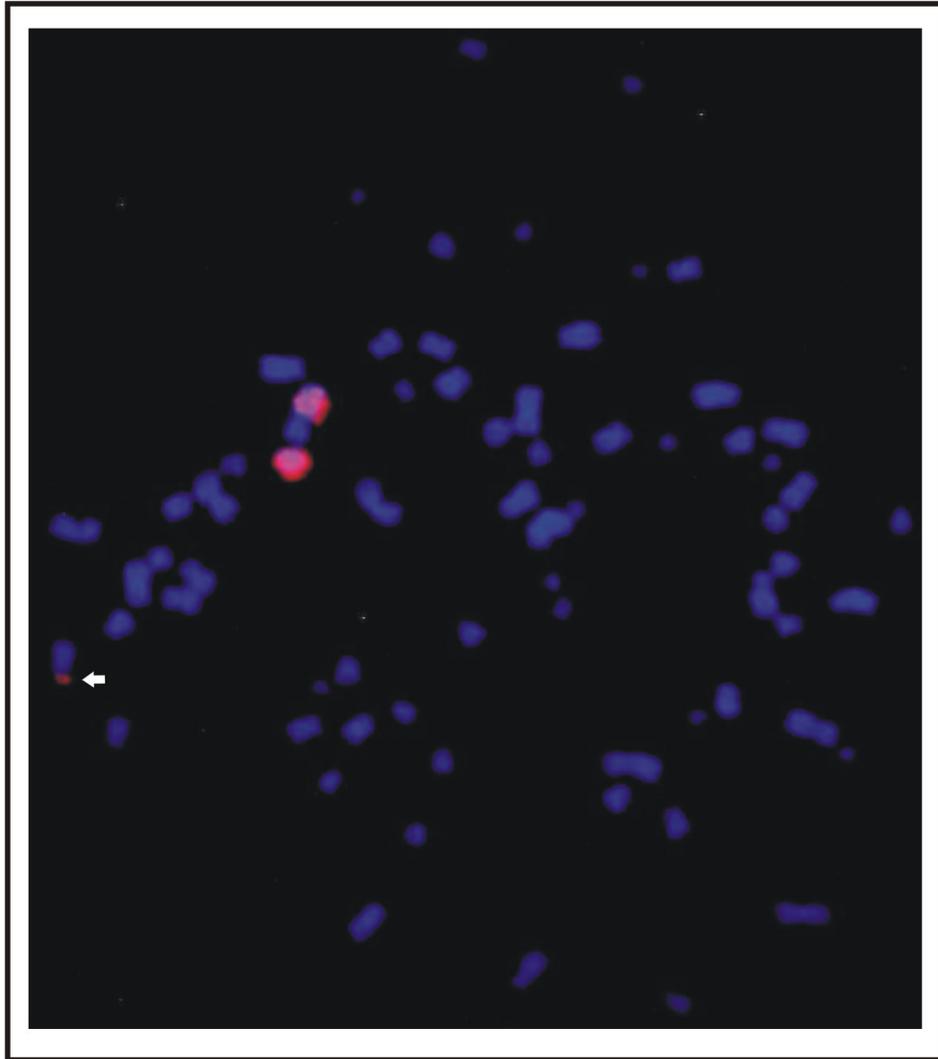


Abb. 3.13: Fluoreszenz in situ Hybridisierung von TX3868-Zellen, die 24 h unter mini-hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden; chromosomaler Bruch III
Chromosomaler Bruch am äußerst proximalen Ende des oberen X-chromosomalen HSRs. Zuwachs an Cy3-Fluoreszenzintensität in der Gesamtheit der beiden HSR-Bruchstücke (125.839 vs. 96.7417 Cy3 Abs. I.F.I.); rot (Cy3): KUB3, grün (Cy5): GAS41; Vergrößerung: 630-fach

Der Bruch des X-chromosomalen HSRs nach 24-stündiger mini-Hypoxie fand in dieser Präparation am äußerst proximalen Ende des HSRs statt. Dies unterstreicht zugleich den Verdacht darauf, dass der Bruch dieser HSR-Struktur in den TX3868-Zellen kein Vorgang ist, der sich auf eine Stelle innerhalb des HSRs begrenzen lässt. So wurde hier der HSR in einen Teil gespalten, der durch die Cy3-markierte Sonde stark angefärbt wurde und einen Teil, an dem die

Sonde nur minimal hybridisierte. Dies ist gleichbedeutend mit der Tatsache, dass das große Bruchstück nahezu den kompletten Anteil an KUB3 enthält, dem Rest des Chromosoms hingegen wohl nur noch minimale Restbestandteile des HSRs verblieben sind. Werden die beiden Längen der beiden Chromosomenbruchstücke addiert, so erhält man mit $3,4 \mu\text{m}$ in etwa die gleiche Chromosomengesamtlänge ($3,3 \mu\text{m}$), wie sie beim homologen Chromosom zu messen war (s. Tab. 3.2). Jedoch zeigt sich hier, dass sich die Gesamtflächen der mit der Sonde hybridisierten HSRs untereinander unterscheiden. Bei der Summe der Flächen innerhalb der beiden HSR-Bruchstücke zeigt sich eine minimal größere Gesamtfläche ($2,5 \mu\text{m}^2 + 0,3 \mu\text{m}^2 = 2,8 \mu\text{m}^2$), als im Vergleich hierzu beim homologen HSR ($2,5 \mu\text{m}^2$).

Es zeigte sich weiterhin ein Anstieg um 23,12 % in der Cy3 Abs. I.F.I. innerhalb der Gesamtfläche der HSR-Bruchstücke im Vergleich zum unveränderten HSR. Dieser Anstieg errechnet sich aus dem Gesamt-HSR mit 96.741 Cy3 und den beiden HSR-Bruchstücken, die in der Summe den Wert 125.839 Cy3 (117.593 und 8.247) aufwiesen.

Dies stellt den höchsten Zugewinn an detektierter Fluoreszenzintensität, innerhalb der durch die mini-Hypoxie bedingten chromosomalen Brüche, dar.

Tab. 3.2: Auswertung der unter mini-Hypoxie entstandenen chromosomalen Brüche bei TX3868-Zellen

		gemessene Fläche pix / μm^2	Cy3 Absolut I.F.I.	HSR Länge pix / μm	Quotient I.F.I. : μm^2	Chr.-Länge pix / μm
Präparation 1	HSR komplett	2.491 / 2,8	87.370	56 / 1,9	31.203,6	103 / 3,5
gebrochener HSR	HSR-Bruchstück	2.296 / 2,6	85.812	52 / 1,7	33.004,6	51 / 1,7
	Chromosom mit Rest-HSR	372 / 0,4	16.902	27 / 0,9	42.255,0	56 / 1,9
Präparation 2	HSR komplett	2.260 / 2,5	78.217	48 / 1,6	31.286,8	74 / 2,5
gebrochener HSR	Chromosom mit Rest-HSR	1.672 / 1,9	56.493	36 / 1,2	29.733,2	33 / 1,1
	HSR-Bruchstück	986 / 1,1	33.913	26 / 0,9	30.830,0	52 / 1,7
Präparation 3	HSR komplett	2.191 / 2,5	96.741	49 / 1,7	38.696,4	99 / 3,3
gebrochener HSR	HSR-Bruchstück	2.209 / 2,5	117.592	56 / 1,9	47.036,8	46 / 1,5
	Chromosom mit Rest-HSR	228 / 0,3	8.247	11 / 0,4	27.490,0	57 / 1,9

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Behandlung mit APC zu einer höheren Frequenz der DM-Induktion führt, während die mini-Hypoxie Behandlung einschneidende chromosomale Veränderungen, in Form von

Brüchen der HSR-Struktur, zur Folge hat. So gehen nach DM-Induktion innerhalb des HSRs nicht alle Gene verloren und es verbleiben somit noch viele Genkopien. Aufgrund des Verlustes des abgetrennten Chromosomenbruchstückes gehen diese nach mini-Hypoxie jedoch für die Zelle komplett verloren.

3.2 Neurale Tumorstammzellen in Zelllinien des *Glioblastoma multiforme*

3.2.1 Charakterisierung von Glioblastomzelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien wurden aus Patientenbiopsien etabliert (s. Material- und Methoden). Ziel war es für diese Zelllinien charakteristische Merkmale zu bestimmen. Dazu wurden sowohl Merkmale, die mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie auswertbar sind, wie Morphologie und Wachstum der einzelnen Zellpopulationen, als auch solche Merkmale untersucht, die außerhalb der Darstellungsmöglichkeit der Durchlichtmikroskopie liegen. Hierzu gehört z.B. die Charakterisierung der Expression verschiedener Gene bzw. Genmuster innerhalb der Glioblastomzelllinien.

3.2.1.1 Unterscheidung von Glioblastomzelllinien anhand der Zellmorphologie

Jede Zelllinie weist eigene charakteristische Merkmale auf. So können diese im Besonderen durch visuelle Charakteristika, zu denen die Zellform oder das Wachstumsverhalten während der Kultivierung gehören, unterschieden werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastomzelllinien stellen, mit Ausnahme der Zelllinien TX3095 und TX3868, Primärkulturen dar. Der Buchstabe „X“ in der Bezeichnung der Zelllinien TX3095 bzw. TX3868 charakterisiert sie als Xenograft ihrer Primärkulturen und bedeutet wiederum, dass es sich hierbei um eine durch die Nacktmaus passagierte Zelllinie handelt. Im Gesamten wiesen die hier untersuchten Glioblastomzelllinien mitunter sehr unterschiedliche Zellmorphologien auf, die im Folgenden näher beschrieben werden.

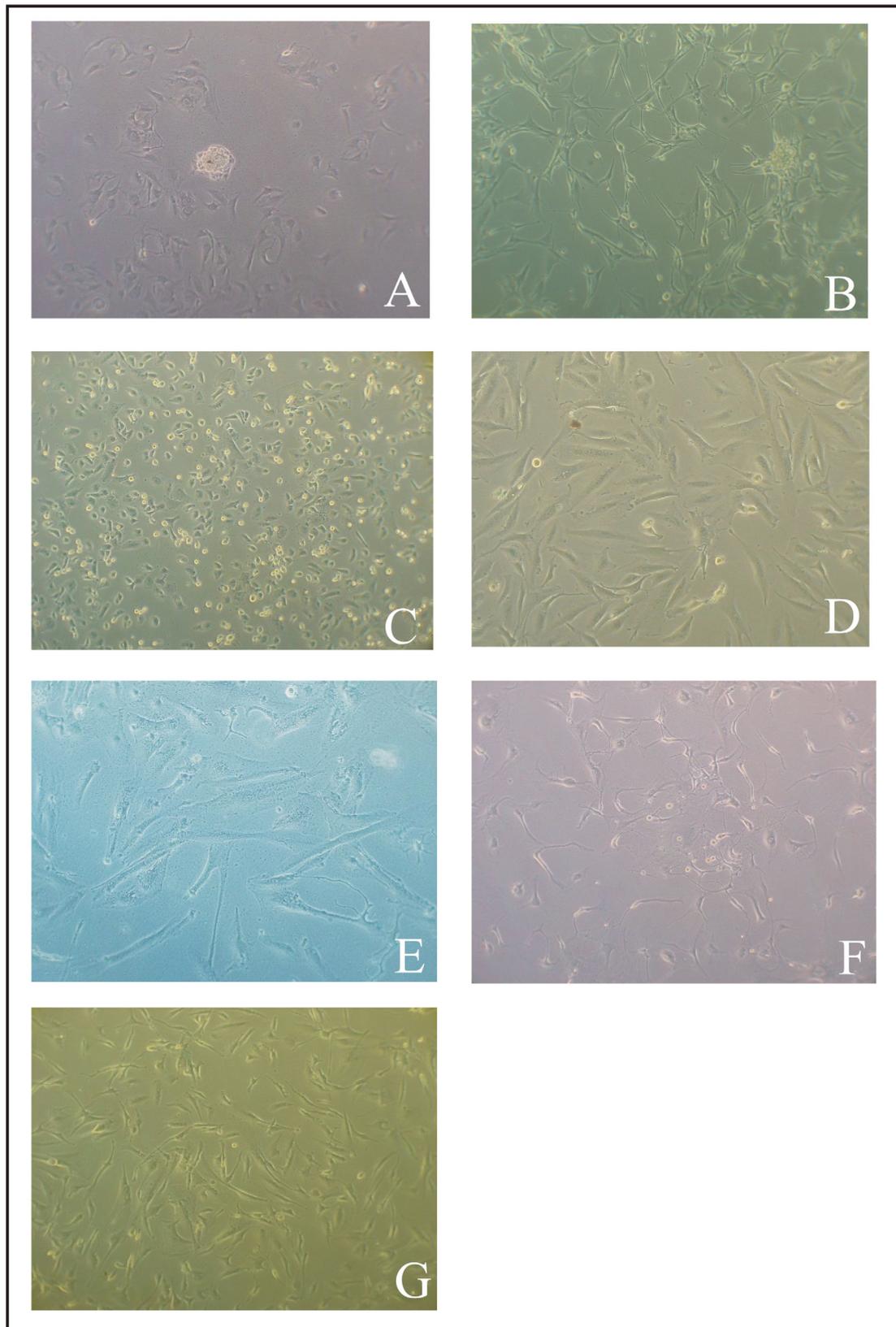


Abb. 3.14: Durchlichtmikroskopische Darstellung von kultivierten Glioblastomzelllinien

Zu sehen ist jeweils eine Darstellung des charakteristischen Wachstums. Es wurden die Zelllinien A: H385 (Px+2), B: TX3095 (P22), C: TX3868 (P30), D: T6217 (P10), E: T6313 (P18), F: T6432 (P5) und G: T6433 (P22) dargestellt und charakterisiert. Diese Abbildung gibt einen Überblick über diese Zelllinien. In den Klammern ist die Passagennummer aufgeführt, in der die Zellen sich zum Zeitpunkt der Aufnahme befanden; Vergrößerung 200-fach

In Abbildung 3.14 ist eine Übersicht über die in diesem Teil der Arbeit charakterisierten Glioblastomzelllinien dargestellt. Die Unterscheidung wurde hierbei anhand der sichtbaren morphologischen Eigenschaften durchgeführt. Jede der hier untersuchten Zelllinien wurde aus einer Biopsieprobe eines Glioblastoms etabliert und anhand der einzelnen Zellmorphologien konnte kein einheitliches Wachstum nachgewiesen werden. Somit spiegelt sich das multiforme Bild, wie es den Glioblastomen zu Eigen ist, auch in den etablierten Zelllinien wieder und stellt die Möglichkeit zur Charakterisierung der einzelnen Zelllinien anhand ihrer Morphologien dar.

So weisen die Zellen der Zelllinie H385 eine dreiecksförmige Morphologie mit dünnen Auswüchsen auf. Diese Zellen lassen an neuronale Strukturen erinnern. Außerdem kann in Teilen der kultivierten Zellpopulation auch das Wachstum von Zellen detektiert werden, deren Morphologie als lanzettförmig beschrieben werden kann.

Die Morphologie der Zelllinie TX3095 stellt sich in der Mehrzahl als dreistrahlige Sternform mit lanzettförmigen Auswüchsen dar. Diese Auswüchse enden häufig in dünnen Ausläufern, was auf neuronale Strukturen hindeuten könnte.

Eine Kultivierung der Zelllinie TX3095 ist über Passage 70 hinaus möglich und erfüllt damit die Richtlinien der ATCC für permanente Zelllinien.

Die Mehrzahl der Zellen der Linie TX3868 weist eine relativ kleine drei- oder viereckige Form auf, die sich mit zunehmender Konfluenz auch als rundlich darstellen kann. Befinden sich die Zellen in einer niedrigen Konfluenz (25 %), so kann sich hierbei die Zellmorphologie der TX3868-Zellen zu einem sehr lang gezogenen, lanzettförmigen Wachstum verändern. Sobald jedoch eine höhere Konfluenz erreicht wird ändert sich dieses Wachstum wieder zum ursprünglichen Erscheinungsbild. Die Zellen nehmen dabei wieder die charakteristische Drei- oder Vierecksform an.

Ebenso wie die Zelllinien TX3095, kann die Zelllinie T6217 über die Passagenzahl 70 hinaus kultiviert werden. Der Nachweis hierfür wurde von Frau Karin Löw erbracht (Anreicherung und Charakterisierung von CD133⁺

Tumorzellen aus einer Glioblastomzellkultur, Diplomarbeit, Institut für Humangenetik, 2006). Somit kann diese Zelllinie ebenfalls, laut den Bestimmungen der ATCC, zu den permanenten Zelllinien gezählt werden. Die Form der Zellen stellt sich lanzettförmig dar. Jedoch lassen sich in der Zellpopulation auch astrozytäre Zellen mit rundlichem Zellkörper und kurzen, dünnen Auswüchsen finden.

Das Zellwachstum der Glioblastomzelllinie T6313 stellt sich als eine Mischung aus relativ dünnen lanzettförmigen Zellen und Zellen mit sehr langem aber relativ dickem Zellkörper dar. Außerdem lassen sich Zellen mit oligodendroglialen Charakteristika finden (s. Pfeil). Charakteristisch für eine Zelle dieses Typs ist der dünne aber rundliche Zellkörper, der von relativ langen, aber verzweigten Ausläufern umgeben ist.

Bei der Zelllinie T6432 handelt es sich um eine noch sehr junge Primärkultur. Während der Kultivierung in dieser geringen Passagenzahl (P5) konnten noch Zellen sowohl astrozytären als auch oligodendroglialen Ursprungs detektiert werden (s. Pfeile). Der Großteil der Zellen wies hingegen einen dünnen, sehr länglichen Zellkörper auf.

Ein Charakteristikum der Zelllinie T6433 ist die Mischpopulation aus spindelförmigen Zellen und Zellen mit dreiecksförmigem Zellkörper die zwei- bis dreistrahlige Ausläufer aufweisen. Außerdem können sich auch kleinvolumige Zellen in der Zellpopulation befinden werden, die sich nur in der Größe von den bereits beschriebenen Zellarten unterscheiden.

3.2.1.2 Charakterisierung von Glioblastomzelllinien anhand des Nachweises der Expression und der Immunfluoreszenzfärbung von Markerproteinen

In diesem Abschnitt sollten Glioblastomzelllinien anhand der Expression von spezifischen Genen unterschieden und charakterisiert werden. Es wurden dabei solche Gene untersucht, für die bekannt war, dass diese von neuronalen Stammzellen oder von bereits differenzierten Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs exprimiert werden. Diese spezifischen Gene werden im Folgenden als Markergene bezeichnet.

Für die Charakterisierung anhand der Expression von Markergenen wurden sechs verschiedene Zelllinien verwendet, die, mit Ausnahme der Zelllinien TX3095 und TX3868, aus Glioblastombiopsien etabliert wurden. Die Versuchsanordnung mit den beiden Zelllinien TX3095 und TX3868 sollte nachweisen, ob das Xenograft-Modell Veränderungen innerhalb der Expression der eingesetzten Markergene hervorgerufen hat.

Eine neurale Stammzelle wird durch die Expression von Nestin und CD133 determiniert, eine späte Progenitorzelle hingegen durch die Expression des Gens CD34. Der Nachweis eines Anstiegs der Expression der Markergene CD133 und Nestin würde somit bedeuten, dass die Passagierung der Primärkultur durch die Nacktmaus eine Anreicherung neuronaler Stammzellen zur Folge hatte. Jedoch ist auch ein gegenteiliger Effekt, also ein Weiter- oder Ausdifferenzierung von Stamm- bzw. Progenitorzellen, denkbar. Dieser Effekt wäre gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression des astrozytären Markers GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) bzw. der neuronalen Marker MAP-2 (*microtubule-associated protein-2*) oder β -Tubulin III.

Neben der Analyse der Expression von Markergenen stehen für die Charakterisierung von Zellen noch weitere Methoden zur Verfügung. So können diese auch mittels Immunfluoreszenzen unterschieden werden. Dies wird hier exemplarisch für die Gene Nestin, CD133, CD34, GFAP, MAP-2 und β -Tubulin III gezeigt. Der Nachweis der Immunfärbungen wurde hier indirekt geführt. Als sekundäre Antikörper dienten Alexa Fluor 488 (grün) bzw. Alexa

Fluor 594 (rot). In allen Fällen wurde eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (blau) durchgeführt. Bei den Antikörpern CD133 und CD34 werden Epitope auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die weiteren Antikörper hingegen detektieren intrazelluläre Strukturen.

Die in den Tabellen dargestellten Daten innerhalb jeder Messreihe wurden mit Hilfe unterschiedlicher Zellpopulationen ermittelt.

Tab. 3.3: Ergebnisse der durchflusszimetrischen Messungen der Expression der untersuchten Gene in der Glioblastomzelllinie T3095.

Zelllinie Marker-Gen	T3095					
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Nestin	98,99	98,01	70,64	97,90	95,74	
CD133	0,29	0,38	0,30	0	0,06	0,14
CD34	0,34	0,08				
GFAP	6,26	6,56	10,44	16,68		
BDNF	2,10	0,46				
MAP-2	0	0,36				
β -Tubulin III	12,72	15,72				
Tyrosin Hydroxylase	3,30	0,56				
Ki67	0	0				
Vimentin	96,28	98,00				

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

Die Tabelle gibt einen Überblick über das Expressionsmuster der eingesetzten Markergene in der Zelllinie T3095.

Für Nestin wurde mit Ausnahme einer Messung (70,64 %) jeweils ein Anteil an über 95 % positiver Zellen nachgewiesen. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass nahezu jede Zelle in den vorliegenden Zellpopulationen positiv für den Marker Nestin war.

Ein gegenteiliges Muster konnte für die Marker CD133 und CD34 gemessen werden. Hier lag bei jeder der durchgeführten Messungen der Anteil an positiven Zellen unterhalb 1 %. Dies führt zu dem Schluss, dass in dieser Glioblastom-zelllinie nur ein sehr geringfügiger Anteil an neuronalen Stamm- bzw. Progenitor-zellen vorhanden ist.

Im Gegensatz hierzu konnte für GFAP, dem Marker glialer Zellen, mindestens ein Anteil von über 6 % detektiert werden. Im Verlauf der Kultivierung wuchs

der Anteil dieser Zellen bis auf einen Wert von 16,68 % glial determinierter Zellen.

Etablierte neuronale Zellen die mit Hilfe des Markers MAP-2 detektiert wurden, konnten nur in einem der Fälle nachgewiesen werden. Jedoch lag mit 0,36 % der Anteil dieser Zellen nahe der Nachweisgrenze. Bei den beiden Messungen für β -Tubulin III konnten im Durchschnitt 14,22 % an frühen neuronalen Zellen gemessen werden.

Bei den zur Analyse eingesetzten Zellpopulationen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Proliferation der Zellen (Ki67) nachgewiesen werden.

Tab. 3.4: Darstellung der Resultate der durchflusszymetrischen Messungen der Expression der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie TX3095.

Zelllinie Marker-Gen	TX3095						
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6	Messung 7
Nestin	99,00	92,30	92,44	83,52	97,38	82,80	92,08
CD133	0,56	0,02	0	0	0	0	
CD34	0,48	0					
GFAP	3,28	6,46	0,68	2,86	0,46		
BDNF	1,72	0	0,02				
MAP-2	3,48	3,26	2,48				
β -Tubulin III	18,18	13,00					
Tyrosin Hydroxylase	0,92	3,10	1,08				
Ki67	0	13,60					
Vimentin	98,36	96,90	95,16				

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

In der Zelllinie TX3095 konnte eine durchschnittliche Genexpression für Nestin von 91,36 % gemessen werden. Im Gegensatz zur Zelllinie T3095 kam es hier zu größeren Schwankungen innerhalb der Messungen. So wurden Anteile an Nestin-positiven Zellen von ca. 83 % bis zu einem Wert von 99 % nachgewiesen. Im Durchschnitt konnten hier jedoch ähnlich hohe Anteile an Zellen detektiert werden, die das Protein Nestin exprimieren, als im Vergleich zur Zelllinie T3095.

Bei der Analyse der Expressionswerte zu den Genen CD133 und CD34 in den TX3095-Zellen zeigte sich ein Muster, ähnlich dem in den T3095-Zellen. Hier wurden konstant Werte unterhalb 1 % positiver Zellen detektiert, was in ähnlichem Maße den Werten dieser Gene in der Zelllinie T3095 entspricht.

Ein hierzu gegensätzliches Bild zeigt sich bei der Analyse der Anteile an glialen Zellen innerhalb der untersuchten TX3095-Zellpopulationen. Hier konnte nur

bei einer Messung (6,46 %) ein Prozentsatz an GFAP-positiven Zellen gemessen werden, der in der Höhe den Anteilen an positiven Zellen in den T3095-Populationen entspricht. Hier lagen die Werte zwischen 6,26 % und 16,68 % (s. Tabelle 3.3). Die weiteren Messdaten ergaben zwischen 0,5 % und etwa 3 % positiver Zellen für GFAP in den TX3095-Zellen. Somit könnte hier eine durch die Mauspassagierung bedingte Änderung des Anteils an glialen Zellen vorliegen, da hier im Durchschnitt weniger gliale Zellen nachgewiesen werden konnten.

Der Anteil an MAP-2-positiven Zellen konnte in jeder untersuchten Zellpopulation auf Werte zwischen 2,5 % und 3,5 % bestimmt werden. Im Vergleich zur Primärzelllinie entspricht dies einem deutlichen Anstieg an späten Neuronen. Hier konnte lediglich in einem der durchgeführten Messungen ein sehr geringer Anteil an MAP-2-positiven Zellen (0,36 %) nachgewiesen werden. Für das Gen β -Tubulin III konnte der Anteil an positiven Zellen in der Zelllinie TX3095 auf 13 % bzw. 18 % definiert werden. In der Primärkultur dieser Zelllinie, T3095, lagen diese Werte bei etwa 13 % bzw. 16 %, was einem ähnlichen Niveau früher neuronaler Zellen entspricht.

Es lässt sich somit feststellen, dass es aufgrund der Mauspassagierung der Primärkultur T3095, zu Veränderungen innerhalb des Expressionsmusters einzelner Markergene in der Glioblastomzelllinie TX3095, kam.

Tab. 3.5: Darstellung des Expressionsmuster der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie T3868. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer.

Marker-Gen \ Zelllinie	T 3868				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
Nestin	98,04	95,02	96,72	94,50	97,06
CD133	0	0,20	0	0	0
CD34	0	0	0		
GFAP	0,56	1,96	0	2,00	
BDNF	0,70	0	1,46		
MAP-2	0	0,18			
β -Tubulin III	4,22	1,56	1,02		
Tyrosin Hydroxylase	1,62	0	0		
Ki67	33,68	0,86			
Vimentin	99,58	98,96	98,50		

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

Bei der Zelllinie T3868 konnte bei jeder Messung in mindestens 94 % der untersuchten Zellen eine Nestinexpression festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wurden bei lediglich einer von fünf Messungen, mit 0,20 %, eine Expression des Markers für frühe Stamm- und Progenitorzellen (CD133) detektiert. Ein ähnliches Muster zeigte sich bei der Messung der CD34-positiven Zellen. Hier konnte in keiner der verwendeten Zellpopulationen die Expression dieses Markers für unreife Progenitorzellen nachgewiesen werden.

Für das Markergen MAP-2, welches späte neurale Zellen kennzeichnet, wurden drei Messungen durchgeführt. Es konnte kein eindeutiger Hinweis darauf gefunden werden, dass sich innerhalb der Zeitspanne der Kultivierung der Anteil an frühen neuronalen Zellen der verloren ging, in der Zellpopulationen der späten neuronalen Zellen wieder findet. So wurde bei den Messwerten zu MAP-2 jeweils weniger als 1 % positiver Zellen gemessen.

Innerhalb der drei Messungen für β -Tubulin III konnten Anteile zwischen ca. 1 % und 4 % früher neuraler Zellen gemessen werden. Da es sich bei den hier gemessenen Zellen um eine fortwährend kultivierte Zellpopulation handelte, könnten die hier gewonnen Daten einen Hinweis darauf geben, dass mit zunehmender Dauer der Kultivierung der Gehalt an frühen neuronalen Zellen abnimmt.

Tab. 3.6: Darstellung der Messungen der Expression der untersuchten Markergene in der Glioblastomzelllinie TX3868.

Zelllinie Marker-Gen	TX 3868						
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6	Messung 7
Nestin	99,17	88,62	96,30	94,20	93,72	97,74	99,16
CD133	0	0	0,20	0,14	0	0	0,06
CD34	0	0,44	0				
GFAP	1,88	1,04	0,90	1,30	11,22		
BDNF	0,64	0					
MAP-2	0,06	0,66					
β -Tubulin III	1,24	9,64					
Tyrosin Hydroxylase	0,22	0	1,98				
Ki67	31,20	15,44					
Vimentin	99,36	98,20	98,86				

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

Die Messungen der Nestinexpression spiegeln, mit Ausnahme eines Messwertes (88,62 %), jeweils Werte wider, die in der Höhe den Expressionswerten in den untersuchten T3868-Zellen entsprachen. So konnten

zwischen etwa 89 % und etwa 99 % positiver Zellen für Nestin in den untersuchten Zellpopulationen detektiert werden. Ähnliches gilt auch für das Markergen CD133. Bei der Mehrzahl der Messungen konnte keine CD133-Expression ermittelt werden und weiterhin lag der höchste Anteil an positiven Zellen bei 0,20 %, was exakt dem Höchstwert der CD133-positiven Zellen in der Primärkultur (T3868) entspricht.

Bei den Messungen zu den Anteilen an Zellen glialen Ursprungs ließ sich ein Anteil an positiven Zellen nachweisen, der zwischen etwa 1 % und 2 % lag. Dies stimmt in etwa mit den in den T3868-Zellen gewonnenen Daten zur Expression des Gens GFAP überein.

Ein ähnliches Bild konnte für das Expressionsmuster des späten neuronalen Markers MAP-2 nachgewiesen werden. Hier wurde bei zwei Messungen Werte unterhalb 1 % positiver Zellen ermittelt.

Bei den Messungen zur β -Tubulin III-Expression wurden zwei Werte ermittelt, die sich in der Höhe sehr unterschieden. Daher lässt sich an dieser Stelle keine eindeutige Aussage bzgl. der Anteile an frühen neuronalen Zellen in den TX3868-Zellen treffen.

Somit spiegeln die aus der Zelllinie TX3868 gewonnenen Messergebnisse ein ähnliches Expressionsmuster der untersuchten Gene wider, wie sie in der Zelllinie T3868 gemessen werden konnten. Dies steht im Gegensatz zu den Zelllinien T3095 bzw. TX3095.

Tab. 3. 7: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Messwerte der Expression der untersuchten Gene in der Glioblastomzelllinie H346.

Zelllinie Marker-Gen	H 346						
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6	Messung 7
Nestin	91,63	84,26	95,14	95,76	81,96	85,43	
CD133	0,94	0	0	0	0	0,10	1,34
CD34	0	0	0,43				
GFAP	0,88	0,20	1,72	9,28			
BDNF	1,52	1,12	0,62				
MAP-2	1,00	1,54	3,52				
β -Tubulin III	2,22	25,20	6,08				
Tyrosin Hydroxylase	0,26	0,10	0,52				
Ki67	0	6,79					
Vimentin	96,30	98,14	94,60				

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

In der Zelllinie H346 wurden für Nestin im Durchschnitt ca. 89 % positive Zellen gemessen. Das hier vorherrschende Expressionsmuster ist bei den weiteren hier untersuchten Zellen nicht zu finden. Außerdem weist die Zelllinie H346 im Durchschnitt den geringsten Anteil an Nestin-positiven Zellen auf.

Für den Marker neuronaler Stammzellen (CD133) konnte bei der Mehrzahl der Messungen keine Expression dieses Gens ermittelt werden. Im Übrigen konnte bei zwei der durchgeführten Messungen auf etwa 1 % der Zellen die Expression dieses Markergens nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Messung lag dieser Wert nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze (0,10 %).

Das Expressionsmuster des Markers CD133 entspricht in weiten Teilen dem Bild der CD34-Expression innerhalb der hier untersuchten Zellpopulationen. So konnte hier gleichfalls nur bei einer von drei Messungen eine Expression dieses Gens detektiert werden, die wiederum nur im geringen Maße nachweisbar war (0,43 %).

Bei den Markern GFAP bzw. β -Tubulin III konnten zwischen 0,20 % und ca. 2 % glialer Zellen (GFAP) innerhalb der untersuchten Zellpopulationen gemessen werden.

Im Gegensatz hierzu lag der Anteil früher neuronaler Zellen (β -Tubulin III) zwischen etwa 2 % und 6 %, der Anteil an späten neuronalen Zellen (MAP-2) hingegen zwischen 1 % und etwa 4%.

Proliferierende Zellen konnten nur bei einer Messung nachgewiesen werden, der Anteil an diesen Ki67-positiven Zellen wurde dabei auf etwa 7 % bestimmt.

Tab. 3.8: Aufstellung der durchflusszytometrischen Messdaten der Expression der Markergene in der Glioblastomzelllinie T6217.

Marker-Gen	Zelllinie	T 6217		
		Messung 1	Messung 2	Messung 3
Nestin		95,19	88,31	96,43
CD133		0	0,14	0,06
CD34		0,12	0,13	
GFAP		3,88	10,69	
BDNF		0	0,90	
MAP-2		0	0,29	
β -Tubulin III		0	4,89	
Tyrosin Hydroxylase		0	1,18	
Ki67		0	2,46	
Vimentin		77,56	97,46	

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

In der Zelllinie T6217 konnte der Anteil an positiven Zellen für Nestin auf Werte zwischen 88 % und 96 % bestimmt werden. Somit gleicht dieses Expressions-muster den Werten der Nestinexpression in den TX3095-Zellen.

Für CD133 konnte nur bei zwei von drei Messungen eine Expression dieses Gens nachgewiesen werden. Diese Werte wiederum wiesen dabei auf einen sehr geringen Anteil an positiven Zellen innerhalb der untersuchten Zellpopulationen hin (0,06 % bzw. 0,14 %).

Für den glialen Marker GFAP konnte bei beiden Messungen eine Expression dieses Gens detektiert und der Anteil an Zellen, die positiv für diesen Marker waren, auf Werte zwischen ca. 4 % und etwa 11 % determiniert werden.

Bei einer Messung für das Gen Ki67 wurde ein Anteil von 2,46 % proliferierender Zellen festgestellt, während der Anteil an frühen neuronalen Zellen auf einen Wert von etwa 5 % bestimmt werden konnte.

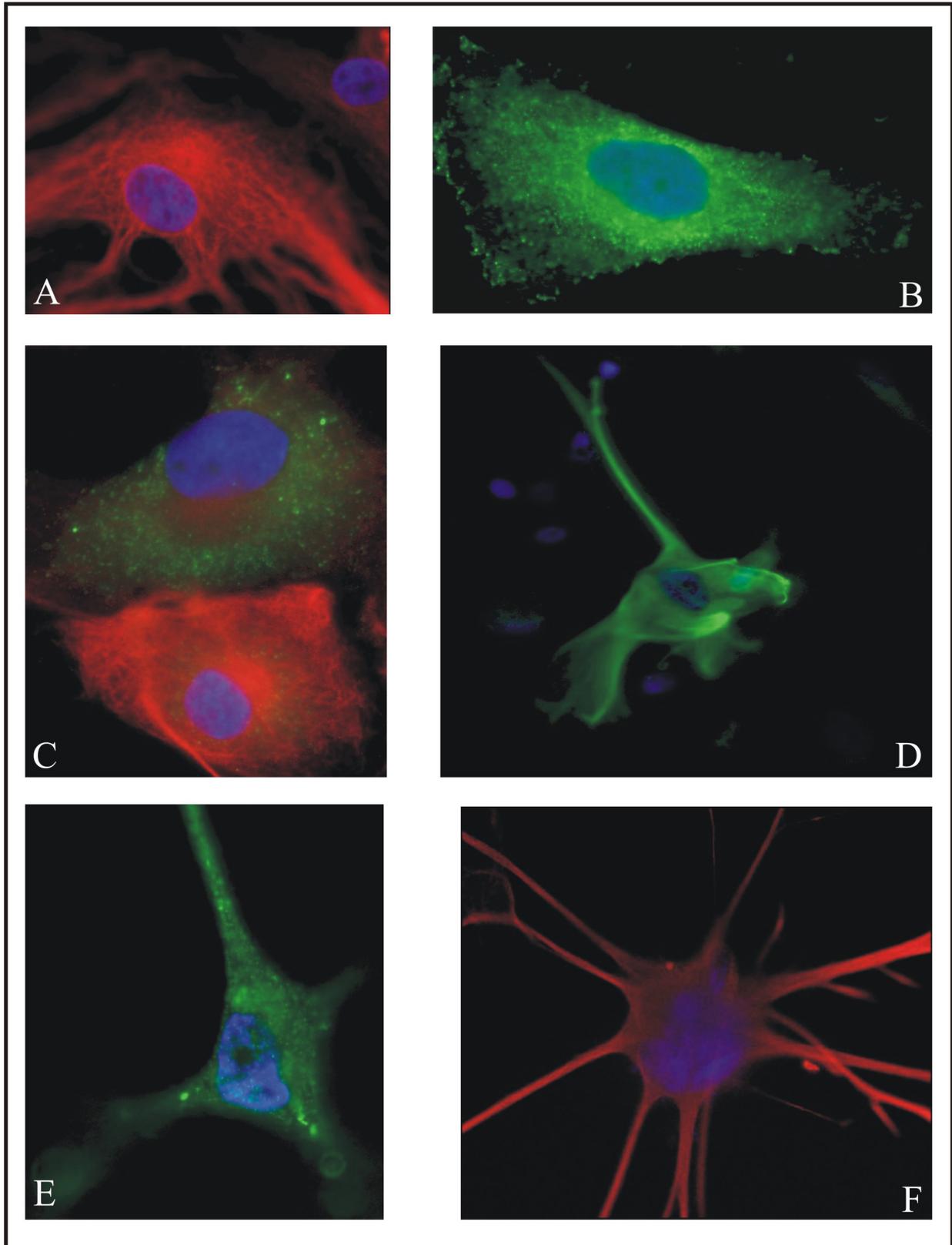


Abb. 3.15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Immunfärbungen der untersuchten Markergene Nestin (A), CD133 (B), CD34 (C), GFAP (D), MAP2 (E) und β -Tubulin-III (F) in den Zelllinien T3868 (B), T6217 (F), T6432 (A, C und E) und T6433 (D); rot: Alexa Fluor 594, grün: Alexa Fluor 488, blau: Kernfärbung mit DAPI, Vergrößerung 630-fach

Abbildung 3.15 zeigt den Nachweis verschiedener Markergene mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Färbungen.

Die in Teilbild A dargestellte Zelllinie T6432 zeigt die netzartige Struktur, die den Filamentproteinen als Stützskelett der Zellen zu Eigen ist. Sie zeichnet sich innerhalb der kompletten Zellfläche als dünne linienförmige Formation ab, die das Volumen des Kerns (blau) ausspart bzw. umschließt.

Bei der Analyse der CD133-Expression in der Zelllinie T3868 (B) konnte sowohl auf der Zelloberfläche, als auch auf von Teilen des Zytoplasmas eine deutliche Färbung nachgewiesen werden. Dabei konnte für die intrazelluläre Anfärbung eine höhere Intensität detektiert werden, als auf der Zelloberfläche. Zudem erschien die Färbung durch den Antikörper als körnig. Jedoch zeigte sich hier auch, dass die Färbung der CD133-positiven Zellen, die komplette Oberfläche der Zelle umfasste.

Analog zur CD133-Markierung kam es beim Nachweis von CD34 zu Anfärbungen innerhalb des Zytoplasmas der ausgesuchten Zellen, wenngleich die unspezifische Färbung hier in einem geringeren Maße ausfiel als bei den CD133-positiven Zellen. Im Fall der Analyse der T6432-Zellen (C) wurde neben CD34 auch ein Nestin-Antikörper für eine indirekte Doppelfärbung eingesetzt. Hier zeigte sich zum einen eine Zelle, die eine positive Expression für Nestin, aber keine Expression für CD34 aufwies (Nestin⁺/CD34⁻, unten), zum anderen konnte auch eine Zelle mit den gegenteiligen Markereigenschaften (Nestin⁻/CD34⁺, oben) nachgewiesen werden. Die Nestinfärbung (rot) stellte sich dabei in ihrer charakteristischen filamentartigen Struktur dar. Beim Nachweis mittels CD34 wurde neben der Zelloberfläche ein Raum um den Zellkern ausgespart. Dies könnte auf eine intrazelluläre Färbung hindeuten, die jedoch das Zytoplasma nicht in ihrer Gesamtheit anfärbte.

Gliale Strukturen wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFAP (D) nachgewiesen. Bei der T6433-Population deutete sich eine räumliche Struktur der angefärbten Zelle an, wobei der lanzettförmige Charakter dieser Zelllinie offensichtlich wurde. Weiterhin sind in dem Teilbild mehrere Zellen dargestellt, bei denen deutlich keine GFAP-Expression nachgewiesen werden konnte. Somit ist die Spezifität dieser Färbung als sehr hoch anzusehen.

Der Nachweis später neuraler Zellen wurde mittels durch den Antikörper MAP-2 geführt, der eine geringer Spezifität aufwies, als der Antikörper gegen GFAP. Auch hier (E) zeigte die Färbung die Größe der zu detektieren Zelle an. Die MAP-2 positiven Zellen stellten sich in der Zelllinie T6432 meist als sternförmig dar.

Für die Untersuchung zum Nachweis von frühen neuralen Zellen innerhalb der T6217-Zellpopulationen wurde ein Antikörper gegen β -Tubulin III eingesetzt (F). Es zeigte sich eine hohe Spezifität der Antikörperbindung, welche die neurale Struktur einer Verästelung an den Zellauswüchsen dieser Zellen klar darstellte. Weiterhin konnte eine Zellanhäufung von mindestens sechs Zellen identifiziert werden (blaue Zellkernfärbung).

3.2.2 Identifizierung der neuralen Tumorstammzelle in den Glioblastomzelllinien T6433 und TX3868 mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren

Jeder Stammzellart ist die Expression von charakteristischen Genen bzw. Genkombinationen zu Eigen. So identifiziert die gleichzeitige Expression der Gene Nestin und CD133 sowohl die gesunden neuralen Stamm- und Progenitorzellen, als auch deren maligne Vertreter, die tumorösen Stamm- und Progenitorzellen.

Der gleichzeitige Nachweis der Expression von CD133 (extrazellulär) und Nestin (intrazellulär) ist aufgrund der notwendigen Methoden zum Nachweis der beiden Antigene sehr diffizil. Neben der Co-Expression von CD133 und Nestin (Corti et al., 2007) wurde eine positive Nestinexpression im Durchschnitt in über 90 % der getesteten Glioblastomzellen nachgewiesen. Daher wird als indirekter Nachweis für neurale Stammzellen das Vorhandensein einer CD133-Expression angesehen (Li et al., 2006; Salmaggi et al., 2006; Zhang et al., 2006; Ma et al., 2007; Pfenninger et al., 2007; Singh & Dirks, 2007).

In diesem Teil der Arbeit sollten verschiedene Methoden zum Nachweis dieser Zellen Anwendung finden. Hierzu wurden verschiedene Glioblastomzelllinien (T6432, T6433 und TX3868) auf die Existenz von doppelt-positiven Zellen für Nestin und CD133 hin untersucht.

Für die Zelllinie T6432, die aus einer Biopsie eines Glioblastoms neu etabliert wurde, konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen eine gleichzeitige Expression der beiden Stammzellmarker nachgewiesen werden.

Gleichfalls wurden Zellen als neue Linie T6433 etabliert. Hierbei wurden ein Ansatz in normalem Kulturmedium und zwei Ansätze in Medien etabliert, die einer möglichen Differenzierung vorhandener Stammzellen entgegenwirken sollten. Ferner sollte der Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen (s. Material & Methoden) auf den Status der neuralen Stammzellen überprüft werden.

Neben den bereits erwähnten Zelllinien sollten auch TX3868-Zellen auf die Existenz von neuralen Stamm- und Progenitorzellen hin untersucht werden. Als

Xenograft der Zelllinie T3868 repräsentiert diese Linie den Beweis für die Existenz von Stamm- bzw. Progenitorzellen in ihrer Primärkultur. Daher sollten diese speziellen Zellen nun auch innerhalb dieser Zelllinie identifiziert und charakterisiert werden.

Die weitergehende Analyse der neuralen Stammzellen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), unter Verwendung eines Durchflusszytometers, durchgeführt. Hierbei sollte u.a. geklärt werden, ob neurale Tumorstammzellen von der übrigen Zellpopulation abweichende charakteristische Merkmale, in Bezug auf Größe und Granulierung, aufweisen.

3.2.2.1 Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbungen

In diesem Teil der Arbeit sollte der Nachweis der neuralen Tumorstammzellen mit Hilfe von Antikörpernachweisen geführt werden. Hierzu wurden spezielle Antikörper ausgewählt, die unter den notwendigen Fixierungsbedingungen sowohl intra- als auch extrazelluläre Strukturen nachweisen konnten. Somit war es möglich spezifisch das Vorkommen neuraler Tumorstammzellen innerhalb der Zelllinien T6432 und T6433 nachzuweisen.

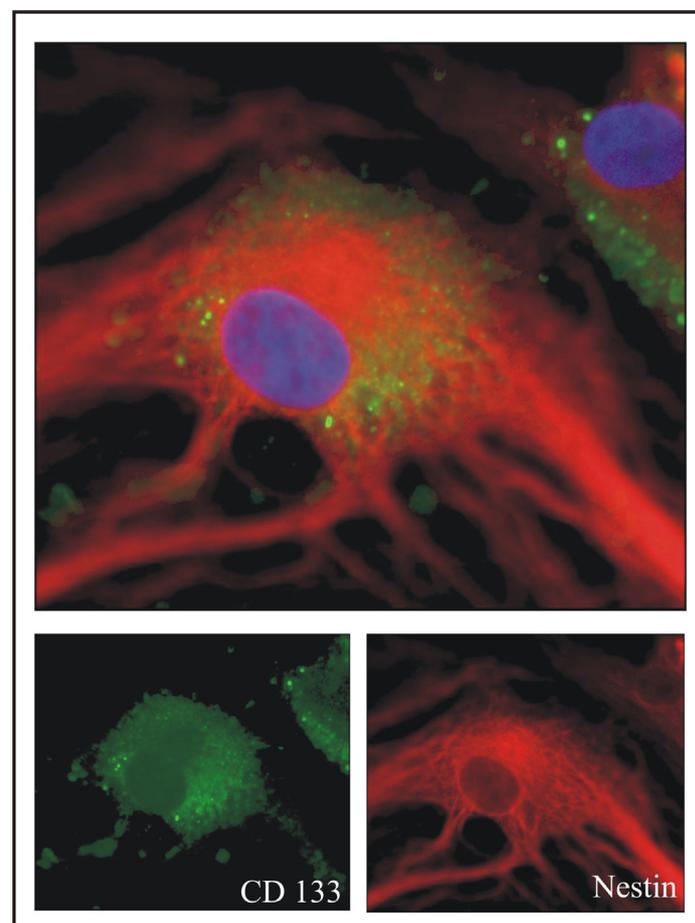


Abb. 3.16: Nachweis von neuralen Tumorstammzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von T6432-Zellen.

Hierbei zeigt sich eine starke Färbung für Nestin und eine im Vergleich hierzu schwächere Färbung für CD133; grün: CD133, rot: Nestin, Kerngegenfärbung mittels DAPI (blau), Vergrößerung 630-fach

Bei der Zelllinie T6432 wurden Zellen nachgewiesen, die sowohl für Nestin, als auch CD133 eine positive Expression aufwiesen. Hierbei zeigte sich für Nestin eine sehr starke Intensität, die hingegen für CD133 im Vergleich hierzu schwächer ausfiel. Da es sich bei der fotografierten Zelle um ein

dreidimensionales Gebilde handelt, musste, um eine ausreichend starke CD133-Färbung nachweisen zu können, die als scharf dargestellte Ebene auf die grüne Fluoreszenz eingestellt werden. Da CD133 ein extrazelluläres Protein darstellt und gleichzeitig Nestin als Filamentprotein in der Zelle angesiedelt ist, bedingt diese Aufnahme eine unscharfe Darstellung der roten Nestinfärbung. Gleichzeitig stellt dies auch den Grund für die Variabilität in der scheinbaren Größe der Zelle dar, die durch die Farben rot (Nestin) und grün (CD133) repräsentiert werden. So werden aufgrund der schwachen grünen Intensität lediglich wenige Zellebenen dargestellt, während aufgrund der sehr starken roten Fluoreszenz der gesamte Zellkörper, wenn auch unscharf, wahrgenommen werden kann.

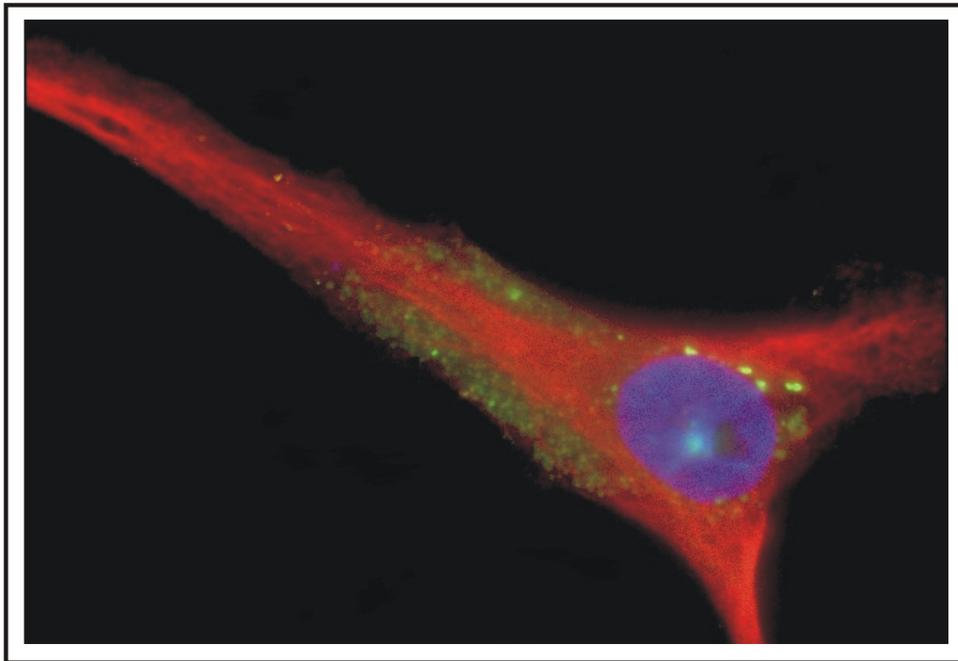


Abb. 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer neuralen T6433-Tumorstammzelle
Auch hier zeigt sich eine starke Färbung für Nestin und eine schwächere Färbung für CD133; grün: CD133, rot: Nestin, Kerngegenfärbung mittels DAPI (blau), Vergrößerung 630-fach

Die Anzahl an Zellen, die in der Zellpopulation der T6433-Zellen sowohl positiv für das Protein Nestin, als auch CD133 waren, war im Vergleich zur Zelllinie T6432, höher. Es wurden hier lanzettförmige Zellen nachgewiesen, die ähnlich den T6432-Zellen eine relativ schwache CD133-Fluoreszenz aufwiesen. Ebenso wurde hier eine starke Intensität von Nestin nachgewiesen, die jedoch im Vergleich zur Zelllinie T6432 hier schwächer erschien. Die Fluoreszenz für

CD133 war hier lediglich auf den länglichen, lanzettförmigen Teil der Zelle begrenzt. Allerdings ließ sich die extrazelluläre Charakteristik der CD133-Expression erkennen.

3.2.2.2 Nachweis mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Stärke der CD133-Expression wurden verschiedene Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Einstellung der Größe (FSC, *forward scatter*) und Granularität (SSC, *side-scatter*) erfolgte so, dass die analysierten Zellen im Dot plot relativ zentral erschienen. Je nach Größe und Strukturen im Inneren einer Zelle, wird das auf sie treffende Licht an ihr gestreut. Dieses Streulicht kann mittels FSC und SSC gemessen werden. Das „Vorwärtsstreulicht“, also der FSC, ist abhängig von der Größe einer Zelle, kleine Zellen verursachen somit eine geringe Vorwärtsstreuung. Der SSC, also die Angabe des „Seitwärtsstreulichtes“, ist neben der Größe der Zelle hauptsächlich vom Inhalt der Zelle abhängig. Finden sich in der Zelle z.B. sehr viele Lysosomen, so entsteht ein hohes Seitwärtsstreulicht.

Die Zellen wurden mit einem fluorochromgelabelten CD133-spezifischen Antikörper gefärbt. Zur Analyse von ausschließlich vitalen Zellen wurde ein begrenzender Bereich, das Gate, so erstellt, dass die enthaltenen Zellen einen mittleren Wert, sowohl im FSC, als auch im SSC aufwiesen. Somit wurden tote Zellen, die neben einer geringen Größe (FSC) auch eine geringe Granularität aufweisen, ausgeschlossen. Die hierdurch separierten Zellen wurden im Anschluss in ein zweites Diagramm implementiert. In diesem Diagramm wurden die jeweilige Zellgröße in Abhängigkeit zur vorliegenden Fluoreszenz (hier: FL2 = rot) aufgetragen. Zur Analyse der CD133-Expression innerhalb der Zielzellen wurde mit Hilfe einer Antikörperkontrolle ein Schwellenwert für die CD133-Expression erstellt. Alle Zellen für die in der Fluoreszenz ein höherer Wert gemessen wurde, können somit als CD133-positiv angesehen werden.

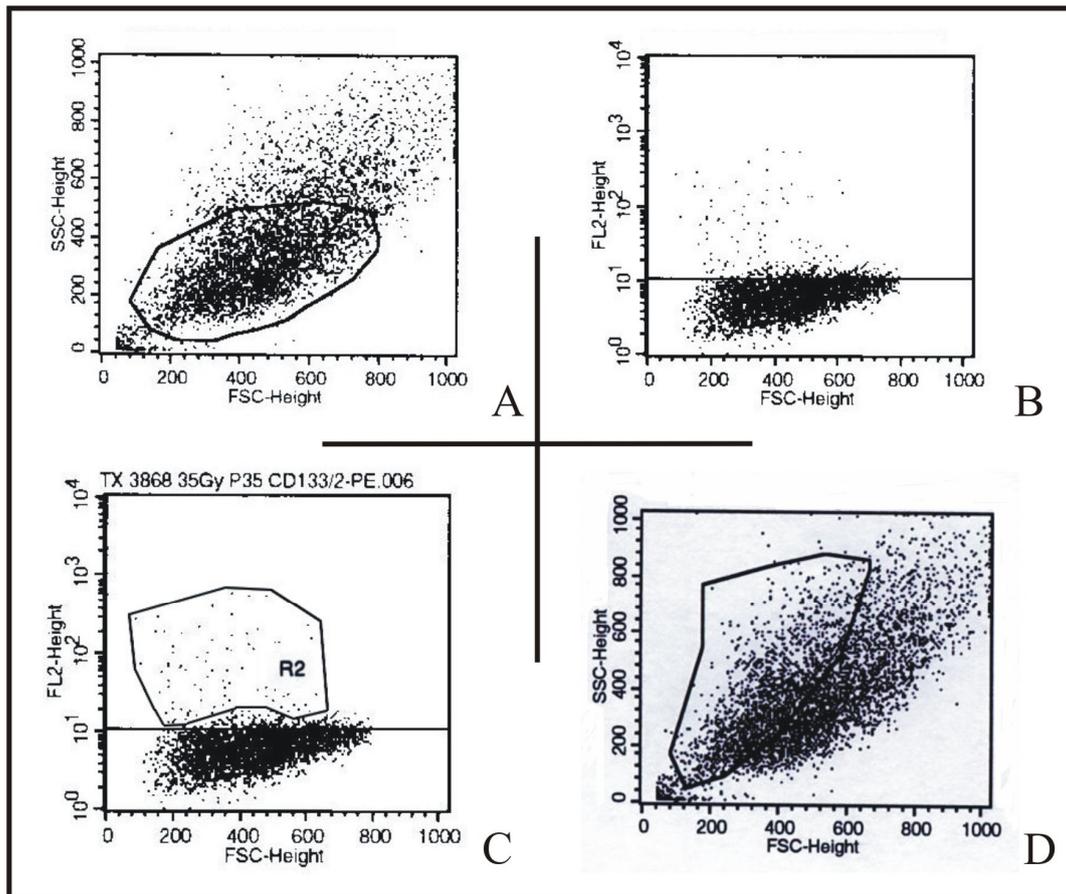


Abb. 3.18: Identifizierung der CD133-positiven Tumorzellen innerhalb der zu untersuchenden Zellpopulationen. **A:** Darstellung der analysierten Zellen anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC), Eingrenzung der Hauptlebenspopulation anhand eines Gates; **B:** Die separierten Zellen werden in Abhängigkeit ihrer Größe und Intensität ihrer CD133-Fluoreszenz aufgetragen, **C:** die CD133-positiven Zellen werden neu eingegrenzt (R2) und können so in der Ursprungspopulation eingefärbt und anhand eines neuen Gates innerhalb der Gesamtzellpopulation identifiziert werden. Es zeigt sich, dass diese Zellen maximal eine mittlere Größe aufweisen, die Granularität jedoch auch hohe Werte aufweisen können (**D**).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Frage nach spezifischen Charakteristika von neuronalen Tumorstammzellen. Anhand der Durchflusszytometrie bei TX3868-Zellen konnten hierzu Antworten gefunden werden. So lassen sich die CD133-positiven Zellen im DotBlot indirekt identifizieren (s. Abb. 3.18). Hierzu wurden zuerst die CD133-positiven Zellen anhand ihrer Fluoreszenzintensität und Größe in einem Diagramm aufgetragen (s. Abb. 3.18, B) und mit Hilfe eines weiteren Gates eingegrenzt (s. Abb. 3.218, C). Die hier enthaltenen neuronalen Tumorstammzellen können nun im Ursprungsgate (s. Abb. 3.18, A), in dem die bereits untersuchte Zellpopulation anhand der Größe und Granularität charakterisiert vorliegt, identifiziert werden. Als nächster Schritt wurden schließlich nur die Zellen im Ursprungsgate dargestellt, die CD133-positiv waren, um anhand eines neuen Eingrenzungsgates die CD133-Population

innerhalb der Ausgangspopulation darstellen zu können (s. Abb. 3.18, D). Hierdurch gelang eine Merkmalsfestlegung der neuronalen Tumorstammzellen, anhand der ihnen eigenen Größe und Granularität.

Mit Hilfe dieser Methode zur Analyse der Größe und Granularität der neuronalen Tumorstammzellen, konnten in weiteren Glioblastomzelllinien die bei TX3868-Zellen ermittelten Ergebnisse überprüft werden. Ziel war die Überprüfung, ob die im Durchflusszytometer beobachteten Charakteristika das generelle Bild einer neuronalen Tumorstammzelle darstellen und wenn dem so ist, ob sich diese Merkmale aufgrund der Behandlungen verändern. Hierzu wurden neben unbehandelten Zellen auch solche untersucht, die einer der Behandlungsformen unterzogen wurden. Diese umfassten neben der Bestrahlung auch die Induktion von Stammzellen als sogenannte Tumorsphäroide. Tumorsphäroide sind Sphäroidstrukturen, hier neuronalen Ursprungs (auch Neurosphäroide, NSP), in denen Stammzellen in Suspension wachsen. Die kugelartige Gestalt dieser Struktur weicht somit klar vom Einzellzellschichtwachstum der kultivierten Glioblastomzellen ab. So zeigte sich, dass sich aufgrund spezieller Kultivierungsbedingungen neurale Stammzellen unter Zellkulturbedingungen zu Tumorsphäroiden entwickeln (Moses et al., 2006; Hermann et al., 2006; Hung & Yang, 2006). Dies wird im Kapitel 3.2.3 näher betrachtet.

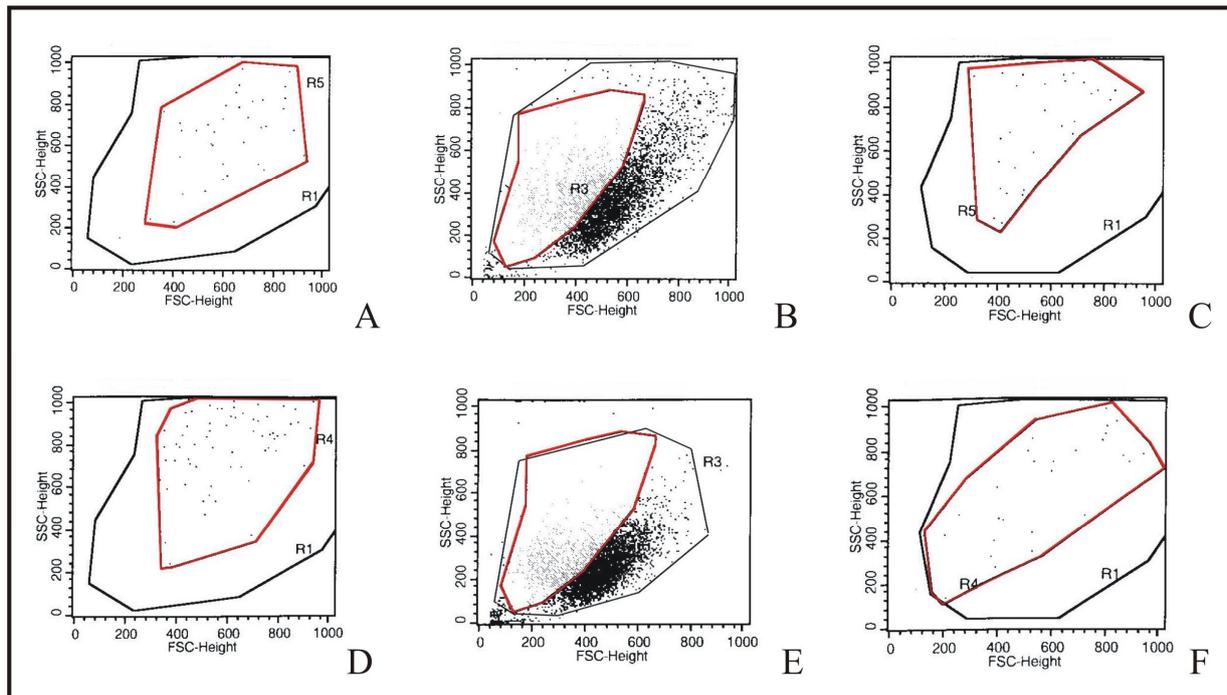


Abb. 3.19: Darstellung der CD133-positiven Zellpopulationen innerhalb der Gesamtlebendpopulationen von unbehandelten und bestrahlten TX3868-Zellen.

Die CD133-positiven Zellen stellen jeweils eine Subpopulation innerhalb der Gesamtlebendpopulation dar, die hauptsächlich eine mittlere Größe (FSC), jedoch sowohl geringe als auch hohe Granularität aufweist; In der ersten Zeile (A, B, C) sind die bestrahlten Zellen aufgetragen (A: 10 Gy, B: 35 Gy, C: 40 Gy), in der zweiten Zeile die zugehörigen parallel kultivierten und unbehandelten Kontrollen. Die Gesamtlebendpopulationen sind jeweils anhand eines schwarzen Gates dargestellt, die CD133-positiven Subpopulationen mit Hilfe eines rot-angefärbten Gates.

Bei der Auswertung der unbehandelten und bestrahlten TX3868-Zellen konnte kein genereller Unterschied innerhalb einzelnen CD133-positiven Subpopulationen festgestellt werden. So wurde für die hier analysierten Zellpopulationen im direkten Vergleich (A und D, B und E, C und F; bestrahlt und unbestrahlte Kontrolle) untereinander eine nahezu identische CD133-Population identifiziert. Diese kann anhand einer mittleren Größe (FSC) und einer geringen bis hohen Granularität typisiert werden. Es zeigt sich jedoch dass die Größe der CD133-positiven Zellpopulation aufgrund der Subkultivierung an Größe (FSC) variiert. Die in den Teilbildern A + B dargestellten Zellpopulationen befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse in Passage 17. Der Großteil der CD133-positiven Subpopulationen wies hier eine mittlere Größe (FSC 400 – 600) auf. Die Zellen in den Teilbildern B und E hingegen befanden sich in der Passagenzahl 40 bzw. 50. Hier konnten zusätzlich zu der Subpopulation mit mittlerer Größe (FSC 300 – 600) Zellen identifiziert werden die eine geringe Größe (FSC 100 – 300) aufwiesen. Ein vollkommen gegensätzliches Bild hierzu konnte bei den Teilbildern C (P43) und F (P53)

ermittelt werden. Hier stellte sich die Hauptpopulation der CD133-positiven Zellen wiederum mit einer mittleren Größe (FSC 300 – 600) dar, allerdings wurden auch viele sehr große Zellen (FSC 600 – 900) gefunden.

So kann zusammenfassend festgehalten werden, dass in den TX3868-Zellen der Hauptanteil der CD133-positiven Zellpopulation eine sehr variable Granularität bei einer mittleren Größe aufweist.

Mit Hilfe der Zelllinie T6433 sollten unter Vergleich unterschiedlicher Kulturbedingungen (Medien und NSP-Induktion) die Auswirkung auf die Darstellung der CD133-positiven Subpopulation in der Durchflusszytometrie untersucht werden.

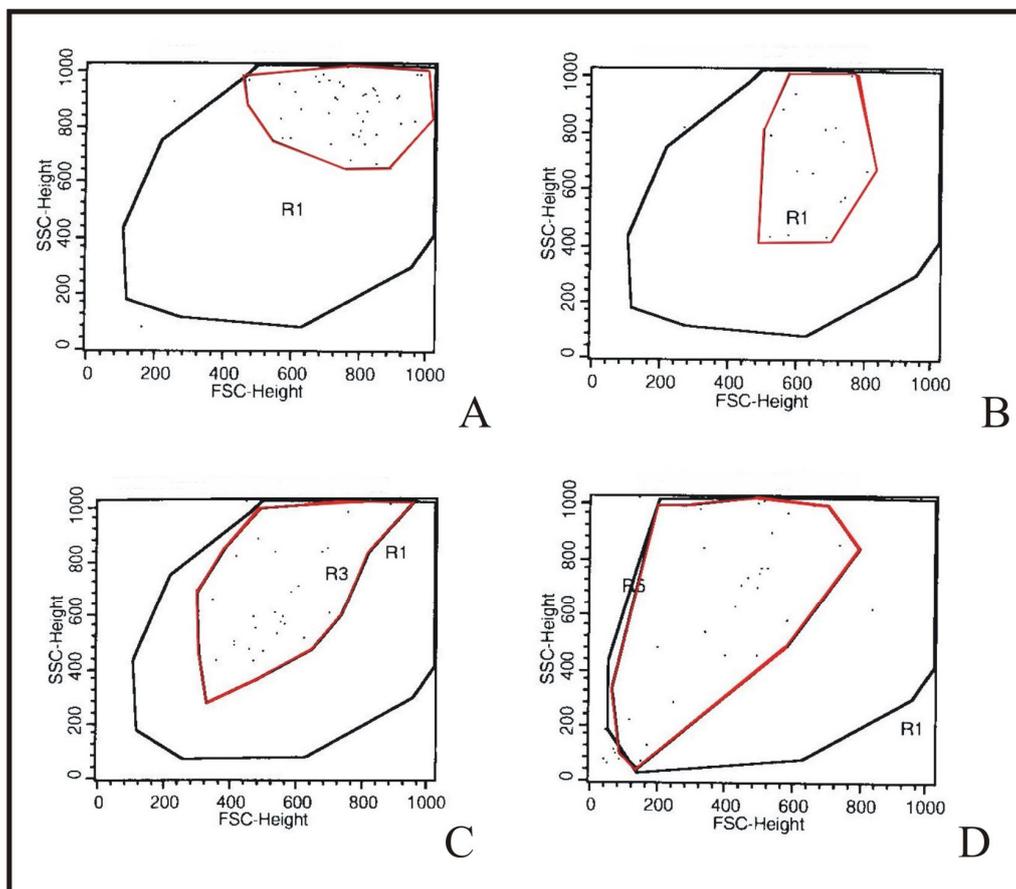


Abb. 3.20: CD133-positive Zellpopulationen innerhalb der Gesamtlebendpopulationen von unterschiedlich kultivierten T6433-Zellen.

Die normal kultivierten Zellen (A) sind durchweg sehr groß und weisen eine hohe Granularität auf. Die mit Stammzellmedium (+5 % Serum) etablierten Zellen (B) zeigen eine geringere mittlere Größe, die jedoch mit einer höheren Variabilität der Granularität der CD133-positiven Zellen einhergeht. Dieser Effekt etabliert sich nach Serumentzug (Zweck der Induktion von Tumorsphäroiden) (C), bis hin zu einer großen Variabilität bei Größe und Granularität innerhalb der induzierten Sphäroiden (D); Die Gesamtlebendpopulationen sind jeweils anhand eines schwarzen Gates dargestellt, die CD133-positiven Subpopulationen mit Hilfe eines rot-angefärbten Gates.

Die CD133-positiven Zellen stellten sich innerhalb der mit normalem Kulturmedium etablierten T6433-Zellen (s. Abb. 3.20 A) als Subpopulation mit hoher Größe (FSC 600 – 1.000) und ebenso starker Granularität (SSC 700 – 1.000) dar. Die gleiche Subpopulation in der mit Stammzellmedium (SCM) unter reduziertem Serumgehalt (5 %) etablierten T6433-Zellen (SCM 5 %, s. Abb. 3.20 B) wies sowohl Veränderung bezüglich der Größe als der Grad der Granularität auf. Hier konnten positive Zellen mit einer Größe im FSC von 500 - 800 detektiert werden. Diese Zellen (s. Abb. 3.20 C) wurden im weiteren Verlauf auch zur Induktion von Neurosphäroiden (NSP) verwendet. Um jedoch eine erfolgreiche Induktion der NSPs gewährleisten zu können, durfte das Stammzellmedium keine Anteile von Serum enthalten, da bestimmte Wachstumsfaktoren dies negativ beeinflussen und die Stammzellen differenzieren würden. Die mit diesem Medium (SCM 0 %) kultivierten Zellen wiesen ebenso eine Änderung der CD133-positiven Zellpopulation in der Durchflusszytometrie auf. Sowohl der Grad der Granularität als auch die Variabilität war einem *shift* unterlegen. Die mittlere Größe lag nun im FSC im Bereich von 400 bis 700, während für die Hauptpopulation im SSC Werte zwischen 400 und 900 aufwies. Dieser Trend zu einer noch größeren Variabilität setzte sich nach abgeschlossener Sphäroidbildung fort. In den als Sphäroide wachsenden Zellen (s. Abb. 3.20 D) wurden für die Hauptpopulation der Zellen im FSC Werte zwischen 200 und 600 gemessen, während die Granularität im SSC auf Werte von 300 bis 1.000 definiert werden konnte.

Für die T6433-Zellen kann festgehalten werden, dass die gezielte Kultivierung dieser Zellen mit dem Ziel der Stammzellinduktion zu einer großen Vielfalt in Bezug auf Größe und Granularität der CD133-positiven Zellen führt. Während diese Zellen unter normaler Kulturbedingung neben einer geringen Größe auch eine geringe Granularität aufweisen, konnte für die Sphäroid-Einzelzellen in den untersuchten T6433-Populationen die größte Variabilität bei geringster Größe und höchster Granularität der CD133-positiven Zellpopulation festgestellt werden.

3.2.3 Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen

Ein generelles Problem bei der Analyse von Stammzellen stellt sich bei der Kultivierung dieser Zellen. Neurale Tumorstammzellen neigen unter suboptimalen Bedingungen zum Verlust ihrer meist pluripotenten Fähigkeiten und zur Differenzierung in die verschiedenen Vorläuferzellen. Es kommt somit zur Entwicklung von Zellen mit glialer oder neuraler Prägung (Dirks et al., 2006). Daher war es wichtig neben Methoden zur Kultivierung dieser neuronalen Tumorstammzellen auch Verfahren zur Aufrechterhaltung des hochpotenten Status zu entwickeln. Zudem stellen die neuronalen Stammzellen eine sehr geringe Subpopulation (< 0,15 % der Zellmasse) innerhalb des Hirnvolumens dar (Singh et al., 2003 & 2004; Dirks et al., 2005; Lee et al., 2005; Li et al., 2006). Somit würde zur Untersuchung dieser speziellen Zellpopulation nur eine sehr geringe Menge an Zellen zur Verfügung stehen. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer Methode zur Anreicherung der neuronalen Tumorstammzellen.

3.2.3.1 Induktion und Anreicherung der neuronalen Tumorstammzellen in der Glioblastomzelllinie T6433 durch den Einsatz selektiver Medien

Die Etablierung einer Methode zur Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen wurde mit Hilfe der Zelllinie T6433 erreicht. Hierzu wurden Zellen einer Biopsieprobe eines Glioblastoms unter Anwendung verschiedener Kultivierungsbedingungen zu einem Einzellzellschichtverband (*monolayer*) herangezogen.

Dabei mussten Bedingungen entwickelt werden, unter denen zum einen Stammzellen angereichert werden können und zum anderen eine Differenzierung dieser angereicherten Zellen unterbunden wird. Im Serum sind Wachstumsfaktoren enthalten, die für eine Kultivierung normaler Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Allerdings lösen diese Faktoren eine Differenzierung neuraler Stammzellen aus. Daher erfolgte der Ersatz dieser Stoffe durch ein Supplement. Durch den weiteren Einsatz eines speziellen

Kultivierungsmediums (DMEM-F12) und der Verwendung der spezifischen Wachstumsfaktoren bFGF2 (*basic Fibroblast Growth Factor 2*) und EGF (*Epidermal Growth Factor*) konnte somit ein Protokoll erstellt werden, um die Problematik der Differenzierung der NSCs zu umgehen (Hemmati et al., 2003; Wang et al., 2006).

Es wurden dabei parallel drei Ansätze entwickelt, die sich einerseits von der Art des eingesetzten Kultivierungsmediums (Normal- und Stammzellmedium) unterschieden, andererseits in der Konzentration (0 %, 5 % und 10 %) des Anteils an fötalem Kälberserum variierten (s. Material & Methoden).

Da die Auswirkungen dieser komplexen Kultivierungsbedingungen auf den Phänotyp der Glioblastomzellen unbekannt waren, erfolgte eine detaillierte Charakterisierung der Etablierung dieser Zelllinie. Hierzu wurden Merkmale wie der Gehalt an CD133-positiven Zellen und die Zellmorphologie (s. a. Kapitel 3.2.1.1), sowie die Expression verschiedener Markergene näher untersucht.

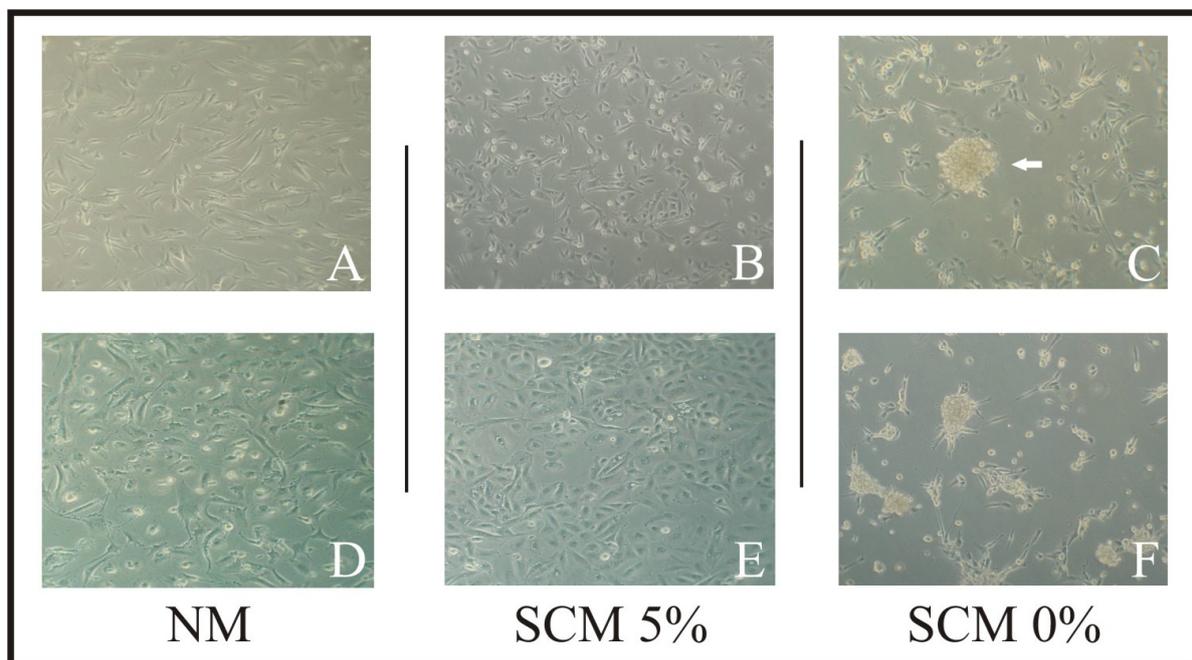


Abb. 3.21: Etablierung der Glioblastomzelllinie T6433 unter Anwendung unterschiedlicher Kulturmedien. Zum Zeitpunkt der Aufnahmen wiesen die Zellen entweder eine geringe Passagenzahl auf (A, B und C) oder wurden seit einem längeren Zeitraum (F, D und E) in diesem Medium kultiviert. Die Zellen wurden entweder in normalem Kultiverungsmedium (A und D) etabliert oder aber in einem für Stammzellen geeigneten Medium (B und E) dem fetales Kälberserum zugesetzt wurde (Stammzellmedium mit 5% FCS, SCM 5 %); Die Abbildungen C und F stellen sowohl einen unmittelbaren Zeitpunkt vor der NSP-Induktion (C), als auch den Zustand nach weiterer Kultivierung der nach NSP-Induktion verbliebenen Zellen dar; Vergrößerung 200-fach

Zu Beginn der Kultivierung der Zellen im normalen Kulturmedium (NM) wies der Großteil der Zellpopulation eine sehr große, lanzettförmige Struktur mit zwei- bis dreistrahligen Auswüchsen auf. Eine kleine Subpopulation innerhalb dieser Gesamtpopulation wies hingegen eine rundlichere Form bei geringerer Größe auf (A). Dieses Verhältnis änderte sich im Verlauf der Kultivierung zugunsten der kleineren, rundlicheren Zellpopulation (D).

Ein gänzlich differentes Bild zeichnete sich bei der Etablierung der T6433-Zellen mittels Stammzellmedium mit Zugabe von 5 % (SCM 5 %) fötalem Kälberserum (FCS) ab. Im Vergleich zu (A) konnten hier hauptsächlich kleinere Zellen identifiziert werden, die mit ihren zwei- bis dreistrahligen Auswüchsen eine ähnliche räumliche Anordnung, wie die unter normalem Medium (NM) kultivierten Zellen, aufwiesen (B). Wie bei den Zellen unter normalem Medium, konnte auch hier eine Wandlung der Morphologie im Verlauf der Kultivierung verzeichnet werden. So wurden die anfangs zahlreich vorkommenden kleinen lanzettförmigen Zellen im späteren Verlauf nur noch in geringem Umfang innerhalb der Zellpopulationen identifiziert. Die Hauptmasse der Zellen wies nun eine eher abgerundete bis rundliche Morphologie (E) auf.

Zur Induktion der Tumorsphäroide musste dem mit Serum versetzten Stammzellmedium dieses entzogen werden (SCM 0 %). Dies hatte seinerseits auch einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Bereits nach einer kurzen Zeitspanne begann die Mehrheit der so kultivierten Zellen eine kugelartige Gestalt, ähnlich der sich in Mitose befindlichen Zellen, anzunehmen. Dieser Effekt verstärkte sich soweit, dass vereinzelte Zellen sich vom Boden des Kultivierungsgefäßes ablösten und sich kugelartige Strukturen ausbildeten (C, s. Pfeil). Im weiteren Induktionsverlauf lösten sich diese komplett ab und die Zellen wurden fortan als Suspensionskultur weiterkultiviert. Die verbliebenen Zellen wiesen dabei eine Morphologie auf, die neuronalen Zellen ähnelte. Die Kultivierung der verbliebenen Zellpopulation führte im geringen Maße zur Bildung weiterer sphäroider Strukturen. In den meisten Fällen kam es allerdings nur zur Ausbildung kugelartige Strukturen, die nicht in Suspension übergangen, sondern mit Zellen, die festen Kontakt zum Kultivierungsgefäß aufwiesen, verbunden schienen. Wurde das Gefäß jedoch einer leichten Erschütterung ausgesetzt, so lösten sich teilweise diese Gebilde von den Zellen ab und gingen ebenso in Suspension über. Dies deutet somit auf einen unvollständigen Induktionsmechanismus hin.

Wie bereits erwähnt, wurden die so entstandenen Neurosphäroide (NSP) als Suspension kultiviert. Die weiterführende Kultivierung dieser Sphäroide führte allerdings zu einem Rückgang in der Anzahl der entstandenen NSPs bei Vergrößerung des Volumens einzelner Sphäroide. Je länger die Zeitspanne der Kultivierung andauerte, desto größere Ausmaße nahmen diese NSPs auch an. Dies könnte einerseits durch eine Zunahme der einen NSP-Population bei gleichzeitiger Abnahme durch Absterben der anderen Population bedingt sein. Andererseits würde eine Fusion mehrerer Sphäroide zu einem großen Sphäroidgebilde die Beobachtungen in Abb. 3.22 B belegen (Singec et al., 2006).

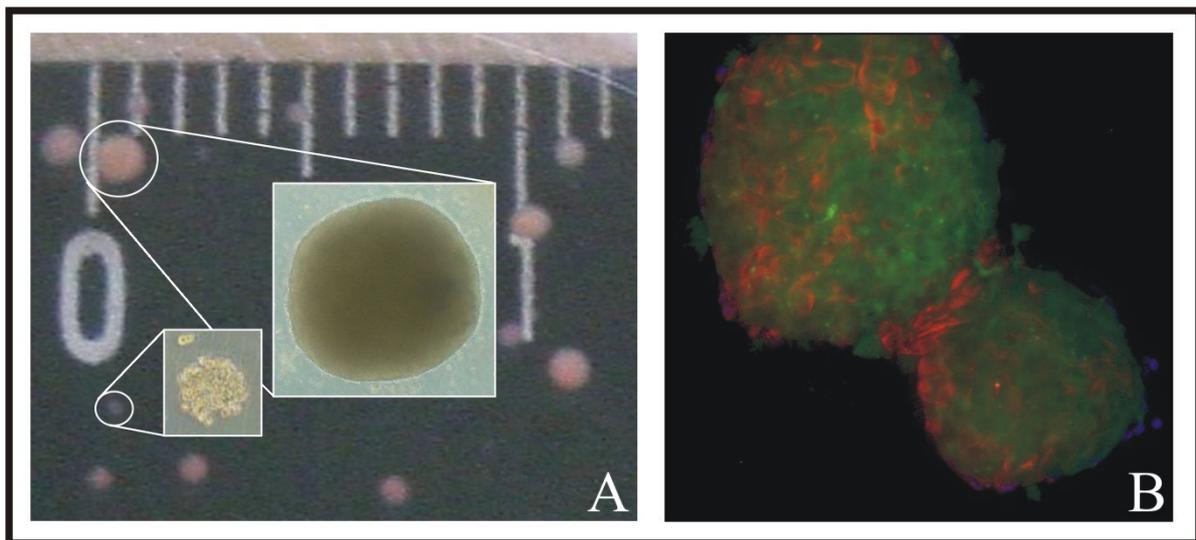


Abb. 3.22: Vergleich der relativen Größe neu induzierter (kleiner Sphäroid) und bereits für einen längeren Zeitraum (großer Sphäroid) kultivierten Neurosphäroide. Anhand der Aufnahme vor einem Millimeterlineal (A) werden die Größenverhältnisse beider NSPs deutlich. B: Darstellung der beginnenden Fusion zweier NSPs anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme.

Nachdem eine Methode zur Induktion von neurosphäroiden Strukturen etabliert wurde, mussten sowohl die NSPs selbst, als auch die Einzelzellen dieser Gebilde als neurale Stammzellen identifiziert werden. Hierfür war es notwendig die Sphäroidstruktur aufzulösen, ohne die Oberflächenstrukturen der Einzelzellen zu zerstören. Nur so wäre der Nachweis der Einzelzellen als doppelt-positiv für CD133 und Nestin ($CD133^+/Nestin^+$) zu erhalten.

Mit Accutase, einer Mischung aus proteolytischen und collagenolytischen Enzymen konnte ein geeignetes Enzym gefunden werden, das eine Vereinzelung des Zellverbandes bei gleichzeitigem Erhalt der Oberflächenproteinstrukturen ermöglichte.

Ein weiteres Problem stellte der einzusetzende Antikörper zum Nachweis der CD133-positiven Zellen dar. Die Verwendung eines indirekten Nachweisverfahrens führte immer wieder zur Bildung falsch-positiver Reaktionen, so dass ein mit R-phycoerythrin (PE)-konjugierter Antikörper im direkten Nachweis eingesetzt wurde, um dieser Problematik zu entgehen.

Beim Nachweis der neuralen Tumorstammzelle mittels Immunfluoreszenz kam es zu antikörperbedingten Kreuzreaktionen. Zusätzlich hierzu führte die Lokalisierung der positiven CD133- (extrazellulär) und Nestinexpression (intrazellulär) zu Überlappungen beim fluoreszenz-mikroskopischen Nachweis. Durch den Einsatz der konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) konnte eine Nachweismethode gefunden werden, die sowohl die positiven Antikörperreaktion spezifisch detektieren, als auch die räumliche Anordnung der NSPs erfassen konnte.

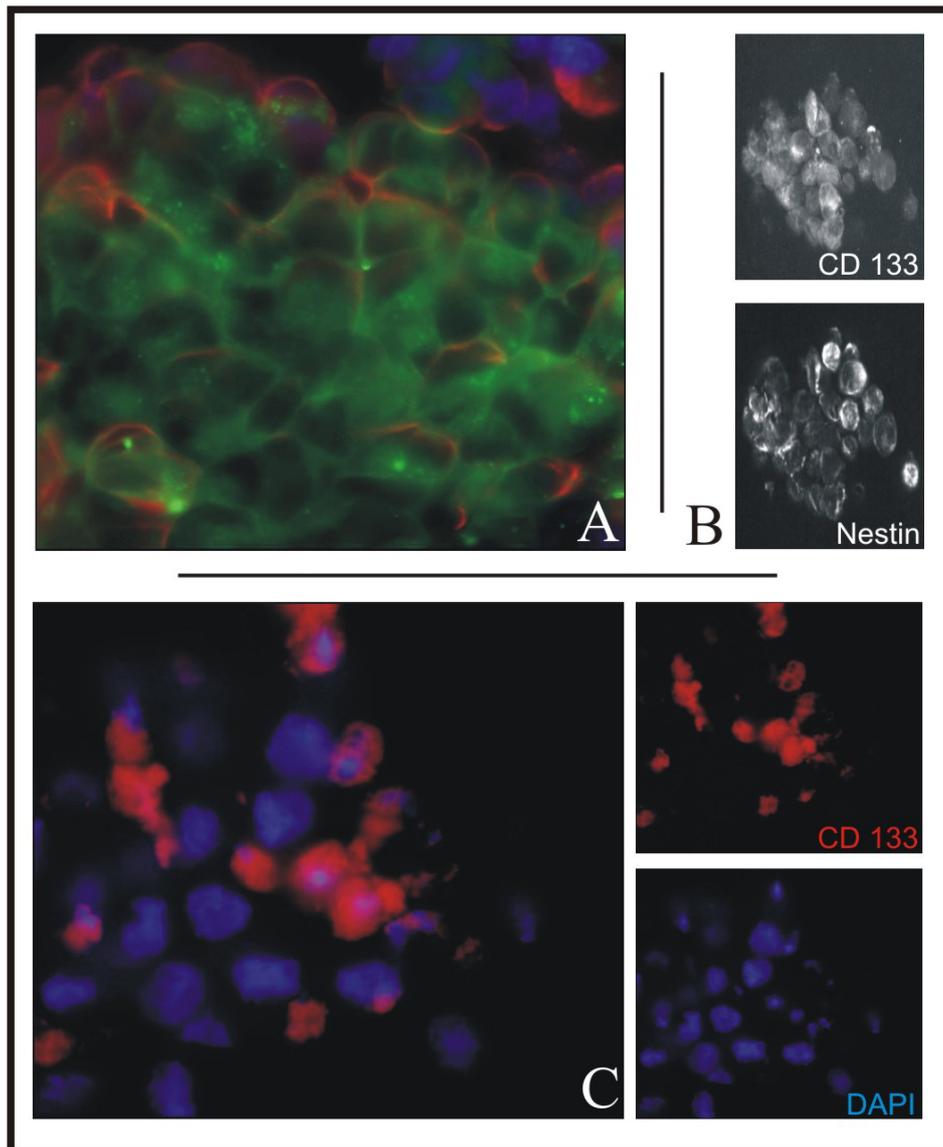


Abb. 3.23: Identifizierung der CD133+/Nestin-- bzw. CD133+/Nestin+-Zellen.

A: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes eines NSPs mit indirekten Antikörpernachweisen; **B:** Aufnahme einer spezifischen Zellschicht eines jungen NSPs mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Es zeigt sich die unterschiedliche Expression von Nestin und CD133 innerhalb einer Zellschicht und somit der dreidimensionale Charakter der kugelartigen Einzelzellen; **C:** Fluoreszenzmikroskopie von vereinzelt Einzelzellen eines großen NSPs. Der Nachweis mittels direktmarkiertem Antikörper zeigt, dass nur noch wenige Zellen CD133-positiv sind; Vergrößerungen: A und B: 630-fach, C: 400-fach; Farben: A: grün: CD133, rot: Nestin, blau: Kerngegenfärbung mit DAPI; C: rot: CD133, blau: Kerngegenfärbung mit DAPI

Bei der Aufnahme mittels indirekten Antikörpernachweisen (A) zeigte sich, dass die CD133-Expression sich wie eine Art Schleier auf der Zelloberfläche der Zellen darstellt. Es kam jedoch auch zu unspezifischen Anfärbungen von intrazellulären Partikeln durch den eingesetzten Antikörper gegen CD133. Der Nachweis CD133-positiver benötigt eine Aufnahme der Zelloberfläche, andererseits verlangt die Identifizierung einer positiven Nestinexpression die Aufnahme intrazellulärer Strukturen.

Um der Problematik der unspezifischen Antikörperfärbungen bei indirekten Nachweisverfahren in der Fluoreszenzmikroskopie zu entgegnen, wurde ein mit Phycoerithrin (PE) konjugierter CD133-Antikörper eingesetzt.

Da mit den konventionellen Fluoreszenzmikroskopen diese Problematik nicht zu lösen war, musste mit der konfokalen Laserscanningmikroskopie ein Nachweisverfahren eingesetzt werden, bei dem sowohl für CD133 als auch für Nestin die Expression im kompletten dreidimensionalen Rahmen untersucht werden kann (B). Somit konnte nun eindeutig und sehr spezifisch die neuronalen Tumorstammzellen identifiziert werden.

Nach erfolgreicher Identifizierung mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweisverfahren wurde der Gehalt an CD133-positiven Tumorstammzellen während des Prozesses der NSP-Induktion in den adherenten T6433-Zellen gemessen, um eine erfolgreiche Anreicherung dieser Zellen nachweisen zu können. Ziel dieses Teils der Arbeit war neben der Anreicherung und Induktion der neuronalen Tumorstammzellen, die Entwicklung einer Methode, zur Unterbindung der Differenzierung dieser Zellen. Hierzu wurde nach Induktion der NSPs der Gehalt der Tumorstammzellen erneut gemessen.

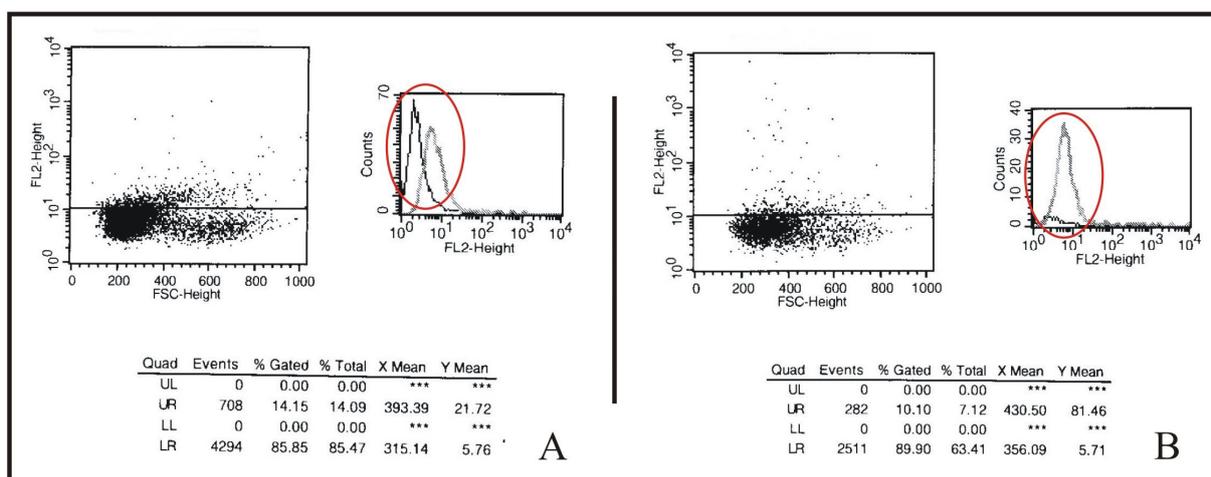


Abb. 3.24: Analyse des Gehaltes an CD133-positiven Stammzellen zum Zeitpunkt der NSP-Induktion und nach weiterer Kultivierung der induzierten NSPs als Suspensionskultur.

A: T6433-Zellen in SCM 0 % zum Zeitpunkt der NSP-Induktion. Es zeigt sich ein erhöhter Gehalt an CD133-positiven Zellen (roter Kreis); **B:** T6433-Zellen nach erfolgreicher NSP-Induktion. Die Messung erfolgte an Einzellzellen eines Sphäroiden. Hier wurde ebenso ein hoher Anteil an CD-133-positives Zellen innerhalb der Gesamtlebenspopulation detektiert (s. Kreis)

Zum Zeitpunkt der NSP-Induktion konnte mit 13,31 % (A) die größte Anzahl an CD133-positiven Zellen in der Zelllinie T6433 gemessen werden. Nach Etablierung der Sphäroidsuspensionskultur wurde danach zu jedem Zeitpunkt ein geringerer Anteil an neuronalen Tumorstammzellen gemessen. Jedoch konnte mit einem Anteil von 8,09 % positiver Zellen für CD133 ein Wert ermittelt werden, der in einem hohen Maße über den Anteilen an neuronalen Tumorstammzellen in den untersuchten Zelllinien lag. Hier wurden stets Anteile unterhalb 1 % gemessen.

Somit kann von einer erfolgreichen Anreicherung neuronaler Tumorstammzellen durch die etablierte Methode ausgegangen werden.

3.2.3.2 Nachweis der Stammzellpotenz durch Differenzierung der induzierten neuralen Tumorstammzellsphäroide

Stammzellen besitzen neben der Fähigkeit sich selbst zu erneuern, auch die Möglichkeit sich zu differenzieren. So entstehen aus neuralen Stammzellen aufgrund Differenzierung u.a. Neuronen (Dirks et al., 2006). Die Auswirkungen können dann mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren detektiert werden. So würde sich neben der Zellmorphologie auch der Gehalt neuronaler oder glialer Zellen ändern.

Die Zugabe von Serum in das für die Induktion der NSPs eingesetzte Stammzellmedium bzw. der komplette Wechsel zum normalen Kultivierungsmedium (NM) hatte die Differenzierung der Sphäroide zur Folge. Mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie wurden die morphologischen Veränderungen dokumentiert und eine Änderung der neuralen und glialen Marker mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Tab. 3. 9: Durchflusszytometrie verschiedener Marker nach Differenzierung von Neurosphäroiden.

	CD133	Nestin	β -Tubulin III	MAP-2	GFAP
NSP-Kultur in SCM 0%	8,08				
Differenzierung					
in SCM 5%	2,79	99,09	10,03	0	0,14
in NM	0,15	97,78	1,34	0,30	0

Die angegebenen Messwerte stellen den Prozentsatz an positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation dar.

Als Ausgangswert für die Bestimmung der Kompetenz der eingesetzten Neurosphäroidkultur wurde der Gehalt an CD133-positiven Zellen gemessen. Die für diesen Versuch verwendeten NSP wiesen dabei einen Gehalt von 8,08 % CD133-positiver Zellen auf. Nach Kultivierung der Sphäroide in SCM 5 % und NM wurde analog zu Kapitel 3.2.1.2 das Expressionsmuster der neu etablierten Zellen bestimmt. Sowohl die neurale Stammzelle, als auch die neurale Tumorstammzellen besitzen neben der Möglichkeit zur Selbsterneuerung die Fähigkeit sich in Neurone und Gliazellen zu differenzieren (Pilkington, 2005, Singh et al., 2004 b). Daher wurden hier nur die Anteile an neuralen bzw. glialen Zellen ermittelt.

Es zeigte sich dass der Anteil an CD133-positiven Zellen mit Erhöhung des Serumgehaltes deutlich abnimmt. So wurde in dem Stammzellmedium mit 5 % FCS ein Rückgang um den Faktor drei nachgewiesen, während im normalem Medium, in dem die spezifischen Wachstumsfaktoren FGF2 und EGF nur in geringsten Spuren enthalten sind und zusätzlich einen 10 %-igen Serumgehalt aufweist, lediglich ein CD133-Anteil von 0,15 % nachgewiesen wurden.

Der Nestingehalt hingegen wies in beiden Differenzierungsmedien einen ähnlichen Prozentsatz auf.

In den mit SCM 5 % versetzten Zellen wurde ein hoher Anteil an frühen neural determinierten Zellen nachgewiesen, was neben dem erniedrigten CD133-Anteil klar für eine voranschreitende Differenzierung der NSPs spricht. Im normalen Kultivierungsmedium wiederum wurde ein um den Faktor 7,5 niedriger Anteil an β -Tubulin III-positiven Zellen nachgewiesen. Allerdings konnte hier ein höherer Anteil an späten neural festgelegten Zellen detektiert werden. Dies spricht für einen sehr weit fortgeschrittenen Differenzierungsprozess in den mit Normalmedium kultivierten NSPs.

Weiterhin zeigte sich hier auch, dass das SCM 5 %-Medium nicht in dem Maße zur Differenzierung in gliale Zellen führte, wie es die Kultivierung im normalen Medium bedingte.

Neben den Veränderungen innerhalb der Expression verschiedener Markergene, konnte nach Kultivierung der Sphäroidkulturen auch eine Veränderung morphologischer Merkmale verzeichnet werden.

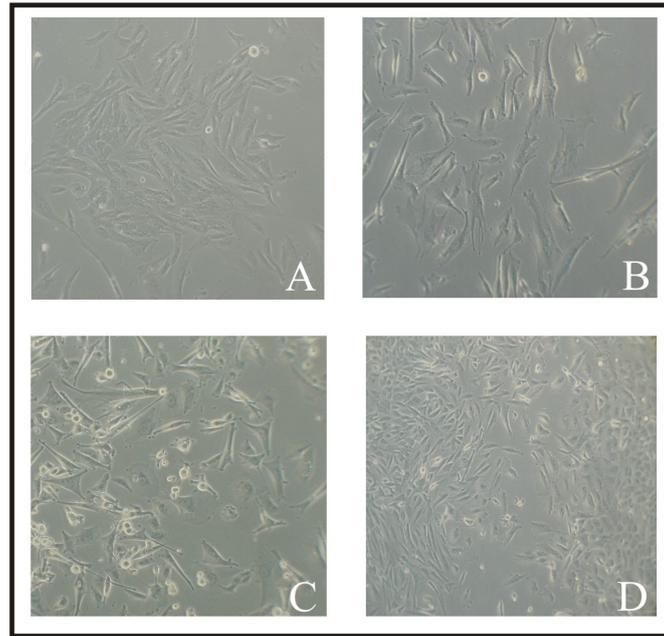


Abb. 3.25: Morphologische Charakterisierung der Tumorsphäroide nach Zugabe der Differenzierungsmedien obere Zeile (**A** und **B**): Normalmedium, untere Zeile (**C** und **D**): SCM 5%, erste Spalte: eine Subkultivierung, zweite Spalte: sieben Subkultivierungen, Vergrößerung 200-fach

Bereits nach einer Subkultivierung zeigte sich bei den in Normalmedium kultivierten T6433-Neurosphäroiden die gleiche längliche und zwei- bis dreistrahlige Lanzettform (**A**), wie bei der in diesem Medium etablierten Zelllinie T6433. Im Verlauf weiterer Kultivierung wurde eine immer stärker zunehmende Übereinstimmung dieser Kultur mit der Originalkultur sichtbar. So konnte ab Passagennummer sieben (**B**) keinerlei Unterschiede mehr festgestellt werden.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch bei der Kultivierung der Sphäroide im Stammzellmedium mit 5% Serum ab. Auch hier ähnelte bereits nach der ersten Subkultivierung (**C**) die Morphologie dieser Zellen denen Zellen, die in diesem Medium etabliert wurden. Nach weiteren sechs Passagierungen (**D**) war auch hier kein Unterschied mehr zu erkennen.

Zusammenfassend kann die erfolgreiche Induktion und Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen unter Anwendung spezieller auf diesen Kontext ausgerichteten Kulturbedingungen festgehalten werden. Außerdem wurden verschiedene Methoden etabliert um die Existenz dieser Stammzellen nachzuweisen.

3.2.3.3 Induktion von Tumorsphäroiden mittels mini-Hypoxie in der Zelllinie T6433

Ein wichtiger Aspekt innerhalb eines Gehirntumors und der ihn umgebenden Areale, stellt die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen dar (Brat et al., 2003). Kommt es aufgrund der schnell voranschreitenden Progression des Tumors zu einer Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen bzw. Sauerstoff, so hat dies umfangreiche Auswirkungen auf alle in diesem Areal befindlichen Zellen. Dies schließt neben den benignen, auch die malignen Zellen und die neuronalen Tumorstammzellen mit ein (Blazek et al., 2007, Zhu et al., 2005, Höckel & Vaupel, 2001).

In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss der mini-Hypoxie auf die Potenz der neuronalen Tumorstammzellen zur Induktion von NSPs untersucht werden. Ein besonderer Aspekt der dabei analysiert werden sollte, stellt die Fähigkeit zur Induktion von Neurosphäroiden dar. Ein Aspekt der Versuche stellt hierbei die Frage dar, ob die mini-Hypoxie selbst einen Auslöser zur Induktion der NSP darstellen kann oder ob sie sie im weiteren Verlauf gar verhindert. Außerdem sollte überprüft werden, ob sich der Anteil an neuronalen Tumorstammzellen aufgrund der mini-Hypoxie verändert.

Hierzu wurden die Zellen für 24 h unter mini-Hypoxie inkubiert. Nach Abschluss der Behandlung erfolgte eine visuelle Kontrolle auf Sphäroidbildung, bevor die Zellen wieder unter normalen Sauerstoffbedingungen weiterkultiviert wurden. Im weiteren Verlauf wurde einerseits eine neu auftretende Induktion von NSPs kontrolliert und andererseits der Gehalt an CD133-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In 20 % der Fälle kam es aufgrund der mini-Hypoxie zur spontanen Bildung von Sphäroidstrukturen. Diese stellten sich zu Beginn als kleine Gebilde dar, nahmen aber nach weiterer Kultivierung an Größe zu, während die reine Anzahl der Sphäroide sank. Dies könnte entweder auf eine Fusion von Sphäroiden zurückzuführen sein (Jessberger et al., 2007, Chen et al., 2006) oder aber auf eine gleichzeitige Zellvermehrung einer Population von Sphäroiden bei gleichzeitigem Sterben der restlichen Subpopulation. Die so entstandenen Sphäroide blieben jedoch während der weiteren Kultivierung in Bezug auf die

Größe hinter den unter normalen Sauerstoffbedingungen induzierten NSPs zurück.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen erfolgte wiederum eine Behandlung der durch mini-Hypoxie induzierten NSPs mittels erneuter mini-Hypoxie. Hierbei sollte der generelle Effekt des veränderten Sauerstoffpartialdruckes auf den Gehalt der CD133-positiven Zellen getestet werden.

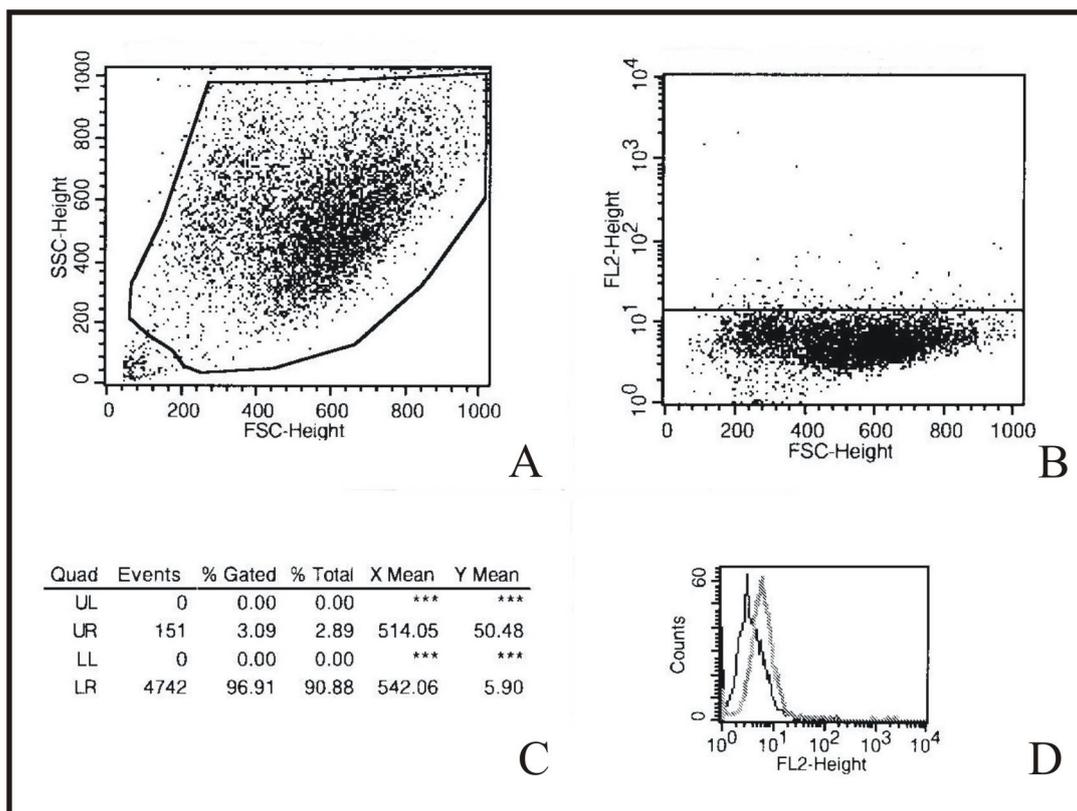


Abb. 3.26: Anteil an CD133-positiven Zellen innerhalb der unter mini-Hypoxie entstandenen Neurosphäroide. **A:** Darstellung der Eingrenzung der Gesamtlebendpopulation anhand eines eingrenzenden „Gates“, **B:** Darstellung der separierten Gesamtlebendpopulation anhand der Größe der Zellen und der Höhe der Expression von CD133; die Einstellung des Gates erfolgte anhand Zellen die mit einer Isotypkontrolle angefärbt wurden, **C:** Gemessene Höhe der CD133-Expression (UR, % Gated, bezogen auf B); hierbei muss noch die Isotypkontrolle subtrahiert werden (0,47 %), **D:** Verhältnis der Anzahl der Zellen und der Höhe der CD133-Expression

Nach zweiwöchiger Kultivierung der durch mini-Hypoxie induzierten Sphäroide konnte ein Gehalt von 2,62 % an CD133-positiven Zellen gemessen werden. Dieser Wert diente als Ausgangswert für die weitere mini-Hypoxiebehandlung dieser Sphäroide. Es zeigte sich aber auch, dass mini-Hypoxie zwar einen Auslösemechanismus zur Induktion von NSPs darstellen kann, diese jedoch nach weiterer Kultivierung nur noch einen sehr geringen Gehalt an CD133-

positiven Zellen aufwiesen. Somit führt auch die mini-Hypoxie zur Induktion von NSPs. Allerdings stellte sich die anhaltende Wirkung der mini-Hypoxie, in Form der Größe der CD133-positiven Zellpopulation, als weniger dauerhaft dar, als es mit Hilfe des Stammzellmediums (SCM 0%) erreicht wurde.

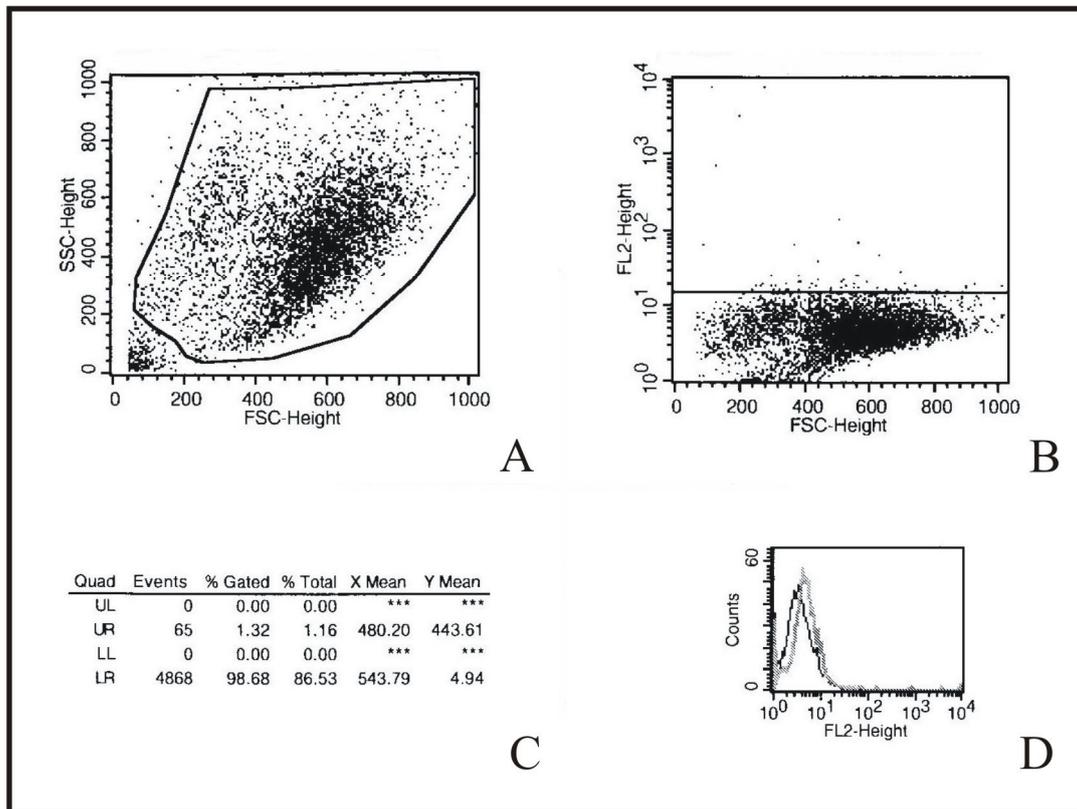


Abb. 3.27: Anteil an CD133-positiven Zellen innerhalb der mini-Hypoxie Neurosphäroide nach weiterer mini-Hypoxie.

A: Darstellung der Separierung der Gesamtlebendpopulation anhand eines eingrenzenden Gates, **B:** separierte Gesamtlebendpopulation; dargestellt anhand der Größe der Zellen und der Höhe der CD133-Expression; die Einstellung des Gates erfolgte mit Hilfe des Einsatzes von Zellen, die mit einer Isotypkontrolle angefärbt wurden, **C:** Gemessene Höhe der CD133-Expression (UR, % Gated, bezogen auf B); Die Höhe der vorliegenden Antikörperfluoreszenz muss hiervon noch subtrahiert werden (ermittelt anhand der Isotypkontrolle) (0,69 %), **D:** Verhältnis der Anzahl der Zellen und der Höhe der CD133-Expression

Die zusätzliche Kultivierung der unter mini-Hypoxie entstandenen Tumorsphäroide führte einerseits zum Rückgang der Anzahl der Sphäroide selbst, andererseits konnte auch eine Reduktion der CD133-positiven Zellen gemessen werden. Bereits eine weitere 24-stündige Kultivierung unter mini-Hypoxie bedingte eine Verminderung der neuralen Stammzellen um den Faktor 4. So konnten nicht mehr als 0,63 % CD133-positive Zellen nach erneuter mini-Hypoxie gemessen werden.

3.2.3.4 Anreicherung der neuralen Stammzellen aufgrund Röntgenbestrahlung in TX3868

Ziel jeder Krebstherapie ist die Tötung der malignen Zellpopulation. Die derzeitige Therapie eines *glioblastoma multiforme* umfasst u.a. die konventionelle Strahlentherapie. Hierbei wird das maligne Gewebe mit ionisierten, hochenergetischen Strahlen behandelt, um somit die bösartigen Zellen abzutöten.

In Studien anderer Arbeitsgruppen wurden Hinweise gefunden, dass die CD133-positiven Tumorstammzellen eine entscheidende Rolle zur der Krebsentstehung beitragen (Singh et al., 2004; Bao et al., 2006; Liu et al., 2006). Daher sollten in diesem Teil der Arbeit die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Tumorstammzellen untersucht werden. Hierzu wurden TX3868-Zellen in mehreren Intervallen mit jeweils 5 Gy Röntgenstrahlung exponiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil an CD133-positiven Zellen bestimmt.

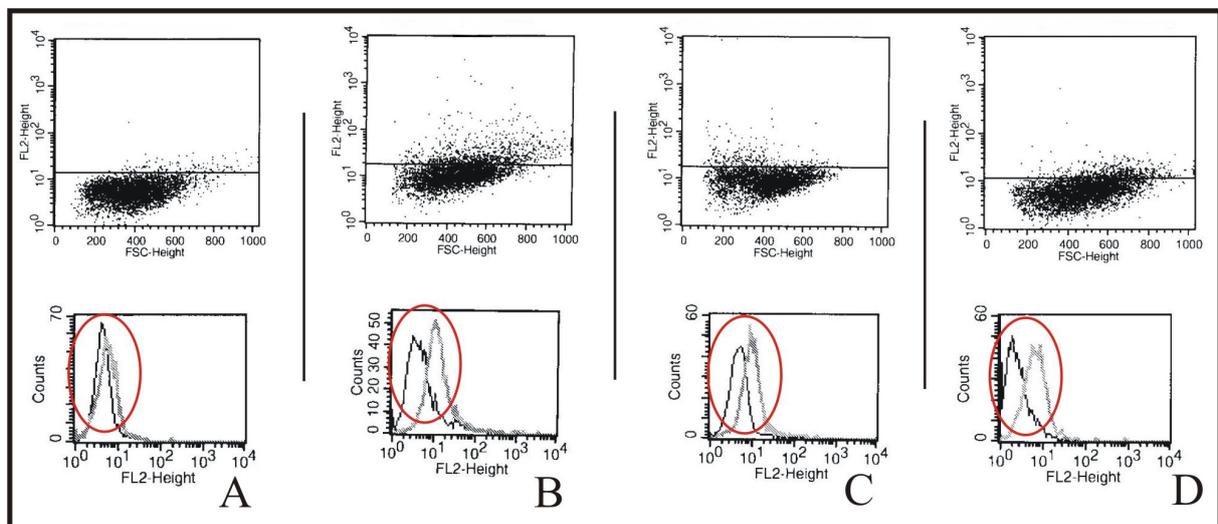


Abb. 3.28: Anreicherung von neuralen Tumorstammzellen nach Bestrahlung.

Es zeigt sich ein deutlicher Zuwachs an CD133-positiven nach 10 Gy (A), 15 Gy (B), 35 Gy (C) und 40 Gy (D) Röntgenstrahlung, zu erkennen an dem zahlenmäßigen Anstieg an CD133-positiven Zellen in den Histogrammdarstellungen (rote Kreise); In den Diagrammen der oberen Zeile sind jeweils die Lebendzellpopulationen in Abhängigkeit von Größe zu Fluoreszenzintensität aufgetragen, in den Histogrammen der unteren Zeile die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur Anzahl der gezählten Zellen. Hier wurden die Kurven der Kontrollzellpopulationen in schwarz, die der bestrahlten Zellen in grau gehalten.

Die Bestrahlung verschiedener Behandlungsansätze mit unterschiedlichen Wiederholungsintervallen von jeweils 5 Gy Röntgenstrahlung hatte ein Anstieg

des Anteils an CD133-positiven Zellen zur Folge. Im Vergleich zur jeweils parallel kultivierten Kontrollpopulation steigerte sich der Anteil an neuronalen Tumorstammzellen nach einer Dosis von 10 Gy um 4,26 % (s. Abb. 3.33 **A**), nach 15 Gy um 11,50 % (s. Abb. 3.33 **B**), nach 35 Gy um 5,54 % (s. Abb. 3.33 **C**) und nach 40 Gy um 9,98 % (s. Abb. 3.33 **D**).

Somit lässt sich für die konventionelle Therapieform des Glioblastoms ein gegenteiliger Effekt in Form einer Anreicherung an neuronalen Tumorstammzellen feststellen. Die Zunahme der neuronalen Stammzellen nach Bestrahlung würde somit zu einem Wachstumsvorteil der hochstrahlenresistenten Tumorstammzellen gegenüber den strahlensensitiven Zellen führen, da diese die Bestrahlungstherapie überleben und somit in verhältnismäßig höherer Zahl vorliegen. Die strahlen-sensitiven Zellen hingegen sterben aufgrund der Strahlendosis ab und deren Raum kann folglich durch, aus strahlenresistenten Tumorstammzellen, differenzierten Zellen eingenommen werden. Dies könnte dazu führen, dass nach einem gewissen Zeitraum nach Behandlung mit ionisierter, hochenergetischer Strahlung mehr strahlenresistente Krebszellen vorliegen, als vor Beginn der Therapie.

4. Diskussion

In humanen Tumoren kommt es aufgrund von Mutationsanhäufungen zu Überexpressionen und Amplifikationen von Genen. Für Glioblastome sind charakteristische Veränderungen beschrieben worden, die neben dem Verlust von Chromosom 10 (LOH #10) auch die Amplifikation des Gens EGFR (*epidermal growth factor receptor*) oder die Mutation von TP53 umfassen (Ohgaki, 2005, Ohgaki und Kleihues, 2007). Zusätzlich zu diesen Veränderungen kommt es in über 15 % der Glioblastome zur Amplifikation des chromosomalen Abschnittes 12q13-14. Neben der Amplifikation des Gens EGFR, stellt diese Region die zweithäufigste amplifizierte Einheit in Glioblastomen dar (Reifenberger et al., 1996). Eine der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastomzelllinien, mit der Bezeichnung TX3868, weist einen X-chromosomalen HSR auf, der die Chromosomenregion 12q13-14 in Form eines Amplikons beinhaltet. Aus dieser Region konnten mit Hilfe eines Mikrodissektionsverfahrens mehrere unbekannte amplifizierte bzw. überexprimierte Gene isoliert werden (Gracia et al., 1996), die in weiteren Untersuchungen näher analysiert wurden. Hierbei konnte z.B. für das Gen für die 25-Hydroxyvitamin-D₃-1 α -Hydroxylase (CYP27B1), ein möglicher Zusammenhang zwischen der Amplifikation dieses Gens und einem verbesserten Überleben von Krebszellen nachgewiesen werden (Maas et al., 2001, Diesel et al., 2005). Für das Gen KUB3 (*Ku70 binding protein 3*) werden ähnliche Effekte vermutet (Fischer et al., 2001). Ku70 ist essentiell für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) (Jones et al., 2001; Sakata et al., 2001; Tamura et al., 2002). Die Bindung von KUB3 an Ku70 könnte zur Verbesserung der Einbindung von weiteren Proteinen (z.B. Ku86, DNA-PKcs), die zur DNA DSB-Reparatur benötigt werden, führen. Durch die Überexpression von KUB3 könnten die Tumorzellen den Auswirkungen von Bestrahlung, Hypoxie oder Chemotherapeutika besser entgegenwirken. So wurde in einer Arbeit von Ayene und Mitarbeiter gezeigt, dass eine Runterregulierung von Ku70 mittels siRNA mit einem schlechteren Überleben nach Bestrahlung korrelierte (Ayene et al., 2005).

Einzelne Onkogene wurden häufig als Zielgene (*target gene*) einer Amplifikationseinheit angesehen. Da viele Amplifikationseinheiten aus mehreren Genen bestehen, wie etwa die Region 12q13-14, ist das Konzept eines einzelnen Targetgens, mit dem weitere, benachbarte Gene koamplifiziert werden, unzureichend. In der vorliegenden Arbeit sollten daher generelle Mechanismen der Amplifikationsentstehung untersucht werden. Wären durch die durchgeführten Behandlungen zur Induktion von Amplifikationsmechanismen verschiedene Gene involviert, so würde dies gegen die Einzelzielgentheorie sprechen.

Im Verlauf der Tumorgenese eines Glioblastoms kann es in einzelnen Bereichen trotz starker Vaskularisierung sowohl zu einer Unterversorgung von Nährstoffen, als auch zur Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes und somit zu unterschiedlich starken Hypoxien kommen (Hoeckel und Vaupel, 2001). Die Untersuchungen zu den Mechanismen, die zur Entstehung von Amplifikationen führen, wurden bislang hauptsächlich bei drogen-selektionierten Mutanten durchgeführt (Coquelle et al., 2002). Allerdings sind Amplifikationen in Tumoren, die nicht mit Chemotherapeutika behandelt wurden, weit verbreitet (Schwab, 1999). Die Aktivierung des Mechanismus der Genamplifikation erfolgt durch die Induktion von *fragile sites* und geht häufig mit der Bildung von *double minutes* (DMs) und Brüchen einher (Gebhart, 2005). In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen sowohl der mini-Hypoxie, als auch von Aphidicolin (APC) auf den X-chromosomalen HSR in der Zelllinie TX3868 untersucht werden. APC wurde hierbei wegen seiner Fähigkeit zur Induktion von *fragile sites* ausgewählt.

Die Mehrzahl der Tumore sind mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden. So kommt es insbesondere bei Gehirntumoren immer wieder zur Bildung von Tumorrezidiven (Kleihues und Ohgaki, 2000). Viele Untersuchungen versuchten daher die Ursachen für die intensive Rezidivbildung bei astrozytären Tumoren zu erforschen. Die traditionelle Hypothese der Gehirntumorentstehung geht von der Dedifferenzierung einer ausgereiften Hirnzelle durch genetische Veränderungen aus. Durch intensive Erforschung der neuralen Stammzellen (NSCs, *neural stem cells*) gilt die Theorie mittlerweile als unwahrscheinlich. Die Tatsache, dass sowohl somatische Stammzellen, als auch

Krebsstammzellen viele funktionelle und genetischen Ähnlichkeiten aufweisen, führte zur These, dass Gehirntumore aufgrund von Transformationsereignissen einer normal neuronalen Stamm- oder Progenitorzelle entstehen müssen (Pardal et al., 2003).

Stammzellen werden durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ihre Unspezialisiertheit und der Potenz zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen definiert (Terskikh et al., 2006). Zudem zeigten Tumorstammzellen aus verschiedenen Geweben im Xenograftmodell die Möglichkeit zur Bildung von Tumorgewebe, das dem histopathologischen Muster des Tumors, von dem sie einst abstammten, entsprach (Khamsi, 2004). Zur Identifizierung neuraler Tumorstammzellen in Glioblastomen wurde der Marker CD133 eingesetzt (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004). In der Studie zeigte sich, dass ausschließlich aus dem Originaltumorgewebe isolierte, CD133-positive Zellpopulationen in immundefizienten Mäusen die erneute Bildung eines Glioblastom induzieren konnten. Dies bestätigte die Theorie, nach der allein die Anhäufung von Mutationen zur Umwandlung neuraler Stammzellen in neurale Krebsstammzellen führt. Aufgrund symmetrischer Teilungen dieser Zelle, kann sich im weiteren Verlauf eine Population von neuronalen Tumorstammzellen bilden, die die Grundlage eines Hirntumors darstellt (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004).

4.1 Auswirkungen von mini-Hypoxie und Aphidicolin auf den X-chromosomalen HSR in der Glioblastomzelllinie TX3868

Die Zelllinie TX3868 besitzt einen HSR für das Amplikon 12q13-14. In Studien, die dieser Arbeit voraus gingen, wurden mit Hilfe eines Mikrodissektionsverfahrens in der Zelllinie TX3868 gezielt Gene isoliert, von denen angenommen wurde, dass diese zur Tumorentstehung beitragen könnten (Gracia et al., 1996). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Entstehungsmechanismen der Amplifikation. Durch den Einsatz von Aphidicolin und mini-Hypoxie sollten neben der Induktion von *fragile sites* auch aktive Amplifikationsmechanismen, wie etwa die Reintegration induzierter *fragile sites* nachgewiesen werden. Der Einsatz von mini-Hypoxie bzw. Aphidicolin erfolgte vor dem Hintergrund folgender Fragestellungen. Kann der Prozess der Amplifikation unter Bedingungen der mini-Hypoxie, wie sie im Tumor oftmals herrschen, induziert werden? Welches sind die Auswirkungen von Wirkstoffanaloga auf die Amplifikationseinheit 12q14-15 bzw. den zugrunde liegenden Amplifikationsmechanismen. Aphidicolin wirkt in ähnlicher Weise auf die Zelle wie manche für die Krebstherapie eingesetzte Chemotherapeutika. Zu diesen gehören DNA-schädigende Wirkstoffe, wie etwa Nitrosoharnstoffe, Temozolomid oder Procarbin oder solche, die in die DNA-Synthese eingreifen, wie etwa Methotrexat (MTX) oder Cytarabin (Ara-c). Zudem waren die Untersuchungen zur Entstehung des Amplifikationsmechanismus auf drogen-selektionierte Mutanten begrenzt (Coquelle et al., 2002). Allerdings sind Amplifikationen in Tumoren, die nicht mit Chemotherapeutika behandelt wurden, weit verbreitet. Daher sollten die so behandelten Tumorzellen unter einem Milieu untersucht werden, das zum Einen der *in vivo* Situation des Tumors unter Chemotherapie nahe kommt, zum Anderen auch die *fragile site* induzierenden Eigenschaften von APC gewährleistet werden kann. Somit könnten die Effekte, die durch APC entstanden sind, mit denen der mini-Hypoxie verglichen werden. Zusätzlich sollte der Einsatz von APC zeigen, dass die Induktion von *fragile sites* auch in

nicht artifiziiellen Modellen, wie in drogen-selektionierten Mutanten, ausgelöst werden kann (Coquelle et al., 2002).

Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Induktion von aktiven Amplifikationsmechanismen mittels der Behandlung durch mini-Hypoxie bzw. Aphidicolin auszulösen. Neben der Induktion von *fragile sites* konnte auch die Reintegration induzierter *fragile sites* an einen anderen genomischen Locus, Brüche der HSR-Struktur oder DMs von variabler Größe, nachgewiesen werden. Die Auswirkungen der Behandlungen auf den X-chromosomalen HSR in der Glioblastomzelllinie TX3868 werden im Folgenden näher diskutiert.

4.1.1 Veränderungen des HSRs aufgrund der Behandlung mit Aphidicolin

Bei der Behandlung der TX3868-Zellen mit APC wurden viele unterschiedlich große DMs induziert (s. Abb. 3.5), die sich auch in ihrer, auf den HSR bezogenen, nachgewiesenen Fluoreszenzintensität unterscheiden. Aufgrund der HSR-Leiterstruktur, liegen Gene in mehrfacher Kopienzahl vor. Dies gilt ebenso für den Locus der hier induzierten DMs. Infolgedessen kann auch die Stelle, an der die DM-Induktion ausgelöst wird, variieren und somit der resultierende DMs eine variable Länge aufweisen. Dies würde auch den unterschiedlichen Gehalt an GAS41- bzw. KUB3-Genkopien erklären (s. Abb. 3.5 und 3.6), die in den induzierten DMs nachgewiesen wurden. In Folge der Variabilität der induzierten DMs erklären sich auch die chromosomalen Veränderungen der HSR-Struktur. Aufgrund unterschiedlicher, chromosomaler Regionen, die in den Prozess der DM-Induktion eingebunden wurden, veränderte sich auch die Struktur des HSRs sehr stark. Diese Änderungen können bis zu einem fast vollständigen Verlust der nachgewiesenen HSR-Struktur führen; dies könnte auf einen beginnenden HSR-*breakdown* hinweisen.

Zusätzlich zur Aktivierung des Amplifikationsmechanismus zeigte sich die Beteiligung von Chemotherapeutika bzw. Wirkstoffanaloga, wie APC bei der Initiierung von Amplifikationen. So kam es aufgrund der Behandlung mit APC häufiger zum partiellen der HSR-*breakdown*. Trotz der DM-Induktion durch APC, konnten mit Ausnahme eines HSRs (s. Abb. 3.7 HSR B-II), jeweils hohe Fluoreszenzintensitäten und somit zahlreiche verbliebene GAS41 bzw. KUB3-Genkopien nachgewiesen werden. Diese könnten wiederum einen Hinweis auf eine Überreplikation dieser Gene darstellen. Des Weiteren wurde eine doppelte Reintegration von GAS41-Sequenzen an den genomischen Locus 1q und die nähere Telomerumgebung des langen Arms von Chromosom 1, nachgewiesen. Die Reintegration von DMs stellt einen Prozess dar, der während der *fragile site* Induktion häufig stattfindet (Hellman et al., 2002). In der Region, in der die DMs reintegriert wurden, liegen drei *fragile sites* des *common types* (CFS), die alle durch APC induzierbar sind (FRA1I, FRA1K und FRA1L). Es ist am wahrscheinlichsten, dass bei diesen fragilen Stellen die Reintegration der durch

APC induzierten DMs stattfand. Dies spiegelt den stärksten nachgewiesenen Einfluss der APC-Behandlung auf die chromosomale Struktur wider.

Die TX3868-Zellen beinhalten jeweils zwei stabile, X-chromosomale HSRs, welche die Auswirkungen der Behandlungen für die Zelle minimieren und somit für diese Zellen zu einer besseren Überlebensfähigkeit führen könnten.

Nach APC-Behandlung konnten größtenteils nur geringfügige Veränderungen der Leiterstruktur des HSRs detektiert werden. Teilweise wurden aber auch starke Verluste von Genkopien nachgewiesen, die mit einem nahezu vollständigen Verlust der HSR-Leiterstruktur einhergingen (s. Abb. 3.7 HSR B-II). Bei den neu induzierten DMs kam es zudem häufig zu einer Anreicherung der Fluoreszenzsignalintensitäten, was gleichbedeutend mit einer Zunahme der nachgewiesenen Genkopien ist. Dies stellt einen zusätzlichen Beweis für fortschreitende Amplifikationsereignisse nach erfolgter APC-Behandlung dar.

Mit Hilfe von *in silico* Analysen der *Genome Data Bank* wurde die in Glioblastomen häufig auftretende Amplifikationseinheit in der chromosomalen Region 12q analysiert (Coquelle et al., 1997). Als Ergebnis dieser Analysen wurden sowohl der initiale Auslösebruch bei FRA12B (12q21.3), als auch der amplikonterminierende Bruch bei FRA12A (12q13.1), bestimmt. In der *Genome Data Bank* ist für die chromosomale Region 12q13-14 keine *fragile-site* verzeichnet. Nach mini-Hypoxie zeigte sich in der Mehrzahl der ausgelösten Brüche ein KUB3-spezifischen Hybridisierungssignals. Dies legt den Schluss nahe, dass eine noch nicht in der *Genome Data Bank* verzeichnete *common fragile site* des APC-sensitiven Typs gefunden wurde, die durch mini-Hypoxie induzierbar ist und in unmittelbarer Nähe des Gens KUB3 liegt.

4.1.2 Veränderungen des HSRs aufgrund mini-Hypoxie Behandlung

Durch die Behandlung mit mini-Hypoxie konnten aktive Amplifikationsereignisse nachgewiesen werden. Im Vergleich wurden hier weniger als die Hälfte der durch APC-Behandlung induzierten DMs gefunden. Zusätzlich zeigte sich einzig nach mini-Hypoxie ein Bruch des HSRs. Dies spiegelt einen ersten Schritt im *breakage-fusion-bridge* (BFB) *cycle* wider, der einen aktiven Mechanismus der Amplifikation repräsentiert.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass mini-Hypoxie einen starken Aktivator der DNA-Amplifikation in Tumoren darstellt. In weitergehenden Versuchen mittels 30-stündiger Hypoxie konnten diese Ergebnisse in einer im Haus durchgeführten Studie (Frau Dr. Fischer, unveröffentlichte Ergebnisse) bestätigt werden. Auch hier wurden teilweise große DM-Strukturen nachgewiesen, die hohe Anteile an KUB3 oder GAS41-Sequenzen enthielten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten der Arbeitsgruppe um Coquelle, die einen starken Einfluss der Hypoxie auf die Formation komplexer DMs und HSRs beschrieben (Coquelle et al., 1998).

Nach mini-Hypoxie wurde ein hohes Maß an Veränderungen der HSR-Struktur nachgewiesen. Diese Veränderungen sind unter anderem durch geringe Verluste an KUB3- und GAS41-Genkopien, sowie durch nahezu vollständige Verluste an KUB3-Sequenzen in einem HSR gekennzeichnet. Da hier auch Veränderungen der Länge des HSRs bzw. eines Chromosoms nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass durch mini-Hypoxie wesentlich größere chromosomale Bereiche aus dem HSRs ausgeschleust werden, als dies nach APC-Behandlung der Fall ist.

Somit stellt die mini-Hypoxie bzw. die Hypoxie einen stärkeren Selektionsdruck und somit einen potenteren Auslösemechanismus für aktive Amplifikationsereignisse in Tumoren dar, als das Wirkstoffanaloga Aphidicolin. Brizel und Mitarbeiter konnten in Weichgewebssarkomen zeigen, dass es in den untersuchten Tumoren trotz präoperativer Bestrahlung, dass die Tumoren trotz präoperativer Bestrahlung nicht kausal therapiert werden konnten (Brizel et al., 1996). In den entstandenen Metastasen wiesen sie einen reduzierten Sauerstoffgehalt nach und vermuteten dies als die Ursache für den Misserfolg in

der Therapie dieser Tumore. Daher wird als Ansatzpunkte einer Tumorthherapie auch versucht, die Auswirkungen von mini-Hypoxie bzw. Hypoxie zu beschränken. Eine mögliche Therapieform stellen hierbei Inhibitoren von HIF-1 dar. Die Expression von HIF-1 wird durch Hypoxie ausgelöst. Dabei aktiviert HIF-1 wiederum die Transkription von Genen, die in Vorgänge wie der Angiogenese, dem Zellüberleben oder dem Glukosestoffwechsel, involviert sind. Aufgrund intratumoraler Hypoxie kann es somit zu einer Überexpression von HIF-1 α kommen, was seinerseits mit einer erhöhten Mortalität in verschiedenen Tumortypen, wie etwa Tumoren des Kopfes und des Nackens (Koukourakis et al., 2002), Oligodendrogliomen (Birner et al., 2001) und Cervixkarzinomen (Burri et al., 2001) in Verbindung gebracht wird.

Die Auswirkungen von Hypoxie auf die Proliferation und Differenzierung neuraler Stammzellen (NSCs, *neural stem cells*) wurden bislang wenig untersucht. Es zeigte sich aber, dass NSCs sowohl im embryonalen (Rodesch et al., 1992), als auch adulten (Goda et al., 1997) Gehirn in einem physiologischen Hypoxiemilieu, welches einen Sauerstoffgehalt von 1 – 5 % aufweist, existieren. Für Cytotrophoblasten, die bei einem Sauerstoffgehalt unter 2 % kultiviert wurden, konnte eine kontinuierliche Proliferation bei geringer Differenzierung nachgewiesen werden. Wurden die gleichen Zellen allerdings unter 20 % Sauerstoff, dem üblichen Sauerstoffgehalt in Zellkultursystemen, kultiviert, so stoppten die Zellen in ihrer Proliferation und differenzierten in einen hochinvasiven Phänotypen (Genbacev et al., 1997; Caniggia et al., 2000). Die Art der Hypoxie kann daher entscheidend für die Proliferation und Differenzierung von NSCs sein. Weiterhin zeigte sich, dass Hypoxie sowohl das Wachstum *in vitro*, als auch die Differenzierung von NSCs *in vivo* beeinflussen kann, da unter hypoxischen Bedingungen mehr Neuronen als Gliazellen gebildet wurden (Studer et al., 2000; Morrison, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte der gleiche Effekt bei der Differenzierung neuraler Tumorstammzellen unter Normoxie nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.3.2, Tab.3.9).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse vieler Studien darauf hin, dass Hypoxie auf viele Arten von Stammzellen einen großen Einfluss haben kann. Dieser Einfluss stellt sich bisher als sehr zelltypspezifisch dar (Zhu et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte in einigen Fällen nach mini-Hypoxie ein neurosphere-induzierender Effekt nachgewiesen werden. Somit könnte die mini-Hypoxie im Glioblastom einen weiteren Auslösemechanismus für die Redifferenzierung neuraler bzw. glialer Zellen in Tumorstammzellen repräsentieren.

4.2 Charakterisierung des Phänotyps verschiedener Glioblastomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp von unterschiedlichen Glioblastomzelllinien anhand der Morphologie und der Expression ausgewählter Gene charakterisiert. Dabei konnte für jede Zelllinie ein charakteristischer Phänotyp bestimmt werden. Dies umfasste neben einer spezifischen Morphologie auch ein voneinander abweichendes Expressionsprofil.

Bei der Analyse der Morphologie der Zelllinien zeigte sich ein uneinheitliches Bild. Jede der untersuchten Glioblastomzelllinien wies eine differente Zellmorphologie auf, was der multiformen Charakteristik der Glioblastome *in vivo* entspricht.

4.2.1 Nachweis der Markergenexpression mittels Durchflusszytometrie

Bei der Untersuchung der verschiedenen Glioblastomzelllinien wurde im Besonderen auf die Expression der Gene CD133 und Nestin geachtet. Die gleichzeitige Expression von Nestin und CD133 findet sich sowohl bei der benignen, als auch bei der malignen neuralen Tumorstammzelle.

CD133 stellt ein Oberflächenprotein dar, welches erstmals bei einer Subpopulation von hämatopoetischen Stammzellen entdeckt wurde (Miraglia et al., 1997). Mittlerweile wird CD133 zur Identifizierung hämatopoetischer und neuraler Stamm- und Progenitorzellen eingesetzt (Corbeil et al., 2000). Mit zunehmender Differenzierung nimmt auch die Expression von CD133 ab. Im Gehirn wird CD133 ausschließlich von neuralen Stammzellen exprimiert und kann daher zum Nachweis dieser Zellen eingesetzt werden (Singh et al., 2004; Clarke 2004).

Nestin ist ein Klasse VI Intermediärfilamentprotein, das ursprünglich im sich entwickelnden ZNS entdeckt wurde. Es dient dabei als Marker neuroepithelialer Progenitorzellen (Lendahl et al., 1990). Nach der Differenzierung dieser Zellen kommt auch die Expression von Nestin zum Erliegen. In Glioblastomen bildet Nestin ein dichtes Netzwerk durch das Zytoplasma (Veselska et al., 2006).

Zur Charakterisierung der Glioblastomzelllinien wurden spezifische Gene ausgewählt. Neben CD133 und Nestin wurden solche Gene ausgewählt, mit deren Hilfe sowohl eine mögliche Stammzellpotenz, als auch der Grad der Differenzierung einer Zellpopulation bestimmt werden kann..

CD34 ist ein Zelloberflächenprotein, das auf ausgewählten, unreifen hämatopoetischen Progenitorzellen (myeloid und lymphoid) zu finden ist. Im Gegensatz zu CD133 kann die Expression von CD34 auch auf späten Progenitorzellen nachgewiesen werden, nimmt aber mit zunehmender Reifung der Zellen ab. Daneben wird die Expression von CD34 als weiterer Hinweis für eine Stammzellpotenz in der untersuchten Zellpopulation angesehen (Osawa et al., 1996).

Einen Hinweis auf eine mögliche Differenzierung von Stamm- bzw. Progenitorzellen kann hiermit ebenso nachgewiesen werden. Diese wäre durch eine erhöhte Expression des astrozytären Markers GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) oder der neuronalen Marker MAP-2 (*microtubule associated protein 2*) oder β -Tubulin III gekennzeichnet. Diese würde mit einer gleichzeitigen Reduktion der CD133-Expression einhergehen.

GFAP kommt als Intermediärfilament im Cytoplasma von Gliazellen, v.a. Astrozyten vor und detektiert somit den glialen Anteil innerhalb der Glioblastomzelllinien.

Die neuronalen Zellen werden sowohl durch MAP-2, als auch durch β -Tubulin III nachgewiesen. MAP-2 spielt beim Mikrotubuliumaufbau im Hirn eine wichtige Rolle. Es ist assoziiert mit Neuro- und Aktinfilamenten, so dass angenommen wird, dass es die Interaktion zwischen den Mikrotubuli, anderen zytoskelettalen Elementen und zytoplasmatischen Organellen leitet. Außerdem ist MAP-2 ein stringenter Marker für Neuronen und die Expression ist im ZNS auf neuronale Zellkörper und Dendriten beschränkt (Binder et al., 1986). β -Tubulin III wird als neuronenspezifischer Marker angesehen. Die Expression von β -Tubulin III wird als eine der frühesten Marker angesehen, welche die neuronale Festlegung im

primitiven Neuroepithelium anzeigt. Daher kann dieser Marker zur Identifikation neu entstandener Neuronen eingesetzt werden (Caccamo, et al. 1989).

Bei allen untersuchten Zelllinien lag der Anteil CD133-positiver Zellen unter 1 % und der nestin-positiven über 90 %. Somit stellen die neuronalen Tumorstammzellen lediglich eine sehr geringe Subpopulation innerhalb der Tumormasse bzw. der kultivierten Zellen dar. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein (Uchida et al., 2000; Singh et al., 2004). Somit kann auch ausgeschlossen werden, dass das Xenograftmodell in den Zelllinien TX3095 und TX3868 eine Anreicherung neuronaler Stammzellen zur Folge hatte. Entgegen neuester Studien (Platet et al., 2007) über den Einfluss von reduziertem Sauerstoff auf Gliomzelllinien, konnte in ersten Untersuchungen von Glioblastomzelllinien unter mini-Hypoxie, keine Veränderung der CD133-Expression nachgewiesen werden. Ein Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte in der Anzahl der Subkultivierungen der für diese Arbeit verwendeten Zelllinien liegen. Platet und Mitarbeiter setzten für ihre Untersuchungen ausschließlich niedrig-passagierte Zelllinien ein, deren maximale Anzahl an Subkultivierung unterhalb zehn lag. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen Zelllinien untersucht, bei denen 15 bis 60 Passagierungen vorlagen. Somit würden bereits wenige Passagierungen unter diesen Kultivierungsbedingungen (20 % Sauerstoff) genügen, um die Anzahl an CD133-positiven Stammzellen bis auf die Nachweisgrenze zu reduzieren.

Die Menge an neuronalen bzw. glialen Zellen war bei den untersuchten Zelllinien sehr variabel, schwankte innerhalb verschiedener Messzeitpunkte und wies überdies sehr uneinheitliche Werte zwischen Primär- und Xenograftkultur auf. Somit können keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Grad der Differenzierung neuronaler Stammzellen in den Zelllinien bzw. im Xenograftmodell gezogen werden. Es ließ sich allerdings eine Tendenz beim Verhältnis früher neuronaler Zellen (β -Tubulin III) zu späten neuronalen Zellen (MAP-2) erkennen. So wurde in jeder Zelllinie ein vielfacher Wert an neu entstandenen Neuronen nachgewiesen. Dem verwendeten Kultivierungsmedium ist zu 10 % fötales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) zugesetzt. In diesem Serum sind Wachstumsfaktoren und Substanzen enthalten, die eine

Ausdifferenzierung von Stammzellen zur Folge haben (Rich, 2007). Somit könnte der durch die Messungen erhöhte Anteil an frühen neuronalen Zellen einen Hinweis auf eine fortlaufende Differenzierung von Progenitor- bzw. Stammzellen darstellen. Weiterhin zeigte sich, dass der Anteil an glialen Zellen in den untersuchten Zellpopulationen zwischen dem der frühen neuronalen Zellen (β -Tubulin III) und dem der späten neuronalen Zellen (MAP-2) lag.

Der Anteil an BDNF-positiven Zellen (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) lag mit Ausnahme weniger Messungen nahe 1%. BDNF ist ein neurotrophischer Faktor, der ursprünglich im Hirn, aber auch in der Peripherie, gefunden wird. Im Speziellen handelt es sich um ein Protein, welches Aktivität auf bestimmten Neuronen des ZNS und des peripheren Nervensystems gezeigt hat. Es zeigte sich, dass es das Überleben der existierenden Neuronen unterstützt und das Wachstum und die Differenzierung von neuen Neuronen und Synapsen fördert. Somit scheinen selbst geringe Mengen dieser speziellen Zellen ausreichend zu sein, um die Funktion und die Fortdauer von neuronalen Strukturen zu unterstützen. Die ermittelten Daten konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Menge an BDNF-positiven Zellen und dem Anteil an neuronalen Zellen belegen.

Vimentin ist ein Typ III-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine und damit ein Element des Zytoskeletts. Zu dieser Gruppe gehört auch das Gliafaserprotein GFAP. Vimentin kommt im Zytoplasma, teilweise auch im Nucleus, aller Zellen mesenchymaler Herkunft (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) vor. Im Gegensatz zu GFAP wurden für diesen Marker in allen Zelllinien bei allen Messungen Anteile mehr als 95 % positiver Zellen nachgewiesen. Dieses Filamentprotein stellt ein für die Zelle essentielles Protein dar, was anhand der Höhe der Expression auch bestätigt werden konnte.

4.2.2 Nachweis ausgewählter Markergene mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Außer durch den Nachweis der Expression der untersuchten Markergene mittels Durchflusszytometrie, kann die Expression der einzelnen Gene auch mit Hilfe immunzytochemischer Nachweisverfahren nachgewiesen werden. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression einzelner Gene untersucht. Es zeigte sich, dass CD133 sowohl in der Durchflusszytometrie, als auch in der Immunzytochemie eine vergleichsweise schwache Fluoreszenz-intensität aufwies. Dieses Ergebnis konnte mittels verschiedener Antikörper-isotypen bzw. Antikörperverdünnungen mehrfach reproduziert werden. Für Nestin wurde eine sehr starke Anfärbung der Filamentstruktur, die in ihrer Intensität die der CD133-Färbung um ein vielfaches übertraf, nachgewiesen. Für die weiteren untersuchten Gene CD34, MAP-2, β -Tubulin III und GFAP zeigte sich neben einer sehr unterschiedlichen Färbung auch eine variierende Intensität der Fluoreszenz.

Nestin, ein Klasse VI Intermediärfilamentprotein, wurde erstmals im sich entwickelnden ZNS nachgewiesen und wird zur Identifizierung von neuroepithelialen Stammzellen eingesetzt (Lendahl et al., 1990). Intermediärfilamente, zu denen neben Nestin auch Vimentin gehören, unterliegen während der Entwicklung des Zentralnervensystems einer fortwährenden Neuordnung. Während die multipotente Stammzelle sowohl Nestin, als auch Vimentin exprimiert, wird diese Expression in Folge neuraler Weiterentwicklung zu Gunsten von Neurofilamenten reduziert (Dahlstrand et al., 1992). Daneben zeigt die Expression von Nestin die Möglichkeit der Existenz von Tumorstammzellen in malignen Tumoren des ZNS an (Rani et al., 2006). Veselska und Mitarbeiter konnten in einer Arbeit über die Expression von Nestin in Glioblastomen das dichte Netzwerk, dass Nestin in dieser Tumorart durch das Zytoplasma ausbildet, nachweisen (Veselska et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte in allen untersuchten Glioblastomzelllinien die Färbung von Nestin im gesamten Zytoplasma detektiert werden. Hierbei stellte sich in einigen Zelllinien die filigrane Struktur der einzelnen Filamente klar und sehr intensiv dar. Diese

Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Studien überein, in denen eine Korrelation zwischen der Intensität der Nestinexpression und der Malignität von Tumoren, nachgewiesen werden konnte (Thomas et al., 2004; Yang et al., 2007). Da das Glioblastom den malignesten Grad der astrozytären Hirntumore darstellt (WHO Grad IV), wäre im Hinblick auf die von Thomas und Mitarbeiter ermittelten Daten, die hohe Intensität der Nestinfärbung zu erklären.

Für CD133, das zur Identifizierung von neuronalen Stamm- und Tumorstammzellen eingesetzt wird (Singh et al., 2004), zeigte sich trotz Sättigung unspezifischer Bindungen im indirekten Nachweisverfahren stets eine Anfärbung intrazellulärer Strukturen. Diese waren in ihrer Intensität teilweise erheblich stärker markiert als die extrazellulär gefärbten Strukturen. Hierbei könnte es sich um laszente CD133-Proteine, die bei den Ribosomen angefärbt wurden, handeln. Somit stellt sich hier der indirekte Nachweis von CD133 mittels Immunfluoreszenz als zu unspezifisch dar, um neurale Tumorstammzellen in Glioblastomzelllinien eindeutig nachzuweisen. Dennoch konnte in der Zelllinie T6433 eine deutliche Abgrenzung beider Färbungen gezeigt und somit diese Zellen eindeutig als neurale Tumorstammzellen identifiziert werden.

Der indirekte Nachweis unreifer Progenitorzellen, die mittels CD34-Antikörper identifiziert werden können, war nur bei den Zelllinien T6432 und TX3095 mit ausreichender Signalintensität wie derjenigen von CD133 entsprach, darstellbar. In den weiteren Zelllinien waren entweder keine unreifen Progenitorzellen vorhanden, oder aber die Spezifität und Sensitivität des Nachweises war sehr gering. Bei der Zelllinie T6432 lagen die untersuchten Zellen in sehr geringer Passage vor. So könnte der Nachweis CD34-positiver Zellen ebenso wie der Nachweis von CD133, abhängig von der Passagenzahl sein (Platet et al., 2007). Des Weiteren zeigte sich hier, dass Nestin zwar die Möglichkeit der Existenz einer Tumorstammzelle angibt (Rani et al., 2006), diese aber nicht gleichzeitig auch eine unreife Progenitorzelle und somit CD133-positiv sein muss.

In den Glioblastomzelllinien konnte der Nachweis neuronaler bzw. glial determinierten Zellen, jeweils mit einer vergleichbaren Sensitivität und Spezifität geführt werden.

4.3 Neurale Tumorstammzellen

Das Zentralnervensystem (ZNS) wird überwiegend von zwei verschiedenen Zelltypen, den Gliazellen und den Nervenzellen, gebildet. Das *Glioblastoma multiforme* stellt dabei einen Tumor dar, der aus den Gliazellen hervorgeht und durch ein infiltrierendes Wachstum charakterisiert wird (Kaba und Kyritsis, 1997).

Die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien weisen auf die Existenz einer einzelnen Zelle hin, die einer malignen Transformation unterlag und daraufhin zur Entstehung eines Tumors führte. Die Transformation ist dabei wahrscheinlich auf häufig stattgefundene Mutationsereignisse zurück zu führen (Grander, 1998). Somit wurde diese zur tumorinitiierenden Zelle mit der Fähigkeit zur Proliferation und Bildung von Tumoren *in vivo*. Die Tatsache, dass viele Tumore mit heterogenen Phänotypen, sowohl funktionelle als auch phänotypische Aspekte von normalen somatischen Zellen zeigen (Sell und Pierce, 1994; Reya et al., 2001), führte zu der Idee der Existenz der Krebsstammzelle (CSC, *cancer stem cell*) (Hager und Heppner, 1983).

Bis vor wenigen Jahren galt noch die Gewissheit, dass im adulten Gehirn keine Neuroneogenese stattfindet. Im Jahr 2000 konnte dies durch den Nachweis der Differenzierung proliferierender Vorläuferzellen zu Neuronen widerlegt werden (Gross, 2000). Gleichfalls konnte in Tumoren des Gehirns die Existenz von Krebsstammzellen nachgewiesen werden (Singh et al., 2003).

Der Prozess der Differenzierung von neuronalen Stammzellen wird u.a. durch ein Gleichgewicht von intrinsischen Wachstumsfaktoren gewährleistet, die neben der Zelldifferenzierung auch die Apoptose beeinflussen. Daneben üben noch eine Reihe von Signalwegen Einfluss auf die Selbsterneuerung und Differenzierung der neuronalen Stammzellen aus. Zu diesen gehören etwa der Notch-, der Wnt- oder der Sonic Hedgehog (Shh) Signalweg (Reya und Clevers, 2005; Blank et al., 2007).

Werden diese Signalwege gestört, kann dies zur Beeinträchtigung der normalen Stammzellselbsterneuerung und folglich zur Tumorentstehung führen. Somit wären die Stammzellen selbst das Ziel der Transformation, da diese aufgrund der langen Lebensspanne einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Akkumulation von Mutationen unterliegen (Reya et al., 2001).

4.3.1 Identifizierung neuraler Tumorstammzellen

Ein Charakteristikum sowohl der neuralen Stammzelle, als auch der neuralen Tumorstammzelle stellt die gleichzeitige Expression von Nestin und CD133 dar. Daneben besitzen diese Zelltypen neben der Möglichkeit der Selbsterneuerung auch die Fähigkeit sich in Neurone und Gliazellen zu differenzieren (Pilkington, 2005, Singh et al., 2004 b). Die CD133-positiven Zellen wurden hierbei mittels extrazellulärem Nachweis identifiziert (Miraglia et al., 1997; Corbeil et al., 2000), während die Nestinexpression mittels intrazellulärer Methoden bestätigt wurde (Lendahl et al., 1990; Veselska et al., 2006). Der parallele Nachweis beider Markergene als stellte sich als problematisch dar, da im indirekten Nachweis mittels Immunfluoreszenzverfahren sowohl extrazelluläre, als auch intrazelluläre Strukturen als CD133-positiv identifiziert wurden.

Dennoch gelang in den Primärzelllinien T6432 und T6433 der eindeutige Nachweis neuraler Tumorstammzellen. Neben einer intensiven roten Nestinfärbung konnte hier eine klar abgegrenzte Grünfärbung für CD133 nachgewiesen werden. Zur Erhöhung der Spezifität dieser indirekten Nachweismethode wurde die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) eingesetzt. Hierbei kann die unspezifische Färbung des Antikörpers von der eigentlichen Fluoreszenzfärbung mittels Computersoftware subtrahiert werden, was eine eindeutige Identifizierung der neuralen Tumorstammzelle ermöglichte. Zusätzlich konnte hierdurch die räumliche Anordnung eines Neurosphäroiden (NSP, *neurosphere*) ermittelt werden.

Durch den Einsatz eines PE-konjugierten Antikörpers gegen CD133 wurde ein direktes Nachweisverfahren zur Identifizierung neuraler Stamm- und Progenitorzellen etabliert. In einer Studie über diesen Zelltyp konnte in über 90 % der getesteten Glioblastomzellen eine Expression von Nestin nachgewiesen werden, die mit einer Co-Expression von CD133 einherging (Corti et al., 2007). Daher wird der alleinige Nachweis einer positiven CD133-Expression als indirekter Beweis für die Existenz einer neuralen Stammzelle angesehen (Li et al., 2006; Salmaggi et al., 2006; Zhang et al., 2006; Singh & Dirks, 2007).

Dieses Beweisverfahren wurde auch zum Nachweis neuraler Stamm- und Progenitorzellen in der Zelllinie TX3868 angewandt. Einzig Tumorstammzelllinien besitzen bei Implantation in immundefiziente Mäuser die Fähigkeit erneut einen Tumor auszubilden, der dem histopathologischen Originalbild des Ausgangstumors entspricht. Somit stellt diese Zelllinie als Xenograft den Nachweis neuraler Tumorstammzellen in der primären Glioblastomzelllinie T3868 dar. Ein Ziel dieser Arbeit stellte daher die Verifizierung der Existenz neuraler Tumorstammzellen in den TX3868-Zellen dar. Zur Analyse der Zellen wurde ein direktmarkierter CD133 Antikörper verwendet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Analyse spezieller Charakteristika neuraler Tumorstammzellen, die durch den bisherigen Einsatz immunzytochemischer Nachweisverfahren nicht nachgewiesen werden konnten. Im Durchflusszytometer konnten die TX3868-Zellen nach Besonderheiten der neuralen Tumorstammzellen in Bezug auf Größe und Granulierung untersucht werden. Dabei wurden neben normal kultivierten Zellen auch Zellen analysiert, die mit Röntgenstrahlung behandelt wurden. Im direkten Vergleich der unbehandelten und bestrahlten TX3868-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Population der CD133-positiven Zellen. Die CD133-positiven Zellen wurden hierbei durch eine mittlere Größe (FSC) und eine geringe bis hohe Granularität (SSC) charakterisiert. Das einzig abweichende Unterscheidungsmerkmal der neuralen Tumorstammzellpopulation im Vergleich zur restlichen Lebendzellpopulation, lag in der durchschnittlich geringeren Größe dieser Zellen. Es konnte somit kein eindeutiges Charakteristikum neuraler Tumorstammzellen in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, wenn sich auch die CD133-Population stets als kleine Subpopulation innerhalb der Gesamtlebendpopulation darstellte.

In jüngsten Studien konnte durch Anfärbung der zu untersuchenden Zellpopulation mit dem Farbstoff Hoechst 33342 eine Methode zur möglichen Identifikation von Stammzellen im Durchflusszytometer etabliert werden. Dabei reichern sich Stammzellen in einer Fraktion (SP, *side-population*) von Zellen an, die durch den Farbstoff nicht angefärbt werden. In weiteren Untersuchungen mit Tumorzellen, konnten mit Hilfe dieser Methode auch Krebsstammzellen identifiziert werden (Mouthon et al., 2006; Kondo, 2007; Tavaluc et al., 2007).

Inwiefern sich diese Methode der Ausschlussfärbung von Stammzellen (*side-population staining*) auf die in dieser Arbeit gefundene Charakteristik der CD133-positiven Stammzellpopulation übertragen läßt, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Bei einer Studie mit der C6-Zellen, die eine etablierte Glioblastomzelllinie der Maus darstellt, konnten Zheng und Mitarbeiter unter Einsatz sowohl des *side-population staining* als auch der Färbung mit dem CD133-Antikörper die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei den meisten der C6-Zellen um Krebsstammzellen handeln muss (Zheng et al., 2007).

Durch die Kombination beider Methoden könnte allerdings eine detaillierte Identifizierung und Charakterisierung der neuronalen Tumorstammzellen im humanen Modell erzielt werden.

4.3.2 Etablierung der Glioblastomzelllinie T6433 mit dem Ziel der Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen

In der vorliegenden Arbeit sollten neurale Tumorstammzellen eines Glioblastoms in einer Primärkultur etabliert werden. Bei Kultivierung unter suboptimalen Bedingungen verlieren Tumorstammzellen ihre pluripotenten Fähigkeiten und differenzieren in glial bzw. neuronal geprägte Zellen aus (Dirks et al., 2006). Daher sollte eine Technik zur Kultivierung dieser Zellen unter Beibehaltung ihres hochpotenten Status entwickelt werden. Zudem stellen die neuronalen Stammzellen eine anteilsmäßig geringe Subpopulation in der Zellmasse dar, daher galt es zusätzlich eine Methode zur Anreicherung neuraler Tumorstammzellen zu etablieren.

Die Zelllinie T6433 wurde sowohl in Normalmedium (NM) als auch in Stammzellmedium (SCM) etabliert. Durch den Einsatz des Stammzellmediums sollte einer möglichen Differenzierung vorhandener Stammzellen entgegenwirkt werden (Rich, 2007). Zudem wurden verschiedene Serummengen eingesetzt, um den Einfluss der Serumkonzentrationen im Medium auf den Bestand an Stammzellen in der etablierten Zellkultur zu untersuchen. In einem Ansatz wurde lediglich die Hälfte des normalen Serumgehaltes (SCM 5 %) verwendet, während der zweite Ansatz komplett serumfrei blieb (SCM 0 %). Den Stammzellmedien mussten jedoch spezielle Wachstumsfaktoren zugefügt werden, die für das Überleben aller Zellen und zur Unterbindung der Differenzierung von Stammzellen dienen (Hemmati et al., 2003; Wang et al., 2006). Dabei handelte es sich um die Wachstumsfaktoren bFGF2 (*basic Fibroblast Growth Factor 2*) und EGF (*Epidermal Growth Factor*).

Bei der Etablierung der Glioblastomzelllinie T6433 zeigten sich unterschiedliche morphologische Phänotypen innerhalb der drei verschiedenen kultivierten Ansätze. Sowohl bei der Kultivierung der T6433 NM, als auch der T6433 SCM 5 % Zellen, zeigte sich zu Beginn ein hoher Anteil an lanzettförmigen Zellen mit zwei- bis dreistrahligen Auswüchsen. Bei den T6433 NM Zellen wiesen diese einen großen Zellkörper auf, während ein geringer Anteil

der Zellpopulation eine kleine, rundliche Morphologie besaß. Nach weiterer Kultivierung konnte allerdings eine vollständige Änderung der Zellmorphologie festgestellt werden. Das Verhältnis von kleinen, rundlichen Zellen zu großen, lanzettförmigen Zellen kehrte sich komplett um. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Etablierung der T6433 SCM 5 % Zellen. Am Anfang der Kultivierung wurde ein großer Anteil an kleinen lanzettförmigen Zellen in der Zellpopulation nachgewiesen, während sich im weiteren Verlauf der Kultivierung auch hier der Anteil an Zellen mit rundlicher Morphologie stark erhöhte.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Zellen mit geringer Größe einen Wachstumsvorteil gegenüber den Zellen mit lanzettförmiger Morphologie besitzen und somit eine Selektion zugunsten dieser Zellen stattgefunden hat.

Neben den morphologischen Charakteristika können den unterschiedlich etablierten Zelllinien (NM und SCM 5 %) auch spezifische, chromosomale Modifikationen zu Eigen sein. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden sowohl von den im Normalmedium etablierten, als auch von den im Stammzellmedium mit Serum (SCM 5 %) etablierten Zellen Karyogramme erstellt. In ersten Untersuchungen konnten vier (T6433 NM) bzw. sechs (T6433 SCM 5 %) Karyogramme erfolgreich erstellt und auf chromosomale Charakteristika untersucht werden. Die wichtigsten Veränderungen werden im Folgenden diskutiert.

Die Karyogramme wiesen auf glioblastomspezifische Aberrationen, wie der Verlust von Chromosom 10 (LOH #10) oder auch Zugewinne an Chromosomen 7 hin, die in beiden Subzellpopulationen vermehrt auftraten. Zudem zeigte sich auch ein häufiger Verlust von Chromosom 16.

Zusätzlich wurden auch Aberrationen nachgewiesen, bei denen sich beide Zellpopulationen voneinander stark unterschieden. Während in der Hälfte der T6433 NM Zellen ein Verlust für Chromosom 20 detektiert wurde, zeigte sich in allen T6433 SCM 5 % Zellen ein Zugewinn. Für Chromosom 20 wurde ein Zugewinn lediglich mit einer kombinierten Amplifikation des Chromosoms 15 beschrieben (Brunner et al., 2000). Dies konnte in den untersuchten Zellen nicht bestätigt werden, hier wurde nur ein Verlust an Chromosom 15 nachgewiesen. Der Nachweis einer Amplifikation ist mittels Karyotypisierung nicht möglich und müsste durch eine array CGH (*comperative genomic hybridization*)

verifiziert werden. Außerdem wurden weitere gemeinsame numerische Veränderungen in beiden etablierten Zelllinien nachgewiesen, die hier jedoch nicht weiter besprochen werden.

Die Auswertung der Karyogramme erfolgte durch Frau Ulrike Lindemann. Eine genaue Auflistung der chromosomalen Aberrationen innerhalb der unterschiedlich etablierten T6433-Zellen kann dem Anhang entnommen werden.

Diese Veränderungen müssen den einzelnen Zellen einen Vorteil bringen, da sie in den vereinzelt Subzelllinien sehr spezifisch auftraten. Eine zytogenetische Charakterisierung dieser Aberrationen mittels array-CGH bzw. SKY (*spectral karyotyping*) könnte Aufschluss über die genauen numerischen Veränderungen geben und einen Hinweis auf spezifische Aberrationen in Stammzellen ermöglichen.

4.3.3 Anreicherung neuraler Tumorstammzellen und Induktion neuraler Tumorsphäroide in der Glioblastomzelllinie T6433 mittels spezieller Kultivierungsverfahren

Neurale Tumorstammzellen zeichnen sich unter anderem durch ihre Fähigkeit Sphäroidstrukturen, so genannte Neurosphäroide (NSP, *neurospheres*), auszubilden. Unter speziellen Kultivierungsbedingungen entwickeln sich neurale Tumorstammzellen zu Tumorsphäroiden und wachsen dann als Suspensionskultur. Diese Induktion des Sphäroidwachstums kann durch eine Kultivierung mit serumfreiem Stammzellmedium (SCM 0 %) erzielt werden (Moses et al., 2006; Hermann et al., 2006; Hung & Yang, 2006). Bereits nach kurzer Kultivierung zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung der Zellmorphologie. So nahmen die T6433 SCM 0 % Zellen eine kleine, kugelartige Form an, die in der Ausbildung räumlicher Kugelstrukturen resultierte. Diese lösten sich nach weiterer Kultivierung vom Boden des Gefäßes ab und gingen in Suspension über. Zudem zeigte sich während der Entwicklung dieser Methode, dass eine beginnende Kultivierung mit reduziertem Serumgehalt (SCM 5 %) im späteren Verlauf eine bessere Induktion der NSPs zur Folge hatte. Eine beginnende Sphäroidbildung zeichnete sich erst nach dem kompletten Entzug des Serums ab. Diese Vorgehensweise erwies sich als weitaus effektiver, als die alleinige Kultivierung unter serumfreien Bedingungen (SCM 0 %). Zwar konnte auch hier eine Entwicklung von Sphäroiden verzeichnet werden, jedoch dauerte es bis zur kompletten Bildung der Neurospheres wesentlich länger. Anscheinend benötigen die neuralen Tumorstammzellen zur Aufrechterhaltung der stammzellspezifischen Pluripotenz eine spezielle Mikroumgebung. Dieses Phänomen wurde unter dem Begriff der Stammzellnische beschrieben (Watt und Hogan, 2000). Der Begriff der Stammzellnische wurde erstmals 1998 bei der Untersuchung des blutbildenden Systems benutzt. Hier zeigte sich, dass verschiedene Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Überleben der Progenitorzellen von der Abgabe spezieller Stoffe durch andere Zellen abhängig waren, die sich aus einem Zusammenspiel von extrinsischen Signalen mit den umgebenden Zellen zusammensetzte (Quesenberry und Becker, 1998). Bei weiteren Untersuchungen konnten zwei

Signalwege identifiziert werden, die bei der Regulierung der Proliferation und der Stammzeleigenschaften eine wichtige Rolle spielen. Sowohl für den TGF β -Signalweg als auch den Wnt-Signalweg, wurden innerhalb verschiedener Spezies und Gewebe eine funktionelle Konservierung nachgewiesen. Zudem werden Gene der Wnt-Familie durch einen komplexen Signalweg, der β -Catenin beinhaltet, aktiv transkribiert (Peifer, 1999; Reya und Clevers, 2005). Dieses Protein stellt dabei eine wichtige strukturelle Komponente der Kontaktstellen zwischen zwei verbundenen Zellen dar. Viele der zur Stammzellregulierung abgesonderten Faktoren können ihre Wirkung über große Strecken, die mehrere Zelldurchmesser umfassen, entfalten. Dennoch benötigen viele Mechanismen, die ebenso zur Steuerung der Stammzellpotenz eingesetzt werden eine direkte Zell-Zell-Interaktionen (Gat et al., 1998; Zhu und Watt, 1999). Somit kann auch die Ausbildung der sphäroidalen Strukturen, die sich während der Kultivierung der T6433 SCM 0 % Zellen ausbildeten, erklärt werden. Die Kugel stellt im dreidimensionalen Raum die geringste Fläche bei größtmöglichem Volumen dar. Somit können die Faktoren, die zur Aufrechterhaltung und gezielten Richtungsweisung der pluripotenten Potenz abgesondert werden, eine hohe Anzahl an Zellen kontrollieren.

Die nach Induktion der NSPs verbliebenen Zellen wiesen eine neuronale Morphologie auf, die teilweise zu einer erneuten, sekundären Sphäroidbildung führte. Dies kann bedeuten, dass noch Zellen verblieben waren, welche die Potenz zur Sphäroidbildung besaßen, oder aber durch die Kultivierung im serumfreien Stammzellmedium erhielten weitere Zellen mittels Redifferenzierung diese Potenz. Diese Strukturen gingen allerdings im Gegensatz zu den primären Sphäroiden nicht in Suspension über. Die Stammzellnische ist nicht einzig aus Stammzellen zusammengesetzt, sondern enthält auch differenzierte Zelltypen, die durch Sekretion bestimmter Faktoren das spezifische Milieu der Stammzellnische organisieren (Fuchs et al., 2004). Somit kann angenommen werden, dass bei der sekundären NSP-Induktion keine ausreichende Zellmenge eines oder mehrerer spezifischen Differenzierungsgrade verblieben waren, um eine entsprechende Stammzellnische auszubilden. Daher wurden die sekundär entstandenen NSPs nicht vollständig ausgebildet und sind daher auch nicht in Suspension übergegangen.

Diese Theorie könnte durch eine Charakterisierung der neuralen Stammzellnische vor und nach Induktion der neuralen Tumorsphäroide untersucht werden. Dazu könnten neurale Genexpressionsarrays, auf denen spezifische Gene gespottet sind, die stammzellrelevante Signalwege repräsentieren, verwendet werden.

Die fortwährende Kultivierung der neuralen Tumorsphäroide resultierte in der Veränderung der Suspensionskultur. Neben einer Zunahme im Volumen der entstandenen Sphäroide konnte auch eine Abnahme der Menge der entstandenen NSPs verzeichnet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung dieser NSPs erbrachte den Nachweis eines beginnenden Zusammenschlusses zweier Sphäroide zu einem großen Gesamtsphäroiden. Diese Fusion zweier NSPs wurde kürzlich auch durch die Arbeitsgruppe von Singec bestätigt (Singec et al., 2006). Aus Einzelzellen entwickeln sich kleine sphäroidale Strukturen, die sich im weiteren Verlauf aufgrund der Fusion mehrerer kleinerer Sphäroide zu einem großen Sphäroid zusammenschließen. Der Grund hierfür ist bislang unbekannt.

Aufgrund der Kultivierung der T6433-Zellen in serumfreiem Medium konnte neben der Induktion der Neurosphäroide auch eine erfolgreiche Anreicherung CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Während in den T6433 NM Zellen stets weniger als 1 % CD133-positiver Zellen gemessen wurden, zeigte sich während der Induktion der Sphäroidkultur eine deutliche Erhöhung auf 13,31 % und somit ein Anreicherungseffekt neuraler Tumorstammzellen. Nach weiterer Kultivierung kam es zu einem Rückgang an neuralen Tumorstammzellen innerhalb der Suspensionskulturen, der sich allerdings bei Werten um 8 % CD133-positiver Zellen einstellte. Folglich konnte auch bei kontinuierlicher Kultivierung der neuralen Tumorsphäroide eine stabile Tumorstammzellpopulation etabliert und somit eine generelle Anreicherung dieser Zellen in der Suspensionskultur erzielt werden.

Vermutlich kam es auch innerhalb der Tumorsphäroide zur Ausbildung einer Stammzellnische, die der Differenzierung der Tumorstammzellen entgegenwirkte. Die Kugelform der Tumorsphäroide führte zu einer verbesserten Erreichbarkeit der durch Stammzellnischenzellen abgesonderten Faktoren und

infolgedessen zur Aufrechterhaltung der Neurosphäroidform und der Pluripotenz der neuralen Tumorstammzellen.

Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zeichnen sich neurale Tumorstammzellen auch durch die Potenz zur Differenzierung in Neurone und Gliazellen aus (Pilkington, 2005, Singh et al., 2004 b). Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Differenzierungsfähigkeit der induzierten NSPs zu untersuchen. Hierzu wurden die Sphäroide in Normalmedium bzw. Stammzellmedium mit 5 % Serumanteil überführt. Bereits nach kurzer Kultivierungszeit zeigte sich eine Auflösung der sphäroidalen Struktur, die im weiteren Verlauf zu einer vollständigen Wiederherstellung des populationsspezifischen Phänotyps führte. Die Analyse der Differenzierung mittels Durchflusszytometrie erbrachte zudem ein spezifisches Muster neuronaler bzw. glialer Genexpression der einzelnen T6433-Subzelllinien. So konnte nach Kultivierung der NSPs in SCM 5% Medium ein Rückgang an CD133-positiven Zellen auf etwa 3 % verzeichnet werden, während der Anteil neuronaler Tumorstammzellen in den mit Normalmedium kultivierten Zellen auf Werte unterhalb 1 % zurückging. Zudem zeigte sich hier ein wesentlich geringerer Anteil früher neuronaler Zellen (β -Tubulin III), bei gleichzeitig höherem Gehalt an späten neuronalen Zellen (MAP-2), wobei hier auch ein höherer Anteil an glialen Zellen nachgewiesen wurde.

Analog zu den nach Induktion der NSPs verbliebenen Zellen, konnte auch hier ein erhöhter Anteil an neuronalen Zellen detektiert werden. Da die Organisation der Stammzellnische sowohl durch Stammzellen, als auch durch differenzierte Zelltypen geschieht, stellt dies einen weiteren Hinweis auf die neurale Nische in den T6433 SCM 5 % Zellen dar.

4.3.4 Auswirkungen der mini-Hypoxie auf Neurospheres

Bei Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung neuraler Stammzellen (NSC, *neural stem cells*) zeigte sich, dass diese in einer physiologischen Hypoxie (1 - 5 % Sauerstoff) vorkommen können. Zudem konnte ein proliferationsfördernder Effekt des reduzierten Sauerstoffgehalts auf die neuralen Stammzellen nachgewiesen werden (Morrison et al., 2000; Zhu et al., 2005). Die meisten Untersuchungen zu den NSC werden jedoch unter normalen Zellkulturbedingungen durchgeführt, die in der Regel einen Sauerstoffgehalt von etwa 20 % aufweist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit an verschiedenen Glioblastomzelllinien erste Versuche unter physiologischen Bedingungen der mini-Hypoxie durchgeführt. Ziel war hierbei der Nachweis der Potenz zur Induktion von neuralen Tumorsphäroiden (NSP, *neurospheres*) unter Einfluss des reduzierten Sauerstoffgehaltes.

In Studien von Zhu und Mitarbeiter wurde die Bildung von primär kultivierten neuralen Sphäroiden aus mesencephalitischen NSCs der Ratte beschrieben (Zhu et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei ersten Versuchen unter mini-Hypoxie die Ausbildung neuraler Tumorsphäroide in 20 % der Fälle. Somit konnten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Zhu auch im humanen Glioblastommodell bestätigt werden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen erreichten die unter mini-Hypoxie induzierten NSPs zu keiner Zeit der Kultivierung die Größe der unter Normoxie induzierten Neurosphäroide. Mögliche Erklärungen für diese Abweichungen wären in den verwendeten Modellorganismen zu finden, da Beobachtungen aus der Ratte nicht zwangsläufig auf das humane Zellkulturmodell übertragbar sind. Des Weiteren ist das Mesencephalon ein Teil des Mittelhirn, während das Glioblastom keiner räumlichen Begrenzung im Großhirn unterliegt und aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstums auch andere Zelltypen involviert sind, die einen Einfluss auf Tumorsphäroidinduktion haben könnten.

Eine weitere Behandlung dieser induzierten Sphäroide unter mini-Hypoxie führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion des prozentualen Anteils an CD133-positiven Zellen. Dies würde einen durch die mini-Hypoxie

bedingten Rückgang an neuronalen Tumorstammzellen bedeuten, was im Widerspruch zu den Daten von Zhu und Mitarbeitern steht (Zhu et al., 2005). Sie konnten trotz mini-Hypoxie eine fortschreitende Proliferation mit geringfügiger Differenzierung nachweisen, allerdings wurden hier weder Daten über den Gehalt an NSPs, noch über den prozentualen Anteil an CD133-positiven Zellen aufgeführt. Somit kann hier nur ein indirekter Vergleich der Proliferations- bzw. Differenzierungsraten erfolgen.

In weiteren Untersuchungen zu den Auswirkungen der mini-Hypoxie auf die Proliferation von NSCs könnte sowohl durch den Nachweis des Anteils CD133-positiver Stammzellen, als auch den Anteil differenzierter Zellen der Differenzierungsgrad der untersuchten Zellpopulation indirekt ermittelt werden. In diesem Zusammenhang könnten mittels neuronaler Stammzellarrays auch Modifikationen der Genexpression ermittelt werden. So würde sich zeigen, welche stammzellspezifischen Gene bzw. Gene aus Signalwegen, einer durch Hypoxie ausgelösten Veränderung in der Genexpressionsrate unterliegen. Somit wären im Vergleich zu den neuronalen Tumorstammzellen bzw. Sphäroiden, weitergehende Rückschlüsse auf regulatorische Mechanismen in der hypoxischen Mikroumgebung des Tumors möglich.

4.3.5 Auswirkungen der Bestrahlung auf neurale Tumorstammzellen

Das Glioblastom (*glioblastoma multiforme*) gehört zur Gruppe der Gliome. Diese werden durch die Weltgesundheitsorganisation, (WHO, *World Health Organization*) in vier unterschiedliche Grade unterteilt, je nachdem wie kanzerös der einzelne Tumor sich darstellt. Dabei steht der höhere Grad auch mit einer schlechteren Überlebensprognose für den Patienten im Zusammenhang. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Zellen von Glioblastomen (WHO Grad IV) untersucht. Diese Tumore sind aufgrund ihres infiltrierenden Wachstums sehr oft nur schwer therapierbar. Zur Therapie dieser Tumore wird eine Operation, bei der möglichst die komplette Masse des Tumors entfernt werden muss, unumgänglich. Trotz des chirurgischen Eingriffs verbleiben noch Krebszellen, so dass es oft zur Tumorneubildung, einem Rezidiv, kommt, weshalb die Patienten meist weiter therapiert werden. Hierbei können neben einer Radiotherapie auch chemotherapeutische Maßnahmen eingesetzt werden, um das Wachstum des Tumors einzugrenzen.

Das ZNS ist vom Blut durch eine physiologische Barriere, der Blut-Hirnschranke, abgetrennt. Diese Schranke dient im gesunden Gewebe als Schutzmechanismus und erlaubt nur den Übertritt bestimmter Moleküle in das Gehirngewebe. Bei der Behandlung von Hirntumoren mittels Chemotherapie werden daher Stoffe eingesetzt, die diese Barriere passieren können. Zu diesen gehören DNA-schädigende Wirkstoffe, wie etwa Nitrosoharnstoffe, Temozolomid oder Procarbin oder solche, die in die DNA-Synthese eingreifen. Hierzu zählen etwa Methotrexat (MTX) oder Cytarabin (Ara-c).

Die Bestrahlungstherapie stellt bei der Therapie des Glioblastoms die wichtigste Behandlungsform mit zwei Behandlungsansätzen dar. Die häufigste angewandte Form stellt dabei die externe bzw. richtgestrahlte Radiotherapie (*external beam radiation therapy*) dar. Diese umfassen tägliche Anwendungsserien, die über Wochen fortauern, um eine sorgfältige Abgabe der Strahlendosis an den Tumor, bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes, zu gewährleisten. Daneben gibt es noch die interne Radiotherapie bzw. interstitielle

Brachytherapie, bei der ein Beutel mit radioaktiver Flüssigkeit in den Kopf eingebracht wird und somit in unmittelbarer Nähe des Tumors wirken kann.

Gerade beim Glioblastom zeigt sich aber eine Resistenz gegenüber der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, so dass angenommen wird, dass Tumorstammzellen eine Rolle bei der Tumorneuentstehung spielen können (Abbott, 2006; Liu et al., 2006; Bao et al., 2006). Kommt es bei der Bestrahlung zum Überleben einer geringen Zellpopulation mit Stammzellpotential, kann diese ausreichend sein, um eine Tumorredividivbildung zu initiieren. Solche potenziellen Krebsstammzellen, welche die Potenz zur Ausbildung eines Tumor im Xenograftmodell aufweisen, wurden von der Arbeitsgruppe von Singh identifiziert (Singh et al., 2003).

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen der Glioblastomzelllinie TX3868 mit mehreren Intervallen zu jeweils 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Bei jeder Bestrahlung wurde eine unbehandelte Kontrollpopulation parallel kultiviert und beide Ansätze mittels Durchflusszytometrie am darauf folgenden Tag analysiert. Bereits nach 10 Gy Röntgenstrahlung zeigte sich gegenüber der Kontrollpopulation ein Anstieg CD133-positiver Zellen um 4,26 %. In einem weiteren Ansatz wurde nach drei Bestrahlungsserien zu jeweils 5 Gy ein Anstieg um 11,50 % nachgewiesen. Dies stellt den höchsten Wert an neuronalen Tumorstammzellen dar, der sowohl in Tumorsphäroiden, als auch in den durch Stammzellmedien angereicherten Zellen gemessen werden konnte. Somit sind bereits geringe Dosen an Röntgenstrahlung ausreichend, um eine starke Anreicherung neuronaler Tumorstammzellen *in vitro* zu initiieren. In der Praxis werden Patienten allerdings mit größeren Gesamtdosen an Röntgenstrahlung behandelt. Daher wurden in weiteren Untersuchungen TX3868-Zellen mit mehreren Intervallen zu je 5 Gy bestrahlt. Nach einer Dosis von 35 Gy Röntgenstrahlung, wurde ein Anstieg des Anteils CD133-positiver Zellen um 5,54 % bzw. nach 40 Gy um 9,98 % nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass auch hohe Bestrahlungsdosen eine Anreicherung neuronaler Tumorstammzellen induzieren können. Da der Gehalt an CD133-positiven Zellen in den Kontrollen stets auf Werte unterhalb 1 % bestimmt werden konnte, wurde folglich in den TX3868-Zellen ein für das Ziel der Strahlentherapie gegensätzlicher Effekt

nachgewiesen. Da durch die Röntgenstrahlen sowohl Normalgewebe, als auch strahlensensitive Zellen zerstört werden, würden die neu entstandenen, strahlenresistenten Tumorstammzellen einen Selektionsvorteil besitzen. Infolgedessen könnte jeder Bestrahlungsansatz zur Entstehung neuraler, strahlenresistenter Tumorstammzellen führen und letztlich zu einer progressiven Tumorneubildung. Dies könnte einen Grund für die in Glioblastomen häufig vorkommende Rezidivbildung bzw. Strahlenresistenz darstellen.

Jede Zelllinie kann nur limitierte Aspekte des Originaltumors, von dem sie abstammt, reflektieren. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden sowohl humane Gliomxenograftmodelle, als auch Biopsiematerial von Glioblastompatienten für Versuche in immundefizienten Mäusen eingesetzt (Rich, 2007). Diese Arbeit wurde analog zu den Untersuchungen von Singh und Mitarbeitern durchgeführt, bei der die tumorinitiierenden, CD133-positiven Stammzellen erstmals nachgewiesen wurden (Singh et al., 2003). Hier zeigte sich in beiden Populationen eine Anreicherung CD133-exprimierender Zellen nach Bestrahlung, wobei hier lediglich eine Anreicherung neuraler Tumorstammzellen um den Faktor zwei bzw. vier gezeigt werden konnte (Rich, 2007).

Somit stellt sich bei der Anreicherung neuraler Tumorstammzellen nach Bestrahlung die Frage nach einem möglichen Mechanismus, der diese Tatsache erklären könnte. Bei Untersuchungen von bestrahlten CD133-positiven Zellpopulationen konnte neben einer verbesserten Reparatur von DNA-Schäden auch eine geringere Apoptoserate dieser Zellen im Vergleich zu CD133-negativen Zellen nachgewiesen werden (Bao et al., 2006; Rich, 2007). Die Analyse der Genexpression wies v.a. auf eine hohe Aktivität der Checkpointkinasen CHK1 und CHK2, bei einer generell hohen Basalaktivität von Rad17, einer Komponente im System der Checkpointerkennung von DNA-Schäden, hin. Daneben wurde bisher kein weiterer Zusammenhang einer Überexpression von Checkpointproteinen nach Bestrahlung beschrieben. Es wird daher vermutet, dass Krebsstammzellen einem generellen, genotoxischen Stress unterliegen und es daher zu einer frühen Aktivierung der Checkpoints und zur verbesserten Erkennung von DNA-Schäden in der Tumorentstehung kommt (Bartkova et al., 2006). Außerdem wird vermutet, dass verschiedene für Krebsstammzellen wichtige Signalwege, wie etwa der Wnt/ β -Catenin, der Notch oder der Sonic

Hedgehog Singalweg, zur Resistenz der Tumorstammzellen gegenüber Radiotherapie beitragen könnten (Woodward et al., 2007; Chen et al., 2007). Für Wnt und β -Catenin sind sowohl für die normale Stammzelle, als auch in der Tumorentwicklung essentielle Funktionen beschrieben worden (Reya und Clevers, 2005). Zudem wurden verschiedene Querverbindungen zwischen β -Catenin und der Kontrolle von DNA-Schäden gefunden. Dabei spielt u.a. das Protein Ku70 eine entscheidende Rolle, indem es durch seine Bindung an den Transkriptionsfaktor Tcf-4 (*T-cell factor-4*) zur gesteigerten Toleranz der Wnt/ β -Catenin Signalwege gegenüber Radiotherapie beiträgt (Idogawa et al., 2007).

Ku70 ist ein Bestandteil des DNA-abhängigen Proteinkinasekomplexes (DNA-PK), der bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur über das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) eine entscheidende Rolle spielt (Rapp und Greulich, 2004, Lieber, 2007). KUB3 (*Ku70 binding protein 3*) wurde von der Arbeitsgruppe von Yang mittels Yeast-Two-Hybrid System als Bindungspartner von Ku70 identifiziert (Yang et al., 1999). Das Gen KUB3 ist Bestandteil des X-chromosomalen HSRs in der Glioblastomzelllinie TX3868 und liegt dort amplifiziert und überexprimiert vor (Fischer et al., 2001). Daneben wird vermutet, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg einen *upstream* Effekt in der Erkennung von DNA-Schäden reguliert bzw. es zu einer verbesserten Aktivierung von Schlüsselregulatoren der Checkpointerkennung beitragen könnte (Rich, 2007).

Somit könnte über eine verbesserte Bindung des in den TX3868-Zellen überexprimiert vorliegenden KUB3 an Ku70 die in der vorliegenden Arbeit höhere Anreicherungsrate von CD133-positiven Tumorstammzellen nach Bestrahlung erklärt werden. In der Arbeit von Rich (Rich, 2007) wurde eine zwei bis vierfache Anreicherung gezeigt, während in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme von unter 1 % auf fast 12 % CD133-positiver Zellen nachgewiesen wurde. Somit könnte die Amplifikation bzw. Überexpression von KUB3 zu einer erhöhten Strahlenresistenz beitragen.

Diese Hypothese müsste allerdings in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Somit könnte eine erste Funktion von KUB3 in Tumorstammzellen ermittelt werden. Bislang wird lediglich der positive Einfluss von KUB3 auf die

DNA-Reparatur über die Bindung mit Ku70 in Tumorzellen vermutet (Fischer et al., 2001).

4.4 Ausblick

Singh und Mitarbeiter (Singh et al., 2003) konnten erstmals die Existenz von tumorinitiierenden Zellen für das Glioblastom nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Kultivierung, Induzierung und Anreicherung von neuronalen Tumorstammzellen im *in vitro* System etabliert. Daneben wurden Methoden zur gezielten Isolierung und eindeutigen Charakterisierung dieser Zellen erarbeitet, um die Grundlage für spätere Untersuchungen zur Charakterisierung der Tumorstammzellen mittels Genexpressionsarrays zu legen.

Bei der Erstellung der Genexpressionsprofile ausgewählter Markergene in den hier untersuchten Glioblastomzelllinien zeigte sich, dass jeder dieser Zelllinien ein eigenes charakteristisches Expressionsmuster zu Eigen war. Außerdem konnte bei der Etablierung der Zelllinie T6433, die Anhäufung bzw. Selektionierung von verschiedenen chromosomalen Aberrationen in den variierten Subzelllinien nachgewiesen werden.

Die hierfür angewandten Methoden stellen meist semiquantitative Nachweisverfahren dar und können die zum Zeitpunkt der Messung vorherrschenden Phänotypen nur in Ansätzen charakterisieren. So konnte ein Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen chromosomalen Veränderungen und den Phänotypen der einzelnen Markergenprofile weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden. In weiteren Untersuchungen könnte diese Fragestellung mittels array-CGH (*comperative genomic hybridization*) oder SKY (*spectral karyotyping*) näher untersucht werden, um eine genauere zytogenetische Charakterisierung möglicher Tumorstammzellen zu erhalten.

Eine weitergehende Charakterisierung des Expressionsprofils stammzellrelevanter Gene könnte zudem Aufschluss darüber geben, ob spezifische Aberrationen, wie sie in den unterschiedlich etablierten T6433-Zellen auftraten, mit der Selektion bestimmter Zellen einhergehen. Zudem könnte die Analyse dieser spezifischen Zellen Aufschluss geben, ob diese ein von der übrigen Zellpopulation abweichendes Markergenexpressionsprofil besitzen und letztlich,

ob es sich hierbei vermehrt um neurale Tumorstammzellen handelt. Im Zuge solcher Untersuchungen könnte auch analysiert werden, welches Expressionsprofil den selektionierten Zellen zu Grunde liegt und inwieweit dieses Muster mit dem der neuronalen Tumorstammzellen übereinstimmt.

Diese stellen nur eine äußerst geringe Subpopulation innerhalb der Gesamtzellpopulation dar. Um jedoch eine aussagekräftige Charakterisierung dieser Zellen gewährleisten zu können, müssten diese getrennt von der Restzellpopulation analysiert werden. Mit Hilfe der Methode der Zellseparation könnten die Zielzellen mit einer hohen Reinheit isoliert und im Anschluss das Expressionsprofil sowohl der selektionierten, als auch der neuronalen Tumorstammzellen einzeln erstellt werden.

Erste erfolgreiche Versuche zur Zellseparierung konnten mit Hilfe der Zelllinie TX3868 und dem Antikörper CD133 durchgeführt werden. Die Separierung selbst erfolgte mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS). Hierbei bindet ein Antikörper an die Zielzellen, welcher mit R-phycoerythrin (PE) konjugiert ist. Zur Detektion der nun gefärbten Zielzellen werden magnetisch-gekoppelte Antikörper, die gegen PE (anti-PE) gerichtet sind, eingesetzt. Dadurch war es möglich die gesuchten Zielzellen in einem magnetischen Feld zu arretieren, während die Zellen, die keine CD133-Expression aufwiesen und somit sowohl ungefärbt, als auch nicht-magnetisch vorlagen, durch das magnetische Feld durchflossen. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurde die magnetische Sortierung wiederholt.

Die Ausführung erster Zellsortierungen in der Glioblastomzelllinie TX3868 erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. So lag bei den unbehandelten TX3868-Zellen nach Sortierung ein Reinheitsgrad von 75,51 % CD133-positiver Zellen innerhalb der CD133-spezifischen Zellpopulation vor, während bei den mit 30 Gy behandelten Zellen lediglich eine Reinheit von 66,31 % erzielt werden konnte. In einer frisch aufgetauten TX3868-Zellpopulation wurde innerhalb der Gesamtlebendpopulation eine Reinheit von 92,56 % gemessen, während in der CD133-spezifischen Lebendzellpopulation dieser Wert bei 67,75 % lag.

Auffällig war die große Zahl toter Zellen. Durch Anfärbung der sortierten Zellen mit dem Stoff 7-AAD (**7-Amino-Actinomycin D**) konnte der Anteil an nicht mehr lebensfähigen Zellen hier auf 89,36 % in der Gesamtlebendzellpopulation

bzw. 64,59 % in der CD133-Population bestimmt werden. Für eine Weiterkultivierung dieser Zellen stellt dies ein großes Problem dar, da der Großteil der Zellen die Sortierung nicht überlebt. Wird die Zellsortierung allerdings zur Aufreinigung für weitere Applikationen, wie etwa die Isolierung von RNA, eingesetzt, so ist die Höhe der nicht mehr lebensfähigen Zellen von geringerer Wichtigkeit, als die Reinheit der Sortierung.

Die Etablierung dieser Sortierungsmethode könnte in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. So ist nun die Möglichkeit geschaffen worden die Effekte der Etablierung und der Anreicherung der neuralen Tumorstammzellen auch auf molekularer Ebene zu analysieren. Außerdem könnte die Aufreinigung angereicherter Tumorstammzellen auch in der Klärung verschiedener Fragestellungen eine Anwendungsmöglichkeit finden. Durch den Einsatz von Genexpressionsarrays könnten die Auswirkungen der Bestrahlung auf die neuralen Tumorstammzellen im Detail bestimmt werden. So wäre es wichtig zu wissen, welche Signalwege in der neuralen Tumorstammzelle aktiv sind und welche Signalwege aufgrund Bestrahlung oder Chemotherapeutika neu aktiviert bzw. inaktiviert werden.

Erste theoretische Ansätze und Versuche zur Charakterisierung neuraler Tumorstammzellen mittels Einzell-RNA-Isolierungen bzw. FACS-Sortierungen wurden bereits durchgeführt (Shin und Rao, 2006; Liu et al., 2006). Dabei zeigten sich in jeder Versuchsreihe starke Verunreinigungen der nach CD133 untersuchten neuralen Stammzellpopulationen.

Außerdem gibt es bis heute noch keinen eindeutigen Marker zur direkten Identifikation neuraler Stammzellen. Selbst für den Marker CD133, für dessen Expression bislang angenommen wurde, eine neurale Tumorstammzelle zu identifizieren (Singh et al., 2004; Galli et al., 2004), wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass auch CD133-negative Zellen existieren, die sowohl Stammzellkriterien erfüllen, als auch in Nacktmäusen tumoröses Potential aufweisen können (Beier et al., 2007).

Somit müssten die neuralen Tumorstammzellen sehr aufwendig auf indirektem Wege, mittels BrdU-Färbung, sowie der Expression der Markergene Sox1, Sox2, Musashi, MSM-2 und Nestin, jedoch ohne begleitende neuronale und gliale Genexpression identifiziert werden (Cai et al., 2003). Dabei muss

allerdings auch der limitierende Faktor, die grundsätzlich geringe Anzahl an neuronalen Tumorstammzellen, berücksichtigt werden. So würden neben der Identifizierung dieser Zellen auch für die späteren Kontrollexperimente während der Charakterisierung mittels Genexpressionsarrays, große Mengen dieser Zellen benötigt. Daher ist es dringend notwendig in weiteren Untersuchungen neben den Induktions- bzw. Kultivierungsmethoden auch die einzusetzende magnetische Sortiermethode zu verfeinern.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine erhöhte Anreicherung neuronaler Tumorstammzellen nach Bestrahlung nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen könnte nun der Zusammenhang der Überexpression von KUB3 und der Resistenz der Glioblastomzelllinie TX3868 gegenüber Radiotherapie näher untersucht werden. Hierzu wäre es notwendig den Einfluss dieser Überexpression auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg und die Ausbildung der Stammzellnische zu untersuchen, da eine alleinige Verbesserung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur diese Tatsache alleine nicht erklären kann.

5. Zusammenfassung

Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit sollte die Induzierbarkeit des Amplifikationsprozesses innerhalb der vorhandenen Amplifikationseinheit 12q13-14 nachweisen. Dazu wurde die Glioblastomzelllinie TX3868 mit Aphidicolin oder mini-Hypoxie behandelt und die dadurch induzierten Auswirkungen bezüglich des Amplifikationsprozesses analysiert und dargestellt. Hierzu zählen die Induktion von *double minutes* variabler Größe, Brüche der HSR-Strukturen und die Reintegration von *double minutes*. Dabei konnte eine bisher noch nicht beschriebene *common fragile site* in unmittelbarer Nähe des Gens KUB3 identifiziert werden.

In dem zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf neurale Tumorstammzellen untersucht werden. Die Existenz von Tumorstammzellen in Gehirntumoren konnte in früheren Studien nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt sich beim Glioblastom eine Resistenz gegenüber Röntgenstrahlung. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Verwendung spezieller Medien, sowie der Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes (mini-Hypoxie), die Bildung von Neurospheres, wie sie typisch für neurale Stammzellen ist, induziert werden. Darüber hinaus konnte die Fusion von Neurospheres mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Nach 15 Gy Bestrahlung wurde in den TX3868-Zellen ein 11,50 %-iger Anstieg neuraler Tumorstammzellen festgestellt. Eine Bestrahlung mit 40 Gy führte zu einer Steigerung der neuralen Tumorstammzellpopulation um 9,98 %. Die hier aufgezeigten Resultate verdeutlichen, dass die konventionelle Therapieform des Glioblastoms, mit dem Ziel der Zerstörung der malignen Zellpopulation, die Ausbildung gegenteiliger Effekte bedingen kann. Die Bestrahlung der Glioblastomzellen führte zu einer Anreicherung neuraler Tumorstammzellen, aus denen vermehrt neue Tumorzellen gebildet werden können.

5. Conclusion

Extrinsic factors and the glioblastoma cell:

Analysis regarding the influences of hypoxia on genetic modifications as well as of irradiation on the stem cell population.

One aspect of the present work should provide evidence that amplification can be induced within the existing amplification unit 12q13-14. For that purpose, glioblastoma cell line TX3868 was incubated with aphidicolin and mini hypoxia. The induced effects of the amplification process were analyzed and described. There were double minutes of variable size, breakages of hsr structures and reintegration of double minutes. Furthermore, a so far not described common fragile site could be identified, which is localized in proximate distance to the gene KUB3.

The second part of the present work should regard the influence of various cell culture conditions on glioblastoma derived stem cells. Former studies could demonstrate the existence of tumor stem cells in brain tumors. Furthermore, glioblastomas show resistance against irradiation. In the present work, generation of neurospheres that is typically for neural stem cells could be induced by application of different media and the reduction of oxygen partial pressure (mini hypoxia). Moreover, fusion of neurospheres was detected using immunostaining. Furthermore, irradiation of TX3868 cells lead to increasing levels of neural tumor stem cells after radiation dosages of 15 Gy (+ 11.50 %) and 40 Gy (+ 9.98 %).

The major objective of the standard therapy of glioblastomas is the elimination of malignant tissue. However, the accumulation of neural tumor stem cells after irradiation of glioblastoma cells leads probably to increased levels of tumor cells that have been arisen out of tumor stem cells.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, A. Cancer: the root of the problem. *Nature* **442**, 742-3 (2006).
- Ahmad, K. Small subsets of cells initiate brain tumours. *Lancet Oncol* **6**, 9 (2005).
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8 (2003).
- Alison, M. R., Golding, M. H. & Sarraf, C. E. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* **29**, 373-402 (1996).
- Alison, M. R. et al. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* **37**, 1-21 (2004).
- Ayene, I. S., Ford, L. P. & Koch, C. J. Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and gamma radiation. *Mol Cancer Ther* **4**, 529-36 (2005).
- Bao, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-60 (2006).
- Bartkova, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-7 (2006).
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F. & Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet* **361**, 323-31 (2003).
- Beier, D. et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* **67**, 4010-5 (2007).
- Beltrami, A. P. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763-76 (2003).
- Bhatia, M. et al. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* **186**, 619-24 (1997).
- Bigner, S. H. & Vogelstein, B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol* **1**, 12-8 (1990).

-
- Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann N Y Acad Sci* **466**, 145-66 (1986).
 - Birner, P. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* **92**, 165-71 (2001).
 - Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J. & Terzis, A. J. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* **5**, 899-904 (2005).
 - Blank, U., Karlsson, G. & Karlsson, S. Signaling pathways governing stem cell fate. *Blood* (2007).
 - Blazek, E. R., Foutch, J. L. & Maki, G. 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 (2007).
 - Brat, D. J. & Mapstone, T. B. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* **138**, 659-68 (2003).
 - Brizel, D. M. et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* **56**, 941-3 (1996).
 - Brunner, C., Jung, V., Henn, W., Zang, K. D. & Urbschat, S. Comparative genomic hybridization reveals recurrent enhancements on chromosome 20 and in one case combined amplification sites on 15q24q26 and 20p11p12 in glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* **121**, 124-7 (2000).
 - Burger, P. C., Heinz, E. R., Shibata, T. & Kleihues, P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* **68**, 698-704 (1988).
 - Burri, P. et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56**, 494-501 (2003).
 - Caccamo, D. et al. Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* **60**,

- 390-8 (1989).
- Cai, J., Limke, T. L., Ginis, I. & Rao, M. S. Identifying and tracking neural stem cells. *Blood Cells Mol Dis* **31**, 18-27 (2003).
 - Caniggia, I. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* **105**, 577-87 (2000).
 - Cavenee, W. K. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg* **92**, 1080-1 (2000).
 - Chen, K. A. et al. Fusion of neural stem cells in culture. *Exp Neurol* **198**, 129-35 (2006).
 - Chen, M. S. et al. Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J Cell Sci* **120**, 468-77 (2007).
 - Ciullo, M. et al. Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Hum Mol Genet* **11**, 2887-94 (2002).
 - Clarke, M. F. Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature* **432**, 281-2 (2004).
 - Collins, V. P. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75 Suppl 2**, ii2-11 (2004).
 - Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G. & Debatisse, M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* **89**, 215-25 (1997).
 - Coquelle, A., Rozier, L., Dutrillaux, B. & Debatisse, M. Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganucleaseI-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements. *Oncogene* **21**, 7671-9 (2002).
 - Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A. & Debatisse, M. A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell* **2**, 259-65 (1998).
 - Corbeil, D. et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is

- also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* **275**, 5512-20 (2000).
- Corti, S. et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol* **205**, 547-62 (2007).
 - Dahlstrand, J., Collins, V. P. & Lendahl, U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* **52**, 5334-41 (1992).
 - Dumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J. & Kelly, P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* **62**, 2152-65 (1988).
 - de la Fuente, B. P., Dalmau, J. & Rosenfeld, M. [Glioma therapy up-date]. *Neurologia* **22**, 159-69 (2007).
 - Debatisse, M., Coquelle, A., Toledo, F. & Buttin, G. Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. *Recent Results Cancer Res* **154**, 216-26 (1998).
 - Demirhan, O., Tastemir, D. & Sertdemir, Y. Chromosomal fragile sites in schizophrenic patients. *Genetika* **42**, 985-92 (2006).
 - Diedrich, U. et al. Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumours and correlation to prognosis. *J Neurol* **242**, 683-8 (1995).
 - Diesel, B. et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin Cancer Res* **11**, 5370-80 (2005).
 - Dirks, P. B. Brain tumor stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**, 12-3 (2005).
 - Dirks, P. B. Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature* **444**, 687-8 (2006).
 - Doetsch, F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-50 (2003).
 - Eriksson, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-7 (1998).
 - Fischer, U. et al. KUB3 amplification and overexpression in human gliomas. *Glia* **36**, 1-10 (2001).

-
- Fuchs, E., Tumber, T. & Guasch, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**, 769-78 (2004).
 - Fujisawa, H. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* **80**, 65-72 (2000).
 - Galli, R. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**, 7011-21 (2004).
 - Garcia-Barros, M. et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **300**, 1155-9 (2003).
 - Gebhart, E. Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification, in human neoplasia - a review. *Clin Transl Oncol* **7**, 477-85 (2005).
 - Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W. & Fisher, S. J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* **277**, 1669-72 (1997).
 - Glover, T. W. Common fragile sites. *Cancer Lett* **232**, 4-12 (2006).
 - Glover, T. W., Arlt, M. F., Casper, A. M. & Durkin, S. G. Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R197-205 (2005).
 - Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J. & Echo, B. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* **67**, 136-42 (1984).
 - Goda, F. et al. Comparisons of measurements of pO₂ in tissue in vivo by EPR oximetry and microelectrodes. *Adv Exp Med Biol* **411**, 543-9 (1997).
 - Gold, L. I. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* **10**, 303-60 (1999).
 - Golestaneh, N. & Mishra, B. TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma. *Oncogene* **24**, 5722-30 (2005).
 - Gracia, E. et al. Isolation of genes amplified in human cancers by microdissection mediated cDNA capture. *Hum Mol Genet* **5**, 595-600 (1996).
 - Grander, D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol* **15**, 20-6 (1998).

-
- Greco, O., Marples, B., Joiner, M. C. & Scott, S. D. How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy. *J Cell Physiol* **197**, 312-25 (2003).
 - Gritti, A., Cova, L., Parati, E. A., Galli, R. & Vescovi, A. L. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett* **185**, 151-4 (1995).
 - Gritti, A. et al. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **19**, 3287-97 (1999).
 - Gross, C. G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* **1**, 67-73 (2000).
 - Gu, H., Wang, S., Messam, C. A. & Yao, Z. Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain. *Brain Res* **943**, 174-80 (2002).
 - Gueneau, G., Privat, A., Drouet, J. & Court, L. Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix. A high-resolution autoradiographic study. *Dev Neurosci* **5**, 345-58 (1982).
 - Guo, G. & Bhat, N. R. Hypoxia/reoxygenation differentially modulates NF-kappaB activation and iNOS expression in astrocytes and microglia. *Antioxid Redox Signal* **8**, 911-8 (2006).
 - Hager, J. C. & Heppner, G. H. Breast cancer stem cells. *Prog Clin Biol Res* **132C**, 137-46 (1983).
 - Hammond, E. M., Green, S. L. & Giaccia, A. J. Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. *Mutat Res* **532**, 205-13 (2003).
 - Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38-47 (2002).
 - Hattori, N. et al. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells* **12**, 387-96 (2007).
 - Heizmann, W., Werner, H. & Herb, B. Comparison of four commercial microdilution systems for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**, 758-63 (1988).

-
- Hellman, A. et al. A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* **1**, 89-97 (2002).
 - Hemmati, H. D. et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15178-83 (2003).
 - Hermann, A. et al. Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. *J Neurochem* **98**, 629-40 (2006).
 - Hill, C., Hunter, S. B. & Brat, D. J. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Adv Anat Pathol* **10**, 212-7 (2003).
 - Hockel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**, 266-76 (2001).
 - Hockel, M. & Vaupel, P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* **28**, 36-41 (2001).
 - Horiguchi, H., Hirose, T., Sano, T. & Nagahiro, S. Loss of chromosome 10 in glioblastoma: relation to proliferation and angiogenesis. *Pathol Int* **49**, 681-6 (1999).
 - Hung, C. H. & Young, T. H. Differences in the effect on neural stem cells of fetal bovine serum in substrate-coated and soluble form. *Biomaterials* **27**, 5901-8 (2006).
 - Idogawa, M. et al. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res* **67**, 911-8 (2007).
 - Jain, R. K. et al. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* **8**, 610-22 (2007).
 - Jessberger, S., Clemenson, G. D., Jr. & Gage, F. H. Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells. *Stem Cells* **25**, 871-4 (2007).
 - Jones, J. M., Gellert, M. & Yang, W. A Ku bridge over broken DNA. *Structure* **9**, 881-4 (2001).
 - Kaba, S. E. & Kyritsis, A. P. Recognition and management of gliomas. *Drugs* **53**, 235-44 (1997).
 - Kesari, S., Jackson-Grusby, L. & Stiles, C. D. "Smad"eningly erratic: target gene methylation determines whether TGFbeta promotes or

- suppresses malignant glioma. *Dev Cell* **12**, 324-5 (2007).
- Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**, 44-51 (1999).
 - Kleihues, P. & Ohgaki, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* **28**, 164-70 (2000).
 - Kleihues, P. & Sobin, L. H. World Health Organization classification of tumors. *Cancer* **88**, 2887 (2000).
 - Klein, O. et al. [Childhood diencephalic pilocytic astrocytoma. A review of seven observations]. *Neurochirurgie* **52**, 3-14 (2006).
 - Kondo, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomark* **3**, 245-50 (2007).
 - Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Liberis, V. & Sivridis, E. Hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha expression is independent of anemia in patients with stage I endometrial cancer. *Anticancer Res* **22**, 4137-40 (2002).
 - Krex, D. et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130**, 2596-606 (2007).
 - Laugwitz, K. L. et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**, 647-53 (2005).
 - Lee, A. et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* **8**, 723-9 (2005).
 - Lee, J. et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391-403 (2006).
 - Lemoli, R. M. et al. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica* **90**, 360-81 (2005).
 - Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-95 (1990).
 - Li, M. C. et al. [Isolation and characterization of brain tumor stem cells in human medulloblastoma]. *Ai Zheng* **25**, 241-6 (2006).
 - Liao, D. & Johnson, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 281-90 (2007).
 - Lieber, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end

- joining. *J Biol Chem* (2007).
- Lim, G. et al. An integrated mBAND and submegabase resolution tiling set (SMRT) CGH array analysis of focal amplification, microdeletions, and ladder structures consistent with breakage-fusion-bridge cycle events in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **42**, 392-403 (2005).
 - Liu, G. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* **5**, 67 (2006).
 - Lofstedt, T. et al. Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle* **6**, 919-26 (2007).
 - Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**, 1145-8 (1994).
 - Lopez-Gines, C. et al. Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clin Neuropathol* **24**, 209-18 (2005).
 - Louis, D. N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol* **7**, 755-64 (1997).
 - Louis, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)* **114**, 97-109 (2007).
 - Ma, Y. H. et al. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* (2007).
 - Maas, R. M. et al. Amplification and expression of splice variants of the gene encoding the P450 cytochrome 25-hydroxyvitamin D(3) 1, alpha-hydroxylase (CYP 27B1) in human malignant glioma. *Clin Cancer Res* **7**, 868-75 (2001).
 - Maher, C. O. & Raffel, C. Neurosurgical treatment of brain tumors in children. *Pediatr Clin North Am* **51**, 327-57 (2004).
 - Majka, M., Kucia, M. & Ratajczak, M. Z. Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* **52**, 353-8 (2005).
 - Marples, B., Greco, O., Joiner, M. C. & Scott, S. D. Radiogenetic therapy: strategies to overcome tumor resistance. *Curr Pharm Des* **9**, 2105-12 (2003).
 - Michiels, C., Minet, E., Mottet, D. & Raes, M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* **33**, 1231-42 (2002).

-
- Miraglia, S. et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013-21 (1997).
 - Mirimanoff, R. O. The evolution of chemoradiation for glioblastoma: a modern success story. *Curr Oncol Rep* **8**, 50-3 (2006).
 - Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y. & Dewhirst, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* **5**, 429-41 (2004).
 - Morrison, S. J. et al. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci* **20**, 7370-6 (2000).
 - Morrison, S. J., Shah, N. M. & Anderson, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**, 287-98 (1997).
 - Morshead, C. M. et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071-82 (1994).
 - Moses, D. et al. Murine embryonic EGF-responsive ventral mesencephalic neurospheres display distinct regional specification and promote survival of dopaminergic neurons. *Exp Neurol* **199**, 209-21 (2006).
 - Mouthon, M. A. et al. Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. *J Neurochem* **99**, 807-17 (2006).
 - Mutomba, M. C. & Wang, C. C. Effects of aphidicolin and hydroxyurea on the cell cycle and differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **80**, 89-102 (1996).
 - Nelson, R. Brain-cancer stem cells may drive tumour formation. *Lancet Neurol* **4**, 17 (2005).
 - Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. & Eriksson, P. S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* **39**, 569-78 (1999).
 - Noble, M. & Dietrich, J. The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. *Trends Neurosci* **27**,

- 148-54 (2004).
- Ohgaki, H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* **25**, 1-7 (2005).
 - Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**, 1445-53 (2007).
 - Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-5 (1996).
 - Palanichamy, K., Erkkinen, M. & Chakravarti, A. in *Curr Treat Options Oncol* 490-504 (2006).
 - Pardal, R., Clarke, M. F. & Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 895-902 (2003).
 - Parlato, C., Barbarisi, M., Moraci, M. & Moraci, A. Surgery, radiotherapy and temozolomide in treating high-grade gliomas. *Front Biosci* **11**, 1280-3 (2006).
 - Peifer, M. Signal transduction. Neither straight nor narrow. *Nature* **400**, 213-5 (1999).
 - Pencea, V., Bingaman, K. D., Freedman, L. J. & Luskin, M. B. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* **172**, 1-16 (2001).
 - Pfenninger, C. V. et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* **67**, 5727-36 (2007).
 - Pilkington, G. J. Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Prolif* **38**, 423-33 (2005).
 - Platet, N. et al. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* (2007).
 - Preusser, M., Haberler, C. & Hainfellner, J. A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* **156**, 332-7 (2006).
 - Quesenberry, P. J. & Becker, P. S. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15155-7 (1998).
 - Rani, S. B., Mahadevan, A., Anilkumar, S. R., Raju, T. R. & Shankar, S. K. Expression of nestin--a stem cell associated intermediate filament in

- human CNS tumours. *Indian J Med Res* **124**, 269-80 (2006).
- Rapp, A. & Greulich, K. O. After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci* **117**, 4935-45 (2004).
 - Raza, S. M. et al. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* **51**, 2-12; discussion 12-3 (2002).
 - Reifenberger, G. & Collins, V. P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* **82**, 656-70 (2004).
 - Reifenberger, G. et al. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* **56**, 5141-5 (1996).
 - Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K. & Collins, V. P. Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site. *Cancer Res* **55**, 731-4 (1995).
 - Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843-50 (2005).
 - Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11 (2001).
 - Rich, J. N. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* **67**, 8980-4 (2007).
 - Rodesch, F., Simon, P., Donner, C. & Jauniaux, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* **80**, 283-5 (1992).
 - Rofstad, E. K., Sundfor, K., Lyng, H. & Trope, C. G. Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis. *Br J Cancer* **83**, 354-9 (2000).
 - Sakata, K. et al. Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in normal and tumor tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**, 161-7 (2001).
 - Salmaggi, A. et al. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and

-
- enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* **54**, 850-60 (2006).
- Schiebe, M. et al. Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors. *J Neurooncol* **49**, 197-203 (2000).
 - Schwab, M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* **9**, 319-25 (1999).
 - Schwab, M. et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* **308**, 288-91 (1984).
 - Seemayer, T. A. & Cavenee, W. K. Molecular mechanisms of oncogenesis. *Lab Invest* **60**, 585-99 (1989).
 - Sell, S. & Pierce, G. B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* **70**, 6-22 (1994).
 - Semenza, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* **88**, 1474-80 (2000).
 - Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32 (2003).
 - Semenza, G. L. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* **5**, 405-6 (2004).
 - Semenza, G. L. & Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54 (1992).
 - Seri, B. et al. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**, i103-11 (2006).
 - Shi, Y., Sun, G., Zhao, C. & Stewart, R. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol* (2007).
 - Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T. & Kanda, T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* **302**, 233-43 (2005).
 - Shin, S. & Rao, M. S. Large-scale analysis of neural stem cells and progenitor cells. *Neurodegener Dis* **3**, 106-11 (2006).

-
- Singec, I. et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* **3**, 801-6 (2006).
 - Singh, S. & Dirks, P. B. Brain tumor stem cells: identification and concepts. *Neurosurg Clin N Am* **18**, 31-8, viii (2007).
 - Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T. & Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* **23**, 7267-73 (2004).
 - Singh, S. K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-8 (2003).
 - Singh, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
 - Spangrude, G. J., Heimfeld, S. & Weissman, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62 (1988).
 - Studer, L. et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**, 7377-83 (2000).
 - Stupp, R., Hegi, M. E., Gilbert, M. R. & Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* **25**, 4127-36 (2007).
 - Stupp, R., van den Bent, M. J. & Hegi, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* **5**, 198-206 (2005).
 - Talks, K. L. et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* **157**, 411-21 (2000).
 - Tamura, K., Adachi, Y., Chiba, K., Oguchi, K. & Takahashi, H. Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J* **29**, 771-81 (2002).
 - Tang, H. L. & Zhu, J. H. Epigenetics and neural stem cell commitment. *Neurosci Bull* **23**, 241-8 (2007).
 - Tavaluc, R. T., Hart, L. S., Dicker, D. T. & El-Deiry, W. S. Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer

- cell lines. *Cell Cycle* **6**, 2554-62 (2007).
- Terskikh, A. V., Bryant, P. J. & Schwartz, P. H. Mammalian stem cells. *Pediatr Res* **59**, 13R-20R (2006).
 - Thomas, S. K., Messam, C. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. & Ross, R. A. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **279**, 27994-9 (2004).
 - Toescu, E. C. Hypoxia response elements. *Cell Calcium* **36**, 181-5 (2004).
 - Tripathy, D. & Benz, C. C. Activated oncogenes and putative tumor suppressor genes involved in human breast cancers. *Cancer Treat Res* **63**, 15-60 (1992).
 - Tunici, P. et al. Brain tumor stem cells: new targets for clinical treatments? *Neurosurg Focus* **20**, E27 (2006).
 - Uchida, N. et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14720-5 (2000).
 - Unruh, A. et al. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* **22**, 3213-20 (2003).
 - Van de Kelft, E. Molecular pathogenesis of astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* **139**, 589-99 (1997).
 - Vaupel, P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* **14**, 198-206 (2004).
 - Vaupel, P., Mayer, A. & Hockel, M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* **381**, 335-54 (2004).
 - Venkitaraman, A. R. Medicine: aborting the birth of cancer. *Nature* **434**, 829-30 (2005).
 - Vescovi, A. L., Galli, R. & Gritti, A. The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed Pharmacother* **55**, 201-5 (2001).
 - Vescovi, A. L., Galli, R. & Reynolds, B. A. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 425-36 (2006).
 - Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D. & Weiss, S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* **11**, 951-66 (1993).
 - Veselska, R. et al. Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* **6**, 32 (2006).

-
- Vogt, N. et al. Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11368-73 (2004).
 - von Deimling, A., Louis, D. N., Schramm, J. & Wiestler, O. D. Astrocytic gliomas: characterization on a molecular genetic basis. *Recent Results Cancer Res* **135**, 33-42 (1994).
 - Wang, T. T. et al. Neural stem cells: isolation and differentiation into cholinergic neurons. *Neuroreport* **17**, 1433-6 (2006).
 - Warner, J. K., Wang, J. C., Hope, K. J., Jin, L. & Dick, J. E. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* **23**, 7164-77 (2004).
 - Watt, F. M. & Hogan, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-30 (2000).
 - Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. & Huttner, W. B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12425-30 (1997).
 - Weinberg, R. A. How cancer arises. *Sci Am* **275**, 62-70 (1996).
 - Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-68 (2000).
 - Westermarck, B. & Nister, M. Molecular genetics of human glioma. *Curr Opin Oncol* **7**, 220-5 (1995).
 - Woodward, W. A. et al. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 618-23 (2007).
 - Yang, C. R. et al. Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res* **27**, 2165-74 (1999).
 - Yang, X. et al. Nestin expression in different tumors and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol* (2007).
 - Zagorska, A. & Dulak, J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* **51**, 563-85 (2004).
 - Zhang, Q. B. et al. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res* **16**, 909-15 (2006).
 - Zheng, X., Shen, G., Yang, X. & Liu, W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res* **67**,

-
- 3691-7 (2007).
- Zhong, H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**, 5830-5 (1999).
 - Zhou, R. & Skalli, O. TGF-alpha differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility. *Exp Cell Res* **254**, 269-78 (2000).
 - Zhu, A. J. & Watt, F. M. beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* **126**, 2285-98 (1999).
 - Zhu, L. L., Wu, L. Y., Yew, D. T. & Fan, M. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol* **31**, 231-42 (2005).

7. Anhang

7.1 Chromosomale Modifikationen bei den mit unterschiedlichen Medien etablierten T6433-Zellen

7.1.1 Tabellarische Zusammenfassung der chromosomalen Aberrationen*

	T6433 -> NM (4 Karyogramme)		T6433 -> SCM 5% (6 Karyogramme)	
	Verlust	Gewinn	Verlust	Gewinn
Chr. 1	1		1	
Chr. 2				1
Chr. 3	1		1	
Chr. 4	1			
Chr. 5			1	1
Chr. 6	1			1
Chr. 7		4		6
Chr. 8	3		2	
Chr. 9	1		1	
Chr. 10	2		5	
Chr. 11	1		1	
Chr. 12			2	
Chr. 13		1		
Chr. 14	1		6	
Chr. 15	2		2	
Chr. 16	4		5	
Chr. 17	2	1		2
Chr. 18	2			1
Chr. 19	1	1		
Chr. 20	2			6
Chr. 21	1	1		1
Chr. 22	2		4	1
X-Chr.	1	1	2	

*Aufgelistet ist jeweils die Anzahl an zusätzlichen Chromosomen bei vier (NM) bzw. sechs (SCM 5%) untersuchten Karyogrammen. So bedeutet bei Chromosom 16 in den SCM 5%-Zellen die Zahl 5, dass bei fünf von sechs dieser untersuchten Karyogramme weniger Chromosomen 16 identifiziert wurden, als im Chromosomensatz vorherrschen müssten.

7.1.2 Detaillierte Auflistung der Karyogrammdaten der unterschiedlich etablierten T6433-Zelllinien*

T6433 NM
90, XXXX, 6q-, +7, +7, -8, 10p-, -16, -16, -22
80, XXX, -1, -1, 6q-, 6q-, +7, +7, -8, 8p?, -9, -10, -10, 10p-, -11, -11, 12q+, -16, -16, -17, -18, -18, -18, -22
141, XXXXX, -3, -4, -6, -6, -6, 6q-, +7, +7, +7, +7, +7, +7, +7, +7, -8, -10, -10, -10, 10p-, +13, -14, -14, -14, -14, -15, -15, -15, -16, -16, -16, -17, -17, -18, -18, -18, -19, -20, -20, -21, 22q+, -X, -X
76, XXXX, 6q-, +7, +7, +7, -10, 10p-, -15, -16, -16, +17, +17, +19, +20, +20, +20, +21, 22q+, +X
T6433 SCM 5 %
87, XXX, -X, -3, der6, +7, +7, der8, -10, -10, -12, 14p+, -16, -16, +17, +20, -22, 22q+
92, XXXX, 5q-, -5, der6, +7, 10p-, 14p+, -14, -15, -16, -16, +20, +20, 22q+, +22, +mar, +mar, +mar
90, XXX, -X, der6, +7, +7, der8, 10p-, -12, -14, -14, -16, +18, +20, +20, -22, -22
92, XXX, 5q-, +der6, +7, +7, der8, 10p-, -14, 14p-, -15, +20, +21, +21, -22, -22
92, XXXX, -1, +2p-, iso4q, +5, der6, +7, +7, +7, -8, -8, +10, -14, -14, -16, -16, +20, +20, 22q+, +mar
91, XXXX, der6, +7, +7, +7, +7, -8, 9p-?, -9, 10p-?, -10, -11, -14, -14, -16, -16, +17, +17, +20, +20, 22q+, -22

*Der erste Zahlenwert spiegelt hier die Anzahl der Chromosomen innerhalb der untersuchten Metaphase wider. Die aufgelisteten X-Chromosome geben den Grad der Polyploidie an (XXX = triploid), der = verändertes Chromosom, (-) entspricht einem Verlust, (+) einem Zugewinn

Beide etablierten Subpopulationen wiesen gemeinsame, glioblastomspezifische Veränderungen (Verlust von Chromosom 10, Zugewinn von Chromosom 7) auf. Zusätzlich konnten auch gemeinsame numerische Aberrationen bei beiden Subzelllinien identifiziert werden. So wurden bei diesen Verluste der Chromosomen 1, 3, 8, 9, 11, 14 und 15, sowie hohe Verluste der Chromosomen 16 nachgewiesen werden, allerdings nur geringfügige Zugewinne (Chromosom 17).

Weiterhin kam es auch zu einzelnen charakteristischen chromosomalen Abberationen (T6433 NM: Zugewinn Chr. 13, Verlust an Chr. 18; T6433 SCM 5 %: Verluste an Chr. 12, hohe Verluste an Chr. 14).

7.2 Fallzahlen der vollstationär aufgenommenen Patienten für die ICD10 Position C71 (*Glioblastoma multiforme*)*

ICD-10-4	Geschlecht	Summe	Alter von ... bis bzw. unter ... Jahren																					
			unter 1	1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	40-45	45-50	50-55	55-60	60-65	65-70	70-75	75-80	80-85	85-90	90-95	95-∞	unbekannt
C710	m	884	5	54	40	32	18	8	13	23	45	45	49	88	83	92	115	88	52	25	6	3	0	0
C710	w	640	2	59	43	58	11	1	9	9	19	25	22	45	44	62	72	59	57	30	12	1	0	0
C711	m	2.160	0	8	20	6	12	22	52	120	172	230	238	214	214	283	259	173	72	49	14	1	1	0
C711	w	1.793	0	3	9	3	9	7	45	85	138	193	205	166	158	207	227	143	118	64	11	2	0	0
C712	m	2.325	8	15	8	21	21	31	34	95	120	187	194	265	300	303	333	209	133	32	14	1	1	0
C712	w	1.575	0	21	9	32	10	23	38	42	72	100	129	152	158	218	232	174	85	55	23	0	2	0
C713	m	1.398	0	6	26	15	8	9	60	63	61	106	142	136	123	166	221	123	93	35	2	3	0	0
C713	w	1.060	1	0	4	36	26	16	10	26	52	61	67	79	90	166	141	126	89	54	12	3	1	0
C714	m	425	2	3	3	2	2	1	7	10	4	23	34	50	30	72	71	56	36	16	3	0	0	0
C714	w	361	0	0	3	1	12	0	4	3	7	14	25	27	44	44	53	45	48	28	2	1	0	0
C715	m	218	4	59	9	61	7	9	7	3	8	8	6	11	3	6	7	5	2	3	0	0	0	0
C715	w	146	1	26	27	14	9	2	4	16	6	10	7	2	4	1	10	3	4	0	0	0	0	0
C716	m	1.540	15	411	406	190	187	91	20	35	22	42	14	19	8	20	23	19	9	6	3	0	0	0
C716	w	770	11	133	135	105	76	64	43	59	18	21	21	21	9	13	10	14	9	5	1	2	0	0
C717	m	587	1	113	137	47	40	19	25	12	19	20	25	19	14	16	19	47	10	3	1	0	0	0
C717	w	389	0	61	62	64	34	20	4	14	16	22	11	14	18	14	12	7	11	3	2	0	0	0
C718	m	2.472	26	114	79	76	27	34	52	109	153	165	203	275	253	249	308	172	108	54	12	3	0	0
C718	w	1.685	2	59	73	46	33	28	48	48	58	117	139	109	165	181	212	150	121	73	18	5	0	0
C719	m	3.440	16	300	165	146	90	61	104	141	171	256	209	291	270	337	403	250	151	63	11	5	0	0
C719	w	2.653	10	158	155	113	76	53	62	125	145	233	156	193	184	257	245	187	165	100	27	9	0	0

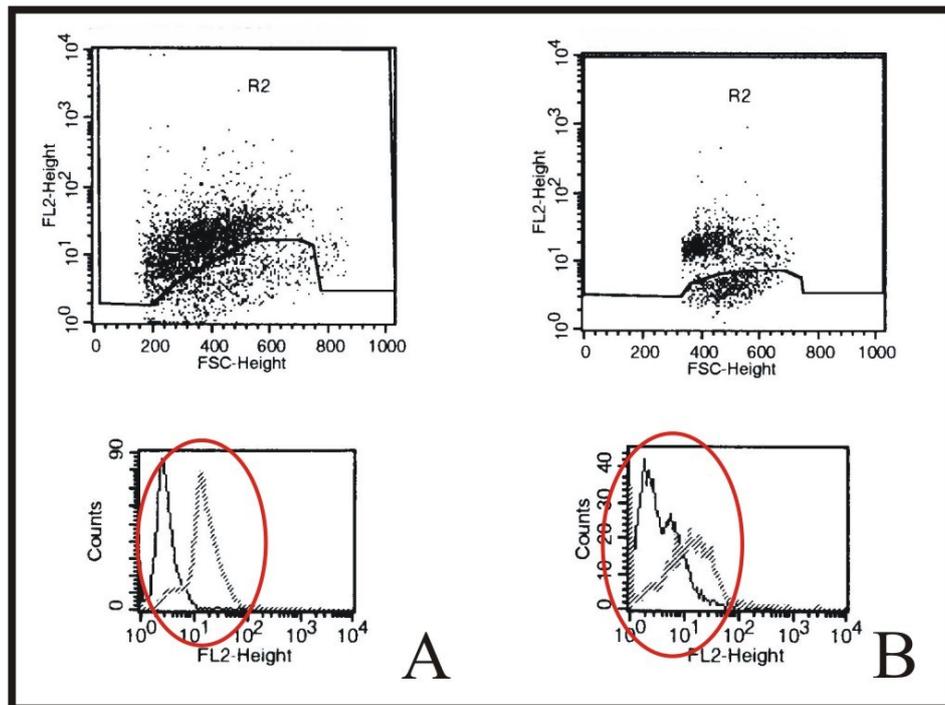
*Quelle: Statistisches Bundesamt, Krankenhausdiagnosestatistik © Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2007. Vervielfältigung und Verbreitung, auch auszugsweise, mit Quellenangabe gestattet; m = männlich, w = weiblich

Die Tabelle enthält Daten für das Jahr 2005 über aus dem Krankenhaus entlassene vollstationäre Patientinnen und Patienten (einschließlich der Sterbe- und Stundenfälle), sortiert nach ausgewählten ICD-10-4-Stellen (ICD, *The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), Altersgruppen und dem Geschlecht.

Hierbei stehen die vierstelligen Zahlen in der ersten Spalte für folgende Erkrankungen:

C710	Bösartige Neubildung: Zerebrum, ausgenommen Hirnlappen und Ventrikel
C711	Bösartige Neubildung: Frontallappen
C712	Bösartige Neubildung: Temporallappen
C713	Bösartige Neubildung: Parietallappen
C714	Bösartige Neubildung: Okzipitallappen
C715	Bösartige Neubildung: Hirnventrikel
C716	Bösartige Neubildung: Zerebellum
C717	Bösartige Neubildung: Hirnstamm
C718	Bösartige Neubildung: Gehirn, mehrere Teilbereiche überlappend
C719	Bösartige Neubildung: Gehirn, nicht näher bezeichnet

7.3 MACS-Sortierung der durch Bestrahlung angereicherten neuralen Tumorstammzellen in TX3868



MACSortierung von CD133-positiven Zellen aus unbehandelten (A) und mit insgesamt 30 Gy (B) bestrahlten TX3868-Zellen; in der unteren Reihe sind jeweils die Anzahl der gezählten Zellen in Abhängigkeit zur Höhe der Fluoreszenz dargestellt, die schwarze Kurve stellt mit einer Antikörperkontrolle gefärbten Zellen dar, die graue Kurve die gefärbten Zielzellen.

Nach der magnetischen Sortierung der TX3868-Zellen konnte für die unbehandelten Zellen (A) eine Reinheit von 75,51 % CD133-positiver Zellen gemessen werden, während die mit insgesamt 30 Gy behandelten Zellen (B) in einem Reinheitsgrad von 66,31 % vorlagen. Somit konnte der Gehalt der CD133-positiven Zellen in jedem Fall um mindestens 50 % (s. 3.2.3.4, höchster gemessener Wert hier: 11,50 %) erhöht werden.

Eidesstattliche Versicherung:

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den 18. Dezember 2007