

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**STAMMZELLEIGENSCHAFTEN VON TUMOREN
MIT NEURALLEISTENURSPRUNG**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sara Ardabili
aus **Hamburg**
Kiel **2016**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Mentlein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. K. Klettner
Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.04.2017

gez.: Priv.-Doz. Dr. M. Böttner
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGEN	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumorstammzellhypothese	1
1.2 Stammzellmarker	3
1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren	7
1.4 Untersuchte Tumorentitäten	11
1.4.1 Mammakarzinom	11
1.4.2 Kleinzelliges Lungenkarzinom	12
1.4.3 Melanom	13
1.4.4 Neuroblastom	13
1.5 Fragestellung	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Zelllinien	16
2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer	17
2.1.3 Biochemikalien	19
2.1.4 Peptide und Enzyme	21
2.1.5 TaqMan® Primer und Sonden	21
2.1.6 Antikörper	22
2.1.7 Gebrauchsfertige Kits	23
2.1.8 Geräte	23
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2 Realtime-RT-PCR	25
2.2.3 Fluoreszenz-Immunzytochemie	29
2.2.4 Western Blot	30
2.2.5 Statistische Analysen und Auswertung	33

3	ERGEBNISSE	34
3.1	Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren	34
3.1.1	Transkription von embryonalen Stammzellmarkern	34
3.1.2	Transkription von neuronalen Stammzellmarkern	35
3.1.3	Transkription von Chemokinrezeptoren	36
3.2	Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren	37
	Zusammenfassung 3.1 und 3.2	39
3.3	Einfluss der Chemokine CXCL11 und CXCL12 auf die Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren	40
3.4	Einfluss des neuronalen Stammzellmediums auf die Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren	45
	Zusammenfassung 3.3 und 3.4	49
4	DISKUSSION	51
4.1	Stammzellmarker bei humanen Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung	52
4.2	Chemokinrezeptoren und Regulation durch Chemokine	53
4.3	Regulation durch neurales Stammzellmedium	56
4.4	Ursprung der Tumorstammzellen und Ausblick	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
	DANKSAGUNG	83
	LEBENS LAUF	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Tumorstammzellhypothese	1
Abbildung 2: Bedeutung der Tumorstammzellen für die Tumorthherapie	3
Abbildung 3: Chemokine in der Tumorbilogie	7
Abbildung 4: Struktur der vier Chemokingruppen	8
Abbildung 5: Signaltransduktion am Chemokinrezeptor	9
Abbildung 6: Transkription von embryonalen Stammzellmarkern in humanen Tumorzelllinien	35
Abbildung 7: Transkription von neuronalen Stammzellmarkern in humanen Tumorzelllinien	36
Abbildung 8: Transkription von Chemokinrezeptoren in humanen Tumorzelllinien	37
Abbildung 9: Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in humanen Tumorzelllinien	38-39
Abbildung 10: Regulation der Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11	42
Abbildung 11: Regulation der Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Lungenkarzinom-Zelllinie OH3 durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11	43
Abbildung 12: Regulation der Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Neuroblastom-Zelllinie SKNSH durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11	44
Abbildung 13: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium	46
Abbildung 14: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Lungenkarzinom-Zelllinie OH3 durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium	47
Abbildung 15: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Melanom-Zelllinie Lox durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium	48

Abbildung 16: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Neuroblastom-Zelllinie SKNSH durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium	49
Abbildung 17: Ursprung der Tumorstammzelle	59
Abbildung 18: Therapieprinzipien für Tumorstammzellen	61

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Marker zur Identifizierung von Tumorstammzellen in soliden Tumoren	4
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

ABKÜRZUNGEN

Allgemeine Abkürzungen, Einheiten sowie Zeit- und Maßangaben sind nicht aufgeführt.

α	griech. Buchstabe Alpha, hier teilweise anti
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HEPES	4,2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor: <i>epidermal growth factor</i>
FKS	Fötales Kälberserum
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
ICC	Immunzytochemie
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
I-TAC	= CXCL11: <i>Interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>
kDa	kilo Dalton
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDF-1 α	= CXCL12: <i>Stromal cell-derived factor-1α</i>
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan

1 EINLEITUNG

1.1 Tumorstammzellhypothese

Die Idee, dass ein Tumor nicht aus einem einheitlichen Klon mutierter Zellen besteht, sondern ein Gewebe mit sehr unterschiedlich differenzierten Zellen ist, an deren Spitze eine Stammzelle steht, ist nicht neu. Bereits 1855 postulierte der deutsche Pathologe Rudolf Virchow, basierend auf seinen Beobachtungen histologischer Ähnlichkeiten zwischen Tumorgewebe und embryonalem Gewebe, dass maligne Tumore aus embryonalem Restgewebe hervorgehen. Diese später erweiterte „Embryonal-Rest“-Theorie entwickelte sich schließlich zur Tumorstammzellhypothese, die besagt, dass ein Tumor aus einer kleinen Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften, den so genannten Tumorstammzellen (*Cancer stem cells* - CSCs), hervorgeht. Nur diese haben das Potential, einen Tumor zu initiieren, sich in die verschiedenen Zellarten zu differenzieren und sich durch eine asymmetrische Zellteilung uneingeschränkt selbst zu regenerieren (*self-renewal*) (Clarke et al., 2006) (siehe Abb.1). Dieses hierarchische Modell der Tumorstammzellhypothese steht im Gegensatz zum bisher favorisierten so genannten stochastischen Modell, nach dem jede Zelle eines Tumors tumorigene Eigenschaften besitzt.

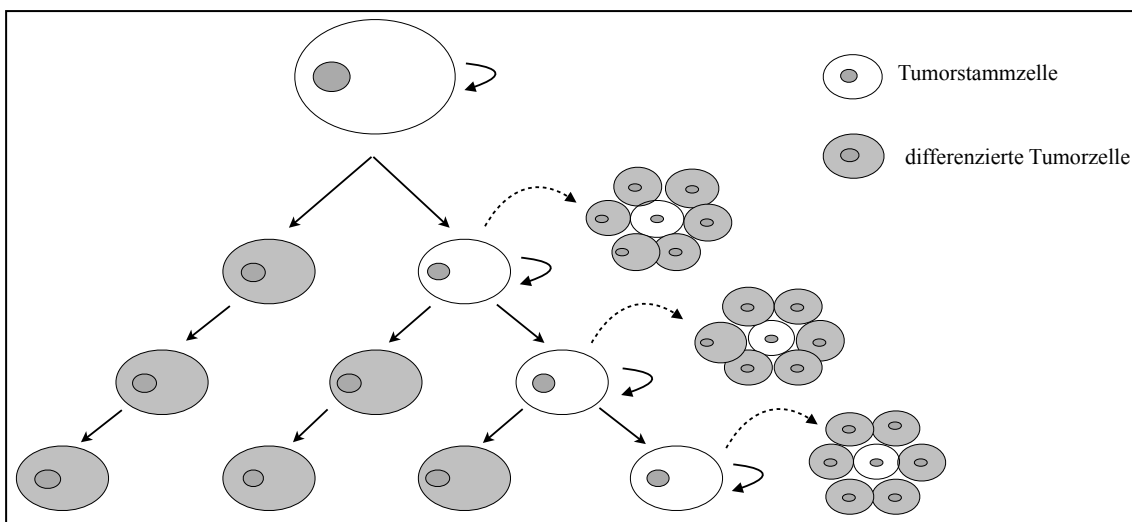


Abb. 1: Tumorstammzellhypothese. Nach dem hierarchischen Modell der Tumorstammzellhypothese hat nur eine kleine Subpopulation von Tumorstammzellen das Potential, einen neuen Tumor zu initiieren, sich in die verschiedenen Zellarten zu differenzieren und sich selbst zu regenerieren.

Als Erstes konnten die Tumorstammzellen bei den Leukämien nachgewiesen werden. Bereits in den 1960er und 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil der primären Leukämiezellen in der Lage ist, erneut einen Tumor zu initiieren (Bruce und Van Der Gaag, 1963; Park et al., 1971; Hamburger und Salmon, 1977). In den 1990er Jahren gelang es Wissenschaftlern dann zum ersten Mal, die vermuteten Tumorstammzellen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) sicher nachzuweisen und zu isolieren: 100 Leukämiezellen, die ein Oberflächenproteinexpressionsmuster trugen, das von Stammzellen der Hämatopoese bekannt war (CD34⁺, CD38⁻), konnten im Tiermodell eine AML auslösen, während die weiteren Leukämiezellen auch in tausendfach höherer Anzahl nicht dazu in der Lage waren (Bonnet und Dick, 1997; Lapidot et al., 1994).

Inzwischen ist es gelungen, Tumorstammzellen bei weiteren Leukämieformen und auch bei einer Vielzahl von soliden Tumoren wie z.B. der Brust (Al-Hajj et al., 2003), der Prostata (Collins et al., 2005), der Haut (Schatton et al., 2008), des Gehirns (Singh et al., 2003), des Darms (Dalerba et al., 2007) oder der Lunge (Eramo et al., 2008) zu identifizieren.

Trotz erfolgreicher initialer Behandlung kommt es bei den allermeisten Tumorpatienten zu einem Rezidiv. Mit der Theorie der Tumorstammzelle kann dieses Phänomen jetzt erklärt werden: Die klassische Chemo- und auch Strahlentherapie richtet sich gegen Zellteilungsmechanismen und trifft daher vor allem sich schnell teilende Zellen wie Progenitor- und differenzierte Zellen, die die Tumormasse ausmachen. Die kleine Subpopulation an Tumorstammzellen, die sich extrem selten teilt, aber den eigentlichen Ursprung des Tumors darstellt, bleibt übrig und bildet das Rezidiv. Des Weiteren verfügen die Tumorstammzellen über diverse zelluläre Mechanismen, sich der klassischen Therapie zu entziehen: Dazu gehören z.B. ein effektiverer DNA-Reparaturmechanismus (Bao et al., 2006; Duru et al., 2012; Facchino et al., 2010; Wang et al., 2012), eine vermehrte Aktivität von anti-apoptotischen Signalwegen (Ma et al., 2008) oder eine Überexpression von Transporterproteinen (ABC-Transporter), die für die Elimination von Chemotherapeutika aus der Zelle verantwortlich sind (Doyle et al., 1998; Pardal et al., 2003; Frank et al., 2005; Lou et al., 2007). Für viele Tumore konnte inzwischen gezeigt werden, dass die klassische Chemo- und Strahlentherapie nur einen

sehr begrenzten bis gar keinen Effekt auf die Tumorstammzellen hat (Bao et al., 2006; Hermann et al., 2007; Ho et al., 2007; Ma et al., 2007).

Während derzeit das Therapieansprechen in erster Linie durch die Reduktion des Tumolvolumens beurteilt wird, sollte laut Anhängern der Tumorstammzellhypothese in Zukunft eher die Reduktion der Tumorstammzellen in den Fokus gerückt werden. Denn diese gezielt zu eliminieren oder durch Differenzierung einer klassischen Chemo- oder Strahlentherapie zugänglich zu machen, sollte dem Tumor seine Regenerationsfähigkeit nehmen und müsste so langfristig zu einer kompletten Remission führen (Baumann et al., 2008; Dingli und Michor, 2006; Clarke et al., 2006) (siehe Abb. 2).

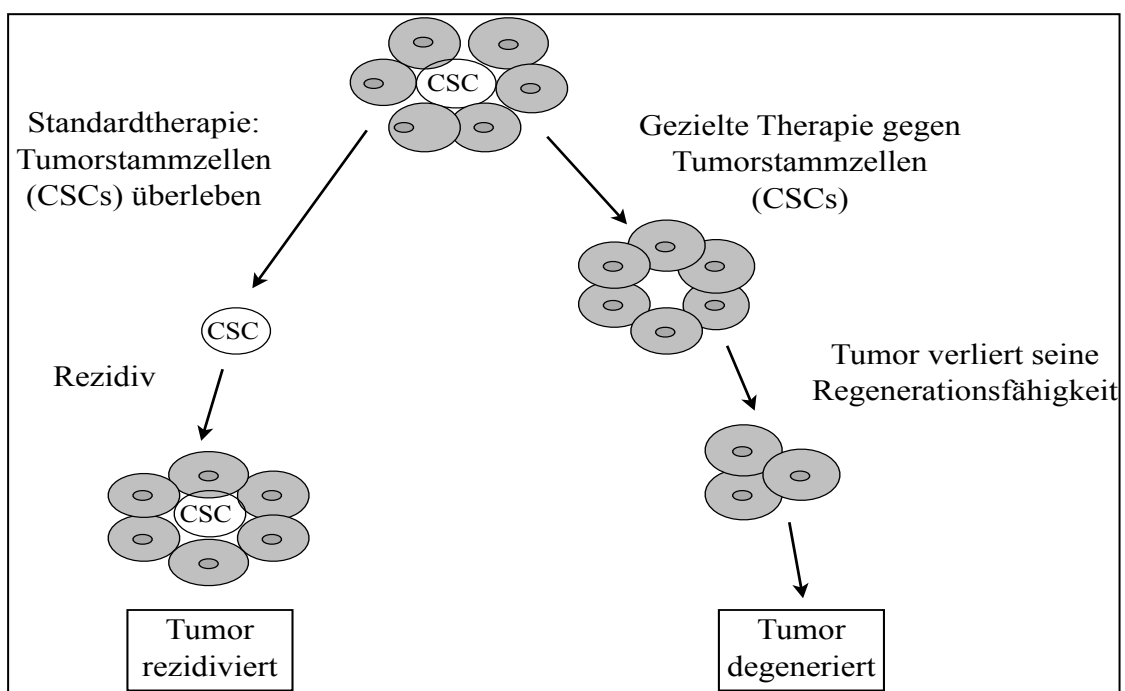


Abb. 2: Bedeutung der Tumorstammzellen für die Tumorthherapie. (nach Reya et al., 2001)

1.2 Stammzellmarker

Um die Tumorstammzellen gezielt eliminieren zu können, ist es von wesentlicher Bedeutung, diese anhand von spezifischen Markern zu identifizieren.

Die ersten in diesem Zusammenhang entdeckten Zelloberflächenmarker waren CD34 und CD38 ($CD34^+CD38^-$) für die AML und CD44 und CD24 ($CD44^+CD24^-$) für den ersten soliden Tumor, das Mammakarzinom. Inzwischen sind eine ganze Reihe weiterer

Marker bei den verschiedensten Tumorentitäten etabliert worden. Eine kurze Übersicht darüber gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Marker zur Identifizierung von Tumorstammzellen in soliden Tumoren. Die gelisteten Tumorentitäten, Marker und Referenzen stellen eine Auswahl dar.

Tumorentität	Marker	Referenz
Mammakarzinom	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} CD133 ⁺ CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺ ALDH1 ⁺ Oct4 Sox2	(Al-Hajj et al., 2003) (Wright et al., 2008) (Hwang-Verslues et al., 2009) (Ginestier et al., 2007) (Ponti et al., 2005) (Leis et al., 2012)
Lungenkarzinom	CD133 ⁺ CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺ ALDH1 ⁺	(Eramo et al., 2008) (Bertolini et al., 2009) (Jiang et al., 2009)
Glioblastom	CD133 ⁺	(Singh et al., 2004)
Prostatakarzinom	CD44 ⁺ /α ₂ β ₁ ^{high} /CD133 ⁺ CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺	(Collins et al., 2005) (Miki et al., 2007)
Kolonkarzinom	CD133 ⁺ ALDH1 ⁺ , EpCAM ⁺ / CD44 ⁺	(O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007) (Dalerba et al., 2007)
Melanom	CD20 ⁺ ABCB5 ⁺	(Fang et al., 2005) (Schatton et al., 2008)
Leberkarzinom	CD133 ⁺ CD90 ⁺	(Ma et al., 2007) (Yang et al., 2008)
Pankreaskarzinom	CD133 ⁺ CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺ ALDH1 ⁺ EpCAM ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ⁺	(Hermann et al., 2007) (Hermann et al., 2007) (Feldmann et al., 2007; Jimeno et al., 2009; Rasheed et al., 2010) (Li et al., 2007)
Ösophaguskarzinom	Oct4, Sox2 CD44 ⁺	(Huang et al., 2009) (Zhao et al., 2011)
Cervixkarzinom	ALDH1 ⁺ Oct4, Sox2	(Yao et al., 2011) (Feng et al., 2009)

CD = cluster of differentiation; ALDH1 = Aldehyd-Dehydrogenase 1; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; EpCAM = epithelial cell adhesion molecule; ABCB5 = ATP-Bindekassette Subfamilie B Mitglied 5.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Stammzellmarker kurz näher erläutert werden:

Nanog (abgeleitet von Tir na nOg, dem „Land der ewigen Jugend“) ist ein Transkriptionsfaktor, der neben *Oct4* (*octamer binding transcription factor 4*), *Sox2* (*sex determining region Y-box 2*) und *cMyc* (*myelocytomatosis oncogene homolog*) eine Schlüsselrolle in der Steuerung und Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen einnimmt. Seine Überexpression in embryonalen Stammzellen der Maus ist für deren Selbsterneuerung wichtig, während seine Abwesenheit deren Differenzierung in endodermale Zellen bewirkt (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003).

Oct4 und *Sox2* sind zwei kooperierende Transkriptionsfaktoren, die für eine normale Embryonalentwicklung von Säugetieren essentiell sind (Niwa et al., 2000; Masui et al., 2007; Rizzino et al., 2009). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Lebensfähigkeit der Maus-Klone direkt von einer korrekten Expression von *Oct4* abhängt. Dabei hat sein Fehlen je nach Entwicklungsphase des Embryos unterschiedliche Auswirkungen (Wu et al., 2014). *Oct4* zeigt viele, teils noch nicht ausreichend verstandene Wechselwirkungen mit anderen Transkriptions- und Kofaktoren. Dazu gehört auch *Sox2*. Dieser spielt zusätzlich zu den embryonalen Stammzellen auch bei den neuralen Stammzellen eine wichtige Rolle (Komitova et al., 2004). Bei einigen Tumoren, wie z.B. dem Mamma-, dem Ösophagus-, dem Rektum- oder dem Adenokarzinom der Lunge korreliert die Expression von *Oct4* und *Sox2* mit einer schlechteren Prognose (Lengerke et al., 2011; Saigusa et al., 2009; Wang et al., 2009), erhöhter Tumorigenität (Nakatsugawa et al., 2011) oder Strahlenresistenz (Debeb et al., 2010).

cMyc kann neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor Histon-Acetyltransferasen rekrutieren und so die Transkription bestimmter Gene gleich auf zwei Arten erhöhen. *cMyc* ist für die Regulation von ca. 15% der menschlichen Gene verantwortlich, v.a. für Gene, die für die Proliferation von Zellen wichtig sind. Daher wird es auch als Protoonkogen bezeichnet. Bei vielen Tumoren ist das Myc-Gen mutiert, sodass *cMyc* dort konstitutiv exprimiert wird. Die Expression von *cMyc* korreliert hier oft mit einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognose (Lin et al., 2012; Beroukhim et al., 2010; Nesbit et al., 1999). Des Weiteren spielt *cMyc* eine wichtige Rolle bei der

Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung z.B. von hämatopoetischen Stammzellen (Wilson et al., 2004).

Klf4 (*Krüppel-like-factor 4*) ist ein epithelialer Transkriptionsfaktor, der im Darm, der Haut, dem Gefäßendothel (Shields et al., 1996) und embryonalen Stammzellen (Li et al., 2005) vorkommt und eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Epithelzellen des Intestinums (Shields et al., 1996) und der Epidermis (Segre et al., 1999) spielt. *Klf4* wirkt antiproliferativ, indem es in die Expression von Genen des Zellzyklus eingreift. Bei einer Vielzahl an Tumoren, wie z.B. beim Kolon-, Lungen- oder Pankreaskarzinom entfaltet es seine Wirkung als Tumorsuppressor (Patel et al., 2010; Hu et al., 2009; Zammarchi et al., 2011). Des Weiteren spielt *Klf4* bei immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle.

Mit Hilfe der Transfektion von *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* und *Klf4* mittels eines Retrovirus gelang es Takahashi und Yamanaka 2006, aus Fibroblasten der Maus pluripotente Stammzellen herzustellen. Ein Jahr später gelangen die Experimente auch mit menschlichen Zellen (Takahashi et al., 2007).

Musashi ist ein RNA-bindendes Protein und greift damit in die Regulation der Gentranslation ein. Es wird in neuralen Stammzellen exprimiert und ist dort für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung wichtig (Okano et al., 2005). Des Weiteren scheint es auch eine Rolle in epithelialen Stammzellen des Darms zu spielen (Potton et al., 2003; Sureban, 2008). Bei Gliomen korreliert die Expression von *Musashi* mit deren Malignität und Proliferation (Kanemura et al., 2001).

CD133 (auch Prominin 1 genannt) ist ein transmembranes Glykoprotein, das ursprünglich als Marker für neuroepitheliale und hämatopoetische Stammzellen klassifiziert wurde (Yin et al., 1997; Mizrak et al., 2008). Seine spezifische Funktion ist bis heute nicht abschließend geklärt, es wird aber eine Funktion in der Organisation der Topologie der Zellmembran angenommen (Weigmann et al., 1997; Corbeil et al., 2001). Es wird zur Isolation von Stamm- und Progenitorzellen verschiedener adulter Gewebe genutzt. 2003 konnten Singh et al. zeigen, dass humane Hirntumore, wie z.B. das Glioblastom, einen Anteil an CD133+-Zellen besitzen. Inzwischen ist *CD133* bei vielen Tumoren als Tumorstammzellmarker bekannt (siehe Tabelle 1). In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der *CD133*-Expression und einer schlechteren Prognose oder Therapieresistenz der Tumorzellen gezeigt werden (Li et al., 2009; Horst

et al., 2008; Metellus et al., 2011; Shin et al., 2013; Sasaki et al., 2010; Bao et al., 2006). Inzwischen gibt es aber auch einige Studien, die die Bedeutung von *CD133* als Tumorstammzellmarker abschwächen, so dass dessen Bedeutung kontrovers diskutiert wird (Shmelkov et al., 2008; Beier et al., 2011; Dittfeld et al., 2010).

1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Schon lange ist bekannt, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der Tumorbiologie einnehmen: Sie nehmen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen, beeinflussen die Rekrutierung von Immunzellen, fördern die Metastasierung und steuern die Angiogenese und Neovaskularisation (O'Hayre et al., 2008, siehe Abb. 3).

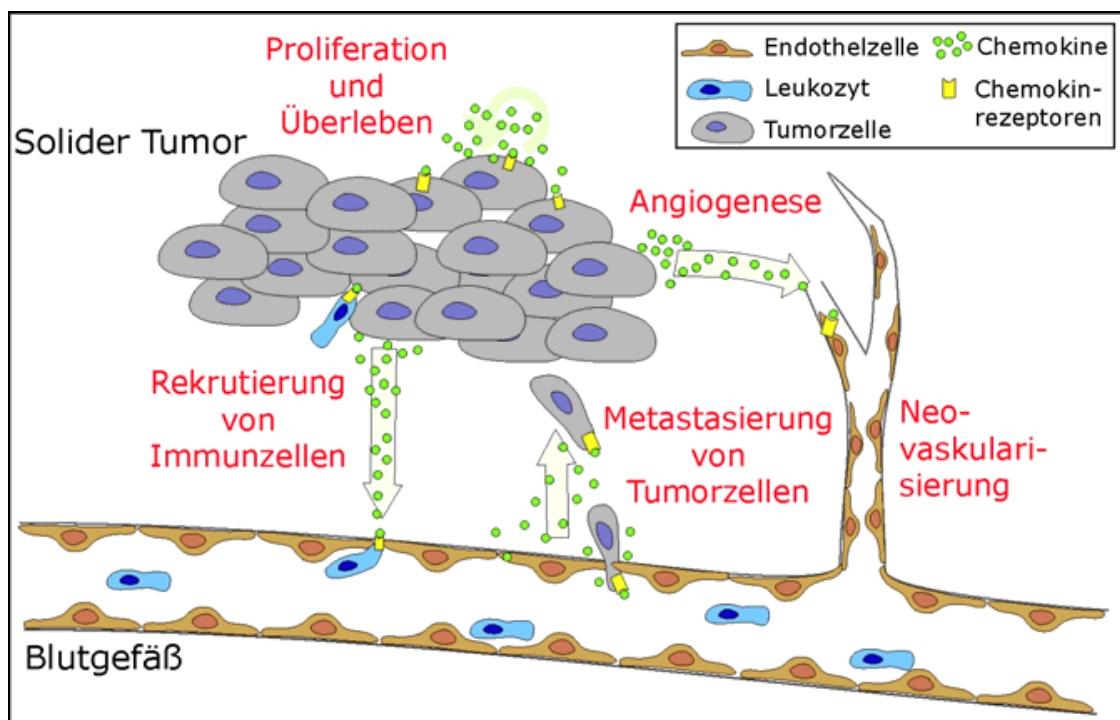


Abb. 3: Chemokine in der Tumorbiologie. Chemokinrezeptoren werden von vielen Tumorzellen exprimiert. Die Chemokine nehmen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen, beeinflussen die Rekrutierung von Immunzellen, fördern die Metastasierung und steuern die Angiogenese und Neovaskularisation. (Mentlein et al., 2013)

Ebenso spielen einige von ihnen eine wichtige Rolle in der Mobilisation und Wanderung von Stammzellen (Burns et al., 2006). Vor diesem Hintergrund liegt es auf der Hand, dass ihnen auch im Rahmen des Tumorstammzellkonzepts eine wichtige

Bedeutung zugeschrieben wird. Der Chemokinrezeptor *CXCR4* beispielsweise ist schon lange als Tumorstammzellmarker etabliert (siehe Tabelle 1).

Die Chemokine, die zu der Gruppe der Zytokine gehören, wurden nach ihrer ursprünglich charakterisierenden chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten benannt (*chemotactic cytokine*).

Sie sind kleine, von verschiedenen Zelltypen sezernierte 8-12 kDa schwere Polypeptide und bestehen aus drei antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix. Am N-terminalen Ende befinden sich vier über Disulfidbrücken verbundene Cysteinreste, die für ihre tertiäre Struktur verantwortlich sind. Anhand der Position der ersten beiden konservierten Cysteinreste unterteilt man die Chemokine in vier Untergruppen (Zlotnik et al., 2006): Bei den CXC-/ α -Chemokinen werden die ersten beiden Cysteinreste durch eine nicht-konservierte Aminosäure getrennt, bei den CC-/ β -Chemokinen sind die ersten beiden Cysteinreste direkt benachbart, bei den C-/ γ -Chemokinen gibt es nur einen der beiden Cysteinreste und daher auch nur eine Disulfidbrücke und beim CX3C-/ δ -Chemokin (Fraktalkin) sind die ersten beiden Cysteinreste durch drei nicht-konservierte Aminosäuren getrennt (siehe Abb. 4).

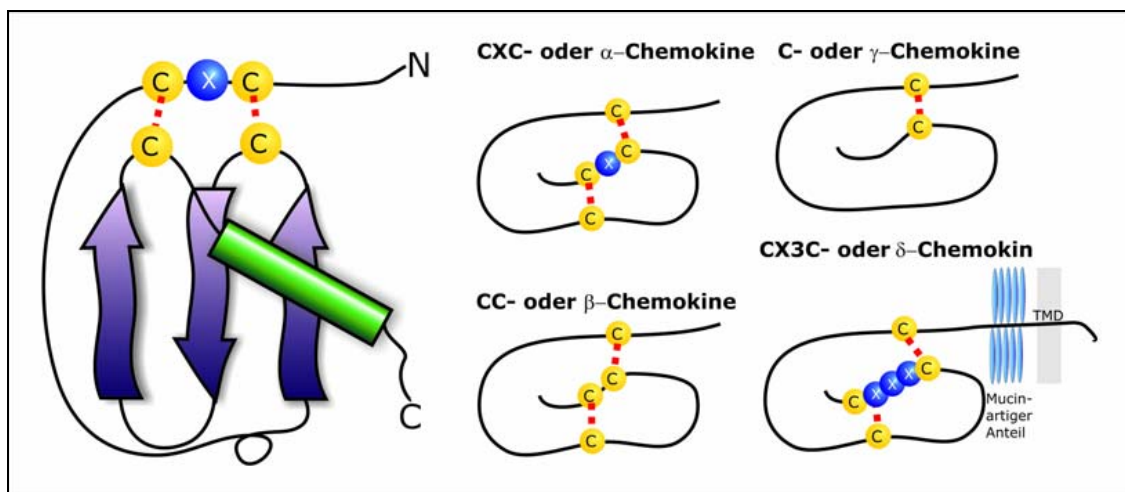


Abb. 4: Struktur der vier Chemokingruppen. C = Cysteinrest, X=beliebige Aminosäure, - - - = Disulfidbrücke, TMD = hydrophobe Transmembrandomäne (Mentlein et al., 2013)

Die Rezeptoren der Chemokine sind heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden nach der Struktur ihrer Liganden ebenfalls in vier Gruppen eingeteilt. Sie sind 340-370 Aminosäuren lang und bestehen aus sieben transmembranen α -Helices, die durch drei intra- und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen verbunden sind. Der N-

Terminus befindet sich extrazellulär, der C-Terminus mit Serin- und Threoninresten intrazellulär (Allen et al., 2007). An der zweiten intrazellulären Schleife befindet sich fast immer ein DRY-Motiv, das für die Signaltransduktion essentiell ist. Rezeptoren ohne dieses Motiv (= *decoy*-Rezeptoren) sind für die Regulation der Chemokinkonzentration verantwortlich, indem sie die Chemokine zwar binden, aber keine Signaltransduktion auslösen.

Die Signaltransduktion erfolgt durch ein heterotrimeres G_i -Protein, dessen $G_{i\alpha}$ -Untereinheit von der $G_{i\beta}$ - und $G_{i\gamma}$ -Untereinheit nach Bindung des Chemokins an den Rezeptor dissoziiert. Über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und anschließender Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) und schließlich Calcium, wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche über die Phosphorylierung verschiedener Proteine eine Signalkaskade in Gang setzt und so für die zelluläre Reaktion auf das Chemokin sorgt. Der Rezeptor wird nach seiner Aktivierung an den Serin- und Threoninresten seines C-Terminus phosphoryliert, wodurch die Bindung von β -Arrestin ermöglicht wird. β -Arrestin blockiert nun die Bindungsstelle des G-Proteins (Desensitivierung des Rezeptors) und sorgt für eine Internalisierung des Rezeptors. Dieser wird nun entweder in den Lysosomen abgebaut oder an die Zelloberfläche zurücktransportiert. Des Weiteren kann auch durch β -Arrestin eine Signaltransduktion über Aktivierung verschiedener Kinasen erfolgen (siehe Abb. 5).

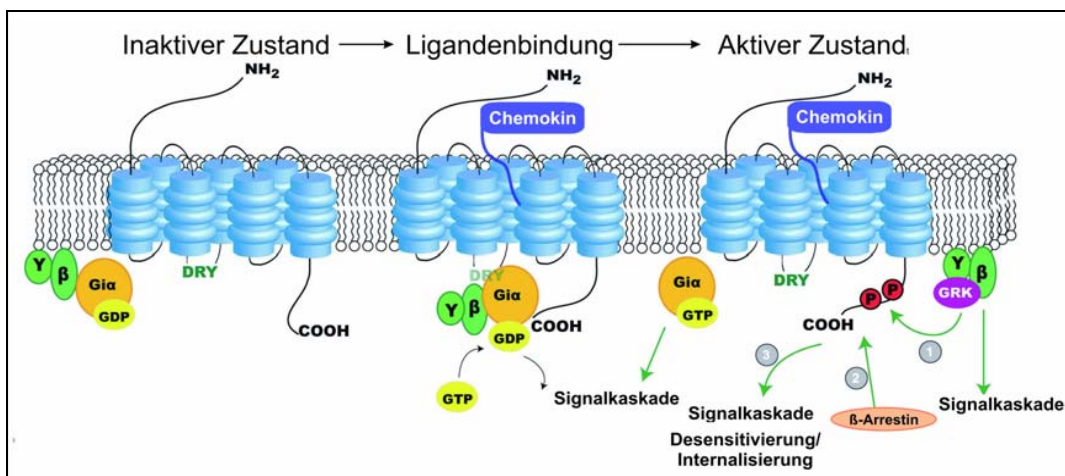


Abb. 5: Signaltransduktion am Chemokinrezeptor. Nach Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor dissoziiert die G_{α} - von der $G_{\beta/\gamma}$ -Untereinheit und löst damit eine Signalkaskade aus, die zur zellulären Reaktion führt. Durch Phosphorylierung des C-Terminus des Rezeptors kann dort β -Arrestin binden und sorgt für eine Desensitivierung und Internalisierung des Rezeptors, welcher dann lysosomal abgebaut oder an die Zelloberfläche zurücktransportiert wird. Des Weiteren kann auch über β -Arrestin eine Signalkaskade ausgelöst werden. (O'Hayre et al., 2008)

Im menschlichen Körper gibt es über 50 verschiedene Chemokine und 23 Chemokinrezeptoren.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten Chemokinrezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* und ihre Liganden *CXCL11* und *CXCL12* kurz näher erläutert werden:

CXCL12, oder auch SDF-1 (*stromal-cell-derived-factor-1*) genannt, bindet an die Rezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* (Duda et al., 2011). Es wird von einer Vielzahl an Zellen, wie z.B. Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Gliazellen, sezerniert und spielt eine Schlüsselrolle bei diversen physiologischen Prozessen, wie z.B. in der Entwicklung des Nervensystems und des Herzens, der Mobilisation und Wanderung von Stammzellen, der Angiogenese, der Lympho- und Myelopoese und der Leukozytenmigration (Burns et al., 2006). Daneben besitzt *CXCL12* durch die Internalisierung des Rezeptors *CXCR4* eine hemmende Wirkung auf HI-Viren (Bleul et al., 1996) und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren (Mentlein et al., 2013).

Der Rezeptor *CXCR4* wird auf Stammzellen, hämatopoetischen Zellen, Leukozyten, Endothelzellen und auch auf diversen Tumorzellen exprimiert. Durch diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine und unter hypoxischen Bedingungen wird die *CXCR4*-Expression gesteigert. Lange war er der einzig bekannte Rezeptor für *CXCL12*. 2005 gelang es Balabanian et al. nachzuweisen, dass auch der Rezeptor *CXCR7* das Chemokin *CXCL12* spezifisch bindet und nach der Bindung internalisiert wird. *CXCL12* bindet mit zehnfach höherer Affinität an *CXCR7* als an *CXCR4*. *CXCR7* wurde ursprünglich als Rezeptor ohne Liganden, als so genannter Orphan-Rezeptor RDC1, entdeckt. Seine Ähnlichkeit zu konservierten Domänen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ließen vermuten, dass es sich um einen CXC-Chemokinrezeptor handelt, was Burns et al. 2006 beweisen konnten. *CXCR7* galt anfangs nur als *decoy*-Rezeptor für *CXCL12*, neuere Studien konnten aber die Auslösung einer Signalkaskade über β -Arrestin zeigen (Rajagopal et al., 2010).

CXCL11 oder auch I-TAC (*interferon-inducible T-cell-chemoattractant*) ist ein weiterer Ligand von *CXCR7*, der allerdings nur mit einer zehnfach geringeren Affinität als *CXCL12* an diesen bindet. Außerdem bindet *CXCL11* auch noch an den Rezeptor *CXCR3*.

CXCR7 ist an mehreren physiologischen Prozessen, wie z.B. der Entwicklung des Herzens (Sierro et al., 2007) oder der Chemotaxis von T-Zellen und Dendritischen Zellen beteiligt (Balabanian et al., 2005). Des Weiteren scheint er auch in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle zu spielen; er konnte schon auf verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden. Dabei sind die Effekte seiner Aktivierung von Gewebe zu Gewebe verschieden: Beim Mammakarzinom fördert die *CXCL12/CXCR7*-Interaktion z.B. die Zellproliferation (Burns et al., 2006), beim Prostatakarzinom dagegen die Invasivität und das Zellüberleben (Wang et al., 2008), beim Glioblastom sorgt er für einen erhöhten Schutz vor Apoptose (Hattermann et al., 2010) und beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom führt seine Expression zu einer Resistenz gegen Chemotherapeutika (Goldmann et al., 2008). Auch ist er an der Regulation der Vaskularisierung der Tumoren beteiligt (Miao et al., 2007).

1.4 Untersuchte Tumorentitäten

Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorentitäten kurz näher vorgestellt werden. Als Vertreter für die Tumore mit Neuralleistenursprung haben wir das kleinzellige Lungenkarzinom, das Melanom und das Neuroblastom gewählt, als Vergleichspartner ohne Neuralleistenursprung das Mammakarzinom.

1.4.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit etwa 31% in den westlichen Ländern die häufigste Krebserkrankung der Frau. Dabei handelt es sich um eine maligne Entartung der Drüsenepithelien der Brust, bei der das Wachstum entweder von den Epithelien der Drüsengänge oder der Läppchen ausgeht. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 70.000 Frauen mit einem Altersgipfel zwischen 45 und 75 Jahren neu an einem Mammakarzinom. Bei Männern dagegen ist es eine Rarität. Die Mortalität liegt bei etwa 18.000 Todesfällen pro Jahr und nimmt seit Mitte der 1990er Jahre trotz steigender Inzidenz aufgrund der früheren Diagnosestellung und konsequenter und neuer medikamentöser Therapiestrategien ab.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des Mammakarzinoms gehören das weibliche Geschlecht, ein höheres Alter, ein westlicher Lebensstil und Adipositas, eine frühe Menarche und späte Menopause, die Hormonsubstitution und eine Strahlenexposition. In 5-10% der Fälle liegt eine genetische Prädisposition, am häufigsten eine Mutation im BRCA-1- (*breast cancer gene*) oder BRCA-2-Gen, vor.

Histologisch wird das Mammakarzinom in zwei große Gruppen, das nicht-invasive Karzinom (*Carcinoma in situ*) (15-20%) und das invasive Karzinom (80-85%), und Sonderformen (<5%) unterteilt. Innerhalb der beiden Gruppen wird dann nochmal zwischen duktal (Duktales Carcinoma in situ 95%; invasiv duktal >70%) und lobulär (Lobuläres Carcinoma in situ 5%; invasiv lobulär 10%) unterschieden. Die klinische Einteilung und das *Staging* erfolgen nach der TNM-Klassifikation, welche die Tumoren anhand der Kategorien Größe (T=Tumor) und das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknoten-Metastasen (N=Nodes) und Fernmetastasen (M=Metastasen) beurteilt. Wichtige prognostische Faktoren sind außerdem der Hormonrezeptor- und der HER2/neu-Status.

Die Therapie des Mammakarzioms erfolgt primär chirurgisch und schließt in Abhängigkeit vom Befund eine Polychemo- und Hormontherapie sowie eine Bestrahlung an die OP an.

1.4.2 Kleinzelliges Lungenkarzinom

Das kleinzellige Lungenkarzinom (*small cell lung cancer* - SCLC) macht 15-25% aller Lungenkarzinome aus. In Deutschland treten jährlich 10.000 Neuerkrankungen mit einem Altersgipfel zwischen 55-65 Jahren auf. 35-40% der Patienten sind älter als 70 Jahre. Das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt bei 5:1, wobei in den letzten Jahren die Inzidenz bei den Frauen deutlich zugenommen hat, während sie bei den Männern dagegen langsam gesunken ist.

Der wichtigste Risikofaktor der SCLC ist das Rauchen. 80-95% aller Patienten sind oder waren Raucher. Aber auch andere Karzinogene wie z.B. Asbest, Radon und aromatische Kohlenwasserstoffe, spielen in der Tumorentstehung eine Rolle.

Das SCLC ist häufig zentral intrapulmonal lokalisiert und ist durch eine hohe Zellteilungsrate und rasche Wachstumsprogredienz charakterisiert, durch welche seine

hohe Strahlen- und Chemosensibilität begründet ist. Allerdings hat das SCLC durch seine starke Rezidivneigung und frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung v.a. ins ZNS, Skelett, Leber und Nebennieren eine äußerst ungünstige Prognose, die auch deutlich schlechter als die des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non small cell lung cancer* - NSCLC) ist. Die klinische Einteilung und das Staging erfolgen nach der TNM-Klassifikation. Die mittlere Überlebenszeit wird zwischen 7 und 20 Monaten angegeben. Unbehandelt führt das SCLC innerhalb von 2-4 Monaten zum Tod.

1.4.3 Melanom

Das Melanom ist der häufigste und bösartigste maligne Hauttumor. Er geht von den Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Haut und der Schleimhaut, aus.

Die Inzidenz ist in der weißen Bevölkerung weltweit zunehmend, besonders bei stark sonnenexponierten hellhäutigen Bevölkerungsgruppen, und beträgt in Mitteleuropa 10-12 und in Australien 50-60 pro 100.000 Einwohner im Jahr.

Hauptrisikofaktoren sind ein heller Hauttyp, eine hohe Anzahl an Nävi und eine starke UV-Exposition, wobei hier insbesondere intermittierende Sonneneinwirkungen in der Kindheit (Anzahl der Sonnenbrände) eine zentrale Rolle spielen.

Das Melanom zeichnet sich durch eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung aus.

Histologische Subtypen und *Grading* spielen beim Melanom eine untergeordnete Rolle. Entscheidend für die Prognose sind vielmehr die vertikale Tumordicke nach Breslow, die Invasionstiefe nach Clarke, eine mikroskopische Ulzeration der Oberfläche und eine Mikrometastasierung in Wächterlymphknoten. Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation. Die Therapie erfolgt primär chirurgisch. Eine Bestrahlung, eine Chemotherapie oder die Gabe von Interferon α kann in einigen Fällen indiziert sein. Ca. 90% aller Melanome werden als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert. Die Überlebensrate liegt bei 75-80%.

1.4.4 Neuroblastom

Das Neuroblastom ist mit einer Inzidenz von ca. 1:7000 Lebendgeburtenshäufigkeit der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kindes. Er macht ca. 8% aller Krebserkrankungen im

Kindesalter unter 15 Jahren aus. 90% der Neuroblastome werden bis zum Ende des 5. Lebensjahres diagnostiziert, 40% bereits im Säuglingsalter. Der Tumor entsteht aus unreifen entarteten Zellen des sympathischen Nervensystems. Daher kann das Neuroblastom überall dort auftreten, wo sich sympathisches Nervengewebe befindet. Meistens ist er aber im Nebennierenmark oder im Grenzstrang, dem Nervengeflecht entlang der Wirbelsäule, lokalisiert. Eine Metastasierung findet v.a. in die Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber und Haut statt.

Die Symptome des Neuroblastoms sind sehr vielfältig, abhängig von der Lokalisation, Größe und Metastasierung des Tumors. Es besitzt ein außergewöhnlich breites Verhaltensspektrum, welches von aggressiven Tumoren mit rascher Progression und Therapieversagen bis zur spontanen Tumorregression oder Differenzierung zu benignen Formen reicht.

Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach dem Internationalen Neuroblastom Stadiensystem (INSS). Prognostisch wichtig sind auch molekulargenetische Untersuchungen des Tumors, wie z.B. die Amplifikation des n-Myc-Gens.

Die Behandlung des Neuroblastoms besteht risikoadaptiert aus einer Operation, Strahlen- und/oder Chemotherapie. Bei einigen Patienten reicht zunächst auch die alleinige Beobachtung aus.

1.5 Fragestellung

Trotz großer Fortschritte und erheblicher Erkenntnisse im Bereich der Tumorforschung ist die Prognose für viele Tumorerkrankungen gegenwärtig immer noch sehr schlecht. Bei den meisten Patienten kommt es trotz gutem initialen Therapieansprechen zu einem Tumorrezidiv. Gerade Tumore mit Neuralleistenursprung sind hiervon betroffen. Als Erklärungsversuch für die Rezidivbildung hat in den letzten Jahren das Konzept der Tumorstammzelle, die so genannte Tumorstammzellhypothese, immer mehr an Bedeutung gewonnen. Bei vielen Tumorentitäten konnten Tumorstammzellen inzwischen nachgewiesen werden. Um sie allerdings gezielt eliminieren zu können, ist es zunächst einmal notwendig, diese mittels bestimmter Marker zu identifizieren. Des Weiteren ist es für die gezielte Therapie wichtig, Informationen über die Biologie der

Tumorstammzellen, also ihren Ursprung, ihr Verhalten und ihre Reaktion auf den Einfluss von verschiedenen Faktoren zu kennen.

Weil häufig Zelllinien als Modell in der Tumorforschung verwendet werden, sollte nun im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung im Vergleich zum Mammakarzinom untersucht werden:

1. Welche embryonalen und neuralen Stammzellmarker und Chemokinrezeptoren, die bei der Wanderung von Stammzellen und in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle spielen, exprimiert werden.
2. Ob diese Marker durch Chemokine oder durch neurales Stammzellmedium (*Neural Stem Cell Medium*), das zur Kultivierung/Gewinnung von Stammzellen verwendet wird, reguliert werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Mammakarzinom: MCF7
MDA parental

Kleinzelliges Lungenkarzinom: OH1
OH3
SW2

Melanom: LOX
Mel Juso
Mel6

Neuroblastom: SKNSH
LAN1
IMR32
SHSY5Y

Die MCF7-Zellen wurden kommerziell erworben. Von den MDA-Zellen war noch cDNA aus früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe vorhanden. Ursprünglich stammen diese von Toshiyuki Yoneda, University of Texas, San Antonio. Alle anderen Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Udo Schumacher vom Anatomischen Instituts des UKE Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Medien

Glial Precursor Cell Medium (Standard-Nährmedium):

DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES
+ 10 % fötales Kälberserum (FKS)
+ 3 % L-Glutamin
+ 1 % Penicillin/Streptomycin

Neural Stem Cell Medium (NSC):

DMEM: Harn's F12 (1:1)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 0,6 % Glucose
+ 9,6 ng/ml Putrescindihydrochlorid
+ 6,3 ng/ml Progesteron
+ 5,2 ng/ml Natriumselenit
+ 0,025 mg/ml Insulin
+ 2 µg/ml Heparin
+ 4 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA)
+ 10 ng/ml bFGF
+ 20 ng/ml EGF

Stimulationsmedium, 0,5 % FKS:

DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 4mM L-Glutamin, 25 mM HEPES
+ 0,5 % fötales Kälberserum (FKS)

Lösungen und Puffer

5x Reaction Buffer:

250 mM Tris-HCl

259 mM KCl

20 mM MgCl₂

50 mM DTT

Dissoziationslösung:

24 mg HEPES

20 mg Trypsin in 10 ml DMEM lösen,

2 mg EDTA steril filtrieren

DNase-Puffer: pH 8

400 mM Tris-HCl

100 mM MgSO₂

10 mM CaCl₂

Elektrodenpuffer: pH 8,2-8,3

15,2 g TRIS

72 g Glycin

5 g SDS

5 l H₂O

HEPES-Puffer (10 mM, 25 mM): pH 7,4

Lysispuffer (Western Blot): pH 7,8

50 mM TRIS

100 mM NaCl

5 mM EDTA

1 % Triton X-100

2 mM Natriumvanadat vor Gebrauch zusetzen

1 mM Glycerolphosphat vor Gebrauch zusetzen

PBS (Phosphate Buffered Saline): pH 7,2-7,3

136 mM (8,0 g) NaCl

2,7 mM (0,2 g) KCl

1,8 mM (0,24 mg) KH₂HPO₄

8 mM (1,44 g) Na₂HPO₄ · 2 H₂O

ad 1 l H₂O dest.

Sammelgelpuffer: pH 6,8

0,5 M TRIS/HCl

0,4 % SDS

SDS-Probenpuffer:

0,23 g SDS in 7,25 ml H₂O

1,25 ml Trenngelpuffer

1 ml Glycerin

20 mM DTT

TBST: pH 7,5

50 mM TRIS

150 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1 % Tween

Trenngelpuffer: pH 8,8

1,5 M TRIS/HCl

0,4 % SDS

2.1.3 Biochemikalien

Aceton

Roth, Karlsruhe

Acrylamid-Bis-Lsg. 29:1, 30 %

Serva, Heidelberg

Bradford Reagenz

BioRad Laboratories, München

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol, USA
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldichloridhydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Harn's F12 (1:1)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP-Mix (Dinukleotidtriphosphat-Mischung)	Fermentas, Vilnius, Litauen
DTT (Dithiotreitol)	Biomol, Hamburg
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA-Stopp-Lösung	Promega, Fitchburg, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FKS Gold (Fötales Kälberserum, teilsynthetisch)	PAA, Pasching, Österreich
Glutamin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, München
HEPES (4, 2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure)	Merck, Darmstadt
Immunmount®	Thermo, Pittsburgh, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Proteinmarker	Fermentas, Vilnius, Litauen
Putrescindihydrochlorid (NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂ · 2HCl)	Sigma-Aldrich, München
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences, UK
Reaction Buffer	Fermentas, Vilnius, Litauen
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe

Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Peptide und Enzyme

bFGF (basic fibroblast growth factor, FGF2)	Immunotools, Friesoythe
CXCL11 (I-TAC, Interferon-inducible T-cell a chemoattractant)	PeptoTech, Rocky Hill, USA
CXCL12 (SDF-1 α , stromal-derived growth factor 1 α)	Immunotools, Friesoythe
DNase (RNase-frei)	Fermentas, ST. Leon-Rot
EGF (epidermal growth factor)	Immunotools, Friesoythe
Insulin (aus Rinderpankreas, 10 mg/ml in 25 mM HEPES)	Sigma-Aldrich, München
Progesteron	Sigma-Aldrich, München
RevertAid TM H Minus M-MuLV (Reverse Transkriptase (40 U/ μ l))	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase (DNase-frei) (20 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 TaqMan® Primer und Sonden

Bezeichnung	ID-Nummer
hCD133	Hs00195682_m1
hCXCL16	Hs00222859_m1
hCXCR3	Hs00171041_m1
hCXCR4	Hs00607978_s1
hCXCR7	Hs00664172_s1
hGAPDH	Hs99999905_m1
hKLF4	Hs00358836_m1

Bezeichnung	ID-Nummer
hMusashi	Hs00159291_m1
hMyc	Hs00153408_m1
hNanog	Hs02387400_g1
hOct4	Hs00999632_g1
hSox2	Hs00415716_m1

Alle TaqMan®-Primer und Sonden wurden von Applied Biosystems, Branchburg, USA bezogen.

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
anti-CXCR4	Ziege	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab1671
anti-CXCR7	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab38089
anti-Musashi (monoklonal)	Maus	1:100	R&D, Wiesbaden	MAB2628
anti-Nanog	Kaninchen	1:500	Thermo Scientific, Waltham, USA	PA1-097
anti-Oct4	Kaninchen	1:150	Cell Signaling, Danvers, USA	2750S
anti-Sox2	Kaninchen	1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	SC-20088

Sekundärantikörper

Markierung	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Alexa Fluor 488®	Ziege	Maus	1:1000	Thermo Scinetific, Waltham, USA	A21202
Alexa Fluor 555®	Esel	Ziege	1:1000	Thermo Scinetific, Waltham, USA	A21432
Alexa Fluor 555®	Ziege	Kaninchen	1:1000	Thermo Scinetific, Waltham, USA	A21428

2.1.7 Gebrauchsfertige Kits

ECL Advance™ Western Blotting-Detection Kit

GE Healthcare, München

TaqMan® Universal Master Mix (20x)

Applied Biosystems, USA

2.1.8 Geräte

ABI Prism®-7700 Real-Time-PCR-Gerät

PE Applied Biosystems, USA

Analysewaage

Sartorius AG, Göttingen

Brutschränke

Heraeus, Hanau

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35 M

Zeiss, Jena

Fluoreszenzspektrometer F-2000

Hitachi, Tokio, Japan

Kühlzentrifuge

Eppendorf, Hamburg

Magnetrührer MR2000

Heidolph, Schwabach

Mikroskop, invers CK2

Olympus, Japan

Thermocycler T-Gradient

Biometra, Göttingen

Tischzentrifuge Biofuge pico

Heraeus, Hanau

Vortex-Mixer VF2

Janke & Kunkel, Staufen

Wasserbad

Köttermann, Hänigsen

Werkbank (Hera-safe)

Heraeus, Hanau

2.1.9 Verbrauchsmaterial

6-Well-Zellkulturschalen

Greiner, Frickenhausen

96-Well-Real-Time-PCR-Platten

Sarstedt, Nürnberg

Deckgläschen

Menzel-Gläser, Braunschweig

Filme

GE Healthcare, München

Kulturflaschen und -schalen

Sarstedt, Nürnberg

Objektträger Super Frost

Roth, Karlsruhe

Optische Folie (Real-Time-PCR)

Sarstedt, Nürnberg

Petrischale 35mm

Sarstedt, Nürnberg

Pipettenspitzen

Sarstedt, Nürnberg

Reaktionsgefäße („Tubes“, 0,2 und 1,5 ml)

Sarstedt, Nürnberg

Röhrchen (10 ml und 50 ml)

Sarstedt, Nürnberg

Whatman-Filterpapier

BioRad, München

Zellschaber

Sarstedt, Nürnberg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten mit lebenden Zellen wurden komplett in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Tumorzelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kulturmedium kam dabei das *Glial Precursor Cell Medium* (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Stepromycin) zum Einsatz. Für die Stimulationsversuche wurde ein Stimulationsmedium (DMEM mit 0,5 % FKS) oder das *Neural Stem Cell Medium* verwendet. Bei Letzterem wurden die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche dazugegeben.

2.2.2 Realtime-RT-PCR

Überblick

Die quantitative Realtime-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (*Realtime-RT-PCR*) dient der Bestimmung der relativen Expression der mRNA eines Gens. Sie beruht auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der zeitgleichen Quantifizierung der DNA-Menge durch Fluoreszenzmessungen während der einzelnen PCR-Zyklen eines Durchlaufs. Dabei verhält sich die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte. Die Auswertung kann dann relativ zu einem mitgemessenen Referenzgen erfolgen.

Für die Durchführung der *Realtime-RT-PCR* muss zunächst die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in die sogenannte *complementary DNA* (cDNA) umgewandelt werden. Während der PCR kommt es dann durch die mehrmalige Wiederholung folgender drei Phasen zur exponentiellen Vermehrung der eingesetzten DNA:

Zunächst erfolgt die Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt wird, anschließend das Annealing, bei welchem sich die Primer an ihre spezifischen Bindungsstellen an die DNA anlagern und abschließend die Elongation, bei welcher die DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge zur eingesetzten DNA-Sequenz bildet.

Für die Quantifizierung kamen hier TaqMan®-Sonden und das Prinzip des Försterresonanz-Energietransfers (FRET) zum Einsatz. TaqMan®-Sonden sind Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher ausgestattet sind. Der Quencher inaktiviert die Fluoreszenz von Farbstoffen, die sich in seiner Nähe befinden. Zu Beginn eines PCR-Zyklus lagert sich nun die TaqMan®-Sonde an die komplementäre Sequenz der eingesetzten DNA an und wird während der Gegenstrangsynthese durch die Taq-Polymerase, die neben ihrer Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aufweist, abgebaut. So befindet sich der Quencher nicht mehr in der Nähe des Farbstoffes, dessen Fluoreszenz nun detektiert werden kann.

RNA-Isolierung mit TRIzol® Reagenz

Vor der Isolierung der RNA aus den Tumorzelllinien wurden diese zwei bis drei Tage in kleinen Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Abschluss der Kultivierung wurden sie mit warmem PBS gespült, abgesaugt und in 1 ml TRIzol® pro Flasche mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nicht-adhärenente Zelllinien wie die OH3-Zellen wurden nach der Kultivierung samt Medium in ein steriles Reaktionsröhrchen überführt, kurz für 3 Minuten bei 1500 xg zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet, in dem sich die Zellen befanden, in warmem PBS gelöst. Nach der anschließenden wiederholten dreiminütigen Zentrifugation bei 1500 xg wurde der Überstand erneut entfernt, das Pellet in 1 ml TRIzol® gelöst und die Probe in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden nun nach der Zugabe von jeweils 200 µl Chloroform 15 Sekunden von Hand geschüttelt, zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12000 xg und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurde eine Trennung der Proben in drei unterschiedliche Phasen erreicht: Unten eine rötliche Phenol/Chloroform-Phase mit DNA, Proteinen und Zelltrümmern, darüber eine weiße Interphase mit DNA und ganz oben eine wässrige Phase mit der gewünschten RNA. Ungefähr 500 µl von der oberen Phase wurden nun in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und jeweils 500 µl Isopropanol zur Fällung der RNA hinzugefügt. Nach 15 Sekunden Schütteln per Hand und einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12000 xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach abgeschlossener Zentrifugation befand sich die RNA in einem Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde entfernt, zum Pellet 1 ml 70 % Ethanol hinzugefügt, kurz gevortext und anschließend 5 Minuten bei 7600 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Größe wurden die Pellets nun in 20-50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und 10 Minuten lang bei 58 °C inkubiert.

Der RNA-Gehalt der einzelnen Proben wurde durch Extinktionsmessungen bei 260 nm im Photometer bestimmt. Zusätzlich wurde die Reinheit der Probe aus dem Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm errechnet. Dieser sollte bei mindestens 1,8 liegen, damit die Probe für die weiteren Anwendungen geeignet ist.

Die entstandene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

DNA-Verdau und Reverse Transkription in cDNA

Für die folgende *Realtime*-PCR muss die isolierte RNA noch mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Alle nachfolgenden Schritte wurden auf einem Eisblock pipettiert und im Thermocycler T-Gradient inkubiert.

Von jeder Probe wurde 1 µg RNA zusammen mit 7 µl bidestilliertem Wasser in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Um eventuell vorhandene Reste genomischer DNA zu entfernen, wurden im ersten Schritt jeweils 1 µl 10x DNase-Puffer (400 mM TRIS, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, pH 8) und 1 µl DNase (1 U/µl) hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden dann jeweils 1 µl EDTA-Lösung (25 mM) hinzugefügt, gemischt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nun wurde jeweils 1 µl Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl) hinzupipettiert und, um eine Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen, der Ansatz für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils ein Mastermix, bestehend aus 4 µl 5x Reaction Buffer (250 mM TRIS-HCl, 259 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 8), 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Wasser hinzugefügt und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 25 °C wurde dann im letzten Schritt jeweils 1 µl Reverse Transkriptase hinzupipettiert und die Proben zunächst für 10 Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert und zum Abschluss zum Beenden der Reaktion für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Realtime-PCR

Für die Durchführung der *Realtime*-PCR wurden hitzestabile, optisch durchlässige 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet. In jede Vertiefung wurden zunächst 2 µl der jeweiligen cDNA-Probe gegeben, die vorher 1:10 auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt worden war. Dazu wurden im nächsten Schritt jeweils 18 µl einer

vorbereiteten Mastermix-Lösung gegeben, die sich aus 1 µl TaqMan®-Primer-Probes, 7 µl Wasser und 10 µl TaqMan®-Universal PCR Mastermix, welcher auch die DNA-Polymerase enthielt, zusammensetzte. Nachdem die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden optischen Folie verschlossen worden war, wurde die PCR-Reaktion im ABI Prism®-7000 SDS Realtime PCR-Gerät nach folgendem Programm durchgeführt: Der erste Schritt beinhaltete eine Inkubation für 2 Minuten bei 50 °C, der zweite Schritt die Polymeraseaktivierung für 10 Minuten bei 95 °C und der dritte Schritt, der 40 mal wiederholt wurde, die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge für 15 Sekunden bei 95 °C und das anschließende Annealing und die Elongation für 1 Minute bei 60 °C. Im Anschluss an jeden der 40 Zyklen wurden die Fluoreszenzsignale gemessen.

Auswertung

Als Maß für die Quantifizierung wurden die so genannten C_T-Werte herangezogen, die vom PCR-Gerät gemessen und mit der entsprechenden Software berechnet wurden. Der C_T-Wert (*Cycle of threshold*) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz, die sich proportional zur DNA-Menge verhält, erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und damit einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die Auswertung erfolgte hierbei relativ zu einem auf derselben Mikrotiterplatte mitgemessenen Referenzgen, einem „*Housekeeping gene*“, der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH).

Die relative Genexpression wurde nach der ΔC_T-Methode errechnet:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GAPDH})$$

Der ΔC_T-Wert gibt also an, wie viele Zyklen später als das Referenzgen das untersuchte Gen den Fluoreszenzschwellenwert überschritten hat. Bei mehrfacher Wiederholung desselben Versuches wurden Mittelwerte verwendet.

Da die Amplifikation in der PCR exponentiell erfolgt, kann der ΔC_T-Wert mit folgender Formel linearisiert werden:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Ein ΔC_T-Wert von 3,33 entspricht also einer zehnfach niedrigeren Expression des untersuchten Gens im Vergleich zum Referenzgen.

Für die Auswertung von Stimulationsversuchen, bei der stimulierte Proben mit unstimulierten Kontrollen verglichen werden sollten, wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{stimuliert}) - \Delta C_T (\text{unstimuliert})$$

Durch Linearisierung konnte die relative Expressionsänderung der stimulierten Probe gegenüber der unstimulierten Kontrolle bestimmt werden:

$$\text{relative Expressionsänderung} = 2^{-(\Delta C_T (\text{stimuliert}) - \Delta C_T (\text{unstimuliert}))}$$

2.2.3 Fluoreszenz-Immunzytochemie

Überblick

Mit Hilfe der Immunzytochemie können Proteine direkt an Zellen sichtbar gemacht werden, indem die eingesetzten Antikörper spezifisch an das Antigen des Proteins binden. Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz werden zu diesen Primärantikörpern Sekundärantikörper dazugegeben, an welche ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Da diese Sekundärantikörper gegen die Spezies gerichtet sind, aus der der Primärantikörper stammt, binden sie an den Fc-Teil des jeweiligen Primärantikörpers und das Fluoreszenzsignal kann dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

Vorgehen

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf in Kulturschalen liegenden, mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichteten Deckgläschen ausgesät und ungefähr zwei Tage kultiviert. Nach der Kultivierung wurden sie dreimal 5 Minuten mit PBS gespült und anschließend mit eiskaltem Aceton/Methanol-Gemisch 10 Minuten fixiert. Nach dem erneuten dreimaligen fünfminütigen Spülen mit PBS wurden die Deckgläschen in neue 6-Well-Schalen umgesetzt und mit 0,5 % BSA/0,5 % Glycin in PBS 60-80 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die in PBS verdünnten Primärantikörper auf die Deckgläschen gegeben und diese über Nacht bei 4 °C in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen erneut dreimal 5 Minuten mit PBS gespült und, nachdem der in PBS verdünnte Sekundärantikörper aufgetragen worden war, für 1 Stunde bei 37 °C in der feuchten Kammer unter Lichtausschluss inkubiert, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Auch alle weiteren Schritte wurden in der feuchten, abgedunkelten Kammer durchgeführt. Nachdem durch wiederholtes dreimaliges fünfminütiges Spülen überschüssiger Sekundärantikörper entfernt werden sollte, wurden die Deckgläschen mit 100 µl DAPI für die Färbung der Zellkerne beschichtet und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen wieder dreimal 5 Minuten mit PBS und ein Mal mit destilliertem Wasser gespült und dann mit Immumount auf Objektträgern eingedeckelt. Nach dem Trocknen bei 4 °C wurden die Präparate mit dem Axiophot Mikroskop mikroskopiert und fotografiert.

Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Western Blot

Überblick

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Vor dem eigentlichen Verfahren wird das zu untersuchende Proteingemisch mit Hilfe der Gel-Elektrophorese-Technik in einer Trägermatrix (SDS-PAGE) mit einem Polyacrylamidgel entsprechend des Molekulargewichtes der einzelnen Proteine in Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend werden diese aufgetrennten Proteinproben auf eine PVDF-Membran übertragen, an deren Oberfläche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Hier können sie nun mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden.

Zellysatherstellung und Vorbereitung der Proteinproben

Jeweils drei kleine Kulturflaschen der jeweiligen Zelllinie wurden für zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde eine Flasche als Kontrolle nach kurzem Spülen mit warmem PBS erneut mit dem Standard-Nährmedium (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Steptomycin) versehen, zu den anderen beiden Flaschen

wurde nach einmaliger Spülung mit warmem PBS das Stimulationsmedium (DMEM mit 0,5 % FKS) und zusätzlich jeweils einer der beiden Chemokine CXCL11 oder CXCL12 in einer Konzentration von 10 nM gegeben. Anschließend wurden die drei Kulturflaschen für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zum Stoppen der Stimulation wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit kaltem PBS gespült, in 250 µl Lysispuffer pro Kulturflasche mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 12000 rpm und die erneute Überführung in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und mit SDS-Probenpuffer auf einen Proteingehalt von 5 µg/20 µl eingestellt.

Nach zehnmütigem Kochen bei 95 °C zur Denaturierung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode wurden zunächst 5 µl der Probe bzw. für den Leerwert 5 µl Lysispuffer mit 795 µl H₂O bidest. verdünnt und jeweils mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Standard wurde eine Lösung aus 785 µl H₂O bidest., 5µl Lysispuffer, 10 µl einer 1 mg/ml BSA-Lösung und 200 µl Bradford-Reagenz verwendet. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen und die Proteinkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{OD}_{595} (\text{Probe}) / \text{OD}_{595} (\text{Standard})) \times 2 = \text{Proteingehalt in mg/ml}$$

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteingemische wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Hierbei wurden die Proben mit dem anionischen Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, um die Eigenladung der Aminosäuren auszuschalten, sodass die Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden konnten.

Es wurden 10- und 12-prozentige Polyacrylamidgele benutzt. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Taschen wurden nach einer mithilfe einer stumpfen Kanüle durchgeführten Spülung mit H₂O bidest. mit jeweils 20 µl der Probe (5 µg Protein) befüllt. Eine weitere Tasche wurde mit 4 µl eines definierten Molekulargewichtsmarkers beladen. Zusätzlich wurde in den Innenraum der Kammer ein Tropfen Bromphenolblau als Indikatorfront gegeben. Anschließend wurde die Elektrophorese für ca. 30 Minuten bei einer Obergrenze von 400 V durchgeführt, bis die Lauffront die Unterseite des Gels erreichte.

Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Die nun aufgetrennten Proteinproben wurden aus dem Polyacrylamidgel mittels *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen. Dabei wurde die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran in Methanol aktiviert, danach in Transferpuffer äquilibriert und mit dem SDS-Gel zwischen jeweils zwei ebenfalls in Transferpuffer getränkte *Whatmann*-Papiere gelegt, wobei die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode wies. Der Transfer erfolgte für 30 Minuten bei einer Obergrenze von 25 V.

Immunologische Detektion der Proteine

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer 5-prozentigen Milchpulver-TBST-Lösung inkubiert, um freie Membran-Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem in 1 ml 5-prozentiger Milchpulver-TBST-Lösung verdünnten Primärantikörper gemeinsam in eine Schlauchfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Um überschüssige, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese am nächsten Tag dreimal 15 Minuten in TBST gewaschen. Danach wurde der in 0,5-prozentiger BSA-TBST-Lösung verdünnte Sekundärantikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder dreimal mit TBST gewaschen. Nun konnten die gebundenen Antikörper mittels des ECL-Kits (ImmobilonTM Western,

Millipore) mit dem Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) oder mithilfe eines Chemilumineszenzdetektors (Fusion SL, Peqlab) sichtbar gemacht werden.

Reblotting

Um auf derselben PVDF-Membran einen weiteren Nachweis mittels eines anderen Antikörpers durchführen zu können, müssen zunächst einmal die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Dies erfolgte durch eine kurze Spülung mit TBST und anschließender 30-minütiger Inkubation mit einer Stripping-Lösung (Millipore) bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran zweimal für 5 Minuten mit 5-prozentiger Milchpulver-TBST-Lösung blockiert und anschließend eine erneute Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.2.5 Statistische Analysen und Auswertungen

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und so eine Standardabweichung bestimmt. Zur Untersuchung von Signifikanzen wurde der zweiseitige Student-T-Test angewandt. Die Grenzen für die statistische Signifikanz wurden bei 5 % (*p kleiner 0,05), 1 % (** p kleiner 0,01) und 0,1 % (***) p kleiner 0,001) gesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren

Es wurde die Expression von embryonalen und neuralen Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF7 und MDA, den kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien OH1, OH3 und SW2, den Melanom-Zelllinien MelJuso, Mel6 und Lox, und den Neuroblastom-Zelllinien SKNSH, LAN1, IMR32 und SHSY5Y auf mRNA-Ebene untersucht. Von den Linien SW2, MelJuso und Mel6 war schon cDNA aus früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe vorhanden, aus den anderen Linien wurde nach Kultivierung RNA isoliert und cDNA hergestellt, die dann in der *Realtime-PCR* verwendet werden konnte. Die ermittelten C_T -Werte wurden in Bezug zu dem mitgemessenen Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) ausgewertet, sodass ein ΔC_T -Wert ermittelt werden konnte. Ein ΔC_T -Wert-Unterschied von 3,33 entspricht einem zehnfachen Expressionsunterschied. Dabei gilt: Je höher der ΔC_T -Wert ist, desto geringer ist die Expression. In den folgenden Abbildungen sind auf der linken Ordinate die ΔC_T -Werte aufgezeichnet und auf der rechten Ordinate ist die relative Genexpression im Vergleich zur GAPDH logarithmisch dargestellt.

In die statistischen Berechnungen wurden pro Probe drei Versuche aufgenommen. Die teilweise zusätzlich durchgeführten *Realtime-PCRs* wurden aufgrund einer nicht vorhandenen oder zu geringen Expression der GAPDH verworfen.

3.1.1 Transkription von embryonalen Stammzellmarkern

Zunächst wurde das Vorhandensein der embryonalen Stammzellmarker *Nanog*, *Oct4*, *Klf4* und *cMyc* in den oben genannten Zelllinien überprüft (siehe Abb. 6).

Nanog konnte mit Ausnahme der MDA-Zellen in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Besonders hoch war hier die Expression in den Lungenkarzinom-Zelllinien.

Oct4 war in allen Zelllinien annähernd gleich stark exprimiert.

Das gleiche galt für *Klf4*, mit Ausnahme der LAN1-Zellen, in denen es komplett fehlte.

cMyc dagegen konnte wieder in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurden deutlich höhere Expressionen als bei den anderen drei embryonalen Stammzellmarkern erreicht, vor allem bei den Mammakarzinom- und Melanom-Zelllinien.

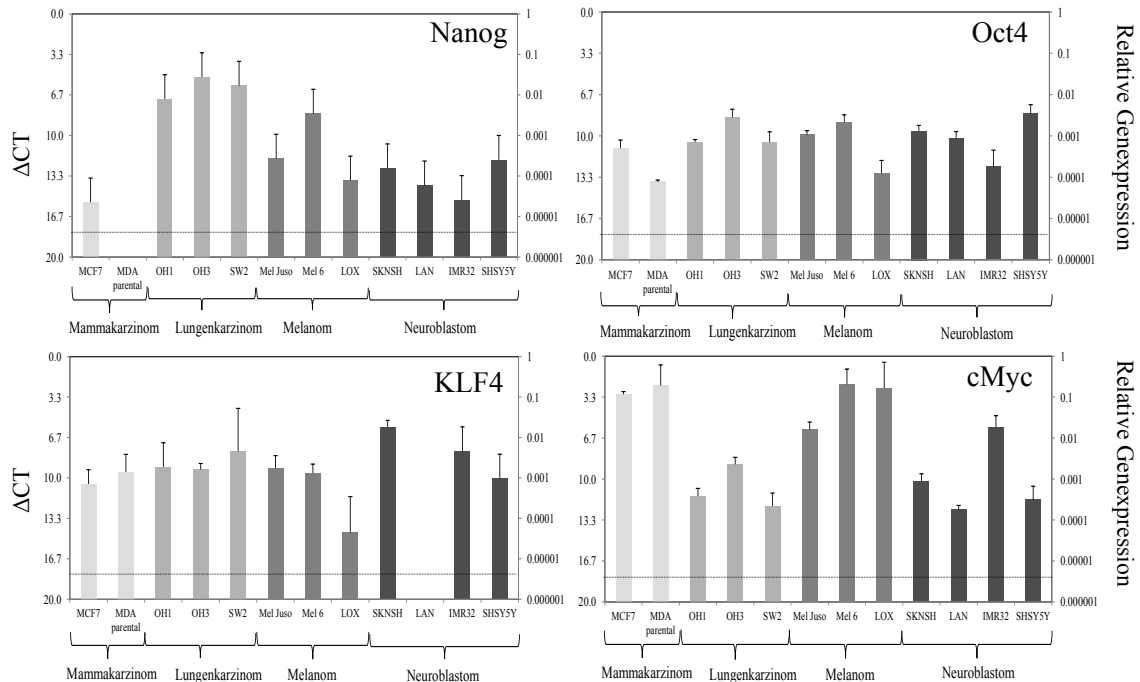


Abb. 6: Transkription von embryonalen Stammzellmarkern in humanen Tumorzelllinien. Die mRNA-Expression von Nanog, Oct4, Klf4 und cMyc wurde in verschiedenen Mammakarzinom-, Lungenkarzinom-, Melanom- und Neuroblastom-Zelllinien mittels dreimalig durchgeführter Realtime-PCR untersucht. Als Referenzgen wurde die GAPDH verwendet.

3.1.2 Transkription von neuralen Stammzellmarkern

Als nächstes wurde das Vorhandensein der neuralen Stammzellmarker *Sox2*, *Musashi* und *CD133* in den verwendeten Zelllinien untersucht (siehe Abb. 7).

Sox2 konnte nur in den Lungenkarzinom-Zelllinien, den Melanom-Zelllinien mit Ausnahme von Mel6 und in den Neuroblastom-Zelllinien mit Ausnahme von SHNSH und auch nur in geringerer Expression im Vergleich zu den anderen Stammzellmarkern detektiert werden. In den Mammakarzinom-Zelllinien fehlte es komplett.

Musashi wurde in allen Zelllinien bis auf den MDA- und den LoX-Zellen exprimiert. Eine besonders hohe Expression wurde dabei bei allen Lungenkarzinom-Zelllinien und den SHSY5Y-Zellen erreicht.

CD133 wurde stark in allen Lungenkarzinom-Zelllinien exprimiert. In der Melanom-Zelllinie Mel Juso und in den Neuroblastom-Zelllinien LAN1, IMR32 und SHSY5Y war die Expression deutlich geringer. In den übrigen Zelllinien fehlte es komplett.

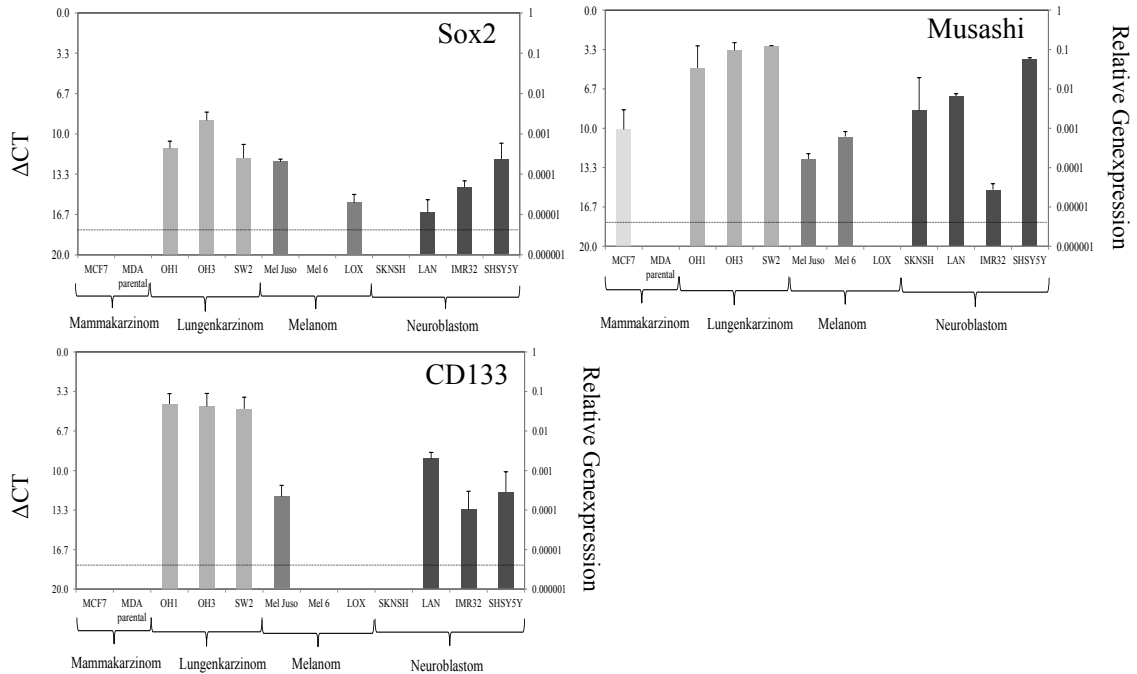


Abb. 7: Transkription von neuronalen Stammzellmarkern in humanen Tumorzelllinien. Die mRNA-Expression von Sox2, Musashi und CD133 wurde in verschiedenen Mammakarzinom-, Lungenkarzinom-, Melanom- und Neuroblastom-Zelllinien mittels dreimalig durchgeführter Realtime-PCR untersucht. Als Referenzgen wurde die GAPDH verwendet.

3.1.3 Transkription von Chemokinrezeptoren

Zuletzt wurde noch die Expression der Chemokinrezeptoren *CXCR4*, *CXCR7*, *CXCR3* und *CXCR6* in den verwendeten Zelllinien bestimmt (siehe Abb. 8).

CXCR4 war mit Ausnahme der LoX-Zellen in allen Zelllinien in annähernd gleicher Menge vorhanden.

CXCR7 dagegen konnte nur in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, der Melanom-Zelllinie Mel6 und in allen Neuroblastom-Zelllinien detektiert werden, in allen anderen fehlte dieser Rezeptor.

CXCR3 und *CXCR6* waren in keiner der untersuchten Zelllinien vorhanden.

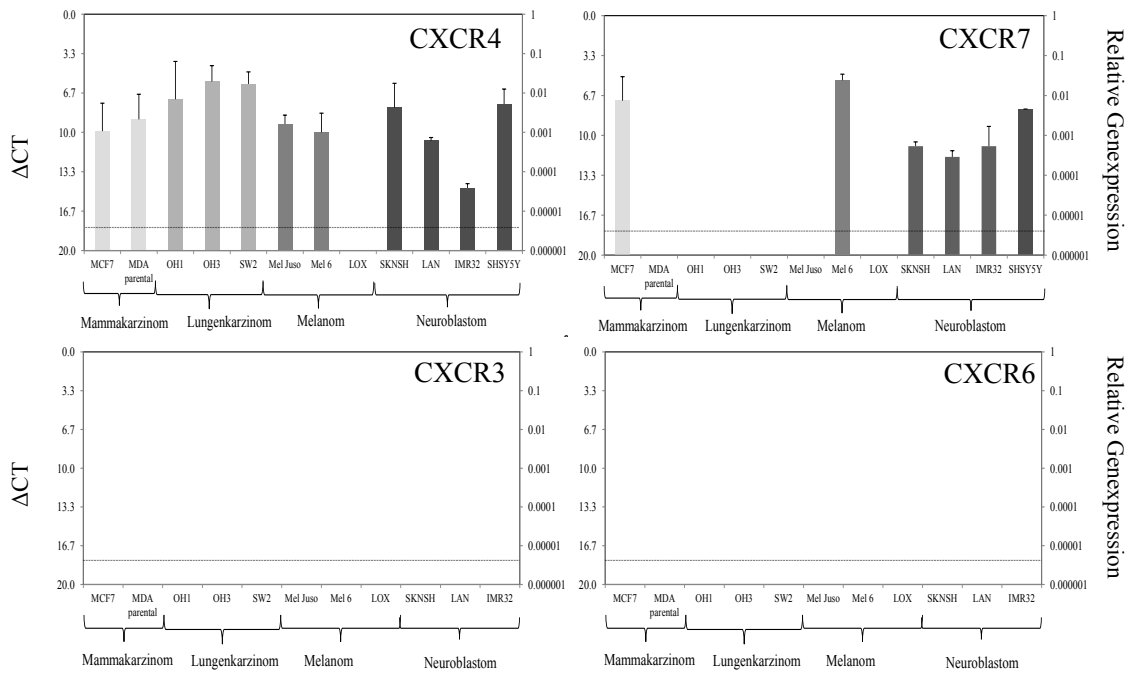
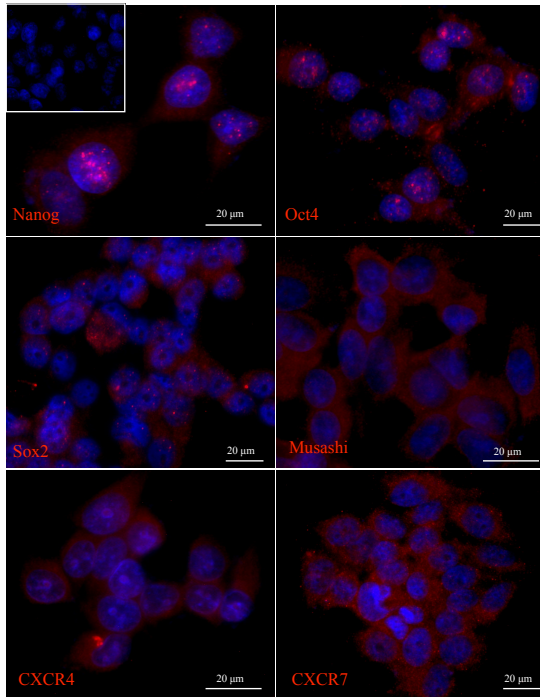


Abb. 8: Transkription von Chemokinrezeptoren in humanen Tumorzelllinien. Die mRNA-Expression von CXCR4, CXCR7 und CXCR6 wurde in verschiedenen Mammakarzinom-, Lungenkarzinom-, Melanom- und Neuroblastom-Zelllinien mittels dreimalig durchgeführter Realtime-PCR untersucht. Als Referenzgen wurde die GAPDH verwendet.

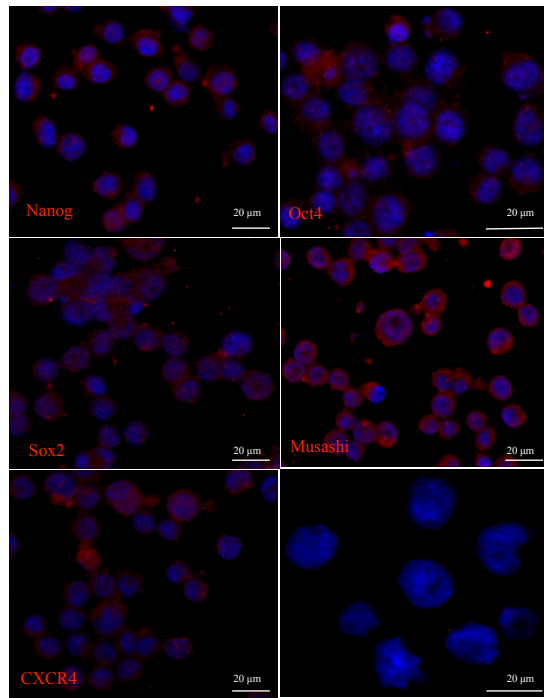
3.2 Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren

Mittels der Immunzytochemie wurde die Expression der Stammzellmarker *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* und *Musashi* und der Chemokinrezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* auf Proteinebene untersucht und deren Homogenität über alle Zellen einer Zelllinie überprüft. Stellvertretend für alle untersuchten Zelllinien wurden die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, die Lungenkarzinom-Zelllinie OH3, die Melanomzelllinie Lox und die Neuroblastomzelllinien SKNSH, LAN1 und SHSY5Y eingesetzt. Es wurden jeweils Einzelfärbungen durchgeführt. Auf den Abbildungen sind die Zellkerne blau markiert und die nachzuweisenden Stammzellmarker oder Chemokinrezeptoren rot (siehe Abb. 9).

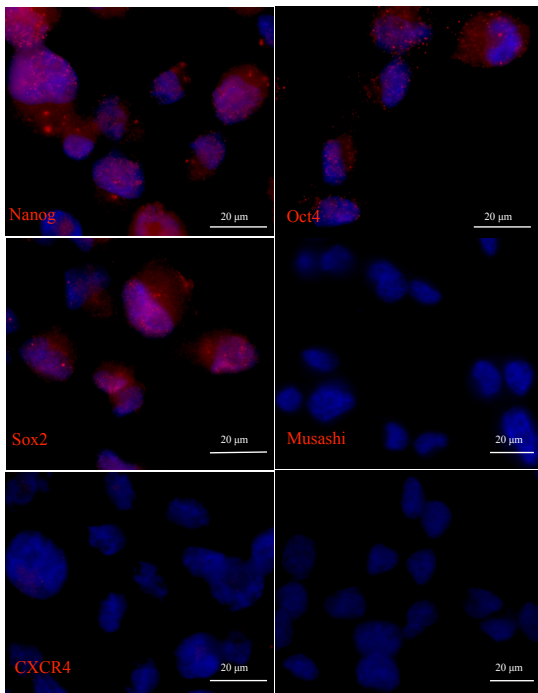
MCF7



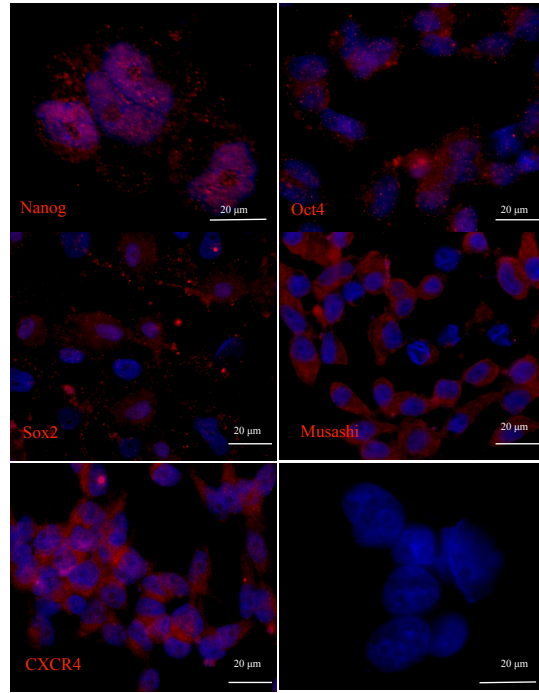
OH3



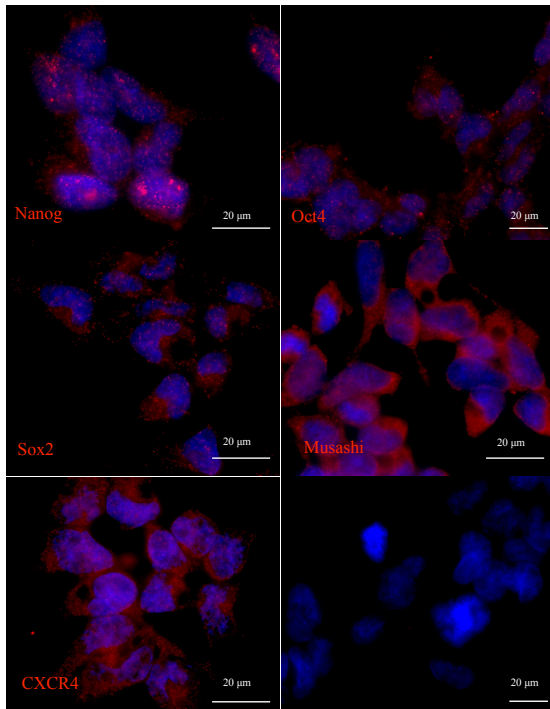
Lox



SHSY5Y



LAN1



SKNSH

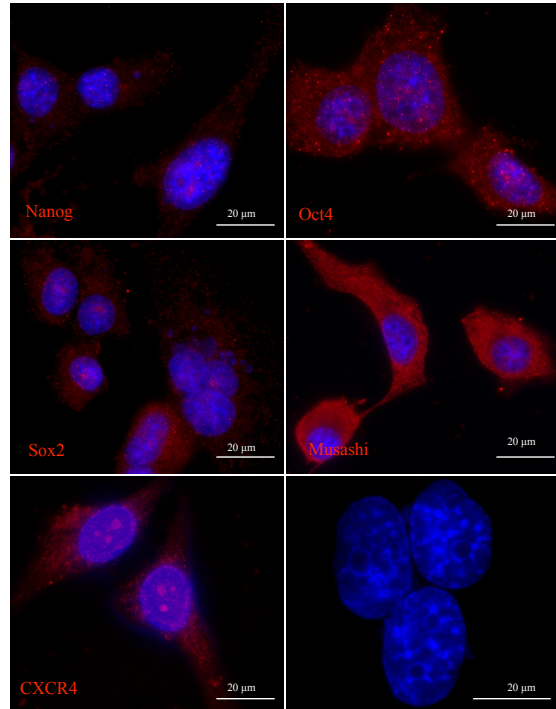


Abb. 9: Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in humanen Tumorzelllinien. Es wurde die Expression von den Stammzellmarkern Nanog, Oct4, Sox2 und Musashi in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, der Lungenkarzinom-Zelllinie OH3, der Melanom-Zelllinie Lox und den Neuroblastom-Zelllinien SHSY5Y, LAN1 und SKNSH mittels immunzytochemischer Färbungen auf Proteinebene untersucht. Die Zellkerne sind dabei mit DAPI blau gefärbt, die nachzuweisenden Stammzellmarker und Chemokinrezeptoren rot. Die Expression ist über alle Zellen der jeweiligen Zelllinie homogen.

Zusammenfassung 3.1 und 3.2:

Die Expression der embryonalen Stammzellmarker zeigte in der *Realtime*-PCR und der Immunzytochemie mit wenigen Ausnahmen eine sehr homogene Verteilung über alle untersuchten Zelllinien: *Nanog* wurde insgesamt mittelstark und etwas stärker in den Lungenkarzinom-Zelllinien exprimiert, *Oct4* und *Klf4* mittelstark in allen Zelllinien und *cMyc* insgesamt sehr stark und besonders stark in den Mammakarzinom- und Melanom-Zelllinien.

Die Expression der neuralen Stammzellmarker dagegen zeigte sowohl in der *Realtime*-PCR wie auch in der Immunzytochemie deutliche Unterschiede über alle untersuchten Zelllinien: *Sox2* konnte mit wenigen Ausnahmen nur in den Lungenkarzinom- und den Neuroblastom-Zelllinien und auch nur in geringerer Expression detektiert werden. Die

Expression von *Musashi* und *CD133* war zwar höher, aber auch v.a. auf die Lungenkarzinom- und Neuroblastom-Zelllinien beschränkt.

Die Expression der Chemokinrezeptoren war mit Ausnahme von *CXCR7* in der *Realtime*-PCR und der Immunzytochemie wieder sehr homogen über alle untersuchten Zelllinien: *CXCR4* wurde mittelstark in allen Zelllinien mit Ausnahme der Lox-Zellen exprimiert, in denen er fehlte. *CXCR7* wurde mittelstark in allen Neuroblastom-Zelllinien und den MCF7- und Mel6-Zellen exprimiert. In den übrigen Zelllinien fehlte er komplett. Und *CXCR3* und *CXCR6* konnten in keiner der untersuchten Zelllinien detektiert werden.

3.3 Einfluss der Chemokine CXCL11 und CXCL12 auf die Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren

Das Chemokin *CXCL11* ist ein Ligand des Chemokinrezeptors *CXCR7*, das Chemokin *CXCL12* bindet dagegen sowohl an den *CXCR4*- als auch an den *CXCR7*-Rezeptor.

Um den Einfluss der beiden Chemokine *CXCL11* und *CXCL12* auf die Expression von Stammzellmarkern und die Chemokinrezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* zu untersuchen, wurden exemplarisch einzelne Tumorzelllinien eingesetzt, bei denen entweder einer oder sogar beide Rezeptoren in den vorherigen Versuchen detektiert werden konnten. Verwendet wurden die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 (*CXCR4* und *CXCR7*), die Lungenkarzinom-Zelllinie OH3 (*CXCR4*) und die Neuroblastom-Zelllinie SKNSH (*CXCR4* und *CXCR7*).

Jeweils drei kleine Kulturflaschen der jeweiligen Zelllinie wurden für zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde eine Flasche als Kontrolle nach kurzem Spülen mit warmem PBS erneut mit dem Standard-Nährmedium (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Steptomycin) versehen, zu den anderen beiden Flaschen wurde nach einmaliger Spülung mit warmem PBS das Stimulationsmedium (DMEM mit 0,5 % FKS) und zusätzlich jeweils einer der beiden Chemokine *CXCL11* oder *CXCL12* in einer Konzentration von 10 nM gegeben. Anschließend wurden die drei Kulturflaschen

für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde aus den Proben die RNA mittels der TRIzol®-Standardmethode isoliert, cDNA hergestellt und anschließend eine quantitative *Realtime-PCR* durchgeführt.

Für jede Zelllinie wurde der komplette Versuch mindestens dreimal durchgeführt, wobei jeweils drei Versuche für die statistischen Berechnungen verwendet wurden. Die teilweise zusätzlichen durchgeführten Versuche wurden aufgrund einer fehlenden oder zu geringen Expression der GAPDH verworfen.

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei welcher die Differenz der ΔC_T -Werte einer stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle linearisiert wurden.

Teilweise wurden zusätzlich Western Blots durchgeführt.

Bei den MCF7-Zellen konnte für *Klf4* und die beiden Chemokinrezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* keine oder nur eine geringe Regulation durch die Chemokine *CXCL11* und *CXCL12* gezeigt werden. Die Expression von *Nanog* wurde bei der Stimulation mit *CXCL12* ebenfalls nicht geändert, aber durch *CXCL11* konnte sie im Mittel auf das 13-fache gesteigert werden, allerdings ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. Ähnliches galt für *Musashi*, bei dem die Stimulation mit *CXCL11* kaum eine Expressionsänderung zeigte, aber *CXCL12* diese im Mittel auf das 27-fache ohne statistische Signifikanz erhöhte. Die Expressionserhöhung von *Oct4* durch *CXCL12* im Mittel auf das 2-fache war dagegen auf dem 5 %-Niveau statistisch signifikant (p-Wert 0,049). Durch die Stimulation mit *CXCL11* verringerte sich die Expression von *Oct4* ohne statistische Signifikanz im Mittel auf 0,35. Die Expression von *cMyc* konnte durch *CXCL12* im Mittel auf das 8-fache ohne statistische Signifikanz gesteigert werden. Die Expressionserhöhung von *cMyc* durch *CXCL11* im Mittel auf das 10-fache erreichte dagegen auf dem 5 %-Niveau wieder statistische Signifikanz (p-Wert 0,008). *Sox2* und *CD133*, die in der Kontrolle nicht detektiert werden konnten, zeigten bei der Stimulation mit *CXCL11* eine geringgradige Expression. Diese Expressionssteigerung war allerdings durch die fehlende Expression in der Kontrolle nicht quantifizierbar. Bei der Stimulation mit *CXCL12* konnten *Sox2* und *CD133* nicht detektiert werden (siehe Abb. 10).

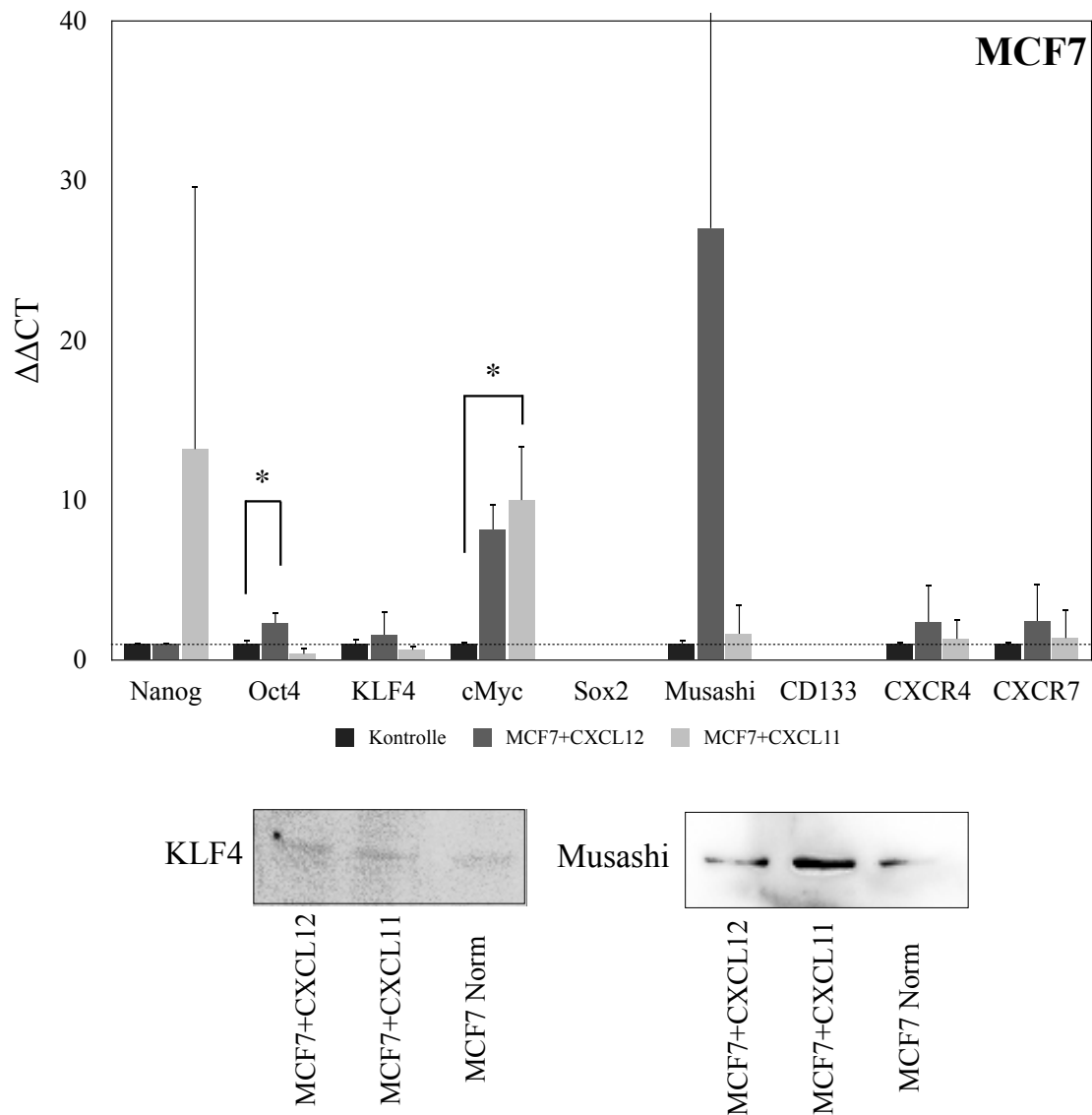


Abb. 10: Regulation der Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11. Die MCF7-Zellen wurden für 24 Stunden mit CXCL12 oder CXCL11 in einer Konzentration von 10 nM in DMEM mit 0,5 % FKS stimuliert. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, wobei die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zusätzlich wurde beispielhaft die Expression von Klf4 und Musashi auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft.

Bei den OH3-Zellen konnte durch die Stimulation mit *CXCL12* eine deutliche Expressionserhöhung aller Stammzellmarker und vom Rezeptor *CXCR4* gezeigt werden, allerdings erreichte diese mit Ausnahme von *cMyc*, dessen Erhöhung im Mittel auf das 7-fache auf dem 5 %-Niveau statistisch signifikant war (p -Wert 0,046), keine statistische Signifikanz: *Nanog* wurde im Mittel auf das 5-fache gesteigert, *Klf4* auf das 10-fache, *Oct4* auf das 12-fache, *Sox2* auf das 25-fache, *Musashi* auf das 4-fache, *CD133* auf das 16-fache und *CXCR4* auf das 12-fache. Der Chemokinrezeptor *CXCR7*,

welcher in der Kontrolle nicht exprimiert wurde, konnte auch nach erfolgter Stimulation mit *CXCL12* nicht detektiert werden.

Bei der Stimulation mit *CXCL11* fand meist kaum eine Regulation statt (*Nanog*, *Klf4*, *Sox2*, *Musashi* und *CD133*). Die Expression von *Oct4* und *cMyc* wurde im Mittel auf das 4-fache und die von *CXCR4* auf das 12-fache gesteigert, allerdings jeweils ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. Der in der Kontrolle nicht exprimierte Chemokinrezeptor *CXCR7* war auch in den mit *CXCL11* stimulierten Proben nicht vorhanden (siehe Abb. 11).

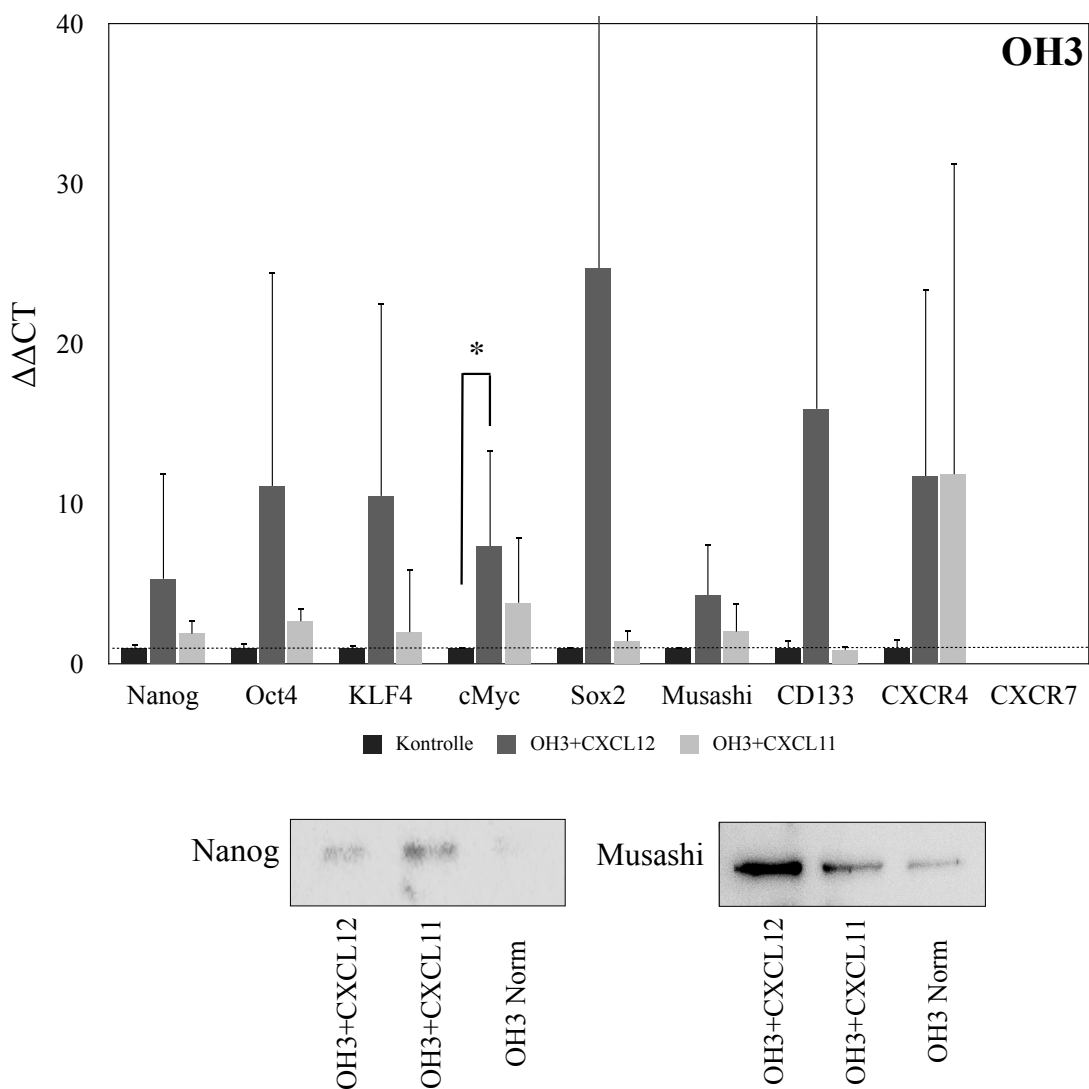


Abb. 11: Regulation der Transkription und Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Lungenkarzinom-Zelllinie OH3 durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11. Die OH3-Zellen wurden für 24 Stunden mit CXCL12 oder CXCL11 in einer Konzentration von 10 nM in DMEM mit 0,5 % FKS stimuliert. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, wobei die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zusätzlich wurde beispielhaft die Expression von Nanog und Musashi auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft.

Bei den SKNSH-Zellen konnte ebenfalls meist keine oder nur eine geringe Regulation durch die Chemokine *CXCL12* und *CXCL11* festgestellt werden (*Klf4*, *Oct4*, *cMyc*, *Musashi* und *CXCR7*). Die Expression von *Nanog* wurde durch *CXCL11* im Mittel auf das 32-fache ohne statistische Signifikanz gesteigert. Durch *CXCL12* änderte sich die Expression von *Nanog* kaum. Die Expression von *CXCR4* erhöhte sich durch Stimulation mit *CXCL12* ohne statistische Signifikanz im Mittel auf das 6-fache. Durch *CXCL11* wurde die Expression allenfalls geringfügig erhöht. *Sox2* und *CD133*, welche in der Kontrolle nicht detektiert werden konnten, wurden auch nach der Stimulation mit *CXCL12* oder *CXCL11* nicht exprimiert (siehe Abb. 12).

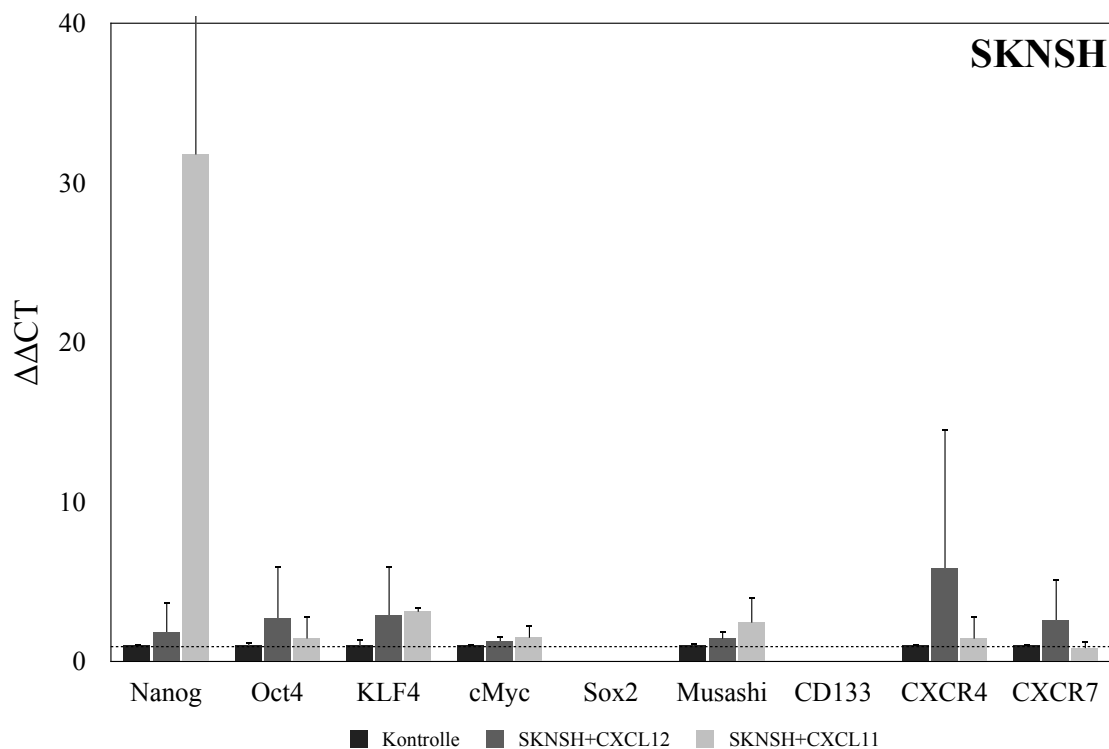


Abb. 12: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Neuroblastom-Zelllinie SKNSH durch die Chemokine CXCL12 und CXCL11. Die SKNSH-Zellen wurden für 24 Stunden mit CXCL12 oder CXCL11 in einer Konzentration von 10 nM in DMEM mit 0,5 % FKS stimuliert. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, wobei die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt.

3.4 Einfluss des neuralen Stammzellmediums auf die Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren

Um den Einfluss des *Neural Stem Cell Medium (NSC)* auf die Expression von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren zu bestimmen, wurden exemplarisch für alle untersuchten Zelllinien die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, die Lungenkarzinom-Zelllinie OH3, die Melanom-Zelllinie Lox und die Neuroblastom-Zelllinie SKNSH eingesetzt.

Je zwei kleine Kulturflaschen der jeweiligen Zelllinie wurden für einen Tag kultiviert. Nach kurzem Spülen mit warmem PBS wurde zu der einen Kulturflasche als Kontrolle erneut das Standard-Nährmedium (DMEM mit 10 % FKS, 3 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Steptomycin) gegeben und zu der anderen das *Neural Stem Cell Medium (NSC)* hinzugefügt. Dabei wurden die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche gegeben. Anschließend wurden die Kulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank für insgesamt 10 Tage kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Nach Ablauf der 10 Tage wurde aus den Proben die RNA mittels der TRIzol®-Standardmethode isoliert, cDNA hergestellt und anschließend eine quantitative *Realtime*-PCR durchgeführt.

Für jede Zelllinie wurde der komplette Versuch dreimal durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei welcher die Differenz der ΔC_T -Werte der Probe im *NSC*-Medium und der Kontrolle im Standard-Nährmedium linearisiert wurden.

Bei den MCF7-Zellen konnte für *Nanog*, *Oct4* und *CXCR4* eine deutliche Expressionserhöhung gezeigt werden, die jedoch mit Ausnahme von *CXCR4*, dessen Erhöhung im Mittel auf das 4-fache auf dem 5 %-Niveau statistisch signifikant war (p-Wert 0,016), keine statistische Signifikanz erreichte. Die Expression von *Klf4*, *Musashi* und *CXCR7* änderte sich kaum. Bei *cMyc* dagegen verringerte sie sich in der stimulierten Probe im Mittel auf 0,16 und zeigte auf dem 1 %-Niveau statistische Signifikanz (p-Wert 0,0059). *Sox2* und *CD133* konnten weder in der Kontrolle noch in der stimulierten Probe detektiert werden (siehe Abb. 13).

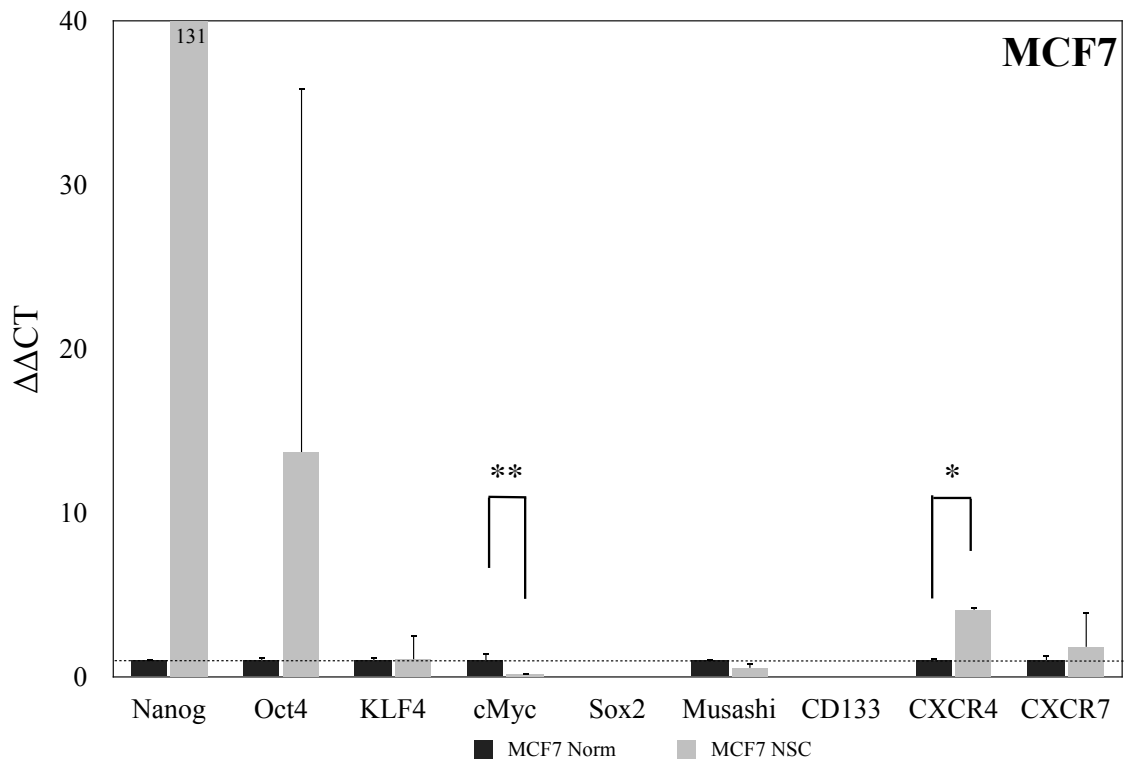


Abb. 13: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium. Die MCF-Zellen wurden für 10 Tage im NSC-Medium kultiviert, wobei die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche gegeben wurden und alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, bei welcher die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Bei den OH3-Zellen konnten fast immer deutliche Expressionserhöhungen gezeigt werden (*Klf4*, *cMyc*, *Sox2*, *Musashi*, *CD133* und *CXCR4*), jedoch auch oft ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. Nur die Erhöhung von *Klf4* im Mittel auf das 4-fache und von *cMyc* auf das 152-fache zeigten auf dem 5 %-Niveau statistische Signifikanz (p-Wert *Klf4* 0,047, p-Wert *cMyc* 0,049). Die Expression von *Oct4* änderte sich kaum, bei *Nanog* verringerte sie sich ohne statistische Signifikanz im Mittel auf 0,006 und *CXCR7* konnte weder in der stimulierten Probe noch in der Kontrolle nachgewiesen werden (siehe Abb. 14).

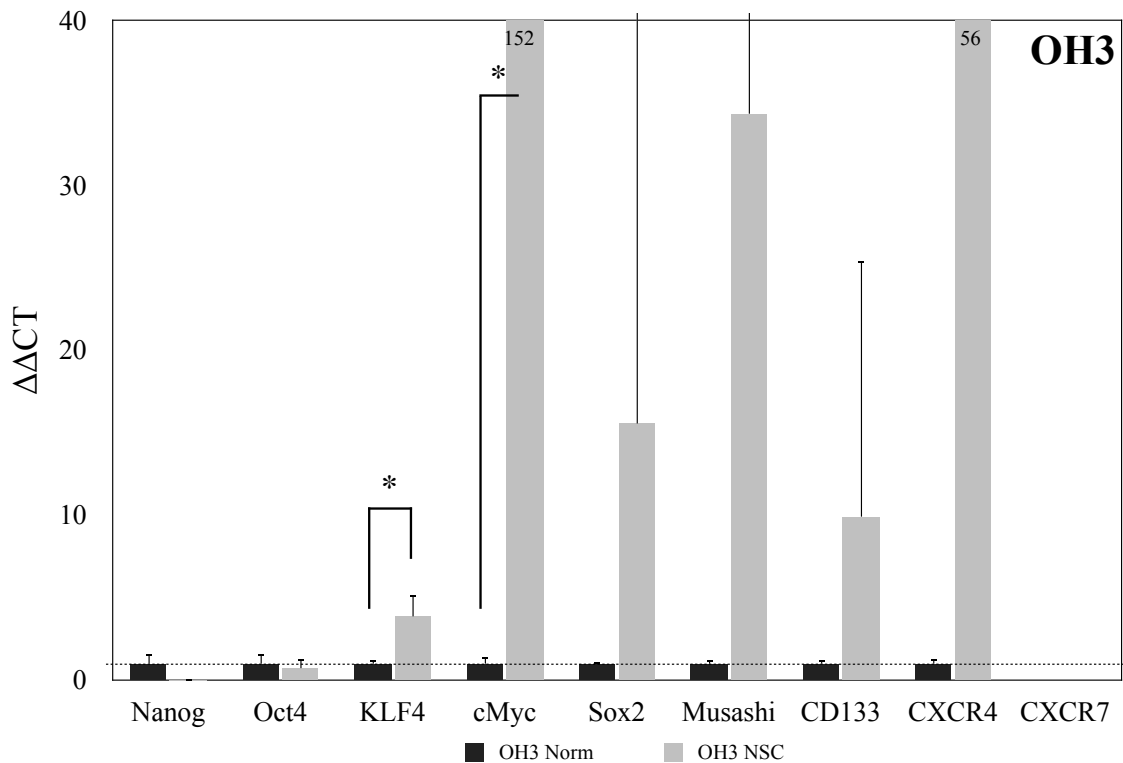


Abb. 14: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Lungenkarzinom-Zelllinie OH3 durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium. Die OH3-Zellen wurden für 10 Tage im NSC-Medium kultiviert, wobei die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche gegeben wurden und alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, bei welcher die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Bei den Lox-Zellen änderte sich die Expression meistens kaum (*Oct4*, *cMyc* und *Sox2*). *Musashi*, *CD133* und die beiden Chemokinrezeptoren konnten weder in der Kontrolle noch der stimulierten Probe detektiert werden. Die Expression von *Klf4* steigerte sich ohne statistische Signifikanz im Mittel auf das 5-fache. Und nur die Expressionserhöhung von *Nanog* im Mittel auf das 2-fache erreichte auf dem 1 %-Niveau statistische Signifikanz (p-Wert 0,0047) (siehe Abb. 15).

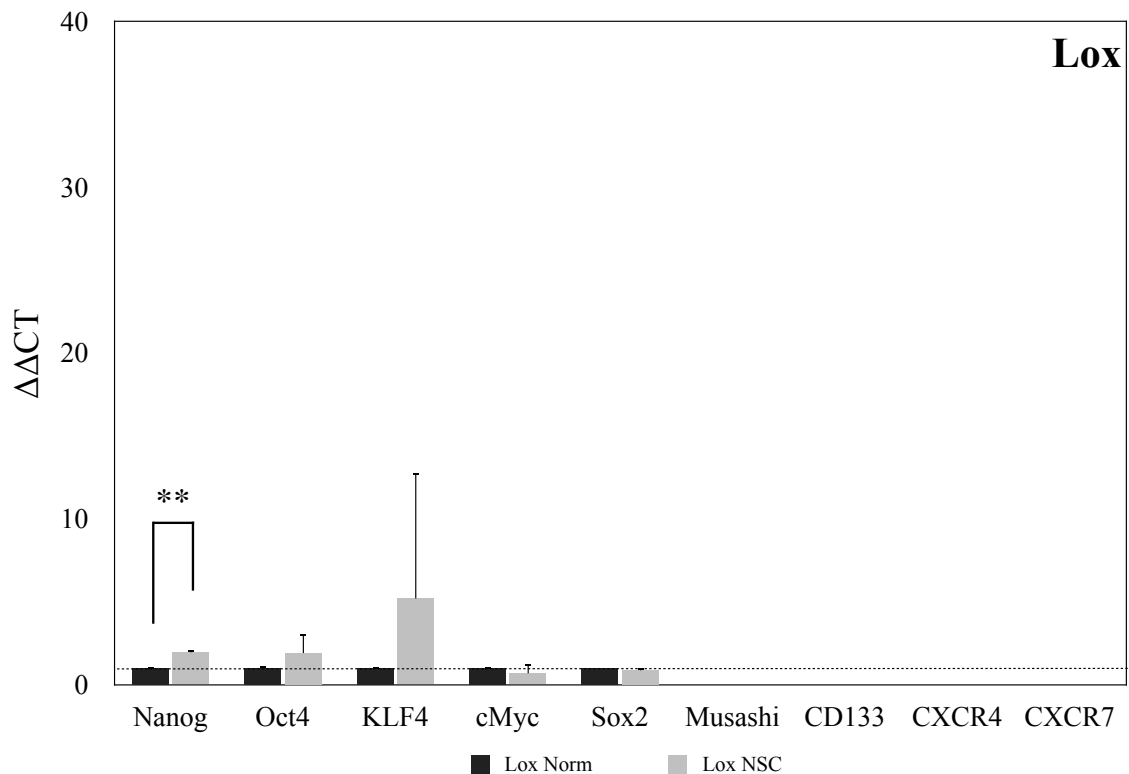


Abb. 15: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Melanom-Zelllinie Lox durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium. Die Lox-Zellen wurden für 10 Tage im NSC-Medium kultiviert, wobei die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche gegeben wurden und alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, bei welcher die GAPDH als Referenzgen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Bei den SKNSH-Zellen erhöhte sich die Expression ebenfalls meist deutlich (*Nanog*, *Oct4*, *cMyc*, *CXCR4* und *CXCR7*), erreichte aber mit Ausnahme von *Nanog*, dessen Erhöhung im Mittel auf das 8-fache auf dem 5 %-Niveau signifikant war (p -Wert 0,037), nie statistische Signifikanz. Die Expression von *Klf4* und *Musashi* änderte sich kaum und *Sox2* und *CD133* konnten weder in der Kontrolle noch in der stimulierten Probe nachgewiesen werden (siehe Abb. 16).

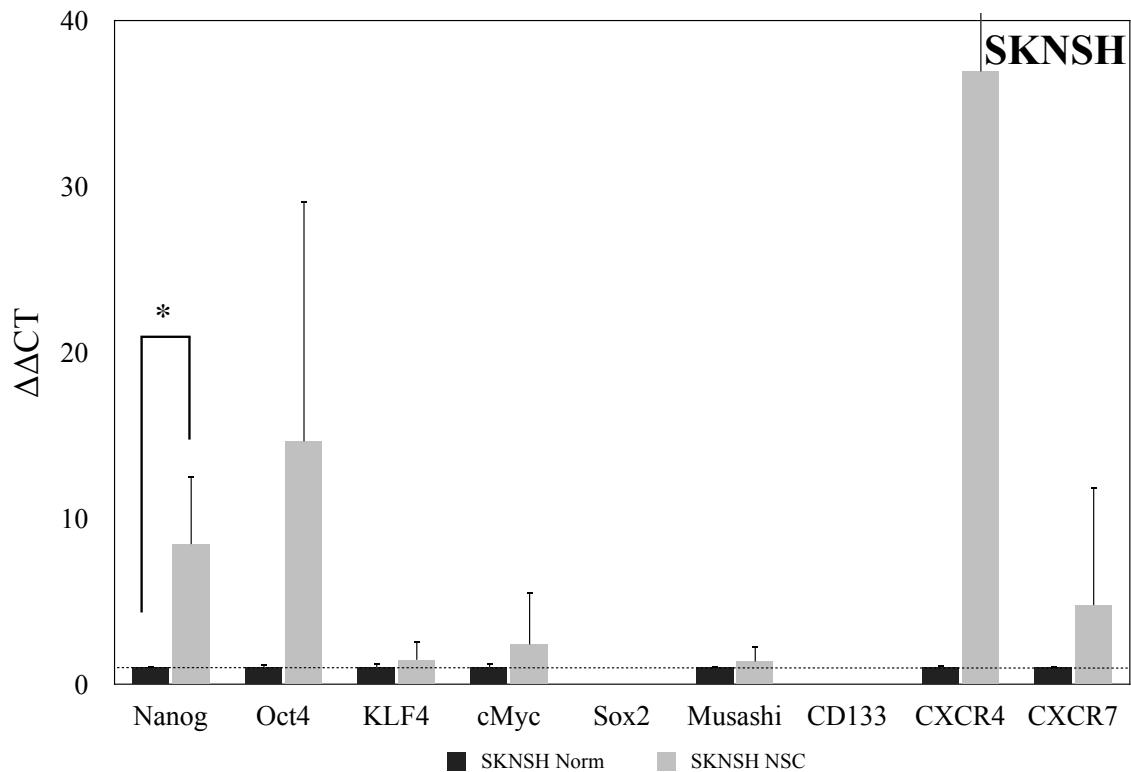


Abb. 16: Regulation der Transkription von Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren in der Neuroblastom-Zelllinie SKNSH durch Kultivierung in neuralem Stammzellmedium. Die SKNSH-Zellen wurden für 10 Tage im NSC-Medium kultiviert, wobei die Faktoren bFGF und EGF erst direkt in die Kulturflasche gegeben wurden und alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Transkription wurde mittels Realtime-PCR untersucht, bei welcher die GAPDH als Referenzen diente. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf den unstimulierten Kontrollwert. * $p < 0,05$. Der ganze Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Zusammenfassung 3.3 und 3.4:

Bei der Stimulation mit den Chemokinen *CXCL11* und *CXCL12* und dem neuronalen Stammzellmedium (*NSC*) zeigten sich die starken und teils sogar signifikanten Expressionsänderungen fast ausschließlich bei den embryonalen Stammzellmarkern (*Nanog*, *Oct4*, *Klf4*, *cMyc*) und dem Chemokinrezeptor *CXCR4*. Die neuronalen Stammzellmarker (*Sox2*, *Musashi*, *CD133*) und der Chemokinrezeptor *CXCR7* wurden mit Ausnahme der OH3-Zellen kaum und in keinem Fall signifikant reguliert.

Bei den MCF7-Zellen erhöhte sich die Expression von *Oct4* durch *CXCL12* und die von *cMyc* durch *CXCL11* signifikant. *Nanog* zeigte durch die Stimulation mit *CXCL11* und *Musashi* durch die Stimulation mit *CXCL12* ebenfalls eine deutliche Expressionssteigerung, die jedoch ohne statistische Signifikanz blieb. Durch das *NSC*-Medium konnte die Expression von *CXCR4* signifikant gesteigert, dagegen die Expression von

cMyc signifikant gesenkt werden. Die Expression von *Nanog* und *Oct4* wurde ohne statistische Signifikanz deutlich erhöht.

Bei den OH3-Zellen steigerte sich die Expression aller exprimierten Marker und dem Chemokinrezeptor *CXCR4* durch *CXCL12* deutlich. Hierbei erreichte aber nur die Steigerung von *cMyc* statistische Signifikanz. Auch durch das *NSC*-Medium wurden mit Ausnahme von *Nanog* und *Oct4* deutliche Expressionserhöhungen erreicht. Allerdings waren hierbei nur die Erhöhungen von *Klf4* und *cMyc* statistisch signifikant.

Bei den Lox-Zellen konnte durch das *NSC*-Medium die Expression von *Nanog* signifikant und die von *Klf4* ohne statistische Signifikanz deutlich erhöht werden.

Bei den SKNSH-Zellen erhöhte sich die Expression von *Nanog* durch Stimulation mit *CXCL11* und die Expression von *CXCR4* durch Stimulation mit *CXCL12* deutlich, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Durch das *NSC*-Medium dagegen konnte die Expression von *Nanog* signifikant gesteigert werden. Die Expression von *Oct4* und *CXCR4* erhöhte sich ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz ebenfalls deutlich.

4 DISKUSSION

Trotz großer Fortschritte und erheblicher Erkenntnisse im Bereich der Tumorforschung können viele Tumorerkrankungen, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien, gegenwärtig nicht kurativ behandelt werden. Einen wesentlichen Grund stellt hierfür die Bildung von Tumorrezidiven nach initialem Therapieansprechen dar. Gerade Tumore mit Neuralleistenursprung, welche im Fokus dieser Arbeit standen, haben auch heute oft noch eine sehr schlechte Prognose, da sie früh metastasieren und schnell zu Rezidiven neigen. Als Erklärungsversuch für die Rezidivbildung ist in den letzten Jahren das Konzept der Tumorstammzelle, die so genannte Tumorstammzellhypothese, immer mehr in den Fokus gerückt. Hierbei geht man davon aus, dass ein Tumor aus einer kleinen Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften, den so genannten Tumorstammzellen, hervorgeht und nur diese das Potential haben, einen neuen Tumor zu initiieren, sich in die verschiedenen Zellarten zu differenzieren und sich durch eine asymmetrische Zellteilung uneingeschränkt selbst zu regenerieren (Clarke et al., 2006). Bei vielen Tumorentitäten konnten diese Tumorstammzellen inzwischen nachgewiesen werden (Al-Hajj et al., 2003; Singh et al., 2003; Collins et al., 2005; Schatton et al., 2008; Dalerba et al., 2007; Eramo et al., 2008). Trotzdem stellt die Identifizierung von potentiellen Markern, des genauen Ursprungs der Tumorstammzellen, ihr biologisches Verhalten und mögliche Einflussfaktoren ein nach wie vor weites und oft noch unbekanntes Forschungsfeld dar.

Indem im Rahmen dieser Arbeit die potentielle Expression und Regulation von verschiedenen Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren, die bei der Wanderung von Stammzellen und in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle spielen, bei humanen Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung im Vergleich zum Mammakarzinom untersucht wurde, sollten zum einen Tumorstammzellmarker, die für Tumore mit Neuralleistenursprung charakteristisch sind, identifiziert werden, und zum anderen ihre Steuerung und mögliche Einflussfaktoren erkannt und geprüft werden.

4.1 Stammzellmarker bei humanen Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung

In allen in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien konnte eine Vielzahl der überprüften Stammzellmarker nachgewiesen werden. Während sich die Expression bei den embryonalen Stammzellmarkern *Nanog*, *Oct4*, *Klf4* und *cMyc* noch ziemlich homogen über alle Zelllinien, unabhängig ob mit oder ohne Neuralleistenursprung, verteilte, war sie bei den neuralen Stammzellmarkern *Sox2*, *Musashi* und *CD133* deutlich heterogener, selbst wenn es sich dabei um verschiedene Zelllinien der an sich gleichen Tumorentität handelte. Die neuralen Stammzellmarker *Sox2* und *CD133* konnten hier fast ausschließlich bei den Lungenkarzinom- und den Neuroblastom-Zelllinien detektiert werden. Beim Melanom scheinen sie nach unseren Ergebnissen eine deutlich untergeordnete Rolle zu spielen und beim Mammakarzinom, der einzigen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorentität ohne Neuralleistenursprung, scheinen sie überhaupt keine Bedeutung zu haben. Dieses Ergebnis ist gut mit der unterschiedlichen Herkunft der Zelllinien zu erklären. Es verhält sich allerdings widersprüchlich zu anderen aktuellen Publikationen, in denen die beiden Marker als Charakteristikum von Tumorstammzellen des Mammakarzinoms nachgewiesen werden konnten (Leis et al., 2012; Wright et al., 2008). Die Expression anderer bekannter Marker stimmte hingegen mit bisherigen Publikationen überein (Ponti et al., 2005; Eramo et al., 2008; Bertolini et al., 2009) (siehe auch Tabelle 1).

Die zu Beginn angesprochene Heterogenität stellt in der Tumorstammzellforschung kein unbekanntes Problem dar. In den letzten Jahren konnten zwar zahlreiche Tumorstammzellmarker identifiziert werden, jedoch lassen sich diese nicht verallgemeinern und weisen zwischen verschiedenen Tumorentitäten und sogar zwischen verschiedenen Patienten große Unterschiede auf (Magee et al., 2012). Während beispielsweise bei manchen Leukämien einige Stammzellen bestimmte Marker sehr homogen exprimieren, treten daneben trotzdem Stammzellgruppen ohne diese Marker auf, bzw. andersherum existieren Zellen mit diesen Markern, die aber trotzdem keine Stammzeleigenschaften aufweisen (Eppert et al., 2011). Dies erschwert die Identifikation und Isolation der Tumorstammzellen und ihre selektive Bekämpfung natürlich erheblich.

Ein weiterer hervorzuhebender Aspekt dieser Arbeit stellt die Expression von *cMyc* bei allen Tumorzelllinien dar, die sich durch ihre besonders hohe Ausprägung von den anderen Stammzellmarkern abhebt. *cMyc* ist für die Regulation von ca. 15% der menschlichen Gene verantwortlich, und zwar v.a. für Gene, die für die Proliferation der Zellen wichtig sind, und wird daher auch als Protoonkogen bezeichnet. Bei vielen Tumoren ist das Myc-Gen mutiert, sodass *cMyc* dort konstitutiv exprimiert wird und vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Erlangung der Unsterblichkeit der Zellen spielt. Diesen Aspekt konnten Ambros und Karlic bereits 1987 beschreiben, indem sie mittels *in-situ*-Hybridisierung nachwiesen, dass das humane Papillomavirus 18 bei HeLa-Zellen (Zervixkarzinomzellen der 31-jährigen Patientin Henrietta Lacks, aus denen die erste permanente humane Zelllinie etabliert wurde) genau die Chromosomenregion des Myc-Gens befällt und so zu einer Aktivierung dieses Gens führt. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von *cMyc* bei Tumoren oft mit einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognose korreliert, welcher Aspekt auch schon mehrfach publiziert wurde (Lin et al., 2012; Beroukhim et al., 2010; Nesbit et al., 1999). Da die Überexpression von *cMyc* bei vielen Tumoren, wie scheinbar auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien, eine wichtige Rolle spielt, stellt das Myc-Gen eine beliebte Zielstruktur für mögliche Therapieansätze dar (Zuber et al., 2011).

4.2 Chemokinrezeptoren und Regulation durch Chemokine

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Regulation der Stammzellmarker und Rezeptoren durch Chemokine stellte zunächst die Darstellung der Expression der Chemokinrezeptoren bei den verschiedenen Tumorzelllinien dar. Der Rezeptor *CXCR4* konnte in mittelstarker bis starker Expression in allen Zelllinien mit Ausnahme der Lox-Zellen (Melanom) detektiert werden und scheint daher nahezu überall, unabhängig vom Ursprung der Tumorzellen, eine wichtige Funktion zu haben. Dies spiegelt auch die aktuelle Literatur wider, in welcher dieser Rezeptor inzwischen bei den meisten Tumorentitäten beschrieben worden ist und ihm mit seinem Liganden *CXCL12* schon lange eine bedeutende Rolle in der Metastasierung, aber auch in der Proliferation und

dem Überleben der Tumorzellen zugeschrieben wird (Balkwill, 2004; Hattermann et al., 2013).

Den Rezeptor *CXCR7* konnten wir dagegen nur in wenigen Tumorzelllinien nachweisen: In allen Neuroblastom-Zelllinien, der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 und der Melanom-Zelllinie Mel6. Bei diesen Zelllinien waren also beide Rezeptoren koexprimiert. Erst 2005 wurde *CXCR7* als zweiter Rezeptor für *CXCL12* beschrieben (Balabanian et al., 2005). Allerdings galt er lange als so genannter *decoy*-Rezeptor ohne eigene Signalkaskade, nur mit der Funktion, das Chemokin *CXCL12* abzufangen und so einen Effekt und eine Signalkaskade über den Rezeptor *CXCR4* zu verhindern (Hattermann et al., 2010; Naumann et al., 2010). Erst vor wenigen Jahren konnte ihm die Auslösung einer eigenen Signalkaskade über β -Arrestin nachgewiesen werden (Rajagopal et al., 2010). Die Ansicht, dass die durch das Chemokin *CXCL12* ausgelösten Effekte ausschließlich einer Signalkaskade über den Rezeptor *CXCR4* zugeschrieben werden können, musste revidiert werden. Inzwischen wird auch dem Rezeptor *CXCR7* eine bedeutende Rolle in der Metastasierung, Proliferation, dem Überleben und zusätzlich auch in der Neovaskularisierung der Tumore zugeschrieben (Hattermann et al., 2010; Singh et al., 2013).

Während der Rezeptor *CXCR4* schon länger als Tumorstammzellmarker bei diversen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Pankreas- oder dem Prostatakarzinom (siehe auch Tabelle 1), bekannt ist, ist die Rolle des Rezeptors *CXCR7* noch unklar. Hattermann et al. konnten 2010 zeigen, dass beim humanen Glioblastom der Rezeptor *CXCR4* von einer kleinen Zellgruppe mit Stammzeleigenschaften (Tumorstammzellen) exprimiert wird, der Rezeptor *CXCR7* dagegen von den weiter ausdifferenzierten Zellen. Der Differenzierungsprozess geht hier also mit einem Rezeptorwechsel von *CXCR4* zu *CXCR7* einher. Und auch die Effekte durch Stimulation mit ihrem Liganden *CXCL12* sind hier bei beiden Rezeptoren unterschiedlich: Während *CXCR4* die Proliferation (Ehtesham et al., 2009), Migration (Sciaccaluga et al., 2010) und die Angiogenese (Yang et al., 2005) der Glioblastomzellen fördert, schützt *CXCR7* diese vor der Apoptose durch Chemotherapeutika (Hattermann et al., 2012).

Ein weiterer Ligand des Chemokinrezeptors *CXCR7* ist das Chemokin *CXCL11*. Dieses bindet ebenfalls an den Chemokinrezeptor *CXCR3*, welchen wir in keiner unserer getesteten Tumorzelllinien nachweisen konnten. Daher sind alle Effekte der Stimulation

der Tumorzellen mit dem Chemokin *CXCL11* bei uns ausschließlich auf den Rezeptor *CXCR7* zurückzuführen.

Bei unseren Stimulationsversuchen mit den Chemokinen *CXCL11* und *CXCL12* zeigten sich die starken und teils sogar signifikanten Expressionsänderungen fast ausschließlich bei den embryonalen Stammzellmarkern (*Nanog*, *Oct4*, *Klf4*, *cMyc*) und dem Chemokinrezeptor *CXCR4*. Die neuronalen Stammzellmarker (*Sox2*, *Musashi*, *CD133*) und der Chemokinrezeptor *CXCR7* wurden mit Ausnahme der OH3-Zellen kaum und in keinem Fall signifikant reguliert. Generell lässt sich sagen, dass die Stimulationseffekte in Form von Expressionsänderungen hier bei den unterschiedlichen Tumorzelllinien sehr verschieden waren und sich kaum vereinheitlichen lassen. Ebenso ist es sehr schwierig, zwischen den Zelllinien mit Neuralleistenursprung und der Mamma-karzinom-Zelllinie zu trennen. Dies passt zu unseren Ergebnissen bezüglich der allgemeinen Expressionsprofile der Stammzellmarker und Chemokinrezeptoren, bei denen sich die Verteilung über die verschiedenen Tumorzelllinien ebenfalls oft ausgesprochen heterogen darstellte. Eine der Ausnahmen war hier der Stammzellmarker *cMyc*, dessen Expression bei allen Zelllinien sehr hoch war. Und auch bei der Chemokinstimulation war seine Expressionsänderung auffällig. Bei zwei der drei getesteten Zelllinien konnte seine Expression signifikant gesteigert werden: Bei den MCF7-Zellen (*CXCR4* und *CXCR7*) durch das Chemokin *CXCL11* auf das 10-fache und bei den OH3-Zellen (*CXCR4*) durch das Chemokin *CXCL12* auf das 7-fache. Nur bei den SKNSH-Zellen zeigte sich keine Expressionsänderung. Dies ist besonders im Hinblick darauf interessant, dass wir ansonsten keine einheitliche Expressionssteigerung bei einem der Stammzellmarker bei mehreren Zelllinien durch eine Chemokinstimulation nachweisen konnten. Der Stammzellmarker *cMyc* lässt sich hier also je nach Rezeptorexpression durch das Chemokin *CXCL11* oder *CXCL12* hochregulieren. Gerade *cMyc* ist bei vielen Tumoren überexprimiert und geht mit einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognose einher (Lin et al., 2012; Beroukhim et al., 2010; Nesbit et al., 1999). Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Tumorstammzellen und normalen Stammzellen zu charakterisieren, verglichen Wong et al. 2008 die Transkriptionsprogramme von embryonalen Stammzellen, adulten Gewebestammzellen und humanen Tumoren. Es zeigte sich, dass das Transkriptionsprogramm der embryonalen Stammzellen bei vielen epithelialen Tumoren aktiviert war und einen

Prädiktor für Metastasierung und schlechte Prognose darstellte. Dabei war nur das Onkogen *cMyc*, nicht aber andere Onkogene, in der Lage, dieses Transkriptionsprogramm bei normalen Zellen und Tumorzellen zu reaktivieren. Die Autoren folgerten, dass die Aktivierung des Transkriptionsprogramms von embryonalen Stammzellen bei differenzierten adulten Zellen die pathologische uneingeschränkte Selbsterneuerung als Charakteristikum von Tumorstammzellen induzieren würde und so *cMyc* die Anzahl an Tumorstammzellen erhöhen könnte (Wong et al., 2008). Überträgt man diese Ergebnisse auf unsere Versuche, könnten die Chemokine *CXCL11* und *CXCL12* mit ihren Rezeptoren *CXCR4* und *CXCR7* möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorstammzellen haben, indem sie die Expression des Onkogens *cMyc* beeinflussen.

4.3 Regulation durch neurales Stammzellmedium

Das *Neural Stem Cell Medium (NSC)* ist ein Medium, welches zur Gewinnung und Kultivierung von neuronalen Stammzellen genutzt wird. Beispielsweise gelang es Zhou et al. 2009 mit Hilfe des serumfreien *NSC*-Mediums, Tumorstammzellen der Gliom-Zelllinie C6 zu isolieren, während hingegen bei der Kultivierung derselben Zelllinie in einem serumhaltigen Medium der Anteil der Tumorstammzellen im Vergleich zu den differenzierten Tumorzellen deutlich abnahm. Dieser beobachtete Effekt war bei einem Wechsel auf das jeweils andere Medium reversibel, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass das *NSC*-Medium in der Lage ist, Tumorstammzellen von differenzierten, in serumhaltigem Medium kultivierten Tumorzellen zu isolieren und diese in ihrem undifferenzierten Zustand zu halten (Zhou et al., 2009). Andere Publikationen beschreiben eine Induktion der Zelldifferenzierung durch serumhaltige Medien (Ward et al., 2009). In Anbetracht dieser Erkenntnisse lag es daher nahe, im Rahmen unserer Arbeit den potentiellen Effekt des *NSC*-Mediums auch bei Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung zu überprüfen.

Analog zu der Stimulation mit den Chemokinen *CXCL12* und *CXCL11* zeigten sich hierbei die starken und teils sogar signifikanten Expressionsänderungen nahezu ausschließlich bei den embryonalen Stammzellmarkern (*Nanog*, *Oct4*, *Klf4*, *cMyc*) und

dem Chemokinrezeptor *CXCR4*. Nur bei den OH3-Zellen fand auch eine gewisse Regulation der neuralen Stammzellmarker (*Sox2*, *Musashi*, *CD133*) statt, die jedoch in keinem der Fälle statistisch signifikant war. Anders als bei der Chemokinstimulation waren beim *NSC*-Medium die Stimulationseffekte grundsätzlich einheitlicher und zeigten bei den verschiedenen Zelllinien ähnliche Tendenzen. Besonders hervorzuheben sind die Expressionsänderungen der beiden Stammzellmarker *Nanog* und *cMyc* und des Chemokinrezeptors *CXCR4*: Die Expression von *Nanog* konnte durch das *NSC*-Medium bei drei der vier getesteten Zelllinien (MCF7, Lox, SKNSH) deutlich hochreguliert werden, bei den Lox- und SKNSH-Zellen sogar mit statistischer Signifikanz. Der Transkriptionsfaktor *Nanog*, welcher eine Schlüsselrolle in der Steuerung und Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und Pluripotenz von embryonalen Stammzellen einnimmt, wurde schon bei diversen Tumorentitäten nachgewiesen und induziert neben anderen Faktoren, wie z.B. *Oct4*, die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen (Chicu et al., 2010; Jeter et al., 2011; Shan et al., 2012). Sein *Knockdown* bewirkt ein verringertes klonales Wachstum und eine geringere Tumorigenität bei Tumorzelllinien der Brust, des Darms und der Prostata (Jeter et al., 2009). Des Weiteren konnten Jeter et al. auch zeigen, dass *Nanog* bei Prostatakarzinom-Zelllinien die Expression anderer Moleküle und Rezeptoren, die als Marker von Tumorstammzellen gelten, steigert. Im Hinblick auf unsere vorherigen Versuche sind hier vor allem *CD133* und *CXCR4* zu nennen (Jeter et al., 2011).

Die zweite herausstechende Expressionsänderung betrifft den Stammzellmarker *cMyc*. Bei diesem fand ebenfalls eine deutliche Regulation bei drei der vier getesteten Zelllinien statt, in zwei Fällen statistisch signifikant. Interessanterweise bewegte sich diese Regulation in genau entgegengesetzte Richtungen: Bei den MCF7-Zellen konnte die Expression von *cMyc* durch das *NSC*-Medium signifikant gesenkt, bei den OH3-Zellen dagegen signifikant und bei den SKNSH-Zellen ein wenig gesteigert werden. Eine Erklärung hierfür wäre die unterschiedliche Herkunft der drei Zelllinien. Das kleinzellige Lungenkarzinom (OH3-Zellen) und das Neuroblastom (SKNSH-Zellen) haben ihren Ursprung im Gegensatz zum Mammakarzinom (MCF7-Zellen) in der Neuralleiste. Das *NSC*-Medium, welches speziell für die Kultivierung und Gewinnung von neuralen Stammzellen verwendet wird, scheint also bei einigen Tumoren mit Neuralleistenursprung die Stammzeleigenschaften der Zellen durch eine gesteigerte

Expression von *cMyc* zu erhöhen, bei Tumoren ohne neuronalen Ursprung dagegen diese durch eine verringerte Expression von *cMyc* zu senken. Wie im vorherigen Kapitel dieser Arbeit schon ausgeführt, stellt gerade *cMyc* einen sehr entscheidenden Faktor im Wiedererlangen von Stammzeleigenschaften dar (Wong et al., 2008) und beeinflusst bei diversen Tumoren maßgeblich die Prognose (Lin et al., 2012; Beroukhi et al., 2010; Nesbit et al., 1999).

Die dritte auffällige Expressionsänderung betrifft den Chemokinrezeptor *CXCR4*. Dieser konnte bei allen Zelllinien, bei denen er vorher schon exprimiert war (MCF7-, OH3-, SKNSH-Zellen), deutlich und bei den MCF7-Zellen sogar signifikant hochreguliert werden. Dies passt zu den Arbeiten von Hattermann et al., die 2010 zeigen konnten, dass der Differenzierungsprozess der Tumorzellen beim Glioblastom mit einem Rezeptorwechsel von *CXCR4* zu *CXCR7* einhergeht und der Rezeptor *CXCR4* von den Tumorstammzellen exprimiert wird. Gerade im Hinblick auf den von uns gezeigten Effekt der Chemokinstimulation auf die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen ist dies ein interessantes Ergebnis, da das NSC-Medium durch eine Steigerung der Chemokinrezeptorexpression die Angriffsfläche für die Chemokine vergrößern und damit auch ihren Einfluss steigern kann.

4.4 Ursprung der Tumorstammzellen und Ausblick

Der genaue Ursprung der Tumorstammzellen ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Grundsätzlich sind dabei mindestens zwei Erklärungsansätze denkbar: Zum einen die Stammzellen selbst, zum anderen differenzierte Zellen oder so genannte Progenitorzellen, die sich in einem Übergangsstadium zwischen Stamm- und differenzierter Zelle befinden (Vincente-Duenas et al., 2009). Für erstere Möglichkeit, also die Stammzellen selbst, spricht die Tatsache, dass in einer normalen Zelle erst eine Vielzahl an Mutationen akkumulieren muss, damit diese zu einer Tumorzelle entartet (Knudson et al., 1973). In vielen Geweben, in denen häufig Tumore entstehen, wie z.B. im Blut, der Darmschleimhaut oder der Haut, haben die differenzierten Zellen und die Progenitorzellen aber nur eine sehr begrenzte Lebensdauer, die im Gegensatz zu der der Stammzellen, die sich lebenslang in diesem Gewebe bzw. diesem Organ befinden, kaum

ausreichen kann, um genügend Mutationen für eine Entartung anzusammeln (Pardal et al., 2003). Auf der anderen Seite konnten beispielsweise Wong et al. 2008 zeigen, dass durch Aktivierung des Onkogens *cMyc* das Transkriptionsprogramm von embryonalen Stammzellen bei normalen differenzierten Zellen reaktiviert werden konnte. Des Weiteren gelang es Takahashi und Yamanaka 2006 mittels Transfektion der vier Stammzellmarker *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* und *Klf4* aus Fibroblasten der Maus wieder pluripotente Stammzellen herzustellen. Dies sind alles Indizien dafür, dass auch eine differenzierte oder eine Progenitorzelle durch bestimmte Mutationen, die ihr wieder Stammzelleigenschaften verleihen, zu einer Tumorstammzelle werden kann.

Wenn nun also aus differenzierten Zellen wieder Stammzellen hergestellt werden können und eine Tumorstammzelle auch durch Mutationen in einer differenzierten Zelle entstehen kann, wäre es ebenso denkbar, dass auch die ausdifferenzierten Zellen innerhalb eines Tumors wieder zu Tumorstammzellen dedifferenzieren können (siehe Abb. 17).

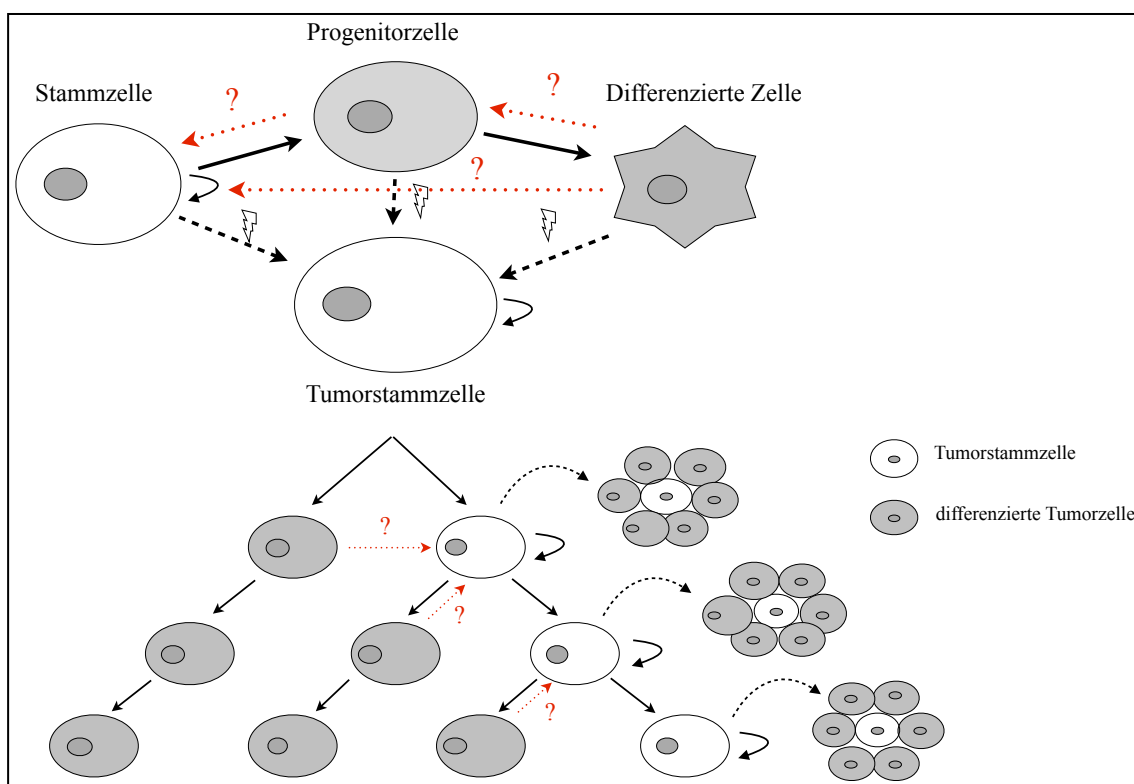


Abb. 17: Ursprung der Tumorstammzelle. Der Ursprung der Tumorstammzellen ist bisher nicht hinreichend geklärt: Entstehen diese durch Mutationen der Stammzellen selbst oder auch durch Dedifferenzierungsprozesse von Progenitor- oder schon endgültig differenzierten Zellen? Und können dann auch differenzierte Tumorzellen wieder zu Tumorstammzellen werden?

Hierbei kommt dem so genannten Mikroenvironment des Tumors eine wesentliche Bedeutung zu: Die den Tumor umgebenden Entzündungszellen, Fibroblasten und Blutgefäß-Endothelzellen sezernieren eine ganze Reihe an Botenstoffen und Molekülen, die Einfluss auf die eigentlichen Tumorzellen haben (Horgan et al., 1987). Zu diesen gehören auch die Chemokine, denen schon lange eine entscheidende Rolle in der Tumorbilogie zugeschrieben wird (O'Hayre et al., 2008) und welche nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Stammzeleigenschaften verschiedener Tumorzelllinien mit Neuralleistenursprung, aber auch der getesteten Mammakarzinom-Zelllinie, durch Expressionssteigerung von Stammzellmarkern steigern können.

Für eine erfolgreiche Tumorthherapie ist es notwendig, neben der Masse an differenzierten Tumorzellen auch gezielt die Tumorstammzellen anzugreifen. Hierbei kommen im Wesentlichen drei Therapieprinzipien in Frage (siehe Abb. 18): Erstens, die Tumorstammzellen anhand spezifischer Stammzellmarker selektiv anzugreifen und zu vernichten. Zweitens, ihre Entstehung, z.B. durch mögliche Dedifferenzierungsprozesse ausdifferenzierter Tumorzellen, zu verhindern. Eine Option wären hier beispielsweise Antagonisten, die selektiv die CXCL12/CXCR4/CXCR7-Signalkaskade blockieren, wie z.B. der CXCR4-Antagonist AMD3100, das CXCL12-Analogon CTCE-9908, das anti-CXCL12-Aptamer Nox-A12 oder der CXCR7- Antagonist CCX733, um nur einige zu nennen (Würth et al., 2013). Drittens, gezielt die Tumorstammzellen zur Ausdifferenzierung zu differenzierten Tumorzellen zu bewegen und sie so in die Apoptose zu führen oder der gängigen zytotoxischen Tumorthherapie zugänglicher zu machen. Beispiele hierfür wären Retinoide, wie ATRA (*all-trans-retinoic acid*), welche schon lange in der Therapie der Akuten Promyelozyten Leukämie eingesetzt werden (Tallman et al., 1997) und welche auch bei diversen anderen Tumoren (u.a. auch Melanom, Neuroblastom und Mammakarzinom) zumindest im Zell- und im Mausmodell Erfolge zeigen konnten (Sell 2004), oder BMPs, wie BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), welches im Zell- und im Mausmodell Erfolge beim Glioblastom (Piccirillo et al., 2006) und beim kolorektalen Karzinom zeigen konnte (Lombardo et al., 2011) .

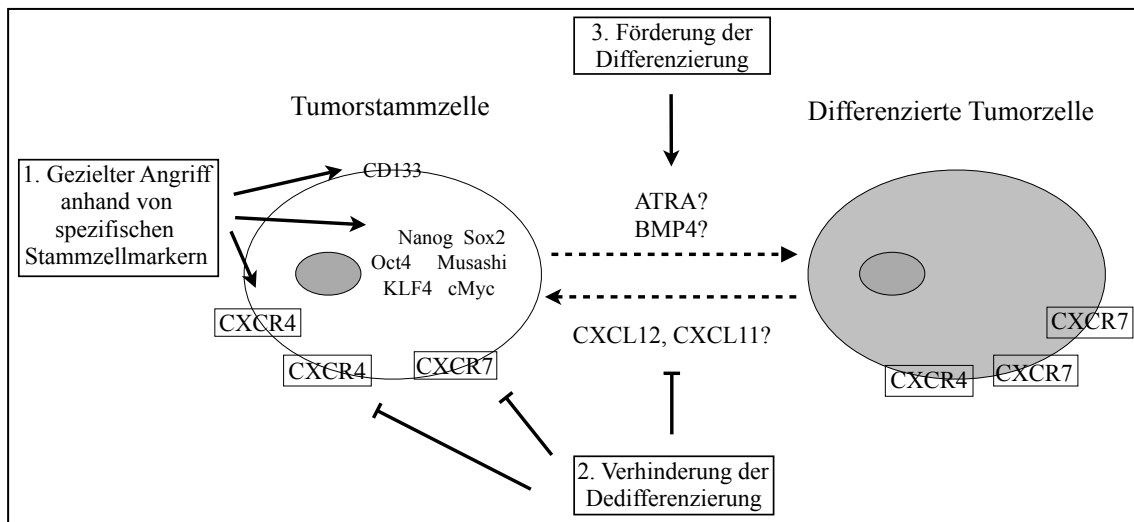


Abb. 18: Therapieprinzipien für Tumorstammzellen. ATRA = all-trans-retinoic acid, BMP4 = bone morphogenetic protein 4

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass es für eine erfolgreiche Tumorthherapie essentiell ist, die Tumorstammzellen stärker in den Fokus zu rücken. Es sollten in Zukunft weitere potentielle Stammzellmarker etabliert und das biologische Verhalten der Tumorstammzellen weiter erforscht werden. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass diese Marker und ihre Regulation bei verschiedenen Tumorentitäten deutlich variieren können. Mit unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die Bedeutung der einzelnen Stammzellmarker und die ihrer Einflussfaktoren sich nicht nur bei Neuralleistentumoren im Vergleich zum Mammakarzinom unterschied, sondern auch innerhalb der Neuralleistentumore und sogar innerhalb einer Tumorentität je nach Zelllinie zum Teil deutlich variieren konnte. Um in diesem Sinne neue Therapiemöglichkeiten entwickeln und so eventuell das große Problem der Tumorrezidivbildung in Zukunft lösen und eine Tumorerkrankung damit zu einer heilbaren Erkrankung machen zu können, besteht also weiterhin ein großer Forschungsbedarf.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz großer Fortschritte und erheblicher Erkenntnisse im Bereich der Tumorforschung können viele Tumorerkrankungen, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien, gegenwärtig nicht kurativ behandelt werden. Einen wesentlichen Grund hierfür stellt die Bildung von Tumorrezidiven nach initialem Therapieansprechen dar. Als Erklärungsversuch für die Rezidivbildung ist in den letzten Jahren das Konzept der Tumorstammzelle, die so genannte Tumorstammzellhypothese, bei der man davon ausgeht, dass ein Tumor aus einer kleinen Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften hervorgeht, immer mehr in den Fokus gerückt. Diese sollte im Rahmen dieser Arbeit an Tumoren mit Neuralleistenursprung, welche aufgrund ihrer frühen Metastasierung und schnellen Rezidivbildung auch heute oft noch eine sehr schlechte Prognose haben, überprüft werden.

Als Modell dienten hierbei Tumorzelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms, des Melanoms und des Neuroblastoms und als Vergleich hierzu die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7. Bei diesen wurde mittels Realtime-PCR und immunzytochemischer Färbungen die Expression verschiedener embryonaler und neuraler Stammzellmarker und die der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7, von denen bekannt ist, dass sie bei der Wanderung von Stammzellen und in der Tumorbologie eine wichtige Rolle spielen, geprüft und ihre Regulation durch die Chemokine CXCL11 und CXCL12 und neurales Stammzellmedium untersucht. Auf diesem Weg sollten potentielle, für Neuralleistentumore charakteristische Stammzellmarker identifiziert und mögliche Einflussfaktoren erkannt werden.

Die embryonalen Stammzellmarker Nanog, Oct4, Klf4 und cMyc zeigten insgesamt eine mittelstarke bis starke Expression mit ziemlich homogener Verteilung über alle Zelllinien. Besonders stark war dabei die Expression von cMyc. Die neuralen Stammzellmarker Sox2, Musashi und CD133 wurden vergleichsweise schwächer und mit einer deutlich heterogeneren Verteilung über alle Zelllinien exprimiert. Ihre Expression war vor allem auf die Lungenkarzinom- und Neuroblastom-Zelllinien beschränkt. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 verhielt sich analog zu der der embryonalen Stammzellmarker mit Ausnahme der Lox-Zelllinie (Melanom), bei welcher er nicht detektiert werden konnte. Der Chemokinrezeptor CXCR7 dagegen

wurde nur bei einzelnen Zelllinien exprimiert: Bei allen Neuroblastom-Zelllinien, der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 und der Mel6-Zelllinie (Melanom).

Bei der Stimulation mit den Chemokinen CXCL11 und CXCL12 und dem neuronalen Stammzellmedium zeigten sich die starken und teils sogar signifikanten Expressionsänderungen fast ausschließlich bei den embryonalen Stammzellmarkern und dem Chemokinrezeptor CXCR4. Besonders hervorzuheben ist dabei die in mehreren Fällen signifikante Expressionserhöhung vom Onkogen cMyc, von welchem angenommen wird, dass es eine wichtige Rolle in der Erlangung der Unsterblichkeit der Tumorzellen spielt und dessen Expression bei vielen Tumoren mit einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognose korreliert. Die neuronalen Stammzellmarker und der Chemokinrezeptor CXCR7 wurden mit Ausnahme der OH3-Zelllinie (Lungenkarzinom) kaum und in keinem Fall signifikant reguliert.

Zusammenfassend konnten wir mit dieser Arbeit zeigen, dass Neuralleistentumore eine Vielzahl an Stammzellmarkern und Chemokinrezeptoren exprimieren und sich vor allem die embryonalen Marker auch durch Chemokine und neurales Stammzellmedium regulieren lassen. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es dabei allerdings wichtig, zu beachten, dass sich die Bedeutung der einzelnen Stammzellmarker und die ihrer Einflussfaktoren sich in unseren Versuchen nicht nur bei Neuralleistentumoren im Vergleich zum Mammakarzinom unterschied, sondern dass ihre Bedeutung auch innerhalb der Neuralleistentumore und sogar innerhalb einer Tumorentität je nach Zelllinie deutlich variieren konnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (7): 3983-3988.

Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007). Chemokine: receptor structure, interactions and antagonisms. *Annu Rev Immunol* 25: 787-820.

Ambros PF and Karlic HI (1987). Chromosomal insertion of human papillomavirus 18 sequences in HeLa cells detected by nonisotopic in situ hybridization and reflection contrast microscopy. *Human genetics* 77 (3): 251-254.

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 35760-35766.

Balkwill F (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 4 (7): 540-550.

Balkwill F (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology* 14: 171-179.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444 (7120): 756-760.

Baumann M, Krause M, Hill R (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 8 (7): 545-554.

Beier CP, Beier D (2011). CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 701-710.

Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Taberner J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463 (7283): 899-905.

Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabró E, Pastorino U, Sozzi G (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (38): 16281-16286.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382 (6594): 829-33.

Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3 (7): 730-737.

Bruce WR, Van der Gaag H (1963). A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 199: 79-80.

Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littmann DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203: 2201-2213.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113 (5): 643–55.

Chicu SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW (2010). Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res* 70 (24): 10433-10444.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66 (19): 9339-9344.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65 (23): 10946-10951.

Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB (2001). Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2: 82-91.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Lui R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (24): 10158-10163.

Debeb BG, Xu W, Mok H, Li L, Robertson F, Ueno NT, Reuben J, Lucci A, Cristofanilli M, Woodward WA (2010). Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76 (3):889-895.

De Clercq E (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (7): 581-587.

Dingli D, Michor F (2006). Successful therapy must eradicate cancer stem cells. *Stem Cells* 24 (12): 2603-2610.

Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, Ried T, Kunz-Schughart LA (2010). CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116. *Radiother Oncol* 94 (3): 375-383.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (26): 15665-15670.

Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK (2011). CXCL12 (SDF1 α)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies?. *Clin Cancer Res* 17: 2074-2080.

Duru N, Fan M, Candas D, Mena C, Liu HC, Nantajit D, Wen Y, Xiao K, Eldridge A, Chromy BA, Li S, Spitz DR, Lam KS, Wicha MS, Li JJ (2012). HER2-associated radiation resistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 18 (24): 6634-47.

Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, Metzeler KH, Poepl A, Ling V, Beyene J, Canty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL, Dick JE (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* 17: 1086-93.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15 (3): 504-514.

Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC (2009). CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett.* 274: 305-312.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cell* 121 (5): 759-767.

Facchino S, Abdouh M, Chato W, Bernier G (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* 30 (30): 10096-10111.

Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A (2007). Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 67 (5): 2187-2196.

Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 22 (5): 1129-1134.

Frank NY, Margaryan A, Huang y Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65 (10): 4320-4333.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1 (5): 555-567.

Goldmann T, Dromann D, Radtke J, Marwitz S, Lang DS, Schultz H, Vollmer E (2008). CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissue; possible regulation upon chemotherapy. *Virchows Arch* 452: 347-348.

Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-463.

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R (2010). The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70: 3299-3308.

Hattermann K, Mentlein R, Held-Feindt J (2012). CXCL12 mediates apoptose resistance in rat C6 glioma cells. *Oncol. Rep.* 27: 1348-1352.

Hattermann K, Mentlein R (2013). An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 und CXCR7 in tumor biology. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 195 (2): 103-110.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem cell* 1 (3): 313-323.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY (2007). Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 67 (10): 4827-4833.

Horgan K, Jones DL, Mansel RE (1987). Mitogenicity of human fibroblasts in vivo for human breast cancer cells. *The British Journal of Surgery*. 74 (3): 227-229.

Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A (2008). CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99: 1285-1289.

Hu W, Hofstetter WL, Li H et al. (2009). Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 5688-95.

Huang D, Gao Q, Guo L, Zhang C, Jiang W, Li H, Wang J, Han X, Shi Y, Lu SH (2009). Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines. *Stem Cells Dev* 18 (3): 465-473.

Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang KJ, Lee WH (2009). Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 4 (12): e8377.

Irollo E, Pirozzi G (2013). CD133: to be or not to be, is this the real question?. *Am J Transl Res* 5 (6): 563-81.

Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen JJ, Tang DG (2011). NANOG promotes cancer stem characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30: 3833-3845.

Jeter CR, Badaeux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C et al. (2009). Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. *Stem cell* 27: 993-1005.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7 (3): 330-338.

Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, Rasheed Z, Solomon A, Zou GM, Rubio-Viqueira B, García-García E, López-Ríos F, Matsui W, Maitra A, Hidalgo M (2009). A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 8 (2): 310-314.

Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N (2001). Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation* 68: 141-152.

Knudson AG, Strong LC, Anderson DE (1973). Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet.* 9: 112-158.

Komitova M and Eriksson PS (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 369 (1): 24-7.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367 (6464): 645-648.

Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG (2012). Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 31 (11): 1354-1365.

Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Muller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. 2011. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer* 11: 42.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67 (3): 1030-1037.

Li CY, Li BX, Liang Y, Peng RQ, Ding Y, Xu DZ, Zhang X, Pan Z, Wan DS, Zeng YX, Zhu XF, Zhang XS (2009). Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med* 7: 56.

Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105: 635-7.

Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zjeng BJ, Guan XY (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132 (7): 2542-2556.

Metellus P, Nanni-Metellus I, Delfino C, Colin C, Tchogandjian A, Coulibaly B, Fina F, Loundou A, Barrie M, Chinot O, Ouafiz LH, Figarella-Branger D (2011). Prognostic impact of CD133 mRNA expression in 48 glioblastoma patients treated with concomitant radiochemotherapy: a prospective patient cohort at a single institution. *Ann Surg Oncol* 18: 2937-2945.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TC (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15735-15740.

Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA (2012). Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated c-Myc. *Cell* 151 (1): 56-67.

Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, Todaro M, Iovino F, Ricci-Vitiani L, Gulotta G, Dieli F, De Maria R, Stassi G (2011). Bone Morphogenetic Protein 4 Induces Differentiation of Colorectal Cancer Stem Cells and Increases Their Response to Chemotherapy in Mice. *Gastroenterology* 140 (1): 297-309.

Lou H, Dean M (2007): Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 26 (9): 1357-1360.

Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY (2008). CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27 (12): 1749-2556.

Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21: 283-96.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9(6): 625-635.

Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J (2013). Migration, Metastasis and More: The Role of Chemokines in the Proliferation, Spreading and Metastasis of Tumors. In *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research*, U. Resende, H. Ulrich, eds. (Springer Science+Business Media Dordrecht) pp 339-358.

Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS (2007). Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* 67 (7): 3153-3161.

Mizrak D, Brittan M, Alison M (2008). CD133: Molecule of the moment. *J Pathol* 214 (1): 3–9.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113 (5): 631–42.

Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, Kondo T, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N (2011). SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Lab Invest* 91 (12): 1796-1804.

Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, Smith D, Shilo K, Zou X, Ganju RK (2011). Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion. *PLoS One*: 6 (9): e23901. Epub 2011 Sep 7.

Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE* 5, e9175.

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18 (19): 3004-16.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24 (4): 372- 376.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445 (7123): 106-110.

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signaling, and intercellular communication in the microenvironment. *Biochemical J* 406: 635-649.

Okano H, Kawahara H, Masako T, Keio N, Shibata S, Imai T (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Experimental Cell Research* 306 (2): 349-356.

Patel NV, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW (2010). Expression of the tumor suppressor Kruppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19: 2631-8.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3 (12): 895-902.

Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 46 (2): 411-422.

Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444 (7120): 761-765.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65 (13): 5506-5511.

Potton CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker musashi-1. *Differentiation* 71 (1): 28-41.

Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the „decoy“ receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 628-632.

Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A (2011). Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 317: 575-589.

Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, Matsui W (2010). Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 102 (5): 340-351.

Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA (2000). Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXCR4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 6 (1): 102-111.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissmann IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (6859): 105-111.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445 (7123): 111-115.

Rizzino A (2009). Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1 (2): 228-236.

Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M (2009). Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 16 (12): 3488-3498.

Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, nakanishi K, Kubota K, Haga H, Matsushita M, Ozaki M, Matsuno Y, Todo S (2010). Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 24: 537-546.

Schatton T, Murphy G et al. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451 (7176): 345-349.

Schutysse E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Miltatovic S, Damme J, Richmond A (2007). Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw.* 18 (2): 59-70.

Sciaccaluga M, Fioretti B, Catacuzzeno L, Pagani F, Bertollini C, Rosito M, Catalano M, D'Alessandro G, Santori A, Cantore G, Ragozzino D, Castigli E, Franciolini F, Limatola C (2010). CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Am. J. Physiol.* 299: C175-184.

Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics* 22: 356-60.

Sell S (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 1-28.

Shan J, Shen J, Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, Xu Y, Ma Q, Yang Z, Zhang Q, Ma L, Liu J, Xu S, Yan X, Bie P, Cui Y, Bian XW, Quian C (2012). Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56 (3): 1004-1014.

Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271: 20009-17.

Shin JH, Lee YS, Hong YK, Kang CS (2013). Correlation between the prognostic value and the expression of the stem cell marker CD133 and isocitrate dehydrogenase 1 in glioblastomas. *J Neurooncol* 115 (3): 333-41.

Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez A, Mackay CR, Mackay F (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14759–14764.

Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D (2013). Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24: 41-49.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkin C, Squire JA, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63 (18): 5821-5828.

Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267-7273.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432 (7015): 396-401.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118 (6): 2111-2120.

Sureban SM, May R, George RJ, Dieckgraefe BK, McLeod HL, Ramalingam S, Bishnupuri KS, Natarajan G, Anant S, Houchen CW (2008). Knockdown of RNA Binding Protein Musashi-1 Leads to Tumor Regression In Vivo. *Gastroenterology* 134 (5): 1448-1458.

Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4): 663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007). Induktion of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861-72.

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Odgen A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH (1997). All-trans-Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia. *N Engl J Med* 337: 1021-1028.

Vincente-Duenas C, de Diego JG, Rodriguez FD, Jimenez R, Cobaleda C (2009). The role of cellular plasticity in cancer development. *Curr Med Chem* 16 (28): 3676-3685.

Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283: 4283-4294.

Wang X, Ma Z, Xiao Z, Liu H, Dou Z, Feng X, Shi H (2012). Chk1 knockdown confers radiosensitization in prostate cancer stem cells. *Oncol Rep* 28 (6): 2247-2254.

Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE, Nesland JM, Suo Z (2009). Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 29 (4): 1233-1241.

Ward RJ, Lee L, Graham K, Satkunendran T, Yoshikawa K, Ling E, Harper L, Austin R, Nieuwenhuis E, Clarke ID, Hui C, Dirks PB (2009). Multipotent CD15⁺ Cancer Stem Cells in Patched-1-Deficient Mouse Medulloblastoma. *Cancer Res* 69 (11): 4682-4690.

Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997). Prominin, a novel microvillus-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12425-12430.

Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche AC, Knabenhans C, MacDonald HR, Trumpp A (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Dev.* 18: 2747-2763.

Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2 (4): 333-344.

Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res* 10 (1): R10.

Wu G and Schöler HR (2014): Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration* 3: 7.

Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T (2013). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 144-144.

Yadav VR, Sung B, Prasad S, Kannappan R, Cho SG, Liu M, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010). Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor. *J Mol Med (Berl)* 88 (12): 1243-1253.

Yang SX, Chen JH, Jiang XF, Wang QI, Chen ZQ, Zhao W, Feng YH, Xin, R, Shi JQ, Bian XW (2005). Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 523-528.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13 (2): 153-166.

Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z (2011). The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Med Sci Monit* 17 (8): HY21-26.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997). AC133, is a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 (12): 5002–5012.

Zammarchi F, Morelli M, Menicagli M, Cristofano CD, Zavaglia K, Paolucci A, Campani D, Aretini P, Boggi U, Mosca F, Cavazzana A, Cartegni L, Bevilacqua G, Mazzanti CM (2011). KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma. *The American journal of pathology* 178: 361-72.

Zhao JS, Li WJ, Ge D, Zhang PJ, Li JJ, Lu CL, Ji XD, Guan DX, Gao H, Xu LY, Li EM, Soukiasian H, Koeffler HP, Wang XF, Xie D (2011). Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One* 6 (6): e21419.

Zhou XD, Wang XY, Qu FJ, Zhong YH, Lu XD, Zhao P, Wang DH, Huang QB, Zhang L, Li XG (2009). Detection of Cancer Stem Cells from the C6 Glioma Cell Line. *Journal of International Medical Research* 37 (2): 503-510.

Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7: 243.

Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, Mulloy JC, Kogan SC, Brown P, Valent P, Bradner JE, Lowe SW, Vakoc CR (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478: 524-528.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rolf Mentlein für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und die hervorragende Betreuung bedanken. Danke, dass du dir immer Zeit für mich genommen hast und mich immer wieder ermutigt hast, eigene Ideen zu entwickeln. Danke auch, dass du dir so viel Mühe gemacht hast, mir in der kurzen Zeit einen möglichst umfassenden Einblick in die Welt der Forschung und in das Gebiet des wissenschaftlichen Arbeitens zu geben. Nicht zuletzt wegen deiner tatkräftigen Unterstützung habe ich mein Interesse an der experimentellen Forschung entdeckt, welches sicherlich auch in meiner zukünftigen Laufbahn Berücksichtigung finden wird.

Ein weiterer Dank gilt PD Dr. Kirsten Hattermann für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, Erklärung der Grafikprogramme und Betreuung meiner Dissertation. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich unterstützt hast, wo du nur konntest.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei den technischen Angestellten des Anatomischen Instituts, besonders bei Miriam Lemmer, Martina Burmester, Judith Becker und Sonja Dahle für die schöne Zeit im Labor, die technische Unterstützung und die geduldigen Erklärungen bedanken. Ihr habt dafür gesorgt, dass ich mich im Labor immer sehr wohl und dazugehörig gefühlt habe.

Ein besonderer Dank geht auch an Henrike Gebhardt für ihre geduldige Hilfe bei der Laborarbeit und der Versuchsauswertung. Danke für deine vielen hilfreichen Tipps und dass du nicht müde wurdest, mir auch immer wieder aufs Neue die Berechnung von Stoffmengen und -konzentrationen bei diversen Versuchen zu erklären.

Außerdem möchte ich mich bei den Direktoren des Anatomischen Instituts für die Möglichkeit, meine Dissertation dort durchführen zu können, bedanken.

Ein weiteres Dankeschön gilt Prof. Dr. Udo Schumacher vom Anatomischen Institut des UKE Hamburg für die freundliche Bereitstellung der von mir verwendeten Zelllinien.

Den letzten Dank widme ich meinen Eltern. Danke für euer unerschütterliches Vertrauen und eure liebevolle und beständige Unterstützung und Hilfe zu jeder Zeit.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Ardabili
Vorname: Sara
Geburtsdatum: 16.03.1992
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule:

1998-2002 Grundschole Turmweg Hamburg
2002-2010 Gymnasium Gelehrtenschule des Johanneums Hamburg
07/2010 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,0)

Studium:

10/2010 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der CAU Kiel
09/2012 1. Staatsexamen (Note 1,0)
02/2013 Beginn der Promotionsarbeit am Anatomischen Institut bei Prof. Dr. R. Mentlein
10/2015 2. Staatsexamen (Note 1,0)
12/2016 3. Staatsexamen und Approbation (Note 1,0)

Auszeichnungen/Stipendien:

WS 11/12 + SS 12 Stipendiatin des Deutschlandstipendiums, gestiftet von der Stiftung zur Förderung der Medizinischen Forschung
WS 13/14 + SS 14 Stipendiatin des Deutschlandstipendiums, gestiftet vom Malteser Krankenhaus Sankt Franziskus-Hospital Flensburg
seit 09/2013 Mitglied des „Medical Excellence“-Finalisten-Netzwerkes der Manfred-Lautenschläger-Stiftung und des MLP

Veröffentlichungen

Engel D, Hattermann K, **Ardabili S**, Held-Feindt J, Mentlein R. Embryonic stem cell markers in human astrocytomas. Brain Tumor Meeting 2013, Berlin (Poster)

Ardabili S, Hattermann K, Held-Feindt, Schumacher U, Mentlein R. Embryonic and neural stem cell markers in human ectodermal-derived tumors. 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft Würzburg 2013, Würzburg (Poster)

Ardabili S, Engel D, Gebhardt H, Held-Feindt J, Schumacher U, Lange T, Mentlein R, Hattermann K. Back to the roots: Embryonic and neural stem cell markers in human neuro-ectodermal tumors. EMBO/EMBL Symposia Frontiers in Stem Cells & Cancer 2015, Heidelberg (Poster)