

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

# **Expression von Stammzellmarkern in humanen astroglialen Hirntumoren**

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

vorgelegt von  
Katharina Dorothee Engel  
aus Preetz  
Kiel 2020

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Kirsten Hattermann-Koch  
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Daniela Wesch  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 07.10.2020

gez.: Prof. Dr. Bodo Kurz  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Astrozytäre Tumoren.....	1
1.2 Die Tumorstammzellhypothese.....	5
1.3 Embryonale Stammzellmarker .....	7
1.4 Embryonale und neurale Stammzellmarker in ZNS-Tumoren .....	8
1.5 Zielsetzung und Fragestellung .....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Gewebematerial.....	15
2.1.1.1 Humane Gewebeproben .....	15
2.1.1.2 Humane Glioblastom-Zelllinien .....	15
2.1.2 Biochemikalien.....	16
2.1.3 Enzyme .....	16
2.1.4 Antikörper.....	17
2.1.5 Primer und Sonden .....	18
2.1.6 Gebrauchsfertige Kits .....	18
2.1.7 Lösungen, Puffer und Medien.....	18
2.1.8 Geräte .....	19
2.1.9 Verbrauchsmaterial.....	20
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Realtime-RT-PCR .....	20
2.2.1.1 RNA-Isolierung.....	21
2.2.1.2 Herstellung von cDNA.....	21
2.2.1.3 Realtime-RT-PCR .....	22
2.2.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten .....	23
2.2.3 Zellkultur .....	25

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1	Transkription von Stammzellmarkern in soliden astrozytären Tumorgeweben und im Normalhirn.....	26
3.2	Immunhistochemischer Nachweis ausgewählter Marker an humanen Glioblastomkryoschnitten .....	28
3.3	Untersuchung der Ko-Lokalisation von Stammzellmarkern sowie anderen Markern mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an humanen Glioblastom-Gefrierschnitten .....	31
3.3.1	Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2.....	32
3.3.2	Immunfluoreszenzdoppelfärbung: Die Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in Kombination mit weiteren Markern .....	34
3.3.3	Quantitative Auswertung immunhistochemischer Doppelfärbungen von Stammzell- und weiteren Markern .....	39
3.4	Transkription von Stammzellmarkern in Glioblastomzelllinien .....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>45</b>
4.1	mRNA-Expression von Stammzellmarkern in humanen Glioblastomproben und Normalhirn.....	46
4.2	Immunhistochemischer Nachweis ausgewählter Marker in Glioblastomkryoschnitten .....	48
4.3	Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene in Glioblastom-Zelllinien .....	50
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	51
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>55</b>
	<b>Danksagung und Publikation</b> .....	<b>66</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Glioblastom im Marklager der rechten Großhirnhemisphäre. ....	2
Abb. 2: Magnetresonanztomographie (MRT) eines frontalen linksseitigen Glioblastoms. ....	3
Abb. 3: Theorie der zielgerichteten Tumorstammzelltherapie .....	7
Abb. 4: Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz .....	23
Abb. 5: Transkription von Stammzellmarkern in humanen Astrozytom- und Glioblastomgewebeprobe.....	27
Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis von embryonalen und neuralen Stammzellmarkern, dem Chemokinrezeptor CXCR4 und dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 .....	29
Abb. 7: Quantitative Auswertung Immunfluoreszenz-gefärbter Zellen in humanen Glioblastom- Proben.....	30
Abb. 8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben. ....	33
Abb. 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Chemokinrezeptors CXCR4 mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.....	35
Abb. 10: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Stammzellmarker Musashi-1 mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.....	36
Abb. 11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 in Kombination mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben. ....	37
Abb. 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem astroglialen Marker GFAP in Kombination mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben. ....	38
Abb. 13: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Nanog in Kombination mit weiteren Markern in humanen Glioblastom-Proben. ....	40
Abb. 14: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Oct4 und Sox2 in Kombination mit weiteren Markern in humanen Glioblastom-Proben. ....	42
Abb. 15: Transkription von embryonalen Stammzellmarkern in humanen Glioblastomzelllinien. ....	44

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorstammzellmarker in Astrozytomen.....	9
--	---

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Astrozytom /in Abbildungen abgekürzt)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD133	Cluster of differentiation 133, Prominin-1
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cMyc	cellular Myc (Abkürzung Myc stammt von Myelocytomatose)
CT	Cycle of Threshold
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindodihydrochlorid
Δ	Delta (griechischer Buchstabe), für Differenz
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; gliales fibrilläres saures Protein
HIV	Human immunodeficiency virus I
iPSC	induced pluripotent stem cell; induzierte pluripotente Stammzelle
KLF4	Krüppel-like factor 4
MIB-1	Made in Borstel 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Nanog	von Tir nan Og (gälisch) ‚Land der ewigen Jugend‘
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
PBS	Phosphate-buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse transcription chain reaction; Reverse-Transkription-Kettenreaktion
Sox2	Sex determining region Y- box 2
TBST	Tris buffered saline + Tween
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
WHO	World Health Organisation

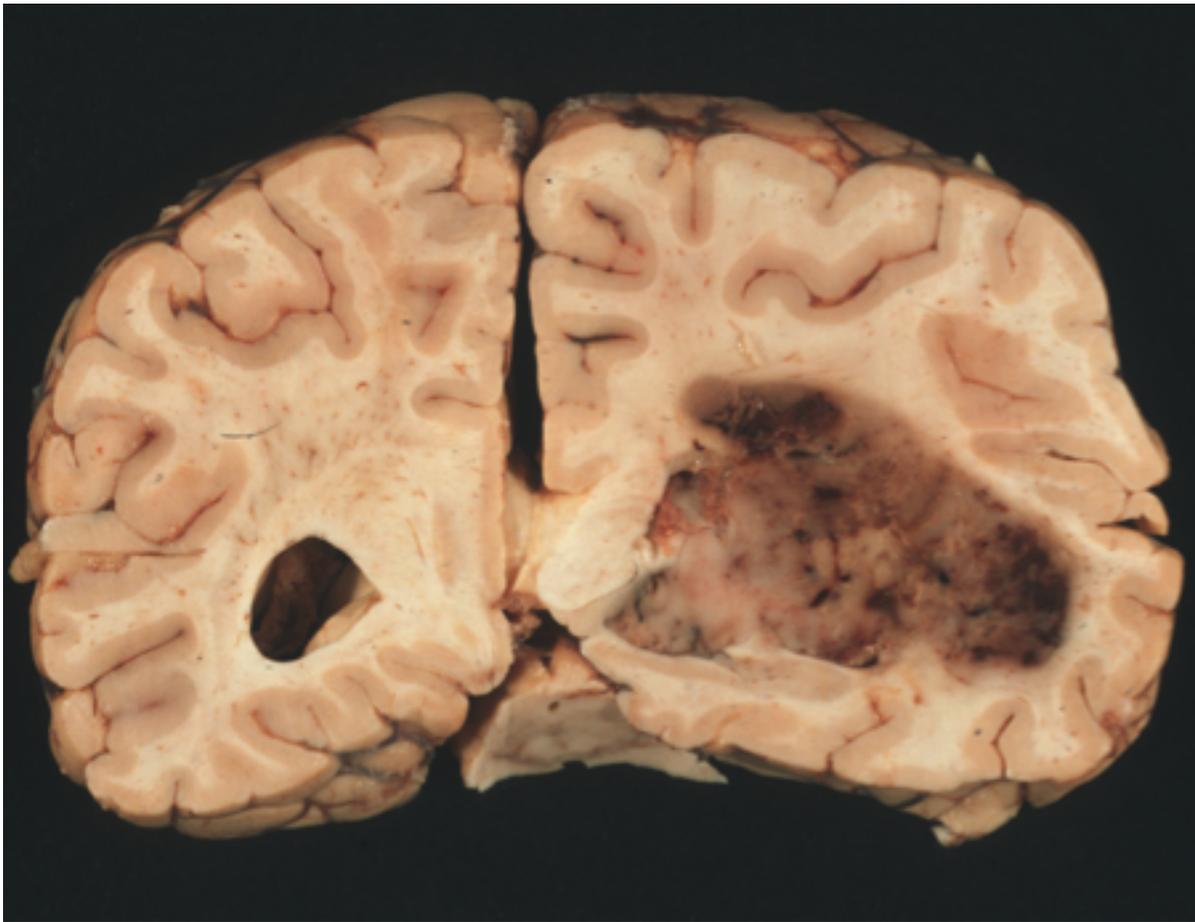
# 1 Einleitung

---

## 1.1 Astrozytäre Tumoren

Intrakranielle Tumoren treten primär aus hirneigenem Gewebe oder sekundär als Metastasen systemischer Malignome auf, wobei die Inzidenz der Metastasen ungefähr 10 x höher ist als die Inzidenz der hirneigenen Tumoren (Masuhr et al., 2013). Unter den hirneigenen Tumoren sind die Gliome am häufigsten (Henne-Bruns, 2012). Die Einteilung der Hirntumoren erfolgt über die WHO-Klassifikation, welche sich am histologischen Aufbau der Tumoren und deren Ursprungsgewebe orientiert. Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren des Gehirns und zu ihnen zählen die Astrozytome. Astrozytome machen über 30 % aller Gliome der zerebralen Hemisphären im Erwachsenenalter (Krams et al., 2013) und ebenfalls mehr als 30 % aller zerebellären Gliome im Kindesalter aus (Henne-Bruns, 2012). Die Inzidenz von Gliomen beträgt 5-6/100.000 Einwohner pro Jahr (Weller, 2014). Die Dignität der Astrozytome wird nach WHO in Grad I, Grad II, Grad III und Grad IV eingeteilt (Louis et al., 2016). Für die unterschiedlichen Dignitätsgrade liegen jeweils verschiedene Inzidenzen vor. Das pilozytische Astrozytom entspricht dem WHO-Grad I und wird mit einer Inzidenz von 0,33/100.000/Jahr angegeben (Weller, 2014). Diese Tumoren sind gut abgrenzbar, langsam wachsend und bestehen häufig aus einem soliden und einem zystischen Teil (Hacke, 2016). Etwas höher liegt die Inzidenz des diffusen Astrozytoms WHO-Grad II mit 0,58/100.000/Jahr (Weller, 2014). Es handelt sich auch hier um einen langsam wachsenden Tumor, der allerdings diffuse Infiltrationen zeigt. Meist von den Großhirnhemisphären ausgehend kann das diffuse Astrozytom bis in die Stammganglien infiltrieren. Oft ist es zystisch umgebaut. Zu den schnell infiltrierend wachsenden Tumoren zählt das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III (Masuhr et al., 2013). Es ist besonders gefäßreich und neigt dadurch zu Einblutungen. Der Tumor wird von einem Begleitödem umgeben (Hacke, 2016). Die Inzidenz des anaplastischen Astrozytoms liegt bei 0,36/100.000/Jahr. Dem WHO Grad IV entspricht das *Glioblastoma multiforme*, es ist ein hochmaligner astrozytärer Hirntumor. Die malignen Glioblastome sind mit einer Inzidenz von 3,19/100.000/Jahr und mit einem Anteil von 15,8 % die häufigsten aller hirneigenen Tumoren (Weller, 2014). Männer sind bevorzugt betroffen, im Verhältnis zu Frauen wird die Diagnose Glioblastom bei den Männern fast doppelt so häufig gestellt (Hacke, 2016).

Das Glioblastom ist insbesondere frontotemporal in den Großhirnhemisphären lokalisiert (Böcker et al., 2012), kann aber auch in allen Hirnloben vorkommen sowie sich beidseits über den Balken als Schmetterlingsgliom in die frontalen Marklager ausbreiten. Der Tumor verbreitet sich infiltrierend, meist subkortikal, aber auch ein Hineinwachsen in die Rinde ist möglich (Hacke, 2016). Häufig besteht eine Beteiligung des Subarachnoidalraumes mit Metastasierung über den Liquor, den sogenannten Abtropfmetastasen. In 10 - 12 % der Fälle finden sich spinale Metastasen (Masuhr et al., 2013).

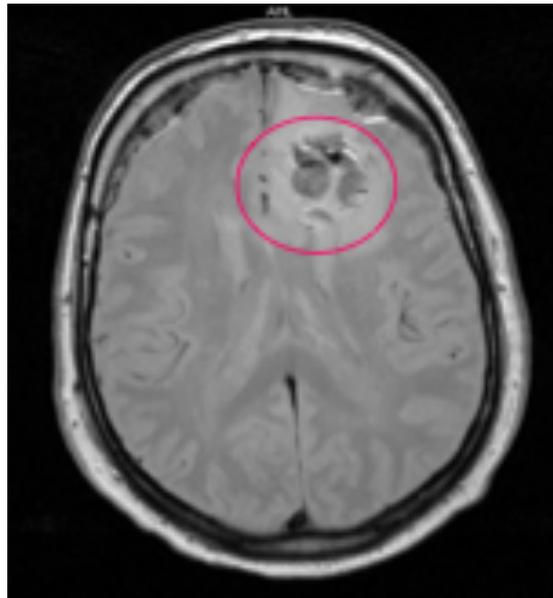


**Abb. 1: Glioblastom im Marklager der rechten Großhirnhemisphäre.**

Dargestellt werden zwei humane Großhirnhemisphären mit einem makroskopischen, frontalen Anschnitt ventral des Balkens. Im Marklager der linken Hemisphäre zeigt sich eine stark veränderte Raumforderung. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Mehdorn und Frau Prof. Dr. Held-Feindt von der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt.

Das ‚*multiforme*‘ in der Namensgebung des *Glioblastoma multiforme* ist ein Hinweis auf das vielfältige morphologische Erscheinungsbild des Glioblastoms. Im makroskopischen Anschnitt des Glioblastoms erscheint das Gewebe ‚bunt‘ mit gelblichen Nekrosen und Blutungen im

grau-weißen Tumorgewebe. In der Histologie zeigen sich Glioblastome besonders zellreich mit einem polymorphen Erscheinungsbild und einem ausgeprägten diffus-infiltrierendem Wachstum mit einer erhöhten Mitoserate (Böcker et al., 2012). Typisch sind unüberschaubare Gefäßproliferationen mit arteriovenösen Fisteln, Gefäßthrombosen sowie Blutungen und zentralen Nekrosen (Masuhr et al., 2013). Ein nekrotischer Zerfall des Tumorgewebes wird auch durch das schnelle Wachstum verursacht. Es kommt oft zur Schwellung der gesamten Hemisphäre vermittelt durch ein frühzeitiges peritumoröses Ödem (Hacke, 2016).



**Abb. 2: Magnetresonanztomographie (MRT) eines frontalen linksseitigen Glioblastoms.**

Links stellt sich im Frontallappen eine inhomogene Raumforderung hypointens dar. Eine scharfe Abgrenzung der Struktur ist nicht eindeutig möglich. Das MRT-Bild wurde freundlicherweise von Herr Prof. Dr. Mehdorn und Frau Prof. Dr. Held-Feindt von der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt.

Zum Nachweis von Astrozytomen ist die Magnetresonanztomographie mit und ohne Kontrastmittel diagnostischer Standard (s. beispielhaft Abb. 2). Weitere wichtige Hinweise über die Ausbreitung des Tumors ergeben sich aus der Anamnese und dem neurologischen Status. Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Bewusstseinsstrübung können Verdachtssymptome für eine intrakranielle Raumforderung sein. Anamnestisch neu aufgetretene fokale oder generalisierte epileptische Anfälle oder neurologische Herdsymptome sowie Persönlichkeitsänderungen können Zeichen einer Raumforderung sein. Eine Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung und weiteren Therapieplanung erfolgt im Rahmen eines operativen oder stereotaktischen Eingriffs (Weller, 2014).

Therapeutisch ist bei allen Astrozytomen grundsätzlich eine operative Tumorresektion indiziert. Dies ergibt sich aufgrund der ‚klinischen Malignität‘ durch den begrenzten Raum mit Einklemmungsgefahr, Störung der Durchblutung und Beeinträchtigung der Liquorzirkulation und der damit verbundenen Bedrohung vitaler Zentren (Müller et al., 2016). Eine Strahlentherapie wird ab WHO-Stadium II je nach Infiltration hinzugezogen (Weller, 2014). Eine vollständig kurative Operation ist bei den malignen Astrozytomen WHO-Grad III/IV in der Regel nicht möglich. Eine kombinierte Radiochemotherapie wird in diesem Fall der Operation angeschlossen, um eine Verlängerung der Überlebenszeit anzustreben (Masuhr et al., 2013).

Die Prognose und Überlebensjahre sind abhängig von vielen Faktoren. Eine wesentliche Rolle spielen dabei zum einen das Dignitätsstadium des astrozytären Tumors zum anderen der Fortschritt der Erkrankung und die durchgeführte Therapie. Allerdings wirken sich auch das Alter, der Allgemeinzustand und bereits bestehende klinische Symptome des Patienten sowie molekulare Veränderungen des Tumors auf das Überleben und somit auf die Prognose aus (Hufschmidt et al., 2017). Das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I hat dabei das beste Outcome. Bei einer 5-Jahres-Überlebensrate (kurz: 5-JÜR) von 50 – 95 % hat es eine günstige bis sehr günstige Prognose (Müller et al., 2016), mit vollständiger Resektion wird sogar ein kurativer Ansatz angestrebt. Beim diffusen Astrozytom WHO-Grad II beträgt das mittlere Überleben 10 – 15 Jahre und ist somit relativ günstig. Jedoch korreliert das Überleben stark mit der Vollständigkeit der chirurgischen Resektion (Siewert und Stein, 2012). Die 5-JÜR ist hier schon deutlich ungünstiger mit 30 %. Noch schlechter ist die 5-JÜR allerdings beim anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III mit nur 10 % (Müller et al., 2016). Das mittlere Überleben liegt bei diesem Tumor auch nur noch im Bereich von 24 – 48 Monaten (Siewert und Stein, 2012). Eine extrem schlechte Prognose hat das Glioblastom WHO-Grad IV. Die Überlebensrate nach Diagnose des Primärtumors beträgt nach 2 Jahren 14 % und nach 5 Jahren lediglich 5 % (Weller, 2014). Im Mittel liegt die Überlebenszeit für Glioblastompatienten zwischen sechs und 20 Monaten. Trotz intensiver Bemühungen eines kurativen Therapieansatzes sind Rezidive leider dennoch unvermeidlich (Hacke, 2016).

Eine Früherkennung für Astrozytome gibt es derzeit noch nicht, da bisher keine einfach zu erhebenden Screening-Parameter verfügbar sind. Beim Glioblastom erschwert die zuweilen überaus kurze Anamnese von nur einigen Wochen die Festlegung eines zeitlichen Rahmens für die präventive Früherkennung (Weller, 2014).

Die Entstehungsmechanismen der Glioblastome sind seit vielen Jahren Gegenstand medizinischer Forschung. Bei älteren Menschen können Glioblastome primär *de novo* entstehen. Im eher mittleren Lebensalter können sie sich aber auch sekundär aus einem niedriggradigem Astrozytom entwickeln (Böcker et al., 2012). Einer Vermutung nach entstehen Astrozytome aus neuralen oder glialen Stammzellen (Hacke, 2016).

## **1.2 Die Tumorstammzellhypothese**

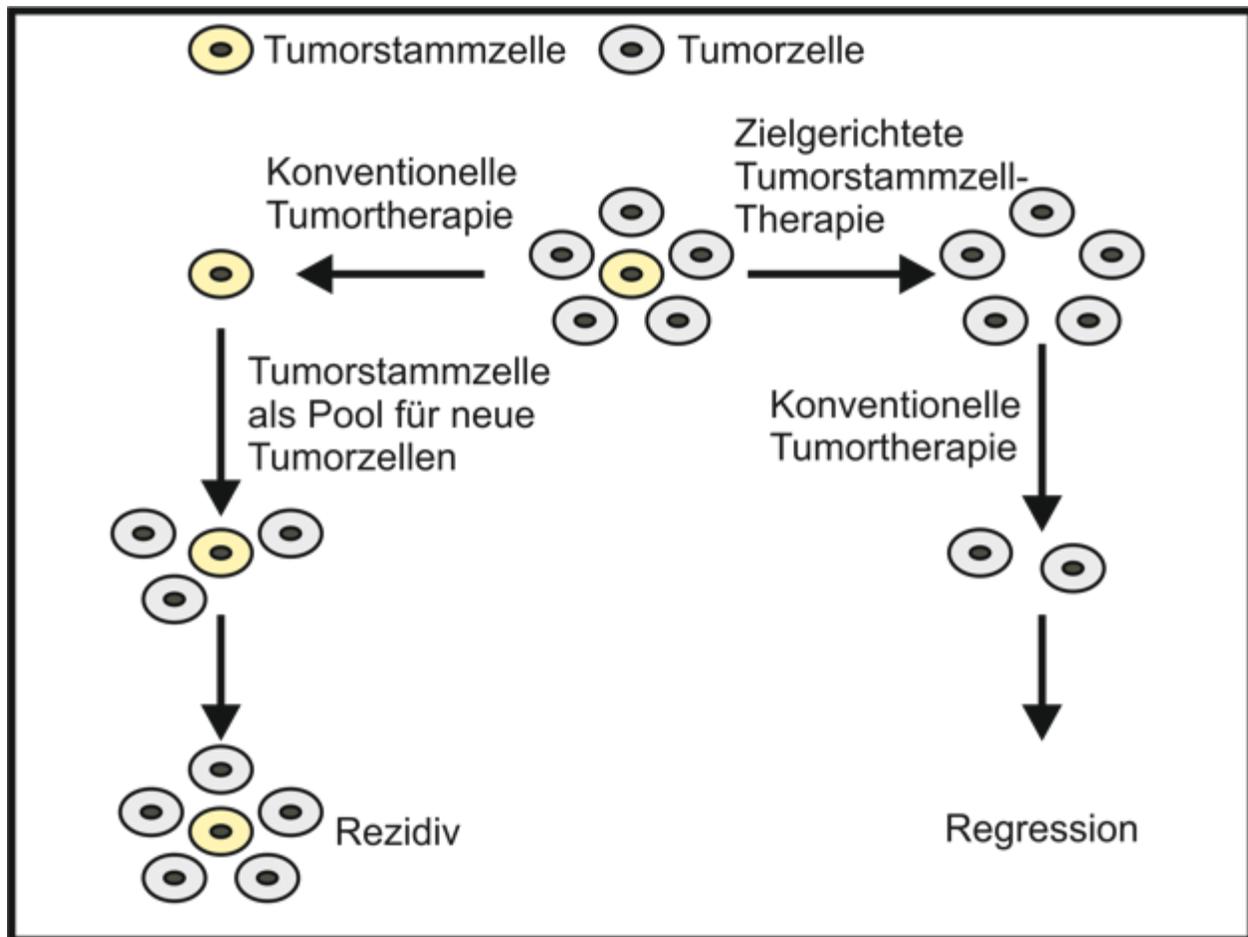
Die zuvor genannte Vermutung, dass Astrozytome bzw. Tumoren aus Stammzellen entstehen können, beruht auf der Theorie, dass Tumorzellen und Stammzellen ähnliche Eigenschaften wie Selbsterneuerung, uneingeschränkte Proliferation und Pluripotenz besitzen. Diese Gedanken sind nicht neu, bereits die Pathologen Rudolf Virchow (1855) und Julius Cohnheim (1875) haben Ähnlichkeiten zwischen Tumor- und Stammzellen gesehen. Später ist daraus die Tumorstammzelltheorie erwachsen. Diese Theorie besagt, dass nicht alle Tumorzellen im Stande sind die Tumorentstehung und das Tumorwachstum durch Selbsterneuerung, Proliferation und weitere Differenzierung zu generieren. Ein kleiner Pool von Tumorstammzellen besitzt jedoch eben diese Stammzeleigenschaften und ist somit verantwortlich für die Tumorentstehung und die Tumorunterhaltung (Clarke et al., 2006; Reya et al., 2001). Langsam teilende Tumorstammzellen bilden als Quelle der Tumorzellen eine Subpopulation von sich schneller teilenden Progenitorzellen, die den Tumor wachsen lassen (Galderisi et al., 2006). Die differenzierten Tumorzellen sind gemäß dieser Hypothese demnach nicht ausschlaggebend für das Fortschreiten einer Tumorerkrankung. Auch bei der Metastasierung einer Tumorerkrankung wird davon ausgegangen, dass die Bildung von Tochtergeschwulsten durch versprengte Tumorstammzellen hervorgerufen wird (Hermann et al., 2007; Reya et al., 2001). Die genaue Entstehung der Tumorstammzellen ist noch unklar. Ein Erklärungsansatz ist, dass die Tumorstammzellen aus vorhandenen Stammzellen oder Progenitorzellen im Gewebe durch mehrfache Mutationsereignisse hervorgehen könnten. Die Langlebigkeit der Stammzellen im Gewebe und bereits präexistente zelluläre Mechanismen begünstigen diese Mutationen (Tan et al., 2006), da z. B. eine erhöhte Telomeraseaktivität und anti-apoptotische Gene schon eine Selbsterneuerung und Proliferation ermöglichen (Hanahan und Weinberg, 2011). Zelluläre Stammzellmechanismen spielen auch bei Resistenzen eine große Rolle und erschweren die Therapie und Heilungschancen (Dean et al., 2005; Singh und Settleman, 2010). Durch die bisherigen konventionellen Therapien wurden die differenzierten Tumorzellen zerstört, jedoch wurden die Tumorstammzellen mit diesen Therapieansätzen nicht erreicht (Wicha et al., 2006;

Morrison et al., 2010), so dass es nach einer Latenzzeit zur Rückkehr und zum Fortschreiten der Tumorerkrankung kommt (s. Abb. 3).

Einen direkten Nachweis von Tumorstammzellen hat man erstmalig bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) belegen können (Lapidot et al., 1994; Bonnet und Dick, 1997). Hierzu wurden im Maus-Modell humane Leukämiezellen mit Stammzeleigenschaften in Mäuse implantiert, welche eine AML in den Mäusen induzierten. In der nachfolgenden Zeit wurden in soliden Krebsentitäten ebenfalls Tumorstammzellen nachgewiesen (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; Li et al., 2007; Collins et al., 2005). Auch für Gehirntumoren konnte gezeigt werden, dass Tumorstammzellen vorkommen (Hemmati et al., 2003; Galli et al., 2004.; Singh et al., 2003; Ignatova et al., 2002).

Um Tumorstammzellen im Gewebe identifizieren zu können und die Erkenntnisse der Tumorstammzelluntersuchungen diagnostisch und/oder therapeutisch nutzbar zu machen, müssen (tumor-)stammzellspezifische Marker definiert und verwendet werden. Beispiele für Marker, die als tumorzellspezifisch diskutiert werden, sind CD133+, CXCR4, Sox2 und Oct4. Diese Marker kommen bei mehreren Tumorentitäten vor (Bertolini et al., 2009; Herman et al., 2007; Leis et al., 2012; Suvà et al., 2009), wie auch dem Glioblastom (u. a. Singh et al., 2004). Ihre Expression hat eine besondere Bedeutung für die Selbsterneuerung, Proliferation und Pluripotenz der Zellen und sie sind somit wichtige Faktoren in der Tumorgenese und Tumorwachstumsprozessen.

In dieser Hinsicht sind einige Marker vor oder am Beginn der Zelldifferenzierung angesiedelt (embryonale Stammzellmarker), andere zeichnen bereits einen Differenzierungsweg zur Progenitorzelle vor (z. B. neurale Stammzellmarker).



**Abb. 3: Theorie der zielgerichteten Tumorstammzelltherapie**

(Quelle: modifiziert nach Ebben et al., 2010)

Die Abbildung beschreibt vereinfacht die Theorie der möglichen therapeutischen Relevanz einer zielgerichteten Therapie von Tumorstammzellen im Vergleich zum konventionellen Ansatz einer Tumorthherapie. Nach der Tumorstammzellhypothese bilden Tumorstammzellen den Pool aus dem Tumorzellen entstehen. Dadurch entsteht ein gemischtes Zellbild im Tumor mit Tumorstammzellen und entdifferenzierten Tumorzellen. Im konventionellen Ansatz einer Tumorthherapie werden die Tumorzellen abgetötet, jedoch die Tumorstammzellen überleben. Durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Proliferation führt dies zum erneuten Auftreten von Tumorzellen und somit zum Rezidiv. Eine gezielte Therapie zum Abtöten oder Inhibieren der Krebsstammzellen würde die Entstehung neuer Krebszellen verhindern. Ein weiteres Voranschreiten des Tumors ist dann nicht mehr möglich. Durch das Abtöten der übrigen Tumorzellen wird der Tumor schließlich vernichtet.

### 1.3 Embryonale Stammzellmarker

Die embryonalen Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, Pluripotenz und Proliferation sind entscheidende Faktoren für Tumorstammzellen. Die Mechanismen für diese Eigenschaften sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es gibt die Theorien, dass Stammzellen mit diesen Eigenschaften zur Krebsstammzelle mutieren oder dass Progenitorzellen oder auch somatische Zellen diese Eigenschaften wiedererlangen können. Takashi und Yamanaka konnten zeigen, dass eine Aktivierung von nur vier Stammzellfaktoren Oct4, Sox2, cMyc und KLF4 die

genannten embryonalen Eigenschaften aufrechterhalten und sogar mehr noch, dass diese sogar eine Reprogrammierung von differenzierten somatischen Zellen induzieren. Im experimentellen Verfahren von Takashi und Yamanaka wurden 24 Faktoren mittels retroviraler Transfektion in Mäusefibroblasten eingebracht. Basierend auf diesen 24 Faktoren konnte gezeigt werden, dass die Kombination von nur vier Faktoren, Oct4, Sox2, cMyc und KLF4, eine Reprogrammierung der somatischen Fibroblasten induzierte und pluripotente iPSCs (induzierte pluripotente Stammzellen) erzeugt wurden. Darüber hinaus wurden lebensfähige chimäre Mäuse aus induzierten iPSCs unter der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nanog hervorgebracht. Allerdings entwickelten diese Mäuse gehäuft Tumoren, wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass cMyc und KLF4 bekannte Protoonkogene darstellen (Takashi et al., 2006).

Die Schlüsselfaktoren Nanog, Oct4 und Sox2 sind als Transkriptionsfaktoren zuständig für Aufrechterhaltung der embryonalen Stammzelle. Ihre gegenseitige Regulation steuert diverse Zielgene, die verantwortlich für die Pluripotenz und Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen sind (Pan et al., 2007).

#### **1.4 Embryonale und neurale Stammzellmarker in ZNS-Tumoren**

Zur Detektion von Stammzellen benötigt man spezifische Marker. 1997 wurde das Transmembranprotein CD133 erstmals in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben (Miraglia et al., 1997). In der folgenden Zeit zeigte sich, dass CD133 als Marker zur Identifizierung von Tumorstammzellen u. a. bei Hirntumoren geeignet ist (Singh et al., 2004). Die Expression in von CD 133 in Gliomen korreliert mit einer schlechten Prognose (Zeppernick et al., 2008). Mittlerweile sind zahlreiche weitere Tumorstammzellmarker in Astrozytomen beschrieben worden. Einige der Tumorstammzellmarker in Astrozytomen werden in der nachfolgenden Tabelle 1 genannt.

Marker	Referenz
CD133+	Singh et al., 2004; Yuan et al., 2004.
CD15	Mao et al., 2009.
cMyc	Wang et al., 2008.
CXCR4	Ehtesham et al., 2009; Hattermann et al., 2010.
Oct4	Guo et al., 2011; Du et al., 2009.
KLF4	Schoenhals et al., 2009; Ma et al., 2014.
Musashi-1	Ma et al., 2008.
Nanog	Guo et al., 2011.
Nestin	Jin et al., 2013; Yuan et al., 2004.
SALL4	Zhang et al., 2015; He et al., 2013; Mei et al., 2009.
Sox2	Ma et al., 2008; Guo et al., 2011.
STAT3	Sherry M.M. et al., 2009; de la Iglesia et al., 2008; Senft et al., 2011.

**Tabelle 1: Tumorstammzellmarker in Astrozytomen.**

Übersicht über Tumorstammzellmarker, deren Vorkommen, Regulation und (funktionelle) Rolle in den genannten Fachartikeln beschrieben wurden.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten oder relevanten embryonalen und neuralen Stammzellmarker sowie einige weitere Marker, die zur Beschreibung der Tumorumgebung verwendet wurden, vorgestellt:

**Nanog** (von Tir nan Og) ist ein Homeobox-Transkriptionsfaktor, der an der Steuerung von embryonalen Stammzellen beteiligt ist (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Gemeinsam mit den Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 reguliert Nanog essentielle Funktionen wie Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Boyer et al., 2005; Pan und Thomson, 2007). In humanen pluripotenten Zellen lässt sich Nanog nachweisen, während er jedoch in differenzierten Zellen fehlt (Chambers et al., 2003). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Nanog-Expression und Tumoren besteht (Jeter et al., 2011; Meng et al., 2010; Nagata et al., 2017; Shan et al., 2012). Eine erhöhte Expression von Nanog in Gliomen deutet auf eine Korrelation zwischen Tumorzellen mit Stammzellcharakter sowie deren Entstehung und dem Verlauf der Tumorerkrankung hin (Guo et al., 2011; Niu et al., 2011; Elsir et al., 2014).

**Sox2** ist einer der bekanntesten Vertreter der Sox-Transkriptionsfaktoren und hat eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (Fong et al., 2008; Zhang und Cui, 2014). 1990 kam es zur Entdeckung der Sox-Proteinfamilie mit dem SRY (sex determining region Y)-Genabschnitt auf dem Y-Chromosom (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Sox-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und zählen zur HMG (High mobility group)-Superfamilie, da sie eine charakteristische HMG-Domäne als DNA-Bindedomäne besitzen (Laudet et al., 1993). Auf Chromosom 3 kodiert ein intronloses Gen den Transkriptionsfaktor Sox2. Das Sox2-Gen besteht aus einem Exon, welches eine 5`untranslatierte Region, die Protein-kodierende Region und eine 3`untranslatierte Region enthält. Sox2OT (Sox2 overlapping transcript) kodiert für eine nicht-kodierende RNA, enthält mindestens 5 Exons und überlappt das Sox2-Gen auf Chromosom 3 teilweise (Amaral et al., 2009; Fantès et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor Sox2 reguliert mit Oct4 eine Reihe von Zielgenen, die für den Erhalt des Stammzellcharakters in Stammzellen notwendig sind (Chew et al., 2005; Kuroda et al., 2005). Überdies spielt Sox2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (Zappone et al., 2000; Graham et al., 2003). Der Verlust von Sox2 zeigt bei *in vitro* Untersuchungen eine Verringerung von differenzierten Neuronen (Cavallaro et al., 2008). Zudem wurde die Expression von Sox2 in verschiedenen Tumoren nachgewiesen und stammzellähnlichen Zellen zugeordnet, beispielsweise in pädiatrischen Hirntumoren (Hemmati et al., 2003; Wang et al., 2008). Auch die nichtkodierende RNA Sox2OT ist an neuronalen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Hierbei wirkt sie beispielsweise bei der Differenzierung corticaler Neurone als Repressor von Sox2 (Knauss et al., 2018). Zudem wurde eine Deregulation von Sox2OT in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Askarian-Amiri et al., 2014; Hou et al., 2014; Shahryari et al., 2014), die einen regulativen Einfluß auf Sox2 vermittelt (Askarian-Amiri et al., 2014).

Der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor **cMyc** gehört zu den Protoonkogenen (Marcu et al., 1992). Ursprünglich wurde cMyc als virales Onkogen (vMyc = virales Myc) entdeckt (Sheiness et al., 1978). Die Abkürzung Myc steht für die Myelocytomatose, die bei Vögeln ausgelöst wird. Wenig später entdeckte man das zelluläre Homolog cMyc (cellular Myc) im Huhn (Vennstrom et al., 1982) und im Verlauf konnten cMyc-Gene in Ratte, Maus und Mensch detektiert werden (Dalla-Favera et al., 1982). Das cMyc-Gen kodiert für einen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der verschiedene Zellfunktionen wie u. a. Zellzyklus und Zellwachstum beeinflusst (Coller et al., 2000). Es ist beschrieben worden, dass in embryonalen Stammzellen cMyc erforderlich ist, um die Pluripotenz und die Selbsterneuerung der Stammzellen zu erhalten (Varlakhanova et al.,

2010). Eine fehlerhafte Funktion von cMyc als Protoonkogen kann die Entstehung von Tumoren induzieren. Ein Zusammenhang zwischen cMyc und malignen Erkrankungen wurde schon früh beim Burkitt-Lymphom festgestellt (Taub et al., 1982). Auch bei weiteren soliden Tumoren (Little et al., 1983; Escot et al., 1986; Sikora et al., 1987; Kotake et al., 1990) sowie auch bei Hirntumoren (Bigner et al., 1990; Zheng et al., 2008) konnte eine Überexpression bzw. Fehlregulation von cMyc beschrieben werden. Überdies wird cMyc eine wichtige Rolle in der Regulation von Tumorstammzellen in Gliomen zugeschrieben (Wang et al., 2008).

Der POU-Transkriptionsfaktor **Oct4** (auch Oct3/POUF5 genannt) wird von embryonalen Stammzellen exprimiert (Okamoto et al., 1990) und übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Niwa et al., 2000). Im Mausmodell zeigte sich, dass eine geringe Expression von Oct4 eine Umwandlung embryonaler Stammzellen in differenzierte trophoblastische Zellen bewirkt (Boiani et al., 2002). Die Relevanz von Oct4 in Neoplasien zeigte sich z. B. im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom mit einer erhöhten Oct4-Expression in CD 133-positiven Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Oct4-Expression in diesen Tumorzellen entscheidend für die Selbsterneuerung war, aber auch für ihre Chemo-Radio-Resistenz (Chen et al., 2008). Auch in Hirntumoren konnte die Expression von Oct4 nachgewiesen werden (Du et al., 2009), und eine positive Korrelation zwischen der Oct4-Expression und Malignität der Hirntumoren wird angenommen (Guo et al., 2011).

**KLF4** ist ein Zinkfinger-haltiger Transkriptionsfaktor, der zur Familie der Krüppel-like factors (kurz: KLF; zu deutsch: Krüppel-ähnlichen Faktoren) zählt. Der KLF-Familie wird eine wichtige Bedeutung in der Entwicklung und Regulierung von Leukozyten zugeschrieben (Cao et al., 2010). KLF4 wurde zuerst als epithelialer Transkriptionsfaktor im Darm, der Haut und im Gefäßendothel beschrieben (Shields et al., 1996). In der Differenzierung von Epithelzellen des Intestinums (Shields et al., 1996) sowie der Epidermis (Segre et al., 1999) wird KLF4 eine entscheidende Funktion zugeschrieben. Die für KLF4 beschriebenen regulativen Funktionen im Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Embryogenese sind vielfältig, Ghaleb und Kollegen beschreiben beispielsweise einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum (Ghaleb et al., 2005). Weiterhin konnte KLF4 in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden (Li et al., 2005) sowie die wichtige Funktion dieses Transkriptionsfaktors in der Stammzellregulation (Zhang et al., 2010; Zaehres et al., 2007). Darüber hinaus wurde KLF 4 bei verschiedenen Tumorentitäten wie dem Kolon-, Lungen- oder Pankreaskarzinom und auch bei Lymphomen (Patel et al., 2010; Hu et al., 2009; Zammarchi et al., 2011; Guan et al., 2010) beschrieben. Hierbei wurde sowohl eine Rolle als Onkogen (Qi et al., 2018), vor allem aber eine

Tumorsuppressor-Funktion, z. B. auch in anaplastischen Meningiomen, beobachtet (Guan et al., 2010; Tang et al., 2017).

**Musashi-1** ist ein RNA-bindendes Protein und reguliert die Gentranslation. Initial wurde Musashi-1 bei *Drosophila* identifiziert, und dort zeigte es sich bei der Entwicklung von Sinnesorganen als erforderlich (Nakamura et al., 1994). Während der embryonalen Entwicklung des ZNS ist Musashi-1 ein typischer Marker für neurale Stammzellen (Sakakibara et al., 1996; Kanekano et al., 2000). In neuronalen Stammzellen wird es stark exprimiert und hat eine wichtige Funktion in der Regulation Pluripotenz und Selbsterneuerung (Okano et al., 2005). Eine Bedeutung von Musashi-1 konnte in verschiedenen Tumoren (Wang et al., 2010; Gao et al., 2015; Fox et al., 2016) und auch Hirntumoren (Kanemura et al., 2001; Vo et al., 2012) dargestellt werden. Der Einfluss auf das Tumorwachstum u. a. beim Glioblastom konnte gezeigt werden (Glazer et al., 2012) und es wurde eine Korrelation zwischen der Musashi-Expression und der Malignität und Proliferation von Gliomen beschrieben (Kanemura et al., 2001).

Alle genannten Transkriptionsfaktoren agieren nicht nur allein, sondern zeigten ein gemeinsames kooperatives Kontrollieren der Genexpression in pluripotenten Stammzellen (Wang und Cui, 2014).

**CXCR4** ist ein Chemokinrezeptor und ein HIV-Corezeptor (Wong et al., 2008). Chemokinrezeptoren sind 7-Transmembrandomänen-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Murphy et al., 2000). CXCR4 besitzt wichtige Funktionen bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, z. B. bei der Hämatopoese, der Leukozyten-Migration und des Tumorwachstums (Wong et al., 2008). Gemeinsam mit seinem Liganden CXCL12 erlangt CXCR4 zunehmend Bedeutung in der Progression, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren (Mentlein et al., 2013; Sun et al., 2010; Teicher und Fricker, 2010). Auch bei der Entwicklung des Gehirns spielt CXCR4 eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Wanderung neuraler Progenitorzellen (Reiss et al., 2002). Zhang et al. konnten zeigen, dass CXCR4 einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu neuronalen Stammzellen besitzt und dass in neuronalen Stammzellen eine erhöhte CXCR4-Expression nachgewiesen werden konnte (Zhang et al., 2016). Weiterhin konnte in Glioblastomen eine deutliche Expression von CXCR4 in Tumorstammzellen detektiert werden (Ehtesham et al., 2009; Hattermann et al., 2010). Somit kann CXCR4 sowohl als wichtiger Marker für neurale Stammzellen, als auch als Marker für Tumorstammzellen im Gehirn gelten.

**GFAP** (Glial fibrillary acidic protein; zu deutsch: Saures Gliafaser-Protein) ist ein Intermediärfilament in einer Größe von 8-9 nm. Es ist ein zellspezifischer-Marker für *reife* Astrozyten. Seit einigen Jahren schon wird GFAP für die Identifizierung von Nervengewebe und als Standard-Marker in der Forschung genutzt. Als Strukturprotein des Zytoskelettes ermöglicht GFAP die Stabilität für astrozytäre Prozesse (Eng et al., 2000). Allerdings ist GFAP nicht nur strukturgebend, sondern ist auch bei Prozessen der Regeneration des ZNS und der synaptischen Plastizität sowie bei der reaktiven Gliose beteiligt (Middeldorp und Hol, 2011).

Als **Proliferationsmarker** wurde in der Immunhistochemie das etablierte Verfahren der Detektierung von **MIB-1/Ki67** genutzt. Das Ki67-Antigen kommt ausschließlich im Nukleus vor und präsentiert sich nur während der aktiven Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2- und M-Phase). In ruhenden Zellen (G0-Phase) fehlt die Expression von Ki67. Eine Beurteilung der Zellteilung innerhalb einer Zellpopulation kann also mit Ki67 getroffen werden (Gerdes et al., 1984). Eine wichtige Bedeutung hat dies bei Tumoren, da es häufig eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und klinischem Verlauf gibt (Scholzen und Gerdes, 2000). Proliferierende Zellen lassen sich mit Hilfe des an Ki67 bindenden monoklonalen Antikörpers MIB-1 (Made in Borstel-1) markieren und erkenntlich machen (Cattoretti et al., 1992).

## **1.5 Zielsetzung und Fragestellung**

Wie bereits zuvor genannt, sind heutzutage immer noch viele Aspekte in der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumorerkrankungen insbesondere den Astrozytomen sowie deren Bildung von Rezidiven unklar. Vor allem die sehr schlechte Prognose der Glioblastome lässt viele Fragen offen. Ein Erklärungsansatz ergibt sich aus der Tumorstammzellhypothese. Der Nachweis von Tumorstammzellen mittels spezifischer Marker könnte somit einen wegweisenden Schritt für diagnostische und therapeutische Strategien darstellen. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere neurale, in begrenztem Ausmaß auch embryonale Stammzellmarker für experimentelle Untersuchungen verwendet, ein einheitlicher Marker wurde jedoch bisher nicht etabliert.

In dieser Arbeit sollten nun ausgewählte embryonale und neurale Stammzellmarker in humanen astrozytären Tumoren untersucht und verglichen werden. Hierfür wurde zunächst das Vorkommen unterschiedlicher Stammzellmarker in soliden Gewebeproben von astrozytären Tumoren unterschiedlicher Dignitätsstufen (sowie als Vergleich nicht-neoplastisches Hirngewebe) auf mRNA-Ebene untersucht, um die Expression der Stammzellmarker einzeln und im Vergleich zueinander beurteilen zu können und um mögliche Hinweise auf einen besonders aussagekräftigen Marker in Astrozytomen/Glioblastomen zu erhalten. Überdies stand im Fokus ausgewählte Stammzellmarker hinsichtlich ihrer Ko-Expressionen miteinander zu vergleichen, und eventuelle Muster bezüglich der Ko-Lokalisationen in humanen Glioblastomproben zu beschreiben. Hierzu folgte die genauere morphologische Untersuchung an humanen Glioblastomproben mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie. Mit dieser Untersuchung sollte das Ausmaß der Expression und der Ko-Expressionen der ausgewählten Stammzellmarker geklärt werden.

Da viele experimentelle Forschungsansätze zu astrozytären Tumoren an Glioblastomzelllinien untersucht werden, wurde schließlich für eine Auswahl etablierter Glioblastomzelllinien mittels realtime RT-PCR ein Expressionsprofil für die jeweiligen Marker erstellt, um zu prüfen, ob sie in Hinblick auf die Stammzellmarkerexpression repräsentative Zellmodelle darstellen.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gewebematerial

##### 2.1.1.1 Humane Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten anonymisierten, humanen Gewebeproben, wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. H.M. Mehdorn und Prof. Dr. Dr. J. Held-Feindt aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden operativ entnommen und es folgte eine unabhängige histopathologische Tumorsicherung. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebeprobe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Patientenmaterial wurde entsprechend der ethischen Richtlinien der Helsinki-Deklaration von 1975 und mit dem Einverständnis der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gewonnen (Votum D536/15). Die Einwilligung der Patienten wurde eingeholt.

##### 2.1.1.2 Humane Glioblastom-Zelllinien

Die untersuchten Glioblastomzelllinien U343 und U118 wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg), und die Linien A172, U373 (mißidentifiziert als U251) und T98G wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) gekauft. Die Linien A767 und A764 wurden durch Dissoziation von soliden Glioblastomproben in der Arbeitsgruppe bereits Jahre zuvor hergestellt und durch wiederholte Passagierung in permanente Zelllinien überführt.

### 2.1.2 Biochemikalien

Biochemikalien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldichloridhydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix (Dinukleotidtriphosphat-Mischung)	Fermentas, Vilnius, Litauen
DTT (Dithiotreitol)	Biomol, Hamburg
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FKS Gold (Fötales Kälberserum, teilsynthetisch)	PAA, Pasching, Österreich
Glutamin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Immunount®	Thermo, Pittsburgh, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences, UK
Reaction Buffer	Fermentas, Vilnius, Litauen
Sudanschwarz	Roth, Karlsruhe
TRIS (Trihydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.3 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNase (RNase-frei)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase (DNase-frei) (20 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.4 Antikörper

#### Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
<b>anti-CXCR4</b>	Ziege	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab1671
<b>anti-CXCR4</b>	Maus	1:100	R&D, Wiesbaden	MAB170
<b>anti-GFAP</b>	Maus	1:100	Dako Cytomation, Hamburg	M0761
<b>anti-MIB-1/Ki67</b>	Maus	1:200	Dako Cytomation, Hamburg	M7240
<b>anti-Musashi</b>	Maus	1:100	R&D, Wiesbaden	MAB2628
<b>anti-Nanog</b>	Kaninchen	1:500	Thermo Scientific, Waltham, USA	PA1-097
<b>anti-Oct4</b>	Kaninchen	1:150	Cell Signaling, Danvers, USA	2750S
<b>anti-Sox2</b>	Kaninchen	1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	SC-20088

#### Sekundärantikörper und Fab-Fragmente

Markierung	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
<b>488 Alexa Flour®</b>	Esel	Maus	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A21202
<b>488 Alexa Flour®</b>	Esel	Kaninchen	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A21206
<b>555 Alexa Fluor®</b>	Esel	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A21432
<b>555 Alexa Fluor®</b>	Esel	Maus	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A31570
<b>555 Alexa Fluor®</b>	Ziege	Kaninchen	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A21428
<b>IgG-Fab-Fragmente</b>	Esel	Maus	1:1000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	715-007-003
<b>IgG-Fab-Fragmente</b>	Esel	Kaninchen	1:1000	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	711-007-003

### 2.1.5 Primer und Sonden

Bezeichnung	ID-Nummer
hCXCR4	Hs00607978_s1
hGAPDH	Hs99999905_m1
hKLF4	Hs00358836_m1
hMusashi	Hs00159291_m1
hMyc	Hs00153408_m1
hNanog	Hs02387400_g1
hOct4	Hs00999632_g1
hSox2	Hs00415716_m1
hSOX2OT	Hs00415716_m1

Alle TaqMan®-Primer und Sonden wurden über Applied Biosystem, USA erhalten.

### 2.1.6 Gebrauchsfertige Kits

TaqMan® Universal Master Mix (20x), Applied Biosystems, USA

### 2.1.7 Lösungen, Puffer und Medien

- Kulturmedium für Tumorzelllinien:
  - DMEM
  - + 10 % FKS
  - 3 % L-Glutamin
  - + 1 % Penicillin/Streptomycin
- 5 x Reaktionspuffer, pH 8:
  - 250 mM Tris-HCl
  - 259 mM KCl
  - 20 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 50 mM DTT
- DNase-Puffer, pH 8:
  - 400 mM Tris-HCl
  - 100 mM MgSO<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>

- PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,2-7,3:
  - 136 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$
  - 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  dest.
  
- TBST (Tris Buffered Saline + Tween), pH 7,5:
  - 20 mM TRIS
  - 0,14 mM NaCl
  - 1 mM EDTA
  - 0,1 % Tween-20

### 2.1.8 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism®-7000 realtime PCR-Gerät	Applied Biosystems, USA
Brutschränke	Heraeus Ag, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M, Zeiss Jena
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Kryostat (CM1100)	Leika, Nussloch
Vortexgerät	Janke und Kunkel, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Werkbank (Herasafe)	Heraeus, Hanau

### 2.1.9 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Super Frost Objektträger	Roth, Karlsruhe
Optische Folie	Sarstedt, Nürnberg
Realtime RT-PCR-Platten (96 Löcher)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Whatman-Filterpapier	BioRad, München
Zellkulturschalen	Sarstedt Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Realtime-RT-PCR

Um eine Aussage zur mRNA-Expression bestimmter Gene in verschiedenen Tumorzelllinien zu treffen, wurde hier die realtime Polymerasekettenreaktion (realtime RT-PCR) verwendet. Hierfür wurde die aus Gewebe und Zellen isolierte mRNA zunächst mittels Reverser Transkription in sogenannte copyDNA (cDNA) umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA wurde im nächsten Schritt mithilfe einer Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Hierbei wurden spezifische TaqMan-Proben eingesetzt, die einerseits Primer für die jeweils zu untersuchenden Gene enthalten (also Nucleotidketten, die am Beginn und Ende der zu vervielfältigen DNA-Sequenz liegen), und andererseits ein kurzes, fluoreszenzmarkiertes, aber gequenchtes Sequenzfragment aus der Mitte des zu vervielfältigen Bereichs. Durch Zugabe eines Mastermixes, der alle weiteren Reaktionskomponenten enthält (DNA-Polymerase, Nucleotide, Puffer) und Inkubation des Reaktionsansatzes bei geeigneten Bedingungen in einem speziellen Thermocycler wurde die Reaktion gestartet. Das fluoreszenzmarkierte DNA-Fragment wurde während der Polymerasekettenreaktion stetig durch die DNase-Aktivität der Polymerase vom Templatestrang abgelöst und zerschnitten, sodass der Fluoreszenzfarbstoff entquencht wurde und ein Signal abgab. Dieses wurde ab einem gewissen Schwellenwert detektiert, und die zeitliche Auflösung (Zyklus, in dem das Signal den Schwellenwert übersteigt) ermöglicht eine Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen Templates.

### 2.2.1.1 RNA-Isolierung

Zunächst musste die zu untersuchende mRNA aus dem Tumormaterial und den Zellen isoliert werden, um dann anschließend über eine reverse Transkription in cDNA überführt zu werden. Zur RNA-Isolierung wurden die kultivierten Tumorzellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1 ml TRIzol® pro großer Flasche geerntet. Das Gewebe in ein Reaktionsgefäß gegeben und in 1 ml TRIzol® zerkleinert, zunächst mechanisch mit einem Stößel, dann durch Ultraschallwellen. TRIzol® ist eine Lösung bestehend aus Phenol und Guanidin-Isocyanat, welches eine gute RNA-Aufarbeitung ermöglicht. Die geernteten Zellen bzw. das Gewebelysate wurden dann kurz abzentrifugiert, um grobe Partikel zu entfernen, dann wurden die Extrakte in ein steriles Eppendorf-Reagiergefäß überführt. 200 µl Chloroform wurden dem Ansatz zugegeben, gut durchmischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasenseparation wurden anschließend eine Zentrifugation bei 12000 xg über 15 Minuten und bei 4 °C durchgeführt. Nach Separation in 3 Phasen befand sich die RNA in der obersten klaren Phase. Die mittlere weißliche Phase enthielt die DNA und in der unteren rötlichen Phase befanden sich Proteine und Zelltrümmer. Die oberste Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfer-Reagiergefäß überführt. Dieser neue Ansatz wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach gutem Durchmischen für 10 Minuten bei 12000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das nun als weißes Pellet am Boden des Reagiergefäßes sichtbare RNA-Präzipitat wurde nach Verwerfen des Überstandes, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und gevortext. Eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 7600 xg und 4 °C folgte. Im Anschluss wurde der Überstand komplett abpipettiert und das RNA-Präzipitat trocknen gelassen. Nach der Trocknung erfolgte die Lösung in ca. 50 µl RNase-freiem bidestilliertem Wasser und eine Inkubation bei 58 °C für 10 Minuten. Schließlich wurde die Konzentration mit Hilfe des Mikroplattenlesers Epoch (BioTek) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.1.2 Herstellung von cDNA

Die nun isolierte RNA musste für die Realtime-PCR in cDNA umgeschrieben werden und eventuelle Reste genomischer DNA musste entfernt werden. 1 µg RNA der Proben wurden auf 7 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase wurden dem Ansatz hinzugefügt, gut durchmischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde der Ansatz mit 1 µl EDTA-Lösung versetzt, wiederum gut durchgemischt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Zur Herstellung der cDNA wurden nun 2 µl Random-Hexamer-Primer dazu gegeben und gevortext. Zur Primeranlagerung an die RNA wurde der Ansatz für

5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Dem Ansatz wurden anschließend 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Wasser hinzupipettiert und gut gevortext. Bei 25 °C wurde der Ansatz für 5 Minuten inkubiert und im Anschluss wurden 1 µl Reverse Transkriptase (40 U/µl) zugefügt. Die folgende Transkription verlief unter Inkubation für 10 Minuten bei 25 °C und weiteren 60 Minuten bei 42 °C. Letztlich wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt.

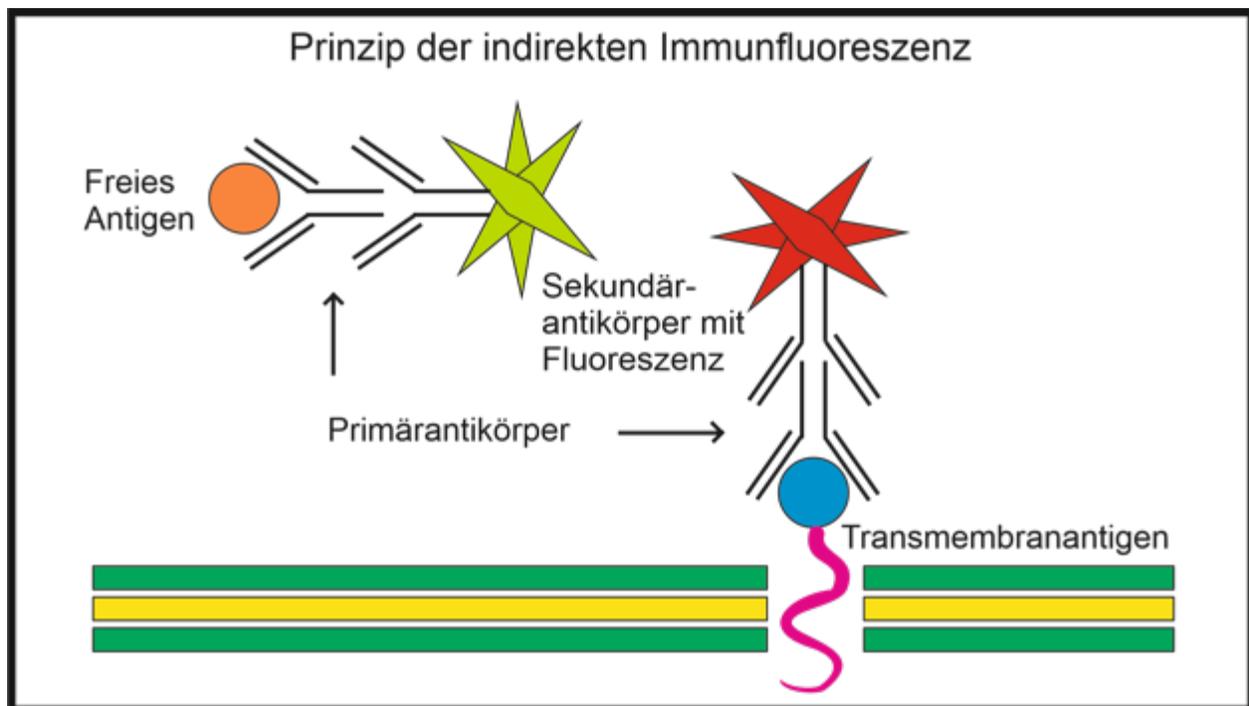
### 2.2.1.3 Realtime-RT-PCR

Für die realtime RT-PCR wurde die cDNA 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 2 µl dieser Verdünnung wurden in die Löcher einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jedem Ansatz auf der Platte wurden 18 µl eines Mastermixes bestehend aus 10 µl 2 x Taqman Universal PCR Master Mix, 1 µl Taqman Primer und 7 µl bidestilliertem Wasser hinzugegeben und die Platte wurde mit einer optischen Folie verschlossen. Für die folgenden Reaktionsschritte der Amplifikation und Detektion wurde die Platte mit den Ansätzen ins ABI Prism®-7000 SDS Realtime PCR-Gerät überführt und das entsprechende Programm gestartet, welches folgende Schritte beinhaltet: Zunächst zwei Minuten 50 °C zur UNG-Aktivierung gefolgt von 10 Minuten 95 °C dienlich der Polymerase-Aktivierung und zur Denaturierung, 40 Zyklen 15 Sekunden 95 °C sowie zum Annealing und zur Elongation 1 Minute 60 °C mit Detektion der Fluoreszenzsignale.

Als interner positiver Standard wurde als Referenzgen die Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH) gleichzeitig auf der Platte mit getestet, um eine relative Änderung der Genexpression innerhalb einer Probe bestimmen zu können. Die GAPDH eignet sich hierfür besonders gut, da sie sich durch eine konstante Expression auszeichnet. Die relative Änderung der Expression ergibt sich aus folgender Formel:  $\Delta CT = CT (\text{Probe}) - CT (\text{GAPDH})$ . CT (Cycle of threshold) steht hier für die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes. Das  $\Delta CT$  (CT = Cycle of threshold) gibt die relative mRNA-Menge an, die sich aus dem CT-Wert der Probe in Bezug auf den CT-Wert der GAPDH errechnet. Durch den logarithmischen Reaktionsverlauf ergibt eine Änderung des  $\Delta CT$ -Wertes um 3,33 eine Änderung der Transkription um das Zehnfache.

### 2.2.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Eine biochemische Methode zum sichtbar machen von gefragten Zellen oder zellulären Strukturen ist die Immunhistochemie. Bei dieser Methode nutzt man markierte Antikörper, welche an die gewünschten Ziel-Antigene binden. So kommt es zur optischen Darstellung der Zielstrukturen. Die indirekte Immunhistochemie benutzt zwei Antikörper. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das gewünschte Zielantigen der Zellen. Die eigentliche Darstellung wird über einen zweiten Antikörper vermittelt. Der Zweitantikörper bindet nun gezielt an den zuerst aufgetragenen Antikörper und bildet so einen Antigen-Antikörper1-Antikörper2-Komplex. Eine Fluoreszenzmarkierung am Zweitantikörper sorgt für die Visualisierung des Komplexes (s. beispielhaft Abb. 4). Im Weiteren wird zur Verdeutlichung der Zellen eine Kernfärbung vorgenommen. Die spezifische Kernfärbung erfolgt mit dem Farbstoff DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldichloridhydrat).



**Abb. 4: Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz**

Quelle: modifiziert nach Renz, 2009

Der Fab-Teil des Primärantikörpers bindet an das freie oder gebundene Antigen. Der fluoreszierende Sekundärantikörper bindet nun mit seinem Fab-Teil an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Die Fluoreszenzmarkierung des Sekundärantikörpers ermöglicht nun die Detektion des Zielantigens mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes.

Für die hier angewandte Fluoreszenz-Immunhistochemie mussten im ersten Schritt Gefrierschnitte der Glioblastomproben angefertigt werden. Mit einem Kryostat wurden 10 µm dicke Schnitte der schockgefrorenen Glioblastomproben angefertigt und auf entsprechende Objektträger übertragen. Diese Tumorschnitte wurden zur Fixierung für 10 Minuten in eine eiskalte 1:1 Methanol-Aceton-Lösung gebracht. Es folgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten mit TBST. Des Weiteren wurden die Gewebeproben zwei Minuten mit 20%igem und zwei Minuten mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zum Blockieren der Autofluoreszenz von übermäßig lipidhaltigem Gewebe erfolgte die Inkubation der Gefrierschnitte für 10 Minuten mit 1 % Sudanschwarz in 70%igem Ethanol. Anschließend wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bis sich keine Farbwolken mehr aufzeigten. Danach wurde zwei Minuten mit 20%igem Ethanol und dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Mit einer in TBST gelösten 0,5 % BSA / 0,5 % Glycin-Lösung wurden die Glioblastomschnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Ohne weiteres Spülen wurden 100 µl des in TBST-verdünnten Primärantikörpers auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Nun wurden je 100 µl mit TBST verdünntem Sekundärantikörper auf die Gewebeproben aufgetragen und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation sowie die darauffolgenden Schritte mussten in Dunkelheit durchgeführt werden, da der Sekundärantikörper empfindlich auf Licht reagiert. Hinsichtlich dessen, ob der Primärantikörper aus der gleichen oder aus unterschiedlichen Spezies stammten, unterschieden sich die weiteren Arbeitsschritte. Wenn der primäre Antikörper aus unterschiedlichen Organismen kam, wurden die Glioblastomproben einmal mit TBST für zehn Minuten und zweimal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte dann mit einer DAPI-Lösung (1:30000 verdünnt in TBS) mit welcher die Glioblastomproben für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Anschluß wurden die Proben kurz gewaschen. Dieses geschah dreimal mit TBST, einmal mit TBS und einmal mit destilliertem Wasser. Zum Schluss wurden die Gewebeproben auf den Objektträgern mit Immumount® eingedeckelt und zum Trocknen und zur Lagerung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Kamen die Primärantikörper jedoch aus der gleichen Spezies, konnte zuerst nur ein Primärantikörper aufgetragen werden und mit dem entsprechendem Sekundärantikörper gefärbt werden. Die Objektträger wurden in diesem Fall nach dem Auftragen des Sekundärantikörpers dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation der Schnitte mit in TBST verdünnten Fab-Fragmenten für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer, um die

Spezies-spezifischen Fc-Teile der Antikörper zu blockieren und somit die Möglichkeit zu schaffen, dass erneut ein Primärantikörper der gleichen Spezies verwendet werden konnte. Nach der Inkubation wurde dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und 100 µl eines weiteren in TBST verdünnten Primärantikörpers wurden auf die Gewebeproben aufgetragen. Die Inkubation geschah über Nacht in einer feuchten Kammer. Am nun dritten Tag erfolgte nach dreimaligen Waschen für 10 Minuten mit TBST die zweite Inkubation mit dem Sekundärantikörper nach der oben genannten Weise. Auch das weitere Waschen, die Kernfärbung, das Eindecken sowie die Trocknung und Lagerung der Gewebeproben geschah hier wie bereits vorher beschrieben. Die Auswertung der fertigen Glioblastomschnitte erfolgte mit dem Axiovert 200 M Mikroskop. Es wurden die Zellen hinsichtlich der Färbung je nach Fragestellung auf einzelne Marker wie auch auf zwei Marker in Bezug auf die Anzahl der gefärbten Zellkerne untersucht.

### **2.2.3 Zellkultur**

Die Kultivierung der Glioblastomzelllinien A767, U373, A764, U118, A172, U343 und T98G erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Zur Versorgung der Glioblastomzelllinien wurde ein Kulturmedium für Tumorzelllinien (DMEM mit 10 % FKS, 3 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) eingesetzt. Wenn eine ausreichende Zelldichte in den Kulturflaschen erreicht wurde, wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. Mit einer EDTA-Lösung wurde der Zellrasen bei 37 °C ca. 5 Minuten zur Ablösung inkubiert und der abgelöste Zellrasen wurde mit 5 ml Kulturmedium abgespült und in 10 ml-Röhrchen überführt. Nach Auszählen wurde eine bestimmte Zellzahl in mit Medium gefüllte Kulturflaschen ausgesäht. Sämtliche Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank ausgeführt.

### 3 Ergebnisse

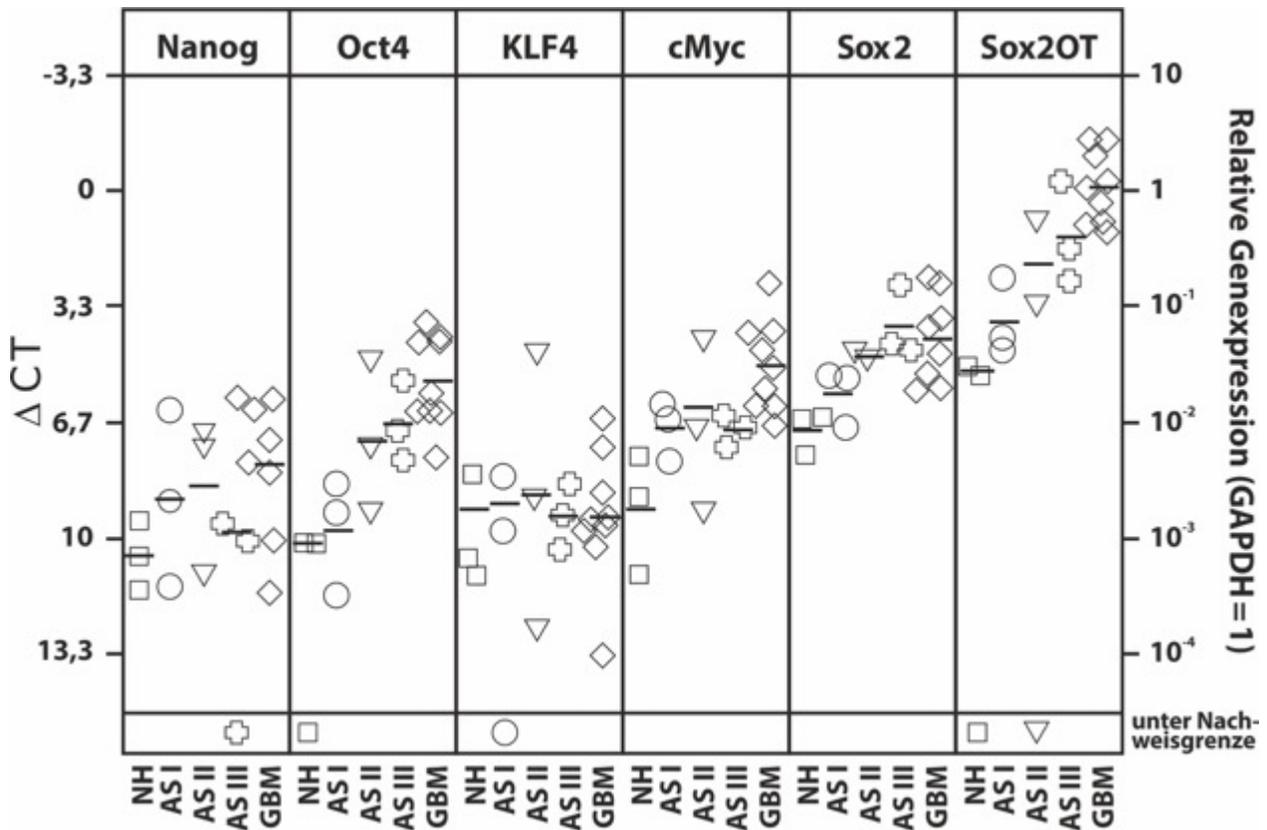
---

#### 3.1 Transkription von Stammzellmarkern in soliden astrozytären Tumorgeweben und im Normalhirn

Zunächst wurde die Expression von embryonalen und neuralen Stammzellmarkern in humanen Gewebeproben von gesundem Normalhirn und von Astrozytomen unterschiedlicher WHO-Grade auf Transkriptionsebene untersucht. Hierfür wurde aus humanen kryokonservierten Gewebeproben in einem ersten Schritt die RNA isoliert, die mRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels realtime RT-PCR analysiert wie bereits beschrieben. Die quantitative Auswertung der gemessenen  $\Delta$ CT-Werte erfolgte in Bezug auf das mitgemessene Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH). Eine hohe mRNA-Expression geht mit einem niedrigen  $\Delta$ CT-Wert einher, während umgekehrt eine niedrige mRNA-Expression einen hohen  $\Delta$ CT-Wert ergibt. Da bei der PCR eine logarithmische Anreicherung der Reaktionsprodukte stattfindet, entspricht ein Unterschied von 3,33 der  $\Delta$ CT-Werte einem zehnfachen Expressionsunterschied.

Die Abb. 5 zeigt die mRNA-Expression der ausgewählten embryonalen Stammzellmarker Nanog, Oct4, KLF4 und der neuralen Stammzellmarker cMyc und Sox2 sowie der nicht-kodierenden Sequenz Sox2OT in humanen Astrozytomproben unterschiedlicher WHO-Grade (AS I – III sowie GBM für Glioblastomproben) im Vergleich zu humanen nicht-neoplastischen Hirngewebeproben (Normalhirn, NT). Aus der nachfolgenden Abb. 5 geht hervor, dass alle untersuchten Marker in den Gewebeproben des Normalhirns und auch in allen Astrozytomproben unterschiedlicher WHO-Grade exprimiert wurden (bis auf vereinzelte Proben).

Bereits im nicht-neoplastischen Hirngewebe waren alle Stammzellmarker nachweisbar, jedoch waren die Expressionswerte allgemein geringer als in den Tumorproben. Die Mittelwerte der  $\Delta$ CT-Werte lagen mit 10,5 (Nanog), 10,1 (Oct4), 9,2 (KLF4) und 9,2 (cMyc) in einem moderaten Bereich. Für Sox2 und Sox2OT lagen die Mittelwerte mit 6,9 (Sox2) und 5,2 (Sox2OT) etwas höher. Allerdings lassen sich die verschiedenen Werte der Primer nicht absolut miteinander vergleichen, da die detektierte Kopienzahl je nach Fragmentgröße etwas abweichen kann und eine absolute Normierung auf die Kopienzahl sehr aufwendig wäre. Die jeweiligen Streuungen um die Mittelwerte war für jedes Gen und jede Probengruppe unterschiedlich stark.



**Abb. 5: Transkription von Stammzellmarkern in humanen Astrozytom- und Glioblastomgewebeproben.**

In Proben von nicht-neoplastischem Gehirn (Normalhirn, NH), Astrozytomen unterschiedlicher WHO-Grade (AS I-III) und des Glioblastoms (GBM) wurde die mRNA-Expression der Stammzellmarker Nanog, Oct4, KLF4, cMyc, Sox2 und der nicht-kodierenden RNA Sox2OT in humanen Astrozytom- und Glioblastomgewebeproben mittels realtime RT-PCR untersucht. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Die linke Ordinate bildet die  $\Delta$ CT-Werte ab, während die rechte Ordinate die relative Genexpression in Bezug auf GAPDH (= 1) zeigt. Nicht detektierte Proben wurden bei der Erstellung der Mittelwerte vernachlässigt.

In den Astrozytom Grad I-Proben waren die  $\Delta$ CT-Mittelwerte etwas höher als bei den nicht-neoplastischen Hirngewebebeobachtungen, auch wenn einzelne Proben vergleichbare oder niedrigere Expressionswerte aufwiesen. Die Mittelwerte für die Astrozytom Grad I-Proben lagen weiterhin in einem moderaten Bereich mit 8,9 (Nanog), 9,8 (Oct4), 9,0 (KLF4), 6,8 (cMyc), 5,8 (Sox2) und 3,8 (Sox2OT).

Die Astrozytom Grad II-Proben wiesen teils ähnliche, teils leicht erhöhte Stammzellmarkerexpressionen im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Hirngewebe- und Astrozytom Grad I-Proben auf. Die Mittelwerte der  $\Delta$ CT-Werte waren hierbei 8,5 (Nanog), 7,2 (Oct4), 8,7 (KLF4), 6,2 (cMyc), 4,8 (Sox2), 2,1 (Sox2OT).

Die bisherige steigende Tendenz der Expression der Stammzellmarker mit zunehmender Malignität ließ sich nun beim Astrozytom Grad III nur teilweise weiterverfolgen. Einen weiteren Anstieg der Mittelwerte zu den vorherigen Malignitätsgraden gab es bei Oct4 (6,7), Sox2 (3,9) und Sox2OT (1,3). Rückläufige Mittelwerte waren im Vergleich zu den AS I- und II- Proben bei Nanog (9,8), KLF4 (9,4) und cMyc (6,9) festzustellen. KLF4 fiel zudem als einziger Marker unter den Mittelwert des nicht-neoplastischen Hirngewebes ab.

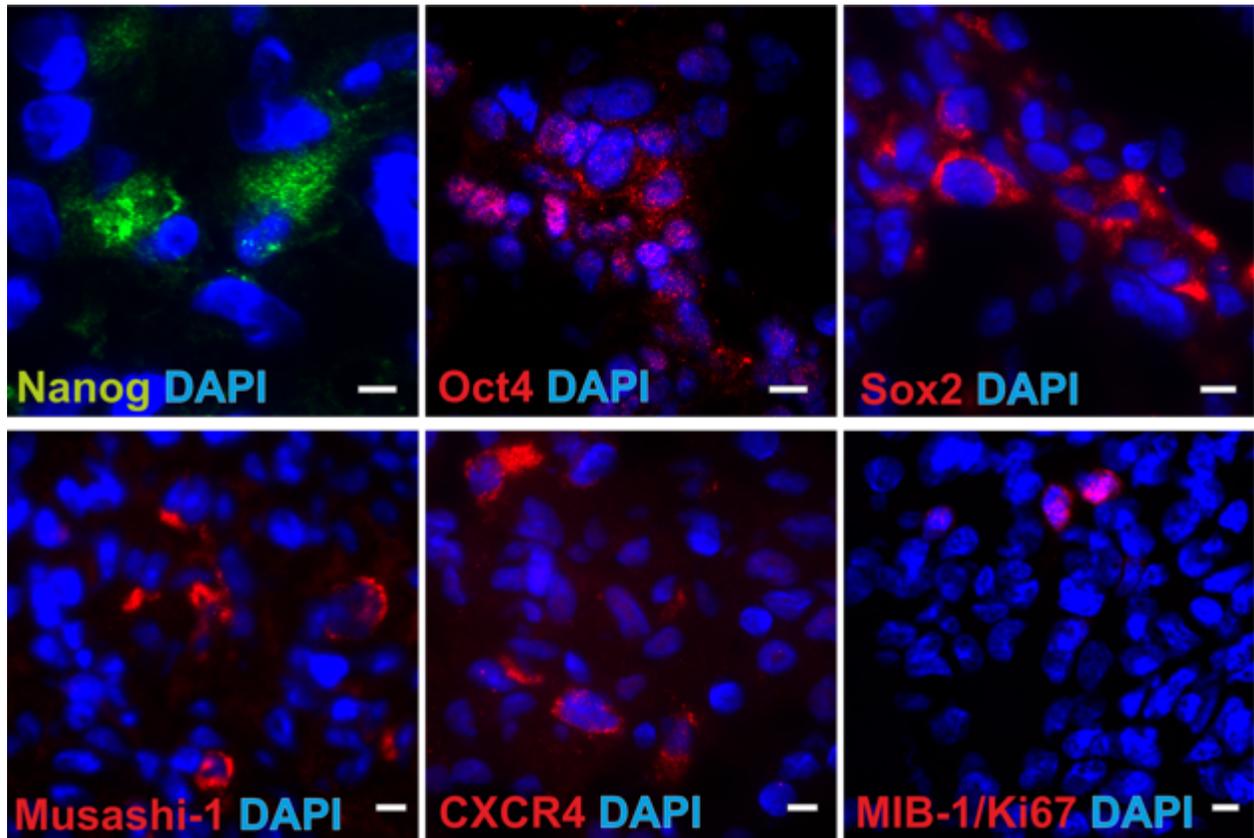
Auf höchster Malignitätsstufe, dem Glioblastom (Astrozytom Grad IV), war, ausgenommen von KLF4 und Sox2, ein Anstieg in den Mittelwerten erkennbar. Mit 7,9 (Nanog), 5,5 (Oct4), 5,0 (cMyc) und -0,1 (Sox2OT) wurden die höchsten Mittelwerte für diese Marker erreicht. KLF4 bleibt mit seinem Wert von 9,4 auf niedrigem Niveau, in dieser Probenkohorte konnte also kein Anstieg von KLF4 nachgewiesen werden. Sox2 war im Mittel (4,3) minimal weniger exprimiert als in den Astrozytom Grad III-Proben.

Zusammenfassend ließ sich insgesamt erkennen, dass mit steigender Malignität eine steigende Expression der Stammzellmarker Oct4, Sox2 und Sox2OT gemessen wurde. Im Allgemeinen ließ sich dieser Trend auch für Nanog und cMyc beobachten, wobei hier die Astrozytom Grad III-Proben etwas niedrigere Mittelwerte aufwiesen. Für KLF4 hingegen wurde in dieser Probenkohorte keine über die Streuung der individuellen Proben hinausgehende Steigerung der Expression beobachtet.

### **3.2 Immunhistochemischer Nachweis ausgewählter Marker an humanen Glioblastomkryoschnitten**

Nachdem auf Transkriptionsebene in den soliden Tumorproben und im Normalhirn die Stammzellmarker Nanog, Oct4, KLF4, cMyc und Sox2 nachgewiesen werden konnten, sollten nun ausgewählte Marker auf Proteinebene mittels der Methode der Immunhistochemie untersucht werden. Hierfür wurden beispielhaft für embryonale Marker Nanog und Oct4 ausgewählt und für eher neurale Stammzellmarker Sox2 und Musashi-1. Als zusätzlicher Marker für die Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter wurde der Chemokinrezeptor CXCR4 untersucht. Über die mRNA-Expression von CXCR4 in Astrozytomen und Glioblastomen lagen schon umfangreiche Daten in der Arbeitsgruppe vor (Hattermann et al., 2010), so dass hier vor allem die Proteinexpression und die Ko-Lokalisation mit den weiteren Stammzellmarkern interessant war. Des Weiteren wurde der Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 gefärbt. Die fluoreszenzgefärbten Schnitte wurden mikroskopiert und fotografiert, Beispiele sind in der Abb. 6 gezeigt. Positive Zellen wurden anhand von mindestens 5 Aufnahmen (mindestens 250 Zellen)

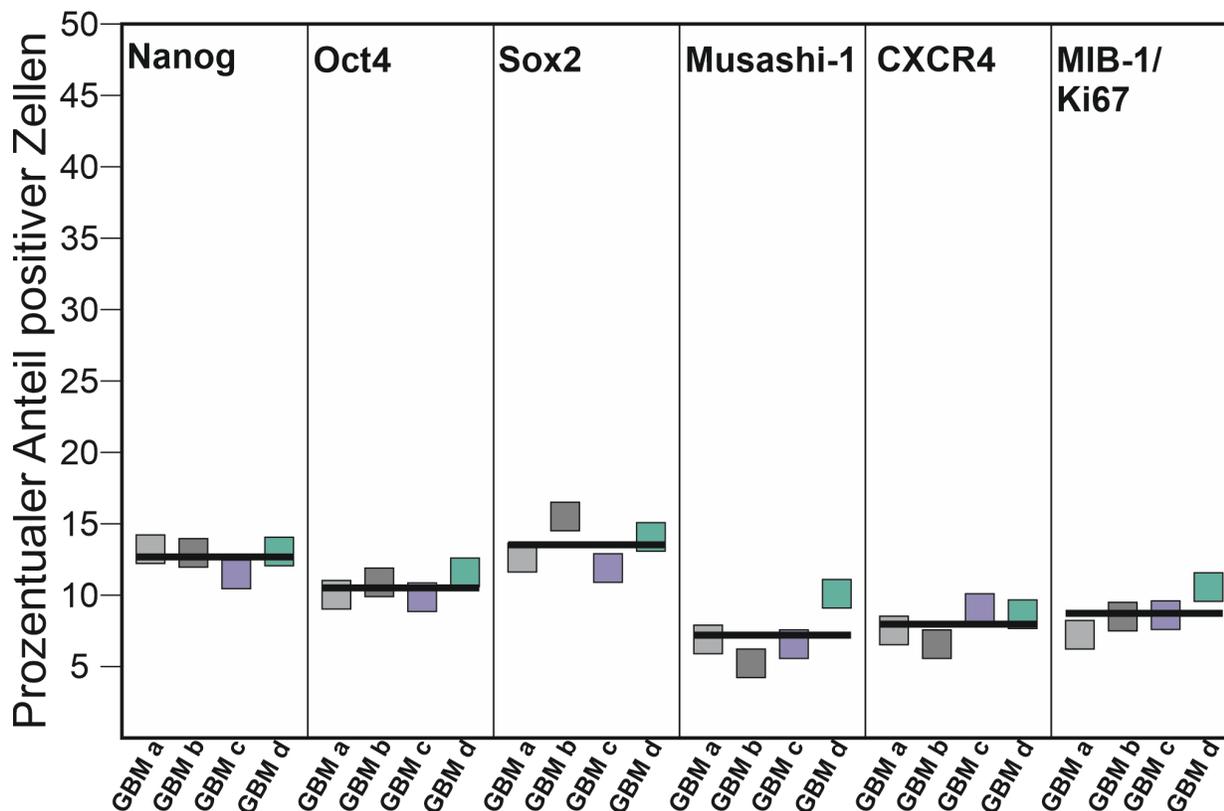
bei 60-facher Vergrößerung ausgezählt und prozentual auf die Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Kerne) bezogen (s. Abb. 7). Einige Marker wurden in der immunhistochemischen Färbung nicht berücksichtigt, da bereits zuvor ausreichende Untersuchungen (z. B. cMyc) vorlagen oder zu Beginn der Arbeit kein zufriedenstellendes Färbeprotokoll entwickelt werden konnte.



**Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis von embryonalen und neuralen Stammzellmarkern, dem Chemokinrezeptor CXCR4 und dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67.**

Mittels immunhistochemischer Färbung die Expression von den Stammzellmarkern Nanog, Oct4, Sox2 und Musashi-1 sowie dem Chemokinrezeptor CXCR4 und dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 in vier humanen Glioblastomproben untersucht. Die jeweiligen Marker mit entsprechend markierten Sekundärantikörpern rot oder grün gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10  $\mu\text{m}$ .

Zunächst einmal konnten alle untersuchten Marker in allen Tumorproben detektiert werden (s. Abb. 6 und Abb. 7). Der prozentuale Anteil der Stammzellmarker-positiven Zellen lag im Bereich zwischen 5 % und 17 %. Unter den Stammzellmarkern hatte Sox2 mit einem Mittelwert von 13,5 % den höchsten prozentualen Anteil und Musashi-1 zeigte mit einem Mittelwert von 7,2 % den niedrigsten Anteil an ausgezählten Zellen. Nanog konnte in einem ähnlichen Bereich wie Sox2 mit einem Mittelwert 12,7 % detektiert werden. Oct4 wies einen etwas niedrigeren prozentualen Anteil mit 10,6 % im Mittelwert auf. Der Mittelwert für den Chemokinrezeptor CXCR4 betrug 8,0 % und für den Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 8,7 %. Bei fast allen untersuchten Markern lagen die Werte der einzelnen Tumorproben dicht um die Mittelwerte, lediglich Sox2 und Musashi-1 zeigten hier eine etwas deutlichere Streuung.



**Abb. 7: Quantitative Auswertung Immunfluoreszenz-gefärbter Zellen in humanen Glioblastom-Proben.**

Die Stammzellmarker Nanog, Oct4, Sox2, Musashi-1, der Chemokinrezeptor CXCR4 sowie der Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 wurden mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie markiert und die gefärbten Schnitte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert. Die vier unterschiedlich gefärbten Vierecke stehen hier für die vier humanen Glioblastomproben GBM a-d. Pro Tumorprobe wurden mindestens 5 Aufnahmen (entsprechend mindestens 250 Gesamtzellen) ausgezählt und positiv markierte Tumorzellen prozentual auf die negativen Zellen (nur DAPI-Kernfärbung sichtbar) bezogen. Die Auswertung zeigte, dass der Anteil der mit Stammzellmarkern gefärbten Zellen in Abhängigkeit vom genutzten Marker zwischen ca. 5 % und 17 % lag, die höchsten Werte wurden für Sox2 erhalten, die niedrigsten für Musashi-1.

### **3.3 Untersuchung der Ko-Lokalisation von Stammzellmarkern sowie anderen Markern mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an humanen Glioblastom-Gefrierschnitten**

Nach dem immunhistochemischen Einzel-Nachweis von verschiedenen Stammzellmarkern und dem Chemokinrezeptor CXCR4 sowie dem Proliferationsfaktor MIB-1/Ki67 in den vier humanen Glioblastom-Proben sollte im Folgendem mehr über die Ko-Expressionen der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in Kombinationsfärbungen mit anderen Markern festgestellt werden. Als astrozytärer Marker diente GFAP in den Doppelfärbungen.

Es wurden dieselben vier humanen Glioblastomproben (GBM a-d) wie bereits in der Einzelfärbung verwendet und ebenfalls das Verfahren der Fluoreszenz-Immunhistochemie angewandt. Die Gefrierschnitte wurden je mit einem Primärantikörper gegen Nanog, Oct4 und Sox2 inkubiert und je nach Kombinationsfärbung mit einem grünen oder roten Sekundärantikörper gefärbt.

Weitere Primärantikörper gegen CXCR4, Musashi-1, MIB-1/Ki67 und GFAP wurden im nächsten Schritt auf die Tumorproben aufgetragen und mit einem Sekundärantikörper in der jeweils anderen Farbe (rot oder grün) gefärbt, so dass beide Immunreaktivitäten parallel betrachtet werden konnten. Durchgehend wurde DAPI zur blauen Kernfärbung genutzt.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde in 60-facher Vergrößerung die zelluläre Lokalisation bestimmt.

Zur quantitativen Analyse wurden einzeln positive Zellen, die doppelt positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl der DAPI-gefärbten Kerne ausgezählt und der prozentuale Anteil der einzeln und doppelt immunreaktiven Zellen auf die Gesamtzellzahl errechnet. Diese prozentualen Anteile werden in einem nachfolgenden Abschnitt 3.3.3 beschrieben und graphisch dargestellt (s. Abb. 13 und Abb. 14).

### **3.3.1 Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2**

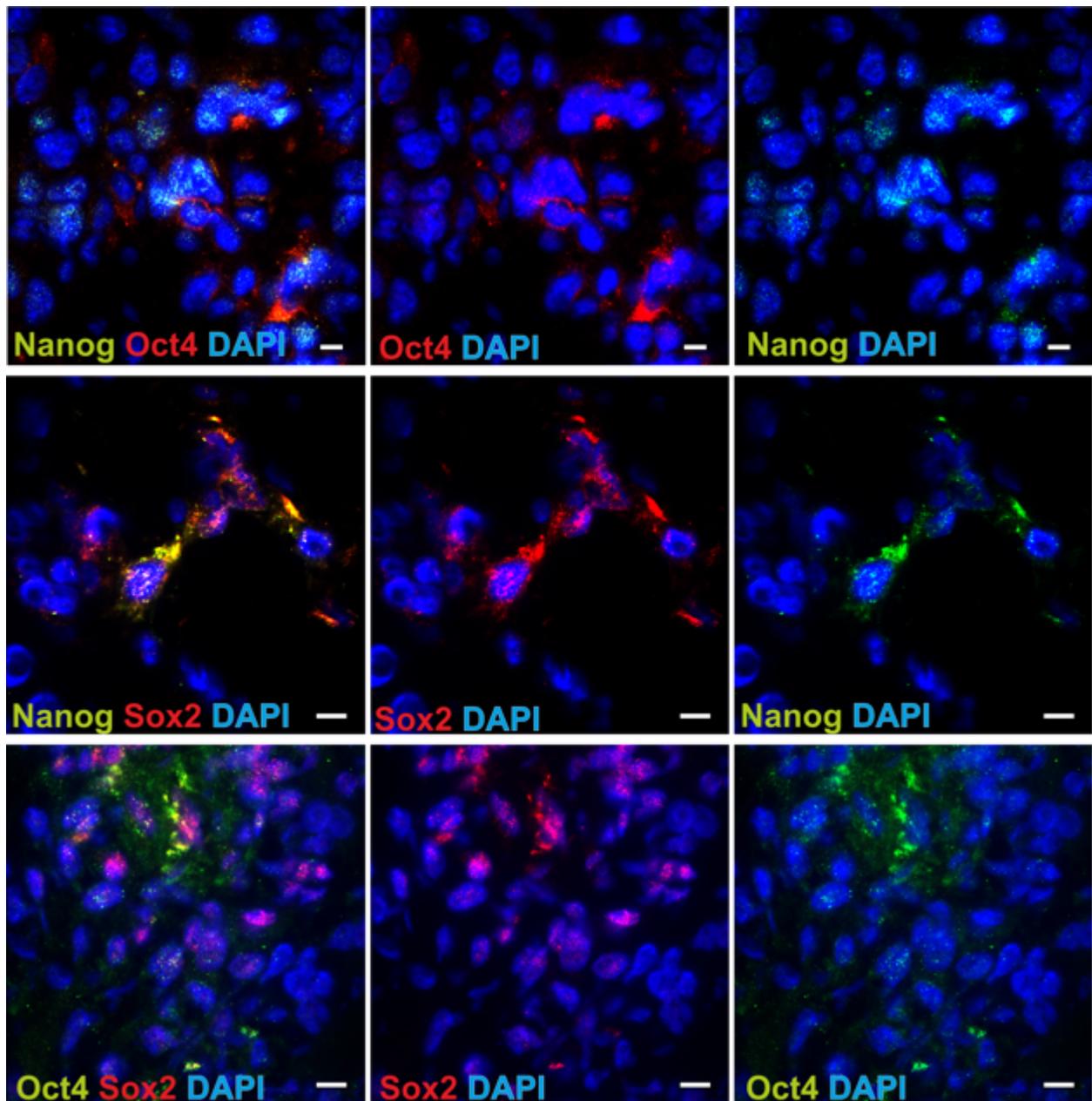
Zunächst wurden die drei Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct4 und Sox2 in folgenden Kombinationen gefärbt: Nanog (grün) mit Oct4 (rot), Nanog (grün) mit Sox2 (rot) sowie gegen Oct4 (grün) mit Sox2 (rot). Die Abb. 8 zeigt Beispiele dieser Kombinationsfärbungen der humanen Glioblastomproben.

Alle drei Stammzellmarker zeigten ein Vorkommen in Clustern unterschiedlicher Größe. Die Verteilung dieser Cluster war eher inhomogen und konnten ubiquitär über die Schnittfläche der humanen Glioblastomproben für alle drei Stammzellmarker detektiert werden. Es gab Bereiche in denen die Marker weniger auftraten, um dann in anderen Bereichen wieder gehäuft zu erscheinen.

Für Nanog und Oct4 konnte beobachtet werden, dass die Cluster der immunreaktiven Zellen meist eine ungefähre Größe von ca. 10-15 Zellen hatten. Gelegentlich fanden sich für beide Stammzellmarker einzeln positive Zellen. Ebenso trat Sox2 überwiegend in Clustern mit einer Zellzahl von ca. 2-10 Zellen auf, aber auch Zellansammlungen von über 20 Zellen waren zu beobachten.

Ko-Expressionen der drei Stammzellmarker konnten regelmäßig sowohl an Zellen in Cluster-Formationen wie auch an einzelnen Zellen beobachtet (beispielhaft gezeigt in Abb. 8) werden.

In den untersuchten Tumorschnittproben zeigte sich, dass die drei Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in unterschiedlichem Maß sowohl nukleär als auch perinukleär lokalisiert waren, was auf eine unterschiedliche Aktivierung der Transkriptionfaktoren hindeuten könnte.



**Abb. 8: Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.**

Gezeigt sind hier repräsentative Gesichtsfelder von  $n = 4$  unterschiedlichen Glioblastomproben. Links sind alle Farbkanäle kombiniert dargestellt. Mittig und rechts sind jeweils einzeln der rote und der grüne Farbkanal mit der DAPI-Kernfärbung (blau) dargestellt. Alle untersuchten Glioblastomproben zeigten für alle drei Stammzellmarker Nanog (grün), Oct4 (grün oder rot) und Sox2 (rot) eine Immunreaktivität. Hierbei konnte eine Anordnung der stammzellmarkerpositiven Zellen in Clustern sowie teilweise eine Ko-Färbung der Stammzellmarker beobachtet. Maßstab: Zellkern ca. 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung: Die Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in Kombination mit weiteren Markern**

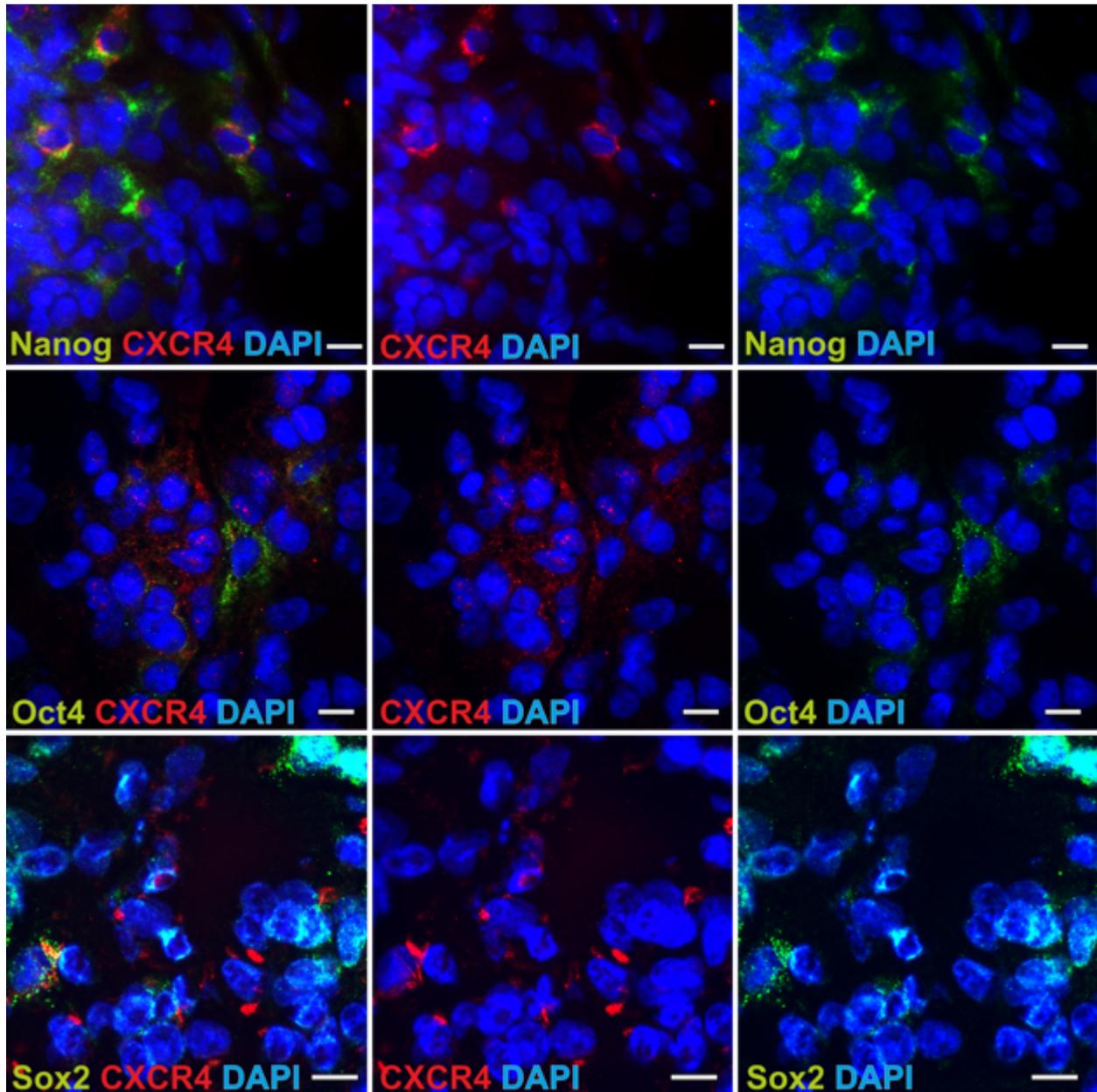
In den weiteren Untersuchungen wurden nun die drei Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 als Basismarker genommen und jeder dieser Stammzellmarker wurde in Kombination mit den Markern CXCR4, Musashi-1, MIB-1/Ki67 und GFAP immunhistochemisch gefärbt, um die Lokalisation der Marker im Verhältnis zueinander zu analysieren. Beispiele mit Anordnung der Zellen sind in den Abb. 9, 10, 11 und 12 dargestellt.

Das Bild der CXCR4-markierten Zellen zeigte sich heterogen. Es kamen sowohl einzelne Zellen vor, als auch mehrere positive CXCR4-Zellen in Clustern. Teilweise gab es Ko-Färbungen mit den drei Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 (s. beispielsweise Abb. 9).

Musashi-1-positive Zellen traten auf der gesamten Tumorschnittfläche eher als einzelne Zellen oder in kleinen Zellgruppen auf. Im Hinblick auf die Ko-Färbung mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 konnten jeweils sowohl einzelne als auch mehrere doppelt-positive Zellen beobachtet werden (s. Abb. 10).

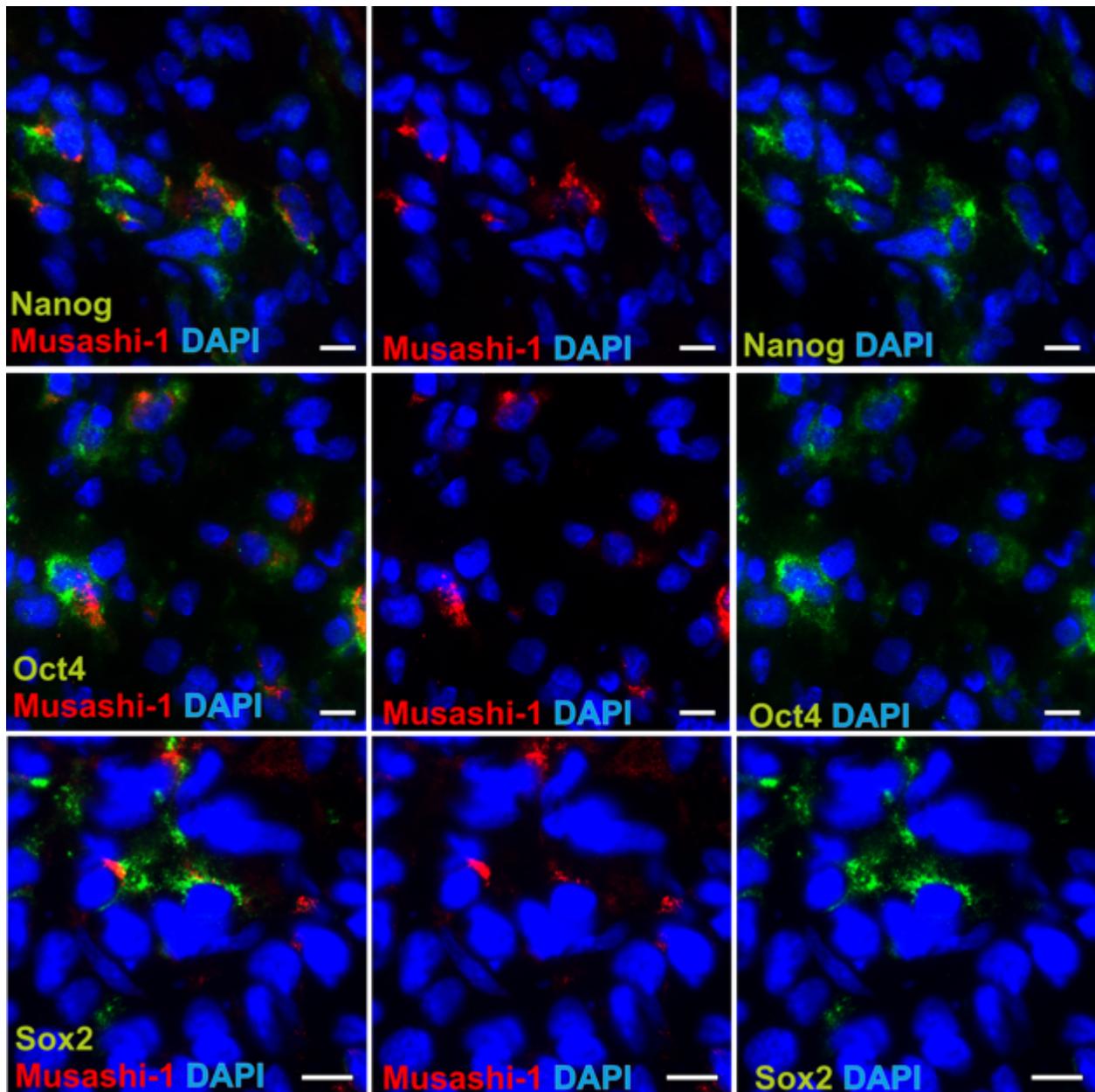
In den Doppelfärbungen der Stammzellmarker mit MIB-1/Ki67 sollten durch diesen Marker proliferierende Zellen gekennzeichnet und mit den stammzellartigen Tumorzellen in Bezug gesetzt werden. Als streng intranukleär vorkommender Marker wurde MIB-1/Ki67 vor allem in einzelnen Zellen beobachtet und wies in den verschiedenen Tumorproben und auch regional innerhalb eines Tumors ein ganz unterschiedliches Färbungsmuster auf. Die Färbung MIB-1/Ki67 wurde hierbei sowohl einzeln, als auch ko-gefärbt mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 beobachtet, so dass sich diese stammzellartigen Zellen offenbar zumindest teilweise in einem Proliferationsstadium befanden (s. beispielsweise Abb. 11).

GFAP, ein Marker der Stütz- und internen Struktur des astrozytärer Zellen, wurde in vielen der gefärbten Tumorproben gefunden, wie beispielhaft in Abb. 12 gezeigt. Die Verteilung des Markers war recht homogen, auch wenn die Färbung in einigen Tumorregionen etwas stärker und in anderen etwas weniger stark ausgeprägt beobachtet wurden. Durch das intrazelluläre Vorkommen von GFAP konnte deutlich das dreidimensionale Netzwerk der verzweigten Zellausläufer in den humanen Glioblastom-Proben dargestellt werden. In diesem Netz der GFAP-Filamente fanden sich die bekannten Cluster der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 wieder, jedoch war der Anteil an echter Ko-Färbung eher gering.



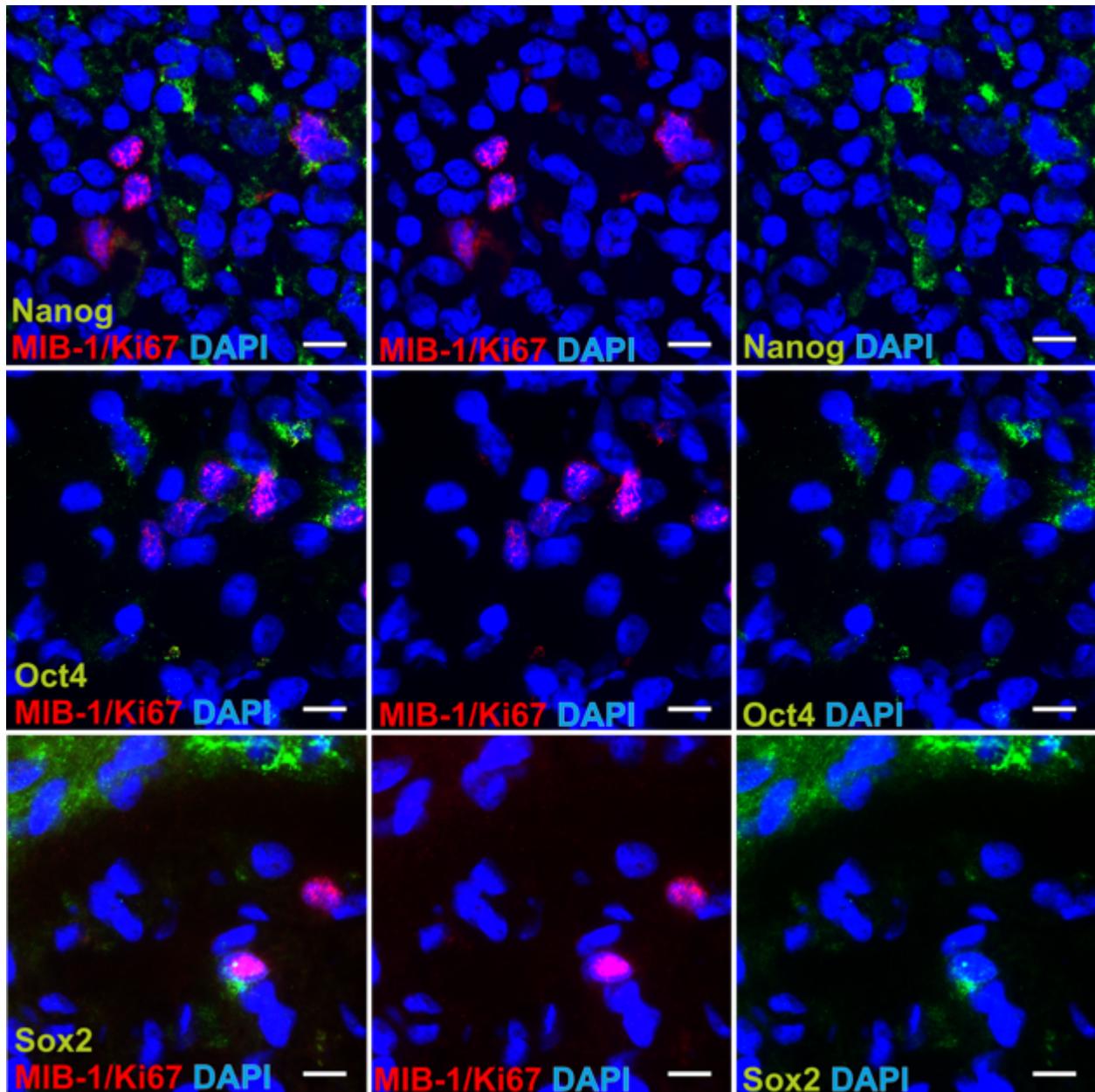
**Abb. 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Chemokinrezeptors CXCR4 mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.**

Die Bilder jeweils links zeigen CXCR4 (rot) mit jeweils den Stammzellmarkern Nanog (grün), Oct4 (grün) und Sox2 (grün). Mittig und rechts sind die jeweiligen Farbkanäle für die Stammzellmarker oder CXCR4 einzeln dargestellt (zusammen mit den DAPI-gefärbten Kernen). Die CXCR4-positiven Zellen waren in Clustern angeordnet oder traten einzeln auf. CXCR4 wurde gemeinsam mit den Stammzellmarkern ko-gefärbt gefunden (z. B. hier Nanog), oder auch separat. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

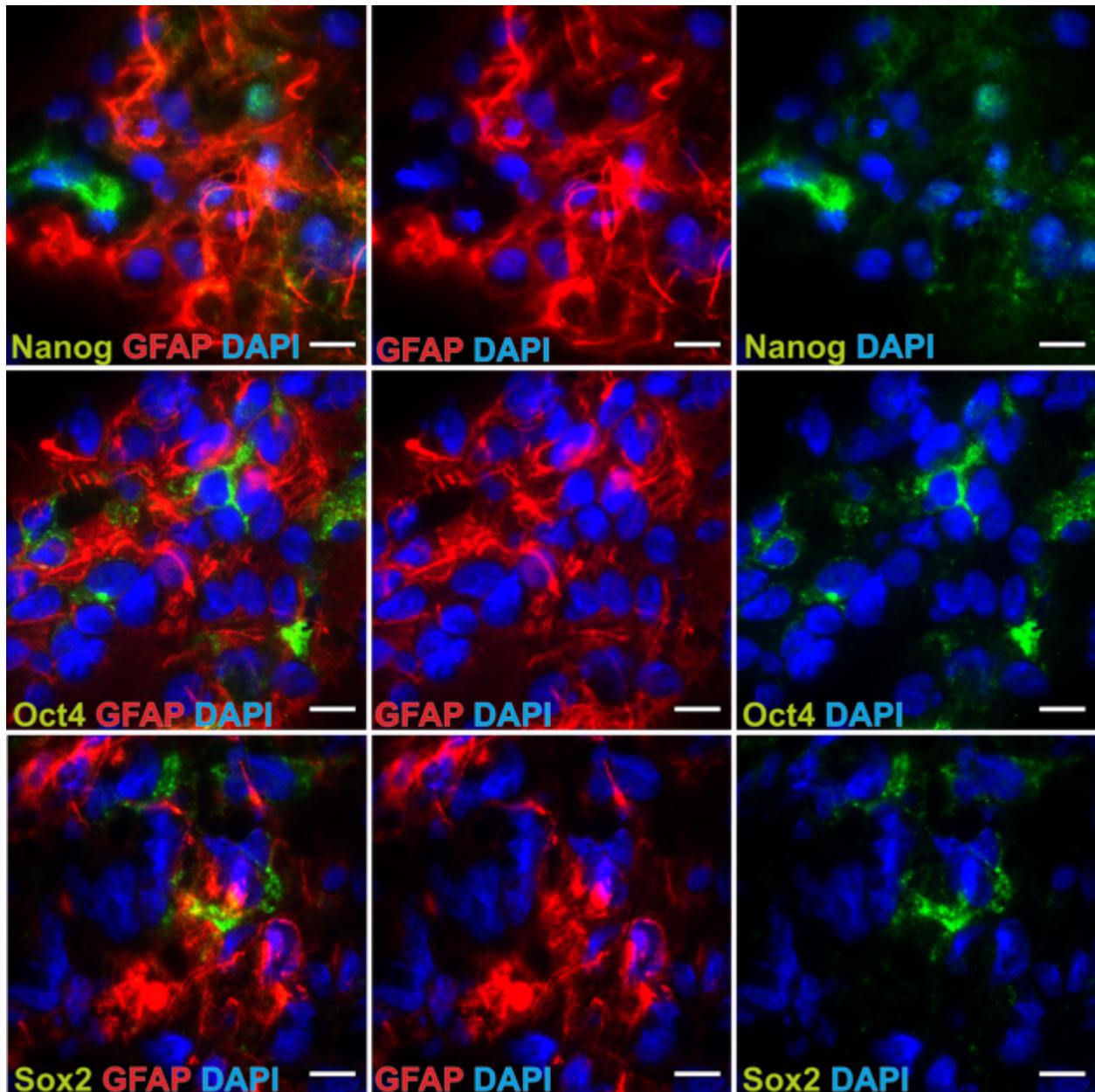


**Abb. 10: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Stammzellmarker Musashi-1 mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.**

In der linken Bildspalte sind alle Farbkanäle gezeigt, während mittig Musashi-1 (rot) und rechts die Farbkanäle für die Marker Nanog (grün), Oct4 (grün) und Sox2 (grün), jeweils in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung, gezeigt sind. Nanog-, Oct4- und Sox2-positive Zellen zeigten sich hier vor allem in Clustern angeordnet, während Musashi-1-positive Zellen unterschiedlich in Clustern oder einzeln auftraten. Maßstabsbalken entspricht 10 µm.



**Abb. 11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 in Kombination mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.** Alle Farbkanäle werden links gezeigt. MIB-1/Ki67 (rot) wird mittig und rechts die Farbkanäle für die Marker Nanog (grün), Oct4 (grün) und Sox2 (grün) einzeln gezeigt jeweils zusammen mit der DAPI-Kernfärbung. Innerhalb der Tumorproben kamen MIB-1/Ki67-positive Zellen in unterschiedlichen Anordnung vor. In den Ko-Färbungen mit den Stammzellmarkern zeigten sich eher einzelne Zellen doppelt-positiv (s. linke Abbildungen). Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.



**Abb. 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem astroglialen Marker GFAP in Kombination mit den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 in humanen Glioblastomproben.**

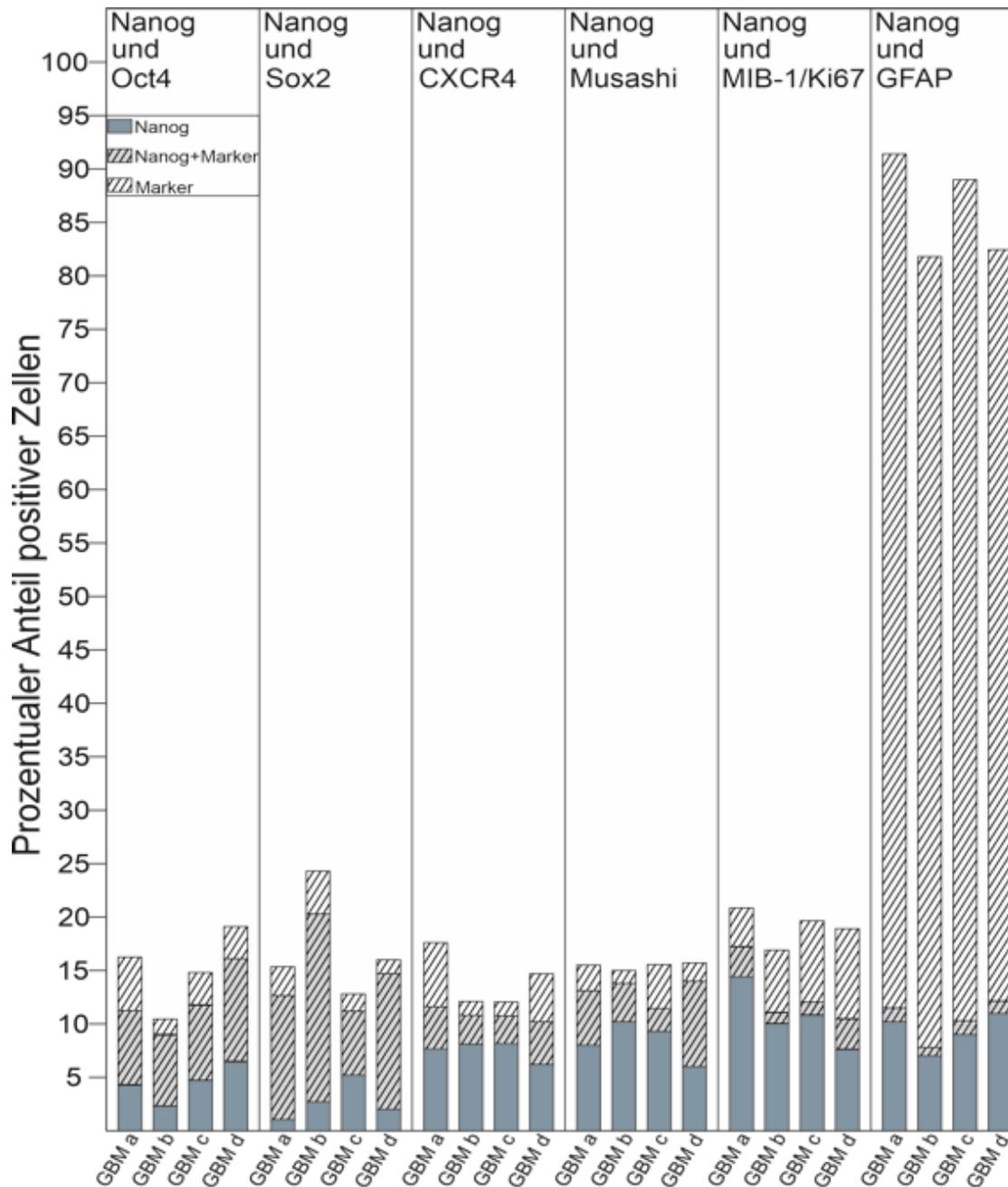
Die linke Bildspalte zeigt alle drei Farbkanäle, während mittig und rechts jeweils nur GFAP (rot) bzw. die Stammzellmarker Nanog (grün), Oct4 (grün) und Sox2 (grün) in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung zu sehen ist. Alle Tumorproben wiesen eine starke Expression von GFAP auf hierbei war die Expressionsstärke regional innerhalb der Tumorproben etwas unterschiedlich. Die Stammzellmarker-positiven Zellen fanden sich zwar häufig in unmittelbarer Nähe der GFAP-positiven Netzwerke, jedoch war die Färbung meist nicht an denselben Zellen zu beobachten. Maßstabsbalken entspricht etwa 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3.3 Quantitative Auswertung immunhistochemischer Doppelfärbungen von Stammzell- und weiteren Markern**

Nun sollte im Weiteren das prozentuale Vorkommen doppelt-positiver Zellen im Vergleich zu den einzel-positiven Zellen in den Tumorproben beurteilt werden. Es wurden hierzu die bereits zuvor beschriebenen Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 in immunhistochemischen Kombinationsfärbungen untereinander und mit dem Chemokinrezeptor CXCR4, dem Stammzellmarker Musashi-1, dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 sowie dem astroglialen Marker GFAP ausgezählt.

Die Auszählung der einfach und doppelt gefärbten Zellen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop in 60-facher Vergrößerung. Es wurden aus 5-10 Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop (ungefähr 250-500 Zellen gemessen an den DAPI-gefärbten Zellkernen) die einfach- und doppelt-immunreaktiven Zellen im Verhältnis zu den nicht-immunreaktiven Zellen ausgezählt und die prozentualen Anteile der einfach- und doppelt-fluoreszenz-markierten Zellen graphisch dargestellt (s. Abb. 13 und 14).

Wie bereits unter Abschnitt 3.3.1 und Abschnitt 3.3.2 beschrieben, konnten durch die ausgewählten immunhistochemischen Kombinationsfärbungen (s. Abb. 8, 9, 10, 11 und 12) in allen vier Glioblastomproben doppelt-positive Zellen detektiert werden. Aus der Abb. 13 und Abb. 14 geht nun hervor, dass sich das bereits morphologisch heterogene Bild auch in den prozentualen Anteilen der Expressionen widerspiegelt.



**Abb. 13: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Nanog in Kombination mit weiteren Markern in humanen Glioblastom-Proben.**

Einfach und doppelt gefärbte Zellen aus den immunhistochemischen Färbungen von vier humanen Glioblastomproben (a-d) gegen den Stammzellmarker Nanog gefärbt jeweils in Kombination mit den Stammzellmarkern Oct4, Sox2, Musashi-1, dem Chemokinrezeptor CXCR4, dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 und dem astroglialen Marker GFAP wurden ausgezählt (5-10 Gesichtsfelder bei 60-facher Vergrößerung) und prozentual auf die Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Kerne) bezogen. Die blaue Fläche beschreibt hier jeweils den prozentualen Anteil der einfach Nanog-positiven Zellen. Der mittlere grauschraffierte Abschnitt kennzeichnet jeweils den prozentualen Anteil der doppelt positiven Zellen. Die weiß-schraffierten Balken stehen für den jeweils anderen Marker, welcher in Kombination mit Nanog angefärbt wurden. Am höchsten sind die prozentualen Anteile von doppelt positiven Zellen in den Doppelfärbungen Nanog mit Oct4 und Nanog mit Sox2. In den anderen Kombinationsfärbungen ist der Anteil an ko-exprimierenden Zellen eher moderat (CXCR4 und Musashi-1) bis gering (MIB-1/Ki67 und GFAP).

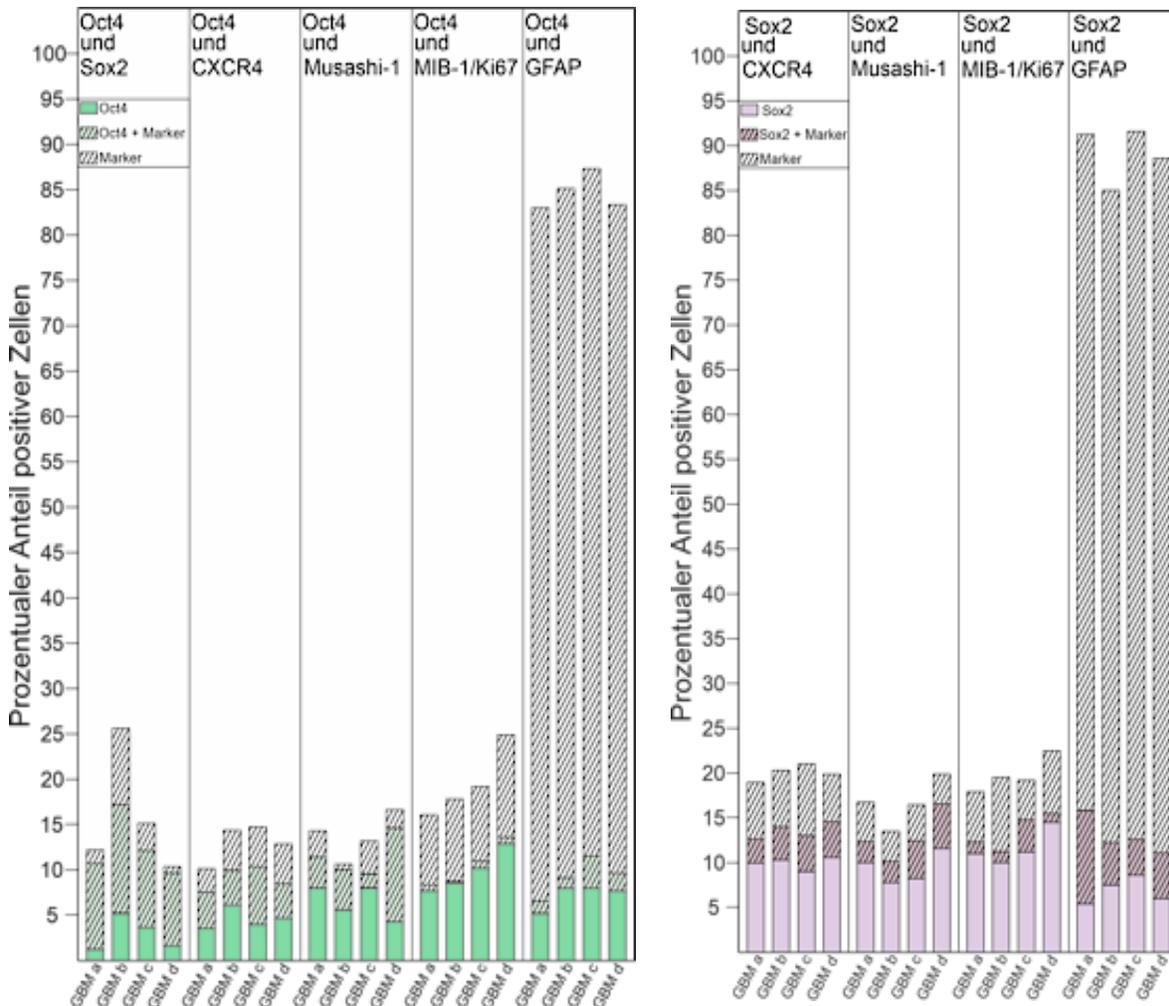
Die größten prozentualen Anteile an doppelt gefärbten Zellen waren in den Doppelfärbungen der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2 zu erkennen. Die prozentualen Anteile der ko-exprimierenden Zellen lagen im Mittel bei 7,6 % (Nanog und Oct4), 12,0 % (Nanog und Sox2) sowie 9,5 % (Oct4 und Sox2), somit waren die prozentualen Anteile der ko-exprimierenden Zellen ähnlich groß wie die Anteile der einfach-positiven Zellen.

In den Doppelfärbungen mit den Markern CXCR4, Musashi-1, MIB-1/Ki67 und GFAP jeweils in Kombination mit Nanog, Oct4 und Sox2 wurden weniger ko-gefärbte Zellen detektiert.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 und der Stammzellmarker Musashi-1 zeigten ähnliche große Anteile mit den Mittelwerten von 3,8 % und 4,4 %. In den Kombinationsfärbungen mit MIB-1/Ki67 war nur ein geringer Teil der Zellen immunreaktiv für beide gefärbten Marker und zeigten eine eher homogene Verteilung mit einem gesamten Mittelwert von 1,4 % der ko-gefärbten Zellen.

In den Doppelfärbungen gegen den astroglialen Marker GFAP war der Großteil der Zellen GFAP-positiv markiert, der Mittelwert der vier Glioblastomproben lag bei 78,6 %. Nur wenige Zellen wiesen dazu eine Ko-Expression im Vergleich mit Nanog, Oct4 und Sox2 auf. Die prozentualen Anteile der doppelt-positiven Zellen waren mit den Werten zwischen 1,3 % bis 10,4 % unterschiedlich verteilt.

Insgesamt zeigte sich nun in den Doppelfärbungen keine besonders auffällig hohe Ko-Expression in Hinblick auf die untersuchten Marker-Kombinationen. Es konnte jedoch auch in allen Kombinationsfärbungen jeweils ein gewisser Anteil an ko-gefärbten Zellen detektiert werden, der stark von der jeweils gefärbten Marker-Kombination abhing, aber innerhalb der vier untersuchten Tumorproben vergleichsweise konstant war. Die größten prozentualen Anteile doppelt-positiver Zellen fanden sich in den Kombinationsfärbungen der drei Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2, welches auf ihre enge funktionelle Beziehung hindeuten könnte. Allerdings kamen auch diese Marker oft genug einzeln exprimiert vor, so dass unter diesen drei Stammzellmarkern kein übergeordneter Marker festgestellt werden konnte. Hinsichtlich des Proliferationsmarkers MIB-1/Ki67 ergab sich lediglich ein geringer prozentualer Anteil von ko-immunreaktiven Zellen in den Doppelfärbungen mit den drei Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2. Dies könnte ein Hinweis auf die niedrige Proliferation vom stammzellartigen Tumorzellen sein. Für GFAP wurden ebenfalls vorwiegend geringe Anteile an Ko-Färbungen mit Oct4 und Nanog (etwas größere Anteile für Sox2) festgestellt. Dies ist ebenfalls wenig überraschend, da GFAP ein Marker für differenzierte Astrozyten ist.



**Abb. 14: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Oct4 und Sox2 in Kombination mit weiteren Markern in humanen Glioblastom-Proben.**

Einfach und doppelt gefärbte Zellen aus den immunhistochemischen Färbungen von vier humanen Glioblastomproben (a-d). Im linken Diagramm wurde gegen den Stammzellmarker Oct4 und im rechten Diagramm gegen den Stammzellmarker Sox2 gefärbt. Beide Stammzellmarker wurden jeweils in Kombination mit dem Stammzellmarker Musashi-1, dem Chemokinrezeptor CXCR4, dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 und dem astroglialen Marker GFAP sowie Oct4 in Kombination mit Sox2 gefärbt. Einfach und doppelt gefärbte Zellen wurden ausgezählt (5-10 Gesichtsfelder bei 60-facher Vergrößerung) und prozentual auf die Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Kerne) bezogen. Die grüne Fläche beschreibt hier jeweils den prozentualen Anteil der einfach Oct4-positiven Zellen und die violette Fläche beschreibt jeweils den prozentualen Anteil der einfach Sox2-positiven Zellen. Der mittlere farbig-schraffierte Abschnitt kennzeichnet jeweils in beiden Diagrammen den prozentualen Anteil der doppelt positiven Zellen. Die weiß-schraffierten Balken stehen für den jeweils anderen Marker, welcher in Kombination mit Oct4 oder Sox2 angefärbt wurden. Die Doppelfärbungen Oct4 mit MIB-1/Ki67 zeigen hier deutlich die niedrigsten prozentualen Anteile der doppelt positiven Zellen. Hingegen wies die Kombinationsfärbung Oct4 mit Sox2 wiederholt die größten Anteile der doppelt-positiven Zellen. Auch in den Doppelfärbungen mit Sox2 bleibt der Trend der ko-gefärbten Zellen ähnlich wie in den Ko-Färbungen von Nanog und Oct4. Alle Kombinationsfärbungen mit Sox2 zeigen sich insgesamt mit moderaten Anteilen von ko-immunreaktiven Zellen. Bemerkenswert ist, dass es einen größeren Anteil von Sox2-GFAP-ko-gefärbten Zellen gab.

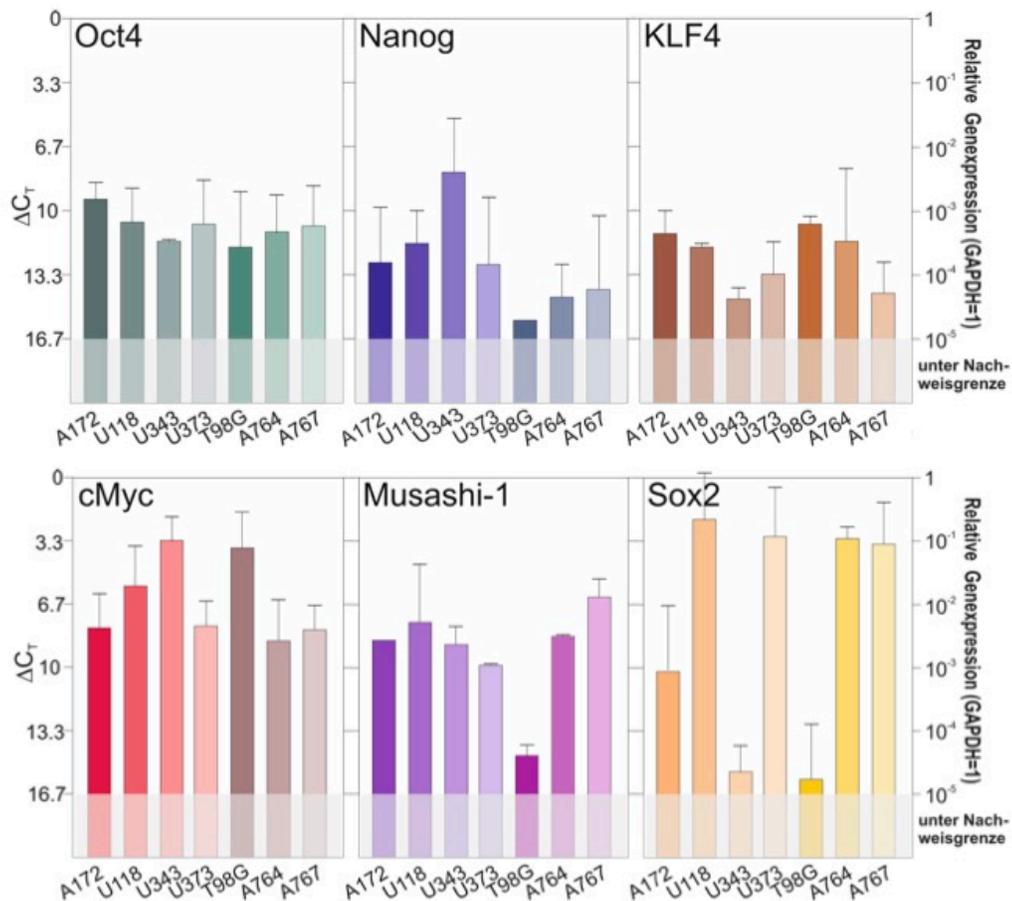
### **3.4 Transkription von Stammzellmarkern in Glioblastomzelllinien**

Abschließend wurde die Expression bereits genannter embryonaler und neuronaler Stammzellmarker in den Glioblastomzelllinien A172, U118, U343, U373, T98G, A764 und A767 überprüft. Die Linien A172, U118, U343, U373 und T98G sind kommerziell erhältliche Zelllinien, die Linien A764 und A767 wurden vor längerer Zeit in der Arbeitsgruppe aus soliden Tumoren hergestellt. Als Untersuchungsmethode wurde die realtime RT-PCR angewandt. Dafür wurde aus den kultivierten Glioblastomzelllinien RNA isoliert, um im nächsten Schritt die benötigte cDNA für die RT-PCR herzustellen. Mit Hilfe des ermittelten CT-Wertes in der realtime RT-PCR konnte ein  $\Delta$ CT-Wert gebildet werden, in dem die gemessenen CT-Werte in Relation zur mitgemessenen GAPDH gesetzt wurden. Dabei entsprach die Abstufung der  $\Delta$ CT-Werte in 3,33-Schritten jeweils einem Expressionsunterschied um das Zehnfache. Ein niedriger  $\Delta$ CT-Wert steht für eine hohe Expression, umgekehrt entspricht ein hoher  $\Delta$ CT-Wert einer niedrigen Expression.

Aus der Abb. 15 geht hervor, dass alle Tumorzelllinien die untersuchten Stammzellmarker exprimieren, jedoch unterschiedlich stark. Unter den Markern konnte bei dem embryonalen Stammzellmarker Oct4 insgesamt eine moderate und homogene Expression detektiert werden. Die übrigen Marker wiesen eher eine heterogene Expression auf. Die Transkription des neuralen Stammzellmarkers Sox2 variierte dabei am stärksten. Im Ganzen konnten für Sox2 die größten Mengen an mRNA detektiert werden. Die Glioblastomzelllinie U118 mit einem  $\Delta$ CT-Wert von 2,2 hatte insgesamt den höchsten Expressionswert, deutlich niedrigere Sox2-Expressionen wiesen die Tumorzelllinien U343 und T98G mit den  $\Delta$ CT-Werten von 15,5 und 16,0 auf. Ebenfalls hohe Werte in der Transkription zeigte der Stammzellmarker cMyc, sie lagen zwischen 8,6 bei den 764- und 4,3 bei den U343-Zellen.

Die Transkription zeigte sich bei Nanog, KLF4 und Musashi-1 eher moderat bis gering. Bei Nanog und Musashi-1 konnten relativ große Schwankungen der  $\Delta$ CT-Werte der jeweiligen Tumorzelllinien beobachtet werden. Für Nanog und Musashi-1 lagen die niedrigsten Expressionen bei einem  $\Delta$ CT-Wert von 15,7 (T98G bei Nanog) sowie 14,6 (T98G bei Musashi-1) und die höchsten Expressionen bei einem  $\Delta$ CT-Wert von 8,0 (U343) sowie 6,2 (A767 bei Musashi-1).

Bei KLF4 waren die Unterschiede zwischen der niedrigsten (U343 mit 14,6) und dem höchsten (T98G mit 10,7)  $\Delta$ CT-Wert weniger stark ausgeprägt.



**Abb. 15: Transkription von embryonalen Stammzellmarkern in humanen Glioblastomzelllinien.**

Die mRNA-Expression von Nanog, Klf4, Oct4, Sox2, Musashi-1 und cMyc wurde mittels realtime RT-PCR in den jeweils unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht. Die GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

In der Zusammenschau konnte in keiner der untersuchten Tumorzelllinien eine gleichmäßig hohe bzw. niedrige Expression aller Stammzellmarker identifiziert werden, allerdings wurden alle Stammzellmarker in allen Tumorzelllinien detektiert. Im Überblick ließ sich erkennen, dass Sox2, Nanog und Musashi-1 deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Tumorzelllinien aufwiesen, wobei Sox2 hier die stärksten Expressionen in einigen Tumorzelllinien zeigte. Oct4, KLF4 und cMyc wurde hingegen homogener in allen Tumorzelllinien exprimiert.

Dieses zeigt, dass Gliomazellen in Kultur Marker von Stammzellen exprimieren, allerdings in sehr unterschiedlicher Intensität.

## 4 Diskussion

---

Wegen einer schlechten bis sehr schlechten Prognose von nur Wochen bis Monaten nach der Diagnose *Glioblastoma multiforme* (GBM) bis zum Tod durch die Erkrankung, ist das Glioblastom bis heute Gegenstand der aktiven Forschung mit unterschiedlichen Ansätzen. Zwar konnte in der Vergangenheit durch die Optimierung der Operationstechniken, Strahlentherapie und die Gabe von Chemotherapeutika die mediane Überlebenszeit und progressionsfreie Zeit auf zum Teil etwa 12-15 Monate verlängert werden (Hart et al., 2013; Stummer et al., 2006; Stupp et al., 2005), jedoch bleibt eine sehr hohe Rezidivrate des Glioblastoms und ein kurativer Therapieansatz fehlt. Dadurch ist es ein Bestreben der derzeitigen Hirntumorforschung, neue Erkenntnisse über die Entstehung von Astrozytomen zu erhalten. Aus Erkenntnissen über eventuelle neue Zielstrukturen, die für die Steuerung der Entstehung und dem Wachstum von Astrozytomen verantwortlich sind, könnten sich mögliche neue therapeutischen Ansätze ergeben.

In den letzten Jahren ist die Tumorstammzellhypothese vermehrt in den Fokus gerückt worden. Diese Hypothese beschreibt, dass wenige Zellen einer Krebszellpopulation die Eigenschaften von Stammzellen besitzen. Für diese Tumorstammzellen bedeutet es, dass sie die embryonalen Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, uneingeschränkten Zellproliferation und weiteren Differenzierung besitzen. Aus diesem Pool der Tumorstammzellen ist nun einerseits weiteres Wachstum des Tumors möglich (Tan et al., 2006), andererseits verbleiben die Tumorstammzellen als eine Reserve von wenig proliferierende Zellen, die weniger angreifbar durch die konventionellen Therapiestrategien sind und aus welcher sich der Tumor nach der Therapie regenerieren kann (Morrison et al., 2011). Die Tumorstammzellhypothese ist somit eine Möglichkeit zur Erklärung von Entstehung, Wachstum und Rezidivbildung bei malignen Tumoren. In Hirntumoren konnte bereits das Vorkommen von Tumorstammzellen mit embryonalen Merkmalen nachgewiesen werden (Singh et al., 2003; Galli et al., 2004; Yuan et al., 2004) wie auch bei anderen Tumorentitäten (Li et al., 2007; Eramo et al., 2008.).

Nun konzentriert sich diese Arbeit darauf, eben diese Zellen mit Stammzellpotential in Astrozytomen und insbesondere dem Glioblastom *in situ* und *in vitro* genauer zu untersuchen. Dabei stand im Fokus, wieweit bestimmte Stammzellmarker allein oder in Kombination mit anderen in diesen Tumoren verbreitet sind und ob sich aus diesen Beobachtungen ein übergeordneter Tumorstammzellmarker oder eine charakteristische Kombination aus Markern identifizieren ließe.

Hierzu erfolgten Untersuchungen von ausgewählten Stammzellmarkern auf mRNA-Ebene in soliden Tumoren, Normalhirngewebe und in Glioblastomzelllinien sowie deren quantitative und phänotypische Beurteilung mittels immunhistochemischer Färbung in humanen Glioblastomschnitten. Ob und in wieweit diese Erkenntnisse über das Vorkommen embryonaler Zielstrukturen in Tumorzellen eine Relevanz für einen künftigen therapeutischen Ansatzpunkt bilden, ist bisher noch unklar und bedarf weiterer intensiver Forschung.

#### **4.1 mRNA-Expression von Stammzellmarkern in humanen Glioblastomproben und Normalhirn**

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der Stammzellmarker Nanog, Oct4, KLF4, cMyc, Sox2 und Sox2OT mit Hilfe der realtime RT-PCR in humanen Gewebeproben von Normalhirn und in Astrozytomproben der WHO-Grade I - IV untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass die gewählten überwiegend embryonalen Stammzellmarker sowohl in den Proben des gesunden Normalhirns wie auch in allen Tumorproben der unterschiedlichen WHO-Grade nachgewiesen werden konnten. Für die Normalhirnproben ergaben sich für alle untersuchten Marker niedrigere durchschnittliche Expressionswerte. Für die Marker Oct4 und Sox2OT konnte ein treppenartiger Anstieg in den Mittelwerten der mRNA-Expression mit Zunahme der Malignität beobachtet werden. Für die übrigen Marker konnte im Trend ebenfalls ein Anstieg der Expression hin zu den höheren Malignitätsstufen beobachtet werden, der jedoch auch Ausreißer zeigte. KLF4 zeigte in unserem Probenkollektiv keine erhöhte Expression in den untersuchten Astrozytomproben unterschiedlicher WHO-Grade vergleichend zu den nicht-neoplastischen Normalhirnproben.

Bereits zuvor konnte in Studien gezeigt werden, dass Stammzellmarker in Proben von Astrozytomen unterschiedlicher Malignitätsgrade, aber auch in Normalhirnproben exprimiert werden. In einer Studie von Ma et al. (2008), die in unserer Arbeitsgruppe entstand und auf die Untersuchung neuraler Stammzellmarker fokussiert war, wurde die mRNA-Expression von v. a. neuralen Stammzell- und weiteren Markern (CD133, Nestin, Sox2, Musashi-1, CXCR4, VEGFR-3 und CD105) in Astrozytomproben unterschiedlicher WHO-Grade im Vergleich zu gesundem Normalhirngewebe untersucht. Es zeigte sich in der Studie von Ma et al., dass alle untersuchten Marker in den Astrozytomproben nachgewiesen werden konnten und die Stammzellmarker zeigten zum Teil eine erhöhte Expression mit zunehmender Malignität, jedoch mit einer teilweise hohen Variabilität in Hinblick auf die individuellen Tumorproben. Die Ergebnisse von Ma et al. (2008) – teilweise mit anderen Markern – sind vergleichbar zu den

Ergebnissen aus dieser Arbeit. Auch in dieser Arbeit konnte eine Variabilität in der Expression der untersuchten Stammzellmarker und ein Anstieg der Expression in den höheren Malignitätsstufen beobachtet werden. Im direkten Vergleich sei hier der Stammzellmarker Sox2 genannt. Es konnte hier ein Anstieg der Expression mit Zunahme der Malignität für Sox2 und noch deutlicher für Sox2OT (einer nicht-kodierenden RNA in der Umgebung des Sox2-Gens) dargestellt werden. Für diese Sox2OT-RNA zeigte sich ein starker Anstieg in der Expression mit jeder Zunahme des Malignitätsgrades. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Su und Kollegen (2017), welche ebenfalls mit Hilfe der realtime RT-PCR die Expression von Sox2OT in Normalhirn sowie in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV untersucht haben. Es zeigte sich in der Arbeit von Su und Kollegen eine signifikante Erhöhung der Expression von Sox2OT in deutliche Korrelation mit dem Malignitätsgrad (Su et al., 2017).

In Hinblick auf die Expression von embryonalen Stammzellmarkern konnten wir mit der vorliegenden Arbeit ähnliche Beobachtungen machen wie Guo und Kollegen (2011). Guo et al. (2011) beschreibt für Oct4, Sox2 und Nanog einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhter Expression der Gene und Malignitätsgrade. In unserer Arbeit konnte für Nanog und Oct4 ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression in den hochmalignen Glioblastomproben im Verhältnis zum Normalhirn verzeichnet werden, dieses galt ebenfalls für cMyc. Oct4 zeigte sich mit einem kontinuierlichen Anstieg der Expression mit zunehmender Malignität. Nanog und cMyc waren in der Expression heterogener, beide Stammzellmarker zeigten einen Abfall in der durchschnittlichen Expression beim Astrozytom-WHO-Grad-III. Für das Protoonkogen cMyc wurde eine erhöhte Expression bei Glioblastomen beschrieben (Wang et al., 2008), für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastomproben konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. In unserer Arbeit zeigte sich in Glioblastomproben eine moderate Expression und kein kontinuierlicher Anstieg der Expression bei zunehmender Malignität. Auch für KLF4 wurde eine erhöhte Expression in Glioblastomen beschrieben (Schoenhals et al., 2009), dieses deckt sich nicht mit den Befunden unserer Untersuchung. Die Expressionsmittelwerte von KLF4 zeigten alle ähnlich niedrige Werte, wobei der Expressionsmittelwert der Glioblastomproben sogar am niedrigsten waren. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von KLF4 zum Malignitätsgrad beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die zum Teil abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, könnte an der teilweise geringen Anzahl der Gewebeproben in dieser Arbeit und auch der zitierten Arbeiten liegen. Einige Gewebeproben zeigten in unserer Arbeit eine größere Streuung der Expressionswerte um die Mittelwerte, so

dass nur in begrenztem Ausmaß die Tendenz der Expression ermittelt werden konnte. Eine erhöhte Probenanzahl könnte mögliche Ausreißer besser detektieren. Das besondere Merkmal unserer Arbeit ist jedoch, dass wir mehrere Stammzellmarker nebeneinander untersucht haben und somit einen Überblick verschiedener Stammzellmarker im Vergleich zueinander in Astrozytomen/Glioblastomen schaffen konnten. In den hier zitierten Studien (bis auf Ma et al., 2008) wurden im Gegensatz nur einzelne oder wenige Marker untersucht.

#### **4.2 Immunhistochemischer Nachweis ausgewählter Marker in Glioblastomkryoschnitten**

Mit dem Verfahren der Fluoreszenz-Immunhistochemie konnten in dieser Arbeit die verschiedenen Marker Nanog, Sox2, Oct4, Musashi-1, CXCR4, MIB-1/Ki67 und GFAP dargestellt werden. Zur Beurteilung des quantitativen Vorkommens und der Morphologie der oben genannten Marker wurden entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen der Marker in Einzel- und in Kombinationsfärbungen an Gefrierschnitten von humanen Glioblastomproben durchgeführt.

In der Einzelfärbung konnten alle untersuchten Marker in allen Glioblastomproben detektiert werden. Die embryonalen Stammzellmarker Nanog und Oct4 zeigten sich in den prozentualen Anteilen ähnlich homogen verteilt. Musashi-1 und Sox2 als neurale Stammzellmarker wiesen eine etwas heterogene Verteilung der prozentualen Anteile auf. Sox2 wies hier die höchsten prozentualen Anteile positiver Zellen auf. Diese Beobachtung zeigte eine teilweise Übereinstimmung mit den zuvor untersuchten mRNA-Expressionswerten, welche die höchsten Werte in der Expression von Sox2 (und Sox2OT, das als nicht-kodierende RNA jedoch nicht mittels Immunhistochemie detektiert werden kann) bei den höher malignen Astrozytomen (WHO-Grad III und IV) aufzeigten.

In den Doppelfärbungen galt es zu untersuchen, wie sich das Auftreten und die Verteilung von zwei Markern zu einander in den Glioblastomproben verhielt. Durch die Kombinationsfärbungen konnten regelmäßig doppel-gefärbte Zellen für zwei unterschiedliche Marker dargestellt werden. Für die Stammzellmarker Oct4, Nanog und Sox2 wurden in den Kombinationsfärbungen größere Anteile von ko-exprimierenden Zellen detektiert, welches auf eine gemeinsame Subpopulation hindeuten könnte. Ähnliche Beschreibungen gehen aus der bereits erwähnten Studie von Guo et al. (2011) hervor. In Studie von Guo et al. wurden die Marker Oct4, Nanog und Sox2 an Astrozytombeschnitten WHO-Grad II - IV immunhistochemisch nachgewiesen. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass besonders in den WHO-Graden III und IV höhere Anteile der Marker verzeichnet werden konnte. Es wurden WHO III-Grad-Tumoren in der

Doppel-Immunfluoreszenz untersucht, wobei es sich ergab, dass ein Großteil der Oct4 exprimierenden Zellen auch Nanog und Sox2 exprimierte. Die Befunde der vorliegenden Arbeit sind vergleichbar mit den Beobachtungen von Guo und Kollegen. In den untersuchten hochmalignen Glioblastomproben dieser Arbeit konnten ebenfalls große Anteile an ko-exprimierenden Zellen in den Doppelfärbungen von Nanog/Oct4, Nanog/Sox2 und Oct4/Sox2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die enge funktionelle Beziehung der Stammzellmarker Nanog, Oct4 und Sox2.

Eine Studie von Chao-Shi Niu et al. (2011) beschreibt die immunhistochemische Kombinationsfärbungen von Nanog und GFAP an Gliomschnitten. Die Studie zeigte, einen geringen Anteil an Zellen, die eine Ko-Expression für Nanog und GFAP aufwiesen. Jedoch waren die Anteile der GFAP-positiven Zellen in der Studie von Chao-Shi Niu und Kollegen in Grad IV Astrozytomen geringer im Verhältnis zum Anteil der Nanog-positiven Zellen. In dieser Arbeit wurde GFAP (saures Gliafaserprotein) zur Darstellung astrozytärer Zellen genutzt. In den Kombinationsfärbungen mit den Stammzellmarkern Oct4, Nanog und Sox2 konnten hier nur geringe Anteile ko-exprimierender Zellen detektiert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es hier nicht um astrozytäre oder um evtl. nicht differenzierte Zellen handelt. Insgesamt lag der prozentuale Anteil der GFAP-positiven Zellen in dieser Arbeit mit über 70 % sehr hoch, welches nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Chao-Shi Niu und Kollegen steht.

Die Wachstumsfraktion wurde in Doppelfärbungen mit dem Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 in Kombination mit den bekannten Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 überprüft. In der Literatur wird die Expression Ki67 bei Glioblastomenschnitten sehr variabel von niedrigen bis zu hohen Proliferationsraten von 40 % beschrieben (Zuber et al., 1988; Giangaspero et al., 1987). In den vier untersuchten Glioblastomproben lagen die prozentualen Gesamtanteile der MIB-1/Ki67 positiven Zellen im Durchschnitt zwischen 5,6%-9,0%. Interessanterweise waren die durchschnittlichen prozentualen Anteile der gemeinsam positiven Zellen der Kombinationsfärbungen mit 0,8 % - 1,9 % gering. Diese Befunde deuten somit auf die langsame Zellteilung von Zellen mit Stammzellcharakter hin, ähnlich wie es auch von den adulten Stammzellen bekannt ist.

### **4.3 Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene in Glioblastom-Zelllinien**

Die im Verlauf dieser Arbeit genannten embryonalen Stammzellmarker Nanog, Oct4, KLF4 und cMyc sowie die neuralen Stammzellmarker Sox2 und Musashi-1 wurden hinsichtlich ihrer Genexpression in den Tumorzelllinien A172, U118, U343, U373, T98G, A764 und A767 mittels realtime RT-PCR auf mRNA-Ebene analysiert.

Bereits zuvor konnten Stammzellmarker in Tumorzelllinien von Astrozytomen und anderen malignen Tumoren nachgewiesen werden. In einer Studie von Annovazzi et al. (2011) wurde in den astrozytären Tumorzelllinien 010627 und U87-MG Sox2 nachgewiesen.

Unter den sechs genannten Markern zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit eine unterschiedliche Verteilung. Nanog und KLF4 wiesen eine heterogene mRNA-Expression von einer eher niedrigen bis moderaten Expression auf. Oct4 und Musashi-1 zeigten eine insgesamt homogenere und moderate Expression. Die Expression von cMyc und Sox2 zeigte sich auch variabel, allerdings konnten hier teilweise hohe bis sehr hohe Expressionswerte detektiert werden. Sox2 zeigte die höchsten Expressionswerte und in der Zusammenschau mit den vorherigen Untersuchungen erscheint Sox2 zum wiederholten Male mit der stärksten Expression unter den untersuchten Stammzellmarkern. Bereits in der Genexpressionsanalyse der soliden Gewebeproben und in den prozentualen Anteilen der immunhistochemischen Färbungen konnten höhere Werte für Sox2 verzeichnet werden. Dies könnte zu einem an der wichtigen Bedeutung eines neuralen Stammzellmarkers liegen (Komitova et al., 2004) und zum anderen an der Aggressivität des Glioblastoms. Die Expression von Sox2 wird mit einer Korrelation eines erhöhten Malignitätsgrad beschrieben (Annovazzi et al., 2011) sowie eine wichtige Rolle in der Tumorigenität und der medikamentösen Resistenz (Song et al., 2016) zugeschrieben. Diese Merkmale sind typisch für das Glioblastom.

Schon in den 1980iger Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen Glioblastomen und cMyc untersucht (Trent et al., 1986). Die höhere Expression von cMyc in allen Tumorzelllinien in dieser Arbeit könnte ein Hinweis auf die hochgradige Malignität der Glioblastome sein. So wurde eine erhöhte Expression von cMyc bereits mit der einer vermehrten Aggressivität und einem schlechteren klinischen Outcome bei Malignomen beschrieben (Lin et al., 2012).

In dieser Untersuchung konnten wir nun eine Übersicht über die Expression verschiedener Stammzellmarker in mehreren Glioblastomzelllinien schaffen; dies wurde in bisherigen Untersuchungen nicht angestrebt. Diese Arbeiten konzentrierten sich eher auf die Untersuchung weniger Marker bzw. einzelner Tumorzelllinien.

Wir fanden in unserer Arbeit heraus, dass die Stammzellmarker von allen Glioblastomzelllinien exprimiert wurden, allerdings wies sich keine der Tumorzelllinien als herausstechend mit besonders homogener oder starker Expression für alle Marker. Jede Glioblastomzelllinie exprimierte sehr individuell die einzelnen Stammzellmarker und somit sind diese Zelllinien nur bedingt als Modell für Untersuchungen zum Tumorstammzellverhalten geeignet. Jedoch ist beschrieben, dass der Gebrauch von *Neural Stem Cell Medium* geeignet ist, Tumorstammzellen aus Gliomzelllinien zu isolieren und im undifferenzierten Zustand zu halten (Zhou et al., 2009). Durch den Einsatz des *Neural Stem Cell Mediums* besteht eventuell die Möglichkeit die Tumorstammzellen in den Glioblastomzelllinien im undifferenzierten Zustand zu stabilisieren und somit Glioblastomzelllinien eher als Modell geeignet zu machen.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Schlussfolgernd lässt sich nun sagen, dass wir mit unserer Arbeit nachweisen konnten, dass Stammzellmarker in Astrozytomen und Glioblastomen *in situ* und *in vitro* mit unterschiedlicher Intensität exprimiert werden. Die Ergebnisse der mRNA-Expression in soliden Tumorproben zeigten, dass sich die untersuchten Stammzellmarker stets finden und mit der Malignität teilweise in der Expression ansteigen; die höchsten Expressionswerte konnten für Sox2/Sox2OT beobachtet werden. Dies könnte auf eine wichtige funktionelle Rolle dieser Transkriptionsfaktoren im Tumorgeschehen hinweisen.

Hinsichtlich eines ‚Master-Stammzellmarkers‘ bzw. einer wiederkehrenden Kombination von Stammzellmarkern ergab sich in den immunhistochemischen Färbungen kein typisches Muster, anhand dessen sich eine Tumorstammzelle identifizieren ließ. Ko-Expressionen der verschiedenen Stammzellmarker konnten in unterschiedlichem Maße beobachtet werden; oft war der Anteil kleiner als der einfach positiven Zellen. Die meisten ko-exprimierenden Zellen wurden bei den Stammzellmarkern Nanog, Oct4 und Sox2 beobachtet, was ein Hinweis auf das enge Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren ist.

Die Subpopulation der Glioblastomzellen mit Stammzellcharakter zeigte eine geringe bis sehr geringe Ko-Expression des Proliferationsmarkers MIB-1/Ki67, was darauf hindeutet, dass sich diese Zellen, ähnlich wie reife Stammzellen, langsam teilen. Auch bei den Kombinationsfärbungen mit GFAP und weiteren Stammzellmarkern zeigten sich überwiegend geringe Ko-Expressionen. Dies zeigt, dass die Tumorzellen mit Stammzellmarkern einen eher geringen Differenzierungsgrad aufweisen. Die letzten beiden Beobachtungen sprechen eher dafür, dass Zellen mit Stammzellcharakter aus vorbestehenden, wenig proliferierenden Stamm- oder Vorläuferzellen entstehen könnten. Wiederum deuten die genannten Beobachtungen der uneinheitlichen und unterschiedlich starken Ko-Expressionen der verschiedenen Stammzellmarker auf eine Aktivierung dieser Faktoren hin, welche durch De-Differenzierung der Tumorzellen in unterschiedlich starkem Maß aktiviert wurden und den Tumorzellen nun Stammzeleigenschaften – jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung – verleihen.

In unterschiedlicher Intensität wurden Nanog, Oct4, Sox2, KLF4, cMyc und Musashi-1 auf mRNA-Ebene in Glioblastomzelllinien exprimiert, so dass die einzelnen Zelllinien möglicherweise als Modell für die unterschiedlich stark differenzierten/de-differenzierten Zellen im Tumor dienen könnten.

Zum Stichwort ‚Targeted Therapy‘ könnten die untersuchten Stammzellmarker in Zukunft eine Rolle als spezifische Zielstrukturen in Diagnose und Therapie bei Glioblastomen darstellen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass hierbei eine sorgfältige Auswahl oder eine Kombination von Zielstrukturen notwendig ist, um einen möglichst großen Anteil der Tumorstammzellpopulation zu treffen. Die Selbsterneuerung und Proliferation von Tumorstammzellen sind essentielle Funktionen für die Entstehung von Tumoren, vor allem aber auch für ihre Progression und die Rezidivbildung. Eine Kontrolle dieser Eigenschaften könnte sich günstig auf die Heilungschancen und somit auf die Prognose des Glioblastoms und anderer Tumorerkrankungen auswirken, jedoch fehlen hierzu bis heute entsprechende erfolgreiche Forschungsergebnisse, so dass weitere Untersuchungen in der Zukunft erforderlich sind.

## 5 Zusammenfassung

---

Die Tumorstammzellhypothese ist ein Erklärungsversuch für die Entstehung, Progression und Rezidivbildung von Tumorerkrankungen. Die Hypothese besagt, dass sich aus einer kleinen Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften neue Tochtertumorzellen entwickeln und somit der Tumor in seinem Wachstum voranschreitet. Demnach könnten Untersuchungen über die Rolle der Tumorstammzellen in Astrozytomen und Glioblastomen möglicherweise das Verständnis für die Erkrankungen und für eventuelle Therapieansätze verbessern, denn insbesondere Glioblastome weisen bei einem fehlenden kurativen Therapieansatz sowie schneller Tumorausbreitung und Rezidivbildung bis heute eine schlechte Prognose mit kurzer Überlebenszeit auf.

Der Schwerpunkt in dieser Arbeit lag darauf, die Expression verschiedener ausgewählter embryonaler und neuraler Stammzellmarker in humanen Astrozytomproben und Glioblastomzelllinien zu untersuchen und in einen vergleichenden Kontext zu setzen. Die Untersuchungen wurden auf mRNA-Ebene mittels realtime RT-PCR und auf Proteinebene mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie unter Einbezug eines allgemeinen Proliferations- und eines astrozytären Markers durchgeführt.

Die untersuchten embryonalen und neuronalen Stammzellmarker Nanog, Oct4, Sox2, KLF4 und cMyc ließen sich auf mRNA-Ebene in unterschiedlicher Expressionsstärke im Normalhirn, in Astrozytomen unterschiedlicher WHO-Grade und im Glioblastom nachweisen, wobei die Ausprägung der Expression je nach untersuchtem Marker und nach Entität sehr unterschiedlich stark ausgeprägt war. Generell war die mRNA-Expression im Normalhirn am niedrigsten und in den Tumorproben meist erhöht. Ein treppenartiger Anstieg mit der Malignität ergab sich insbesondere für Oct4 und Sox2/Sox2OT, wobei letzterer Marker die höchsten Expressionswerte in den Tumorproben aufwies.

In der immunhistochemischen Beurteilung von vier soliden Glioblastomproben konnten die Stammzellmarker Nanog, Oct4, Sox2, Musashi-1 sowie der Chemokinrezeptor CXCR4, der Proliferationsmarker MIB-1/Ki67 und der astrozytäre Marker GFAP ebenfalls als heterogen ausgeprägt beobachtet werden. Die Kombinationsfärbungen von Nanog, Oct4 und Sox2 zeigten die größten Anteile ko-exprimierender Zellen, welches die enge funktionelle Beziehung der drei Stammzellmarker unterstreicht. Allerdings ergab sich in unseren Untersuchungen keine typische Tumorstammzell-Signatur mit bestimmter wiederkehrenden Kombination von Stammzellmarkern. In den Kombinationsfärbungen von MIB-1/Ki67 mit den verschiedenen Stammzellmarkern ließ

sich erkennen, dass die Zellen, welche Stammzellmarker tragen, sich erwartungsgemäß seltener teilen. Zellen mit Stammzellcharakter stellen somit in den Tumorproben eine Subpopulation ‚ruhender‘ Zellen dar.

In allen untersuchten Glioblastomzelllinien konnten die verschiedenen Stammzellmarker mit variierender mRNA-Expression detektiert werden. Alle Tumorzelllinien zeigten heterogene Expression der unterschiedlichen Stammzellmarker und umgekehrt zeigte kein Stammzellmarker eine gleichmäßig starke Expression bei allen Tumorzelllinien. Als Modell können die Tumorzelllinien für die unterschiedlich stark differenzierten/de-differenzierten Zellen im Tumor dienen, ihre Charakteristika sollten für weiterführende Untersuchungen sorgfältig berücksichtigt werden.

Im Überblick deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Populationen der Tumorzellen mit Stammzellcharakter als sehr heterogen betrachtet werden müssen, einen einheitlichen Marker oder eine bestimmte Marker-Signatur konnte nicht identifiziert werden. Tumorzellen mit Stammzellcharakter könnten sowohl aus Tumorzellen durch De-Differenzierung wie auch aus Stammzellen entstanden sein. Die Expression von vielen Stammzellmarkern unterschiedlicher Intensität *in vitro* oder das überwiegende Vorkommen von Zellen mit einzelnen Markern und geringer in Kombination mit bestimmten Markern *in situ*, sprechen möglicherweise eher für die Entstehung aus Tumorzellen. Auf die Entstehung aus Stammzellen hingegen könnte die geringe Teilungsrate *in situ* hindeuten. Die Frage der Herkunft der Tumorstammzellen lässt sich jedoch *in situ* und *in vitro* nicht hinreichend beantworten. Unabhängig hiervon könnte die in unserer Studie beobachtete Heterogenität der Stammzellmarker jedoch im Hinblick auf zelluläre Zielstrukturen in Astrozytomen/Glioblastomen bezüglich zukünftiger Therapien und diagnostischer Methoden von Bedeutung sein.

## Literaturverzeichnis

- Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3983-3988.
- Amaral P. P., Neyt C., Wilkins S. J., Askarian-Amiri M. E., Sunkin S. M., Perkins A. C., Mattick J. S. (2009): Complex architecture and regulated expression of the Sox2 locus during vertebrate development. *RNA Journal* 15: 2013-2027.
- Annovazzi L., Mellai M., Caldera V., Valente G., Schiffer D. (2011): SOX2 Expression and Amplification in Gliomas and Glioma Cell Lines. *Cancer Genomics and Proteomics* 8: 139-147.
- 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: 16281-16286.
- Bigner S. H., Friedman H. S., Vogelstein B., Oakes W. J., Bigner D. D. (1990): Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res.* 50: 2347-2350.
- Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J., Springer T. A. (1996): The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829-833.
- Böcker W., Denk H., Heitz Ph. U., Höfler G., Kreipe H., Moch H. (2012): *Pathologie*. 5. Aufl. Elsevier Urban und Fischer, München.
- Boiani M., Eckardt S., Schöler H. R., McLaughlin K. J. (2002): Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development* 16: 1209 - 1219.
- Bonnet D., Dick J. E. (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3: 730-737.
- Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F., Johnstone S. E., Levine S. S., Zucker J. P., Guenther M. G., Kumar R. M., Murray H. L., Jenner R. G., Gifford D. K., Melton D. A., Jaenisch R., Young R. A. (2005): Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122: 947-956.
- Cao Z., Sun X., Icli B., Wara A. K., Feinberg M. W. (2010): Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116: 4404-4414.
- Cattoretti G., Becker M. H. G., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Galle J., Gerdes J. (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwaved-processed formalin-fixed paraffin sections. *The Journal of Pathology* 168: 357-363.
- Cavallaro M., Mariani J., Lancini C., Latorre E., Caccia R., Gullo F., Valotta M., DeBiasi S., Spinardi L., Ronchi A., Wanke E., Brunelli S., Favaro R., Ottolenghi S., Nicolis S. K., (2008): Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* 135: 541-557.
- 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: 643-655.

- Chen Y.-C., Hsu H.-S., Chen Y.-W., Tsai T.-H., How C.-K., Wa C.-Y., Hung S.-C., Chang Y.-L., Tsai M.-L., Lee Y.-Y., Ku H.-H., Chiou S.-H. (2008): Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *Plos one* 3: e2637.
- Chew J. L., Loh Y. H., Zhang W., Chen X., Tam W. L., Yeap L. S., Li P., Ang Y. S., Lim B., Robson P., Ng H. H. (2005): Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 25: 6031-6046.
- Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L., Wahl G. M. (2006): Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344.
- Coller H. A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E. S., Eisenmann R. N., Golub T. R. (2000): Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that Myc regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3260-3265.
- Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J., Maitland N. J. (2005): Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65: 10946-10951.
- Crump M. P., Gong J. H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J. L., Baggiolini M., Sykes B. D., Clark-Lewis I. (1997): Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The Embo Journal* 16: 6996-7007.
- Dalerba P., Dylla S. J., Park I.-K., Liu R., Wang X., Cho R. W., Hoey T., Gurney A., Huang E. H., Simeone D. M., Shelton A. A., Parmiani G., Castelli C., Clarke M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 10158-10163.
- Dalla-Favera R., Gelmann E. P., Martinotti S., Franchini G., Papas T. S., Gallo R. C., Wong-Staal F. (1982): Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6497-6501.
- De la Iglesia N., Konopka G., Lim K.-L., Nutt C. L., Bromberg J. F., Frank D. A., Mischel P. S., Louis D. N., Bonni A. (2008): Deregulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness. *The Journal of Neuroscience* 28: 5870-5878.
- Dean M., Fojo T., Bates S. (2005): Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* 5: 275-284.
- Du Z., Jia D., Liu S., Wang F., Li G., Zhang Y. (2009): Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 57: 724-733.
- Ebber J. D., Treisman D. M., Zorniak M., Kutty R. G., Clark P. A., Kuo J. S. (2010): The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14: 621-632.
- Ehtesham M., Mapara K. Y., Stevenson C. B., Thompson R. C. (2009): CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Letters* 274: 305-312.
- Elsir T., Edqvist P.-H., Carlson J., Ribom D., Bergqvist M., Ekman S., Popova S. N., Alafuzoff I., Ponten F., Nistér M., Smits A. (2014): A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: Identification of Nanog as a predictor of survival. *International Journal of Cancer* 134: 1123-1131.

- Eng L. F., Ghirnikar R. S., Lee Y. L. (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Res.* 25: 1439-1451.
- Eramo A., Lotti F., Sette G., Pillozzi 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 and Differentiation* 15: 504-514.
- Escot E., Theillet C., Lidereau R., Spyrtatos F., Champerne M. H., Gest J., Callahan R. (1986): Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4834-4838.
- Fantes J., Ragge N. K., Lynch S.-A., McGill N. I., Collin R. O., Howard-Peebles P. N., Haywards C., Vivian A. J., Williamson K., van Heyningen V., FitzPatrick D. R. (2003): Mutations in Sox2 cause anophthalmia. *Nature Genetics* 33: 462-463.
- Fong H., Hohenstein K. A., Donovan P. J. (2008): Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 1931-1938.
- Fox R. G., Lytle N. K., Jaquish D. V., Park F. D., Ito T., Bajaj J., Koechlein C. S., Zimdahl B., Yano M., Kopp J., Kritzik M., Sicklick J., Sander M., Grandgenett P. M., Hollingsworth M. A., Shibata S., Pizzo D., Valasek M., Sasik R., Scadeng M., Okano H., Kim Y., MacLeod A. R., Lowy A. M., Reya T. (2016): Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma. *Nature* 534: 407-411.
- Galderisi U., Cipollaro M., Giordano A. (2006): Stem cells and brain cancer. *Cell Death and Differentiation* 13: 5-11.
- Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C., Dimeco F., Vescovi A. (2004): Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human Glioblastoma. *Cancer Res.* 64: 7011-7021.
- Gao C., Han C., Yu Q., Guan Y., Li N., Zhou J., Tian Y., Zhang Y. (2015): Downregulation of Msi1 suppresses the growth of human colon cancer by targeting p21cip1. *Int. J. Oncol.* 46: 732-740.
- Gerdes J., Lemke H., Balsch H., Wacker H. H., Schwab U., Stein H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133:1710-1715.
- Ghaleb A. M., Nandan M. O., Chanchevalap S., Dalton W. B., Hisamuddin I. M., Yang V. W. (2005): Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res.* 15: 92-96.
- Giangaspero F., Doglioni C., Rivano M. T., Pileri S., Gerdes J., Stein H. (1987): Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathologica* 74: 179-182.
- Glazer R. I., Vo D. T., Penalva L. O. (2012): Musashi 1: a RBP with versatile functions in normal and cancer stem cells. *Frontiers in Bioscience* 17: 54-64.
- Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L. (2003): SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39: 749-765.
- Guan H., Xie L., Leithäuser F., Flossbach L., Möller P., Wirth T., Ushmorov A. (2010): KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 116: 1469-1478.

- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- Guo Y., Liu S., Wang P., Zhao S., Wang F., Bing L., Zhang Y., Ling E.-A., Gao J., Hao A. (2011): Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 59: 763-775.
- Hacke W. (2016): *Neurologie*. 14. Auflage. Springer Medizin: Berlin/ Heidelberg.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hart M. G., Garside R., Rogers G., Stein K., Grant R. (2013): Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 4: CD007415.
- Hattermann K., Held-Feindt J., Lucius R., Sebens Muerköster S., Penfold M. E., Schall T. J., Mentlein R. (2010): The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70: 3299-3308.
- He J., Zhang W., Zhou Q., Zhao., Song Y., Chai L., Li Y. (2013): Low-expression of microRNA-107 inhibits cell apoptosis in glioma by upregulation of SALL4. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45: 1962-1973.
- Hemmati H., Nakano I., Lazareff J., Mesterman-Smith M., Geschwind D. H., Bronner-Fraser M., Kornblum H. I. (2003): Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15178-15183.
- Henne-Bruns D. (2012): *Duale Reihe Chirurgie*. 4. Auflage, Georg Thieme: Stuttgart.
- Hermann P. C., Huber S. L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J. W., Guba M., Bruns C. J., Heeschen C. (2007): Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323.
- Hu W., Hofstetter W. L., Li H., Zhou Y., He Y., Pataer A., Wang L., Xie K., Swisher S. G., Fang B. (2009): Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 15: 5688-5695.
- Hufschmidt A., Lücking C. H., Rauer S., Glockner F. X. (2017): *Neurologie compact für Klinik und Praxis*. 6. Aufl. Georg Thieme: Stuttgart.
- Ignatova T. N., Kukekov V. G., Laywell E. D., Suslov O. N., Vrionis F. D., Steindler D. A. (2002): Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39: 193-206.
- Jeter C. R., Liu B., Liu X., Liu C., Calhoun-Davis T., Repass J., Zaehres H., Shen J. J., Tang D. G. (2011): Nanog promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30: 3833-3845.
- Jin X., Jin X., Jung J.-E., Beck S., Kim H. (2013): Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochemical and Biophysical Res. Communications* 433: 496-501.
- Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y., Sawamoto K., Ogawa Y., Toyama Y., Miyata T., Okano H. (2000): Musashi1: An evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* 22: 139-153.

- Kanemura Y., Mori K., Sakakibara S., Fujikawa H., Hayashi H., Nakano A., Matsumoto T., Tamura K., Imai T., Ohnishi T., Fushiki S., Nakamura Y., Yamasaki M., Okano H., Arita N. (2001): Musashi1: An evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation* 68:14-52.
- Komitova M., Eriksson P. S. (2004): Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neuroscience Letters* 369: 24-27.
- Kotake T., Saiki S., Kinouchi T., Shiku H., Nakayama E. (1990): Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Japanese Journal of Cancer Res.* 81: 1198-1201.
- Krams M., Frahm S. O., Kellner U., Mawrin C. (2013): *Kurzlehrbuch Pathologie. 2. Auflage*, Georg Thieme: Stuttgart.
- Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S. Y., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. (2005): Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology* 25: 2475-2485.
- Lagerström M. C., Schiöth H. B. (2008): Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 339-357.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648.
- Laudet V., Stehelin D., Clevers H. (1993): Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic acids Res.* 21: 2493-2501.
- Leis O., Eguirara A., Lopez-Arribillaga E., Alberdi M. J., Hernandez-Garcia S., Elorriaga K., Pandiella A., Rezola R., Martin A. G. (2012): Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 31: 1354-365.
- Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F., Simeone D. M. (2007): Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67: 1030-1037.
- Li Y., McClintick J., Zhong L., Edenberg H. J., Yoder M. C., Chan R. J. (2005): Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105: 635-637.
- Lin C. Y., Lovén J., Rahl P. B., Paranal R. M., Burge C. B., Bradner J. E., Lee T. I., Young R. A. (2012): Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151: 56-67.
- Ling G.-Q., Chen D.-B., Wang B.-Q., Lan-Shen Zhang L.-S. (2012): Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncology Letters* 4: 1264-1268.
- Little C. D., Nau M. M., Carney D. N., Gazdar A. F., Minna J. D. (1983): Amplification and expression of the c-myc in human lung cancer cell lines. *Nature* 306: 194-196.
- Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., Deimling A. von, Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Wiestler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. (2016): The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica* 131: 803-820.
- Ma J., Yao Y., Wang P., Liu Y., Zhao L., Li Z., Li Z., Xue Y. (2014): MiR-152 functions as a tumor suppressor in glioblastoma stem cells by targeting Krüppel-like factor 4. *Cancer Letters* 355: 85-95.

- Ma Y.-H., Mentlein R., Knerlich F., Kruse M. L., Mehdorn H. M., Held-Feindt J. (2008): Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *Journal of Neuro-Oncology* 86: 31-45.
- Mao X.-g., Zhang X., Xue X.-y., Guo G., Wang P., Zhang W., Fei Z., Zhen H.-n., You S.-W., Yang H. (2009): Brain tumor stem-like cells identified by neural stem cell marker CD15. *Translational Oncology* 2: 247-257.
- Marchese A. (2014): Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 27: 72-77.
- Marcu K. B., Bossone S. A., Patel A. J. (1992): Myc function and regulation. *Annual Review of Biochemistry* 61: 809-858.
- Masuhr K. F., Masuhr F., Neumann M. (2013): MLP Duale Reihe Neurologie. 7. Auflage. Georg Thieme: Stuttgart.
- Mei K., Liu A., Allan R. W., Wang P., Lane Z., Abel T. W., Wei L., Cheng H., Guo S., Peng Y., Rakheja D., Wang M., Ma J., Rodriguez M. M., Li J., Cao D. (2009): Diagnostic utility of SALL4 in primary germ cell tumors of the central nervous system: a study of 77 cases. *Modern Pathology* 22:1628-1636.
- Meng H.-M., Zheng P., Wang X.-Y., Liu C., Sui H.-M., Wu S.-J., Zhou J., Ding Y.-Q., Li J. (2010): Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy* 9: 295-302.
- 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*. Resende U., Ulrich H. (Eds.). Springer Science and Business Media: Dordrecht. 339-358.
- Middeldorp J., Hol E. M. (2011): GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93: 421-443.
- Miraglia S., Godfrey W., Yin A. H., Atkins K., Warnke R., Holden J. T., Bray R. A., Waller K., Buck D. W. (1997): A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization and molecular cloning. *Blood* 90: 5013-5021.
- 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: 631-642.
- Morrison R., Schleicher S. M., Sun Y., Kenneth J. Niermann K. J., Kim S., Spratt D. E., Christine H. Chung C. H., Lu B. (2011): Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *Journal of Oncology* 2011: 941876.
- Müller M. (2016): *Chirurgie für Studium und Praxis*. 13. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste: Breisach.
- Murphy P. M., Baggiolini M., Charo I. F., Hébert C. A., Horuk R., Matsushima K., Miller L. H., Oppenheim J. J., Power C. A. (2000): International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature of chemokine receptors. *Pharmacological Rev.* 52: 145-176.
- Nagata T., Shimada Y., Sekine S., Moriyama M., Hashimoto I., Matsui K., Okumura T., Hori T., Imura J., Tsukada K. (2017): KLF4 and Nanog are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Breas. Cancer* 24: 326-335.

- Nakamura M., Okano H., Blendy J. A., Montell C. (1994): Musashi, a neural RNA-binding protein required for drosophila adult external sensory organ development. *Neuron* 13: 67-81.
- Niu C.-S., Li D.-X., Liu Y.-H., Fu X.-M., Tang S.-F., Li J. (2011): Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cell. *Oncology Reports* 26: 593-601.
- Niwa H., Miyazaki J.-I., Smith A. G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet.* 24: 372-376.
- Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M., Hamada H. (1990): A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60: 461-472.
- 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 Res.* 306: 349-356.
- Pan G., Thomson J. A. (2007): Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17: 42-49.
- Patel N. V., Ghaleb A. M., Nandan M. O., Yang V. W. (2010): Expression of the tumor suppressor Krüppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention: A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19: 2631-2638.
- Qi X.-t., Li Y.-l., Zhang Y.-q., Xu T., Lu B., Fang L., Gao J.-g., Yu L.-s., Zhu D.-f., Yang B., He Q.-j., Ying M.-d. (2019): KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 40: 546-555.
- Reiss K., Mentlein R., Sievert J., Hartmann D. (2002): Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stemcells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 115: 295-305.
- Renz H. (2009): *Praktische Labordiagnostik*. Walter de Gruyter: Berlin.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
- Rosenbaum D. M., Rasmussen S. G., Kobilka B. K. (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.
- Sakakibara S., Imai T., Hamaguchi K., Okabe M., Aruga J., Nakajima K., Yasutomi D., Nagata T., Kurihara Y., Uesugi S., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Okano H. (1996): Mouse-Musashi-1: An neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol.* 176: 230-242.
- Schoenhals M., Kassambara A., De Vos J., Hose D., Moreaux J., Klein B. (2009): Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 157-162.
- Scholzen T., Gerdes J. (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182: 311-322.
- Segre J. A., Bauer C., Fuchs E. (1999): KLF4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics* 22: 356-360.

- Senft C., Priester M., Polacin M., Schröder K., Seifert V., Kögel D., Weissenberger J. (2011): Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* 101: 393-403.
- 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 X., Qian C. (2012): Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56: 1004-1014.
- Sheiness D., Fanshier L., Bishop J. M. (1978): Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J. Virol.* 28: 600-610.
- Sherry M. M., Reeves A., Wu J. K., Cochran B. H. (2009): STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* 27: 2383-2392.
- Shields J. M., Christy R. J., Yang V. W. (1996): Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J. Biol. Chem.* 271: 20009-20017.
- Siewert J. R., Hubert J., Stein H. J. (2012): *Chirurgie*. 9. Auflage. Springer: Berlin, Heidelberg.
- Sikora K., Chan S., Evan G., Gabra H., Markham N., Stewart J. and Watson J. (1987): C-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 59: 1289-1295.
- Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Foster J. W., Frischauf A. M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Singh A., Settleman J. (2010): EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741-4751.
- Singh S. K., Clarke I. D., Hide T., Dirks P. B. (2004): Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267-7273.
- Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J., Dirks P. B. (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63: 5821-5828.
- Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman M., Cusimano M. D., Dirks P. B. (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.
- Song W.-S., Yang Y.-P., Huang C.-S., Lu K.-H., Liu W. H., Wu W.-W., Lee Y.-Y., Lo W.-L., Lee S.-D. Chen Y.-W., Huang P.-I., Chen M.-T. (2016): Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *Journal of the Chinese Medical Assoc.* 79: 538-545.
- Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O. D., Zanella F., Reulen H. J. (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 7: 392-401.
- Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fischer B., Martin J. B., Taphoorn M. J. B., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Luwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncros J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 987-996.

- Su R., Cao S., Ma J., Liu Y., Liu X., Zheng J., Chen J., Liu L., Cai H., Li Z., Zhao L., He Q., Xue Y. (2017): Knockdown of SOX2OT inhibits the malignant biological behaviors of glioblastoma stem cells via up-regulating the expression of miR-194-5p and miR-122. *Mol. Cancer* 16: 171.
- Sun X., Cheng G., Hao M., Zheng J., Zhou X., Zhang J., Taichman R. S., Pienta K. J., Wang J. (2010): CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 29: 709-722.
- Suvà M.-L., Riggi N., Stehle J.-C., Baumer K., Tercier S., Joseph J.-M., Suvà D., Clément V., Provero P., Cironi L., Osterheld M.-C., Guillou L., Stamenkovic I. (2009): Identification of cancer stem cells in Ewing's Sarcoma. *Cancer Res.* 69: 1776-1781.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Tan B. T., Park C. Y., Ailles L. E., Weissman I. L. (2006): The cancer stem cell hypothesis: A work in progress. *Laboratory Investigation* 86: 1203-1207.
- Tanegashima K., Suzuki K., Nakayama Y., Tsuji K., Shigenaga A., Otaka A., Hara T. (2013): CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Letters* 587: 1731-1735.
- Tang H., Zhu H., Wang X., Hua L., Li J., Xie Q., Chen X., Zhang T., Gong Y. (2017): KLF4 is a tumor suppressor in anaplastic meningioma stem-like cells and human meningiomas. *Journal of Molecular Cell Biology* 9: 315-324.
- Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P. (1982): Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7837-7841.
- Teicher B. A., Fricker S. P. (2010): CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Res.* 16: 2927-2931.
- Varlakhanova N. V., Cotterman R. F., de Vries W. N., Morgan J., Donahue L. R., Murray S., Knowles B. B., Knoepfler P. S. (2010): Myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation* 80: 9-19.
- Vennstrom B., Sheiness D., Zabielski J., Bishop J. M. (1982): Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J. Virol.* 42: 773-779.
- Vo D. T., Subramaniam D., Remke M., Burton T. L., Uren P. J., Gelfond J. A., De Sousa Abreu R., Burns S. C., Qiao M., Suresh U., Korshunov A., Dubuc A. M., Northcott P. A., Smith A. D., Pfister S. M., Taylor M. D., Janga S. C., Anant S., Vogel C., Penalva L. O. F. (2012): The RNA-binding protein Musashi1 affects medulloblastoma growth via a network of cancer related genes and is an indicator of poor prognosis. *Am. J. Pathol.* 181: 1762-1772.
- Wang J., Sakariassen P. Ø., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S. O., Svendsen A., Prestegarden L., Røslund G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P. Ø. (2008): CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer* 122: 761-768.
- Wang J., Wang H., Li Z., Wu Q., Lathia J. D., McLendon R. E., Hjelmeland A. B., Rich J. N. (2008): c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* 3: e3769.

- Wang S., Cui W. (2014): Sox2, a keyfactor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of stem cells* 6: 305-311.
- Wang X.-Y., Penalva L. O., Yuan H., Linnoila R. I., Lu J., Okano H., Glazer R. I. (2010): Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Molecular Cancer* 9: 221-233.
- Weller M. (2014): Gliome. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Kommission Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Ed.) voll. überar. 5. Aufl. albertZWEI media, München.
- Wicha M. S., Liu S., Dontu G. (2006): Cancer stem cells: An old idea- a paradigm shift. *Cancer Res.* 66: 1883-1890.
- Wong R. S. Y., Bodart V., Metz M., Labrecpue J., Bridger G., Fricker S. P. (2008): Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and noncyclam molecule CXCR4 Chemokine Receptor 4 Inhibitors. *Molecular Pharmacology* 74: 1485-1495.
- Yuan X., Curtin J., Xiong Y., Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D. L., Black K. L., Yu J. S. (2004): Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23: 9392-9400.
- Zaehres H., Scholer H. R. (2007): Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell* 131: 834-835.
- Zammarchi F., Morelli M., Menicagli M., Di Cristofano C., Zavaglia K., Paolucci A., Campani D., Aretini P., Boggi U., Mosca F., Cavazzana A., Cartegni L., Bevilacqua G., Mazzanti C. M. (2011): KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma. *The American journal of pathology* 178: 361-372.
- Zappone M. V., Galli R., Catena R., Meani N., De Biasi S., Mattei E., Tiveron C., Vescovi A. L., Lovell-Badge R., Ottolenghi S., Nicolis S. K. (2000): Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* 127: 2367-2382.
- Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B. M., Becker N., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C. C. (2008): Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical Cancer Res.* 14: 123-129.
- Zhang L., Hua Q., Tang K., Shi C., Xie X., Zhang R. (2016): CXCR4 activation promotes differentiation of human embryonic stem cells to neural stem cells. *Neuroscience* 337: 88-97.
- Zhang L., Yan Y., Jiang Y., Cui Y., Zou Y., Qian J., Lu Y., Wu X. (2015): The expression of SALL4 in patients with gliomas: high level of SALL4 expression is correlated with poor outcome. *Journal of Neuro-Oncology* 121: 261-268.
- Zhang P., Andrianakos R., Yang Y., Liu C., Lu W. (2010): Krüppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *The Journal of biological chemistry* 285: 9180-9189.
- Zhang S., Cui W. (2014): Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells* 6: 305-311.

- Zheng H., Ying H., Yan H., Kimmelman A., Hiller D., Chen A.-J., Perry S. R., Tonon G., Chu G. C., Ding Z., Stommel J. M., Dunn K. L., Wiedemeyer R., You M. J., Brennan C., Wang Y. A., Ligon K. L., Wong W. H., Chin L., DePinho R. A. (2008): Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73: 427-437.
- Zuber P., Hamou M.-F., de Tribolet N. (1988): Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67; *Neurosurgery* 22: 364-368.

## **Danksagung**

Am Ende meiner Dissertation möchte ich mich bei allen jenen bedanken, die mich während der Zeit ihrer Erarbeitung unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Rolf Mentlein, dem ich das Thema dieser Dissertation verdanke, und meiner Doktormutter Frau PD Dr. Kirsten Hattermann-Koch. Beide haben mich während der ganzen Zeit geduldig, und sehr konstruktiv unterstützt. Ich wusste mich auf bestmögliche Weise begleitet und bin dankbar für viele gute Gespräche, für ein offenes Ohr bei den wissenschaftlichen Fragestellungen und für stärkende Motivierung.

Für die herausragende Hilfe und die andauernde Hilfsbereitschaft im Labor bedanke mich herzlich bei den technischen Angestellten des Anatomischen Institutes Miriam Lemmer, Martina Burmester und Judith Becker. Die Zusammenarbeit war stets eine Freude. An Judith Becker geht ein besonderer Dank für ihre zuvorkommende Hilfe bei der Laborarbeit. Darüber hinaus danke ich Clemens Franke für die Unterstützung bei der Erstellung der Grafiken und Otfried Frandsen für seine Hilfe bei diversen Computerproblemen.

Mein Dank gilt auch den Direktoren des Anatomischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Möglichkeit, meine Dissertation dort durchführen zu können.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken: Bei meinem Mann und meinen Kindern dafür, dass sie mir den Raum gegeben und manches Mal auf mich verzichtet haben, bei meinen Eltern für ihr ausgiebiges Interesse und ihre Unterstützung, bei meinen Freundinnen Carola Drews, Meike Heinze und vor allem Uta Gabriel sowie Aenne Claußen für ihre beständige Ermunterung und Hilfe.

## **Publikation**

### Originalartikel

Hattermann K., Flüh C., Engel D., Mehdorn H. M., Synowitz M., Mentlein R., Held-Feindt J. (2016): Stem cell markers in glioma progression and recurrence. Int. J. Oncol. 49: 1899-1910.