

Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock

Ernst- Heydemann- Straße 8

18057 Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Radke

**DIE UMWANDLUNG DIFFERENZIERTER  
GLIOBLASTOMA MULTIFORME-ZELLEN IN  
STAMMZELLÄHNLICHE ZELLEN UNTER  
TEMOZOLOMID-THERAPIE *IN VITRO***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin** der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Madlin Walther | geb. am 02. August 1992 in Oelsnitz/Vogtl.

aus Adorf/Vogtl.

Rostock | 04. Oktober 2017

**Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Reisinger**

**Gutachter:**

Herr Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen, Universität Rostock, Kinder- und Jugendklinik

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Universität Rostock; Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Herr Prof. Dr. med. David Capper, Charité Berlin, Institut für Neuropathologie

**Jahr der Einreichung: 2017**

**Jahr der Verteidigung: 2018**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Symbolverzeichnis und Maßeinheiten.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Glioblastoma multiforme .....	1
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.1.2. Klinik.....	2
1.1.3. Diagnostik.....	2
1.1.4. Neuro- und Histopathologie .....	3
1.1.5. Therapie und Prognose .....	3
1.2. Die zelluläre Vielfalt bei Glioblastoma multiforme .....	6
1.2.1. Die Entwicklung der Tumorstammzell-Hypothese .....	6
1.2.1.1. Hierarchisches Modell eines Tumors .....	6
1.2.1.2. Stochastisches Modell eines Tumors.....	9
1.2.2. „Stammzell-Nische“ .....	11
1.2.3. Die Bedeutung der stammzellähnlichen Zellen beim Glioblastoma .....	14
1.3. Resistenzentwicklung bei Glioblastoma multiforme .....	15
1.3.1. Radioresistenz.....	15
1.3.2. Temozolomid-Resistenz .....	15
1.3.2.1. Resistenzentwicklung durch intrinsische Faktoren.....	15
1.3.2.2. Resistenzentwicklung durch extrinsische Faktoren .....	17
1.3.2.3. Resistenzentwicklung durch den Verlust der Zellhierarchie .....	17
1.3.3. Umwandlung der differenzierten Tumorzellen unter Chemotherapie.....	18
1.4. Zielgerichtete Therapie für stammzellähnliche Tumorzellen .....	19

1.4.1. Funktion der Mitochondrien in Tumorzellen.....	19
1.4.1.1. Mitochondrien .....	19
1.4.1.2. Die Veränderung der Mitochondrien in Tumorzellen.....	20
1.4.2. Wirkung von Doxyzyklin auf Glioblastoma multiforme .....	21
1.4.2.1. Doxyzyklin .....	21
1.4.2.2. Suppression der stammzellähnlichen Zellen durch Doxyzyklin.....	21
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1. Material .....	25
3.1.1. Geräte .....	25
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3. Chemikalien und Zusätze .....	26
3.1.4. Medien und Lösungen .....	27
3.1.5. Agar für Soft-Agar Assay .....	28
3.1.6. Antikörper .....	28
3.1.7. Medikamente .....	28
3.1.8. Zelllinien .....	29
3.1.9. Software .....	30
3.2. Methoden .....	31
3.2.1. Zellkultur.....	31
3.2.2. Kryokonservierung von Zelllinien.....	32
3.2.3. Bestimmung der Chemosensitivität .....	32
3.2.3.1. Calcein AM Assay .....	34
3.2.4. Soft-Agar Assay.....	34
3.2.5. Immunfluoreszenzmikroskopie .....	35
3.2.6. Statistische Auswertung .....	36

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1. Morphologische Unterschiede der differenzierten Zellen und deren stammzellähnlichen Zellen von 4 Primärzelllinien .....	37
4.2. <i>In vitro</i> Tumorigenität der 4 Glioblastom-Primärzelllinien .....	38
4.3. Umwandlung der differenzierten Tumorzellen in einen Tumorstammzell-ähnlichen Phänotyp durch die Behandlung mit Temozolomid .....	40
4.3.1. Sensitivität gegenüber Temozolomid <i>in vitro</i> .....	40
4.3.2. <i>In vitro</i> Tumorigenität der differenzierten Tumorzellen nach Behandlung mit Temozolomid .....	42
4.3.3. Die phänotypische Veränderung der differenzierten Tumorzellen unter Temozolomid-Behandlung .....	44
4.4. Die Suppression der Temozolomid-induzierten Tumorigenität durch Doxyzyklin <i>in</i> <i>vitro</i> .....	49
4.4.1. Sensitivität gegenüber Doxyzyklin <i>in vitro</i> .....	49
4.4.2. <i>In vitro</i> Tumorigenität der differenzierten Tumorzellen nach Behandlung mit Temozolomid, Doxyzyklin und einer Kombination der Medikamente .	51
4.4.3. Zeitverläufe unterschiedlicher Behandlungsvarianten <i>in vitro</i> .....	54
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
<b>6. Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	<b>68</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Thesen</b> .....	<b>XXVI</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>XXVIII</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XXIX</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>XXXI</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hierarchisches Modell eines Tumors .....	7
Abb. 2: Therapieschema nach Reya <i>et al.</i> .....	8
Abb. 3: Stochastisches Modell eines Tumors .....	9
Abb. 4: Die Mikroumgebung eines Tumors und deren Effekt .....	11
Abb. 5: Die molekulare und zelluläre Grundlage zwischen CSCs und deren „Stammzell-Nische“ .....	13
Abb. 6: Wirkung von TMZ auf die DNA.....	16
Abb. 7: Strukturelle Darstellung von Dox.....	21
Abb. 8: Versuchsaufbau Chemosensibilitätsbestimmung .....	32
Abb. 9: Versuchsaufbau Soft-Agar Assay .....	35
Abb. 10: Morphologischer Unterschied der DCs und CSCs von 4 GBM Primärzelllinien.....	37
Abb. 11: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der <i>in vitro</i> Tumorigenität .....	39
Abb. 12: Chemosensibilität gegenüber TMZ.....	41
Abb. 13: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der <i>in vitro</i> Tumorigenität nach TMZ-Behandlung.....	43
Abb. 14: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG06 .....	45
Abb. 15: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG10 .....	46
Abb. 16: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG36 .....	47

Abb. 17: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG38 .....	48
Abb. 18: Chemosensibilisierung gegenüber Dox.....	50
Abb. 19: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der <i>in vitro</i> Tumorigenität der DCs nach TMZ-Behandlung, Dox-Behandlung und einer Kombination beider Medikamente .....	51
Abb. 20: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der <i>in vitro</i> Tumorigenität der DCs nach TMZ-Behandlung, Dox-Behandlung und einer Kombination beider Medikamente im zeitlichen Verlauf von 5d.....	51

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte .....	25
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tab. 3: Chemikalien und Zusätze .....	26
Tab. 4: Medien und Lösungen .....	27
Tab. 5: Agar für Soft-Agar Assay .....	28
Tab. 6: Antikörper .....	28
Tab. 7: Medikamente .....	28
Tab. 8: Klinische und zelluläre Charakteristika der 4 GBM-Primärzelllinien .....	29
Tab. 9: Software .....	30
Tab. 10: Verdünnungsreihe für TMZ.....	33
Tab. 11: Verdünnungsreihe für Dox.....	33
Tab. 12: IC50-Werte der DCs und CSCs von 4 GBM-Zelllinien nach Chemosensibilisierung mit TMZ .....	41
Tab. 13: IC50-Werte der DCs und CSCs von 4 GBM-Zelllinien nach Chemo- sensibilisierung mit Dox .....	50

## Symbolverzeichnis und Maßeinheiten

&	und
%	Prozent
+	positiv
-	negativ
±	Plus oder Minus
~	ungefähr gleich
<	kleiner als
>	größer als
°	Grad
°C	Grad Celsius
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
d	Tage
Gy	Gray
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar

nm	Nanometer
pH	pondus Hydrogenii
s	Sekunde
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ATP	Adenosintriphosphat
ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter
BER	Base-Excision-Repair
bFGF	Basic-Fibroblast-Growth-Factor
BMI	Body-Mass-Index
Bmi1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CAFs	Krebs-assoziierte Fibroblasten
cCT	craniale Computertomographie
CD15	3-Fucosyl-N-acetyl-Laktosamin
CD133	Prominin-1
CD133+	CD133-Expression positiv
CD133-	CD133-Expression negativ
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSCs	Cancer-Stem-like-Cells
Cy	Cyanin-Farbstoff

CXCL12	Stroma cell- derived Factor 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DCs	Differentiated Cells
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DE	Deutschland
dentCs	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
Dr.	Doktor
ECs	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
<i>et al.</i>	et alii / aliae
etc.	et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
f	femininum
FGFR	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FSK	Fetales Kälberserum

G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
GBM	Glioblastoma multiforme
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGF	Hepatocyte-Growth-Factor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ID	Identifikation
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
insg.	insgesamt
L	links
LK	Lebendkontrolle
m	masculinum
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDR	Multidrug-Resistance-Protein
MDSCs	Myeloid-abgeleitete Suppressorzellen
med.	medicinae
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MMR	Mismatch-Repair-System

MRP	Multidrug-Resistance-Related Proteine
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCs	mesenchymale Stammzellen
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MTIC	3-Methyl-(triazen-1-y)imidazole-4-carboxamide
mtPTP	Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore
MÜZ	Mittlere Überlebenszeit
N3-MetA	N3-Methyladenin
N7-MetG	N7-Methylguanin
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Prof.	Professor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	rechts
rer. nat.	rerum naturalium
rhEGF	Recombinant Human-Epidermal-Growth-Factor

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Sox2	sex determining region Y – box2
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TANs	Tumor-assoziierte Neutrophilen
Tab.	Tabelle
TGF- $\alpha$	Transforming-Growth-Factor-alpha
TGF- $\beta$	Transforming-Growth-Factor-beta
TK	Todkontrolle
TMZ	Temozolomid
TNC	Tenacin-C
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
Tp53	Tumorsuppressor p53
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
u.v.m.	und vieles mehr
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1. Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und aggressivste primäre Hirntumor im Erwachsenenalter.<sup>1,2</sup> GBM gehört zu der Gruppe der Gliome und wird nach der WHO-Klassifikation aufgrund seiner Morphologie, Histologie und Malignität dem höchsten Grad IV zugeordnet.<sup>3</sup> Die mittlere Überlebenszeit (MÜZ) beträgt bei standardmäßiger Behandlung ca. 15 Monate<sup>4</sup> und ist unter anderem abhängig von dem Alter des Patienten, der Lokalisation und der Histologie des Tumors.<sup>3</sup> GBM zeigen eine stark ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität, wodurch die Therapie deutlich erschwert wird.<sup>5</sup>

### 1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie von Glioblastoma multiforme

Jährlich erkranken in Europa 3,55 Erwachsene pro 100.000 Einwohner an GBM. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt  $62,2 \pm 13,4$  Jahre, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Verhältnis 1,34:1).<sup>6</sup> Die Inzidenzrate im Kindesalter ist deutlich niedriger und geht mit einer besseren Prognose einher.<sup>7</sup>

Die Ursachen für die Entstehung von GBM sind noch nicht umfassend geklärt. Der hirneigene Tumor tritt meist sporadisch auf, zeigt allerdings in 1% der Fälle eine familiäre Häufung.<sup>8,9</sup> Ein GBM kann auch im Zusammenhang mit genetisch bedingten Erkrankungen diagnostiziert werden. So wurde ein gehäuftes Auftreten des malignen Hirntumors bei der Tuberösen Sklerose<sup>10</sup>, dem Turcot-Syndrom<sup>11</sup>, der Neurofibromatose Typ I<sup>12</sup>, sowie in Fällen der Multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Typ IIA<sup>13</sup> festgestellt. Außerdem können GBM durch verschiedene Störungen in den Gliazellen hervorgerufen werden. Neben dem Verlust von genetischem Material innerhalb des Chromosoms 10q können auch Amplifikationen in EGFR, FGFR2 oder Mutationen in PTEN und Tp53 Faktoren für die Entstehung des Tumors sein.<sup>14,15</sup> Des Weiteren spekuliert man über Risikofaktoren wie erhöhtem BMI<sup>16</sup> oder vorangegangene Infektionen mit dem humanen Cytomegalievirus.<sup>17</sup> Letztendlich ist die genaue Ursache jedoch unbekannt.<sup>9</sup>

### **1.1.2. Klinik**

Die Symptomausprägung hängt stark von der Progression und der Lokalisation des Tumors ab. Zu Beginn der Tumorentstehung zeigen sich meist keine klinischen Manifestationen, diese können aber durch permanentes Wachstum des Tumors und eine daraus folgende kraniale Druckerhöhung zum Vorschein kommen.<sup>18</sup> GBM sind typischerweise im Frontal- und Parietallappen beider Hemisphären, sowie im Balken lokalisiert.<sup>19</sup> Dies führt dazu, dass Betroffene unter Persönlichkeitsveränderungen und progressiven Defiziten der Gedächtnisleistung leiden können. Neben Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Hemiparesen sind epileptische Anfälle häufige Erstsymptome.<sup>20</sup> Je nach Lokalisation können auch Sehstörungen oder Aphasien auftreten. Besonders durch das tumorangrenzende Ödem zeigen sich in späteren Stadien Hirndruckzeichen wie Stauungspapille, Somnolenz und Koma. Diese Symptome gelten als prognostisch ungünstig.<sup>18</sup>

### **1.1.3. Diagnostik**

Bei Verdacht auf eine intrakranielle Raumforderung ist nach genauer klinischer neurologischer Untersuchung eine Bildgebung indiziert. Die Magnetresonanztomografie (MRT) und die kraniale Computertomografie (cCT) mit intravenöser Kontrastmittel-Gabe sind hierbei die diagnostischen Mittel der Wahl.<sup>21</sup> Im MRT und cCT stellt sich ein GBM als eine inhomogene intrakranielle Neoplasie dar, die oft Einblutungen, Zysten und Nekrosen zeigt. Die vitalen Tumoranteile weisen eine starke Kontrastmittel-Anreicherung auf, die sich, typisch für GBM, ringförmig ausdehnt (ringförmiges Enhancement). In der T2-gewichteten Sequenz des MRTs kann außerdem das an den Tumor angrenzende Ödem gut dargestellt werden. GBM präsentieren sich angiografisch durch starke Neovaskularisationen mit arterio-venösen Kurzschlüssen und sinusoidalen Gefäßektasien.<sup>21-23</sup> Um die Verdachtsdiagnose jedoch zu bestätigen und den Tumor von anderen malignen Prozessen abzugrenzen, bedarf es einer histologischen Diagnostik. Das dafür notwendige Tumormaterial kann mittels stereotaktischer Biopsie oder einer Kraniotomie mit Tumorresektion gewonnen werden.<sup>24</sup> GBM metastasieren selten ins ZNS, zeichnen sich jedoch durch ein infiltratives Wachstum aus. Fernmetastasen stellen eine Rarität dar.<sup>25</sup>

#### **1.1.4. Neuro- und Histopathologie**

GBM bilden nach der WHO-Klassifikation mit weiteren Hirntumoren die Einheit der neuroepithelialen Tumoren und gehören zu der Gruppe der Gliome.<sup>20</sup> Diese werden je nach dem Ursprungsgewebe in astrozytäre, oligodendrozytäre und ependymale Gliome sowie Mischformen hieraus unterteilt. GBM werden den astrozytären und primären Gliomen zugeordnet.<sup>20,23</sup> Primäre Glioblastome stammen histologisch von Gliazellen bzw. deren Vorläuferzellen, den Glioblasten ab. Sie bilden mit über 90% aller Glioblastome die deutliche Mehrheit. Die restlichen 10% stammen von niedrigeren malignen Gliomen ab und zählen somit zu den sekundären Glioblastome.<sup>6,26</sup>

Eine weitere Subklassifizierung der Gliome erfolgt nach dem Malignitätsgrad. Die niedrigmalignen Gliome (WHO Grad I und II) und die anaplastische Form (WHO Grad III) müssen von dem hochmalignen GBM (WHO Grad IV) abgegrenzt werden.<sup>27</sup> Das wesentliche histologische Unterscheidungskriterium von GBM zu einem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) stellt die flächenhafte Tumornekrose dar. Die sogenannte „bunte Schnittfläche“, die durch Blutungen, Nekrosen, Zysten und Tumorzerfallshöhlen entsteht, gibt dem GBM seinen Namen.<sup>23</sup> Charakteristischerweise zeigt dieser maligne Hirntumor starke Kern- und Zellpleomorphien, eine mikrovaskuläre Proliferation (glomerulumartige Gefäßknäuel), ein ausgeprägtes Ödem, sichelförmige Nekrosen und eine erhöhte Mitose- und Proliferationsrate.<sup>28</sup>

#### **1.1.5. Therapie und Prognose**

Nach ausgiebiger Diagnostik wird eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors angestrebt. Um die Chancen zu erhöhen, initial möglichst viel Tumormasse zu entfernen, kann der Tumor intraoperativ durch eine Fluoreszenzdarstellung mit 5-Aminolävulinsäure visualisiert werden.<sup>29</sup> Im Großteil der Fälle verbleibt jedoch intrazerebral Tumorrestgewebe, da die entarteten Gliazellen ein stark invasives Wachstum aufweisen.<sup>30</sup>

Um die MÜZ der Betroffenen zu verlängern, folgen anschließend an die operative Behandlung eine Radio- und Chemotherapie.<sup>31,32</sup> Die Standardtherapie bei GBM ist eine externe konventionell fraktionierte lokale Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 50 - 60Gy.<sup>33</sup> Diese wird in Tagesdosen von 1,8 - 2,0Gy aufgeteilt und in einem Zeitraum von 6 - 7 Wochen, 5 Tage (d) pro Woche appliziert.<sup>33</sup> Spätfolgen der Strahlentherapie

können aufgrund der kurzen Überlebenszeit der Betroffenen üblicherweise vernachlässigt werden. Jedoch können (sub-)akute Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und Übelkeit sowie selten Enzephalopathie oder Hirnatrophie auftreten.<sup>34</sup>

Das Standardchemotherapeutikum zur Behandlung von neu aufgetretenen GBM ist das alkylierende Zytostatikum Temozolomid (Temodal®).<sup>32</sup> In einer schmalen, leicht alkalischen pH-Spanne bildet das als Prodrug aufgenommene Temozolomid (TMZ) rasch das alkylierende 3-Methyl-(triazen-1-y)imidazole-4-carboxamide (MTIC). MTIC kann durch DNA-Methylierung eine Hemmung des Zellzyklus mit konsekutiver Apoptose induzieren.<sup>35</sup> Dabei werden bevorzugt die Basen N3-Adenin, N7-Guanin sowie O6-Guanin methyliert.<sup>36</sup>

Das Zytostatikum passiert die Blut-Hirn-Schranke und verteilt sich anschließend im Hirngewebe und Liquor.<sup>37</sup> Da der Hirntumor im Vergleich zu dem gesunden angrenzenden Gewebe leicht höhere pH-Werte aufweist, wirkt TMZ bevorzugt auf diese maligne Zellen.<sup>38,39</sup>

TMZ wird simultan mit der Radiotherapie oral oder intravenös verabreicht, um die Strahlensensibilität zu erhöhen.<sup>32</sup> Dadurch kann die MÜZ der GBM-Patienten erhöht werden.<sup>32</sup> Nach abschließender Radiochemotherapie wird die TMZ-Behandlung für 6 Zyklen adjuvant weitergeführt.<sup>32,40</sup> Dieses Schema wurde in der Publikation von Stupp *et al.* 2005 eingeführt und gilt bis heute als Goldstandard.<sup>32</sup>

TMZ ist grundsätzlich ein recht gut verträgliches Chemotherapeutikum, kann allerdings unter anderem zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Übelkeit, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Panzytopenie und gehäuftem Neuauftreten von Hepatitis-B-Infektionen führen.<sup>40</sup>

Trotz multimodaler Therapie besteht noch immer eine schlechte Prognose bei GBM-Patienten (MÜZ ~ 15 Monate).<sup>4</sup> Die Bestrebungen sind demnach groß, neue wirksamere Therapieansätze zu entwickeln. Ein Augenmerk liegt dabei besonders auf der durch Antikörper oder niedermolekulare Inhibitoren gezielten Hemmung von hochregulierten Signalwegen bzw. deren Komponenten bei GBM. So zeigten vorangegangene Studien erste Erfolge bei der Hemmung der Angiogenese durch

Inhibierung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch bestimmte Antikörper (z.B. Bevacizumab).<sup>41</sup>

Zudem wurden weitere Signalwege identifiziert, die bei GBM häufig dereguliert sind (z.B. mTOR, EGFR, MAPK) und sich daher als Ziel einer therapeutischen Intervention eignen können.<sup>42–44</sup>

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Entwicklung von Immuntherapien, wie Vakzinierungen mit dendritischen Zellen (dentCs). Dabei soll das Immunsystem des Patienten dazu stimuliert werden, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren.<sup>45</sup> Darüber hinaus gibt es Studien zur GBM-Therapie mit onkolytischen Viren, welche gezielt Tumorzellen infizieren und eliminieren, während das gesunde umliegende Hirngewebe nicht beeinträchtigt wird.<sup>46</sup>

## **1.2. Die zelluläre Vielfalt bei Glioblastoma multiforme**

GBM zeichnen sich besonders durch ein hohes Maß an phänotypischer, morphologischer und zellulärer Heterogenität aus, die das Fortschreiten der Krankheit, die therapeutische Wirksamkeit der Behandlungen und somit die MÜZ der GBM-Patienten beeinflussen.<sup>15,47,48</sup> Neben der genetischen Vielfalt und der unterschiedlichen Morphologie der Tumorzellen trägt die Mikroumgebung der Zellen zu der Tumorerogenität bei.<sup>30,47</sup> Man geht davon aus, dass GBM und andere Tumoren aus verschiedenen Subpopulationen funktionell ungleicher Zellen bestehen. So kann ein Tumor grob in undifferenzierte stammzellähnliche Zellen (cancer stem-like cells; CSCs), Vorläuferzellen und ausdifferenzierte Tumorzellen (differentiated cells; DCs) unterteilt werden.<sup>49</sup> Während die CSCs für die Malignität, die Tumorprogression und die Therapieresistenz verantwortlich zu sein scheinen, bilden die DCs den großen Anteil des schnell wachsenden Tumorgewebes.<sup>50–52</sup> Die Eigenschaften der Vorläuferzellen ähneln eher denen der CSCs.<sup>53</sup>

Die unterschiedlichen Zelltypen eines Tumors können theoretisch einer hierarchischen Rangordnung unterliegen oder nach einem stochastischen Modell agieren.<sup>53</sup>

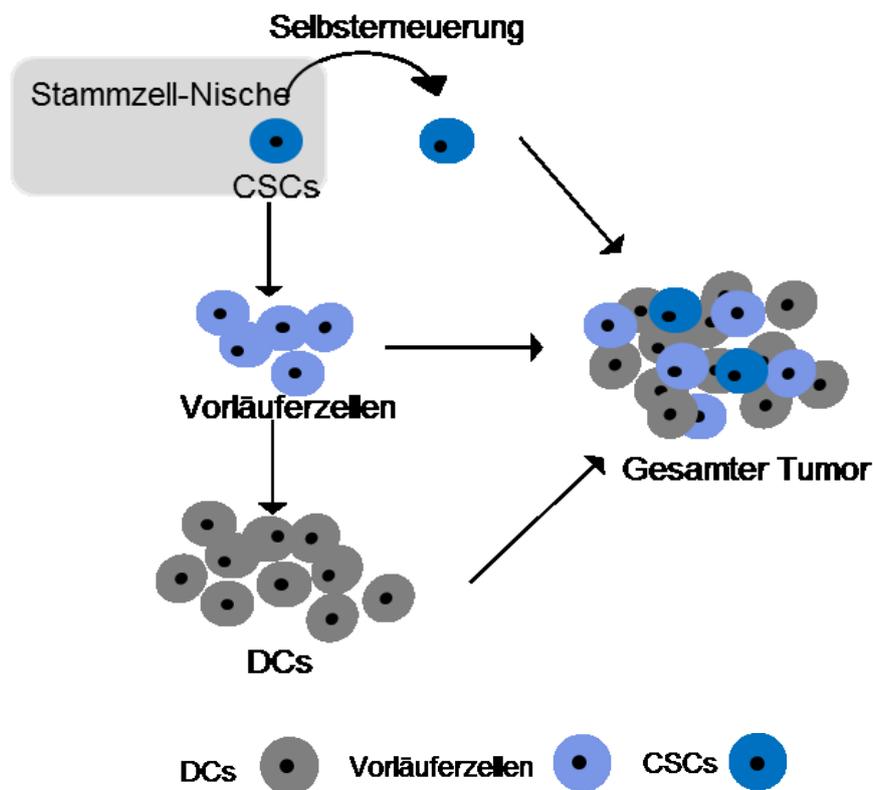
### **1.2.1. Die Entwicklung der Tumorstammzell-Hypothese**

In der Tumorstammzell-Hypothese werden die unterschiedlichen Subpopulationen eines Tumors anhand verschiedener Modelle genauer charakterisiert. Im Laufe der Zeit hat sich die einst von Reya *et al.* aufgestellte Theorie eines streng hierarchischen Tumormodells als eine zu grobe Vereinfachung der Zellinteraktionen herauskristallisiert. So scheinen nun nicht die einzelnen Subpopulationen an sich die entscheidende Rolle zur Charakterisierung der Zellinteraktionen eines Tumors zu spielen, sondern die Eigenschaften der verschiedenen Zellen selbst.<sup>54,55</sup>

#### **1.2.1.1. Hierarchisches Modell eines Tumors**

In dem von Reya *et al.* aufgestellten Tumormodell unterliegen die verschiedenen Zelltypen einer streng hierarchischen Ordnung.<sup>53</sup> Die undifferenzierten CSCs stellen einen kleinen Teil des Gesamttumors dar und weisen ähnliche Eigenschaften wie hämatopoetische Stammzellen auf. Sie zeigen eine asymmetrische Zellteilung und ein potentiell unendliches Wachstum.<sup>31,49,56</sup> Die CSCs gelten als die „initialen Zellen der Tumorgenese“ und stehen an der Spitze der Hierarchie. Sie können sich selbst ständig

erneuern und weiter differenzieren, während alle anderen Zellen einer klonalen Erschöpfung unterliegen (Abb. 1).<sup>55</sup> Über Vorläuferzellen entsteht aus den CSCs die große Masse der DCs. Die genauen Zwischenschritte sind weitestgehend unbekannt.<sup>49,57</sup> Die CSCs haben die Fähigkeit, das gesunde Gewebe zu infiltrieren und somit die lokale Tumorausbreitung und Metastasierung voranzutreiben.<sup>30</sup> Außerdem weisen CSCs im Vergleich zu DCs eine höhere Radio- und Chemoresistenz auf.<sup>49</sup> DCs zeigen dagegen eine höhere Proliferationsrate und sind für die permanente Größenzunahme des Tumors mitverantwortlich.<sup>31</sup>

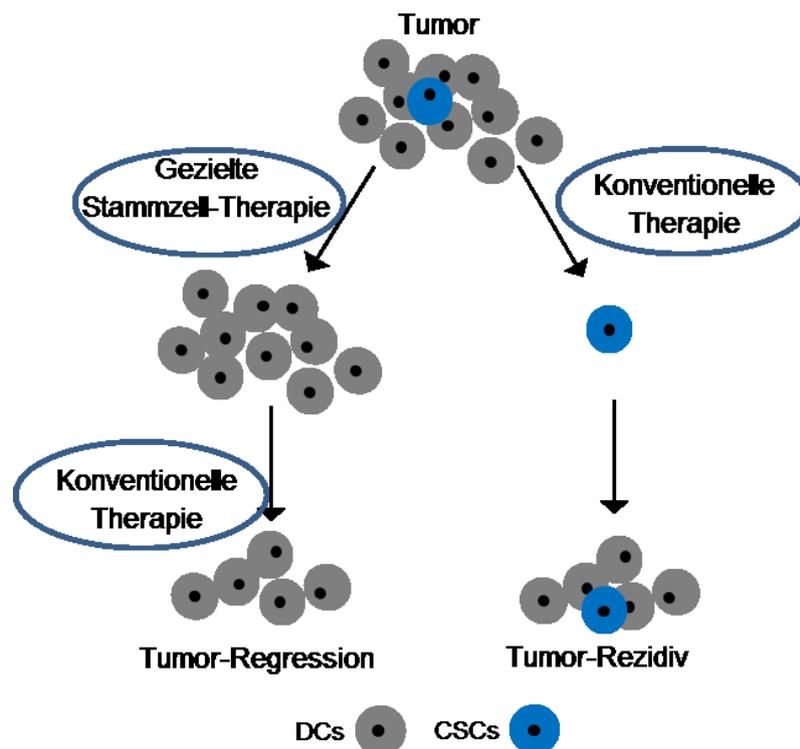


**Abb. 1: Hierarchisches Modell eines Tumors**

Eigene Darstellung in Anlehnung an Reya *et al.*, 2001<sup>49</sup>

Durch die Selbsterneuerung und Differenzierung der CSCs bildet sich der gesamte Tumor bestehend aus den einzelnen Subpopulationen.

Reya *et al.* beschrieben bereits 2001, dass durch die Behandlung eines Tumors mit konventioneller Radio- und Chemotherapie hauptsächlich die chemo- und radiosensible Subpopulation der DCs angegriffen wird, wohingegen CSCs überleben.<sup>49,58</sup> Die CSCs können somit zu einer erneuten Tumorprogression bzw. zu einem Tumorrezidiv führen.<sup>59,60</sup> Der Grundgedanke der Stammzell-Hypothese von Reya *et al.* beruht darauf, Therapieoptionen zu finden, die speziell auf CSCs zielen. Dadurch soll die Entstehung eines Rezidivs verhindert und eine Regression des Tumors erreicht werden (Abb. 2).<sup>49</sup>



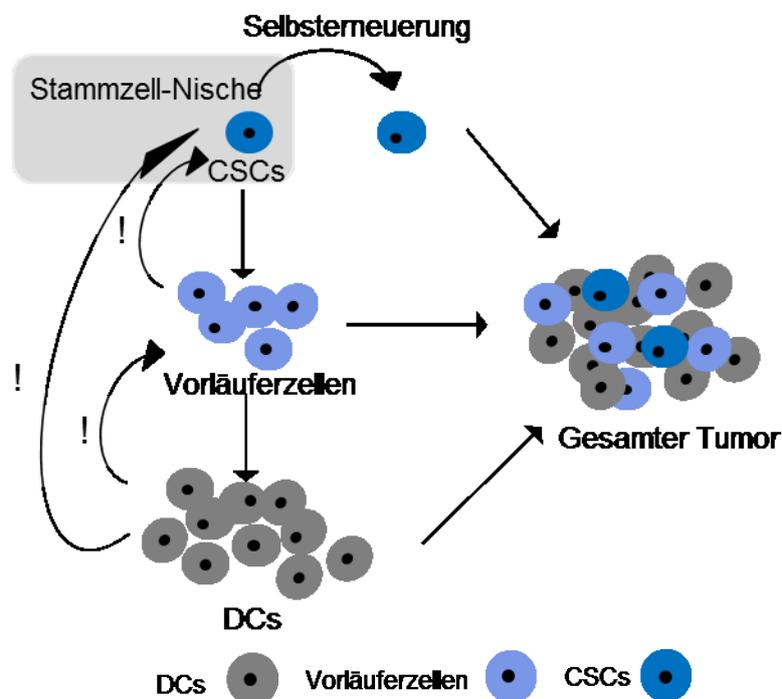
**Abb. 2: Therapieschema nach Reya *et al.***

Eigene Darstellung in Anlehnung an Reya *et al.*, 2001<sup>49</sup>

Durch den Einsatz von zielgerichteter Stammzell-Therapie wird im Vergleich zur alleinigen konventionellen Therapie eine Tumor-Regression postuliert.

### 1.2.1.2. Stochastisches Modell eines Tumors

Ca. 10 Jahre später wurden die Kenntnisse über die Tumorstammzell-Hypothese erweitert und das hierarchische Modell in Frage gestellt. Nach wie vor kann davon ausgegangen werden, dass ein Tumor aus mehreren funktional und phänotypisch unterschiedlichen Zellen besteht. Diese agieren aber nicht wie beschrieben nach einer hierarchischen Ordnung, sondern scheinen vielmehr von bestimmten Umgebungsfaktoren abhängig zu sein.<sup>64,65</sup>



**Abb. 3: Stochastisches Modell eines Tumors**

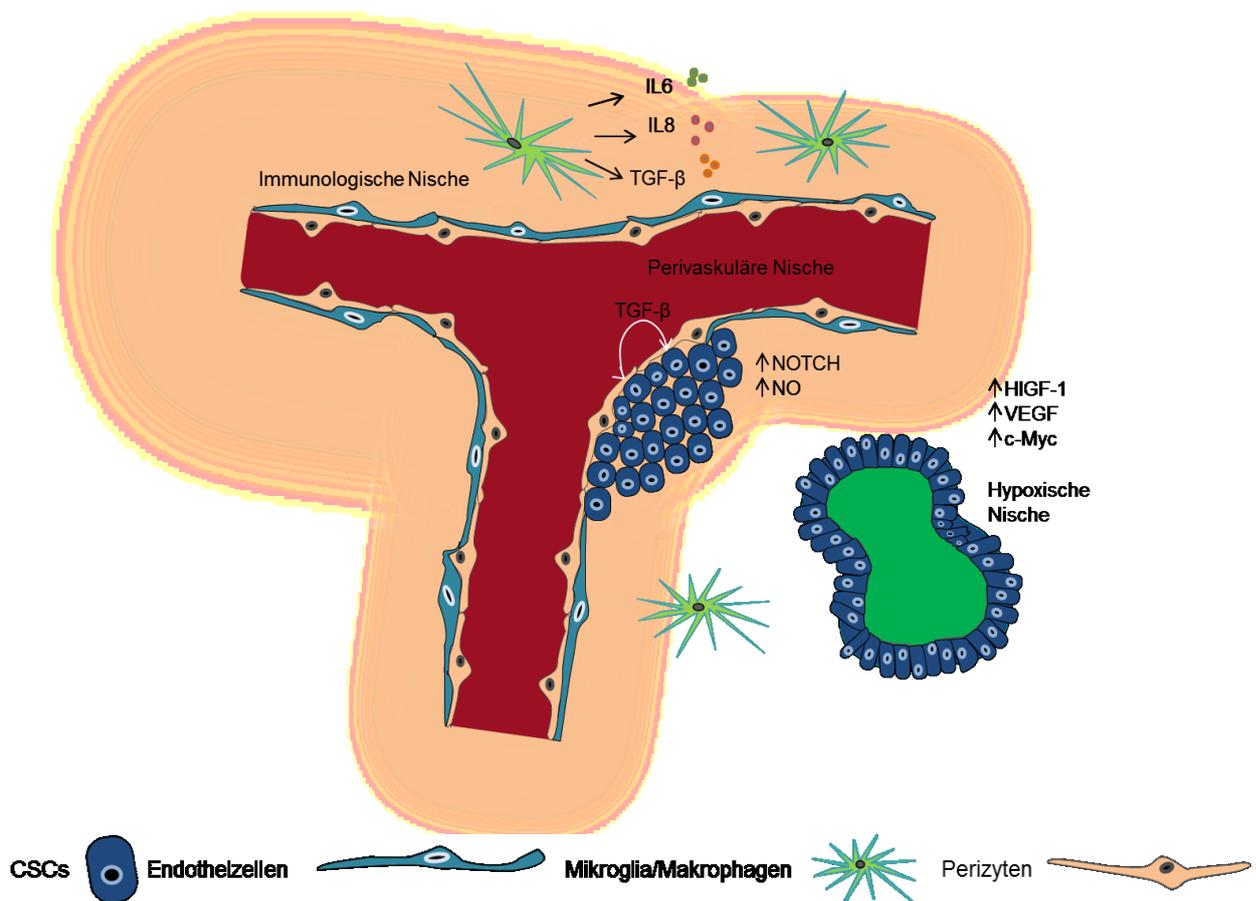
Eigene Darstellung in Anlehnung an Stopschinski *et al.*, 2013<sup>55</sup>

Jede Subpopulation kann sich unter bestimmten Umständen (!) in andere Subpopulationen umwandeln bzw. sich entdifferenzieren. Um die CSCs befindet sich die „Stammzell-Nische“ (grauer Kasten), die die Eigenschaften der CSCs verstärkt bzw. aktiviert.

Es wird postuliert, dass Tumorzellen durch Mutationen in gesunden Zellen entstehen, die folglich zu einem großen Tumor heranwachsen können.<sup>61,62</sup> Alle Zellen scheinen dazu befähigt zu sein, durch bestimmte Aktivierungsfaktoren (z.B. „Stammzell-Nische“) Stammzelleigenschaften (Selbsterneuerung, Tumorinduktion, Therapie-Resistenz) anzunehmen und die Tumorentstehung zu initiieren.<sup>61,63</sup> Verglichen mit dem hierarchischen Modell gehen auch hier aus den „initialen Zellen der Tumorgenese“ Vorläufer- und differenzierte Tumorzellen hervor.<sup>53</sup> In beiden Modellen weisen DCs zwar die gleichen Eigenschaften auf, jedoch setzt das stochastische Modell voraus, dass sich DCs verändern und dadurch ebenfalls zur Tumorentstehung beitragen können. Unter bestimmten Umständen, wie Hypoxie, Chemotherapie-induziertem Stress, Veränderung der Mikroumgebung u.v.m., scheinen sie in der Lage zu sein, durch Entdifferenzierungsschritte Stammzellcharakter anzunehmen (Abb. 3).<sup>54,64,65</sup> Alle Zelltypen können ineinander konvertieren, ohne dabei einer Hierarchie zu unterliegen.<sup>65,66</sup> Zudem scheint ein Tumor aus mehreren funktional verschiedenen CSC-Subpopulationen zu bestehen, die ebenfalls ineinander konvertieren können.<sup>52,67</sup> Diesen Erkenntnissen nach nimmt die inter- und intratumorale Heterogenität deutlich zu, wodurch die Suche nach gezielten Therapieverfahren noch weiter erschwert wird.<sup>64,65</sup>

### 1.2.1. „Stammzell-Nische“

Die Heterogenität in GBM ist nicht nur Folge genetischer und epigenetischer Veränderungen, sondern auch durch die verschiedenen Mikroumgebungen in unterschiedlichen Regionen des Tumors beeinflusst. So sorgt die „Stammzell-Nische“ (zusammengesetzt aus der hypoxischen, immunologischen und perivaskulären Nische) in GBM für das Aufrechterhalten bzw. Neuerwerben der Stammzeleigenschaften.<sup>68,69</sup>



**Abb. 4: Die Mikroumgebung eines Tumors und deren Effekt**

Eigene Darstellung in Anlehnung an Ho *et al.*, 2017<sup>68</sup>

Die perivaskuläre Nische enthält Zellen wie Endothelzellen (ECs), Perizyten und Astrozyten. Jede Komponente der perivaskulären Nische interagiert mit GBM-CSCs, um die Stammzeleigenschaften zu verstärken. Der Kern der hypoxischen Nische stellt die Pseudopalisaden-Nekrosen (grüner Bereich) dar. Makrophagen und Mikroglia bilden die immunologische Nische.

Nischen sind anatomisch begrenzte Bereiche innerhalb der gesamten Mikroumgebung des Tumors, die durch verschiedene Zellen und Faktoren charakterisiert sind.<sup>70,71</sup> Diese Zellen und Faktoren können die Selbsterneuerung, die Proliferation und die Differenzierung der CSCs stimulieren und die Angiogenese induzieren.<sup>48,53,70,71</sup> Außerdem rekrutiert die „Stammzell-Nische“ Immunzellen und andere Stromazellen, die das invasive Wachstum bzw. die Ausbreitung des Tumors fördern (Abb. 4 und 5).<sup>70,71</sup> Diese Nischen sorgen grundsätzlich für den Erhalt der Stammzeleigenschaften und bewahren die phänotypische Plastizität der undifferenzierten Zellen.<sup>53</sup>

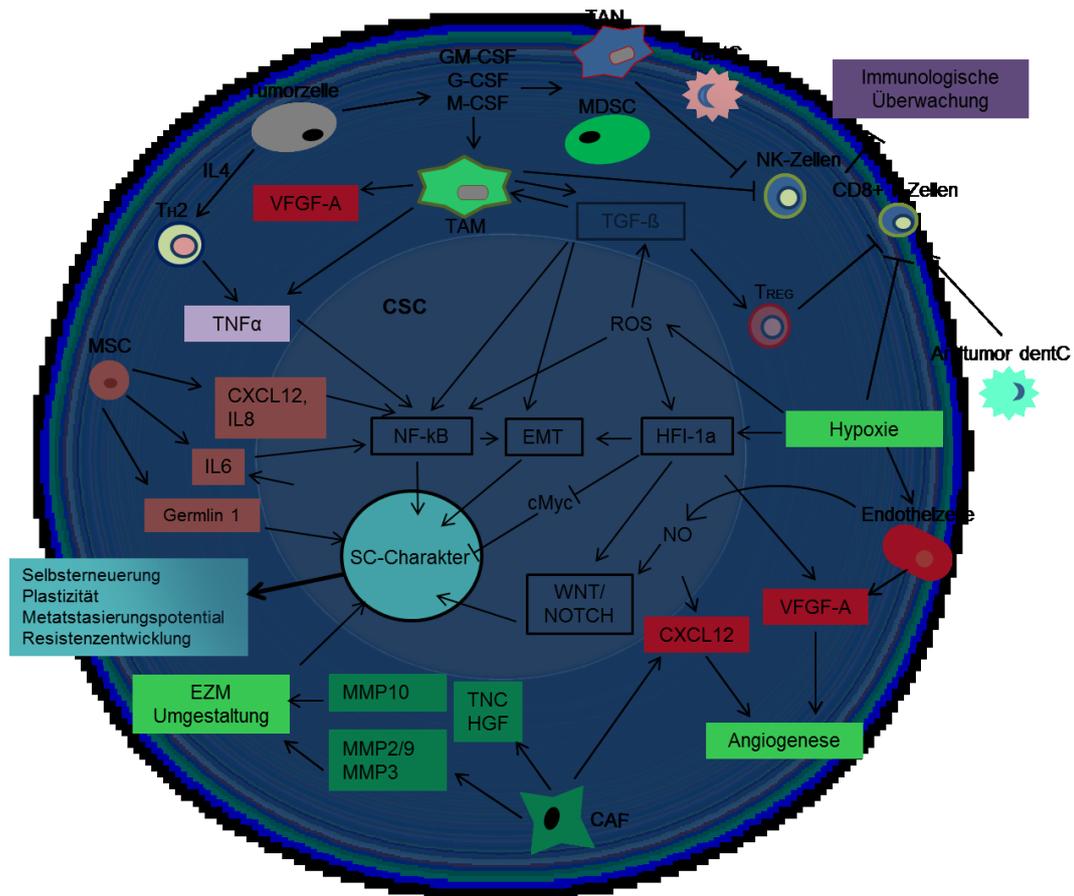
Eine wichtige Komponente der „Stammzell-Nische“ ist die extrazelluläre Matrix (EZM), die als physikalische Barriere gegen Therapeutika wirken kann.<sup>71,72</sup> Außerdem erfolgt darüber die Freisetzung von Faktoren, die die Angiogenese, das invasive Wachstum und die Ausbreitung fördern (Abb. 5).<sup>73–75</sup>

Zell-Zell-Wechselwirkungen zwischen CSCs untereinander, sowie zwischen CSCs und DCs spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle.<sup>68</sup> CSCs nutzen diese Kontakte zur Aktivierung bestimmter Signalwege (z.B.: NOTCH-Signalweg), um ihren Phänotyp zu erhalten und ihre Funktionalität auszuüben (Abb. 5).<sup>76–78</sup>

Auch Mesenchymale Stammzellen (MSC) fördern die Tumorpheriferation, Metastasierung sowie die Angiogenese und sorgen mit weiteren Entzündungszellen für ein immunsuppressives Mikromilieu (Abb. 5).<sup>79–82</sup>

Die in der „Stammzell-Nische“ herrschende Hypoxie trägt zur Hemmung von Immunzellen bei und vermindert somit die immunologische Überwachung des Tumors.<sup>83</sup> Ferner fördert Hypoxie die Aktivierung weiterer Faktoren, die die Stammzellgenese unterstützen und die Angiogenese induzieren (Abb. 4 und 5).<sup>81,84–86</sup>

Insgesamt ist die „Stammzell-Nische“ ein weites und komplexes System, das durchaus Angriffspunkte für zukünftige Therapiemöglichkeiten bieten kann. Das Verständnis über das wechselseitige Verhältnis zwischen CSCs zu dessen Nischen ist entscheidend für die Entschlüsselung der regulatorischen Rolle der Mikroumgebung bei GBM.



**Abb. 5: Die molekulare und zelluläre Grundlage zwischen CSCs und deren „Stammzell-Nische“**

Eigene Darstellung in Anlehnung an Plaks *et al.*, 2015<sup>53</sup>

CSCs: stammzellähnliche Zellen; CAFs: Krebs-assoziierte Fibroblasten; dentCs: dendritische Zellen; EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition; EZM: Extrazelluläre Matrix; G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor; GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor; HGF: Hepatocyte-Growth-Factor; HIF: Hypoxie induzierender Faktor; M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor; MDSCs: Myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen; MMP: Matrix-Metalloproteasen; MSCs: Mesenchymale Stammzellen; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen; NO: Stickstoffmonoxid; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; TAMs: Tumor-assoziierten Makrophagen; TANs: Tumor-assoziierten Neutrophilen; TH2-Zellen: T-Helfer-Zellen; TNC: Tenacin-C; Treg-Zellen: Regulatorische T-Zellen; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

### 1.2.3. Die Bedeutung der stammzellähnlichen Zellen bei Glioblastoma multiforme

Im Jahr 2002 wurden CSCs zum ersten Mal im Zusammenhang mit GBM beschrieben. Ignatova *et al.* berichteten über Zellen mit Stammzeleigenschaften innerhalb von menschlichen kortikalen Gliatumoren.<sup>87</sup> Später wurden GBM-CSCs als CD133<sup>+</sup>-Zellen bezeichnet.<sup>60</sup> CD133 (Prominin-1) ist ein Zellmembranprotein, welches ursprünglich in hämatopoetischen Stammzellen entdeckt wurde und noch heute, trotz mäßiger Validität, zur Detektion von Tumorstammzellen in GBM eingesetzt wird.<sup>88</sup>

Das gegenwärtige Verständnis über die Rolle der einzelnen Subpopulationen und der komplexeren Fähigkeiten der CSCs in GBM ist noch unvollständig.<sup>67</sup> CSCs scheinen jedoch auch in dieser Tumorentität die bereits beschriebenen typischen Stammzeleigenschaften zu besitzen und demnach für die Progression, Heterogenität und Therapieresistenz hauptverantwortlich zu sein.<sup>89</sup> Studien anderer Arbeitsgruppen beschreiben außerdem auch bei GBM das Vorhandensein spezifischer Nischen um die CSCs, die deren Funktionen wie Angiogenese, Tumorentstehung und Therapieresistenz verstärken.<sup>90</sup>

In der Literatur wird wiederkehrend über eine hierarchische Ordnung der Zellen in GBM berichtet.<sup>89</sup> Dabei stehen CSCs an der Spitze und können sich, neben der Selbsterneuerung, zu weiteren Zelltypen differenzieren (Hierarchisches Tumormodell von Reya *et al.*).<sup>49,89</sup> Das Hauptaugenmerk vieler aktueller Forschungen liegt derzeit auf einer validen Detektion der CSCs, um diese genauer zu charakterisieren und Therapieoptionen zu entwickeln.<sup>91,92</sup>

### **1.3. Resistenzentwicklung bei Glioblastoma multiforme**

Die Resistenzbildung gegenüber Radio- und Chemotherapie ist eine der Hauptursachen für das Therapieversagen und die Entstehung eines Rezidivs beim GBM. Die steigende Resistenzentwicklung geht mit einer schlechten Prognose einher.<sup>93</sup>

#### **1.3.1. Radioresistenz**

Obwohl die Radiotherapie zu den wichtigsten und wirksamsten Maßnahmen in der Behandlung von GBM zählt, entwickelt sich mit der Zeit eine immer stärker ausgeprägte Resistenz.<sup>94</sup> Hauptverantwortlich dafür scheint die kleine Subpopulation der CSCs zu sein.<sup>93</sup> Diese weisen neben einem gesteigerten Selbsterneuerungspotential eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität auf.<sup>82</sup> Dadurch bleiben die initialen Tumorzellen am Leben und können Rezidive entwickeln.<sup>51</sup>

#### **1.3.2. Temozolomid-Resistenz**

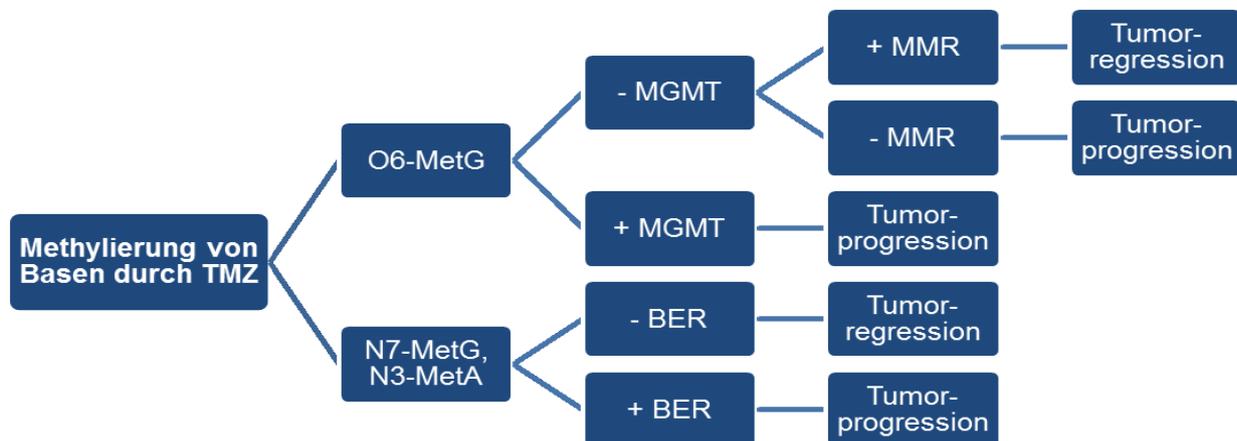
Die TMZ-Resistenz ist ein relevantes und komplexes Thema in der Behandlung und Forschung von GBM. Auch hier scheinen die CSCs die Vermittler der Chemoresistenz zu sein.<sup>93</sup> Die genauen Mechanismen sind jedoch nicht ausreichend geklärt. In den folgenden Abschnitten sind einige Möglichkeiten aufgelistet, die zur TMZ-Resistenz beitragen können.

##### **1.3.2.1. Resistenzentwicklung durch intrinsische Faktoren**

Wie bereits beschrieben wirkt TMZ durch Methylierung verschiedener Basen zytotoxisch. Bestimmte Mechanismen können jedoch die verursachten DNA-Schäden wieder beheben, wodurch die TMZ-Resistenz verstärkt wird.

Ein prognostischer Marker für den Erfolg der Chemotherapie mit TMZ ist der Promotor-Methylierungsstatus des DNA-Reparaturenzyms O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT).<sup>95</sup> Bei unmethyliertem und somit aktivem MGMT-Promotor kann das Reparatur-Enzym die von TMZ verursachten DNA-Schäden am O6-Guanin wieder beseitigen.<sup>95-97</sup> Die Literatur gibt Anhaltspunkte, dass CSCs eine MGMT-Überexpression zeigen, die hauptsächlich für die TMZ-Resistenz verantwortlich zu sein scheinen.<sup>98</sup>

Auch andere DNA-Reparaturmechanismen, wie das Mismatch-Repair-System (MMR) und das Base-Excision-Repair-System (BER) spielen eine Rolle bei der Beseitigung TMZ-induzierter DNA-Schäden (Abb. 6). Insgesamt scheint der Großteil der DNA-Schäden durch BER repariert zu werden.<sup>36</sup>



**Abb. 6: Wirkung von TMZ auf die DNA**

Eigene Darstellung in Anlehnung an Zhang *et al.*, 2012<sup>38</sup>

TMZ wirkt durch Methylierung verschiedener Basen auf die Tumorzellen. Die entstandenen DNA-Schäden können zum Teil durch aktives MGMT (MGMT+) repariert werden, wodurch es zur Tumorprogression kommt. Bei inaktiven MGMT (MGMT-) spielt der Aktivitätsgrad von MMR (MMR+ = aktiv; MMR- = inaktiv) eine Rolle. N7-MetG und N3-MetA können durch aktives BER repariert werden (BER+ = aktiv; BER- = inaktiv).

Des Weiteren scheinen Multidrug-Resistance-Related Proteine (MRP) eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>99</sup> MRP sind Transmembranproteine, die zu der großen Gruppe der ABC-Transporter gehören. Sie pumpen unter Energieverbrauch bestimmte Stoffe aus den Zellen heraus und sorgen dadurch für ein Therapieversagen.<sup>100</sup> Schaich *et al.* berichteten, dass die durch TMZ verursachte Zytotoxizität die Expression von Multidrug-Resistance-Protein-1 (MDR1) erhöht, was eine verstärkte TMZ-Resistenz in GBM zur Folge hat.<sup>101</sup> Außerdem kann die Veränderung apoptotischer Mechanismen mit der Chemoresistenz in Verbindung gebracht werden. Ebenso wie normale neurale

Stammzellen können GBM-CSCs eine Überexpression von anti-apoptotischen Faktoren aufweisen.<sup>102,103</sup>

### **1.3.2.2. Resistenzentwicklung durch extrinsische Faktoren**

Eine der möglichen Ursachen der Resistenzentwicklung kann die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sein.<sup>104</sup> Im Vergleich zu den normalen Plasmaspiegeln von TMZ (27µM - 50µM) kann die exakte Konzentration in GBM nicht bestimmt werden.<sup>35</sup> Bei physiologischer Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke geht man davon aus, dass die intratumorale TMZ-Konzentration lediglich den Werten entspricht, die auch im gesunden Hirngewebe messbar sind (5µM).<sup>35,105</sup> Sobald die Blut-Hirn-Schranke jedoch durch GBM verursachte Schäden aufweist, kann TMZ die Barriere an diesen Stellen besser passieren.<sup>106</sup> Es folgt eine Erhöhung der intratumoralen TMZ-Konzentration, wodurch ebenso wirksame Werte bis 50µM erreicht werden können.<sup>107</sup>

Besonders CSCs weisen die Fähigkeit auf, das gesunde Gewebe zu infiltrieren und Ableger zu bilden, bei denen die Blut-Hirn-Schranke anfangs noch intakt ist. Dadurch gelangen vorerst nicht ausreichend hohe TMZ-Dosen an diese Tumorzellen, was zu einem erneuten Tumorwachstum führt.<sup>30,104</sup>

Darüber hinaus spielen Faktoren eine Rolle, die die Mikroumgebung der Tumorzellen beeinflussen. Zell-Zell-Wechselwirkungen, ein erhöhtes Angebot an Zytokinen, ein niedriger pH oder Hypoxie scheinen für die Resistenzentwicklung gegen TMZ mitverantwortlich zu sein.<sup>51,52</sup> Durch die veränderte Mikroumgebung sind CSCs in der Lage, ihre Stammzeleigenschaften zu maximieren und somit die Chemoresistenz zu verstärken (siehe „Stammzell-Nische“).<sup>48,68,108</sup>

### **1.3.2.3. Resistenzentwicklung durch den Verlust der Zellhierarchie**

Nach neuen Erkenntnissen kann der Verlust der Zellhierarchie in GBM zur TMZ-Resistenz beitragen.<sup>67,109</sup> Dies ist besonders von großem Interesse, da selbst nach Eradikation der CSC-Subpopulation eine gesteigerte Tumorprogression beobachtet werden konnte.<sup>110</sup> Ursache dafür können funktionell verschiedene Arten von CSCs innerhalb eines Tumors sein, die unterschiedlich auf externe Einflüsse - wie TMZ-Behandlung - reagieren (siehe Tumorstammzell-Hypothese).<sup>67</sup> Zudem können DCs durch die Behandlung mit TMZ Stammzeleigenschaften erwerben.<sup>65,66</sup> TMZ kann die

Mikroumgebung der Tumorzellen derart verändern, dass diese einen hypoxischen Charakter annimmt.<sup>66</sup> Folglich können die Zelltypen leichter ineinander konvertieren und entwickeln im Laufe der Zeit eine Radio- und Chemoresistenz sowie gesteigerte Tumorigenität.<sup>66,86</sup> Wang *et al.* waren die Ersten, die zeigten, dass CD133<sup>-</sup>-Tumorzellen CD133<sup>+</sup>-Eigenschaften erwerben können.<sup>64</sup>

Durch die Konversion der Zelltypen untereinander kann eine zelluläre Hierarchie in Tumoren auch völlig fehlen, was zu einer gesteigerten intratumoralen Heterogenität und erschwerten Therapiebedingungen führt.<sup>111,107</sup>

### **1.3.3. Umwandlung der differenzierten Tumorzellen unter Chemotherapie**

Durch eine Behandlung der GBM-Zellen mit therapeutischen Konzentrationen von TMZ (50µM) *in vitro* konnten Auffinger *et al.* zeigen, dass DCs einer phänotypischen und funktionellen Umwandlung unterlagen.<sup>66,112</sup> DCs können Stammzeleigenschaften annehmen und somit die Malignität, Tumorprogression und Therapieresistenz steigern.<sup>63,65</sup> Studien zeigten, dass schon nach wenigen Tagen TMZ-Behandlung eine Veränderung der DCs beobachtet werden konnte.<sup>66</sup> Womöglich sei dafür die TMZ-bedingte Umgestaltung der Mikroumgebung verantwortlich, die zu hypoxischen und azidotischen Umständen führt.<sup>113,114</sup> Diese Veränderung stellt eine für CSCs spezifische Nische dar, in der die Konvertierung zwischen den Subpopulationen erleichtert ist.<sup>114</sup> Die phänotypische Umwandlung der Zellen kann anhand der Expression von Stammzell-Markern untersucht werden.<sup>115</sup> Für GBM sind derzeit noch keine Stammzell-Marker mit einer hohen Validität vorhanden. Die Marker CD133, CD15 oder Nestin werden jedoch zu Forschungszwecken regelmäßig eingesetzt.<sup>115,116</sup> Die funktionelle Umwandlung von DCs durch die Chemotherapie wird anhand der *in vitro* Tumorigenität untersucht. Die vorher weniger tumorigenen DCs scheinen nach TMZ-Behandlung das Tumorwachstum und die Tumorbildung voranzutreiben. Außerdem zeigen diese Zellen eine stärkere Chemo- und Radioresistenz im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen.<sup>66</sup> Insgesamt scheint die phänotypische und funktionelle Umwandlung der Zellen unter der Regie von genetischen und epigenetischen Regulierungen sowie der Mikroumgebung abzulaufen.<sup>117–119</sup>

## 1.4. Zielgerichtete Therapie für stammzellähnliche Tumorzellen

Durch die Umwandlung der DCs zu Zellen mit Stammzeleigenschaften unter TMZ-Therapie nimmt die schwierig behandelbare, therapieresistente Subpopulation deutlich zu.

Lamb *et al.* suchten nach einer gemeinsamen Eigenschaft der CSCs verschiedener Tumorentitäten, um diese zielgerichtet zu therapieren.<sup>67,120</sup> Dabei zeigte sich eine strenge Abhängigkeit von den Mitochondrien in Bezug auf Funktionalität und das Überleben der CSCs. CSCs waren mit einem entsprechend hohen Mitochondrien-Gehalt assoziiert, was sich als mögliches Therapieziel anbieten könnte.<sup>121</sup> Die Toxizität gegenüber Mitochondrien ist eine bekannte Nebenwirkung einiger Antibiotikaklassen, wie Erythromyzenen, Tetrazyklinen und Glycylcyclinen.<sup>40,122</sup> Diesen Effekt machte man sich als therapeutische Wirkung zu Nutze, um die Anzahl der CSCs *in vitro* zu minimieren.<sup>120</sup>

### 1.4.1. Funktion der Mitochondrien in Tumorzellen

#### 1.4.1.1. Mitochondrien

Mitochondrien, auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, spielen eine wichtige Rolle für die Funktionalität der Tumorzellen. Sie sind von einer Außen- und einer Innenmembran umrandet. Mitochondrien besitzen neben einigen Vesikeln und Ribosomen maternale vererbte mitochondriale DNA (mtDNA).<sup>123</sup> Viele lebenswichtige zelluläre Funktionen werden von Mitochondrien gesteuert. In ihnen findet die Modulation des Oxidations-Reduktionsstatus, die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Kontrolle des zytosolischen Calcium-Spiegels ( $\text{Ca}^{2+}$ ) statt. Mitochondrien leisten außerdem einen Beitrag zur Gewinnung zytosolischer biosynthetischer Vorläufer wie Acetyl-CoA oder Pyrimidin und initiieren durch die Aktivierung der mitochondrial Permeability Transition Pore (mtPTP) die Apoptose.<sup>100</sup> Als „Kraftwerke der Zelle“ sind sie für die Energiegewinnung verantwortlich. Abwandlungen der genannten Funktionen können Biosynthesewege, zelluläre Signalwege, Transkriptionsfaktoren und Chromatinstrukturen der Zelle verändern. Dadurch kann die Zelle von einem ruhigen differenzierten Zustand in einen proliferativen Zustand verschoben werden.<sup>100</sup>

#### 1.4.1.2. Die Veränderung der Mitochondrien in Tumorzellen

Die mtDNA hat eine hohe Mutationsrate. Durch *de novo*-Mutationen wird in den Zellen eine Mischung aus mutierten und normalen mtDNAs geschaffen (Heteroplasmie). Tumorzellen verschiedener Ursprungsentitäten weisen eine stark ausgeprägte Heteroplasmie auf. Durch bestimmte mtDNA-Mutationen werden in den Zellen Kaskaden ausgelöst, die unterschiedlichste Veränderungen der Zellfunktion hervorrufen und zu Tumorenstehung bzw. -erhalt führen können.<sup>122,124</sup>

Auch Mutationen der nukleären DNA (nDNA) können den mitochondrialen Metabolismus beeinflussen und so die Tumorentstehung fördern.<sup>125–127</sup>

Vor ca. 80 Jahren beobachtete Warburg als Erster einen Zusammenhang von veränderten Mitochondrien und Tumorzellen. Er zeigte, dass Tumoren überschüssiges Laktat produzieren, was als mitochondriale Dysfunktion interpretiert wurde. Dieses Phänomen wurde als aerobe Glykolyse oder auch „Warburg-Effekt“ bekannt.<sup>128</sup> Im Laufe der Zeit brachten zahlreiche Analysen neue Erkenntnisse über die Bedeutung und die Komplexität der mitochondrialen Veränderungen in Tumorzellen.<sup>129</sup>

Durch den veränderten mitochondrialen Stoffwechsel in den Tumorzellen kann zudem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erhöht und der zelluläre Redox-Status verändert werden. Es kommt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Erhöhung der Proliferationsrate in Tumoren.<sup>85,130</sup> Außerdem kann eine vermehrte Produktion von ROS zur Hemmung des intrinsischen Apoptoseweges führen.<sup>129</sup>

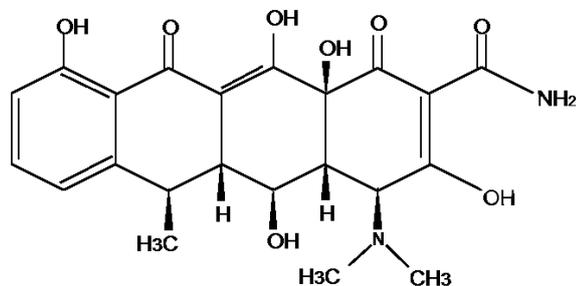
Ferner können die Mitochondrien in Tumorzellen für die Aktivierung des PI3K-PTEN-AKT-Signalwegs verantwortlich sein. Dadurch verschiebt sich der Stoffwechsel der Tumorzellen so, dass die Umverteilung von glycolytischen Nährstoffen den Wechsel von Katabolismus zu Anabolismus ermöglicht. Lamb *et al.* beschrieben, dass vor allem CSCs eine anabole Stoffwechsellage aufweisen, wodurch die Tumorentstehung und -proliferation angetrieben wird.<sup>120,121,131</sup>

Die unterschiedlichen Einflüsse der Mitochondrien scheinen für die Lebensfähigkeit der Tumorzellen essentiell zu sein. Diese Kenntnisse geben uns neue Anhaltspunkte für Möglichkeiten in der Behandlung von GBM.

## 1.4.2. Wirkung von Doxyzyklin auf Glioblastoma multiforme

### 1.4.2.1. Doxyzyklin

Doxyzyklin (Dox) ist ein Breitspektrum-Antibiotikum aus der Gruppe der Tetrazykline.<sup>132</sup> Tetrazykline wirken bakteriostatisch, indem sie die Proteinbiosynthese in Bakterien hemmen. Die Moleküle binden reversibel an die Aminoacyl-tRNA der 30S-Untereinheit (30S-UE) von 70S-Ribosomen und verhindern somit die Elongation der Peptidketten.<sup>37,40</sup> Da die 30S-UE der bakteriellen Ribosomen strukturell ähnlich zu der 28S-UE der mitochondrialen Ribosomen ist, wirken Tetrazykline außerdem auf die mitochondriale Funktion.<sup>120</sup>



**Abb. 7: Strukturelle Darstellung von Dox**

Eigene Darstellung in Anlehnung an Forth W *et al.*  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2002<sup>39</sup>

### 1.4.2.2. Suppression der stammzellähnlichen Zellen durch Doxyzyklin

Dox und andere Tetrazyklin-Derivate verändern die Funktionalität der Mitochondrien, indem sie sich an die 28S-Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen binden.<sup>120</sup> Dadurch wird die Funktionalität der Mitochondrien verändert. Lamb *et al.* beschrieben diesen Effekt als therapierelevante Wirkung im Zusammenhang mit der Behandlung verschiedener Krebsarten, da besonders die CSCs eine strenge Abhängigkeit von der mitochondrialen Biosynthese aufweisen.<sup>120</sup> Tatsächlich führte eine Behandlung mit Antibiotika wie Dox zu einer verringerten Tumorigenität *in vitro*.<sup>120,121</sup> Man geht davon aus, dass Dox die Proliferation, die Invasion und die Differenzierung der CSCs hemmt. Weitere Studien zeigten allerdings, dass das Tetrazyklin-Derivat auch zur Hemmung der Apoptose beitragen kann.<sup>133</sup> DCs reagierten kaum bzw. gar nicht auf die Antibiotika-Therapie.

Schlussfolgernd scheinen CSCs bezüglich ihrer Funktionalität abhängig von Mitochondrien zu sein, die durch Dox und einige andere Antibiotika unterdrückt werden können. Welche genaue Rolle die Mitochondrien in den CSCs spielen, ist momentan noch nicht geklärt. <sup>120,121</sup>

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Trotz zunehmender Therapieansätze für die Behandlung von GBM scheint die Möglichkeit der Heilung des malignen Tumors weit entfernt zu liegen. Frühere Arbeiten anderer Arbeitsgruppen beschäftigten sich besonders mit der Entwicklung neuer Medikamente, die zielgerichtet GBM-CSCs angreifen sollen, da einst von einem hierarchischen Tumormodell der einzelnen Subpopulationen in GBM ausgegangen wurde.<sup>49</sup> Damals meinte man zu wissen, dass lediglich CSCs für die Tumorentstehung und -progression, die Metastasierung, die Differenzierung der Zellen und somit für die Therapieresistenzen verantwortlich seien. Durch den Verlust der CSCs wurde eine Regression der Tumormasse postuliert.<sup>49</sup> Neueste Studien beschreiben jedoch ein deutlich komplexeres System zwischen den einzelnen Subpopulationen eines Tumors. Man geht nun davon aus, dass die verschiedenen Tumorzellen durch bestimmte Umgebungsbedingungen ineinander konvertieren können, wodurch die Masse der therapieresistenten Zellen stetig steigt.<sup>61,63,64</sup>

Ein wichtiger Punkt, der zum Misserfolg der Therapie beiträgt, ist außerdem die steigende Resistenzentwicklung gegen das Standardtherapeutikum TMZ.<sup>93</sup> In früheren Studien wurde beobachtet, dass die beschriebene Konversion der DCs in Zellen mit Stammzeleigenschaften durch TMZ-induzierten Stress verursacht werden kann, was ein ungenügendes Ansprechen des Zytostatikums zur Folge hat.<sup>66</sup> Ziel aktueller Arbeiten ist es demnach, Medikamente zu entwickeln, die mehr auf die Stammzeleigenschaften aller Tumorzellen an sich abzielen, anstatt einzelne Zelltypen zu eliminieren. Außerdem wird eine Suppression der TMZ-Resistenz angestrebt. Lamb *et al.* zeigten in vorangegangenen Studien, dass durch Medikamente verschiedener Antibiotikaklassen eine verminderte *in vitro* Tumorigenität sowie Stammzell-Marker Expression von konvertierten Tumorzellen zu beobachten war, was zukünftig neue Therapieansätze liefern kann.<sup>120</sup>

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Differenzierung der einzelnen Zellsubpopulationen von 4 GBM-Primärzelllinien *in vitro* darzustellen und diese anhand funktioneller (*in vitro* Tumorigenität) und phänotypischer (Stammzell-Marker Expression) Eigenschaften zu vergleichen. Des Weiteren wurde der Einfluss von TMZ auf DCs untersucht. Dabei stand die beschriebene TMZ-induzierte Konversion der DCs in Zellen mit Stammzeleigenschaften im Vordergrund mehrerer Versuche. Verglichen wurde die

funktionelle und phänotypische Veränderung der behandelten und unbehandelten DCs. Zusätzlich wurde eine Suppression der gesteigerten *in vitro* Tumorigenität der mit TMZ behandelten DCs angestrebt und durch das Antibiotikum Dox untersucht. Letztlich wurde der zeitliche Rahmen, in dem die genannten Veränderungen der Zellen stattgefunden haben, analysiert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

Tab. 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec, Münster, DE
Brutschrank INCO2246	Memmert, Schwabach, DE
Elektrische Pipettierhilfe	Integra Pipetboy, Biebertal, DE
ELISpot-Reader	Labindia, Thane, Indien
Einfriercontainer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE
Handstückzähler mechanisch	neoLab, Heidelberg, DE
Gefrierschrank -28°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kühlschrank 4°C	Bosch, Stuttgart, DE
Microplate-Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop (Foto)	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop	Olympus, Hamburg, DE
Mikrowellenherd	Samsung, Seoul, Südkorea
Multikanalpipette	Gilson, Middleton, WI, USA
Multistep Pipette	Eppendorf, Hamburg DE
Pipette (10, 20, 100 ,200 ,1000µl)	Eppendorf, Hamburg DE
Sterilbank Safemate 1.8 vision	EuroClone, Pero, Italien
Waage	Kern&Sohn GbmH, Balingen-Frommern, DE
Wasserbad	Witeg, Wertheim, DE
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	Integra, Biebertal, DE
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, DE
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2: Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
6-well Platte	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-well Platte	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Deckglas	Menzel, Braunschweig, DE
Falconröhrchen 15ml	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falconröhrchen 50ml	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Objektträger	Marienfeld, Lauda Königshofen, DE
Petrischalen (100mm)	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 10;20;200;1000µl steril (mit/ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen Glas	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reaktionsgefäß 1,5ml (braun/klar)	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Serologische Pipetten (2; 5; 10ml)	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche mit Filter 75cm <sup>2</sup>	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellsieb (70µm)	Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich

### 3.1.3. Chemikalien und Zusätze

**Tab. 3: Chemikalien und Zusätze**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
B27	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
bFGF	Immunotools, Friedoythe, DE
BSA	Roth, Karlsruhe, DE
Calcein AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/Ham's F12 - Flüssigmedium	Biochrom, Berlin, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, DE

Ethanol	AppliChem, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	PanBiotech, Aidenbach, DE
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg, DE
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, DE
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, DE
Methanol	AppliChem, Darmstadt, DE
PBS pH 7,4	Biochrom, Berlin, DE
rhEGF	Immunotools, Friedoythe, DE
Trypan-Blau	AppliChem, Darmstadt, DE
Trypsin/ EDTA	Biochrom, Berlin, DE

### 3.1.4. Medien und Lösungen

**Tab. 4: Medien und Lösungen**

<b>Produkt</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Standardmedium	DMEM/Ham's F12 2mM L-Glutamin 10% FKS
Stammzell-Medium	DMEM/Ham's F12 2mM L-Glutamin 1x B-27 10ng/ml bFGF 20ng/ml rhEGF
Einfriermedium	10% DMSO in FKS
Agar	3% in sterilem H <sub>2</sub> O
Blockierlösung (Immunfluoreszenz)	2% BSA in PBS
bFGF - Stock	10µg/ml in sterilem H <sub>2</sub> O
Calcein AM	4mM in DMSO
rhEGF - Stock	20µg/ml in sterilem H <sub>2</sub> O

### 3.1.5. Agar für Soft-Agar Assay

Tab. 5: Agar für Soft-Agar Assay

Agar	Zusammensetzung
Base-Agar	0,4% Agar in Medium
Top-Agar	0,35% Agar in Einzelzellsuspension

### 3.1.6. Antikörper

Tab. 6: Antikörper

Marker	Isotyp	Label	Spezies	Hersteller	Antikörper-Lösung (AK:Blockierlösung)
Nestin	IgG1	Alexa 488	Maus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:100
CD133	IgG1	FITC	Maus	Miltenyi Biotec, Gladbach, DE	1:100
CD15	IgM	PE	Maus	Immunotools, Friedoythe, DE	1:100
Sox2	IgG1	Cy5	Maus	Biorbyt, Cambridge, UK	1:100
Bmi1	IgG1	Cy3	Maus	GeneTex, San Antonio, Texas, USA	1:100

### 3.1.7. Medikamente

Tab. 7: Medikamente

Medikament	Stock	Verdünnungslösung	Hersteller
Temozolomid	175mM	DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Doxyzyklin	9,7656mM	Ethanol	AppliChem, Darmstadt, DE

### 3.1.8. Zelllinien

Die in diesem Projekt verwendeten GBM-Zelllinien wurden zuvor aus Primärtumormaterial von PatientInnen etabliert und molekularpathologisch charakterisiert (Tab. 8). Zur Anonymisierung wurde jeder Zelllinie eine Identifikationsnummer (z.B. HROG06) zugewiesen. Hierbei stehen HRO für die Stadt Rostock, G für Glioblastoma multiforme und die letzten beiden Ziffern für die aufgelistete Nummer in der Datenbank. Ausgehend von diesen Primärzelllinien wurden durch Anpassung der Kulturbedingungen (serumfrei, B27, EGF, FGF) CSCs *in vitro* angereichert. In diesen Fällen wurde hinter das Kürzel der Zelllinie ein „SC“ für Stammzelle angefügt (z.B. HROG06SC).

#### Tab. 8: Klinische und zelluläre Charakteristika der 4 GBM-Primärzelllinien

Pro Zelllinie (ID-Nummer) wurden die Herkunft des Primärtumormaterials sowie die Diagnose nach WHO-Klassifikation beschrieben. Außerdem wurde das Alter in Jahren sowie das Geschlecht (m = masculinum, f = femininum) der PatientInnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, die Lokalisation des Primärtumors im Cerebrum (L = linke Hemisphäre, R = rechte Hemisphäre) und der MGMT-Promotorstatus des Primärtumors angegeben.

ID-Nummer	Herkunft	Diagnose	Lokalisation	Alter/ Geschlecht	MGMT- Promotor
HROG06(SC)	Human	GBM (°IV)	L; frontal	53/m	unmethyliert
HROG10(SC)	Human	GBM (°IV)	L; temporal	74/m	unmethyliert
HROG36(SC)	Human	GBM (°IV)	R; parietal	80/f	unmethyliert
HROG38(SC)	Human	GBM (°IV)	R; parietooccipital	49/f	unmethyliert

Bei einer Gleichverteilung der Geschlechter lag das mittlere Erkrankungsalter von den PatientInnen der ausgewählten Fälle bei 64 Jahren. Die Lokalisation des Tumors präsentierte sich stets an unterschiedlichen Orten der beiden Hemisphären. In allen Fällen konnte ein unmethylierter MGMT-Promotor nachgewiesen werden.

### 3.1.9. Software

Tab. 9: Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz	Zitieren
ELISpot Reader Count	Labindia, Thane, Indien	Soft-Agar Assay
Microplate Reader Count	Tecan, Männedorf, Schweiz	Chemosensibilisierung
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA	tabellarische und grafische Auswertung
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA	Erstellen und Bearbeiten von Grafiken
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA	Dissertation
SigmaStat	Systat Software GmbH, Erkrath, DE	Statistische Auswertung

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

Die für diese Studie verwendeten Primärzelllinien wurden zuvor aus GBM-Gewebe von PatientInnen, nach deren schriftlichem Einverständnis auf der Grundlage eines Votums (Referenznummer: A 2009-34) der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Rostock, in der Arbeitsgruppe etabliert.<sup>134</sup> Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 (2mM L-Glutamin, 10% FKS) aufgenommen, in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert, um eine Kontaktinhibition zu verhindern. Dazu wurden die Zellen zur enzymatischen Ablösung nach dem Spülen mit PBS kurzzeitig im Brutschrank mit 0,25% Trypsin inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung des Trypsins Medium zugegeben und die gelösten Zellen in Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5min, 300xg). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, gezählt und in gewünschter Menge wieder ausgesät.

Um ausgehend von diesen Zelllinien CSCs *in vitro* anzureichern, wurden die Zellen gewaschen und in Stammzell-Medium (DMEM/Ham's F12, 2mM L-Glutamin, B27, rhEGF, bFGF) kultiviert. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, serumfreies Kulturmedium zu verwenden, um viele variable Bestandteile des Serums, welche die Differenzierung der Zellen vorantreiben, auszublenden. Die Supplementation von B27, definiert als ein Nahrungsergänzungsmittel mit essentiellen Fettsäuren, Hormonen, Vitaminen und Antioxidantien, sorgt zusammen mit dem serumfreiem Medium für eine Reduktion der Variabilität in neuronalen Kulturen. Dieses zusammengesetzte Medium ist besonders zur Kultivierung neuronaler Zellen des ZNS geeignet und stellt eine klassische Methode dar.<sup>135,136</sup>

Manche Stammzelllinien wuchsen in Kultur als nicht-adhärenente dreidimensionale Sphäroide. In diesen Fällen wurden die Sphäroide mithilfe eines Zellsiebs (70µm Porendurchmesser) vereinzelt. Dazu wurden die Zellen in Medium aufgenommen und mehrmals durch das Zellsieb gespült. Anschließend wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert und ausgesät. Nachdem die Zellen für ca. 10 – 14d in dem

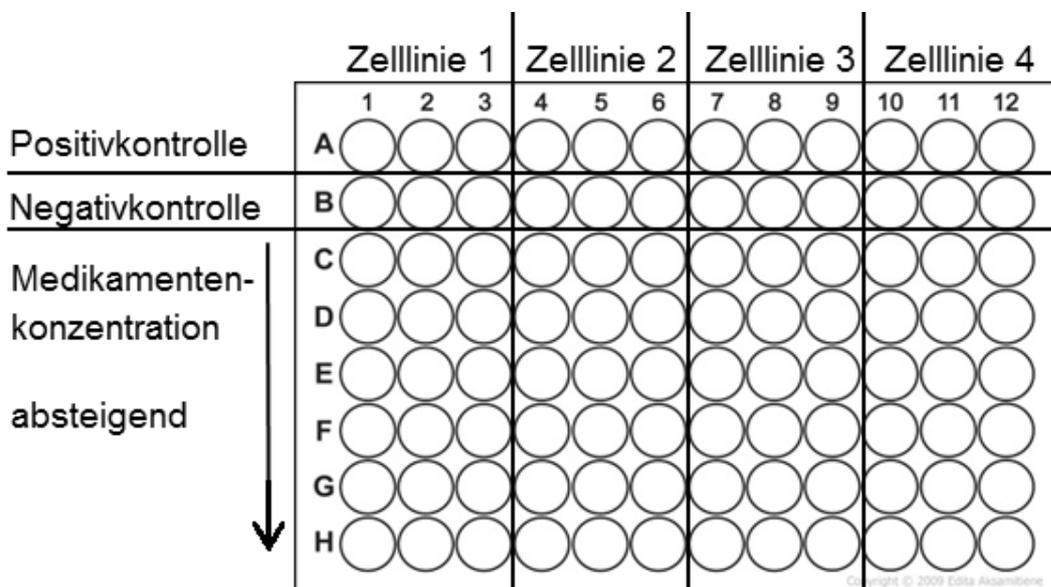
Stammzell-Medium kultiviert waren, wiesen diese Stammzeleigenschaften auf und werden im Folgenden als CSCs bezeichnet.

### 3.2.2. Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen, wie beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1,5ml Einfriermedium (10% DMSO in FKS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in einem Isopropanol-gefüllten Einfriercontainer umgelagert und bei -80°C eingefroren.

### 3.2.3. Bestimmung von Chemosensitivität

Um zu bestimmen, wie empfindlich die Zellen auf bestimmte Medikamente reagierten, wurden sogenannte Chemogramme erstellt. Dazu wurden in 96-Well-Platten 5000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Medikamente behandelt. Nach 2 Behandlungszyklen (jeweils 72h), erfolgte die Auswertung mittels Calcein AM Assay.



**Abb. 8: Versuchsaufbau Chemosensibilitätsbestimmung**

Wie in Abb. 8 schematisch dargestellt, wurden pro 96-Well-Platte 4 Zelllinien gleichzeitig analysiert. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte bzw. lediglich mit dem

Lösungsmittel des zu testenden Medikaments behandelte Zellen. Zellen der Negativkontrolle wurden vor der Auswertung mit 70%-igen Ethanol abgetötet. Die Zellen der Reihen C bis H wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Medikamentes behandelt. Dabei wurde auf die Zellen der Reihe C die höchste Medikamentenkonzentration pipettiert, die bis Spalte H nach Vorgabe der Verdünnungsreihe (Tab. 10 und 11) verringert wurde.

**Tab. 10: Verdünnungsreihe für TMZ**

Die Mengenangaben beziehen sich auf 3 Wells, die Konzentration der Stock-Lösung betrug 175mM.

	<b>TMZ-Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>1</b>	8mM	1:21,9	29,6µl Stock + 620,4µl Medium
<b>2</b>	1,6mM	1:5	130µl von 1 + 520µl Medium
<b>3</b>	320µM	1:5	130µl von 2 + 520µl Medium
<b>4</b>	64µM	1:5	130µl von 3 + 520µl Medium
<b>5</b>	12,8µM	1:5	130µl von 4 + 520µl Medium
<b>6</b>	2,56µM	1:5	130µl von 5 + 520µl Medium

**Tab. 11: Verdünnungsreihe für Dox**

Die Mengenangaben beziehen sich auf 3 Wells, die Konzentration der Stock-Lösung betrug 9,77mM.

	<b>DOX-Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>1</b>	500µM	1:19,5	76,8µl Stock + 1423,2µl Medium
<b>2</b>	250µM	1:2	750µl von 1 + 750µl Medium
<b>3</b>	125µM	1:2	750µl von 2 + 750µl Medium
<b>4</b>	62,5µM	1:2	750µl von 3 + 750µl Medium
<b>5</b>	31,25µM	1:2	750µl von 4 + 750µl Medium
<b>6</b>	15,625µM	1:2	750µl von 5 + 750µl Medium

### 3.2.3.1. Calcein-AM Assay

Der Farbstoff Calcein ist ein Derivat des Fluoreszins und wird zur selektiven Detektion vitaler Zellen verwendet. Calcein-AM selbst fluoresziert nicht.<sup>137,138</sup> Als hydrophober Ester gelangt es jedoch ins Zytosol. Dort wird Calcein-AM in vitalen Zellen durch die zelluläre Esterase in das fluoreszierende Calcein umgewandelt. Calcein ist hydrophil und somit nicht membranpermeabel, sodass sich der Farbstoff im Zellinneren ansammelt. Vitale Zellen können bei einer Anregung von 485nm und mit einem Emissionsmaximum von 535nm detektiert werden.<sup>137-140</sup>

Vor der Färbung wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches, serumfreies Medium ersetzt (100µl pro Well). Für die Färbung wurden 2,5µl des Calcein Stocks (4mM in DMSO), mit 4997,5µl PBS gemischt und auf die Zellen gegeben (50µl pro Well). Nach 20min Inkubation in einem Brutschrank konnten die Platten am Microplate-Reader (485nm Excitation, 535nm Emission) ausgewertet werden. Dadurch erhielt man für alle Konzentrationen des getesteten Medikaments sowie für die Positiv- und Negativkontrolle die Fluoreszenzintensität, die mit der Menge der vitalen Zellen korreliert. Die Werte wurden anschließend auf die Positivkontrolle (= 100%) normalisiert.

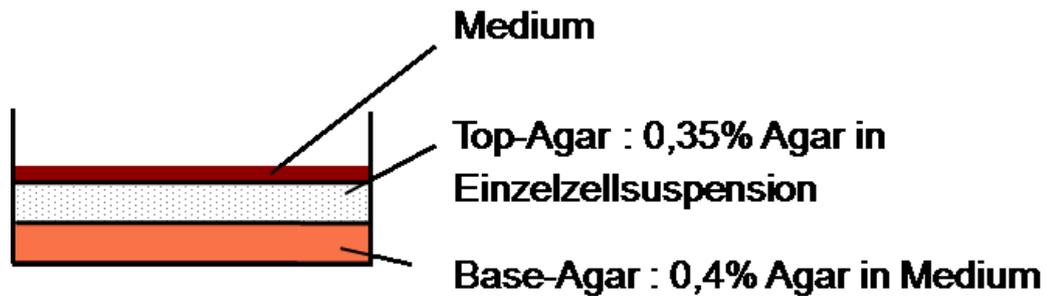
$$X = \frac{100 \times \text{Anzahl der überlebenden Zellen (Vergleichsgruppe)}}{\text{Anzahl der überlebenden Zellen (Positivkontrolle)}}$$

Zusätzlich wurden die Platten mit Hilfe des ELISpot-Readers fotografiert, um einen optischen Eindruck zu erhalten (siehe Auswertung Soft-Agar Assay).

### 3.2.4. Soft-Agar Assay

Mit Hilfe des Soft-Agar Assays kann das Potential zur Bildung maligner Klone (Tumorigenität) von kultivierten Zellen bestimmt werden. Hintergrund ist, dass viele Tumorzellen im Gegensatz zu nicht malignen Zellen in semi-festen Medien, wie z.B. Agar, Klone bilden können.

Dazu wurden die kultivierten Zellen mit dem zu untersuchenden Medikament für 2 x 72h vorbehandelt und mit den unbehandelten DCs und CSCs verglichen.



**Abb. 9: Versuchsaufbau Soft-Agar Assay**

Zunächst wurde eine 3%-ige Agar-Lösung angesetzt (gelöst in doppeltdestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O)), autoklaviert und in einem Mikrowellenherd bis zur Verflüssigung erhitzt. Die benötigten Mengen des Wachstumsmediums (Standard-/Stammzell-Medium) wurden in ein 15ml Falcon-Röhrchen gefüllt und im Wasserbad auf 40°C temperiert. Zur Herstellung der Base-Agar-Phase erfolgte die Verdünnung der Agar-Lösung mit Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 0,4%. Anschließend wurden in jedes Well einer 96-Well-Platte 100µl Base-Agar gefüllt, um die Adhäsion der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen in einer Konzentration von 500 Zellen pro Well in 100µl Medium mit 0,35% Agar (Top-Agar-Schicht) ausgesät. Die Zellen wurden anschließend 14d im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde 2x wöchentlich 50µl frisches Medium pro Well zugeführt.

Die Auswertung erfolgte durch Calcein-AM Färbung (siehe 3.2.3.1. Calcein-AM Assay). Nach der Färbung wurden die Platten mittels ELISpot-Reader fotografiert. Die gebildeten Kolonien wurden mit einem automatisierten ELISpot Lesesystem gezählt. Die Anzahl der Kolonien ist dabei Ausdruck der Tumorigenität *in vitro*.<sup>141,142</sup>

### **3.2.5. Immunfluoreszenzmikroskopie**

Um die phänotypischen Unterschiede zwischen DCs und CSCs darzulegen, kamen verschiedene Stammzell-Marker zum Einsatz (Nestin, CD133, CD15, Sox2 und Bmi1). Durch die Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die Bindung der Antikörper an die Zellstruktur in den Zellen dargestellt werden.

Die Immunfluoreszenz weist den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex farblich nach. Bei der direkten Immunfluoreszenz bindet der Fluorochrom-markierte Antikörper

direkt an das Antigen. Der Antigen-Antikörper-Komplex kann durch Licht bestimmter Wellenlängen sichtbar gemacht werden.

Vor der Färbung wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und die Zellzahl auf 2000 Zellen/ $\mu\text{l}$  in PBS eingestellt. 5 $\mu\text{l}$  der Einzelzellsuspension wurden mittig auf einen Objektträger pipettiert und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden in Methanol für 30min fixiert und nach kurzer Lufttrocknung mit einem Fettstift umrandet, um später die Lösungen auf die Zellen zentrieren zu können. Die Objektträger wurden 1h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (PBS mit 2% BSA) inkubiert. Anschließend wurden diese in eine Inkubationskammer umgelagert und die Zellen mit jeweils 90 $\mu\text{l}$  Antikörper-Lösung bedeckt. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur unter feuchten und dunklen Bedingungen wurden die Objektträger mit der Blockierlösung gewaschen. Dadurch wurden die unverbrauchten Antikörper abgespült. Im Verlauf wurden die Objektträger erneut in die Inkubationskammer umgelagert und mit jeweils 90 $\mu\text{l}$  DAPI-Lösung (1:1000 in Blockierlösung) zur Gegenfärbung der Zellkerne bedeckt. Nach 5min Inkubation wurden die Objektträger wiederholt in Blockierlösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Tropfen Eindeckmedium (Fluorescent mounting Medium) und einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

#### **1.2.6. Statistische Auswertung**

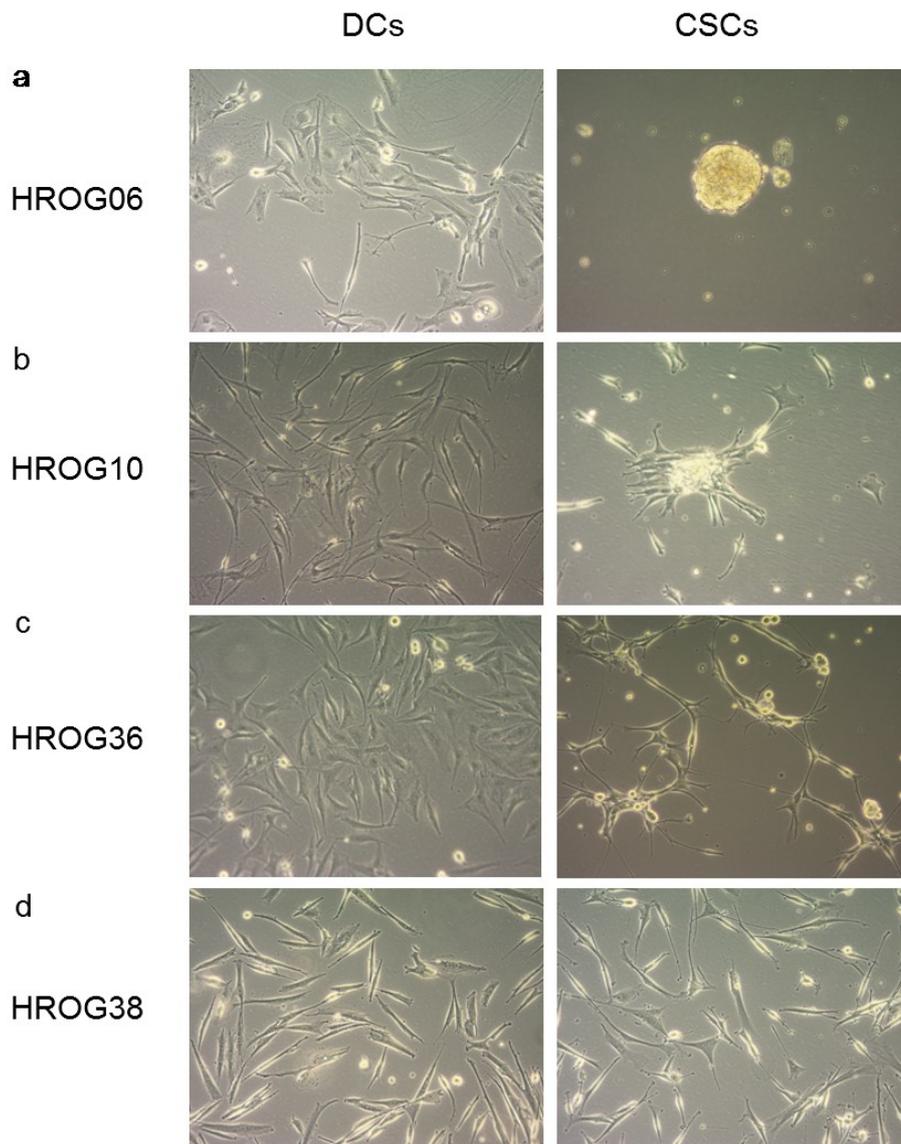
Die statistische Auswertung aller durchgeführten Versuche erfolgte durch das Programm SigmaPlot 10.0. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test angewandt. In dieser Arbeit wurden p-Werte  $\leq 0,05$  als signifikant und p-Werte  $< 0,001$  als hochsignifikant definiert. In den Abbildungen wurden die p-Werte folgendermaßen markiert:

$p < 0,001$  \*\*\*;  $p = 0,001 - 0,05$  \*;  $p > 0,05$  n.s.

## 2. Ergebnisse

### 4.1. Morphologische Unterschiede der differenzierten Zellen und deren stammzellähnlichen Zellen von 4 Primärzelllinien

Zur Charakterisierung der verschiedenen Subpopulationen wurden neben DCs auch CSCs untersucht. Dabei wurden die Zellen für 10 - 14d in Stammzell-Medium kultiviert. Als Folge konnte eine morphologische Veränderung der Zellen beobachtet werden (Abb. 10).



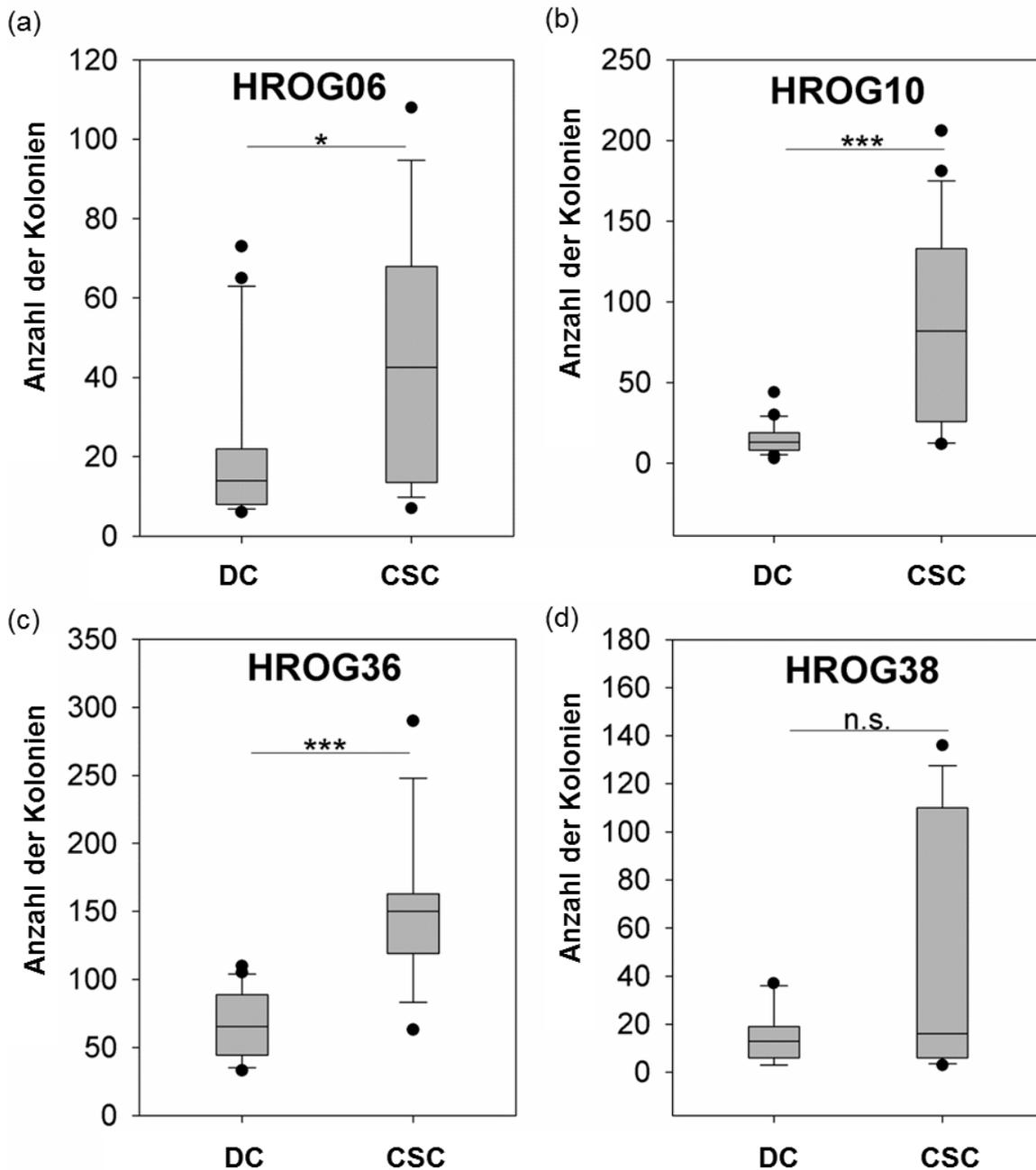
**Abb. 10: Morphologischer Unterschied der DCs und CSCs von 4 GBM-Primärzelllinien**

Nach einer Inkubationsdauer von 10 - 14d in Standard- bzw. Stammzell-Medium *in vitro* wurden die Zellen der einzelnen Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) durch ein Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung fotografiert.

Verglichen wurden die morphologischen Unterschiede der kultivierten DCs (Abb. 10 links) mit den dazugehörigen CSCs (Abb. 10 rechts). Die DCs aller 4 Primärlinien wuchsen adhärent, wohingegen CSCs unterschiedliche Wachstumsmuster präsentierten. Die gravierendste Differenz zeigte die Linie HROG06/SC, bei der die CSCs vorrangig dreidimensional wuchsen (Abb. 10a). Bei den Zellen der Linie HROG10 und HROG10SC konnte ebenfalls eine morphologische Veränderung sichtbar gemacht werden. HROG10SC zeigte mehrere sich anlagernde Zellen, mit teilweise semiadhärenter Entfaltung, wohingegen die DCs der Linie HROG10 ausschließlich adhärent wuchsen (Abb. 10b). Die Zellen von HROG10SC zeichneten sich außerdem durch die Ausprägung von zahlreichen Ausläufern aus. Die CSCs der Linie HROG36SC wuchsen größtenteils adhärent am Boden der Zellkulturflasche, konnten jedoch auch kleine Sphäroide bilden und wiesen somit ebenfalls ein teils semiadhärentes Wachstum auf. Morphologisch unterschieden sie sich zu den dazugehörigen adhärent-wachsenden DCs ebenfalls durch mehrere Ausläufer (Abb. 10c). Bei den Zellen der Linien HROG38 und HROG38SC war kein morphologischer Unterschied zu sehen. Beide Zelltypen wuchsen ausschließlich adhärent (Abb. 10d).

#### **4.2. *In vitro* Tumorigenität der 4 Glioblastom-Primärzelllinien**

Zur Untersuchung der Hypothese, dass CSCs im Vergleich zu Zellen, die unter Standardkulturbedingungen kultiviert wurden, eine erhöhte *in vitro* Tumorigenität zeigen, wurden Soft-Agar Assays durchgeführt. Nach 14d Inkubation wurden die Kolonien automatisiert ausgezählt.



**Abb. 11: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der *in vitro* Tumorigenität**

Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien von DCs und CSCs der Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) nach 14d Inkubation in einem Soft-Agar Assay aus insgesamt 4 unabhängigen Versuchen in Quinduplikaten.

Balken: Median; Box: Bereich in dem die mittleren 50% der Daten vorkommen; Whisker: Bereich in dem die mittleren 95% der Daten vorkommen; Punkte: Ausreißer. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , n.s.  $p > 0,05$ , Mann Whitney Rank sum test.

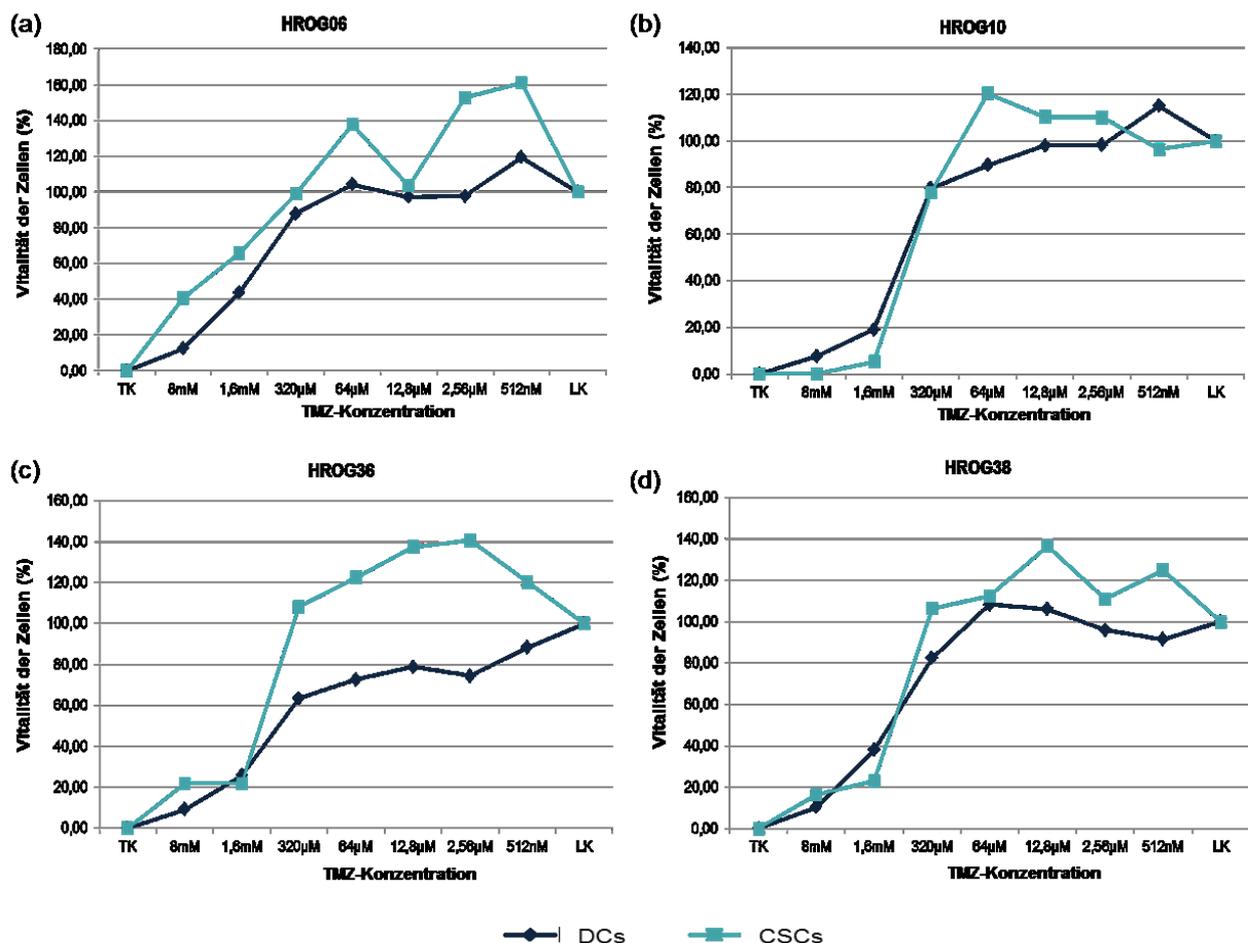
Die CSCs der Linien HROG06, HROG10 und HROG36 wiesen eine signifikant höhere *in vitro* Tumorigenität im Vergleich zu den korrespondierenden DCs auf (HROG06:  $p=0,021$ . HROG10 & HROG36:  $p<0,001$ ). Bei der Zelllinie HROG38 konnte keine signifikante Differenz der einzelnen Subpopulationen dargestellt werden ( $p=0,282$ ). Insgesamt kann in 3 von 4 Fällen von einer erfolgreichen Anreicherung der CSCs *in vitro* ausgegangen werden (Abb. 11).

#### **4.3. Umwandlung der differenzierten Tumorzellen in einen Tumorstammzell-ähnlichen Phänotyp durch die Behandlung mit Temozolomid**

Einige Studien haben belegt, dass sich GBM-DCs durch die Behandlung mit klinisch relevanten Dosen TMZ in CSCs umwandeln können. Folglich konnte eine höhere *in vitro* Tumorigenität der behandelten DCs sowie eine erhöhte Expression verschiedener Stammzell-Marker festgestellt werden.<sup>66</sup> In dieser Arbeit wurden diese Erkenntnisse an GBM-Primärtumorzelllinien untersucht.

##### **4.3.1. Sensitivität gegenüber Temozolomid *in vitro***

Zunächst wurde die Sensitivität der 4 ausgewählten Zelllinien gegenüber TMZ analysiert. Dazu wurden die Zelllinien HROG06, HROG10, HROG36, HROG38 und die dazugehörigen Stammzelllinien mit verschiedenen Konzentrationen von TMZ behandelt.



**Abb. 12: Chemosensibilität gegenüber TMZ**

Nach 2x72h Inkubation der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen TMZ (horizontale Achse) wurde die Vitalität der DCs und CSCs (vertikale Achse) der Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) analysiert. Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten.

Die Totkontrolle (TK) wurde durch das Abtöten der Zellen mit Ethanol erreicht. Die Lebendkontrolle (LK) wurde ausschließlich mit Medium behandelt.

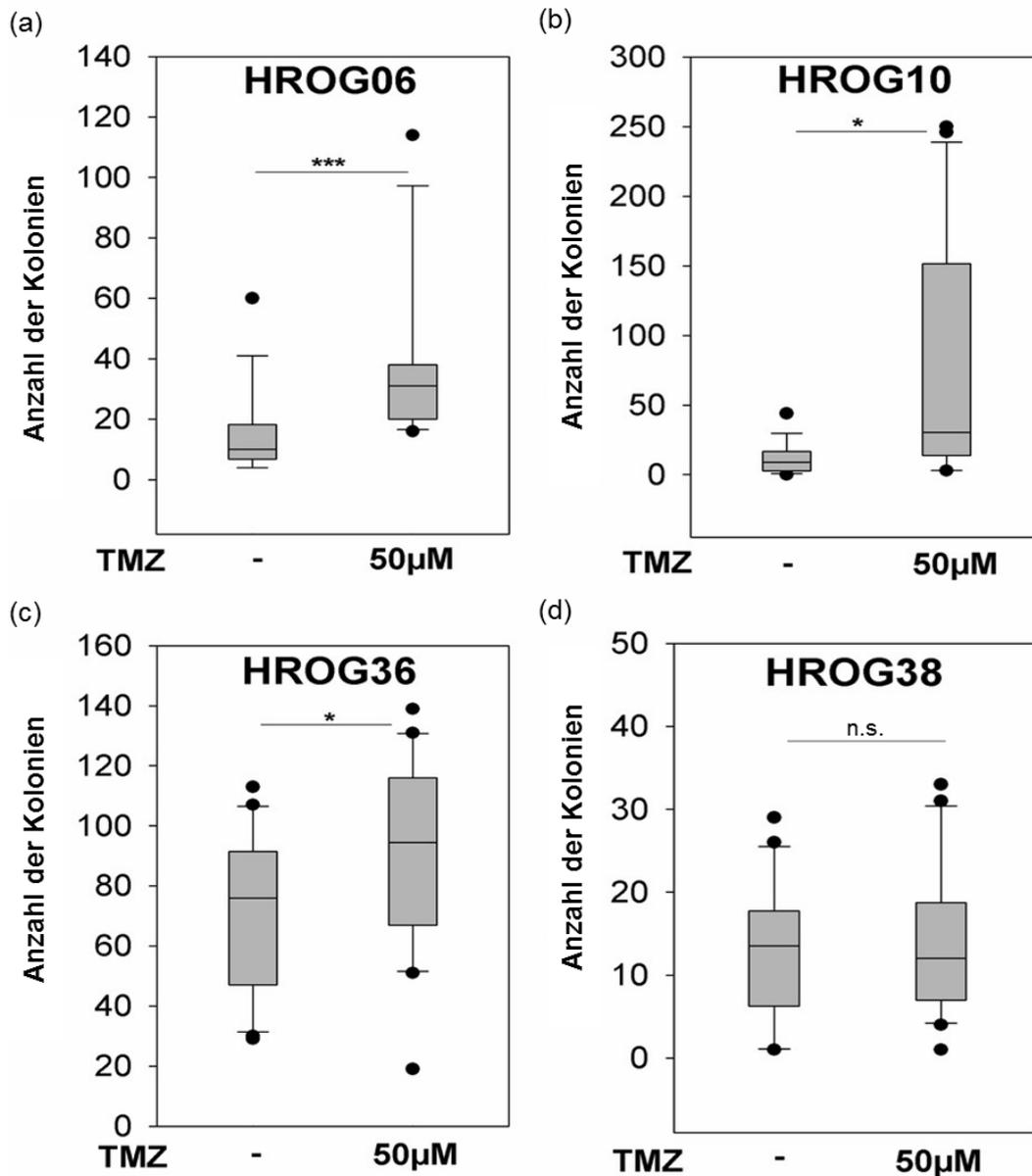
**Tab. 12: IC50-Werte der DCs und CSCs von 4 GBM-Zelllinien nach Chemosensibilisierung mit TMZ**

Zelllinie	IC50 DCs in mM	IC50 CSCs in mM
HROG06	1,28	1,6
HROG10	1,35	1,8
HROG36	1,0	1,0
HROG38	1,0	1,5

Bei der Testung der Chemosensibilität gegenüber TMZ der 4 verwendeten Primärzelllinien konnte zwischen den einzelnen Subpopulationen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 12a - d). Zudem lagen die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte bei allen DC- und deren entsprechenden Stammzell-Linien deutlich über der klinisch erreichbaren Plasmakonzentration von 50µM TMZ (Tab. 12).

#### **4.3.2. *In vitro* Tumorigenität der differenzierten Tumorzellen nach Behandlung mit Temozolomid**

Für die nachfolgenden Experimente wurde mit der TMZ-Konzentration von 50µM, die der klinisch relevanten Plasmakonzentration entspricht, gearbeitet. Um den Einfluss der TMZ-Behandlung auf die Tumorigenität der Zellen zu untersuchen, wurden die DCs mit 50µM TMZ behandelt und mit unbehandelten Zellen verglichen. Die Bestimmung der *in vitro* Tumorigenität erfolgte mittels Soft-Agar Assay.



**Abb. 13: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der *in vitro* Tumorigenität nach TMZ-Behandlung**

Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien von unbehandelten DCs und mit 50µM TMZ behandelten DCs der Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) nach 14d Inkubation in einem Soft-Agar Assay von insgesamt 4 unabhängigen Versuchen in Quinduplikaten.

Balken: Median; Box: Bereich in dem die mittleren 50% der Daten vorkommen; Whisker: Bereich in dem die mittleren 95% der Daten vorkommen; Punkte: Ausreißer. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , n.s.  $p > 0,05$ , Mann Whitney Rank sum test.

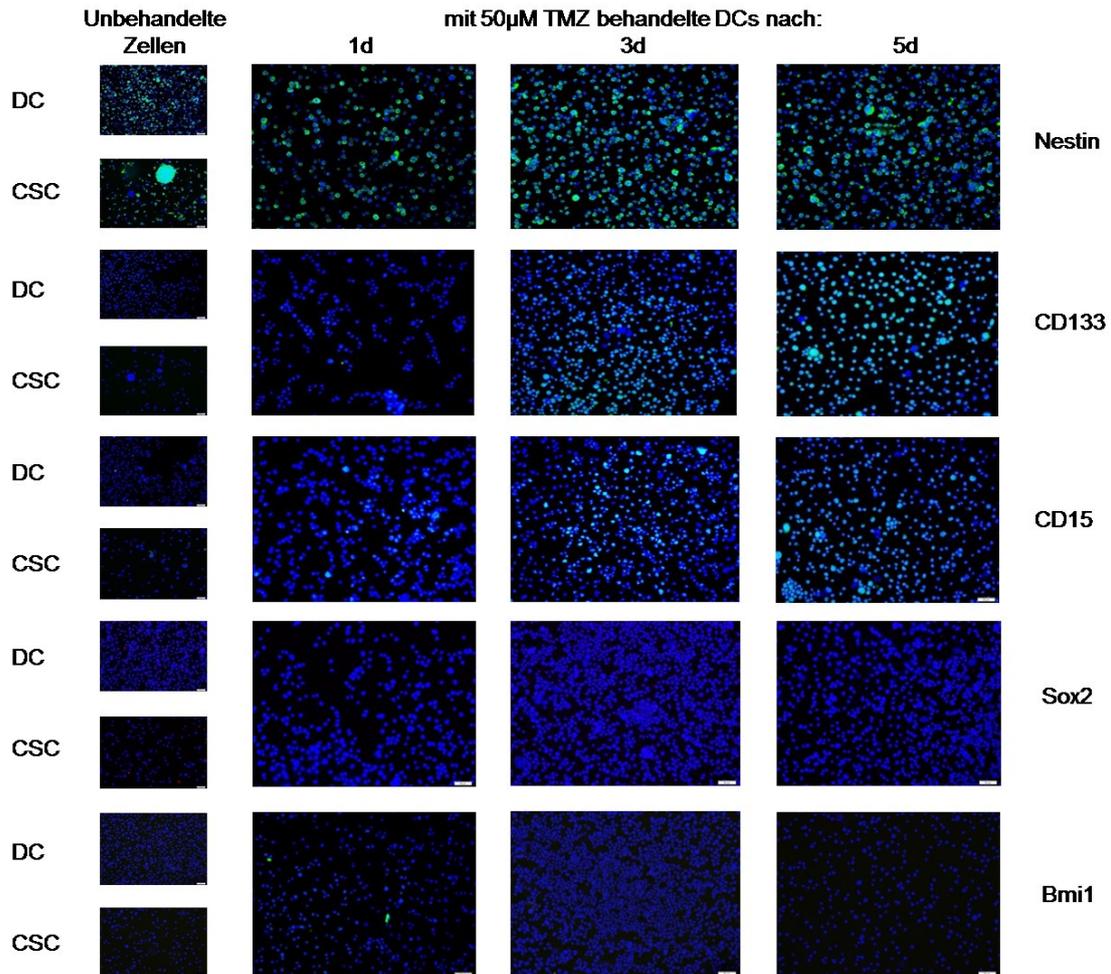
Bei allen 4 Zelllinien konnte eine im Mittel höhere Anzahl von Kolonien der TMZ-behandelten DCs im Vergleich zu den unbehandelten DCs beobachtet werden. 3 Zelllinien zeigten eine signifikant höhere *in vitro* Tumorigenität der DCs unter TMZ-Behandlung (HROG06:  $p < 0,001$ , HROG10:  $p = 0,001$ , HROG36:  $p = 0,031$ ). HROG38 zeigte zwischen den TMZ-behandelten und unbehandelten DCs keine signifikant unterschiedliche *in vitro* Tumorigenität ( $p = 0,935$ ). Alles in allem waren in 3 von 4 Fällen die mit TMZ behandelten DCs tumorigener als die unbehandelten DCs der gleichen Zelllinie (Abb. 13).

#### **4.3.3. Die phänotypische Veränderung der differenzierten Tumorzellen unter Temozolomid-Behandlung**

Neben der durch den Anstieg der Tumorigenität *in vitro* gezeigten funktionellen Umwandlung der DCs durch die TMZ-Behandlung wurde nun die Expression der verschiedenen Stammzell-Marker Nestin, CD133, CD15, Sox2 und Bmi1 mittels Immunfluoreszenz untersucht. Verglichen wurde dabei die Expression der Marker bei unbehandelten DCs und CSCs sowie bei mit 50 $\mu$ M TMZ behandelten DCs. Um einen Eindruck zu erhalten, ob und wie schnell die phänotypische Umwandlung einsetzt, wurden die DCs 1 - 5d konstant mit der gleichen Konzentration TMZ behandelt und täglich analysiert.

##### HROG06

Im Fall von HROG06 zeigte sich eine Expression von Nestin sowohl in den unbehandelten DCs, als auch in den unbehandelten CSCs. Im Verlauf der Behandlung mit 50 $\mu$ M TMZ konnte eine Steigerung der Expression beobachtet werden (1 - 5d). CD133 war in unbehandelten CSCs gering exprimiert und in unbehandelten DCs nicht nachweisbar. Jedoch stieg die CD133-Expression im Verlauf der TMZ-Behandlung an. CD15 präsentierte ein ähnliches Bild wie CD133; keine bis nur eine geringe Expression bei den unbehandelten Zellen und eine steigende Expression unter TMZ-Behandlung. Sox2 zeigte allenfalls eine geringe Expression bei unbehandelten CSCs. Die unbehandelten und die behandelten DCs zeigten keine Expression. Bmi1 ist für alle untersuchten Zellen negativ (Abb. 14).

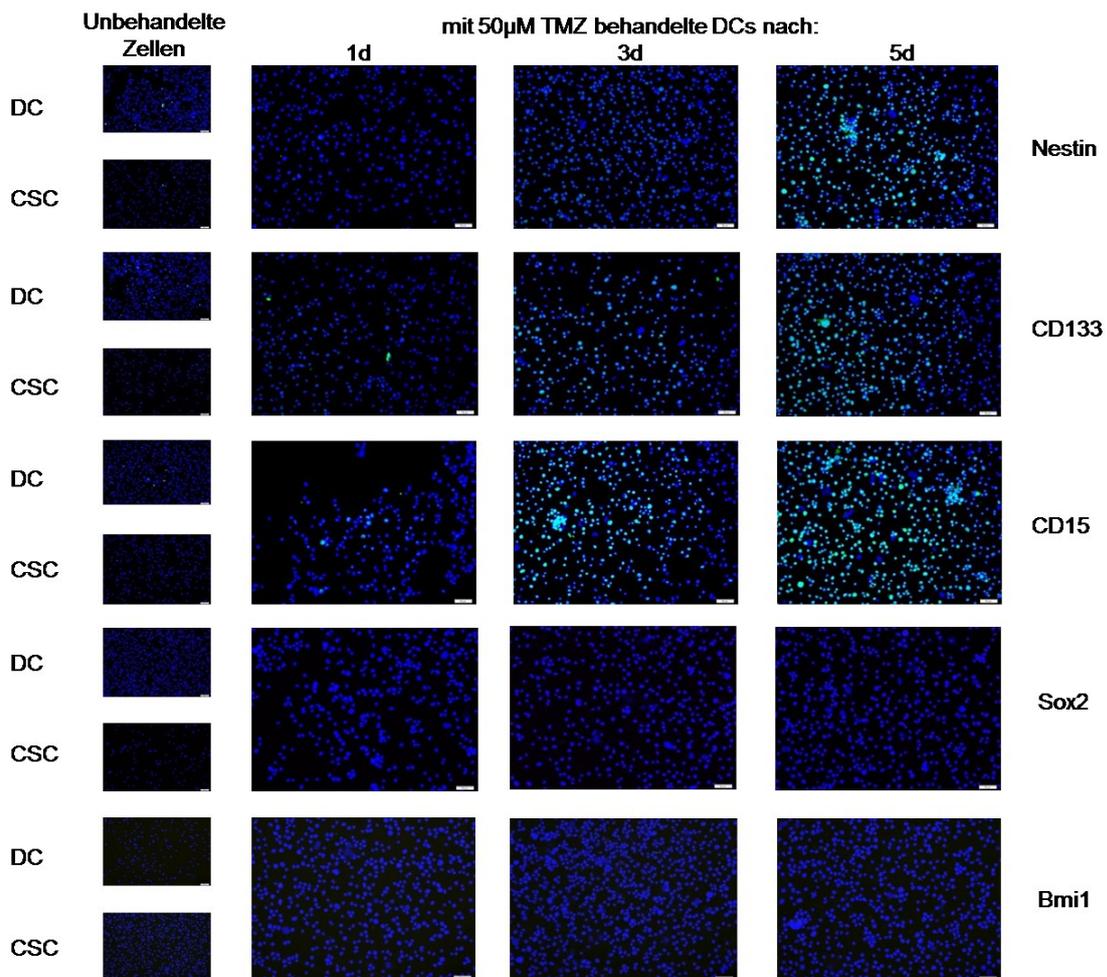


**Abb. 14: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG06**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von unbehandelten und mit 50µM TMZ behandelten Zellen nach 1, 3 und 5d Inkubation in Standard- bzw. Stammzell-Medium. Kernfärbung mit DAPI (blau). Färbung mit Stammzell-Markern Nestin (grün), CD133 (grün), CD15 (grün), Sox2 (rot) und Bmi1 (gelb).

## HROG10

Bei HROG10 zeigte sich lediglich eine schwache Expression von Nestin, CD133 und CD15 in den unbehandelten DCs und CSCs. Jedoch konnte eine Steigerung der Expression dieser 3 Marker unter TMZ-Behandlung beobachtet werden. Für die weiteren 2 Stammzell-Marker (Sox2 und Bmi1) ist sowohl in den unbehandelten Zellen, als auch in den behandelten DCs keine Expression nachzuweisen (Abb. 15).

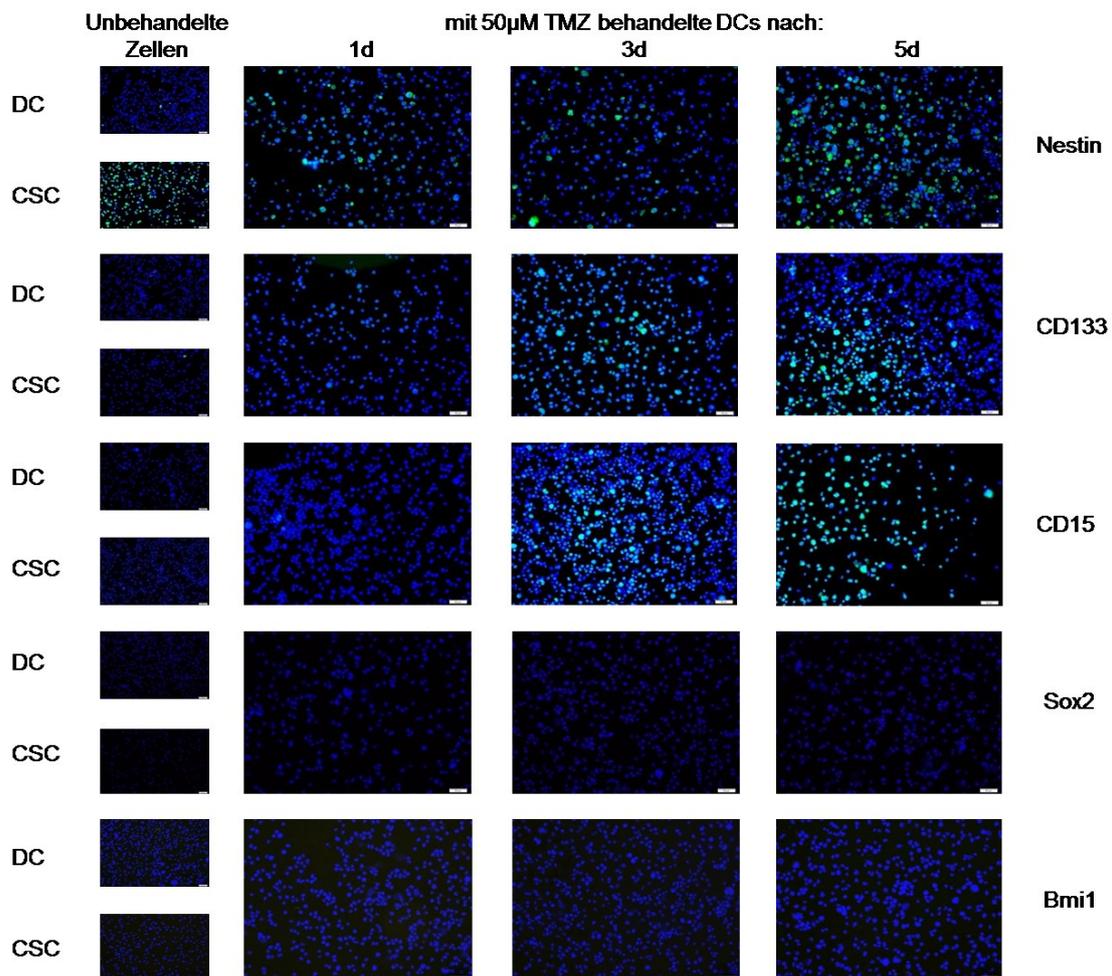


**Abb. 15: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG10**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von unbehandelten und mit 50µM TMZ behandelten Zellen nach 1, 3 und 5d Inkubation in Standard- bzw. Stammzell-Medium. Kernfärbung mit DAPI (blau). Färbung mit Stammzell-Markern Nestin (grün), CD133 (grün), CD15 (grün), Sox2 (rot) und Bmi1 (gelb).

## HROG36

Bei HROG36 zeigte sich eine starke Nestin-Expression der unbehandelten CSCs, nicht jedoch der unbehandelten DCs. Im Laufe der TMZ-Behandlung konnte bei dieser Zelllinie ebenfalls eine Steigerung der Nestin-Expression detektiert werden. Auch die Expression von CD133 und CD15, die für die unbehandelten DCs und CSCs nicht dargestellt werden konnte, nahm unter TMZ-Behandlung zu. Wie bei HROG10 konnte auch bei HROG36 keine Expression von Sox2 und Bmi1, unabhängig von der Subpopulation oder der TMZ-Behandlung, beobachtet werden (Abb. 16).

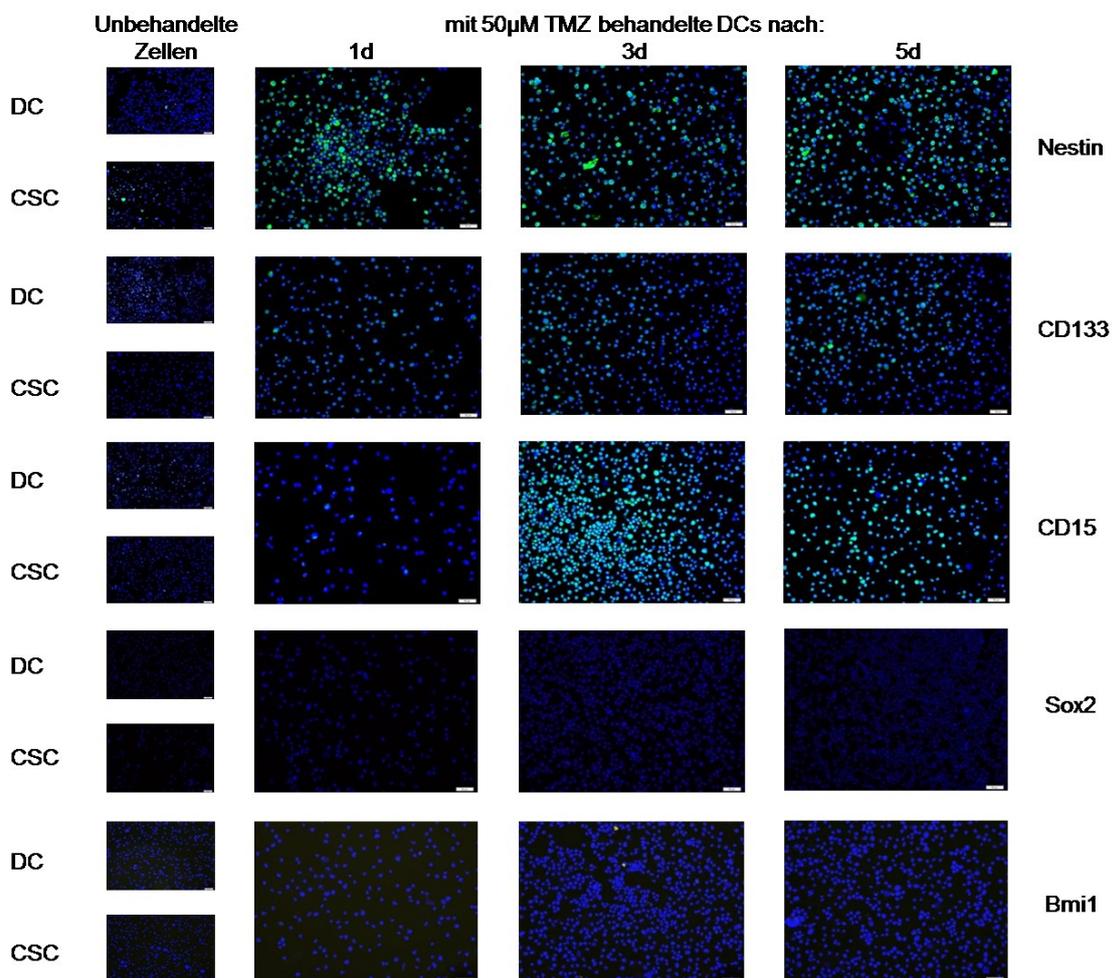


**Abb. 16: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG36**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von unbehandelten und mit 50µM TMZ behandelten Zellen nach 1, 3 und 5d Inkubation in Standard- bzw. Stammzell-Medium. Kernfärbung mit DAPI (blau). Färbung mit Stammzell-Markern Nestin (grün), CD133 (grün), CD15 (grün), Sox2 (rot) und Bmi1 (gelb).

## HROG38

HROG38 zeigte keine Nestin-Expression in den unbehandelten DCs und nur eine schwache Expression bei den CSCs. Unter TMZ-Behandlung konnte jedoch ein Anstieg der Nestin-Expression bei DCs beobachtet werden. CD133 war ebenfalls nur sehr schwach in den unbehandelten Zellen exprimiert. Dies änderte sich nicht wesentlich unter der TMZ-Therapie. Bei den unbehandelten DCs und CSCs zeigte sich eine leichte CD15-Expression, die durch die TMZ-Behandlung jedoch anstieg. Sox2 war in den unbehandelten und behandelten Zellen nicht exprimiert. Die Bmi1-Expression wurde allenfalls nur sehr schwach in den behandelten Zellen nachgewiesen (Abb. 17).



**Abb. 17: Immunfluoreszenzbilder unbehandelter DCs und CSCs sowie mit 50µM TMZ behandelte DCs der Zelllinie HROG38**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von unbehandelten und mit 50µM TMZ behandelten Zellen nach 1, 3 und 5d Inkubation in Standard- bzw. Stammzell-Medium. Kernfärbung mit DAPI (blau). Färbung mit Stammzell-Markern Nestin (grün), CD133 (grün), CD15 (grün), Sox2 (rot) und Bmi1 (gelb).

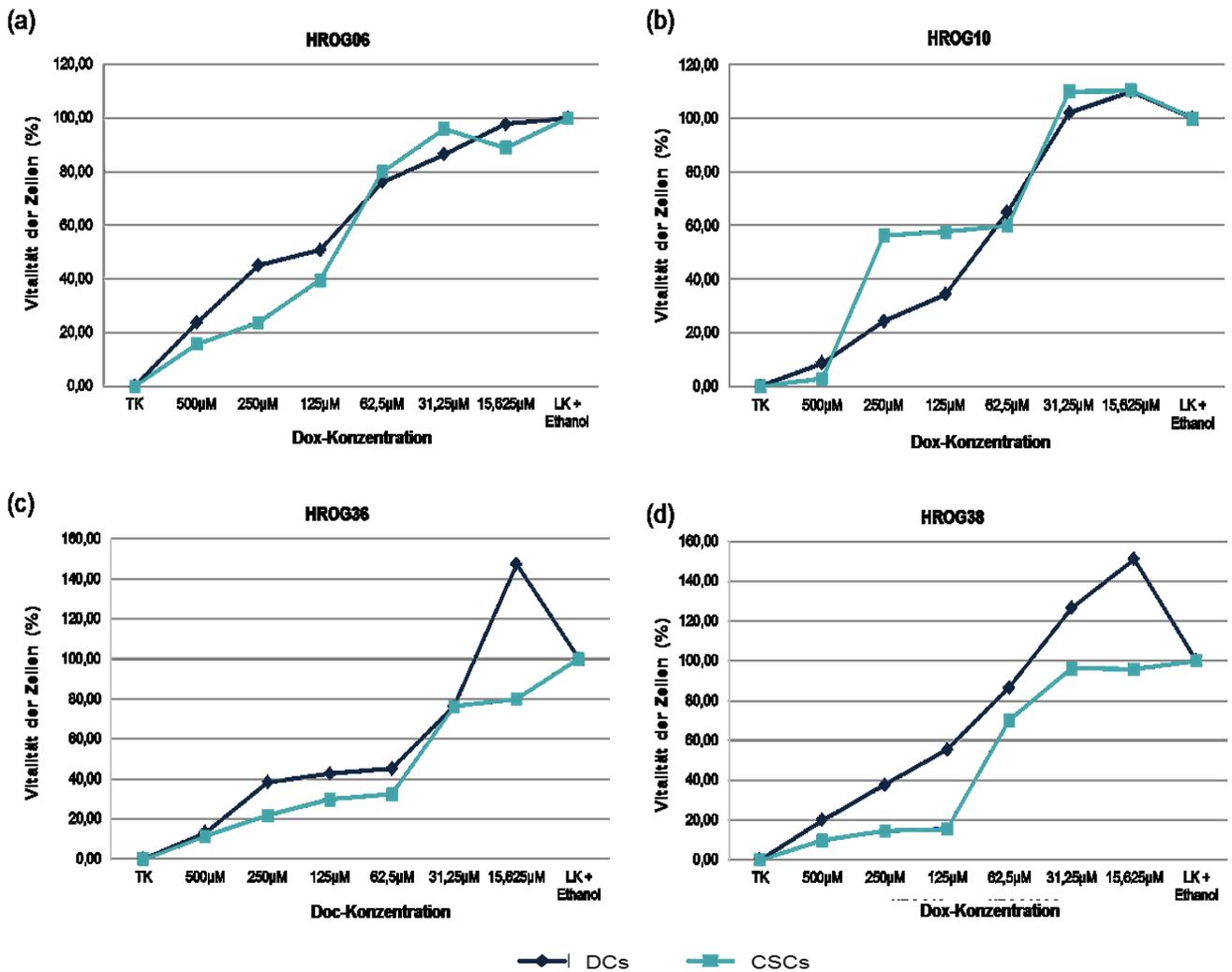
Durch die Behandlung der DCs mit 50µM TMZ konnte also eine Veränderung in der Expression von Stammzell-Markern gezeigt werden. Zusammen mit den Ergebnissen der funktionellen Analyse (*in vitro* Tumorigenität) zeigen diese Resultate eine Umwandlung der DCs in Zellen mit stammzellähnlichen Charakterzügen unter TMZ-Behandlung.

#### **4.4. Suppression der Temozolomid-induzierten Tumorigenität durch Doxyzyklin *in vitro***

In einer Studie von Lamb *et al.* konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Tumorigenität der GBM-CSCs durch verschiedene Antibiotika minimiert werden konnte. Dazu wurde u.a. das Antibiotikum Dox verwendet.<sup>120</sup> Dieser Effekt wurde nun anhand der 4 GBM-Primärzelllinien untersucht.

##### **4.4.1. Sensitivität gegenüber Doxyzyklin *in vitro***

Um die Sensitivität der Zellen gegenüber Dox zu untersuchen, wurden die DCs und CSCs der Zelllinien HROG06, HROG10, HROG36, HROG38 mit verschiedenen Dox-Konzentrationen behandelt (Abb. 18a - d).



**Abb. 18: Chemosensibilisierung gegenüber Dox**

Nach 2x72h-iger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums Dox (horizontale Achse) wurde die Vitalität der DCs und CSCs (vertikale Achse) der Zelllinie HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) verglichen. Zusammenfassung aus 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten.

Die Totkontrolle (TK) wurde durch das Abtöten der Zellen mit 70%-igen Ethanol erreicht. Die Zellen der Lebendkontrolle (LK+Ethanol) wurden mit Medium und Ethanol behandelt (Menge stimmt mit Ethanolgehalt des Dox-Stocks überein). Diese nahm den prozentualen Wert 100 an.

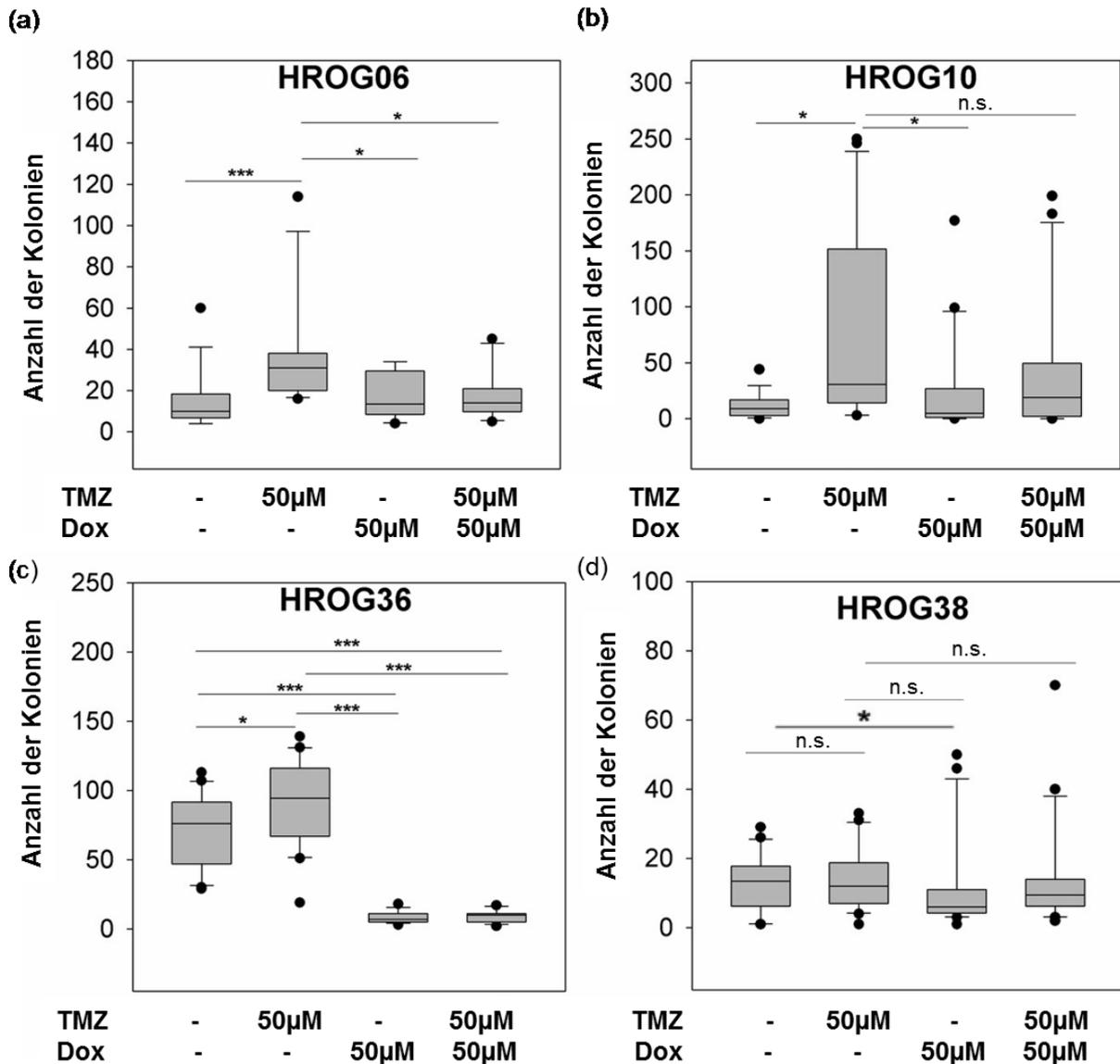
**Tab. 13: IC50-Werte der DCs und CSCs von 4 GBM-Zelllinien nach Chemosensibilisierung mit Dox**

<b>Zelllinie</b>	<b>IC50 DCs in <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>IC50 CSCs in <math>\mu\text{M}</math></b>
HROG06	155	110
HROG10	110	315
HROG36	155	110
HROG38	155	90

In allen 4 Fällen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen bezüglich der Sensitivität gegenüber Dox festgestellt werden (Abb. 18). Es zeigte sich jedoch in 3 von 4 Fällen (HROG06, HROG36 und HROG38) ein deutlich niedrigerer IC50 bei den CSCs im Vergleich zu den dazugehörigen DCs. Die ermittelten IC50-Werte aller GBM-Primärzelllinien lagen außerdem auch für Dox über der klinisch relevanten Plasmakonzentration von  $23,5\mu\text{M}$  (Tab. 13).

#### **4.4.2. *In vitro* Tumorigenität der differenzierten Tumorzellen nach Behandlung mit Temozolomid, Doxyzyklin und einer Kombination beider Medikamente**

In den nachfolgenden Experimenten wurde analysiert, ob die simultane Behandlung der GBM-Zelllinien mit Dox zur Verminderung der TMZ-induzierten *in vitro* Tumorigenität beitragen kann. Dazu wurden DCs mit  $50\mu\text{M}$  TMZ und  $50\mu\text{M}$  Dox simultan behandelt. Als Vergleichsgruppe dienten dabei DCs, die nur mit  $50\mu\text{M}$  TMZ bzw. nur mit  $50\mu\text{M}$  Dox behandelt wurden sowie unbehandelte DCs der 4 verwendeten Primärzelllinien.



**Abb. 19: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der *in vitro* Tumorigenität der DCs nach TMZ-Behandlung, Dox-Behandlung und einer Kombination beider Medikamente**

Verglichen wurde die Anzahl der Kolonien von unbehandelten DCs und mit 50µM TMZ, 50µM Dox und einer Kombination beider Medikamente behandelten DCs der Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) nach 14d Inkubation in einem Soft-Agar Assay von insgesamt 4 unabhängigen Versuchen in Quinduplikaten.

Balken: Median; Box: Bereich in dem die mittleren 50% der Daten vorkommen; Whisker: Bereich in dem die mittleren 95% der Daten vorkommen; Punkte: Ausreißer. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , n.s.  $p > 0,05$ , Mann Whitney Rank sum test.

Für die Zelllinie HROG06 konnte ein signifikanter Unterschied der *in vitro* Tumorigenität zwischen den unbehandelten und mit 50µM TMZ behandelten Zellen festgestellt werden ( $p < 0,001$ ). Die mit TMZ-behandelten Zellen waren deutlich tumorigener als die unbehandelten DCs. Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den mit 50µM TMZ und den mit 50µM Dox behandelten DCs ( $p = 0,011$ ) sowie zwischen den mit 50µM TMZ behandelten DCs und den Zellen, die mit beiden Medikamenten behandelt wurden ( $p = 0,004$ ), für die Zelllinie HROG06 beobachtet werden. Dabei nahmen die (zusätzlich) mit 50µM Dox behandelten Zellen eine deutlich geringere *in vitro* Tumorigenität an (Abb. 19a).

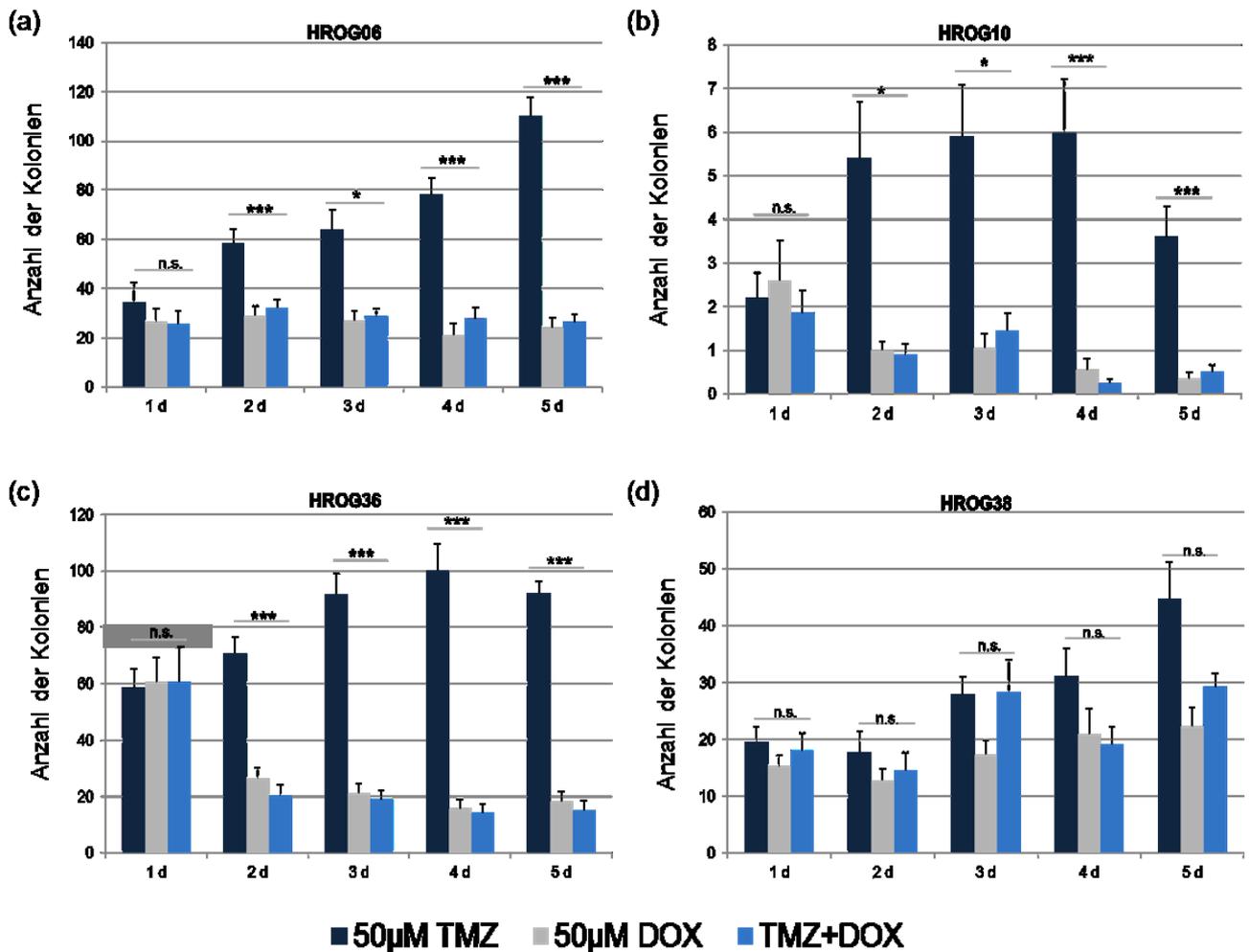
Die mit 50µM TMZ behandelten DCs der Zelllinie HROG10 zeigten ebenfalls eine signifikant gesteigerte *in vitro* Tumorigenität im Vergleich zu den unbehandelten DCs ( $p = 0,001$ ). Durch die Co-Behandlung mit Dox konnte hier zwar eine Minderung der *in vitro* Tumorigenität im Vergleich zu den Zellen, die allein mit 50µM TMZ behandelt wurden, erzielt werden, jedoch ohne Signifikanz ( $p = 0,066$ ). Der Unterschied zwischen den mit 50µM TMZ und den mit 50µM Dox behandelten Zellen war bei HROG10 signifikant ( $p = 0,003$ ) (Abb. 19b).

Die *in vitro* Tumorigenität der Zellen der Linie HROG36 war bezüglich der verschiedenen Behandlungsmuster stets signifikant unterschiedlich. So konnte auch hier eine gesteigerte *in vitro* Tumorigenität der mit 50µM TMZ behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten DCs festgestellt werden ( $p = 0,031$ ). Die Zellen, die mit 50µM Dox sowie mit 50µM TMZ und 50µM Dox behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den Zellen mit der alleinigen Behandlung von 50µM TMZ eine hochsignifikant geringere *in vitro* Tumorigenität ( $p < 0,001$ ). Außerdem konnte für HROG36 ein signifikanter Unterschied zwischen den *in vitro* Tumorigenitäten der unbehandelten DCs zu den mit 50µM Dox und mit 50µM TMZ und 50µM Dox behandelten Zellen beobachtet werden ( $p < 0,001$ ) (Abb. 19c).

Die *in vitro* Tumorigenitäten der Zellen von HROG38 zeigten lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen den mit 50µM TMZ behandelten Zellen zu den mit 50µM Dox behandelten DCs ( $p = 0,031$ ). Die weiteren Behandlungsvarianten waren untereinander und im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in Bezug auf die *in vitro* Tumorigenität nicht signifikant unterschiedlich (unbehandelte DCs zu 50µM TMZ:  $p = 0,935$ ; 50µM TMZ zu 50µM Dox:  $p = 0,076$ ; 50µM TMZ zu 50µM TMZ + 50µM Dox:  $p = 0,386$ ) (Abb. 19d).

#### **4.4.3. Zeitverläufe unterschiedlicher Behandlungsvarianten *in vitro***

Um sich genauer mit der Steigerung der *in vitro* Tumorigenität durch TMZ-Therapie und der Eindämmung derer durch Dox zu beschäftigen, wurde in den weiteren Experimenten die Eintrittsgeschwindigkeit der Effekte untersucht. Dazu wurden die DCs 1 - 5d konstant mit der gleichen Konzentration der Medikamente behandelt. Verglichen wurde ebenfalls die *in vitro* Tumorigenität von DCs, die allein mit 50µM TMZ, 50µM Dox, sowie mit einer Kombination beider Medikamente behandelt wurden. Alle Zellen inkubierten 14d in Soft-Agar Assay und wurden anschließend analysiert.



**Abb. 20: Colony Formation Assay in Soft-Agar zur Bestimmung der *in vitro* Tumorigenität der DCs nach TMZ-Behandlung, Dox-Behandlung und einer Kombination beider Medikamente im zeitlichen Verlauf von 5d**

Die *in vitro* Tumorigenität unterschiedlicher Behandlungsschemata (50µM TMZ, 50µM Dox und 50µM TMZ + 50µM Dox) der Zelllinien HROG06 (a), HROG10 (b), HROG36 (c) und HROG38 (d) wurde innerhalb der Behandlungsdauer von 5d (horizontale Achse) anhand der Anzahl an Kolonien (vertikale Achse) bestimmt. Dazu wurden 4 unabhängige Versuche in Quinduplikaten durchgeführt.

Säulen = Mittelwert, Fehlerbalken = Standardfehler. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , n.s.  $p > 0,05$ , Mann Whitney Rank sum test.

Nach eintägiger Behandlung der DCs von 4 Primärzelllinien mit 50µM TMZ, 50µM Dox und einer Kombination beider Medikamente ist kein signifikanter Unterschied der *in vitro* Tumorigenitäten zwischen den einzelnen Behandlungsvarianten festzustellen (HROG06:  $p=0,223$ , HROG10:  $p=0,468$ , HROG36:  $p=0,425$ , HROG38:  $p=0,371$ ) (Abb. 20). Bereits nach dem 2. Behandlungstag konnte jedoch für die Zelllinien HROG06, HROG10 und HROG36 ein signifikanter Unterschied zwischen den mit 50µM TMZ behandelten DCs und den mit 50µM TMZ und 50µM Dox behandelten DCs sowie den Zellen, die nur mit 50µM Dox behandelt wurden, beobachtet werden (HROG06:  $p<0,001$ , HROG10:  $p=0,002$ , HROG36:  $p<0,001$ ) (Abb. 20a - c).

Im Verlauf der nächsten 3 Behandlungstage zeigte sich eine Steigerung der *in vitro* Tumorigenität der mit 50µM TMZ behandelten DCs in allen 4 Fällen (Abb.20). Die Suppression der *in vitro* Tumorigenität der TMZ-behandelten DCs durch 50µM Dox blieb im Verlauf des 2. - 5.d bei den Zelllinien HROG06, HROG10 und HROG36 weitestgehend konstant und zeigte somit weiterhin signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsschemata (Vergleich 50µM TMZ zu 50µM TMZ & 50µM Dox: HROG06: 3. - 5.d  $p<0,001$ ; HROG10: 3.d  $p=0,002$ , 4./5.d  $p<0,001$ ; HROG36: 3. - 5.d  $p<0,001$ ) (Abb. 20a-c).

Die Zelllinie HROG38 stellte sich unspezifischer dar. Hier konnte kein signifikanter Unterschied der *in vitro* Tumorigenitäten zwischen den TMZ-behandelten DCs und den TMZ- und Dox-behandelten DCs sowie zwischen den TMZ-behandelten und Dox-behandelten Zellen (2.d  $p=0,316$ ; 3.d  $p=0,645$ ; 4.d  $p=0,116$ ; 5.d  $p=0,087$ ) festgestellt werden (Abb. 20d).

## 5. Diskussion

In dieser Studie wurden die unterschiedlichen Zellsubpopulationen von 4 GBM-Primärzelllinien untersucht und die *in vitro* Tumorigenität, Stammzell-Marker Expression und das Ansprechen auf TMZ und Dox der einzelnen Subpopulationen verglichen.

Auf der Basis der zuvor in der Arbeitsgruppe etablierten, patientenindividuellen GBM-Primärzelllinien wurden zunächst CSCs *in vitro* angereichert.<sup>134</sup> Ausgehend von DCs wurden durch Kultivierung der Zellen in Stammzell-Medium (DMEM/Ham's F12, 2mM L-Glutamin, 1x B-27, 10ng/ml bFGF, 20ng/ml rhEGF) CSCs *in vitro* gewonnen. Diese Methode wurde bereits vor vielen Jahren zur Gewinnung von Tumorstammzellen angewandt und hat bis heute großen Bestand in der Forschung.<sup>143</sup> Wie einleitend beschrieben, basiert die Theorie der einzelnen Subpopulationen eines Tumors auf der Zelldifferenzierung ausgehend von Tumorstammzellen zu einer großen Anzahl an ausdifferenzierten Tumorzellen (Stammzell-Hypothese nach Reya *et al.*).<sup>49</sup> In dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurden die CSCs jedoch aus den unter Standardbedingungen kultivierten Primärzelllinien mittels serumfreiem Medium angereichert. Einige Studien deuten darauf hin, dass die DCs eines Tumors unter bestimmten Umständen die Fähigkeit der Entdifferenzierung besitzen. Das bedeutet, dass diese Subpopulation Stammzeleigenschaften annehmen kann.<sup>144</sup> Durch die Umkehrung der Zelldifferenzierung, wie sie einst von Wang *et al.* und Safa *et al.* beschrieben wurde (stochastisches Modell), scheint die Zellhierarchie eines Tumors vollkommen aufgelöst.<sup>64,65</sup> Dieses Phänomen könnte, neben der Stammzell-Medium-vermittelten Separierung der Subpopulationen zugunsten von CSCs, für deren vermehrte Anreicherung *in vitro* ursächlich sein.

Durch die veränderten Kulturbedingungen *in vitro* konnten Unterschiede in der Morphologie der Zelllinien beobachtet werden (Abb. 10). Hierbei zeigten die verschieden kultivierten Primärzelllinien ein heterogenes Bild. Die DCs aller 4 Zelllinien wuchsen ausschließlich adhärent, wohingegen die CSCs ein semi-adhärentes (HROG36 und HROG38) bis sphärisches (HROG06 und HROG10) Wachstum aufwiesen (Abb. 10). Westhoff *et al.* beschrieben bereits, dass die Subpopulation der DCs Zell-Substrat-Wechselwirkungen bevorzugen.<sup>145</sup> Diese Erkenntnisse passen zu den hier erhobenen Daten und könnten die Adhäsion der DCs an der Kulturflasche mitbegründen. Konträr dazu scheinen Tumorsphären durch Zell-Zell-Wechselwirkungen

definiert zu werden. In den ersten Publikationen zu GBM-CSCs wurde bereits von einem sphärischen Wachstumsmuster berichtet, welches als charakteristisch für die neuronalen Stammzellen galt.<sup>146,147</sup> Erst in späteren Publikationen unterschiedlicher Arbeitsgruppen haben sich Eigenschaften herauskristallisiert, die die CSCs genauer definieren. Dazu gehören die Fähigkeiten der Tumorigenität, Selbsterneuerung und Differenzierung der Zellen, die gesteigerte *in vitro* Tumorigenität sowie die Expression von Stammzell-Markern.<sup>49,54,59,148,149</sup>

Gunther *et al.* zeigten, dass das sphärische Wachstum der Tumorzellen mit einer erhöhten *in vitro* Tumorigenität und deutlichen Expression von Stammzell-Marker assoziiert werden konnte. Im Gegensatz dazu exprimierten die adhären wachsenden Zellen keine Stammzell-Marker und waren weniger tumorigen.<sup>148</sup> Da eine genaue Differenzierung der einzelnen Subpopulationen anhand der Morphologie in dieser Arbeit nicht verdeutlicht werden konnte, wurde die *in vitro* Tumorigenität der unterschiedlichen Zelllinien durch Colony Formation Assays in Soft-Agar untersucht (Abb. 11). Bei 3 von 4 untersuchten Zelllinien wiesen die Zellen, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, eine signifikant höhere *in vitro* Tumorigenität auf. Dies lässt auf eine erfolgreiche Anreicherung der CSCs *in vitro* schließen. Unklar bleibt jedoch, ob diese verschiedenen Eigenschaften auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen sind, die während der (Ent-)Differenzierung auftraten oder die Folge verschiedener Kultivierungsmethoden sein könnten.

Die Zellen der Zelllinie HROG38 zeigten zwischen den Subpopulationen weder morphologisch noch funktionell signifikante Unterschiede. Dies könnte an der intertumoralen Heterogenität von GBM liegen oder auch durch die *in vitro* erschwerten Differenzierungsbedingungen verursacht sein. Wahrscheinlicher ist, dass in diesem Fall die CSCs *in vitro* nicht angereichert werden konnten.

Insgesamt konnte eine Trennung zweier unterschiedlicher GBM-Subpopulationen *in vitro* dargestellt werden. Sowohl das sphäroide Wachstum als auch die gesteigerte *in vitro* Tumorigenität scheinen für die CSCs charakteristisch, aber nicht essentiell zu sein. Ein sphäroides Wachstumsmuster in der DC-Subpopulation ist hingegen *in vitro* nicht zu erwarten.

Um den Einfluss des Standardtherapeutikums Temozolomid und dessen Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die GBM-

Tumorzellen mit TMZ behandelt. Zur Bestimmung der zu verwendenden TMZ-Konzentration wurden im Vorfeld Chemosensitivitätsbestimmungen in Triplikaten durchgeführt, wobei alle getesteten Zelllinien mit IC50 Werten von mehr als 1mM als resistent gegenüber TMZ definiert wurden (Abb. 12). Zudem zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Sensitivität von DCs und CSCs gegenüber TMZ.

Erklärend dafür kann zum einen erneut die intra- und intertumorale Heterogenität von GBM und somit das unterschiedliche Ansprechen auf Zytostatika sein. Zum anderen agiert TMZ als sogenannte „Prodrug“. Diese kann sich in einem schmalen alkalischen pH-Fenster spontan in ihre aktive Form umwandeln.<sup>38</sup> Gegebenenfalls kommt es *in vitro* zu einem Über- oder Unterschreiten der benötigten pH-Spanne, wodurch das Ansprechen der Zellen auf TMZ beeinflusst werden könnte.<sup>150</sup> Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte das Ansprechen von TMZ durch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subpopulationen gezeigt werden (z.B. Soft-Agar Assays). Demzufolge scheint lediglich die zytotoxische Wirkung von TMZ auf die Zellen *in vitro* nicht realitätsgetreu dargestellt werden zu können.

Für das weitere Vorgehen wurde eine TMZ-Konzentration von 50 µM verwendet, die dem therapeutischen Plasmaspiegel entspricht und auch in *in vitro* Versuchen anderer Arbeitsgruppen zur Anwendung kam.<sup>66</sup>

Die Behandlung der DCs mit 50µM TMZ zeigte auf funktionaler Ebene einen deutlichen Effekt auf die *in vitro* Tumorigenität in 3 von 4 getesteten Zelllinien (Abb. 13). Die unbehandelten DCs präsentieren sich, wie bereits im Vergleich mit den CSCs beobachtet wurde, mit einer geringen *in vitro* Tumorigenität. Diese Eigenschaft wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen anderer Institute als typisch für diese Zellpopulation beschrieben und stellt sich in dieser Arbeit ebenfalls dar.<sup>49,64</sup> Die mit 50µM TMZ behandelten DC-Zelllinien wiesen jedoch, analog zu den CSC-Zelllinien, in 3 von 4 Fällen eine signifikant gesteigerte *in vitro* Tumorigenität auf.

Die Theorie, dass die langsam proliferierenden CSCs im Grunde deutlich therapieresistenter sind, als die schnell proliferierende Subpopulation der DCs<sup>49</sup>, stellt sich unter anderem durch unsere Ergebnisse (Chemosensibilisierung und Soft-Agar Assays) als eine zu grobe Vereinfachung dar. Die oft als typische Stammzeleigenschaft beschriebene gesteigerte *in vitro* Tumorigenität kann nicht per se der Subpopulation der CSCs zugeordnet werden. Es scheint vielmehr so, als würde der Zustand, indem sich die Zellen befinden, die *in vitro* Tumorigenität beeinflussen. So widersprechen die hier

erworbenen Erkenntnisse der von Raye *et al.* aufgestellten Stammzell-Hypothese und unterstützen vielmehr das stochastische Tumormodell. Demzufolge können DCs, eventuell durch chemotherapeutisch verursachten Stress, Stammzeleigenschaften, wie in diesem Fall eine gesteigerte *in vitro* Tumorigenität, annehmen. Dadurch kann die Resistenzentwicklung und Progression eines Tumors vorangetrieben werden. Dass die Elimination von chemo-sensiblen Zellen mit Überleben der chemo-resistenten Zellen eines anfangs heterogenen Tumors für die hier gesteigerte *in vitro* Tumorigenität verantwortlich sein soll, ist eher unwahrscheinlich. Wie bereits anhand der Morphologie und *in vitro* Tumorigenität der 4 Zelllinien gezeigt wurde, war eine Trennung der Subpopulationen *in vitro* in 3 von 4 Fällen gelungen (Abb. 10 und 11). Das bedeutet, dass einzig die Zellen behandelt wurden, die zu diesem Zeitpunkt eine geringe *in vitro* Tumorigenität aufwiesen und somit als DC-Subpopulation galten, wodurch die Hypothese der Umwandlung von DCs in CSCs unterstützt wird.

Die erworbene TMZ-Resistenz könnte jedoch auch eine Folge von medikamenteninduzierten genetischen und epigenetischen Veränderungen in GBM-Zellen sein.<sup>151</sup> Dadurch könnten Gene induziert und selektiert werden, die einen Überlebensvorteil bieten. Beispielsweise haben Alvino *et al.* herausfinden können, dass eine TMZ-vermittelte Resistenzentwicklung in Melanomzellen durch eine gesteigerte MGMT-Aktivität zu begründen war. Außerdem scheinen dort medikamenteninduzierte Veränderungen in apoptotischen Wegen (z.B.: MMR) eine Rolle zu spielen.<sup>151</sup> Ähnliches könnte auch für GBM zutreffend sein.

TMZ wirkt durch Methylierung unterschiedlicher Basen zytotoxisch auf die Tumorzellen und verursacht dadurch den Zelltod. Die Resistenzentwicklung von GBM-Zellen gegenüber TMZ nimmt jedoch in der Realität stetig zu. Diese scheint unter anderem durch die DNA-Reparationskapazität der eukaryotischen Zellen verstärkt zu werden.<sup>95,152</sup>

Einer der bis heute am meisten diskutierten Angriffspunkte von TMZ ist die Base O6-Guanin, deren Reparatur durch den MGMT-Promotor-Status bestimmt wird. In dieser Studie weisen alle der 4 verwendeten Primärzelllinien einen unmethylierten MGMT-Promotorstatus auf (Tab. 8). Bei nicht-methyliertem Promotor und somit aktivem MGMT kann das Reparatur-Enzym die von TMZ verursachten DNA-Schäden wieder beheben, wodurch eine verstärkte TMZ Resistenz der Zellen zu erklären wäre.<sup>97</sup> Vorangegangene Studien zeigten, dass das Reparatur-Enzym MGMT sowohl im

Nucleus (nucl-MGMT), als auch in Mitochondrien (mito-MGMT) zu finden ist. Vor allem die Überexpression der mito-MGMT scheint die Resistenzentwicklung voranzutreiben.<sup>152</sup>

Eine phänotypische und funktionelle Umwandlung der DCs unter TMZ-Behandlung in CSCs kann durch den MGMT-Promotorstatus allein nicht sicher erklärt werden. Dieser kann jedoch nach einer solchen Umwandlung zur Aufrechterhaltung der TMZ-Resistenz beitragen.

Quantitativ am häufigsten verursacht TMZ eine Methylierung der Basen N7-Guanin und N3-Adenin, welche durch BER schnellstmöglich repariert werden.<sup>153</sup> Infolgedessen kommt es nicht wie erwünscht zu einem medikamenteninduzierten Zelltod, sondern zu einer verstärkten TMZ-Resistenzentwicklung. Falls es jedoch zu einer BER-Inhibition kommt, zeigt besonders N3-MeA (methyliertes N3-Adenin) eine zytotoxische Wirkung, wodurch folglich die erwünschte TMZ-Wirkung eintritt. Diese Effekte könnten zusätzlich zu der in dieser Arbeit untersuchten Umwandlung von DCs in CSCs unter TMZ-Therapie relevant sein und zur Entwicklung der TMZ-Resistenz beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen intratumoralen Populationswechsel der Zellen hin. Dadurch kommt es zum Verlust der Zellhierarchie. Wie von Wang *et al.* sowie Safa *et al.* beschrieben wurde, können DCs unter bestimmten Umständen durch Entdifferenzierungsschritte Stammzeleigenschaften, wie die gesteigerte *in vitro* Tumorigenität annehmen.<sup>64,65</sup> Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht ausreichend geklärt. Es kann dennoch spekuliert werden, dass DCs durch den TMZ-induzierten Stress eine vermehrte Expression von anti-apoptotischen Proteinen und ABC-Transportern durch das Multidrug-Resistance-Gen aufweisen. Dadurch kann von einer erhöhten Chemo- und Strahlenresistenz ausgegangen werden.<sup>101</sup>

Des Weiteren machten Auffinger *et al.* die Umwandlung der Mikroumgebung durch TMZ, die zu hypoxischen und azidotischen Umständen führte („Stammzell-Nische“), für die erleichterte Konversion zwischen den Subpopulationen verantwortlich. Hierbei könnten besonders MMPs eine wichtige Rolle spielen. In einer großen Anzahl an Tumoren sind MMPs überexprimiert. Diese Expression geht zum Teil direkt von den Tumorzellen aus.<sup>154–156</sup> MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen, die die EZM degradieren können. Folglich kommt es zu einer vermehrten Proliferation, Invasion und

Zellmigration, was schließlich zu einem erhöhten Tumorwachstum, Metastasierung und Neovaskularisierung führt.<sup>157–159</sup>

Die EZM stellt als physikalische Barriere ebenfalls eine wichtige Komponente der „Stammzell-Nische“ dar. Es ist wahrscheinlich, dass durch die TMZ-Therapie-induzierte Umverteilung der Mikroumgebung eine erhöhte Steifigkeit der EZM verursacht wird, die den Durchtritt der Therapeutika blockiert. Folglich verliert TMZ seine vollständige Wirksamkeit, wodurch die Resistenzentwicklung ebenfalls vorangetrieben wird.

In dieser Studie konnten die letztgenannten Punkte nicht weiter untersucht werden, da bei *in vitro*-Versuchen die Versuchsbedingungen bezüglich der Mikroumgebung nicht realitätsgetreu wiedergegeben werden können. So kann beispielsweise eine Beurteilung der EZM oder auch der „Stammzell-Nische“ nicht stattfinden. Nichtsdestoweniger können die genannten Faktoren im Gesamtbild zusätzlich eine entscheidende Rolle spielen.

Hauptverantwortlich für die Konversion der Subpopulationen *in vitro* scheint jedoch eine direkte Wirkung von TMZ auf die GBM-Tumorzellen zu sein. Eventuell durch Chemotherapie-induzierte Genveränderungen oder auch durch TMZ-vermittelten zytotoxischen Stress nahmen die DCs der verwendeten Primärzelllinien in 3 von 4 Fällen eine gesteigerte *in vitro* Tumorigenität an. Für die Zelllinie HROG38 konnte, wie bei den Vorversuchen, auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies spricht für eine stark ausgeprägte Heterogenität in GBM. So scheinen einige GBM-Tumoren leichter im Vergleich zu anderen dazu befähigt zu sein, einen intratumoralen Populationswechsel vollziehen zu können. Es kann spekuliert werden, dass diese funktionelle Umwandlung der Zellen durch mehrere Faktoren beeinflusst wird. Daher könnten *in vivo* andere Ergebnisse auftreten als *in vitro*.

Auffinger *et al.* zeigten nach Ausschluss von Selektion und Expansion der CSCs neben der funktionellen auch eine TMZ-induzierte phänotypische Umwandlung der DCs in CSCs *in vitro*.<sup>66</sup> Unter Verwendung von klassischen Stammzell-Markern (Nestin, CD133, Sox2 u.v.m.) konnte nach langfristiger Exposition gegenüber klinisch relevanten Dosen von TMZ eine konsequente Zunahme mehrerer phänotypischer und funktionaler Stammzell-Marker bei allen verwendeten GBM-Zelllinien festgestellt werden.<sup>66</sup> Um neben der gesteigerten Tumorigenität *in vitro* auch die phänotypische Modifikation der Zellen für die hier verwendeten Primärzelllinien und dabei insbesondere das Verhalten

der Stammzell-Marker auf behandelte DCs zu untersuchen, wurde die Expression von CD133, CD15, Nestin, Sox2 und Bmi1 bestimmt (Abb. 14 - 17). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass die Stammzell-Marker-Expression von Nestin, CD133 und CS15 bei den DCs aller 4 verwendeter Primärzelllinien mit steigender TMZ-Behandlungsdauer anstieg. Dies legt den Schluss nahe, dass die TMZ-induzierte phänotypische Umwandlung der DCs in CSCs im Laufe einiger Tage eintritt, wie es Auffinger *et al.* bereits an GBM-Zellen beschrieben haben. Eine Veränderung der Expression von Sox2 und Bmi1 mit fortlaufender TMZ-Behandlung konnte nicht festgestellt werden. Außerdem konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen den unbehandelten DCs und CSCs lediglich für den Marker Nestin bei den Zelllinien HROG36 und HROG38 gezeigt werden. Bezogen auf andere Marker und Zelllinien konnte keine Diskrepanz festgestellt werden. Diese Ergebnisse stellen die Validität der verwendeten Stammzell-Marker in Frage. In der Literatur sind die genannten Stammzell-Marker bei GBM ohnehin sehr umstritten. Nur wenige Studien konnten die Aussagekraft der Stammzell-Marker durch signifikante Unterschiede zwischen DCs und CSCs unterstreichen. Der Großteil der Arbeiten zeigte unklare Ergebnisse. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass CD133<sup>-</sup>-Zellen annähernd gleiche Stammzelleigenschaften (gesteigerte *in vitro* Tumorigenität, Chemo- und Strahlenresistenz etc.) aufweisen konnten, wie CD133<sup>+</sup>-Zellen. Interessanterweise berichteten Brescia *et al.*, dass die Zellhierarchie zwischen CD133<sup>+</sup>- und CD133<sup>-</sup>-Zellen aufgehoben ist und damit die Funktion zur Detektion von Zellen mit Stammzelleigenschaften entfällt.<sup>160</sup> In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden die Stammzell-Marker ebenso als nicht präzise genug interpretiert, um eine genaue phänotypische Unterscheidung der Zellsubpopulationen vornehmen zu können. In der Studie von Auffinger *et al.* wurden im Gegensatz zu dieser Arbeit DCs aus Xenografts von humanen Tumoren verwendet, für die eine bessere Validität der Stammzell-Marker-Expression beschrieben ist. Demnach ist die beschriebene Konversion der Zellen durchaus plausibel und kann dennoch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit assoziiert werden.

Insgesamt konnte bereits nach 48h ein signifikanter Anstieg der *in vitro* Tumorigenität (Abb. 20) bei 3 von 4 Zelllinien sowie eine Tendenz zur phänotypischen Umwandlung (Abb. 14 – 17) der DCs nach TMZ-Behandlung nachgewiesen werden. Dies deutet auf

einen Populationswechsel unter bestimmten Bedingungen hin und führt zu erschwerter Therapieoptionen bei GBM.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern sich die TMZ-induzierte Modulation der DCs in CSCs unterdrücken lässt. Lamb *et al.* zeigten zuerst den anti-tumorigenen Einfluss von verschiedenen Antibiotikaklassen wie Tetrazyklinen oder Makroliden auf Tumorstammzellen unterschiedlicher Tumorentitäten.<sup>120</sup> Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Dox, einem Tetrazyklin-Derivat, auf unbehandelte und mit 50µM TMZ behandelten DCs untersucht. Dazu wurde zunächst die Sensitivität der Zelllinien gegenüber Dox analog zur Chemosensitivitätstestung mit TMZ bestimmt (Abb. 18). Die gewonnenen Ergebnisse zeigen in 3 von 4 Fällen niedrigere IC50-Werte bei der CSC-Subpopulation im Vergleich zu den DCs (Abb. 18 und Tab. 13). Dies deutet darauf hin, dass CSCs tendenziell besser auf Dox ansprechen als deren Vergleichsgruppe der DCs.

Die für alle Folgeexperimente verwendete Konzentration von 50µM Dox überschreitet zwar geringfügig die in Patienten gemessene Plasmakonzentration von 23,5µM, ist jedoch in Anbetracht der Notwendigkeit von erhöhten Konzentrationen für *in vitro*-Versuchen annähernd so aussagekräftig.

Zur Bestimmung der Funktionalität der unbehandelten und mit TMZ sowie mit einer Kombination aus TMZ und Dox behandelten DCs wurde im Verlauf die *in vitro* Tumorigenität der Zellen geprüft und verglichen. Dabei zeigte sich ein durch Dox-vermittelter anti-tumorigener Einfluss auf die TMZ-behandelten Zellen. Die Ergebnisse in Abb. 19 zeigen in 3 von 4 Fällen eine signifikant geringere *in vitro* Tumorigenität der mit Dox und TMZ behandelten DCs im Vergleich zu den nur mit TMZ behandelten Zellen. Gestützt auf den Gedanken, dass DCs unter bestimmten Umständen Stammzeleigenschaften annehmen können, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die TMZ-behandelten DCs stammzellähnliche Funktionen entwickeln, was durch Dox unterdrückt werden kann. Ein deutlicher Unterschied zwischen den unbehandelten DCs und den nur mit Dox behandelten DCs konnte nur in einer Zelllinie (HROG38) beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der Angriffspunkt von Dox abhängig von dem aktuellen Zustand der Zelle ist. Eine präzise Erklärung, weshalb und vor allem wie Dox Einfluss auf CSCs nimmt, konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend gegeben werden. Es scheinen jedoch mehrere Faktoren eine Rolle spielen zu können.

Dox wirkt an der 30S-UE der bakteriellen Ribosomen. Diese Einheit zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit zu der 28S-UE der Mitochondrien, wodurch Dox, ähnlich wie auf Bakterien, auch auf Mitochondrien wirken kann. In Ergebnissen vorangegangener Studien anderer Arbeitsgruppen wurde eine starke mitochondriale Abhängigkeit der CSCs in mehreren Tumorentitäten festgestellt.<sup>161,162</sup> So führen die Mitochondrien in Tumorzellen beispielsweise zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die durch Umverteilung von Nährstoffen eine anabole Stoffwechsellage schaffen. Diese treibt die Tumorentstehung und –proliferation voran.<sup>120,121,131</sup>

In vitalen Zellen wird Dox in das Zytoplasma übertragen und in den Mitochondrien wirksam, wo es zu stabilen Photoprodukten wie Lumidoxyzyklin metabolisiert wird. Diese induzieren eine mitochondriale Fragmentierung und verändern die Membranintegrität der Mitochondrien. Folglich kommt es zu einer kontinuierlichen Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese, wodurch die mitochondriale Funktionalität beeinflusst wird.<sup>163</sup> Der Zustand der durch TMZ konvertierten DCs unterliegt wahrscheinlich, ebenso wie der der CSCs, einer gesteigerten mitochondrialen Abhängigkeit. Ansetzend an der Theorie der Dox-induzierten Dysfunktion der Mitochondrien scheint die *in vitro* Tumorigenität der CSCs offensichtlich beeinflusst zu sein. Bei einer gestörten Mitochondrienfunktion kann es zu einer verminderten Tumorigenität, welche in dieser Arbeit beobachtet wurde, kommen. Dadurch könnte ein Therapieansatz für GBM gegeben sein.

Wie bereits erläutert, scheint besonders der mitoMGMT-Promotor in CSCs angereichert zu sein, welcher die Resistenzentwicklung in GBM stark beeinflusst. Wenn TMZ-behandelte DCs Stammzelleigenschaften annehmen und ebenfalls eine vermehrte mitochondriale Abhängigkeit aufweisen, könnte auch eine Zunahme des mitoMGMT-Promotors in diesen umgewandelten Zellen zu verzeichnen sein. Die durch Dox-induzierte mitochondriale Dysfunktion kann folglich die Anzahl und somit die Wirkung der DNA-Reparaturenzyme vermindert werden, wodurch die beobachtete gesunkene *in vitro* Tumorigenität zu erklären sein könnte.

Des Weiteren sorgen Dox-Photoprodukte für eine gesteigerte Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose unter physiologischen und pathologischen Bedingungen spielen.<sup>164</sup> ROS entstehen in den Mitochondrien der eukaryotischen Zellen und induzieren viele Arten von DNA-Schäden,

wodurch die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 folgt. Für das Kolon- und Pankreaskarzinom wurde bereits berichtet, dass die Dox-induzierte Apoptose NF- $\kappa$ B- und p53-abhängig ist, was auch bei GBM der Fall sein könnte.<sup>165–167</sup> Das Ergebnis der Aktivierung von p53 ist entweder Apoptose oder Zellzyklusarrest, abhängig von der p53-Expression: bei hoher Expression fördert p53 den Zelltod durch einen transkriptional unabhängigen Mechanismus, während niedrige Expressionslevel eine transkriptionsgesteuerte Hemmung des Zellzyklusfortschritts initiieren.<sup>168</sup> Durch diesen proapoptotischen Effekt könnte Dox ebenfalls Einfluss auf die GBM-Zellen haben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen konnte keine Zelltodinduktion, jedoch eine verringerte *in vitro* Tumorigenität verzeichnet werden. Auch Lamb *et al.* sahen in ihrer Studie bei der entsprechenden Konzentration von Dox keinen Zellzahlverlust.<sup>120</sup> Es kam lediglich zu einem Wandel der funktionellen und phänotypischen Eigenschaften.

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet der Einfluss von Dox auf MMPs. Dox ist in der Lage, MMPs über verschiedene Mechanismen zu inhibieren. Folglich wird die Tumorigenität vermindert.<sup>169–171</sup> Inwieweit dieses Phänomen eine Rolle in *in vitro*-Versuchen spielt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Für Folgeexperimente könnte dies jedoch ein interessanter Anhaltspunkt sein.

Generell deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass eine direkte Wirkung des Antibiotikums auf die GBM-Zellen stattgefunden hat.

Inwieweit Dox direkt diese Modifikation der GBM-Zellen bewirkt, kann allerdings nicht vollständig erklärt werden. Es scheint jedoch, als spiele auch hier der Zustand der Zelle die entscheidende Rolle. Bei alleiniger Behandlung der DCs mit 50 $\mu$ M Dox zeigt lediglich die Zelllinie HROG36 einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten DCs. Für 3 weitere Zelllinien (HROG06, HROG10, HROG38) konnte eine verringerte *in vitro* Tumorigenität der Zellen erst nach stattgefundener Umwandlung durch TMZ in CSCs beobachtet werden. Es scheint, als seien bestimmte Stammzeleigenschaften Voraussetzung für die Wirksamkeit des Antibiotikums. So könnte die gesteigerte mitochondriale Abhängigkeit der GBM-Zellen im Stammzell-Status der Angriffspunkt des Antibiotikums sein. Durch die Schädigung der Mitochondrien scheint die Tumorigenität, zumindest *in vitro*, beeinflussbar.

Neben Dox konnten auch weitere Antibiotika ähnliche Effekte bei verschiedenen Tumorentitäten bewirken. Lamb *et al.* beobachteten bereits bei fortgeschrittenen oder

behandlungsresistenten Patienten mit B-Zell-Lymphom (Dox) oder Bronchialkarzinom (Azithromycin) eine deutlich erhöhte 1-Jahres-Überlebensrate in klinischen Studien.<sup>172,173</sup> Möglicherweise könnten ähnliche Ergebnisse für GBM erreicht werden. Dies sollte zukünftig weiter untersucht werden.

Die Daten zeigen außerdem, dass sich der Einfluss von Dox auf die mit TMZ behandelten DCs im Laufe mehrerer Tage nicht signifikant veränderte. Bereits nach einmaliger Behandlung mit 50µM Dox konnte die *in vitro* Tumorigenität gesenkt werden. Dies bestärkt ebenfalls die Theorie einer direkten Wirkung von Dox auf die Zellen. Zugleich kann vermutet werden, dass die Suppression der *in vitro* Tumorigenität ein limitierter Effekt ist und bereits nach kurzer Behandlungsdauer das Maximum erreicht hat. Interessanterweise wurde in früheren Studien festgestellt, dass Lymphom-Patienten von einer nur 3-wöchigen Dox-Therapie profitierten und eine vollständige Remission der Krankheit zeigten.<sup>174</sup> Diese Ergebnisse könnten mit den vorliegenden korrelieren und deuten auf ähnliche Effekte bei GBM hin. Eine kurze Behandlungsdauer scheint demnach ausreichend, um die gewünschten Effekte zu erzielen. Um diesbezüglich an weitere Erkenntnisse zu gelangen, müssten als nächstes *in vivo*-Versuche mit Dox stattfinden.

Bei der Zelllinie HROG38 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *in vitro* Tumorigenitäten der mit TMZ behandelten und der mit TMZ und Dox behandelten DCs festgestellt werden. Einerseits könnte dafür eine Notwendigkeit einer längeren Umwandlungsdauer ursächlich sein. Andererseits könnte auch die intertumorale Heterogenität eine Rolle spielen. Eventuell sind jedoch auch nicht alle GBM-Zelllinien gleichermaßen dazu befähigt, einen Populationswechsel zu vollziehen. So konnten in dieser Studie Dox-vermittelte Effekte in 3 von 4 Patientenzelllinien beobachtet werden. Eine Zelllinie - HROG38 - zeigte indes keinerlei Ansprechen auf Dox. Auch wenn viel über mögliche Ursachen spekuliert werden kann, wäre es notwendig, den Wirkungsmechanismus noch genauer zu identifizieren. Erst dadurch kann in einer klinischen Studie gewährleistet werden, dass bevorzugt jene Patienten ausgewählt werden, die von einer zusätzlichen Dox-Therapie profitieren könnten.

## 6. Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass GBM aus mehreren Subpopulationen besteht. In 3 von 4 Patientenzelllinien zeigte sich eine gesteigerte *in vitro* Tumorigenität der CSCs im Vergleich zu den DCs.

Außerdem war durch die TMZ-Behandlung eine phänotypische (Stammzell-Marker) und funktionelle (gesteigerte *in vitro* Tumorigenität) Umwandlung der DCs zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass ein Populationswechsel bei GBM zwischen den einzelnen Zellklassen unter bestimmten Bedingungen *in vitro* stattfinden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen dem hierarchischen Tumormodell mit der von Raye *et al.* aufgestellten Stammzell-Hypothese und bestärken die Theorie eines stochastischen Zellmodells. Dabei sind alle Zellen theoretisch gleichgestellt und können die Eigenschaften der verschiedenen Subpopulationen annehmen. Für die Konversion der Subpopulationen scheinen neben der in der Literatur beschriebenen Umgebungsbedingungen („Stammzell-Nische“) noch weitere zellintrinsische Faktoren eine Rolle zu spielen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch TMZ-induzierte gesteigerte *in vitro* Tumorigenität in 3 von 4 Patientenzelllinien durch die Behandlung mit Dox signifikant gesenkt werden konnte. Dies deutet auf eine indirekte und/oder direkte anti-tumorigene Wirkung von Dox auf CSCs hin. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der bakteriellen 30S-UE zu der 28S-UE der Mitochondrien kann eine mitochondriale Dysfunktion durch Dox ausgelöst werden. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse konnte die Hypothese der verstärkten mitochondrialen Abhängigkeit der CSCs dadurch untermauert werden.

Schlussfolgernd eröffnen diese Erkenntnisse Perspektiven für neue Therapieansätze des GBM. Entscheidend dafür scheint der jeweils aktuelle Zustand der Zelle zu sein. So ist es für zukünftige Therapieoptionen sinnvoll, gegen die Eigenschaften der „Stammzellen“ vorzugehen bzw. die Umstände, die zu einem vermehrten Wandel der Zellen zu Gunsten der CSCs führen, zu unterdrücken. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die potenzielle Wirksamkeit von Dox als Antikrebsmittel sowie als Verstärker herkömmlicher chemotherapeutischer Mittel zu bestimmen. Dazu sollte der genaue Wirkmechanismus bei GBM identifiziert werden, um für klinische Studien die Patienten auswählen zu können, bei denen eine zusätzliche Behandlung mit Dox am vielversprechendsten ist.

## Literatuurverzechnis

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology* 2012; 14: v1-v49
2. Lima FR, Kahn SA, Soletti RC, *et al.* Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2012; 1826: 338–49
3. Pollo B. Neuropathological diagnosis of brain tumours. *Neurological Sciences* 2011; 32: 209–11
4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 2009; 10: 459–66
5. Hjelmeland AB, Rich JN. The Quest for Self-Identity: Not All Cancer Stem Cells Are the Same. *Clinical Cancer Research* 2012; 18: 3495–8
6. Ohgaki H, Kleihues P. Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2005; 64: 479–89
7. Nasrolahi H, Kani A-A, Mohammadianpanah M, *et al.* Pediatric glioblastoma multiforme: A single-institution experience. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 2012; 33: 155
8. Houben, M P W A, van Duijn CM, Coebergh JWW, Tijssen CC. Gliomen: de rol van omgevingsfactoren en genetische predispositie. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 2005; 149: 2268–72
9. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice. Neurology* 2006; 2: 494
10. Padmalatha C, Harruff RC, Ganick D, Hafez GB. Glioblastoma multiforme with tuberous sclerosis. Report of a case. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1980; 104: 649–50

11. Grips E, Wentzensen N, Sutter C, *et al.* Glioblastoma multiforme als Manifestation des Turcot-Syndroms. *Der Nervenarzt* 2002; 73: 177–82
12. Broekman MLD, Risselada R, Engelen-Lee J, Spliet WGM, Verweij BH. Glioblastoma Multiforme in the Posterior Cranial Fossa in a Patient with Neurofibromatosis Type I. *Case Reports in Medicine* 2009; 2009: 1–4
13. Sánchez-Ortiga R, Boix Carreño E, Moreno-Pérez O, Picó Alfonso A. Glioblastoma multiforme y neoplasia endocrina múltiple tipo 2 A. *Medicina Clínica* 2009; 133: 196–7
14. Nayak A, Ralte AM, Sharma MC, *et al.* p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. *Neurology India* 2004; 52: 228–32
15. McLendon R, Friedman A, Bigner D, *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455: 1061–8
16. Benson VS, Pirie K, Green J, Casabonne D, Beral V. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *British Journal of Cancer* 2008; 99: 185–90
17. Cobbs CS. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae* 2011; 2: 10
18. Markert J. Glioblastoma Multiforme: Jones and Bartlett Publishers, 2005
19. Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M. *Duale Reihe Neurologie*, 7th edn. s.l.: Georg Thieme Verlag KG, 2013
20. Barnett GH, ed. *High-Grade Gliomas: Diagnosis and Treatment. Current Clinical Oncology*. Totowa, NJ, Berlin, Heidelberg: Humana Press; Springer, 2007
21. Reiser M, Bartenstein P. *Radiologie: 110 Tabellen*, 3rd edn. *Das duale Lehrbuch*. Stuttgart: Thieme, 2011
22. Tonn J-C, Westphal M, Rutka JT, eds. *Oncology of CNS Tumors*. Heidelberg: Springer, 2010
23. Zülch KJ, Bailey P. *Brain tumors: Their biology and pathology*, 3rd edn. Berlin: Springer, 1986
24. Schultz S, Pinsky GS, Wu NC, Chamberlain MC, Rodrigo AS, Martin SE. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. *CytoJournal* 2005; 2: 19
25. Blume C, Lehe M von, van Landeghem F, Greschus S, Boström J. Extracranial glioblastoma with synchronous metastases in the lung, pulmonary lymph nodes,

- vertebrae, cervical muscles and epidural space in a young patient - case report and review of literature. *BMC Research Notes* 2013; 6: 290
26. Tso C-L, Freije WA, Day A, *et al.* Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer research* 2006; 66: 159–67
27. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, *et al.* The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2002; 61: 215–25
28. Thomas C, Alexandrakis E. *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik ; mit CD-ROM, 14th edn. Pathologie.* Stuttgart: Schattauer, 2006
29. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet. Oncology* 2006; 7: 392–401
30. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell* 2014; 14: 275–91
31. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 2006; 66: 9339–44
32. Stupp R, Mason WP, van den Bent, Martin J., *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 2005; 352: 987–96
33. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: A systematic review. *Radiotherapy and Oncology* 2002; 64: 259–73
34. Swennen MHJ, Bromberg JEC, Witkamp TD, Terhaard CHJ, Postma TJ, Taphoorn MJB. Delayed radiation toxicity after focal or whole brain radiotherapy for low-grade glioma. *Journal of neuro-oncology* 2004; 66: 333–9
35. Brada M, Judson I, Beale P, *et al.* Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British journal of cancer* 1999; 81: 1022–30
36. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology* 2012; 5: 102–14

37. Forth W, Forth/Henschler/Rummel/Förstermann/Starke ., eds. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 8th edn. München: Urban & Fischer, 2002
38. Tsang LL, Farmer PB, Gescher A, Slack JA. Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1990; 26: 429–36
39. Rottenberg DA, Ginos JZ, Kearfott KJ, Junck L, Bigner DD. In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography. *Annals of neurology* 1984; 15 Suppl: S98-102
40. Rote Liste 2016: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte), 56th edn. Frankfurt am Main: Rote Liste Service GmbH, 2016
41. Fong TA, Shawver LK, Sun L, *et al.* SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer research* 1999; 59: 99–106
42. Jendrossek V, Belka C, Bamberg M. Novel chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert opinion on investigational drugs* 2003; 12: 1899–924
43. PAUL KLEIHUES. Klassifikation, Grading und genetischen Profil der Gliome: Astrozytome und Oligodendrogliome 2007
44. Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY. Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports* 2005; 5: 186–97
45. Dejaegher J, van Gool S, Vleeschouwer S de. Dendritic cell vaccination for glioblastoma multiforme: review with focus on predictive factors for treatment response. *ImmunoTargets and therapy* 2014; 3: 55–66
46. Kazimirsky G, Jiang W, Slavin S, Ziv-Av A, Brodie C. Mesenchymal stem cells enhance the oncolytic effect of Newcastle disease virus in glioma cells and glioma stem cells via the secretion of TRAIL. *Stem cell research & therapy* 2016; 7: 149

47. Nickel GC, Barnholtz-Sloan J, Gould MP, *et al.* Characterizing Mutational Heterogeneity in a Glioblastoma Patient with Double Recurrence. *PLoS ONE* 2012; 7: e35262
48. Li L, Xie T. STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005; 21: 605–31
49. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–11
50. Liu G1, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma 2006
51. Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756–60
52. Chen J, Li Y, Yu T-S, *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012; 488: 522–6
53. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell* 2015; 16: 225–38
54. Stopschinski BE, Beier CP, Beier D. Glioblastoma cancer stem cells – From concept to clinical application. *Cancer Letters* 2013; 338: 32–40
55. Greaves M. Cancer stem cells as 'units of selection'. *Evolutionary applications* 2013; 6: 102–8
56. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112: 4793–807
57. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurgical Focus* 2014; 37: E6
58. Hadjipanayis CG, van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in molecular medicine* 2009; 15: 519–30
59. Nduom EK, Hadjipanayis CG, van Meir EG. Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 2012; 18: 100–6
60. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396–401
61. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306–13
62. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501: 338–45

63. Quail DF, Taylor MJ, Postovit LM. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Current stem cell research & therapy* 2012; 7: 197–216
64. Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, *et al.* CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International journal of cancer* 2008; 122: 761–8
65. Safa AR, Saadatzadeh, Cohen-Gadol AA, Pollok KE, Bijangi-Vishehsaraei K. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes & Diseases* 2015; 2: 152–63
66. Auffinger B, Tobias AL, Han Y, *et al.* Conversion of Differentiated Cancer Cells Into Cancer Stem-Like Cells in a Glioblastoma Model After Primary Chemotherapy. *Cell death and differentiation* 2014; 21: 1119–31
67. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, *et al.* A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; 17: 362–75
68. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441: 1075–9
69. Ho IAW, Shim WSN. Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity. *BioMed research international* 2017; 2017: 9634172
70. Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell stem cell* 2014; 14: 306–21
71. Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014; 35: 3945–51
72. Wong GS, Rustgi AK. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *British journal of cancer* 2013; 108: 755–61
73. Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* 2012; 20: 210–6
74. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52–67
75. Noel A, Gutierrez-Fernandez A, Sounni NE, *et al.* New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Frontiers in pharmacology* 2012; 3: 140
76. Sneddon JB, Werb Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell stem cell* 2007; 1: 607–11

77. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer research* 2011; 71: 634–9
78. Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nature reviews. Cancer* 2007; 7: 733–6
79. Cui BG, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell adhesion & migration* 2012; 6: 220–30
80. Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2012; 79: 290–306
81. Cabarcas SM, La Mathews, Farrar WL. The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? *International journal of cancer* 2011; 129: 2315–27
82. Li L, Xie T. STEM CELL NICHE: Structure and Function.  
[http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed](http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed)  
(accessed 04/29/2016)
83. Wei J, Wu A, Kong LY, *et al.* Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS ONE* 2011; 6: e16195
84. Liu L, Wise, Diehl JA, Simon MC. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 31153–62
85. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, *et al.* ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science* 2008; 320: 661–4
86. Li Z, Bao S, Wu Q, *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 2009; 15: 501–13
87. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002; 39: 193–206
88. Wu Y, Wu PY. CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells and Development* 2009; 18: 1127–34
89. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: At the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 2015; 36: 177–85

90. Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 2017; 6: 1359479
91. Guadagno E, Vitiello M, Francesca P, *et al.* PATZ1 is a new prognostic marker of glioblastoma associated with the stem-like phenotype and enriched in the proneural subtype. *Oncotarget* 2017; 8: 59282–300
92. Orzan F, Bacco F de, Crisafulli G, *et al.* Genetic Evolution of Glioblastoma Stem-Like Cells from Primary to Recurrent Tumor. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2017
93. Sze CI, Su WP, Chiang MF, Lu CY, Chen YA, Chang NS. Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. *Frontiers in oncology* 2013; 3: 59
94. Ahmed KM, Li JJ. ATM-NF-kappaB connection as a target for tumor radiosensitization. *Current cancer drug targets* 2007; 7: 335–42
95. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine* 2000; 343: 1350–4
96. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 2005; 352: 997–1003
97. Weller M, Tabatabai G, Kastner B, *et al.* MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clinical Cancer Research* 2015; 21: 2057–64
98. Blough MD, Westgate MR, Beauchamp D, *et al.* Sensitivity to temozolomide in brain tumor initiating cells. *Neuro-Oncology* 2010; 12: 756–60
99. Tivnan A, Zakaria Z, O'Leary C, *et al.* Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Frontiers in neuroscience* 2015; 9: 218
100. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*, 8th edn. Springer-Lehrbuch. Heidelberg: Springer, 2007
101. Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, *et al.* A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in

- glioblastoma patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009; 20: 175–81
102. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153–64
103. Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, *et al.* Absence of caspase 8 and high expression of PED protect primitive neural cells from cell death. *The Journal of experimental medicine* 2004; 200: 1257–66
104. Beier D, Röhrli S, Pillai DR, *et al.* Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer research* 2008; 68: 5706–15
105. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, *et al.* Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10: 3728–36
106. Groothuis DR. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-Oncology* 2000; 2: 45–59
107. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells-- much more complex than expected. *Molecular cancer* 2011; 10: 128
108. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, *et al.* Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 3015–24
109. Fomchenko EI, Holland EC. Stem cells and brain cancer. *Experimental cell research* 2005; 306: 323–9
110. BioMed Central. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3207925/> (accessed 05/02/2016)
111. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593–8
112. Portnow J, Badie B, Chen M, Liu A, Blanchard S, Synold TW. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2009; 15: 7092–8
- 113.Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, *et al.* Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell death and differentiation* 2011; 18: 829–40
- 114.Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2009; 8: 3274–84
- 115.Jin X, Jung JE, Beck S, Kim H. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2013; 433: 496–501
- 116.Pruszek J, Ludwig W, Blak A, Alavian K, Isacson O. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009; 27: 2928–40
- 117.Li Y, Lathia J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer research* 2012; 72: 576–80
- 118.Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, *et al.* Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2010; 28: 851–62
- 119.Jun HJ, Bronson RT, Charest A. Inhibition of EGFR induces a c-MET-driven stem cell population in glioblastoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2014; 32: 338–48
- 120.Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, *et al.* Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: Treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 2015; 6: 4569–84
- 121.Lamb R, Harrison H, Hulit J, Smith DL, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget* 2014; 5: 11029–37
- 122.Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 1972; 20: 145–7
- 123.Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger M-R. *Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler: 74 Tabellen*, 7th edn. Stuttgart: Thieme, 2009

124. Fleming JE, Miquel J, Cottrell SF, Yengoyan LS, Economos AC. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* 1982; 28: 44–53
125. Dang L, White DW, Gross S, *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739–44
126. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1807: 1432–43
127. Xiao M, Yang H, Xu W, *et al.* Inhibition of  $\alpha$ -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development* 2012; 26: 1326–38
128. Otto Warburg, Franz Wind and Erwin Negelein. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY 1927
129. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 685–98
130. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, *et al.* Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 25130–8
131. Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, *et al.* Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy. *Oncotarget* 2015; 6: 14005–25
132. Saivin S, Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clinical pharmacokinetics* 1988; 15: 355–66
133. Yang B, Lu Y, Zhang A, *et al.* Doxycycline Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation and Invasion of Human Cervical Carcinoma Stem Cells. *PLoS ONE* 2015; 10: e0129138
134. Mullins CS, Schneider B, Stockhammer F, Krohn M, Classen CF, Linnebacher M. Establishment and characterization of primary glioblastoma cell lines from fresh and frozen material: A detailed comparison. *PLoS ONE* 2013; 8: e71070
135. Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods* 1997; 71: 143–55
136. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal?: a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* 1993; 35: 567–76

137. Xiu Ming Wang, Terasaki PI, Rankin GW, Chia D, Hui Ping Zhong, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Human Immunology* 1993; 37: 264–70
138. Yang A, Cardona DL, Barile FA. In vitro cytotoxicity testing with fluorescence-based assays in cultured human lung and dermal cells. *Cell biology and toxicology* 2002; 18: 97–108
139. Bharti AC, Takada Y, Shishodia S, Aggarwal BB. Evidence That Receptor Activator of Nuclear Factor (NF)- B Ligand Can Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis through Activation of a NF- B-independent and TRAF6-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 6065–76
140. Terasaki PI, Rankin GW, JR, Chia D, Zhong HP, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Human Immunology* 1993; 37: 264–70
141. Freedman VH, Shin SI. Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 1974; 3: 355–9
142. Borowicz S, van Scoyk M, Avasarala S, *et al.* The soft agar colony formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014: e51998
143. Jung J, Gilbert MR, Park DM. Isolation and Propagation of Glioma Stem Cells from Acutely Resected Tumors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2016; 1516: 361–9
144. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, *et al.* Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011; 146: 633–44
145. Westhoff M-A, Fulda S. Adhesion-mediated apoptosis resistance in cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2009; 12: 127–36
146. Uchida N, Buck DW, He D, *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 14720–5
147. Galli R, Binda E, Orfanelli U, *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research* 2004; 64: 7011–21
148. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, *et al.* Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 2008; 27: 2897–909

149. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, *et al.* CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland) 2008; 18: 370–7
150. Rottenberg DA, Ginos JZ, Kearfott KJ, Junck L, Bigner DD. In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography. *Annals of neurology* 1984; 15: 98–102
151. Alvino E, Castiglia D, Caporali S, *et al.* A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O(6)-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: Role of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *International journal of oncology* 2006; 29: 785–97
152. Cai S, Xu Y, Cooper RJ, *et al.* Mitochondrial targeting of human O6-methylguanine DNA methyltransferase protects against cell killing by chemotherapeutic alkylating agents. *Cancer research* 2005; 65: 3319–27
153. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology* 2012; 5: 102–14
154. Arenas-Huertero FJ, Herrera-Goepfert R, Delgado-Chavez R, *et al.* Matrix metalloproteinases expressed in squamous cell carcinoma of the oral cavity: Correlation with clinicopathologic features and neo-adjuvant chemotherapy response. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 1999; 18: 279–84
155. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2002; 2: 161–74
156. Vihinen P, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *International Journal of Cancer* 2002; 99: 157–66
157. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* 2001; 11: S37–43
158. Forsyth PA, Wong H, Laing TD, *et al.* Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *British Journal of Cancer* 1999; 79: 1828–35
159. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2004; 7: 195–208

160. Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 2013; 31: 857–69
161. Bhat TA, Kumar S, Chaudhary AK, Yadav N, Chandra D. Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discovery Today* 2015; 20: 635–43
162. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4647–62
163. Shea CR, Olack GA, Morrison H, Chen N, Hasan T. Phototoxicity of Lumidoxycycline. *Journal of Investigative Dermatology* 1993; 101: 329–33
164. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function<sup>11</sup> Both Drs. Paules and Kaufmann received their doctoral degrees in Experimental Pathology from the University of North Carolina at Chapel Hill School of Medicine (in 1984 and 1979, respectively). *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 28: 1387–404
165. Son K, Fujioka S, Iida T, *et al.* Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Anticancer research* 2009; 29: 3995–4003
166. Fujioka S, Schmidt C, Sclabas GM, *et al.* Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF- $\kappa$ B. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 27549–59
167. Wafik S. El-Deiry, J. Wade Harper, Patrick M. O'Connor, Victor E. Velculescu, Christine E. Canman, Joany Jackman, Jennifer A. Pietsenpol, Marilee Burrell, David E. Hill, Yisong Wang, Klas G. Wiman, W. Edward Mercer, Michael B. Kastan, Kurt W. Kohn, Stephen J. Elledge, Kenneth W. Kinzler and Bert Vogelstein. WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 Arrest and Apoptosis; 1 March 1994
168. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological reviews* 1993; 73: 161–95
169. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Advances in dental research* 1998; 12: 12–26
170. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, *et al.* Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *Journal of periodontal research* 1984; 19: 651–5

- 171.Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93: 178–93
- 172.Han JJ, Kim TM, Jeon YK, *et al.* Long-term outcomes of first-line treatment with doxycycline in patients with previously untreated ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma. *Annals of hematology* 2015; 94: 575–81
- 173.Chu DJ, Yao DE, Zhuang YF, *et al.* Azithromycin enhances the favorable results of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genetics and molecular research : GMR* 2014; 13: 2796–805
- 174.Ferreri AJM, Ponzoni M, Guidoboni M, *et al.* Bacteria-eradicating therapy with doxycycline in ocular adnexal MALT lymphoma: A multicenter prospective trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98: 1375–82

## Thesen

1. Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist durch eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet.
2. Das GBM weist mindestens 2 funktionell und phänotypisch verschiedene zelluläre Subpopulationen auf.
3. Das GBM kann grob in stammzellähnliche Zellen (CSCs) und ausdifferenzierte Zellen (DCs) unterteilt werden.
4. *In vitro* wachsen DCs adhärent am Boden der Zellkulturflasche, wohingegen CSCs ein semiadhärentes bis sphärisches Wachstum aufweisen.
5. CSCs weisen im Vergleich zu DCs eine höhere *in vitro* Tumorigenität auf.
6. Mit den Stammzell-Markern Nestin, CD133, CD15, Sox2 und Bim1 können die phänotypischen Unterschiede der einzelnen Subpopulation in GBM nicht sicher dargestellt werden.
7. CSCs und DCs agieren nach einem stochastischen Tumormodell und können unter bestimmten Umständen ineinander konvertieren, wodurch DCs befähigt sind, Stammzeleigenschaften anzunehmen.
8. Durch die Behandlung der Zellen einiger GBM-Primärzelllinien *in vitro* mit dem Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ) kann eine gesteigerte *in vitro* Tumorigenität bei den behandelten DCs im Vergleich zu den unbehandelten DCs beobachtet werden.
9. TMZ sorgt bei einigen GBM-Primärzelllinien für eine Konversion der DCs in Zellen mit Stammzeleigenschaften (gesteigerte *in vitro* Tumorigenität).

10. Durch die Behandlung der konvertierten DCs nach TMZ-Therapie mit Dox kann eine Regression der *in vitro* Tumorigenität beobachtet werden. Dadurch ist von einer antitumorigenen Wirkung von Dox auszugehen.
  
11. Die Wirkung von Dox tritt bereits nach kurzer Behandlungsdauer ein.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Madlin Walther

## **Danksagung**

Ich glaube es ist nicht selbstverständlich, Teil einer Forschungsgruppe zu werden, in der man sich vollkommen wohl und aufgehoben fühlt. Ich hatte jedoch das Glück und möchte mich demnach allen voran bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen und meiner Betreuerin, Frau Doreen William für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die unerschöpfliche Unterstützung bedanken.

Herr Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen danke ich besonders, für das Vertrauen, welches er mir entgegengebracht hat, die zahlreichen Anregungen und besonders für die Übermittlung wissenschaftlicher Kenntnisse. Ich bedanke mich außerdem sehr für die mehrmaligen Einladungen zur Teilnahme an verschiedenen Kongressen, welche mich sehr bereichert haben.

Meiner Betreuerin Doreen William danke ich dafür, dass sie es durch ihre Ruhe und Geduld geschafft hat, mir ein selbstständiges Arbeiten im Labor zu ermöglichen. Ich bedanke mich für die Bereitstellung aller notwendigen Materialien und Dokumente, für jegliche konstruktive Kritik und ebenfalls für die wissenschaftlichen Kenntnisse, die sie mir vermittelt hat. Außerdem bedanke ich mich für die ständige Motivation und die Freude an der Arbeit im Labor, welche wir zusammen teilten. Ohne sie wäre die Fertigstellung dieser Arbeit in diesem Umfang und zeitlichem Rahmen nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. phil. nat. Björn Schneider für seine hilfsbereite und mühevollen Unterstützung bei einigen Versuchen und die intensive Auseinandersetzung mit der vorliegenden Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitarbeitern der AG MOI, des Forschungslabors von Fr. Dr. rer. nat. habil. Fischer und des Instituts der Pathologie der Universitätsmedizin Rostock für die Kooperation und Zusammenarbeit, sowie für die Bereitstellung einiger Räumlichkeiten und Geräte, welche zur Fertigstellung der Arbeit notwendig waren.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, auf die ich in allen Lebenslagen zählen und bauen kann. Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, an den Punkt des

Lebens zu kommen, an dem ich nun stehe. Ich bin sehr dankbar für die zahlreichen aufbauenden, unterstützenden und liebevollen Worte, die Geduld, die Motivation und die finanzielle Unterstützung, die ich von ihnen erhielt! Besonders danke ich auch meiner Schwester, Lisa Walther, die in allen Lebenslagen meine engste Vertraute ist und mich zu jeder Zeit unglaubliche Unterstützung spüren lässt, egal welche Entfernung uns voneinander trennt. Nicht zuletzt danke ich meinem Freund und seiner Familie für das Verständnis, die liebevolle Unterstützung und die Durchsicht der Dissertation.