

Vorhersagen zur Therapie-assoziierten
polyklonalen Dynamik im Glioblastom
anhand vergleichender Analysen von
Tumor-Subklonen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Roman Reinartz

aus

Bonn

Bonn, Juli 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Björn Scheffler
2. Gutachter: Prof. Dr. Hubert Schorle

Tag der Promotion: 23.11.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Glioblastom	1
1.1.1	Klinische Erscheinung	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiologie	2
1.1.4	Histopathologische Diagnostik und Subklassifikation	3
1.1.5	Molekularpathologie beim Glioblastom	4
1.1.6	Therapie	6
1.1.7	Modellsysteme des Glioblastoms	7
1.2	Tumorheterogenität	11
1.2.1	Intertumorale Heterogenität	11
1.2.2	Intratumorale Heterogenität	16
2	Zielsetzung	21
3	Material	23
3.1	Geräte	23
3.2	Labormaterial	24
3.3	Chemikalien und Reagenzien	25
3.4	Lösungen und Puffer	26
3.4.1	Vorgefertigte Lösungen und Puffer	26
3.4.2	Angesetzte Lösungen, Medien und Puffer	27
3.5	Lyophilisierte Proteine	28
3.6	Kits	28
3.7	Wirkstoffe	29
3.8	Primer	30
3.9	Antikörper	30
3.10	Zellkulturen	30
3.11	Mausstämme	30

3.12	Software	31
4	Methoden	33
4.1	Zellkultur	33
4.1.1	Gewinnung und Expansion primärer Zellkulturen	33
4.1.2	Bereitgestellte Zellkulturen	35
4.1.3	Kryokonservierung	35
4.1.4	Isolation von Subklonen	36
4.1.5	Wachstumskinetik	38
4.1.6	Neurosphären-Ansatz	39
4.1.7	Differenzierung	39
4.1.8	Bestimmung der Viabilität	40
4.1.9	Behandlung von Zellen	41
4.2	Histologie	45
4.2.1	Histochemische Färbung	45
4.2.2	Immunhistochemische Färbung	46
4.2.3	Quantifizierung multinukleärer Zellen	47
4.3	Molekularbiologie	47
4.3.1	Nukleinsäure-Extraktion	48
4.3.2	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	49
4.3.3	Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation	51
4.3.4	<i>Microarrays</i>	52
4.4	Tierversuche	52
4.4.1	Xenotransplantation & Gewebeprozessierung	53
4.4.2	Behandlung	54
4.5	Statistische Auswertung und Bioinformatik	55
5	Ergebnisse	57
5.1	Analyse von inter- und intratumoraler Heterogenität	57
5.1.1	Validierung des Zellkulturmodells	57
5.1.2	Isolation von Subklonen	60
5.1.3	Charakterisierung genetischer Aberrationen	60
5.1.4	Charakterisierung pharmakologischer Resistenzen	63
5.2	Personalisierte Analyse zur Vorhersage polyklonaler Dynamik	65
5.2.1	Separation Tumor-inhärenter Merkmale durch Isolation von Subklonen	66
5.2.2	Charakterisierung und Gruppierung der Subklone	68

5.2.3	Selektion von Subklonen aufgrund unterschiedlicher Resistenzprofile	71
5.2.4	Vorhersagen über polyklonale Dynamik <i>in vitro</i>	74
5.2.5	Vorhersagen über polyklonale Dynamik <i>in vivo</i>	82
6	Diskussion	85
6.1	Glioblastom – Viele Tumoren in einem?	85
6.1.1	Bewertung inter- und intratumoraler Diversität	86
6.1.2	Therapeutische Relevanz	87
6.2	Homogenität separierter Tumorzellen	91
6.2.1	Separation intratumoraler Heterogenität für funktionelle Analysen	92
6.3	Polyklonale Dynamik	94
6.3.1	Überwachung der polyklonalen Dynamik	94
6.3.2	Polyklonale Dynamik unter Therapie	95
6.3.3	Vorhersagen zur polyklonalen Dynamik	96
6.4	Potenzial und Limitationen	98
6.4.1	Funktionelle und mechanistische Analysen	98
6.4.2	Modellsysteme des Glioblastoms	99
6.4.3	Translationales Potenzial	102
7	Zusammenfassung	107
8	Abstract	109
A	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	111
	Literaturverzeichnis	132
	Abkürzungsverzeichnis	149
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	151
	Danksagung	155

1. Einleitung

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der vorliegenden präklinischen Studie erläutert, in der am Beispiel des malignen Hirntumors Glioblastom untersucht wurde, wie isolierte Tumorzellen auf den Einsatz von Chemotherapie reagieren und ob sich Therapie-assoziierte Veränderungen der zellulären Komposition des Tumors vorhersagen lassen.

1.1 Das Glioblastom

Das Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*, WHO-Grad IV) ist der häufigste bösartige hirneigene Tumor bei Erwachsenen. Trotz routinemäßiger Tumoresektion und anschließender Radiochemotherapie sehen sich alle betroffenen Patienten mit einer schlechten Prognose konfrontiert. Ungeachtet des rasant wachsenden Verständnisses der pathologischen Mechanismen, die dieser Erkrankung zugrunde liegen, konnten bislang wenige Erkenntnisse in klinische Erfolge umgesetzt werden. Verbesserte Modellsysteme für die funktionelle Charakterisierung des Glioblastoms in präklinischen Studien sollen dabei helfen, die Biologie des Tumors und die Grundlagen des Therapieversagens besser zu verstehen (Cloughesy et al. 2014).

1.1.1 Klinische Erscheinung

Bei mehr als 90% der Glioblastome handelt es sich um primäre Glioblastome. Diese entstehen rasch (*de novo*), mit einer krankheitsbedingten klinischen Vorgeschichte von wenigen Tagen oder Wochen. Im Gegensatz dazu entwickeln sich die selteneren sekundären Glioblastome aus vorherigen Astrozytomen niedrigeren Grades (WHO-Grad II oder III). Diese Patienten haben zumeist

eine klinische Vorgeschichte von mehr als einem Jahr vorzuweisen (Ohgaki & Kleihues 2007, 2013).

Die Art der auftretenden Krankheitssymptome ist von Patient zu Patient verschieden und hängt maßgeblich von der Größe und Lokalisation des Tumors ab. Die Symptome können u. a. Kopfschmerzen, Sprach- und Sehstörung, halbseitige Lähmung, Gemütsschwankungen, Persönlichkeitsveränderungen, Übelkeit, Erbrechen und epileptische Anfälle umfassen (Omuro & DeAngelis 2013). Bei Verdacht auf eine intrakranielle Raumforderung erfolgt eine zerebrale Bildgebung mittels Computertomographie oder, als Mittel der Wahl, eine Magnetresonanztomographie (MRT). Die Diagnosesicherung erfolgt durch eine histopathologische Analyse nach Biopsie oder Resektion des Tumorgewebes (Preusser et al. 2011).

1.1.2 Epidemiologie

Mit einer jährliche Inzidenz von 3,19 pro 100 000 Einwohnern in Nordamerika zwischen 2007 und 2011 ist das Auftreten des Glioblastoms im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, wie z. B. dem Prostatakarzinom (201,4) oder dem Mammakarzinom (171,2), selten. Unter den bösartigen primären Tumoren des Zentralnervensystems im Erwachsenenalter ist das Glioblastom mit einem Anteil von 45,6 % jedoch am häufigsten vertreten. Glioblastome treten in allen Altersgruppen auf, wobei die primären Glioblastome ab dem 45. Lebensjahr eine deutlich erhöhte Inzidenz aufweisen (64 Jahre im Median) und die sekundären Glioblastome häufiger bei jüngeren Patienten auftreten (45 Jahre im Median). Männer sind im Durchschnitt 1,6-fach häufiger als Frauen von der Erkrankung betroffen (Ohgaki et al. 2004; Ostrom et al. 2014).

1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung eines Glioblastoms sind bisher weitestgehend unbekannt. Der einzige gesicherte Umwelt-Risikofaktor ist die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (Fisher et al. 2007). In seltenen Fällen sind weitere Familienmitglieder von primären Hirntumoren betroffen, am häufigsten bei vererbten Tumorsyndromen, wie Turcot oder Li-Fraumeni bzw. Neurofibromatose Typ 1 (Schwartzbaum et al. 2006). Genomweite Assoziationsstudien konnten

zudem Risiko-Allele mit geringer Penetranz für die Suszeptibilität gegenüber der Entstehung eines Glioblastoms aufdecken (Shete et al. 2009; Wrensch et al. 2009).

1.1.4 Histopathologische Diagnostik und Subklassifikation

Eine typische histopathologische Konstellation für die Diagnose eines Glioblastoms ist die Zusammensetzung aus dedifferenzierten, häufig pleomorphen, astrozytären Tumorzellen mit ausgeprägter Anomalie der Zellkerne und hoher mitotischer Aktivität. Zudem sind das Auftreten markanter Gefäßproliferation und/oder Nekrosen charakteristische histopathologische Merkmale. Nicht obligatorische, aber häufig beobachtete Kennzeichen des Glioblastoms sind u. a. strichförmige Nekrosen, deren Ränder von kleinen spindelförmigen Zellen umstellt sind (Pseudopalisaden), und das Vorkommen vereinzelter vielkerniger Riesenzellen (vRZ, Louis et al. 2007a).

Wie die Bezeichnung *Glioblastoma multiforme* bereits andeutet, stellt sich die histopathologische Erscheinung dieses Tumors als sehr variabel dar (Cushing & Bailey 1926). Während z. B. einige Tumorregionen einen hohen Anteil zellulärer und nukleärer Heterogenität mit vereinzelt Riesenzellen aufweisen, sind andere Bereiche monoton mit kleinen rundlichen Zellen besiedelt. Dieser hohe Grad an Heterogenität stellt hohe Ansprüche an die neuropathologische Diagnostik, speziell wenn nur wenig Biopsiematerial verfügbar ist. Kommt es zu einer markanten Anhäufung gewisser Zelltypen, kann das Glioblastom noch weiter histopathologisch unterteilt werden.

Ausgewählte Beispiele für die histopathologische Subklassifikation des Glioblastoms entlang der mittlerweile überarbeiteten Richtlinien von 2007 (Louis et al. 2007a) sind das Kleinzell-Glioblastom, das Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente oder das Glioblastom mit riesenzelliger Komponente. Das Kleinzell-Glioblastom zeichnet sich durch eine prädominante oder exklusive Zusammensetzung von monomorphen, kleinen und rundlichen Zellen mit geringfügig hyperchromatischen Zellkernen und hoher Proliferationsrate aus (Perry et al. 2004). Ein Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente enthält Herde, die große Ähnlichkeit mit Oligodendrogliomen (WHO-Grad II–III) aufweisen. Bei einem Aufkommen von multinukleären Riesenzellen in geringem Maße kann der Tumor als Glioblastom mit riesenzelliger Komponente subklassifi-

ziert werden. Wenn die Riesenzellen prädominant sind, ist die Bezeichnung Riesenzellglioblastom gerechtfertigt (Louis et al. 2007a).

1.1.5 Molekularpathologie beim Glioblastom

Krebs ist eine Erkrankung, deren Entstehung und Fortschritt mit genetischen Aberrationen einhergeht (Hanahan & Weinberg 2000). Diese Veränderungen können u. a. Mutationen in der Sequenz der Desoxyribonukleinsäuren (DNA, *deoxyribonucleic acid*), veränderte Kopienzahlen von chromosomalen Regionen oder ganzer Chromosomen sowie Translokationen umfassen (Brennan et al. 2013). Dabei ist zu beachten, dass der Prozess der Entstehung und frühen Entwicklung des Glioblastoms im Menschen unbemerkt vonstattengeht und folglich nicht unmittelbar zu untersuchen ist. Berechnungsmethoden auf der Grundlage genetischer Veränderungen in verschiedenen Tumorarealen (*molecular clock*, Sottoriva et al. 2013) und der Einsatz transgener Mausmodelle (Huse & Holland 2009) helfen dabei, die Vorgänge bei der Entstehung des Glioblastoms besser zu verstehen. Beide Ansätze beruhen aber auf Rückschlüssen, die anhand bereits manifestierter Tumoren gezogen werden müssen.

Das Glioblastom war eine der ersten Tumorentitäten, deren genetische Veränderungen systematisch und anhand großer Patientengruppen genomweit untersucht wurden (Beroukhim et al. 2007; Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Parsons et al. 2008). Studien mit hohen Fallzahlen erlauben die Unterscheidung zwischen treibenden Mutationen (*driver mutations*), die von genereller Wichtigkeit für die Pathogenese sind und wiederkehrend auftreten, und Beifahrer-Mutationen (*passenger mutations*), die zufällig entstehen und weiter vererbt werden, solange sie keinen Selektionsnachteil für den Tumor darstellen. Typische fokale Amplifikationen finden sich u. a. von den Genen *EGFR*, *CDK4*, *PDGFRA*, *MDM4*, *MDM2*, *CCND2*, *MET*, *MYC* und *PIK3CA*. Gene mit häufigen Deletionen sind u. a. *CDKN2A/B*, *PTEN*, *CDKN2C* und *RB1*, und somatische Mutationen finden sich typischerweise u. a. bei *PTEN*, *TP53*, *EGFR*, *PIK3R1*, *NF1*, *RB1* und *IDH1*. Charakteristische Duplikationen ganzer Chromosomen-Arme betreffen u. a. die Chromosomen (Chr.) 7p, 7q, 19q, 19p, 20p und 20q. Verluste von Chromosomen-Armen werden häufig u. a. an Chr. 10p, 10q, 9p, 13q, 22q, 14q, 6q und 22q beobachtet (siehe Abbildung 1.1).

Alles zusammengenommen zeigt das Glioblastom einen relativ klar umris-

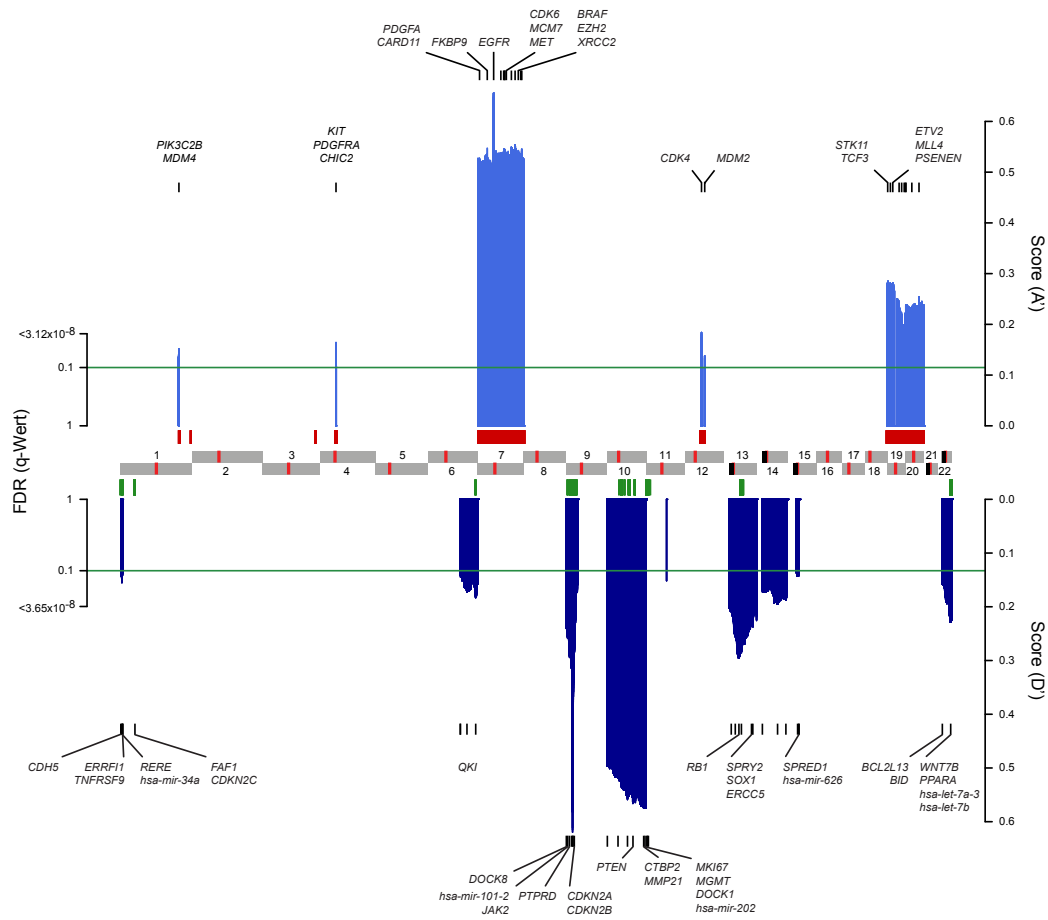


Abbildung 1.1: Übersicht über statistisch signifikante Kopienzahl-Aberrationen im Glioblastom. Signifikant veränderte Regionen innerhalb eines großen Kollektivs von Glioblastom-Patienten (Cancer Genome Atlas Research Network 2008) wurden mittels RAE-Algorithmus berechnet (Taylor et al. 2008) und dargestellt. Die Signifikanzwerte für erhöhte (Score (A'), hellblau) und verringerte (Score (D'), dunkelblau) Kopienzahlen sind nach ihrer chromosomalen Position dargestellt (Centromere in Rot, kurze Arme von akrozentrischen Chromosomen in Schwarz). Der Schwellenwert der FDR (*false discovery rate*) von 10 % ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet (grün). Modifiziert nach Cancer Genome Atlas Research Network 2008.

senen Satz genetischer Veränderungen, die typisch für diese Erkrankung sind. Gruppirt man die entsprechenden Gene mit Sequenzmutationen, Amplifikationen oder Deletionen nach ihrer Beteiligung an Glioblastom-relevanten zellulären Signaltransduktionswegen, findet man eine starke Anreicherung in den folgenden drei zentralen Signalwegen: Rezeptor-Tyrosinkinase/RAS/PI(3)K (in 88 % der untersuchten Glioblastome betroffen), p53 (in 87 % betroffen) und RB (in 78 % betroffen, Cancer Genome Atlas Research Network 2008). Die Identifikation charakteristischer Veränderungen im Glioblastom hat so eine Fokussierung auf bestimmte zelluläre Signalwege ermöglicht, deren Deregulation Einblicke in die

Pathobiologie der Erkrankung zulässt und mögliche Therapieansätze bietet (Cloughesy et al. 2014).

1.1.6 Therapie

Die Behandlung des Glioblastoms beginnt in der Regel mit der chirurgischen Resektion des Tumors. Dabei ist es für den Krankheitsverlauf des Patienten vorteilhaft, wenn mittels MRT eine möglichst vollständige Entfernung der schrankengestörten Tumoranteile gezeigt werden kann (Senft et al. 2011; Stummer et al. 2006, 2008). Bei etwa 20–30 % der Patienten ist eine vollständige Resektion, bedingt durch eine ungünstige Lokalisation des Tumors (z. B. im primären Motorcortex), jedoch nicht möglich (Preusser et al. 2011). Da Glioblastomzellen die Eigenschaft aufweisen, das angrenzende Hirnparenchym diffus zu infiltrieren, ist es auch mit fortgeschrittenen Methoden, wie der fluoreszenzgestützten Chirurgie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA, Stummer et al. 2006), nicht möglich alle Tumorzellen zu entfernen. Demzufolge hat sich die Behandlung der im Patienten persistierenden Tumorzellen mit kombinierter Strahlen- und Chemotherapie als vorteilhaft erwiesen. Die Ergänzung der Resektion um eine postoperative Strahlentherapie konnte das mediane Gesamtüberleben nach Diagnose von zuvor 4–5 auf 9–10 Monate verlängern (Kristiansen et al. 1981; Walker et al. 1978). Die aktuelle Standardtherapie (Stupp et al. 2005) beinhaltet eine Bestrahlung mit insgesamt 60 Gy in 30 Sitzungen über einen Zeitraum von ungefähr 6 Wochen. Das Bestrahlungsfeld umfasst die erweiterte Tumorregion auf der Basis der präoperativen Bildgebung, wobei die Strahlendosis zum Rand hin abnimmt. Das Feld der höchsten Strahlendosis schließt einen Randsaum von ca. 2–3 cm um die Resektionshöhle mit ein, um auch die Infiltrationszone zu berücksichtigen. Die Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ) wird für die Dauer der Strahlentherapie (konkomitant) täglich verabreicht (75 mg pro m² Körperfläche). Nach Beendigung der Radiotherapie wird die Chemotherapie alleine (adjuvant) durch die Verabreichung von TMZ in 6 Zyklen fortgeführt. Ein Zyklus dauert 28 Tage, wobei TMZ (150–200 mg pro m² Körperfläche) ausschließlich an den ersten 5 Tagen verabreicht wird. Verglichen mit der alleinigen Strahlentherapie erhöhte die kombinierte Radiochemotherapie das mediane Gesamtüberleben zwar nur von 12,1 auf 14,6 Monate, steigerte aber die Wahrscheinlichkeit, 2 bzw. 5 Jahre zu überleben, von 11 auf 27 % bzw.

von 2 auf 10% (Stupp et al. 2005, 2009).

In nachfolgenden klinischen Studien konnten zwar bislang keine neuen, der Standardtherapie überlegenen Therapieansätze gefunden werden, jedoch konnte ein Trend zu erhöhten mittleren Überlebenszeiten von 16,1–16,7 Monaten nach der Behandlung mit der Standardtherapie in den Kontrollarmen registriert werden (Chinot et al. 2014; Gilbert et al. 2013, 2014b). Dieser allgemeine Trend zu erhöhten Überlebenszeiten kann mit einer verbesserten klinischen Betreuung der Patienten und dem häufigeren Einsatz von Folgetherapien begründet werden (Preusser et al. 2011).

Trotz eines initialen Ansprechens auf therapeutische Maßnahmen und verbesserter Überlebenszeiten bei kombinierter Radiochemotherapie kommt es in nahezu allen Patienten zur Wiederkehr des Tumors (Rezidiv). Für die Behandlung eines progredienten Glioblastoms gibt es bisher keine einheitliche Richtlinie. Patienten mit gutem Allgemeinzustand können von einer erneuten Operation profitieren (Barbagallo et al. 2008; Park et al. 2010). Eine Vielzahl von Mono- und Kombinationstherapien wurden in klinischen Studien untersucht, darunter auch mehrere Studien mit Dosis-intensiviertem TMZ oder anderen auf Alkylanzien basierenden Schemata. Jedoch ist aus keiner der Studien eine Behandlung mit einer der Standardtherapie überlegenen Wirkung hervorgegangen (Weller et al. 2013).

Neue Therapieansätze zielen vor allem auf die Hemmung von deregulierten Signalwegen (siehe Unterabschnitt 1.1.5) mit niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*), die Hemmung der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese), die Gen- und Immuntherapie sowie die Bekämpfung der Ausbildung von TMZ-Resistenz (Adamson et al. 2009; Gilbert et al. 2014a; Tanaka et al. 2013). Einige klein angelegte klinische Studien zeigen vielversprechende Resultate, wie z. B. ein gentherapeutischer Ansatz, der sehr hohe Dosierungen von TMZ ermöglicht (Adair et al. 2014). Die Wirksamkeit von neuen therapeutischen Regimen muss sich aber erst noch in größeren randomisierten kontrollierten klinischen Studien bestätigen.

1.1.7 Modellsysteme des Glioblastoms

Da funktionelle Untersuchungen an Glioblastomen im Menschen (*in situ*) nur begrenzt durchführbar sind, werden Modellsysteme benötigt, die einen experi-

mentellen Zugriff auf Tumorzellen außerhalb des Patienten (*ex vivo*) erlauben. Gängige Modelle in der Tumor-Forschung sind z. B. Zellkulturen (*in vitro*), Tumorzell-Transplantationen in Tiermodelle oder die Induktion von Tumoren in Tiermodellen durch genetische Eingriffe oder Exposition gegenüber Karzinogenen (*in vivo*). Keines der Modellsysteme kann die Situation im Patienten exakt nachstellen, aber mit der Auswahl eines geeigneten Modells lassen sich wesentliche Fragestellungen über die Biologie des Tumors funktionell bearbeiten.

Zentrale Herausforderungen an Glioblastom-Modelle sind die Darstellung und Erhaltung von Patienten- und Tumor-spezifischen Merkmalen, wie z. B. genetischen Veränderungen, pathologischen Mechanismen und Wachstumsverhalten, sowie der zellulären Heterogenität über einen größtmöglichen Versuchszeitraum. Verschiedene Glioblastom-Modelle eignen sich dabei unterschiedlich gut für die Untersuchung von diversen Aspekten der Erkrankung. Am Beispiel der Identifizierung potenzieller neuer Wirkstoffe lässt sich der Einsatz einer Kombination verschiedener Modellsysteme entsprechend ihrer Anwendbarkeit aufzeigen. Zellkulturen eignen sich u. a. für die massenhafte und standardisierte Expansion von Tumorzellen, um in Hochdurchsatzverfahren nach bisher unbekanntem aktiven Wirkstoffen zu fahnden. Die Wirksamkeit einer eingegrenzten Anzahl von Kandidaten-Substanzen muss anschließend in mehreren verschiedenen Zellkulturen bestätigt werden, bevor mit der arbeitsaufwendigen Entschlüsselung der molekularen Wirkungsmechanismen begonnen werden kann. Zum Abschluss der präklinischen Untersuchungen wird die Aktivität von Substanzen in relevanten Tiermodellen überprüft, wobei zudem Erkenntnisse über deren Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung und Toxizität gewonnen werden (Damia & D’Incalci 2009).

Zellkultur

Seit der Etablierung der ersten humanen Tumor-Zelllinie (HeLa) im Jahre 1951 konnten von allen häufigen Krebserkrankungen Zellkulturen abgeleitet und für deren präklinische Erforschung angewendet werden. Mit fortschreitender Entwicklung von analytischen Methoden wurde zunehmend deutlich, dass sich die teilweise über Jahrzehnte expandierten Kulturen phänotypisch und genetisch von ihren Ursprungstumoren entfernt haben (Deschavanne & Fertel 1996; Hecht et al. 1995; Pardal et al. 2003; Romer & Curran 2005). Durch

die Etablierung einfacher und kostengünstiger Untersuchungsmethoden zur Detektion genomweiter Genexpressionslevel und chromosomaler Aberrationen wurde es ermöglicht, Zellkulturbedingungen systematisch auf den Erhalt dieser Merkmale hin zu verbessern (Gillet et al. 2013).

Für das Glioblastom konnte gezeigt werden, dass Zellkulturbedingungen, die in der Stammzellforschung für die Expansion neuraler Vorläuferzellen Anwendung finden, besser als herkömmliche Methoden geeignet sind, um die Muster der Genexpression, der genetischen Veränderungen und des Wachstumsverhaltens nach Tumorzell-Transplantation wiederzugeben (Lee et al. 2006; Pollard et al. 2009). Der Einsatz von Kulturtechniken, die den Erhalt unreifer Zelltypen berücksichtigen, hat sich als wesentlich für die Bestimmung von Subpopulationen mit erhöhtem tumorigenem Potenzial (Bao et al. 2008; Singh et al. 2004; Son et al. 2009; Zhu et al. 2014), die Identifikation zuvor unbekannter wirksamer Substanzen (Visnyei et al. 2011; Wieland et al. 2013), die Untersuchung zellulärer Plastizität (Galli et al. 2004; Ricci-Vitiani et al. 2010; Soda et al. 2011) sowie die Anwendung neuer therapeutischer Strategien (Day et al. 2013; Piccirillo et al. 2006; Wurdak et al. 2010) erwiesen.

Die Vorteile der Zellkultur liegen in der hohen Verfügbarkeit, der Standardisierung und der experimentellen Zugänglichkeit. Faktoren wie Atmosphäre, Temperatur, pH-Wert, Adhäsion, Zelldichte, Wachstumsfaktor- und Nährstoffversorgung sowie Exposition gegenüber experimentellen Stimuli können genau definiert und Resultate vergleichsweise einfach und reproduzierbar ausgelesen werden. Da sehr schnell eine große Menge von Zellen expandiert werden kann, eignet sich die Zellkultur im Rahmen der Krebsforschung für große explorative Ansätze zur Identifikation neuer Substanzen (Sharma et al. 2010) sowie für mechanistische Studien (Zhou et al. 2009). Das System weist aber auch einige Limitationen auf; darunter fallen z. B. die fehlende Interaktion mit der ursprünglichen Umgebung, dem Immunsystem, den Blutgefäßen und dem Blutkreislauf. Nährstoffe, Gase und Wirkstoffe sind zudem *in vitro* relativ homogen verteilt und werden dort zum Teil anders verstoffwechselt (Choi et al. 2014). Diese Einschränkungen müssen hinsichtlich der Übertragbarkeit von Befunden auf die Anwendung im Menschen beachtet werden.

Orthotope Xenotransplantation

Einige Limitationen der Zellkultur können durch die Transplantation von humanen primären Zellkulturen oder frisch dissoziierten Tumorbiopsien in immunsupprimierte Versuchstiere (Xenotransplantation) eingeschränkt werden. Bei orthotopen Xenotransplantationen werden die Tumorzellen an den gleichen Ort transplantiert, an dem der Tumor im Patienten lokalisiert war, um somit eine größere Ähnlichkeit zur ursprünglichen Umgebung herzustellen. Im Falle des Glioblastoms wird den transplantierten Zellen so der Zugang zu Umgebungsstrukturen, wie z. B. dem Gefäßsystem und dem Corpus callosum, ermöglicht, die für die Versorgung mit regulatorischen Faktoren und die Invasion der Tumorzellen von großer Bedeutung sind (Louis et al. 2007a). Für die Entdeckung neuer Therapeutika sind Experimente in diesem System wertvoll, um Aufschluss über die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung und Toxizität zu gewinnen, da einige Substanzen dosislimitierende Organtoxizität aufweisen (Weinstein 2012). Zu den Nachteilen des Modells gehören u. a. die Unklarheit darüber, welchen Einflüssen humane Zellen in einer fremden Spezies ausgesetzt sind, und pragmatische Gründe bezüglich der Anforderungen an die Verfügbarkeit, Durchsatzrate und Auslesbarkeit experimenteller Ansätze.

Die histopathologische Erscheinung von Glioblastom-Biopsien des Patienten und den Tumoren, die nach orthotoper Xenotransplantation primärer Zellkulturen (Pollard et al. 2009) oder frisch dissoziierter Tumorbiopsien (Joo et al. 2013) in immundefizienten Mäusen entstanden sind, wiesen in systematischen Vergleichen eine große Ähnlichkeit auf. Pollard et al. zeigten bemerkenswerte Ähnlichkeiten bezüglich der Präsenz von strichförmigen Nekrosen mit Pseudopalisaden, pleomorphen Zellkernen und ausgeprägter Gefäßproliferation. Joo et al. konnten eine hohe Korrelation des Ausmaßes der Tumorzell-Infiltration, -Proliferation und Gefäßdichte zwischen ursprünglichem Tumor und Xenograft nachweisen. So konnte in beiden Studien gezeigt werden, dass Patienten- und Glioblastom-typische histologische Merkmale in diesem Modellsystem erhalten werden können.

Xenotransplantationen von Tumorzellen werden auch als Methode verwendet, um das tumorigene Potenzial bestimmter Subpopulationen zu offenbaren. Die Trennung des heterogenen Tumors in Subpopulationen kann z. B. auf phänotypischer Ebene durch die Expressionsstärke bestimmter Oberflächenmarker

(Medema 2013) oder auf genetischer Ebene durch die Isolation von genetischen Entitäten (Subklonen, SK) geschehen (siehe auch Unterabschnitt 1.2.2). Durch eine stufenweise Verringerung der transplantierten Zellzahl und anschließende Bestimmung der Tumorigenität kann die Frequenz der Tumor-initiiierenden Zellen innerhalb der Subpopulation berechnet werden (Bonnefoix et al. 1996). Die Aussagekraft dieses Verfahrens ist Gegenstand kontroverser Diskussion, zumal gezeigt werden konnte, dass die Frequenz der tumorigenen Zellen sehr stark vom Tiermodell und der Transplantationstechnik abhängig ist, und Ergebnisse nicht immer unabhängig reproduziert werden konnten (Beier et al. 2007; Ishizawa et al. 2010; Quintana et al. 2008; Shackleton et al. 2009).

1.2 Tumorheterogenität

Die Heterogenität bei Tumoren kann auf unterschiedlichen Ebenen betrachtet werden. Verschiedene Tumorentitäten werden anhand des ihnen zugedachten Ursprungsgewebes eingeteilt und unterscheiden sich bezüglich ihrer genetischen und phänotypischen Profile stark voneinander (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Hoadley et al. 2014). Patienten, die an dem gleichen Tumor erkrankt sind, weisen meist weniger Unterschiede zueinander auf, können aber trotzdem weiter in biologisch homogenere Gruppen unterteilt (stratifiziert) werden, damit genauere Vorhersagen über den Krankheitsverlauf oder angepasste Therapieentscheidungen getroffen werden können (intertumorale Heterogenität). Innerhalb eines einzelnen Tumors können sich wiederum individuelle Tumorzellen genetisch und phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden (intratumorale Heterogenität, siehe Abbildung 1.2, Marusyk et al. 2012). Der technische Fortschritt in der Diagnostik ermöglicht es mittlerweile, die Unterschiede auf Einzelzelebene besser quantitativ zu erfassen. Durch diese Entwicklung entsteht ein steigendes Bewusstsein für das Ausmaß und die Auswirkungen klonaler Diversität, insbesondere in Hinblick auf deren klinische Relevanz (Bedard et al. 2013; Crockford et al. 2014).

1.2.1 Intertumorale Heterogenität

Die molekularbiologische Charakterisierung vertieft nicht nur das Verständnis der Pathobiologie von Tumoren (siehe Unterabschnitt 1.1.5), sondern auch

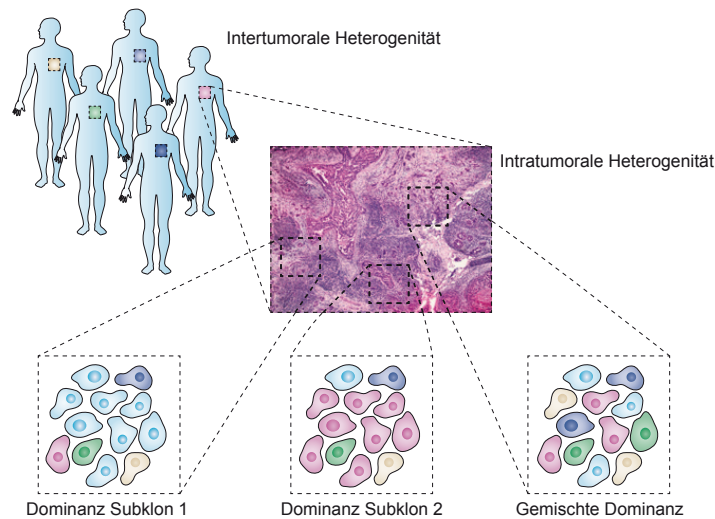


Abbildung 1.2: Schema zur Tumorheterogenität. Dargestellt sind die Ebenen der intertumorale und intratumorale Heterogenität. Patienten können unterschiedliche Ausprägungen des gleichen Tumors besitzen. Innerhalb eines Tumors kann es regionale Unterschiede geben, denen eine unterschiedliche Verteilung diverser Subklone zugrunde liegt. Verschiedenartigkeit wird durch die Farbkodierung von Tumoren bzw. Subklonen wiedergegeben. Modifiziert nach Marusyk et al. 2012.

das der Heterogenität zwischen Patienten mit der gleichen Erkrankung. Ein Teil der identifizierten Veränderungen kann zur Korrelation mit dem Krankheitsverlauf (prognostisch) oder der Vorhersage über ein Therapieansprechen (prädiktiv) verwendet werden (Biomarker, Dancey et al. 2012). Oftmals finden sich informative Biomarker aber nur in einem Anteil von Patienten, die anhand dessen noch weiter stratifiziert werden können. Eines von vielen Beispielen für einen prädiktiven Biomarker ist eine kleine Gruppe von Patienten (etwa 5–7 %) mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC), die eine Tumor-treibende translokationsbedingte Fusion der Gene *EML4* und *ALK* trägt (Soda et al. 2007). Für diese kleine Gruppe hat sich eine Behandlung mit dem ALK-Hemmer Crizotinib als vorteilhafter gegenüber konventioneller Chemotherapie erwiesen (Shaw et al. 2013). Bei vielen weiteren Tumorerkrankungen (u. a. beim malignen Melanom und beim Mammakarzinom) ist die Stratifizierung von Patienten anhand prädiktiver Marker heutzutage ein routinemäßiger Vorgang (Dancey et al. 2012).

***MGMT*-Promotormethylierung als Biomarker**

Beim Glioblastom hat die Untersuchung des Methylierungsstatus der Promoter-Region des *MGMT*-Gens Einzug in die Routine-Diagnostik gefunden. *MGMT* ist ein DNA-Reparaturenzym, das Alkyl-Gruppen von der O⁶-Position des Guanins entfernen kann und somit dem Effekt von Alkylanzien wie Temozolomid entgegenwirkt. Die Hypermethylierung der Promotorregion führt zu einer epigenetischen Repression der Genexpression von *MGMT*. In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass die Methylierung der *MGMT*-Promotorregion ein unabhängiger günstiger prognostischer Faktor ist und Glioblastom-Patienten von einer Behandlung mit Temozolomid profitieren. Dabei betrug das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit *MGMT*-Promotormethylierung 21,7 Monate, im Vergleich zu 15,3 Monaten bei Patienten ohne eine entsprechende Promotormethylierung (Hegi et al. 2005).

Häufige *IDH1*-Mutationen in sekundären Glioblastomen

Durch einen explorativen genomweiten Sequenzierungsansatz an 22 Glioblastomen gelang es, Mutationen im aktiven Zentrum des *IDH1*-Gens zu identifizieren und erfolgreich mit klinischen Daten zu assoziieren (Parsons et al. 2008). *IDH1*-Mutationen treten in etwa 80 % der sekundären und in etwa 4 % der primären Glioblastome auf (siehe Unterabschnitt 1.1.1). Die Patienten mit *IDH1*-Mutation sind jünger; so beträgt das mittlere Alter der Gruppe mit Mutation 48 Jahre im Gegensatz zu 61 Jahren bei Patienten mit *IDH1*-Wildtyp. Zudem ist das Auftreten der Mutation auch nach multivariater Analyse mit einer besseren Prognose (27,1 im Vergleich zu 11,2 Monaten) assoziiert (Nobusawa et al. 2009).

Molekulare Subklassifikationen im Glioblastom

In Studien, die im Rahmen des Gemeinschaftsprojekts *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) u. a. genomweite Daten zur Genexpression (Verhaak et al. 2010) oder Epigenetik (Noushmehr et al. 2010) an großen Patientengruppen erhoben und analysiert hatten, konnten verschiedene molekulare Subklassen des Glioblastoms identifiziert werden. Die Analyse der genomweiten Genexpression von 173 Glioblastomen ergab, dass sich der Tumor in die vier relativ gleichmäßig

verteilten Subklassen „proneural“, „neural“, „klassisch“ und „mesenchymal“ gliedern lässt. Die Korrelation der Subklassen mit genetischen und klinischen Daten zeigte bisher nur einen geringen Nutzen für die klinische Versorgung von Patienten. Hervorzuheben sind die Assoziation der „proneuralen“ Subklasse mit dem Auftreten von *IDH1*-Mutationen und der Überlebensvorteil der „klassischen“ Subklasse durch intensive Chemotherapie (Verhaak et al. 2010).

In einer epigenetischen Analyse von 272 Glioblastomen konnte eine kleine Subgruppe (etwa 13 %) mit einem Muster erhöhter Methylierung von CpG-Inseln (Cytosin-Phosphat-Guanin-Inseln) identifiziert werden, die als G-CIMP (*glioma-CpG island methylator phenotype*) bezeichnet wurde (Noushmehr et al. 2010). Die Korrelationen der G-CIMP-Subklasse mit anderen genomweiten und klinischen Daten ergab, dass diese Subklasse häufiger im „proneuralen“ Expressionsmuster und in niedriggradigen Gliomen vorkommt und zudem stark mit *IDH1*-Mutationen assoziiert ist. Folgeuntersuchungen konnten zeigen, dass alleine die Einführung einer *IDH1*-Mutation in Astrozyten ausreicht, um den G-CIMP-Phänotyp zu induzieren und die Zellen zu transformieren (Turcan et al. 2012). Patienten mit G-CIMP⁺-Tumoren sind meistens an einem sekundären Glioblastom erkrankt. Darüber hinaus sind sie im Durchschnitt jünger als Patienten mit G-CIMP⁻-Tumoren und verfügen über eine signifikant bessere Prognose (Noushmehr et al. 2010). In einer Folgepublikation der Arbeitsgemeinschaft *The Cancer Genome Atlas* konnte die prognostisch günstigste Gruppe auf G-CIMP⁺-Glioblastome mit „proneuralem“ Expressionsmuster eingeeengt und eine Begrenzung der prädiktiven Aussagekraft der *MGMT*-Promotormethylierung auf Patienten der „klassischen“ Subklasse postuliert werden (Brennan et al. 2013). In einer unabhängigen Studie an pädiatrischen und adulten Glioblastomen konnten insgesamt sechs relevante Glioblastom-Subklassen identifiziert werden. Vier dieser Subklassen zeigten große Ähnlichkeit zu den zuvor erwähnten Subklassen (Noushmehr et al. 2010; Verhaak et al. 2010) und erweiterten die intertumorale Heterogenität um zwei Pädiatrie-spezifische Subklassen (siehe Abbildung A.1, Sturm et al. 2012).

Status der personalisierten Medizin beim Glioblastom

Die Möglichkeiten der genomweiten Charakterisierung von Tumorbiopsien haben große Teile der intertumorale Heterogenität des Glioblastoms offengelegt

und in der Folge die Definition von Subklassen ermöglicht, um Patienten in molekularpathologisch homogenere Gruppen einzuteilen. Jedoch ist die Bedeutung für die klinische Anwendung, angesichts der zu Beginn dieses Unterabschnitts genannten Erfolge der personalisierten Medizin bei anderen Tumorentitäten, bislang hinter den Erwartungen zurückgeblieben (Huse & Aldape 2014).

Eine mögliche Erklärung dafür könnte die fehlende Abhängigkeit der Glioblastomzellen von einzelnen beschriebenen genetischen Veränderungen (*oncogene addiction*, Ashworth et al. 2011) liefern. Durch die selektive Hemmung von häufig deregulierten Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR (z. B. mit Gefitinib) oder PDGFRA (z. B. mit Imatinib) bzw. eine in der Signalkaskade weiter unten ansetzende AKT-Blockade (z. B. mit Perifosine) konnten in klinischen Studien keine verbesserten Überlebenszeiten gegenüber der Standardtherapie erreicht werden (Adamson et al. 2009; Gilbert et al. 2014a). Insbesondere bei der Blockade der Rezeptor-Tyrosinkinasen-Signaltransduktion konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass häufig verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen gleichzeitig aktiv und darüber hinaus auch redundant ausgelegt sind (Stommel et al. 2007). Diese Befunde zeigen, dass neben der Identifizierung von häufig veränderten Genen bzw. Signalwegen, mehr über deren Funktionen und Interaktionen im Kontext des gesamten Tumors in Erfahrung gebracht werden muss.

Eine weitere Erklärung für den bisher ausbleibenden Erfolg von personalisierten Therapieansätzen beim Glioblastom könnte darin liegen, dass sich die Präsenz der therapeutischen Zielstrukturen während bzw. durch die Therapie verändern kann. Viele klinische Studien zur individuellen Therapie wurden an progredienten Patienten durchgeführt, die nicht länger auf die Standardtherapie angesprochen oder diese nicht länger vertragen hatten. Durch die begrenzten Möglichkeiten einer erneuten Biopsieentnahme bei diesen Patienten (siehe Unterabschnitt 1.1.6) muss bei personalisierten Ansätzen daher vorwiegend auf das genetische Profil des Tumors vor dem Beginn der Behandlung zurückgegriffen werden (Kim et al. 2015b). Vergleichende Studien an Glioblastom-Biopsien, die vor und nach der Anwendung der Standardtherapie gewonnen wurden, konnten jedoch zeigen, dass die genetischen Profile und die Präsenz molekularer Zielstrukturen deutlich voneinander abweichen können (Hunter et al. 2006; Kim et al. 2015b). Daraus ergibt sich, dass die Wahl der personalisierten Folgethera-

pie aufgrund einer Biopsie des unbehandelten Tumors fehlgeleitet sein kann und dass eine erneute Biopsieentnahme nach der Primärbehandlung wohlmöglich ein präziseres Vorgehen erlaubt.

1.2.2 Intratumorale Heterogenität

Schon in den Anfangszeiten der modernen Pathologie im 19. Jahrhundert fand die morphologische Heterogenität innerhalb von Tumoren Beachtung. Der anhaltende technologische Fortschritt ermöglichte die Durchführung weiterführender Studien über die genetischen, phänotypischen und funktionellen Unterschiede von Tumorzellen (Heppner 1984). Im Jahre 1976 veröffentlichte Peter Nowell eine Sichtweise auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren, die auf evolutionären Prozessen beruht (Nowell 1976). Demzufolge entwickeln sich Tumoren aus somatischen Zellen durch die schrittweise Anhäufung genetischer Veränderungen (klonale Evolution). Die entstehenden Tumorzellen stehen miteinander in direktem Wettbewerb um Raum und Nährstoffe und unterliegen somit einem ständigen Selektionsdruck, am besten angepasst zu sein (*fitness*). Dabei kann mit jeder hinzugewonnenen Mutation eine funktionelle Konsequenz bezüglich der *fitness* einhergehen, was der Zelle z. B. deren Ausbreitung im Patientengewebe erleichtern könnte (genzentrische Sicht, Nowell 1976). Die Anwendung evolutionsbiologischer Theorien auf die Tumorphathologie hilft auch heute noch, verschiedene Aspekte der Erkrankung besser zu verstehen (Aktipis et al. 2013; Merlo et al. 2006).

In Studien über die genetische Diversität von Tumor-Subklonen konnte Nowells Hypothese mit Hilfe genomweiter Analysetechniken unterstützt werden (Gerlinger et al. 2012; Navin et al. 2011). Parallel zur Untersuchung der klonalen Evolution, die ausschließlich durch Zellteilung vererbte Mutationen berücksichtigt, hat sich auch das Wissen über die phänotypische Heterogenität zwischen Tumorzellen erweitert. Speziell die Entwicklung der Tumorstammzellhypothese, die besagt, dass sich phänotypisch charakterisierte Tumor-Subpopulationen in ihren funktionellen Eigenschaften wie der Tumorigenität oder der Selbsterneuerung unterscheiden, hat viel zum Verständnis der Tumorphathologie beigetragen (Clarke et al. 2006; Reya et al. 2001; Visvader & Lindeman 2008). Die genzentrische und die funktionelle Sichtweise schließen sich gegenseitig nicht aus und zeichnen nach heutiger Sicht gemeinsam ein

mehrdimensionales Bild der Beschaffenheit eines Tumorgewebes mit enormer Komplexität (Bedard et al. 2013; Greaves & Maley 2012; Marusyk et al. 2012; Vermeulen et al. 2008).

Polyklonale Dynamik

Nach heutigen Erkenntnissen wird angenommen, dass sich Tumoren in den meisten Fällen aus einer einzelnen transformierten Zelle entwickeln. Zu der folgenden Ausprägung von genetischer Heterogenität kann es kommen, wenn sich im Laufe der Zeit weitere Mutationen in Subklonen anhäufen. Durch Faktoren wie z. B. eine erhöhte Proliferationsrate und chromosomale Instabilität kann sich der stochastische Prozess der Akquisition neuer Mutationen noch verstärken. Eine Minderheit der so entstandenen Subklone kann auf diesem Wege einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Tumorzellen gewinnen und folglich ihren Anteil in der Population erhöhen. Dabei ist zu beachten, dass vorteilhafte Mutationen immer in dem gegenwärtigen Kontext zu betrachten sind, da die Zellen einem heterogenen und wechselhaften Umfeld ausgesetzt sind, dem es sich anzupassen gilt. An einem anderen Ort, zu einer anderen Zeit oder mit einem anderen genetischen Hintergrund kann dieselbe Mutation einen neutralen oder negativen Einfluss auf den Anteil eines Subklons im Tumor haben. Durch die ständige Konkurrenz koexistierender Subklone und die fortwährende Entstehung neuer Subklone folgt die Evolution von Tumoren anstatt einer linearen zumeist einer verzweigten Entwicklung, bei der ein dominierender Klon Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sukzessive anhäuft (siehe Abbildung 1.3, Marusyk & Polyak 2010).

Eine therapeutische Intervention beeinflusst den Tumor von außen und erzeugt entsprechend ihrem Wirkmechanismus einen Selektionsdruck auf die davon betroffenen Tumorzellen. Wenn bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine stark ausgeprägte klonale Diversität vorhanden ist, erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit, dass Subklone mit zufällig erworbenen präexistenten Resistenzmechanismen gegenwärtig sind oder dergleichen unter Behandlung schneller akquirieren können. Diese Subklone haben einen Überlebensvorteil gegenüber anderen, was zu deren steigendem Anteil innerhalb der Population und gegebenenfalls zum Therapieversagen führt. Dieses Szenario konnte bereits bei Patienten mit Imatinib-resistenter chronischer myeloischer Leukämie

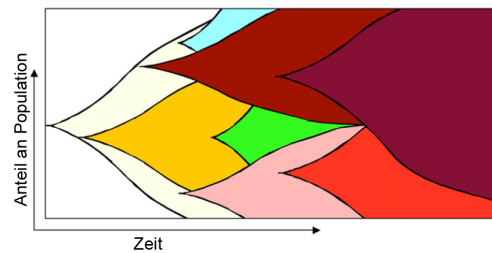


Abbildung 1.3: Schema der verzweigten Tumorprogression. Die Farben stellen verschiedene koexistierende Subklone, die von einem gemeinsamen Ursprungsklon abstammen, während der Progression dar. Die erhöhte Farbtintensität korreliert mit Tumorprogression. Modifiziert nach Marusyk & Polyak 2010.

(Shah et al. 2002) und Panitumumab-resistentem kolorektalen Karzinom mit *KRAS*-Wildtyp aufgezeigt werden (Diaz et al. 2012). Neben dem Vorkommen präexistenter resistenter Zellen konnte auch der Einfluss der Chemotherapie auf das Auftreten von spezifischen Mutationen beim Mammakarzinom (Sakai et al. 2008) sowie beim Glioblastom (Hunter et al. 2006) gezeigt werden (Marusyk & Polyak 2010).

Genetische Heterogenität

Aktuelle Studien zur genetischen intratumoralen Heterogenität deuten auf eine komplexe klonale Architektur in Tumoren hin. Durch fortschrittliche Methoden der DNA-Sequenzierung können Tumorgenome in einer hohen Auflösung objektiv erfasst und die Tumor-Komposition und -Phylogenie zu Teilen nachgebildet werden. So können nicht nur Aussagen über die Entwicklung von Tumoren bis zum Zeitpunkt der Diagnose, sondern auch über Metastasierung und Therapie-assoziierte Veränderungen getroffen werden (Gerlinger et al. 2012; Johnson et al. 2014; Navin et al. 2011; Yachida et al. 2010; Zhang et al. 2014).

Auch Verfahren mit geringerer Auflösung wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder *microarray*-Genotypisierungen haben sich als bedeutsam für ein besseres Verständnis der Tumorevolution erwiesen (Anderson et al. 2011; Snuderl et al. 2011; Sottoriva et al. 2013). In einer der ersten Studien über die Therapie-assoziierten genetischen und phänotypischen Veränderungen in gepaarten Tumor-Biopsien konnten auf Einzelzellebene anhand einer Kombination von Immunfluoreszenz und FISH (Immunfluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, iFISH) auch rein phänotypische Veränderungen durch Therapiemaßnahmen demonstriert werden (Almendro et al. 2014).

Nicht-genetische Heterogenität

Unabhängig von genetischen Unterschieden lassen sich auch funktionelle Unterschiede zwischen Tumorzellen feststellen. So konnte z. B. in einer Studie am kolorektalen Karzinom gezeigt werden, dass Tumoren, die nach der Transplantation von Einzelzellen entstehen, die phänotypische Vielfalt des parentalen Tumors rekonstruieren können (Dalerba et al. 2011). Neben der genetischen Ausstattung einer Einzelzelle gibt es demnach noch dynamisch regulierte Faktoren, die ihr Verhalten und das ihrer Abkömmlinge beeinflussen. Im Rahmen der Tumorstammzellhypothese wurden funktionelle Ansätze entworfen, um den Status einer Zelle in Hinblick auf deren Potenzial zu ermitteln, sich selbst zu erneuern, in andere Zelltypen zu differenzieren, Tumoren nach Xenotransplantation zu erzeugen und resistent gegen antineoplastische Therapie zu sein (Visvader & Lindeman 2008). Bislang fehlt es an eindeutigen Biomarkern, um diese Zustände eindeutig und reproduzierbar definieren zu können. Fortschritte in der genomweiten Analyse der Genexpression (Patel et al. 2014) und Epigenetik (Smallwood et al. 2014) von Einzelzellen könnten in Zukunft dabei helfen, ein vollständigeres Bild der genetischen und nicht-genetischen Heterogenität und der daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen zu zeichnen. Ein tieferes Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Beziehung ist speziell in Hinblick auf die klinische Umsetzung von großer Bedeutung (Ashworth et al. 2011).

Klinische Bedeutung

Für einige Tumorerkrankungen konnte allein ein hohes Ausmaß der genetischen Heterogenität zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer schlechten Prognose korreliert werden (Chen et al. 2012; Maley et al. 2006; Mroz et al. 2013). Beim Glioblastom und auch bei verschiedenen anderen Tumorentitäten konnte zudem eine heterogene intratumorale Verteilung genetischer und phänotypischer Biomarker gezeigt werden (Almendro et al. 2013; Meyer et al. 2015; Patel et al. 2014; Snuderl et al. 2011). Diese Befunde zeigen, dass durch eine Analyse, die den Tumor nicht als Mosaik aus individuellen Entitäten betrachtet, wertvolle Informationen bezüglich der Stratifizierung von Patienten verloren gehen können. Mit hochauflösenden Analysemethoden können bei einigen Tumorentitäten bereits jetzt schon präexistierende, resistente Subklone vor Behandlungsbeginn

ausfindig gemacht werden, was eine frühzeitige Anpassung der Therapiemaßnahmen ermöglicht (Almendro et al. 2013; Bedard et al. 2013; Crockford et al. 2014).

Funktionelle Studien an *in vitro* isolierten Glioblastom-Subklonen zeigten, dass diese heterogen auf antineoplastische Chemotherapeutika ansprechen können (Meyer et al. 2015; Yung et al. 1982). Weiterführende funktionelle Untersuchungen von Subklonen zur Chemoresistenz in einem intratumoralen Kontext und unter Berücksichtigung von Geno- und Phänotypen können *in situ*-Studien ergänzen und wertvolle Hinweise für die translationale Forschung liefern (Ashworth et al. 2011; Ene & Fine 2011).

2. Zielsetzung

Das Glioblastom ist ein maligner Hirntumor, der sich u. a. durch ein hohes Ausmaß an zellulärer Diversität auszeichnet. Die morphologische Vielfalt der Tumorzellen wurde bereits früh in histopathologischen Untersuchungen wahrgenommen (Cushing & Bailey 1926). Darüber hinaus konnte in aktuelleren Studien gezeigt werden, dass sich einzelne Zellen desselben Tumors auch anhand ihrer genetischen, phänotypischen und funktionellen Profile stark voneinander unterscheiden können (Meyer et al. 2015; Patel et al. 2014; Snuderl et al. 2011; Yung et al. 1982).

Bislang ist nur wenig über die Bedeutung der intratumoralen Heterogenität im Zusammenhang mit dem Einsatz von Therapiemaßnahmen bekannt. Die Beobachtung, dass bei anderen Tumorentitäten allein ein hohes Ausmaß an genetischer intratumoraler Heterogenität mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (Chen et al. 2012; Maley et al. 2006; Mroz et al. 2013), könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der zellulären Diversität bei Tumoren und einem Therapieversagen hinweisen.

Auf diesen Befunden aufbauend wurde in der vorliegenden Studie an Zellkultur- und Tiermodellen des Glioblastoms untersucht, (1) wie stark sich verschiedene zelluläre Entitäten (Subklone) desselben Tumors in ihrem Ansprechen auf klinisch relevante Chemotherapeutika untereinander unterscheiden, (2) ob sich Substanzen identifizieren lassen, die eine unterschiedliche Wirkung auf koexistierende Subklone haben und (3) ob sich anhand der Analyse von Subklonen Therapie-assoziierte Veränderungen der zellulären Komposition von Tumoren vorhersagen lassen. Anschließend wird diskutiert, wie sich aus den gewonnenen Erkenntnissen neue Ansätze für eine Verbesserung der Behandlung des Glioblastoms ableiten lassen könnten.

3. Material

3.1 Geräte

Gerät / Funktion	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Cubis	Sartorius
Automatischer Sequenzierer	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Beheizbares Wasserbad	W 6	Medingen
Beheizbares Wasserbad	WNB 14	Memmert
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 150 / 240	Heraeus
Dokumentationssystem Agarosegele	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson
Einfrierbehälter	StrataCooler Cryo Preservation Module	Stratagene
Feinwaage	LA 310 S	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Carl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	AxioImager.Z1	Carl Zeiss
Folienschweiß-Automat für MTP	4s2 Semi-Automated Heat Sealer	4titude
Fotodokumentation von MTP	Cellavista	SynenTec
Gefrierschrank (-20°C)	G 2013 Comfort	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	HERAfreeze	Heraeus
Heizschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Homogenisator	POLYTRON PT 1600 E	Kinematica
Kamera für AxioImager.Z1	AxioCam MRm	Carl Zeiss
Kamera für Axioskop 2	AxioCam MRm	Carl Zeiss
Kamera für DMI3000B	DFC 420	Leica Microsystems
Kühlblock für 96-well MTP	PCR-Cooler	Eppendorf
Laborautoklav	Varioklav 135T	Thermo Fisher Scientific
Lagerbehälter Stickstoffkälte	MVE 800 Series -190	MVE /Chart
Laufkammern Gelelektrophorese	Agagel (Mini, Midi, Maxi)	Biometra
Lichtmikroskop	DMI3000B	Leica Microsystems
Magnetrührer mit Heizplatte	ARE	Velp Scientifica
Mikrotiterplattenleser	Infinite F200	Tecan
Mikrozentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR
pH-Meter	FE20 - FiveEasy	Mettler Toledo
Pipette, 1-Kanal (elektrisch)	Xplorer	Eppendorf
Pipette, 1-Kanal (manuell)	Research	Eppendorf
Pipette, 8-Kanal (elektrisch)	Transferpette -8 electronic	Brand
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand
Rotator zum Mischen	VWR Tube Rotator	VWR
RTQ-PCR System	ViiA 7	Applied Biosystems
Sicherheits-Bunsenbrenner	phoenix eco	Schuett Biotec
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KSP12	Heraeus
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab
Stromversorgung Gelelektrophorese	Standard Power Pack P25	Biometra

Strudelmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Thermocycler	TPersonal	Biometra
Vakuumpumpe	BVC21	Vacuubrand
Waage	JL1502-G	Mettler Toledo
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal, bright-line	Marienfeld
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge	Centrifuge 5702 / 5415 R	Eppendorf

3.2 Labormaterial

Bezeichnung	Art.-Nr.	Hersteller
6-well MTP für die Zellkultur	3516	Costar
6-well MTP für die Zellkultur (<i>ultra low attachment</i>)	3471	Costar
12-well MTP für die Zellkultur	3512	Costar
24-well MTP für die Zellkultur	3524	Costar
96-well MTP für die Lagerung von Wirkstoffen	4ti-0960	4titude
96-well MTP für die Molekularbiologie	168055	Nunc
96-well MTP für die RTQ-PCR	82-1400-A	Peqlab
96-well MTP für die Zellkultur	3596	Costar
Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheit (0,5 mL 30K)	UFC503096	Amicon
Deckgläser für Mikroskopie (24×60 mm)	2000878	Labomedic
Deckgläser für Mikroskopie (rund, ø 13 mm)	631-0149	VWR
DMSO-resistente Folien für Folienschweiß-Automaten	4ti-0585	4titude
Klonzylinder (8 mm)	3166-8	Corning
Kryogefäße (1,8 mL)	377267	Nunc
Mullkompressen (10×10 cm)	4018456	Hartmann
Objektträger (25×75×1,0 mm)	J1800AMNZ	Menzel-Gläser
Parafilm 'M'	701605	Brand
Pasteurpipetten (22,5 cm)	747720	Brand
Petrischalen (ø 10 cm)	391-2002	VWR
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µM)	Diverse	Axygen
	Diverse	Eppendorf
	Diverse	Nerbe Plus
Reaktionsgefäße für die Durchflusszytometrie (5 mL)	55.1579	Sarstedt
Reaktionsgefäße (200, 500, 1500, 2000 µM)	Diverse	Biozym Scientific
	Diverse	Eppendorf
	Diverse	Sarstedt
Selbstklebende DMSO-resistente Folien für MTP	4ti-0512	4titude
Selbstklebende Folien für MTP	82-0558-A	Peqlab
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 mL)	Diverse	Falcon
Silikon-Hochvakuumfett	1018817	Dow Corning
Skalpelle (Edelstahlklinge, Typ 15)	02.001.30.015	Feather
Spritzen (10 mL, 2-teilig)	300294	Becton Dickinson
Sterilfilter für Spritzen (0,2 µm, ø 25 mm)	4612	PALL
Sterilfilter für Vakuumfiltration (0,22 µm)	SCGPT05RE	Merck Millipore
Wischtücher (Kimtech Science)	7552	Kimberly-Clark
Zellkulturschalen (ø 3,5 cm)	353001	Falcon
Zellkulturschalen (ø 6 cm)	353004	Falcon
Zellkulturschalen (ø 10 cm)	353003	Falcon
Zellschaber mit flexibler 2-Positionen-Klinge (25 cm)	83.1830	Sarstedt
Zellsieb (70 µm)	352350	Falcon
Zentrifugationsgefäße (15, 50 mL)	Diverse	Corning
	Diverse	Falcon
	Diverse	Nerbe Plus
Zytostatika-Arbeitsunterlage (steril)	BI-8001	Berner International

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Kurzform	CAS	Summenformel	Lagerung	Art.-Nr.	Hersteller
2-Mercaptoethanol	β -ME	60-24-2	C ₂ H ₆ OS	RT	M3148	Sigma-Aldrich
2-Propanol		67-63-0	C ₃ H ₈ O	RT	A3928	AppliChem
4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid	DAPI	28718-90-3	C ₁₆ H ₁₅ N ₅ · 2HCl	4°C	D9542	Sigma-Aldrich
Agarose		9012-36-6	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	RT	A9539	Sigma-Aldrich
Citronensäure Monohydrat		1609-47-8	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	RT	5110.3	Carl Roth
Diethylpyrocarbonat	DEPC	5949-29-1	C ₆ H ₁₀ O ₅	4°C	K028	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (Hybri-Max)	DMSO	67-68-5	(CH ₃) ₂ SO	RT	D2650	Sigma-Aldrich
Essigsäure		64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	RT	A6283	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	EtOH	64-17-5	C ₂ H ₆ O	RT	A3678	AppliChem
Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	EDTA	6381-92-6	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	RT	X986	Carl Roth
Eukitt		25608-33-7	(C ₈ H ₁₄ O ₂ · C ₅ H ₈ O ₂) _n	RT	03989	Sigma-Aldrich
Glycerol		56-81-5	C ₃ H ₈ O ₃	RT	G5516	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid		7447-40-7	KCl	RT	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumphosphat monobasisch		7778-77-0	KH ₂ PO ₄	RT	P5655	Sigma-Aldrich
Methanol	MeOH	67-56-1	CH ₃ OH	RT	8388	Carl Roth
Methylcellulose		9004-67-5		RT	M0512	Sigma-Aldrich
Natriumazid		26628-22-8	NaN ₃	RT	K305	Carl Roth
Natriumchlorid		7647-14-5	NaCl	RT	S5886	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat		144-55-8	NaHCO ₃	RT	A0384	AppliChem
Natriumhydroxid		1310-73-2	NaOH	RT	S8045	Sigma-Aldrich
Natriumphosphat dibasisch		7558-79-4	Na ₂ HPO ₄	RT	S5136	Sigma-Aldrich
Natriumselenit	SOSE	10102-18-8	Na ₂ SeO ₃	RT	S5261	Sigma-Aldrich
Orange G		1936-15-8	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	RT	0318	Carl Roth
Paraformaldehyd	PFA	30525-89-4	(CH ₂ O) _n	RT	P6148	Sigma-Aldrich
Poly-L-Ornithin Hydrobromid		27378-49-0	C ₅ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	-20°C	P3655	Sigma-Aldrich
Progesteron		57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	-20°C	P8783	Sigma-Aldrich
Putrescin Dihydrochlorid		333-93-7	C ₄ H ₁₂ N ₂ · 2HCl	RT	P5780	Sigma-Aldrich
Saccharose (Sucrose)		57-50-1	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	RT	4621	Carl Roth
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Tris	77-86-1	C ₄ H ₁₁ NO ₃	RT	A411	Carl Roth
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid	Tris-HCl	1185-53-1	C ₄ H ₁₁ NO ₃ · HCl	RT	9090.3	Carl Roth
Triton X-100		9002-93-1	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) ₉₋₁₀	RT	93443	Sigma-Aldrich
Xylol (Isomere)		1330-20-7	C ₈ H ₁₀	RT	A2476	Appllichem

3.4 Lösungen und Puffer

3.4.1 Vorgefertigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Kurzform	Stock	Lagerung	Art.-Nr.	Hersteller
100 bp Größenstandard		0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4°C	GC-015-004	GeneCraft
AlamarBlue		10 \times	4°C	DAL1100	Molecular Probes
Antibiotic-Antimycotic	ABX	100 \times	-20°C	15240-062	Gibco
Aqua-Poly/Mount		100%	4°C	18606-20	Polysciences, Inc.
B-27 Supplement	B-27	50 \times	-20°C	17504-044	Gibco
Desoxyribonukleosidtriphosphate (Mix)	dNTPs	10 mM jeweils	-20°C	18427-088	Invitrogen
DMEM/F-12 Medium		1 \times	4°C	11320074	Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	1 \times	RT	14190-094	Gibco
Eosin G-Lösung (wässrig)		1%	RT	3137.1	Carl Roth
Ethidiumbromid-Lösung		1%	RT	2218	Carl Roth
Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)	FCS	100%	-20°C	SH30071.03	HyClone
Fluorescein		1 mM	-20°C	170-8780	Bio-Rad
Formaldehyd-Lösung (pH 6,9)		4%	RT	1004969010	Merck Millipore
GeneScan 500 ROX (Größenstandard)			4°C	4310361	Applied Biosystems
Hämalaunlösung sauer (nach Mayer)			RT	T865	Carl Roth
Hi-Di (deionisiertes Formamid)		100%	-20°C	4440753	Applied Biosystems
Kolliphor EL		100%	RT	C5135	Sigma-Aldrich
L-Glutamin		200 mM (100 \times)	-20°C	25030	Gibco
Laminin (natürliches Maus-Protein)		1 mg/mL	-20°C	23017-015	Invitrogen
Leukemia Inhibitory Factor (rekombinant, human)	LIF	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4°C	LIF1010	Merck Millipore
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	50 mM	-20°C	Y02016	Invitrogen
N-2 Supplement	N-2	100 \times	-20°C	17502-048	Gibco
Natronlauge	NaOH	1 M	RT	A1432	AppliChem
Neurobasal Medium		1 \times	4°C	21103-049	Gibco
PCR Puffer (inkl. MgCl ₂)		10 \times	-20°C	18067-017	Invitrogen
Phenolrot-Lösung (in PBS)		0,50%	RT	P0290	Sigma-Aldrich
QIAzol Lysis Reagent			4°C	79306	Qiagen
Reagent DX (Entschäumer)		100%	RT	19088	Qiagen
Rinderhypophysenextrakt (<i>bovine pituitary extract</i>)	BPE	Variabel	-20°C	13028-014	Gibco
RNase A		20 mg/mL	RT	12091-039	Invitrogen
ROX Referenz-Farbstoff		50 \times	-20°C	12223-012	Invitrogen
RTQ-PCR Puffer (exkl. MgCl ₂)		10 \times	-20°C	Y02028	Invitrogen
Salzsäure	HCl	1 M	RT	A1434	AppliChem
Serum aus der Ziege (<i>normal goat serum</i>)	NGS	100%	-20°C	G6767-100ML	Sigma-Aldrich
SYBR Green I für RTQ-PCR		10000 \times	-20°C	S9430	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polymerase		5 U/ μL	-20°C	10342-020	Invitrogen
Trypanblau-Lösung		0,4%	RT	15250-061	Gibco

3.4.2 Angesetzte Lösungen, Medien und Puffer

Für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Blocklösung	Immunhistochemie	10 % FCS, 5 % NGS in PBST
Citratpuffer	Immunhistochemie	2,1 g Citronensäure Monohydrat in 1 L ddH ₂ O (pH 6)
DEPC-Wasser	Resuspension von RNA	0,1 % DEPC in ddH ₂ O
DNA-Ladepuffer (10×)	Agarose Gelelektrophorese	40 % Sucrose, 0,36 % Orange G in 1×TAE
PBS-Azid	Lagerung fixierter Zellen	0,1 % Natriumazid in PBS
PBST	Immunhistochemie	0,1 % Triton X-100 in PBS
PFA 4 %	Fixierung	4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,2)
RTQ-PCR Supermix	RTQ-PCR	2×RTQ-PCR-Puffer, 0,2×ROX Referenz-Farbstoff, 6 mM MgCl ₂ , je 40 μM dNTPs, 1,5×SYBR Green I, 6 % DMSO in ddH ₂ O
TAE (50×)	Agarose Gelelektrophorese	242 g/L Tris, 57,1 mL/L Essigsäure (100 %), 50 mM EDTA in ddH ₂ O
TE	Resuspension von DNA	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0) in ddH ₂ O

Für die Zellkultur

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
DF (2×)	Neurosphären-Ansatz	1×N-2, 1×B-27, 2×ABX in DMEM/F-12
DF10	Zellexpansion	10 % FCS, 1×ABX in DMEM/F-12
EDTA-PBS	Dissoziation von Zellen	5 mM EDTA in PBS
EF	Wachstumsfaktoren	10 % FCS, 200 ng/mL EGF, 200 ng/mL FGF-2, 1×ABX in DMEM/F-12
FC	Zellexpansion	2 mM L-Glutamin, 0,5×N-2, 0,5×B-27, 1×ABX, 1 μg/mL Laminin in Neurobasal
FC-Differenzierungsmedium	Differenzierung	1×B-27, 2 mM L-Glutamin, 1×ABX in Neurobasal
Freeze	Kryopräservierung	20 % DMSO, 10 % FCS, 1×ABX in DMEM/F-12
Methylcellulose-Lösung	Neurosphären-Ansatz	20 mg/mL Methylcellulose, 2,4 mg/mL Natriumhydrogencarbonat in 1×DMEM/F-12
N5	Zellexpansion	5 % FCS, 0,25 % BPE, 20 nM Progesteron, 5 ng/mL SOSE, 100 μM Putrescin, 4 μg/mL Insulin, 100 μg/mL Transferrin, 10 ng/mL LIF, 1 μg/mL Laminin, 1×ABX in DMEM/F-12
N5 (2×)	Neurosphären-Ansatz	10 % FCS, 0,5 % BPE, 40 nM Progesteron, 10 ng/mL SOSE, 200 μM Putrescin, 8 μg/mL Insulin, 200 μg/mL Transferrin, 20 ng/mL LIF, 2×ABX in DMEM/F-12
N5-Differenzierungsmedium	Differenzierung	0,25 % BPE, 20 nM Progesteron, 5 ng/mL SOSE, 100 μM Putrescin-Dihydrochlorid, 4 μg/mL Insulin, 100 μg/mL Transferrin, 1×ABX in DMEM/F-12

Poly-L-Ornithin-Lösung (1000×)	Beschichtung von Kulturschalen	15 mg/mL Poly-L-Ornithin Hydrobromid in ddH ₂ O
TD-Puffer (2×)	Dissoziation von Zellen	16 mg/L Natriumchlorid, 760 mg/L Kaliumchlorid, 200 mg/L Natriumphosphat dibasisch, 6 g/L Tris in ddH ₂ O
Trypsin-Lösung	Dissoziation von Zellen	2 mg/mL Trypsin, 1×Versene-Puffer, 0,8×TD-Puffer
Versene-Puffer (5×)	Dissoziation von Zellen	200 mg/L EDTA, 8 g/L Natriumchlorid, 200 mg/L Kaliumchlorid, 1,19 g/L Natriumphosphat dibasisch, 180 mg/L Kaliumphosphat monobasisch in ddH ₂ O

3.5 Lyophilisierte Proteine

Protein	Herkunft	Lösungsmittel	Stock	Art.-Nr.	Hersteller
DNase I	Bovin (Pankreas)	PBS	10 mg/mL bei -20°C	LS002140	Worthington
EGF	Human (rekombinant)	DF10	10 µg/mL bei -20°C	236-EG	R&D Systems
FGF-2	Human (rekombinant)	DF10	10 µg/mL bei -20°C	233-FB	R&D Systems
INS	Human (rekombinant)	20 % Essigsäure in ddH ₂ O	2 mg/mL bei -20°C	4502-01	Merck Millipore
Transferrin	Human (Blutplasma)	ddH ₂ O	50 mg/mL bei -20°C	4452-01	Merck Millipore
Trypsin	Porzin (Pankreas)	2×ABX, 0,001 % Phenolrot in ddH ₂ O (pH 7,3)	5 mg/mL bei -20°C	27250-018	Gibco

3.6 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Art.-Nr.	Hersteller
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Isolation von DNA und RNA	80204	Qiagen
BeadChip Human610-Quad v1_B	<i>Microarray</i> für Genotypisierung	WG-311-1001	Illumina
BeadChip HumanHap550-2 v3	<i>Microarray</i> für Genotypisierung	WG-350-5503	Illumina
BeadChip HumanHT-12 v3	<i>Microarray</i> für Genexpression	BD-103-0203	Illumina
CellTracker Green CMFDA Dye	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	C7025	Molecular Probes
CellTracker Red CMTPX Dye	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	C34552	Molecular Probes
MLPA GBM Gain	MLPA	P345-X1	MRC-Holland
MLPA GBM Loss	MLPA	P346-X1	MRC-Holland
RNeasy Plus Mini Kit	Isolation von RNA	74136	Qiagen
Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	V-22889	Molecular Probes

Bezeichnung	Lösungsmittel	Stock	CAS	Lagerung	Art.-Nr.	Hersteller
The Killer Collection [†]	DMSO	10 mM	-	-80°C	-	Microsource Discovery Systems
17-AAG (Tanespimycin)	DMSO	2 mM	75747-14-7	-20°C	LKT-A0025	LKT
Bortezomib (PS-341)	DMSO	50 µM	179324-69-7	-20°C	sc-217785	Santa Cruz Biotechnology
Cabozantinib (XL184)	DMSO	20 mM	849217-68-1	-20°C	S1119	Selleck Chemicals
Cisplatin (DDP)	DMSO	20 mM	15663-27-1	-20°C	LKT-C3374	LKT
Dacomitinib (PF-00299804)	DMSO	6,325 mM	1110813-31-4	-20°C	S2727	Selleck Chemicals
Dasatinib (BMS-354825)	DMSO	2 mM	302962-49-8	-20°C	S1021	Selleck Chemicals
Enzastaurin (LY317615)	DMSO	6,325 mM	170364-57-5	-20°C	S1055	Selleck Chemicals
Etoposide (VP-16)	DMSO	10 mM	33419-42-0	-20°C	Cay12092	Cayman Europe
Gefitinib (ZD1839)	DMSO	20 mM	184475-35-2	-20°C	Cay13166	Cayman Europe
Imatinib (STI-571)	DMSO	10 mM	220127-57-1	-20°C	Cay13139	Cayman Europe
Lomustine (CCNU)	DMSO	20 mM	13010-47-4	-20°C	40011667	Medac
Lonafarnib (SCH 66336)	DMSO	10 mM	193275-84-2	-20°C	Cay11746	Cayman Europe
Mibefradil (Ro 40-5967)	DMSO	20 mM	116644-53-2	-20°C	sc-204083	Santa Cruz Biotechnology
PD 0332991 (Palbociclib)	DMSO	6,325 mM	827022-32-2	-20°C	S1116	Selleck Chemicals
Pelitinib (EKB-569)	DMSO	6,325 mM	257933-82-7	-20°C	S1392	Selleck Chemicals
Perifosine (KRX-0401)	EtOH	20 mM	157716-52-4	-20°C	S1037	Selleck Chemicals
Rapamycin (Sirolimus)	DMSO	6,325 mM	53123-88-9	-20°C	S1039	Selleck Chemicals
Sorafenib (BAY 43-9006)	DMSO	20 mM	284461-73-0	-20°C	LKT-S5868	LKT
Sunitinib (SU11248)	DMSO	6,325 mM	341031-54-7	-20°C	S1042	Selleck Chemicals
Temozolomide (TMZ)	DMSO	100 mM	85622-93-1	-20°C	T2577	Sigma-Aldrich
Thioguanine (6-TG)	0,02 M NaOH	10 mM	154-42-7	-20°C	A4882	Sigma-Aldrich
Vorinostat (SAHA)	DMSO	10 mM	149647-78-9	-20°C	Cay10009929	Cayman Europe

[†] Siehe Tabelle A.1 für eine Auflistung aller 160 Substanzen der „Killer Collection“.

3.8 Primer

Gen	Sequenz Vorwärtsprimer (5'-3')	Sequenz Rückwärtsprimer (5'-3')	Hersteller
<i>ASB3</i>	GCATACACAGGCGTAATCCC	CACAGGAGTCACTGCCTACA	Invitrogen
<i>BID</i>	GGCTGTGAAGGCTATGGTGT	AGGCTGACAGTTGAGAGCTG	Invitrogen
<i>CDKN2C</i>	TAACTTGAGGGCCACCGAAC	ACCGCGGAAGGAAAGACATT	Invitrogen
<i>CHD1</i>	AAGGCCATTGGCATCTGTTTG	TGATTTGGTGTAAGGCGCAC	Invitrogen
<i>MEMO1</i>	TCTGACACTTCTTGGGGGAC	TCTGAGCTCCTTCTGGCTTC	Invitrogen
<i>NF2</i>	TGTGCTCCTGGCTTCTTACG	AGGAGTGATCCCATGACCCA	Invitrogen
<i>SCAMP1</i>	CACTGTATGTGCTCCCTGGT	TGCCTCCCCTCAACTCTAAC	Invitrogen

3.9 Antikörper

Epitop	Klon	Verdünnung	Spender	Art.-Nr.	Hersteller
pan-Cadherin	Polyklonal	1:200	Kaninchen, IgG	PA5-19479	Pierce
GFAP	Polyklonal	1:600	Kaninchen, IgG	Z0334	DAKO
α -Tubulin	DM1A	1:1000	Maus, IgG	T6199	Sigma-Aldrich
β III-Tubulin	5G8	1:1000	Maus, IgG	G712A	Promega
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 555	1:500	Ziege, IgG	A-21429	Molecular Probes
Maus IgG	Alexa Fluor 488	1:800	Ziege, IgG	A-11029	Molecular Probes

3.10 Zellkulturen

Bezeichnung	Zelltyp	Medium	Herkunft
AHNPs	Aus humanem Hippocampus gewonnene adulte neurale Vorläuferzellen	FC	Siehe Abschnitt 4.1
BN035	Primäre Glioblastomzellen	FC	Siehe Abschnitt 4.1
BN046	Primäre Glioblastomzellen	FC	Siehe Abschnitt 4.1
BN055	Primäre Glioblastomzellen	FC	Siehe Abschnitt 4.1
BN118	Primäre Glioblastomzellen	FC	Siehe Abschnitt 4.1
Fibroblasten	Dermale Fibroblasten	DF10	Koch et al. 2011
GNV019	Primäre Glioblastomzellen	N5	Siehe Abschnitt 4.1
hESCdNP	Aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitete neurale Vorläuferzellen	Koch et al. 2009	Koch et al. 2009
U-87 (MG)	Konventionelle Glioblastom-Zelllinie	DF10	ATCC, HTB-14

3.11 Mausstämme

Bezeichnung	Nomenklatur	Vertreiber
Fox Chase SCID Beige	CB17.Cg-Prkdc ^{scid} Lyst ^{bg} /Crl	Charles River Laboratories
NMRI-nu	RjOrl:NMRI-Foxn1 ^{nu} /Foxn1 ^{nu}	Janvier Labs

3.12 Software

Bezeichnung	Version	Verwendung	Vertreiber
AxioVision	4.5.0.0	Steuerung Fluoreszenzmikroskope	Carl Zeiss
Cellavista Software	1.1	Steuerung & Bildanalyse Cellavista	SynenTec
Coffalyser	8	Auswertung MLPA	MRC-Holland
Excel	12.3.6	Tabellenkalkulation	Microsoft
Fiji	1.48k	Bildverarbeitungsprogramm	NIH
FlowJo	8.7	Auswertung Durchflusszytometrie	Tree Star
Genemapper	3.7	Datenverarbeitung MLPA	Applied Biosystems
GenomeStudio	2011.1	Verarbeitung von <i>microarrays</i>	Illumina
Illustrator	13.0.0	Grafikprogramm	Adobe
Leica FireCam	3.2	Steuerung Lichtmikroskop	Leica Microsystems
Photoshop	10.0	Bildbearbeitungsprogramm	Adobe
Prism	6.0f	Statistik-Software	GraphPad Software
R	3.0.2	Statistik-Software	The R Foundation for Statistical Computing
ViiA 7 Software	1.2	Steuerung ViiA 7 RTQ-PCR-System	Applied Biosystems
Ensembl Genome Browser	-	Auswahl von Oligonukleotiden	http://www.ensembl.org/
Primer Designing Tool	-	Auswahl von Oligonukleotiden	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Schaubilder wurden anhand der Vorlagen von Servier Medical Art (<http://www.servier.com>) erstellt.

4. Methoden

4.1 Zellkultur

Die Zellkultur erlaubt es, Zellen außerhalb eines Organismus unter kontrollierten Bedingungen zu erhalten und zu vervielfältigen. Durch die Anpassung verschiedener Umgebungsfaktoren, wie z. B. der Temperatur, Atmosphäre, Oberflächenbeschaffenheit und der Zusammensetzung des Nährmediums, kann den individuellen Ansprüchen unterschiedlicher Zelltypen entsprochen werden. Alle in der vorliegenden Studie verwendeten Zellkulturen sind humanen Ursprungs und wurden, sofern nicht anders beschrieben, adhärent in Antibiotika-haltigen Nährmedien bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

4.1.1 Gewinnung und Expansion primärer Zellkulturen

Primäre Zellkulturen sind Kulturen, die frisch aus einem Gewebe abgeleitet und nicht immortalisiert wurden. Die für diese Studie zur Verfügung gestellten Glioblastom- bzw. Hippocampus-Biopsien wurden in den neurochirurgischen Abteilungen der Universität Bonn (BN035–BN118, AHNPs) und der Universität von Florida (GNV019; Gainesville, FL, USA) entnommen. Die lokalen Ethikkommissionen an beiden Standorten haben das Verfahren genehmigt (Bonn: 182/08, Gainesville: IRB# 319-1996, IRB# 292-2001) und alle Patienten haben nach ihrer Aufklärung ein schriftliches Einverständnis für die Nutzung des Gewebematerials abgegeben. Die Diagnostizierung der Tumorbiopsien wurde anhand der Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) von zwei Neuropathologen unabhängig voneinander durchgeführt (Louis et al. 2007a,b).

Verarbeitung von Gewebeproben

Frisches Tumor- oder Hippocampusgewebe wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von Pinzette und Skalpell zerkleinert, durchmischt und in drei etwa gleich große Einheiten aufgeteilt. Das erste Drittel wurde für histologische Untersuchungen für mindestens 24 Stunden mit 4 %igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Das zweite Drittel wurde für etwaige molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff bei ca. -196°C schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Das letzte Drittel wurde für die Gewinnung einer primären Zellkultur verwendet.

Gewinnung primärer Zellkulturen

Für die Etablierung einer primären Zellkultur wurden die Gewebestücke in einer Trypsin-Lösung für 10 Minuten bei 37°C , oder über Nacht bei 4°C enzymatisch zerkleinert und anschließend mit Hilfe von feuerpolierten Pasteurpipetten mechanisch dissoziiert. Die resultierende Einzelzellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert, der Überstand über dem Pellet verworfen, das Pellet aufgeschlagen, die Zellen in 37°C warmem Nährmedium mit 10 % EF aufgenommen (siehe Unterabschnitt 3.4.2 und Abschnitt 3.10) und auf Poly-L-Ornithin (L-PO)-beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Das Medium wurde anschließend jeden zweiten Tag mit EF supplementiert (5 % des Gesamtvolumens) und spätestens nach 7 Tagen vollständig ausgetauscht. Wenn die Oberfläche der Kulturschale etwa zu 60–90 % mit Zellen bewachsen war (60–90 % Zellkonfluenz), wurden diese zum ersten Mal in eine neue Passage überführt.

Expansion primärer Zellkulturen

Kontinuierlich proliferierende, adhärente Zellkulturen müssen vor dem Erreichen vollständiger Konfluenz auf neue Kulturoberflächen verteilt werden, damit den Zellen genug Platz für die weitere Expansion bereitsteht und somit eine hohe Proliferationsrate aufrechterhalten werden kann. Beim Erreichen einer Konfluenz von etwa 60–90 % wurden Zellkulturen in die nächste Passage überführt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und so lange in einer Trypsin-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig von der Kulturschale

abgelöst hatten (etwa 0,5–2 Minuten). Anschließend konnte die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 5 % FCS blockiert werden. Die Zellen wurden danach mit PBS von der Schale gewaschen, in einem Zentrifugationsgefäß gesammelt und mit einer serologischen 5-mL-Pipette durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Anzahl der lebenden Zellen in der Zellsuspension wurde nach der Trypanblau-Färbung eines 100- μ L-Alliquots und mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3 aufgeteilt (*split*) oder das Volumen mit der gewünschten Zellzahl entnommen und die Zellen wie zuvor beschrieben zentrifugiert, in Medium aufgenommen und für die weitere Expansion oder funktionelle Untersuchungen ausplattiert. Während der Expansion wurde das Medium jeden zweiten Tag mit EF supplementiert (5 % des Gesamtvolumens) und spätestens nach 6–7 Tagen vollständig ausgetauscht.

4.1.2 Bereitgestellte Zellkulturen

Die in dieser Arbeit als Referenz eingesetzten Zellkulturen von humanen Fibroblasten, die aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen (hESCdNP, *human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells*) und die konventionelle Glioblastom-Zelllinie U-87 wurden von diversen Quellen bezogen (siehe Abschnitt 3.10).

Die zur Verfügung gestellte Kultur von hESCdNP wurde in dieser Studie nicht weiter fortgeführt, sondern unmittelbar für die Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA, *ribonucleic acid*) zur Analyse der genomweiten Genexpression verwendet. Die Handhabung bei der Kultivierung von Fibroblasten und U-87 unterschied sich gegenüber der Handhabung der primären Zellen aus dem Glioblastom oder dem Hippocampus nur durch den Einsatz von unbeschichteten Zellkulturschalen und serumhaltigem Nährmedium ohne Zugabe von EF (siehe Unterabschnitt 3.4.2 und Abschnitt 3.10).

4.1.3 Kryokonservierung

Vitale Zellkulturen können für einen längeren Zeitraum kryokonserviert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Die Zugabe von Kryoprotektiva, wie z. B. DMSO, sowie ein gleichmäßiges und langsames Herunterkühlen erhöhen die

Überlebensrate der Zellen während des Einfrierprozesses.

Vereinzelte Zellen in Suspension wurden wie oben beschrieben durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand verworfen und in kaltem DF10 resuspendiert. Je 0,5 mL dieser Zellsuspension wurden mit je 0,5 mL Freeze in einem Kryoröhrchen gemischt und mit Hilfe eines Einfrierbehälters (StrataCooler Cryo Preservation Module) bei einer Kühlrate von -0,4 bis -0,6°C pro Minute bis zu einer Temperatur von -80°C eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen anschließend in einem Flüssigstickstoff-gekühlten Behälter aufbewahrt.

Präservierte Zellen konnten wieder in Zellkultur überführt werden, indem das Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt wurde, bis sich die Zellsuspension gerade vollständig verflüssigt hatte. Diese konnte dann mit 14 mL PBS gemischt und für 5 Minuten bei 400 *g* zentrifugiert werden. Die Zellen wurden anschließend wie zuvor beschrieben ausplattiert.

4.1.4 Isolation von Subklonen

Im Verlauf der Tumor-Evolution kann sich eine hohe genetische und funktionelle Diversität zwischen Tumorzellen ausprägen (siehe Unterabschnitt 1.2.2). Durch die Isolation und Expansion von Einzelzellen können Zellkulturen verschiedener Subklone etabliert, konserviert und charakterisiert werden, um experimentellen Zugriff auf die intratumorale Heterogenität zu erlangen. In dieser Arbeit wurden dazu insgesamt drei verschiedene Methoden angewendet (siehe Tabelle 5.2).

Limitierende Verdünnungskultur auf Zellkulturschalen (10 cm-LDA)

Die Isolation von GNV019-Subklonen wurde von Björn Scheffler (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt. Dazu wurden Zellen der parentalen GNV019-Kultur in Passage 5 in einer Zelldichte von 15 Zellen pro cm² auf fünf 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Einen Tag später wurden auf jeder Schale 20 zufällig ausgewählte solitäre Einzelzellen mit einem Stift auf der Unterseite der Schale umkreist und deren Wachstum über einen Zeitraum von 30–60 Kulturtagen weiterverfolgt und dokumentiert. Unter diesen Bedingungen bildeten 7 Einzelzellen klonale Kolonien, die anschließend mit Hilfe von 8 mm-Klonzylindern isoliert wurden. Dazu wurde zuerst das Nährmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für alle

angewachsenen Kolonien wurde danach jeweils ein Klonzylinder mit einer sterilierten Pinzette mit einer Seite in steriles Silikon-Hochvakuumfett getaucht, um ihn danach zentral über die Kolonie zu setzen. Anschließend wurden die umschlossenen Zellen mit Trypsin dissoziiert und wie zuvor beschrieben für die weitere Expansion in jeweils eine 6 cm-Zellkulturschale überführt. Die Subklone SK1/2/3/6/7 wurden aufgrund ihrer charakteristischen Zellmorphologien *in vitro* für die weitere Analyse ausgewählt (siehe Abbildung 5.6A).

Durchflusszytometrische Einzelzellablage (MTP-FACS)

Zufällig ausgewählte Einzelzellen der parentalen BN035-Kultur in Passage 7 wurden mit Hilfe von durchflusszytometrischer Zell-Sortierung (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) in individuelle *wells* von zwei 96-*well* Mikrotiterplatte (MTP) abgelegt. Die Zellen wurden anschließend für 18–33 Tage weiter kultiviert und ihr Wachstum dokumentiert. 11 von 39 bis dahin angewachsenen Kolonien wurden zufällig ausgewählt und für die weitere Expansion auf 6 cm-Zellkulturschalen überführt. Davon wurden 5 wiederum zufällig ausgewählte Klone in dieser Arbeit genetisch und funktionell charakterisiert.

Limitierende Verdünnungskultur auf MTP (MTP-LDA)

Zellen der parentalen Kulturen von BN046 (Passage 5), BN055 (Passagen 5 & 6) und BN118 (Passage 5) wurden in einer Zelldichte von 0,5 Zellen pro *well* in jeweils bis zu 8 verschiedene 96-*well* MTP ausgesät. Ab dem folgenden Tag wurde das Wachstum der Zellen in allen *wells* der MTP – während der ersten 4 Tage täglich und fortan wöchentlich – mit einem System für die automatisierte Fotodokumentation von Zellen in MTP (Cellavista) aufgezeichnet. Nach 13–22 Tagen wurde anhand der Bilderserie ermittelt, ob die angewachsenen Kolonien einen mono- oder einen polyzellulären Ursprung hatten (siehe Abbildung 4.1). Anschließend wurden Kolonien mit verifiziertem Einzelzell-Ursprung zufällig ausgewählt und zur weiteren Expansion auf 6 cm-Zellkulturschalen überführt. Dabei konnte ein geringer Anteil der Kulturen nur für kurze Zeit expandiert werden. 19–26 Einzelzell-abgeleitete Kulturen pro parentaler Kultur konnten über einen längeren Zeitraum stabil expandiert sowie genetisch und funktionell charakterisiert werden (siehe Tabelle 5.2).

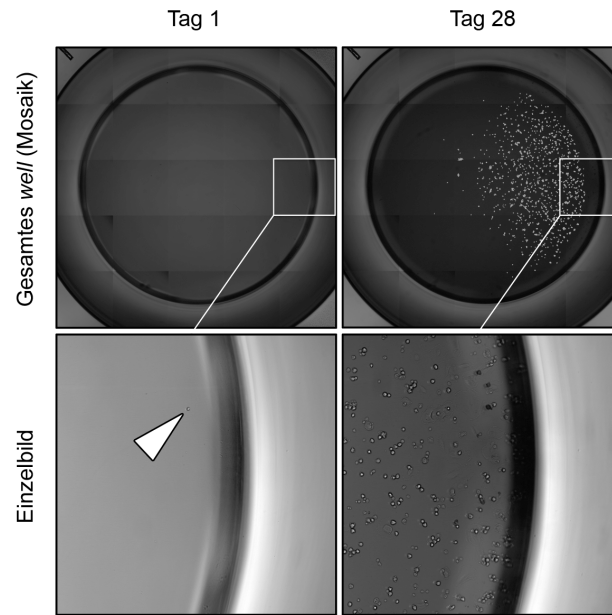


Abbildung 4.1: Verifizierung des Einzelzell-Ursprungs am Beispiel von Subklon BN118 6-D02. Dargestellt sind zusammengesetzte (oben, Falschfarben durch den Erkennungsalgorithmus für Zellen (hell) der Cellavista-Software) bzw. einzelne Bilder (unten, Hellfeld, 10 \times -Objektiv) von *well* D02 der 6. MTP an den Tagen 1 und 28 nach dem Aussäen der parentalen BN118-Kultur. Nach dem Anwachsen der Kolonie wurde nachträglich überprüft, dass diese aus einer einzelnen Zelle (Pfeil) hervorgegangen war. Kolonien, bei denen kein eindeutiger Einzelzell-Ursprung bestätigt werden konnte, wurden verworfen.

Unabhängig von der Methode der Separation wurden in dieser Arbeit mindestens 5 Subklone pro parentaler Kultur für die genetische und funktionelle Charakterisierung eingesetzt (für eine Übersicht siehe Tabelle A.2).

4.1.5 Wachstumskinetik

Durch die Aufzeichnung der Wachstumskinetik von kultivierten Zellen ist es möglich, die Höhe und Stabilität der Teilungsgeschwindigkeit innerhalb eines gewählten Zeitraums zu bestimmen. Dafür wurden in jeder neuen Passage $4,7 \times 10^4$ Zellen in einer 3,5 cm-Zellkulturschale ausplattiert, für 5–6 Tage kultiviert, gezählt und erneut passagiert. Die Anzahl der kumulativen Populationsverdoppelungen (PD, *population doublings*) wurde anschließend mit Hilfe der Formel 4.1 berechnet (Kruse & Patterson 1973).

$$n = 3,32 (\log(UCY) - \log(l)) + X \quad (4.1)$$

Dabei gibt n die Anzahl der kumulativen PD, l die Zellzahl zu Beginn (hier $4,7 \times 10^4$) und UCY die Zellzahl am Ende der Passage an. X steht für die

Anzahl der kumulativen PD der vorherigen Passage.

Anhand des Verlaufs der kumulativen PD und der korrespondierenden Kultivierungszeit ließ sich berechnen, wie viel Zeit eine Zellkultur benötigt hatte, um ihre Zellzahl zu verdoppeln. Darüber hinaus konnte anhand einer linearen Regressionsanalyse ermittelt werden, wie gleichmäßig die Wachstumsgeschwindigkeit während der gesamten Expansionszeit erhalten worden war (siehe Abbildung 5.1B).

4.1.6 Neurosphären-Ansatz

Der Neurosphären-Ansatz wird u. a. dazu eingesetzt, Aufschluss über das Selbsterneuerungspotenzial von Zellkulturen zu geben (Deleyrolle et al. 2011a). Dazu wurden 10^5 Zellen in 1 mL N5 ($2\times$) oder DF ($2\times$) aufgenommen, mit 1 mL Methylcellulose-Lösung gemischt und auf adhäsionsabweisende *6-well* MTP ausplattiert. Der Methylcellulose-Anteil im Medium erhöht die Viskosität der Zellsuspension und verringert damit die Aggregation von Einzelzellen. Nach 2–3 Wochen Inkubationszeit, unter Zugabe von EF in Zweitagesabständen (je 5% Gesamtvolumen), wurden die entstandenen Neurosphären mit Hilfe eines Lichtmikroskops gezählt, dann in PBS aufgenommen, bei 400 *g* zentrifugiert, durch einen 15–20-minütigen Verdau mit Trypsin bei 37°C und Durchmischung mit feuerpolierten Pasteurpipetten vereinzelt, durch ein Zellsieb (70 μm) gefiltert, gezählt und wie zuvor beschrieben für die zweite Generation ausgesät. Aus dem Verhältnis von ausplattierten Einzelzellen und der Anzahl von Neurosphären lässt sich der Anteil der Sphären-formierenden Zellen berechnen. Neurosphären der zweiten Generation wurden in dieser Arbeit für die Bestimmung des Differenzierungspotenzials in neuronale und gliale Zelltypen verwendet.

4.1.7 Differenzierung

Während der Expansion von Glioblastom-Zellkulturen kann deren spontane Differenzierung durch die regelmäßige Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 unterdrückt werden (Galli et al. 2004; Pollard et al. 2009). Der kontrollierte Entzug von Wachstumsfaktoren ermöglicht es, das Differenzierungspotenzial verschiedener Zellkulturen zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Um die Fähigkeit zur Differenzierung in neuronale (β III-Tubulin⁺) und gliale (GFAP⁺) Zelltypen zu untersuchen, wurden mehrere einzelne sekundäre Neurosphären isoliert und in 1,5 mL Differenzierungsmedium auf einer L-PO-beschichteten 6 cm-Zellkulturschale ausplattiert. Einen Tag später wurde das Medium auf ein Volumen von 4 mL aufgefüllt und die Zellen anschließend über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen kultiviert. Dabei wurde das Differenzierungsmedium mindestens einmal pro Woche vollständig ausgetauscht. Der Verlauf der Differenzierung wurde regelmäßig lichtmikroskopisch begutachtet und die Zellen wurden bei ausreichender Differenzierung für die immunhistochemische Analyse mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren konnte bei GNV019-Zellen eine Anhäufung von multinukleären Phänotypen beobachtet werden. Um den Anteil von multinukleären Zellen (mn-Zellen) zu quantifizieren, wurden adhärent expandierte oder behandelte Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 4 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Danach wurden die Zellen für die immunhistochemische Analyse mit 4%igem PFA fixiert.

4.1.8 Bestimmung der Viabilität

Die quantitative Erfassung der zellulären Viabilität kann wiedergeben, wie sehr ein Versuchsansatz das Wachstum oder das Überleben von kultivierten Zellen beeinflusst hat. In der vorliegenden Arbeit wurde der Viabilitäts-Indikator AlamarBlue verwendet, um die Wirksamkeit diverser Substanzen gegenüber Kontroll-Ansätzen zu bestimmen. Das Prinzip von AlamarBlue beruht auf der Reduktion des blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoffs Resazurin zum rosafarbenen, stark fluoreszierenden Resorufin in metabolisch aktiven Zellen. Dabei verhält sich die gemessene Intensität der Fluoreszenz proportional zur Anzahl lebendiger Zellen, sofern eine Sättigung durch zu hohe Zelldichten bzw. zu lange Inkubationszeiten vermieden werden (O'Brien et al. 2000).

Die Viabilitätsbestimmung von kultivierten Zellen erfolgte durch die Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen AlamarBlue zum Kulturmedium, eine anschließende Inkubation bei 37°C für 2–5 Stunden und die Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesers (Anregung bei 540 nm, Detektion bei 590 nm). In Abhängigkeit von der Metabolisierungsrate einzelner Zellkulturen und dem eingesetzten Zellkultur-Format wurden die Inkubationszeiten

bis auf 12 Stunden verlängert und regelmäßige Messungen der Fluoreszenz vorgenommen.

Bei jedem Experiment wurden unbehandelte bzw. mit Lösungsmittel behandelte Kulturen sowie Medium ohne Zellen als Kontrollansätze integriert, um den relativen Effekt von Wirkstoffen berechnen zu können. Um die Hintergrundfluoreszenz zu beseitigen, wurde zuerst die Mediumkontrolle von allen anderen Messwerten subtrahiert. Anschließend wurde mittels Division der korrigierten Fluoreszenzwerte der behandelten Zellen durch die Werte der unbehandelten Zellen die relative Viabilität bestimmt.

4.1.9 Behandlung von Zellen

In Abhängigkeit von der Zielsetzung einzelner experimenteller Ansätze wurde die Behandlung von Zellkulturen anhand verschiedener Methoden durchgeführt.

Pharmakodynamik

Die pharmakodynamische Analyse gibt Aufschluss über die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Substanzen und Zellen. So ist es u. a. möglich, die Konzentration zu ermitteln, bei der die Vitalität der behandelten Zellen um 50 % gegenüber der Kontrollbedingung reduziert wurde (IC_{50} , absolute inhibitorische Konzentration 50, *absolute inhibitory concentration 50*, Sebaugh 2011). Zwischen verschiedenen Zellkulturen kann die Wirksamkeit von Substanzen durch die IC_{50} besser verglichen werden als z. B. die Ansprechrate auf eine einzelne Konzentration, die weit über- oder unterhalb des Wirksamkeitsbereiches von einer der untersuchten Kulturen liegen kann.

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden primäre und Referenz-Zellkulturen in Zelldichten von $5\text{--}13 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in einem Volumen von $135 \mu\text{L}$ Nährmedium in Triplikaten auf 96-well MTP ausplattiert. Für jede Substanz wurden 6–8 verschiedene Konzentrationen getestet. Die Behandlung erfolgte einen Tag nach dem Aussäen der Zellen durch die Zugabe von $15 \mu\text{L}$ einer 10-fach konzentrierten Wirkstofflösung. Bei jeder Substanz richtete sich der Lösungsmittelanteil nach der höchsten getesteten Wirkstoff-Konzentration und wurde für alle niedrigeren Konzentrationen und die Lösungsmittelkontrollen entsprechend angeglichen. Die Messung der zellulären Viabilität erfolgte 4–

5 Tage nach dem Beginn der Behandlung. Die daraufhin ermittelte relative Viabilität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle wurde anschließend gegen die entsprechende Substanzkonzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Quadrate, *ordinary least squares*) zur Erstellung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung und einem auf den Wert 0 festgelegten unteren Plateau durchgeführt (siehe Formel 4.2, für exemplarische Kurven siehe z. B. Abbildungen A.2 & 5.9C).

$$Y = \frac{Top}{1 + 10^{(\log(EC50) - X) HillSlope}} \quad (4.2)$$

Top stellt das obere Plateau, *EC50* (mittlere effektive Konzentration, *half maximal effective concentration*) die Wendestelle und *HillSlope* die Steigung der sigmoidalen Kurve dar. *Y* entspricht der gemessenen Viabilität bei der Konzentration *X* der jeweiligen Substanz. Die IC_{50} -Werte wurden anhand der Formel 4.3 abgeleitet.

$$\log(IC_{50}) = \log(EC50) - \frac{\log(\frac{Top}{0,5} - 1)}{HillSlope} \quad (4.3)$$

Substanz-Screening

Das Substanz-Screening wird eingesetzt, um aus einer Zusammenstellung (Bibliothek) von Wirkstoffen diejenigen Substanzen zu identifizieren, die eine gewünschte Wirkung aufweisen. Darüber hinaus lassen sich verschiedene Zellkulturen in ihrem Ansprechverhalten gegenüber ganzen Bibliotheken miteinander vergleichen und kategorisieren.

Primäre- und Referenz-Zellkulturen wurden in einer Zelldichte von $5\text{--}13 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in einem Volumen von $135 \mu\text{L}$ Nährmedium in *96-well* MTP in dreifacher Ausführung ausplattiert. Einen Tag später wurden die Zellen durch die Zugabe von $15 \mu\text{L}$ einer 10-fach konzentrierten Wirkstofflösung behandelt.

Für die IC_{50} -Analyse von 20 Glioblastom-relevanten Substanzen (siehe Unterabschnitt 5.1.4, Abbildung 5.3 und Tabelle A.3) wurden BN- und GNV-Kulturen mit 6 unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle A.4) für eine Dauer von 4 Tagen einmalig behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,55 % DMSO für alle Substanzen, die mit $50 \mu\text{M}$ TMZ kombiniert wurden (analog zur klinischen Darreichung), 1,5 % DMSO für die TMZ-Monobehandlung,

0,5 % Ethanol (EtOH) für die Perifosine-Behandlung und 0,5 % DMSO für alle anderen Substanzen (siehe Tabelle A.4 und Abschnitt 3.7). Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung aller 20 Wirkstoffe ist in Abbildung A.2 anhand der parental Kultur von BN118 exemplarisch dargestellt.

Die Substanzen der Bibliothek „The Killer Collection“ wurden in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt (siehe Abbildung 5.9 und Tabellen A.1–A.12). Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,01 % DMSO verwendet und die zelluläre Viabilität wurde 5 Tage nach der einmaligen Behandlung gemessen.

Ko-Kultur

In Ko-Kultur-Experimenten kann untersucht werden, ob das beobachtete Verhalten einer Zellkultur durch die Interaktion mit Zellen aus anderen Zellkulturen beeinflusst wird. Durch den Einsatz von verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen konnten einzelne Zellkulturen vor deren Ko-Kultivierung individuell markiert werden, um anschließend deren Schicksal im Verlauf einer Behandlung separat verfolgen zu können.

Die eingesetzten CellTracker-Farbstoffe können frei durch die Plasmamembran lebender Zellen passieren und werden intrazellulär zu Membran-undurchlässigen Farbstoffen umgesetzt. Somit bleibt der Farbstoff über mehrere Zellteilungen erhalten und wird dabei nur an die Tochterzellen und nicht an umliegende Zellen weitergegeben. Analog zu Versuchen mit CellTracker-Farbstoffen wurden auch lipophile Vybrant-Farbstoffe eingesetzt, die erst nach ihrem Einbau in die Plasmamembran stark fluoreszierend sind und sich dort lateral, aber nicht interzellulär verbreiten können. Bei den von den Zellen aufgenommenen CellTracker- und Vybrant-Farbstoffen verteilt sich die Farbstoffmenge mit jeder Zellteilung auf die beiden Tochterzellen, wodurch die Fluoreszenzintensität proliferierender Zellen mit fortlaufender Kulturzeit abnimmt. Dies wurde bei der Wahl der Farbstoff-Konzentrationen für mehrtägige Markierungen mitberücksichtigt.

Primäre Glioblastom-Kulturen wurden dafür mit den grün (CellTracker Green, 5 μ M, bzw. Vybrant DiO, 1:200) oder rot (CellTracker Red, 25 μ M, bzw. Vybrant DiD, 1:200) fluoreszierenden Farbstoffen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, zweimal mit Nährmedium ohne Wachstumsfaktoren gewaschen, einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in 10 mL PBS aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die pelletierten Zellen in 10 mL PBS

resuspendiert und anschließend gezählt. Gleiche Mengen von grün und rot markierten Zellen wurden in einer Gesamtzahl von $9,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in 12-well MTP ausgesät. GNV019-Kulturen wurden einen Tag später mit $10 \mu\text{M}$ Thioguanine, $2 \mu\text{M}$ Oridonin, $4 \mu\text{M}$ Sorafenib, $1 \mu\text{M}$ Cantharidin oder 0,1 % DMSO für 5 Tage behandelt. BN035-Kulturen wurden mit $8 \mu\text{M}$ Lonafarnib + $50 \mu\text{M}$ TMZ, 400 pM Bortezomib oder 0,55 % DMSO und BN046-Kulturen mit $10 \mu\text{M}$ Etoposide + $50 \mu\text{M}$ TMZ, $4 \mu\text{M}$ 17-AAG oder 0,55 % DMSO für 3 Tage behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in 5 mL PBS aufgenommen, gezählt, zentrifugiert, das Pellet in 1 mL PBS resuspendiert, durch ein Zellsieb ($70 \mu\text{m}$) gefiltert und die Fluoreszenz-Signale von $10\text{--}20 \times 10^3$ Zellen per Durchflusszytometrie gemessen, um die Effekte der Behandlung auf die separat gefärbten Populationen der Ko-Kultur zu bestimmen (vergleiche Abbildung 5.11).

Selektion von Subklonen *in vitro*

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob die Analyse pharmakologischer Resistenzen an isolierten Subklonen des Glioblastoms Vorhersagen über deren Schicksal innerhalb des Tumors unter dem Einfluss von Chemotherapeutika erlaubt (siehe Unterabschnitt 5.2.4). Im Folgenden wird die Durchführung der gezielten pharmakologischen Selektion von Zellen innerhalb der parentalen Kulturen von GNV019, BN035 und BN046 beschrieben.

Bei Fall GNV019 wurde die gezielte Anreicherung von SK1/3/6- oder SK2-ähnlichen Zellen untersucht. Für die Selektion von Zellen, die ein größeres Potenzial zur spontanen Differenzierung in multinukleäre Zellen (mn-Zellen) besitzen (wie z. B. SK1/3/6), wurden $9,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 der parentalen GNV019-Kultur auf $3,5 \text{ cm}^2$ -Zellkulturschalen ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 10 nM, 100 nM, 316 nM, $1 \mu\text{M}$, $3,16 \mu\text{M}$ oder $10 \mu\text{M}$ Thioguanine bzw. 0,1 % DMSO behandelt und für die Quantifizierung von mn-Zellen anschließend für 4 Tage differenziert (siehe Abbildung 5.13A). Für die Selektion von SK2-ähnlichen Zellen wurden $9,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 der parentalen GNV019-Kultur auf 6 cm^2 -Zellkulturschalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Sorafenib oder 0,02 % DMSO für 5 Tage behandelt. Im Anschluss wurden sie direkt für die Analyse mittels RTQ-PCR

verwendet oder zuvor noch ein zweiter Behandlungszyklus durchgeführt (siehe Abbildung 5.16A).

Für die gezielte Selektion von Subklonen bei den Fällen BN035 und BN046 wurden die parentalen Kulturen für je 3 Tage in 2 aufeinanderfolgenden Zyklen behandelt. Jeweils $3,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 der parentalen BN035-Kultur wurden auf 6 cm-Zellkulturschalen ausplattiert und am folgenden Tag mit $8 \mu\text{M}$ Lonafarnib + $50 \mu\text{M}$ TMZ, 400 pM Bortezomib oder $0,55 \%$ DMSO behandelt (siehe Abbildung A.3F). Bei der parentalen BN046-Kultur wurden je $2,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 auf 6 cm-Zellkulturschalen ausplattiert und am nächsten Tag mit $10 \mu\text{M}$ Etoposide + $50 \mu\text{M}$ TMZ, $4 \mu\text{M}$ 17-AAG oder $0,55 \%$ DMSO behandelt (siehe Abbildung A.4F).

4.2 Histologie

In histologischen Untersuchungen wird die mikroskopische Anatomie von Geweben und Zellen begutachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu verschiedene histologische Färbemethoden an fixierten Glioblastom-Biopsien, Xenotransplantaten und Zellkulturen durchgeführt.

4.2.1 Histochemische Färbung

Zur histopathologischen Bewertung von Tumorbiopsien und Xenotransplantaten (siehe Unterabschnitt 1.1.4) wurden $4 \mu\text{m}$ dicke Schnitte von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben angefertigt und mit Hämatoxylin & Eosin gefärbt (H&E-Färbung). Der Farbstoff Hämalan, ein Oxidationsprodukt von Hämatoxylin, bindet an basophile Strukturen (u. a. Zellkerne) und nimmt nach dem Waschen mit Leitungswasser eine bläuliche Farbe an (Bläuen). Eosin färbt im Gegensatz dazu eosinophile Strukturen (u. a. Zellplasmaproteine) rötlich an (siehe Abbildungen 5.4 & 5.5B).

Alle H&E-Färbungen, die in dieser Arbeit gezeigt werden, und die dafür hergestellten Gewebeschnitte wurden von Sabine Normann (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) angefertigt. Für die H&E-Färbung wurden Proben zuerst zweimal für 5 Minuten mit Xylol entparaffiniert und anschließend über eine absteigende EtOH-Reihe (100% , 90% , 70% , 50% , je 2 Minuten) rehydriert. Nach einer mindestens 2-minütigen Inkubation in Wasser

wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Hämalaunlösung gefärbt, einmal mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen, für 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut, für 1 Minute mit Eosin gegengefärbt, zum Entwässern zweimal in 100 % EtOH geschwenkt, für 1 Minute in Isopropanol inkubiert, in Xylol überführt und anschließend mit Eukitt unter einem Deckglas eingedeckt.

4.2.2 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen lassen sich Strukturen in Zellen und Geweben spezifisch anfärben. Das Prinzip der Färbung basiert auf der Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop, das somit spezifisch markiert werden kann.

In dieser Arbeit wurden Antikörper aus Mäusen und Kaninchen eingesetzt, um ausgewählte humane Proteine in Gewebeschnitten und fixierten Zellkulturen spezifisch zu binden. Durch den Einsatz von sekundären Antikörpern aus der Ziege, die mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt wurden und eine hohe Affinität für Gammaglobuline der Maus oder des Kaninchens besitzen, konnten die Zielproteine für die Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abschnitt 3.9).

Zellkulturen wurden nach ihrer Fixierung in einer 0,1%igen PBS-Natriumazid-Lösung gelagert. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Zellen einmal mit PBST gewaschen und 20 Minuten in einer Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu besetzen. Anschließend wurde der primäre Antikörper in Blocklösung verdünnt und zu den Zellen gegeben (siehe Abschnitt 3.9). Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Zellen viermal für 5 Minuten mit PBST gewaschen und der Fluorophor-konjugierte sekundäre Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls in Blocklösung verdünnt war. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Anschließend wurden die Zellen erneut viermal für 5 Minuten mit PBST gewaschen, mit DAPI (2 µg/mL in PBS) für 10 Minuten gefärbt, mit Aqua-Poly/Mount unter einem Deckglas eingedeckt und bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Vor der immunhistochemischen Färbung von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben wurden die Schnittpräparate wie zuvor beschrieben entparaffiniert, rehydriert und in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden

durch die Formalinfixierung quervernetzte Antigene demaskiert, indem die Proben in Citratpuffer mit einer Mikrowelle für 2 Minuten bei 450 W zum Kochen gebracht und für 10 Minuten bei 90 W inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, für 5 Minuten in PBS gewaschen und wie zuvor beschrieben immunhistochemisch gefärbt.

4.2.3 Quantifizierung multinukleärer Zellen

Die Präsenz multinukleärer Zellen ist ein wesentliches Merkmal der GNV019-Kultur (siehe Abschnitt 5.2). Auf der Basis von immunhistochemischen Färbungen konnte die Frequenz vielkerniger Zellen in Xenotransplantaten (% vRZ) oder Zellkulturen (% mn-Zellen) bestimmt werden.

Aus verschiedenen experimentellen Ansätzen, die in mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt worden waren, wurden Fotos von mehreren zufällig gewählten Gesichtsfeldern aufgenommen und die Anzahl der einkernigen und mehrkernigen Zellen mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Fiji (Schindelin et al. 2012) manuell gezählt. Um die Abgrenzungen einzelner Zellen hervorzuheben, wurde das Zytosol von Zellkulturen mit einem Antikörper gegen das Zytoskelettprotein α -Tubulin und die äußere Umgrenzung von Zellen in Xenotransplantaten mit Antikörpern gegen Adhäsionsproteine aus der Superfamilie der Cadherine gefärbt. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI markiert (siehe Abbildung A.5). Alle Zellen, denen mehr als ein Nukleus zugeordnet werden konnte, wurden als mehrkernig gewertet.

Alle immunhistochemisch gefärbten Tumor-Präparate aus Tierversuchen wurden von mindestens zwei Personen begutachtet (Roman Reinartz, Laurèl Rauschenbach und Björn Scheffler, alle Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn), denen die Behandlungsbedingungen der vorliegenden Proben unbekannt waren. Die Ergebnisse der Quantifizierungen wurden für die nachfolgende Auswertung gemittelt (siehe Abbildung 5.17B).

4.3 Molekularbiologie

In dieser Arbeit wurden molekularbiologische Untersuchungen an extrahierten Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren mit Hilfe verschiedener

Methoden durchgeführt.

4.3.1 Nukleinsäure-Extraktion

Genomische DNA aus kultivierten Zellen und Xenotransplantaten wurde anhand des AllPrep DNA/RNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. Mikrodissezierten Xenotransplantaten wurde Lysispuffer mit 0,5 % Reagent DX zugegeben, um die Schaumbildung bei der Homogenisierung des Gewebes zu unterdrücken. Isolierte Proben-DNA wurde in der vorliegenden Studie für die Analyse von Kopienzahl-Veränderungen mittels MLPA, RTQ-PCR oder *microarrays* eingesetzt.

Gesamt-RNA für die Analyse der genomweiten Genexpression wurde in der Abteilung Genomik & Immunoregulation des Life & Medical Sciences Institute (LIMES) der Universität Bonn mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Dafür wurden expandierte Zellkulturen (siehe Abbildung 5.8 links) zuvor in einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (QIAzol) nach Angaben des Herstellers lysiert.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden mittels Spektrophotometer gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration der Proben wurde durch Multiplikation der gemessenen optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Faktor 40 bei RNA-Proben bzw. dem Faktor 50 bei Proben mit doppelsträngiger DNA errechnet.

Das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm wurde dazu verwendet, die Reinheit der Proben einzuschätzen. Ein Verhältnis von ca. 1,8 weist auf eine reine DNA-Lösung und ein Verhältnis von ca. 2,0 auf eine reine RNA-Lösung hin. Ein geringeres Verhältnis deutet auf eine Verunreinigung mit Protein, Phenol oder anderen Kontaminanten hin.

Konzentrierung und Aufreinigung

Zur Aufkonzentrierung von DNA-Proben wurden Nukleinsäurelösungen mittels Zentrifugation durch eine Cellulose-Filtereinheit (Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheit) gepresst, wobei relevante DNA-Moleküle wegen ihrer Größe vom

Filter zurückgehalten wurden. Somit ließ sich das Volumen der Lösung reduzieren, ohne die darin enthaltene Menge an DNA deutlich zu verringern.

Mit dieser Technik konnte zudem der Anteil von Kontaminanten, deren Größe unter der Ausschlussgröße des Filters lag, in der Lösung reduziert werden. Dazu wurden verunreinigte DNA-Proben in einem Gesamtvolumen von bis zu 500 μL mit ddH₂O verdünnt, zentrifugiert und anschließend zurückgewonnen.

4.3.2 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine Methode, mit der ausgewählte Abschnitte der DNA anhand von zwei flankierenden Primern, die jeweils komplementär an den beiden Einzelsträngen binden, gezielt vervielfältigt werden können (Saiki et al. 1988). Das Prinzip beruht auf einer zyklischen Abfolge von Denaturierung der vorgelegten DNA (94–98°C), Hybridisierung der Primer an den DNA-Einzelsträngen (52–62°C, Anlagerung) und der Primer-Verlängerung an deren 3'OH-Enden durch das Enzym Taq DNA Polymerase (72°C, Elongation). Da die Komplementierung an beiden Einzelsträngen der vorgelegten DNA vonstattengeht, verdoppelt sich die Menge des ausgewählten DNA-Abschnitts theoretisch mit jedem durchlaufenen Zyklus.

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (RTQ-PCR, *real time quantitative PCR*) kann der Verlauf der Amplifikation über den gesamten Zeitraum der Reaktion verfolgt werden. In dieser Arbeit wurde dazu der Farbstoff SYBR Green I verwendet, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Dabei verhält sich die Menge des eingelagerten Farbstoffs proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA. Die Fluoreszenzintensität des DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes wurde am Ende eines jeden Zyklus gemessen (Anregung bei 497 nm, Emission bei 520 nm). Anhand des auf diese Weise nachvollziehbaren Verlaufs der Reaktion wurde für jede Probe ein C_T-Wert (*cycle threshold*) bestimmt. Dieser Wert entspricht dem Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Mit der ViiA 7-Software wurden die C_T-Werte anhand eines für alle Proben des Experiments einheitlichen Schwellenwerts automatisch ermittelt.

Komponente	Volumen
Genomische DNA (10 ng/ μ L)	1 μ L
Taq DNA Polymerase	0,05 μ L
RTQ-PCR Supermix	5 μ L
Primer (Vorwärts und Rückwärts je 10 μ M)	0,5 μ L
ddH ₂ O	3,45 μ L
Gesamtvolumen	10 μ L

Tabelle 4.1: RTQ-PCR-Reaktionsansatz

Untersuchung von Kopienzahl-Veränderungen

In dieser Arbeit wurde die RTQ-PCR für die Bestimmung von Kopienzahl-Veränderungen von Chr. 5q14.1–q22.1 an DNA-Proben des Falls GNV019, der Chr. 22-Gene *BID* & *NF2* an BN035-Kulturen und von *CDKN2C* an BN046-Kulturen verwendet (siehe Unterabschnitt 5.2.4). Dazu wurden Primerpaare für die entsprechenden Zielregionen (*CHD1* & *SCAMP1* / *BID* & *NF2* / *CDKN2C*, siehe Abschnitt 3.8) und zwei Primerpaare für eine Kontrollregion auf Chr. 2p23.2–16.1 (*ASB3* & *MEMO1*) mit Hilfe des „Ensemble Genome Browser“ und des „Primer Designing Tool“ (siehe Abschnitt 3.12) entworfen und ihre Spezifität an Kontrollproben mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die RTQ-PCR-Reaktionen wurden in 96-*well* MTP jeweils in Triplikaten angesetzt (siehe Tabelle 4.1). Neben den DNA-Proben aus kultivierten Zellen (siehe Abbildungen 5.16A, A.3F & A.4F) oder mikrodissezierten Xenotransplantaten (siehe Abbildung 5.17C) wurden in jedem Ansatz zudem DNA-freie Ansätze zur technischen Kontrolle und Referenz-DNA aus Leukozyten von gesunden humanen Spendern zur Normalisierung der Kopienzahl integriert. Nach der Amplifikation wurden zudem Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgezeichnet, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Der Verlauf des PCR-Programms ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Mit diesem Verfahren lassen sich u. a. relative Unterschiede der Kopienzahl zwischen Tumor- und Kontrollproben ermitteln. Zu Anfang wurden die ΔC_T -Werte berechnet, indem die gemittelten C_T -Werte der untersuchten Abschnitte der Kontrollregion (*ASB3* & *MEMO1*) jeweils von den C_T -Werten der untersuchten Abschnitte der Zielregion subtrahiert wurden. Anschließend wurden die Tumorproben gegen die Kontrollproben, bei denen eine Kopienanzahl von 2 angenommen wird, normalisiert. Dazu wurde der

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten
2. Denaturierung	95°C	20 Sekunden
3. Primer-Anlagerung	60°C	20 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
6. Abkühlung	60°C	1 Minute
7. Schmelzkurve [†]	60-95°C	12 Minuten

Tabelle 4.2: RTQ-PCR-Programm. Die Schritte 2–4 wurden in insgesamt 40 Zyklen durchgeführt. [†]Für die Aufnahme der Schmelzkurve wurde die Temperatur in Schritten von 0,05°C/Sekunde erhöht.

$\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet, indem die ΔC_T -Werte der Kontrollproben von denen der Tumorproben subtrahiert wurden. Die relative Kopienzahl ergab sich aus der Rechnung $2 \times 2^{-\Delta\Delta C_T}$ und wurde anschließend für die Abschnitte der Zielregion gemittelt. Aus technischen Gründen wurde auf *WNT7B* bei der Untersuchung von Veränderungen der Kopienzahl auf Chr. 22 bei BN035 verzichtet.

4.3.3 Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation

Die multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) ist eine Multiplex-PCR-Methode, mit der u. a. Kopienzahl-Veränderungen nachgewiesen werden können. Dazu werden mehrere verschieden lange Sondenpaare gleichzeitig mit einer Proben-DNA hybridisiert (multiplex), bei spezifischer Bindung legiert, mittels PCR amplifiziert, mit einem automatischen Sequenzierer quantifiziert und gegen Referenzproben verglichen (Schouten et al. 2002). Da die Anzahl der Sonden gegenüber *microarrays* vergleichsweise gering ist, werden mit dieser Methode vorwiegend ausgewählte Bereiche gezielt auf genetische Aberrationen hin untersucht. In Zusammenarbeit mit Robert Schuit und Suvi Savola (MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande) wurde in dieser Arbeit eine Kollektion von Sonden zusammengestellt, die Regionen mit häufig auftretenden Kopienzahl-Veränderungen beim Glioblastom abdecken (siehe Unterabschnitt 1.1.5, Abbildung 5.2 und Tabellen A.5–A.9).

Neben den Tumorproben müssen bei jedem MLPA-Ansatz auch Kontrollproben mitprozessiert werden, die keine Kopienzahl-Veränderungen aufweisen. Diese dienen bei der Auswertung als Referenz, damit genetische Aberrationen in den Tumorproben bestimmt werden können. Kontrollproben wurden aus

Leukozyten von drei gesunden humanen Spendern gewonnen. Die Prozessierung der MLPA-Reaktionen wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Für jede MLPA-Reaktion wurden 90 ng Referenz- oder Proben-DNA eingesetzt, die Hybridisierung für 16–20 Stunden durchgeführt und die verschiedenen langen Amplifikationsprodukte der Sonden durch Kapillarelektrophorese auf einem 3130xl Genetic Analyzer separiert und quantifiziert. Die Analyse der Daten wurde mit der Software Coffalyser durchgeführt.

4.3.4 *Microarrays*

Für die Genotypisierung von GNV019-Zellkulturen wurden die BeadChips HumanHap550-2 v3 (PA + 3, PA + 10, SK6, SK7) und Human610-Quad v1_B (SK1, SK2, SK3) verwendet. Die Prozessierung der DNA-Proben wurde nach dem Protokoll des Herstellers (*Infinium HD Super Assay Protocol*) in der Abteilung Genomics des Forschungszentrums Life & Brain in Bonn durchgeführt. Die rohen Signaldaten der beiden BeadChips wurden entlang der Angaben des Herstellers (*Technical Note: „Combining and Analyzing Data from Different BeadChips“*) über die Software GenomeStudio gemeinsam eingelesen und normalisiert (Peiffer et al. 2006). Für die Auswertung und Visualisierung der genetischen Aberrationen, wurden die Daten der LogR-Ratio und B-Allel-Frequenz von GenomeStudio auf die Software R übertragen.

Die genomweite Genexpression wurde mit Hilfe des HumanHT-12 v3 Bead-Chip bestimmt. Die Proben- und Datenprozessierung wurde in der Abteilung Genomik & Immunoregulation des Life & Medical Sciences Institute (LIMES) der Universität Bonn entlang der Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe der Software R (Paket IlluminaGUI) wurden die Rohdaten anschließend einer Quantil-Normalisierung unterzogen und unter Verwendung von Excel, Prism und R weiter ausgewertet und dargestellt.

4.4 **Tierversuche**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Biologie des Glioblastoms u. a. anhand von Tierversuchen untersucht. Im Xenotransplantations-Modell wurden GNV019-Kulturen hinsichtlich ihrer Tumorigenität, Histopathologie und ihrem Ansprechverhalten auf Therapeutika untersucht. Zu diesem Zweck wurden

die immunsupprimierten Mausstämme Fox Chase SCID Beige und NMRI-nu eingesetzt (siehe Abschnitt 3.11).

Alle Tierversuche an der Universität Bonn wurden im Haus für Experimentelle Therapie durchgeführt und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen in Recklinghausen zugelassen (Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.136 & 84-02.04.2014.A316). Tierversuche an der Universität von Florida, USA, wurden vom örtlichen Institutional Animal Care and Use Committee zugelassen (IACUC #B046).

4.4.1 Xenotransplantation & Gewebeprozessierung

Orthotope Xenotransplantationen wurden von Anke Leinhaas und Sied Kebir (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt. Für die Dauer der Transplantation wurden alle Versuchstiere über eine vollständig antagonisierbare Anästhesie mit Fentanyl, Midazolam und Medetomidin narkotisiert. Nach dem Einsetzen der Narkose wurden die Mäuse auf ein Wärmekissen gelegt und in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt, ihre Kopfhaare entfernt und die Augen mit Vaseline bedeckt. Anschließend wurde durch einen Schnitt durch die Kopfhaut die Schädeldecke freigelegt und das Bregma als Ausgangspunkt für die Transplantationskoordinaten identifiziert. Die Koordinaten für 9–13 Wochen alte, weibliche Fox Chase SCID Beige Mäuse waren vom Bregma ausgehend 1,6 mm anterior, 1,9 mm lateral und von der Dura ausgehend 1,4 mm tief. Die Schädeldecke wurde an der beschriebenen Position aufgebohrt, eine vorbereitete Zellsuspension mit einer Zelldichte von 5×10^4 vitalen Zellen pro μL in einer feuerpolierten Glas-Injektionsnadel aufgezogen und ein Volumen von $2 \mu\text{L}$ über einen Zeitraum von mehreren Minuten an den Zielkoordinaten injiziert. Anschließend verblieb die Injektionsnadel für weitere 5 Minuten an dieser Position, um einen Rückfluss der injizierten Zellen zu vermeiden. Danach wurde die Nadel langsam entfernt, das Bohrloch mit Knochenwachs versiegelt und die Kopfhaut mit einer Wundklammer geschlossen. Abschließend wurden die Versuchstiere mit dem Schmerzmittel Carprofen versorgt und durch die Gabe von Naloxon, Flumazenil sowie Atipamezol aufgeweckt.

Für die Vorbereitung der Zellsuspension wurden kultivierte GNV019-Zellen dissoziiert, gezählt und in einer Dichte von 5×10^4 vitalen Zellen pro μL in PBS mit 0,1 % DNase resuspendiert. Die Zellen wurden bis zu ihrer Aufnahme in

die Injektionsnadel auf Eis gehalten.

Nach der Transplantation wurden die Mäuse täglich überwacht und beim Auftreten von neurologischen Einschränkungen oder eines Gewichtsverlusts von $\geq 20\%$ des präoperativen Gewichts eingeschläfert und die Gehirne je nach experimentellen Gegebenheiten weiterverarbeitet. Für molekularbiologische Analysen wurde das Maushirn nach dem Einschlafen entnommen und der Tumor mikrodisseziert. Für histologische Untersuchungen wurde eine vaskuläre Perfusion mit PBS und 4%igem Formalin durchgeführt. Anschließend wurde das Gehirn entnommen, mindestens einen Tag mit 4%igem Formalin fixiert, in koronarer oder horizontaler Ebene zugeschnitten und in Paraffin eingebettet. Magnetresonanztomographische Untersuchungen an Formalin-fixierten Gehirnen wurden von Timothy M. Shepherd (Department of Neuroscience, Evelyn F. & William McKnight Brain Institute, Universität von Florida, USA) durchgeführt.

Um das tumorigene Potenzial aller GNV019-Zellkulturen in einem zweiten Mausstamm zu verifizieren, wurden Xenotransplantationen an jeweils zwei 6–10 Wochen alten, weiblichen NMRI-nu Mäusen unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Koordinaten: von der Dura ausgehend 1,7 mm tief, vom Bregma ausgehend 2,2 mm anterior und 1,3 mm lateral).

4.4.2 Behandlung

Die Behandlung von Mäusen mit GNV019-Xenotransplantaten wurden von Sied Kebir (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt. 42 Tage nach der Transplantation von 10^5 parentalen GNV019-Zellen wurden die Versuchstiere mit Thioguanine, Sorafenib oder den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt, um die Auswirkung der Therapie auf die klonale Komposition der Tumoren zu untersuchen (siehe Abbildung 5.17).

Für die Behandlung mit Thioguanine wurde eine Stocklösung von 2,5 mg/mL vorbereitet (50 mg Thioguanine in 20 mL einer 0,02 M NaOH-Lösung), die bis kurz vor der Injektion bei -20°C gelagert wurde. Den Versuchstieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Thioguanine (10 mg/kg) oder entsprechende Mengen Lösungsmittel intraperitoneal injiziert (Adams & Bowman 1963).

Für die Behandlung mit Sorafenib wurden 100 mg Sorafenib in 2,5 mL Kolliphor / EtOH (1 : 1) gelöst, um eine 4-fache Stocklösung (40 mg/mL) zu

erhalten, die anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert wurde. Unmittelbar vor der Injektion wurde die Stocklösung auf eine Konzentration von 10 mg/mL mit ddH₂O verdünnt. Die Versuchstiere wurden mit einer Sorafenib-Dosis von 100 mg/kg oder entsprechenden Mengen Lösungsmittel an bis zu 17 aufeinanderfolgenden Werktagen behandelt (Siegelin et al. 2010).

Die Auswertung der Kopienzahl-Veränderungen bei GNV019-Zellen durch die Behandlung mit Sorafenib konnte nur an 5 von 8 behandelten Tieren (2 mal Lösungsmittel-, 3 mal Sorafenib-Gabe) durchgeführt werden (siehe Abbildung 5.17C). Bei 3 von 8 Tieren konnte nicht genügend DNA in ausreichender Qualität für die Folgeanalyse gewonnen werden. 2 der 3 Tiere verstarben über Nacht und das extrahierte Gewebe befand sich in einem pränekrotischen Stadium. Von einem weiteren mikrodisezierten Tumor konnte die DNA nicht in ausreichender Menge isoliert werden.

4.5 Statistische Auswertung und Bioinformatik

Die Untersuchung der statistischen Signifikanz von gemessenen Unterschieden zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen wurde anhand eines ungepaarten t-Tests unter Annahme gleicher Varianzen durchgeführt. Bei Vergleichen zwischen mehr als zwei Versuchsgruppen wurde eine *one-way* oder eine *two-way* ANOVA (Varianzanalyse, *analysis of variance*) mit Tukeys Post-hoc-Test für multiples Testen angewendet. Die Signifikanz zwischen unterschiedlichen Überlebenszeiten von Versuchstieren wurde mit Hilfe des Mantel-Cox-Tests überprüft. Die Rangfolge der Sensitivität von Subklonen wurde mittels Friedman-Test mit Dunns Korrektur für multiples Testen ermittelt. Alle präsentierten statistischen Auswertungen wurden mit der Software Prism vorgenommen. In Balkendiagrammen wird der Durchschnitt aller Messwerte einer Gruppe samt Standardabweichung dargestellt. Wenn nicht anders vermerkt, basierte die statistische Analyse auf biologischen Triplikaten. Unterschiedliche Signifikanzniveaus werden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

Heatmaps wurden mit Hilfe der Software R erzeugt (Paket *gplots*). Für die hierarchische Clusteranalyse wurde das *average-linkage*-Verfahren mit dem euklidischen Abstand als Distanzmaß angewendet.

5. Ergebnisse

Der Einfluss von Chemotherapie auf die zelluläre Komposition von Tumoren ist bislang wenig erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Vorgehensweise beschrieben, mit der anhand von funktionellen Analysen an isolierten Subklonen eines Tumors Vorhersagen zur Veränderung der zellulären Komposition im Glioblastom durch Anwendung gewählter Chemotherapeutika getroffen werden können.

5.1 Analyse von inter- und intratumoraler Heterogenität

Das Glioblastom weist eine ausgeprägte Heterogenität zwischen Tumoren einzelner Individuen sowie innerhalb einzelner Tumoren auf (siehe Abschnitt 1.2). In dieser Arbeit wurden aus Glioblastom-Biopsien von 5 Patienten primäre Zellkulturen abgeleitet, aus denen insgesamt 81 Subklone isoliert, expandiert und kryokonserviert werden konnten. Das Profil von Glioblastom-typischen genetischen Veränderungen wurde bei 53 Subklonen untersucht und bei 33 davon wurde zusätzlich das pharmakologische Ansprechen auf Chemotherapeutika charakterisiert (Übersicht in Tabelle A.2).

5.1.1 Validierung des Zellkulturmodells

Zur Abdeckung interindividueller Tumorheterogenität wurden primäre Zellkulturen von 5 Glioblastom-Patienten mit unterschiedlich ausgeprägten klinischen Parametern wie dem Alter bei Diagnose, dem Geschlecht und dem weiteren Krankheitsverlauf eingeschlossen (siehe Tabelle 5.1). Damit an Tumorzellen außerhalb des Patienten (*ex vivo*) aussagekräftige funktionelle Analysen durch-

Fall	Geschlecht	Alter	Primärtherapie	PFS	OS	MGMT-Status
BN035	w	73	R	k. A.	1 [†]	um
BN046	m	76	R, TMZ	k. A.	1 [†]	um
BN055	m	62	R, RT/TMZ, 6×TMZ (5/28)	14	16	k. A.
BN118	m	61	R, RT/TMZ, 3×TMZ (5/28)	7	9	um
GNV019	m	9	R, RT/TMZ	k. A.	12	um

Tabelle 5.1: Klinische Daten zu Glioblastom-Patienten. w = weiblich, m = männlich, R = Tumorresektion, TMZ = Temozolomide, RT = Radiotherapie, RT/TMZ = Strahlentherapie mit konkomitanter Gabe von Temozolomide, $n \times \text{TMZ}$ (x/y) = n Zyklen adjuvanter Temozolomide-Therapie (Gabe an den ersten x Tagen eines y Tage dauernden Zyklus), k. A. = keine Angabe, PFS = progressionsfreies Überleben (*progression free survival*), OS = Gesamtüberleben (*overall survival*), um = unmethylierter *MGMT*-Promoter, [†] postoperative Komplikationen.

geführt werden können, ist es notwendig, dass Glioblastom- und Patientenspezifische Merkmale für einen längeren Untersuchungszeitraum aufrechterhalten werden können (siehe Unterabschnitt 1.1.7). Für die Fälle BN035, BN046, BN055 und BN118 wurden bereits etablierte Methoden angewendet, für die der Erhalt von Glioblastom- und Patienten-spezifischen Merkmalen gezeigt werden konnte (Lee et al. 2006; Pollard et al. 2009). Für den Fall GNV019 wurden für die Expansion von Glioblastomzellen bisher unveröffentlichte Bedingungen verwendet (siehe Abschnitt 3.10, Scheffler et al. 2005) und daher eigens Untersuchungen zur Stabilität dieser Merkmale in Zellkultur durchgeführt (analog zu Lee et al. 2006). Bei allen primären Glioblastom-Kulturen wurden Bedingungen gewählt, die für die Erhaltung unreifer Zelltypen wie z. B. neuralen Stamm- und Vorläuferzellen geeignet sind.

Die aus der GNV019-Tumorbiopsie abgeleitete primäre Zellkultur wies eine ausgeprägte morphologische Heterogenität (siehe Abbildung 5.1A) während des gesamten Versuchszeitraums auf, was auf eine Erfassung und Erhaltung von unterschiedlichen koexistierenden Zelltypen unter den gewählten Kulturbedingungen hinweist. Die heterogene Kultur ließ sich mit einer stabilen Rate von 0,194 Populationsverdoppelungen pro Tag über einen Beobachtungszeitraum von 186 Tagen expandieren (siehe Abbildung 5.1B, 95 %-Konfidenzintervall: 0,188–0,199, $R^2 = 0,9933$). Dabei kam es nicht zum Auftreten von Plateau-Phasen, die auf starke Veränderungsprozesse innerhalb der Kultur hinweisen können (Lee et al. 2006). Ferner zeigte die Korrelation der genomweiten Genexpressionsprofile von Zellen aus Passage 5 und Passage 10 einen hohen Grad an Konservierung auf (siehe Abbildung 5.1C, $R^2 = 0,9246$). 96,8 % aller ex-

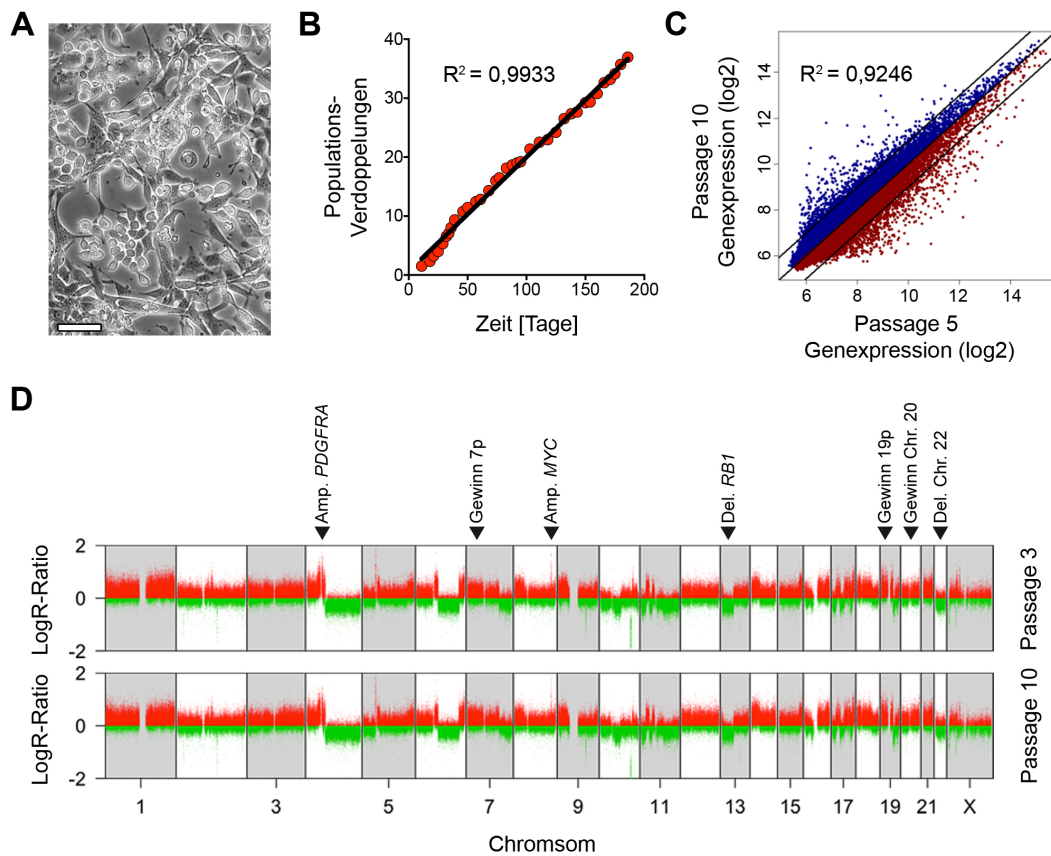


Abbildung 5.1: Stabilität der parentalen GNV019-Zellen während der Kultivierung. (A) Phasenkontrastaufnahme von GNV019-Zellen in Passage 4. (B) Korrelation der Populationsverdoppelungen und der Kultivierungszeit von GNV019 *in vitro* (Wachstumskinetik). (C) Korrelation genomweiter Genexpressionsdaten (\log_2 -transformiert) von GNV019-Zellen aus den Passagen 5 und 10. (D) Darstellung genetischer Aberrationen von GNV019-Zellen aus den Passagen 3 und 10. Glioblastom-typische Veränderungen (Beroukhim et al. 2007; Cancer Genome Atlas Research Network 2008) wurden hervorgehoben. Amp. = fokale Amplifikation, Del. = Deletion. Maßstabsbalken = 50 μm .

primierten Gene zeigten weniger als einen 2-fachen Expressionsunterschied zwischen früher und später Passage. Der Vergleich genetischer Aberrationen von Zellen aus Passage 3 und Passage 10 offenbarte zudem ein hohes Ausmaß an genetischer Stabilität während der Expansion ($R^2 = 0,996$, siehe Abbildung 5.8). Bei der Analyse der chromosomalen Aberrationen wurden charakteristische Veränderungen des Glioblastoms (Beroukhim et al. 2007; Cancer Genome Atlas Research Network 2008) identifiziert und in Abbildung 5.1D hervorgehoben.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung von funktionellen Studien zur inter- und intratumoralen Heterogenität ist es, dass die Glioblastom- und Patientenspezifischen Merkmale in Modellsystemen *ex vivo* erhalten werden können. Dass die hier verwendeten Methoden diesen Anforderungen entsprechen

können, wurde in dieser Arbeit (siehe Abbildung 5.1) und von anderen gezeigt (Lee et al. 2006; Pollard et al. 2009).

5.1.2 Isolation von Subklonen

Von den 5 ausgewählten parentalen Zellkulturen, die von Patienten mit verschiedenen klinischen Parametern erzeugt wurden (siehe Tabelle 5.1), konnten Einzelzell-abgeleitete Kulturen erzeugt werden (Subklone, SK, siehe Unterabschnitt 4.1.4). Die Bilanz der Subklon-Isolation ist in Tabelle 5.2 dargestellt. Pro parentaler Kultur wurden 5–26 Subklone isoliert, expandiert und kryokonserviert. Für die Vereinzelung der Zellen wurden verschiedene Methoden verwendet (siehe Unterabschnitt 4.1.4). Zellen von GNV019, BN046, BN055 und BN118 wurden auf eine rechnerisch klonale Zelldichte verdünnt und auf 10 cm-Zellkulturschalen oder 96-*well* MTP ausgesät und kultiviert (limitierende Verdünnungskultur). Einzelne Zellen von BN035 wurden mittels durchflusszytometrischer Zell-Sortierung in separate *wells* einer Mikrotiterplatte abgelegt. Zwischen 110 und 380 Zellen pro parentaler Kultur wurden für die Isolation von Subklonen ausgesät. Nicht alle ausplattierten Zellen besaßen nach der Vereinzelung die Fähigkeit zu überleben und zu expandieren, die Frequenz der angewachsenen Zellen lag bei 6,4–28 % pro Kultur. Ausgewählte Zellen wurden nicht weiter expandiert, wenn ein polyklonaler Ursprung der Subkultur festgestellt wurde oder schon ausreichend viele Subklone eines Falls für Folgeanalysen isoliert worden waren. Wenige Kulturen monoklonalen Ursprungs (0,6–3,2 %) konnten nur kurzzeitig (weniger als 4 Wochen) expandiert werden, bevor sich ein Wachstumsarrest einstellte. Die Frequenz der stabil expandierbaren Subklone lag zwischen 4,5 und 15,9 %. Insgesamt wurden 81 Subklone monoklonalen Ursprungs aus 5 parentalen Kulturen isoliert. Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen parentaler Kulturen und ausgewählter Subklone sind in Abbildung A.6 dargestellt.

5.1.3 Charakterisierung genetischer Aberrationen

Das Glioblastom besitzt eine ausgeprägte interindividuelle Vielfalt somatischer genetischer Veränderungen (Brennan et al. 2013). Die Charakterisierung struktureller genetischer Aberrationen einzelner Tumoren, z. B. der Kopien-

	GNV019	BN035	BN046	BN055	BN118
Verwendete Methode	10 cm-LDA	MTP-FACS	MTP-LDA	MTP-LDA	MTP-LDA
Ausgesäte Zellen [†]	110 (100 %)	192 (100 %)	164 (100 %)	285 (100 %)	380 (100 %)
Angewachsene Zellen	7 (6,4 %)	39 (20,3 %)	46 (28 %)	65 (22,8 %)	38 (10 %)
Nicht weiter kultiviert	2 (1,8 %)	28 (14,6 %)	19 (11,6 %)	40 (14 %)	6 (1,6 %)
Nur kurzzeitig expandierbar	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (0,6 %)	6 (2,1 %)	12 (3,2 %)
Stabil expandierbare Subklone	5 (4,5 %)	11 (5,7 %)	26 (15,9 %)	19 (6,7 %)	20 (5,3 %)

Tabelle 5.2: Bilanz der Subklon-Isolation sowie Übersicht über die Isolations-Methoden und die Isolations-Effizienz pro Fall. LDA = limitierende Verdünnungskultur (*limiting dilution assay*), MTP = Mikrotiterplatte, FACS = durchflusszytometrische Zell-Sortierung (*fluorescence-activated cell sorting*), [†] berechneter Wert.

zahl bestimmter chromosomaler Bereiche, trägt zum verbesserten Verständnis der Pathobiologie dieser Erkrankung bei, indem Glioblastom-treibende Mutationen herausgestellt werden. Um zu untersuchen, ob Tumor-Subklone ein ähnliches oder abweichendes Profil genetischer Veränderungen im Vergleich zu ihrer parentalen Kultur tragen, wurden bekannte Glioblastom-typische Kopienzahl-Veränderungen (Beroukhi et al. 2007; Cancer Genome Atlas Research Network 2008) von 5 parentalen Kulturen und 53 Subklonen mittels multiplexer ligationsabhängiger Sondenamplifikation (MLPA, siehe Unterabschnitt 4.3.3) analysiert (siehe Abbildung 5.2). Die gemessenen Signale der MLPA-Sonden von Tumorzell- und Kontroll-DNA wurden normalisiert, um die Signal-Verhältnisse (MLPA-Ratios) von Probe und Kontrolle zu berechnen. Ratios im Bereich von 0,8–1,2 geben eine normale Kopienzahl an. Eine MLPA-Ratio von 0 kennzeichnet eine homozygote Deletion, ein Bereich von 0,4–0,65 spiegelt eine heterozygote Deletion wider. Bei einer heterozygoten Duplikation liegt die Ratio im Bereich von 1,3–1,65 und bei einer homozygoten Duplikation bei 1,75–2,15. Fokale Amplifikationen weisen MLPA-Ratios von über 2,15 auf.

Die MLPA-Auswertung von Glioblastom-typischen Veränderungen der parentalen GNV019-Kultur zeigte fokale Amplifikationen der Rezeptoren *PDGFRA* und *KIT*, Duplikationen von Chr. 7p und 19p sowie eine heterozygote Deletion von Chr. 22 (vergleiche auch Abbildung 5.1D). BN035 wies eine fokale Amplifikation von *MET*, eine Duplikation von Chr. 7, eine heterozygote Deletion von Teilen des Chr. 9p und eine homozygote Deletion von *CDKN2A/B* auf. BN046 trug homozygote Deletionen von *CDKN2A/B*, *ELAVL2* und *LINGO2*, heterozygote Deletionen von *CDKN2C*, Chr. 10 und 22 sowie eine Duplikation von Chr. 7. BN055 zeigte fokale Amplifikation von *EGFR* und *MDM2*, eine homozygote Deletion von *CDKN2A/B* und *ELAVL2*, eine heterozygote De-

letion von Chr. 10 sowie Duplikationen von Chr. 7 und 20. BN118 wies eine heterozygote Deletion von Chr. 10 und 14q auf (siehe Abbildung 5.2).

Die jeweiligen Subklone zeigten überwiegend ähnliche Profile genetischer Aberrationen im Vergleich zu ihren Ursprungskulturen. Jedoch wiesen einige Subklone stellenweise deutliche Abweichungen zu ihrer parentalen Kultur und anderen davon abgeleiteten Subklonen in den hier untersuchten Regionen auf. Bei GNV019 konnten mit dieser Methode solche Abweichungen auf Chr. 10 und 22 und bei BN035 auf Chr. 22 beobachtet werden. 2 von 9 BN046-Subklonen zeigten eine homozygote Deletion von *CDKN2C* und 1 von 9 trug keine homozygote Deletion von *CDKN2A/B*. Des Weiteren konnten Unterschiede zwischen Subklonen auf Chr. 11, 15 und 19 festgestellt werden. 12 von 16 BN055-Subklonen trugen eine fokale Amplifikation von *EGFR*. Für BN118 konnte bei 3 von 18 Subklonen eine Amplifikation von *PDGFRA* und *KIT* nachgewiesen werden. Zudem zeigten BN118-Subklone Unterschiede auf Chr. 7, 10, 12, 19 und 22 (siehe Tabellen A.5–A.9 für eine Auflistung der MLPA-Ratios).

Zusammengefasst zeigten die Subklone denselben Hintergrund genetischer Veränderungen wie ihre Ursprungskulturen. Die intratumorale Untersuchung zeigte in jedem der 5 untersuchten Patienten Abweichungen einzelner Subklone vom Profil der parentalen Kultur. Unter diesen Abweichungen befanden sich auch Therapie-relevante Onkogene wie *EGFR*, *PDGFRA* und *KIT* (Wick et al. 2011). Das lässt darauf schließen, dass den routinemäßig durchgeführten Analysen an der polyklonalen Hauptmasse von Tumoren relevante Informationen über subklonale Aberrationen entgehen können.

5.1.4 Charakterisierung pharmakologischer Resistenzen

Ein unterschiedliches Ansprechverhalten verschiedener Tumor-Subklone gegenüber der Exposition antineoplastischer Substanzen konnte bereits in vorherigen präklinischen Studien *in vitro* gezeigt werden (Yung et al. 1982; Meyer et al. 2015). Ein verschiedenartig ausgeprägtes Ausmaß an Resistenzen gegenüber angewandten Chemotherapeutika zwischen Subklonen könnte zum Therapieversagen bei der Behandlung des Glioblastoms beitragen. Um die Profile der inter- und intratumoralen endogenen pharmakologischen Resistenz tiefer gehend zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Dosis-Wirkungs-Beziehung (Pharmakodynamik) von 20 Substanzen, die größtenteils in klinischen Studi-

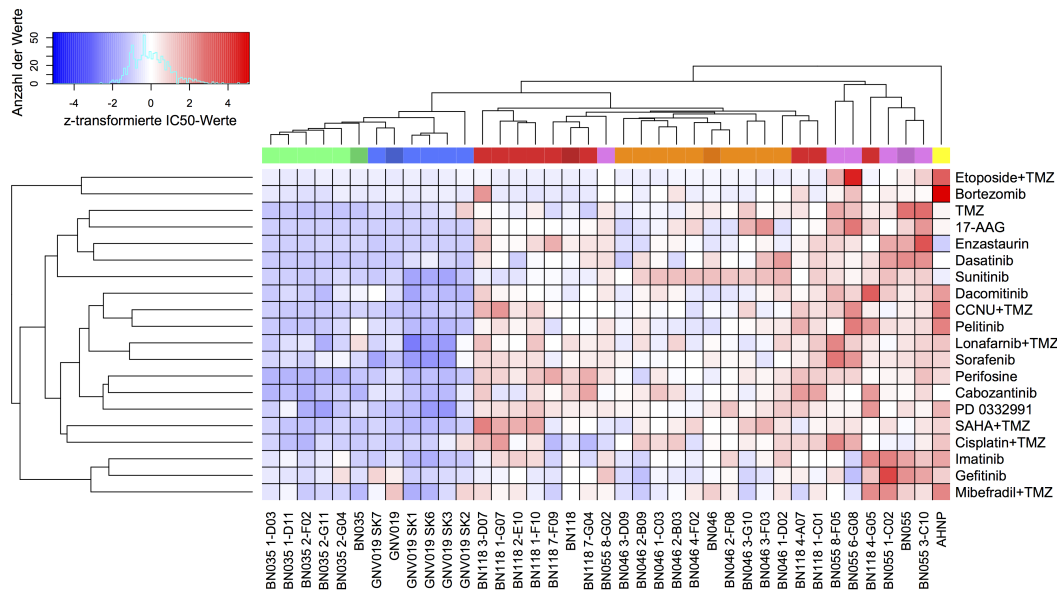


Abbildung 5.3: Pharmakologisches Resistenzprofil von 33 Subklonen. *Heatmap* und Clusteranalyse von z-transformierten IC_{50} -Werten. Die farbliche Markierung der Spalten gibt den Patienten-Ursprung der parentalen (dunkle Farbtöne) und klonalen (helle Farbtöne) Kulturen an. Hohe IC_{50} -Konzentrationen sind durch rote und niedrige durch blaue Farbtöne dargestellt. AHNP = adulte humane neurale Vorläuferzellen.

en zum Glioblastom eingesetzt wurden (siehe Tabelle A.4), an 33 Subklonen von 5 Patienten getestet. An allen untersuchten Kulturen wurden für jede der Substanzen anhand einer pharmakodynamischen Analyse die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt. Diese geben die Konzentration an, bei der die Vitalität der behandelten Zellen an einem gegebenen Zeitpunkt um 50% gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert wurde (siehe Abbildung 5.3 und Tabelle A.3).

Kulturen von GNV019 und BN035 zeigten ein allgemein niedrigeres Ausmaß der Chemoresistenz als die Zellkulturen BN046, BN055 und BN118. Unter den Tumorzellen konnte die ausgeprägteste Resistenz an BN055-Zellkulturen beobachtet werden. Eine nicht-maligne Referenz-Population adulter neuraler Vorläuferzellen (AHNP) zeigte eine allgemein geringere Sensitivität gegenüber den getesteten Substanzen, was auf deren Spezifität gegenüber Tumorzellen hinweist.

Die Durchführung einer unsupervidierten hierarchischen Clusteranalyse anhand der ermittelten IC_{50} -Werte zeigte ein deutliches Gruppierungsmuster von Kulturen gleichen Patientenursprungs (intertumorale Gruppierung). 29 der 33 Subklone ordneten sich in dem Cluster ihrer Ursprungskultur ein. Ausgeprägte

intraindividuelle Unterschiede der Substanz-Wirksamkeit konnten auch innerhalb der intertumoralen Gruppierungen beobachtet werden und sind anhand der Dendrogramme in Abbildung 5.3 verdeutlicht. 4 von 33 Subklonen zeigten in ihrem Ansprechverhalten eine größere Ähnlichkeit zu Subklonen, die aus Tumoren anderer Patienten gewonnen wurden, als zu ihren Ursprungstumoren (transindividuelles *clustering*).

Um die Relevanz der intraindividuellen Unterschiede weiter herauszustellen, wurde für alle Substanzen das IC_{50} -Verhältnis der am meisten und am wenigsten resistenten Subklone pro Patient berechnet (siehe Tabelle A.10 und Abbildung A.7). Der Median dieser IC_{50} -Verhältnisse von allen Substanzen, die an Subklonen desselben Patienten getestet wurden, beträgt 2,9 bei GNV019, 1,9 bei BN035, 2,2 bei BN046, 2,3 bei BN055 und 2,3 bei BN118. Im Patienten-Durchschnitt zeigten demnach die hier untersuchten pharmakologisch sensitivsten und resistentesten Subklone einen 2,32-fachen Unterschied ihrer IC_{50} -Werte.

Neben der bereits weitläufig anerkannten interindividuellen Vielfalt des Glioblastoms konnten hier auch relevante intraindividuelle Unterschiede bezüglich der zellulären Resistenz und genetischer Veränderungen aufgezeigt werden. Der beschriebene durchschnittliche 2,32-fache Konzentrations-Unterschied zwischen resistenten und sensitiven Subklonen erreicht ein Niveau, das von klinischer Bedeutung sein kann und eine zusätzliche Ebene der Komplexität für die Entwicklung und Anwendung neuer Therapien für das Glioblastom aufzeigt.

5.2 Personalisierte Analyse zur Vorhersage polyklonaler Dynamik

Die bisherige Analyse der intratumoralen Heterogenität legt nahe, dass innerhalb eines Tumors Subklone mit relevanten Unterschieden bezüglich ihrer genetischen und pharmakologischen Profile koexistieren. Dieser Befund zieht zwei wesentliche Fragestellungen nach sich: (1) Wie stark ist die genetische und pharmakologische Vielfalt koexistierender Subklone ausgeprägt? (2) Ist die *in vitro* Analyse von Subklonen ein geeignetes Modell, um einzelne Elemente des Tumors isoliert zu betrachten und so die Konsequenzen, die aus den unterschiedlichen Pharmaprofilen herrühren, bei der Behandlung des Gesamt-Tumors zu untersuchen?

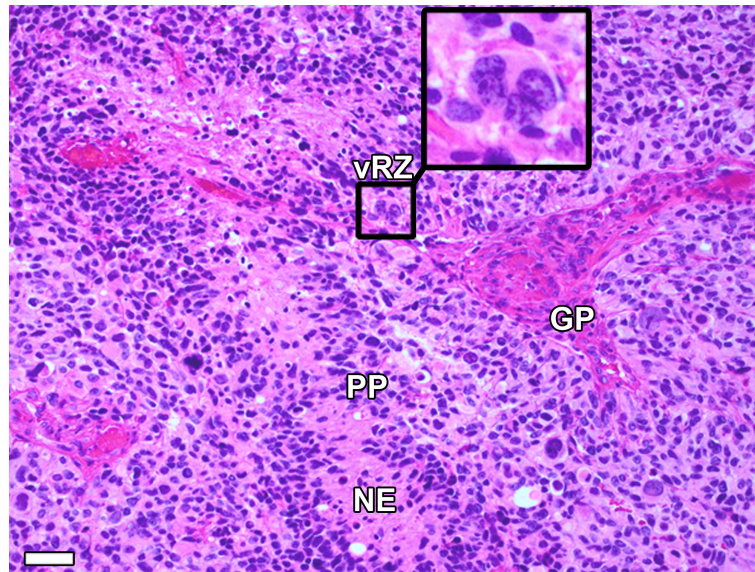


Abbildung 5.4: Histologie der GNV019-Tumorbiopsie. Die H&E-Färbung des GNV019-Biopsiepräparates zeigt typische Merkmale eines Glioblastoms: strichförmige Nekrosen (NE) und Pseudopalisaden (PP). Dazu Gefäßproliferation (GP), mitotische Aktivität (nicht markiert) und das nicht obligatorische Vorkommen von vielkernigen Riesenzellen (vRZ). Maßstabsbalken = 250 μ m.

In dieser Arbeit wurde Fragestellung (2) priorisiert, da die Bandbreite unterschiedlicher pharmakologischer und genetischer Profile von Subklonen weniger bedeutsam sind, wenn sie nicht zu einer signifikanten Veränderung der zellulären Komposition während der Behandlung des Tumors beitragen.

5.2.1 Separation Tumor-inhärenter Merkmale durch Isolation von Subklonen

Für eine ausführliche personalisierte Analyse über die polyklonale Natur des Glioblastoms wurde der Fall GNV019 ausgewählt. Dieser zeigte neben den bereits zuvor beschriebenen genetischen und pharmakologischen Unterschieden zwischen Subklonen mit der Präsenz von histopathologisch diagnostizierten vielkernigen Riesenzellen (vRZ) ein zusätzliches Heterogenitäts-Merkmal auf morphologischer Ebene. Das Vorkommen von vRZ ist für die Diagnostizierung des Glioblastoms nicht obligatorisch, aber vereinzelte vRZ werden häufig beobachtet (Louis et al. 2007a). Die histopathologische Untersuchung der GNV019-Tumorbiopsie zeigte eine geringe Frequenz ($\approx 1\%$) von vRZ, die verstreut zwischen anderen kleineren und pleomorphen Zelltypen lagen (siehe Abbildung 5.4).

Die Transplantation von kultivierten GNV019-Zellen in den frontalen Cor-

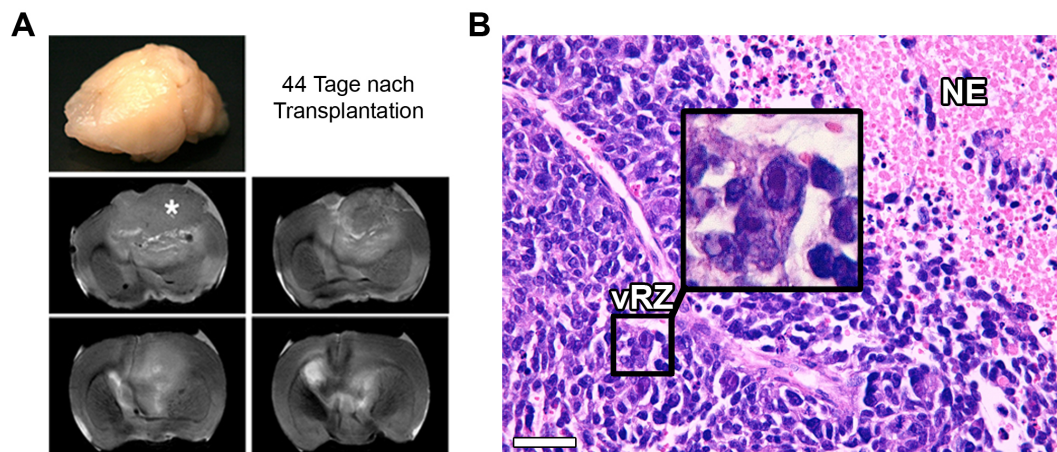


Abbildung 5.5: Orthotope Xenotransplantation von GNV019-Zellen. (A) Magnetresonanztomographie eines SCID Beige Maushirns 44 Tage nach Xenotransplantation. Zu erkennen ist die Infiltration einer Masse mittlerer T2-Intensität in den linken frontalen Cortex und die unterliegenden Basalganglien. Die Raumforderung bewirkt eine Herniation und Mittellinienverschiebung. (B) Ausschnitt einer H&E-Färbung eines GNV019-Xenotransplantats mit Nekroseareal (NE) und vielkernigen Riesenzellen (vRZ). Der Stern in (A) markiert den Transplantationsort. Maßstabsbalken = 100 μm .

tex von immundefizienten Mäusen führte zur Entstehung von Tumoren mit typischen Merkmalen des Glioblastoms und Ähnlichkeit zur ursprünglichen Histologie des Patienten ($n = 11$ Transplantationen, siehe Abbildung 5.5). Die Magnetresonanztomographie eines extrahierten Maushirns dokumentierte das Glioblastom-typische diffus infiltrative Wachstumsverhalten sowie eine ausgeprägte Mittellinienverschiebung und Einklemmung (Herniation) des Gehirns, die durch die große Raumforderung des Tumors bedingt wurden (siehe Abbildung 5.5A). Bei histopathologischer Betrachtung von Xenotransplantaten fanden sich weitere Glioblastom- und Patienten-typische Merkmale, unter anderem die Präsenz von vRZ (siehe Abbildung 5.5B). Die Quantifizierung deren Häufigkeit ergab eine Frequenz von $2,1 \pm 1,1\%$ (siehe Abbildung 5.6B und Unterabschnitt 4.2.3).

Die einzelnen GNV019-Subklone zeigten sowohl in Zellkultur als auch nach orthotoper Xenotransplantation individuelle Ausprägungen ihres Wachstumsmusters (siehe Abbildung 5.6A). SK2 zeigte nach 11 von 11 Transplantationen kein tumorigenes Potenzial. Alle anderen Subklone wiesen nach der Transplantation histopathologische Merkmale eines Glioblastoms auf (Louis et al. 2007a), wobei sich aber Unterschiede in ihrer zellulären Komposition offenbarten (5.6A, unterer Teil). Tumoren von SK7 zeigten eine Kleinzell-angereicherte

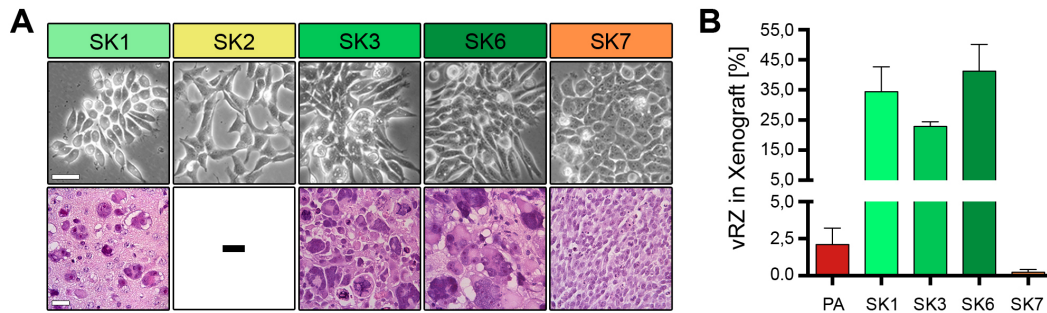


Abbildung 5.6: Morphologie und vRZ-Frequenz der GNV019-Subklone. (A) Oben: Phasenkontrastaufnahmen der GNV019-Subklone *in vitro*. Unten: Hellfeldaufnahmen von H&E-gefärbten Xenotransplantaten der GNV019-Subklone. SK2-Zellen waren nicht tumorigen. (B) Quantifizierung der vRZ-Frequenz in Xenotransplantaten von GNV019-Subklonen und der parentalen Kultur (PA). Für jeweils 3 unterschiedliche Präparationen von Xenotransplantaten wurden 3–10 Aufnahmen von zufälligen Gesichtsfeldern eines 40x-Objektivs für die Quantifizierung von durchschnittlich 10 145 Zellen verwendet. Maßstabsbalken = 50 μ m.

Morphologie, die meisten Tumorzellen präsentierten sich einheitlich als klein und rundlich. Die Präsenz von vRZ war extrem selten und wurde auf $0,2 \pm 0,2$ % bestimmt ($n = 8$ Transplantationen). Im Gegensatz dazu wiesen Tumoren von SK1/3/6 eine hohe Frequenz von vRZ auf ($32,8 \pm 9,3$ % im Mittel, $n = 8/7/10$ Transplantationen, siehe Abbildung 5.6A, unterer Teil, und Abbildung 5.6B).

Die Tumor-inhärenten morphologischen Merkmale des Falls GNV019 – vielzellige Riesenzellen und kleinzellige Tumorzellen – konnten in Zellkultur und Xenotransplantaten erhalten werden. Die Separation und anschließende Charakterisierung von Subklonen aus der heterogenen parentalen Kultur ermöglichte den experimentellen Zugriff auf die zelluläre Grundlage dieser unterschiedlichen Phänotypen.

5.2.2 Charakterisierung und Gruppierung der Subklone

In Folgeuntersuchungen zu den GNV019-Subklonen sollte herausgefunden werden, ob die Ausbildung der verschiedenen Phänotypen nach Xenotransplantation durch mögliche Unterschiede in der zellulären Plastizität, Genexpression oder von genetischen Aberrationen wiedergegeben wird.

In vitro-Experimente zur zellulären Plastizität der GNV019-Subklone offenbarten ein ähnliches Entwicklungspotenzial wie neurale Vorläuferzellen, insofern als sie die Fähigkeit zeigten, sich selbst zu erneuern und in neuronale (β III-Tubulin⁺) und gliale (GFAP⁺) Zelltypen zu differenzieren (siehe Abbildung 5.7, oberer Teil). Zusätzlich wurde ausschließlich für SK1/3/6 ein ausgeprägtes

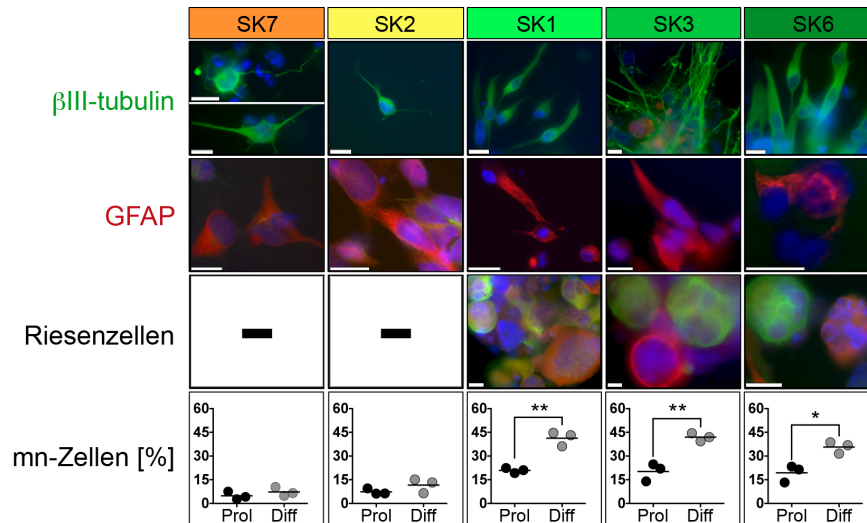


Abbildung 5.7: Differenzierungspotenzial der GNV019-Subklone. Die spontane Differenzierung adhärerter sekundärer Neurosphären der jeweiligen Subklone generierte in allen untersuchten Kulturen nach 10–26 Tagen neuronale (β III-Tubulin⁺) und gliale (GFAP⁺) Nachkommen. Quantifizierung von mn-Zellen anhand von durchschnittlich 1158 ± 172 gezählten Zellen pro Kondition (Prol = proliferativ, Diff = 4-tägiger Entzug von Wachstumsfaktoren *in vitro*). Maßstabsbalken = $20 \mu\text{m}$. Ungepaarter t-Test unter Annahme gleicher Varianzen, Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Potenzial zur spontanen Differenzierung in (riesige) multinukleäre Zellen (mn-Zellen) beobachtet, die den vRZ aus histologischen Untersuchungen ähnlich sind (siehe Abbildung 5.7, unterer Teil). Die Frequenz der mn-Zellen erhöhte sich nach der Differenzierungs-Phase bei SK7 von $4,8 \pm 2,5 \%$ auf $7,3 \pm 2,9 \%$ ($p = 0,321$) und bei SK2 von $7,4 \pm 1,9 \%$ auf $11,6 \pm 4,6 \%$ ($p = 0,208$). Dem gegenüber war der Anstieg der mn-Zellen bei SK1 (von $20,9 \pm 1,6 \%$ auf $41,3 \pm 4,5 \%$, $p = 0,0018$), SK3 (von $20,2 \pm 5,6 \%$ auf $41,9 \pm 2,6 \%$, $p = 0,0036$) und SK6 (von $19,4 \pm 5,4 \%$ auf $35,7 \pm 3,7 \%$, $p = 0,0123$) jeweils statistisch signifikant und erreichte nach der Differenzierung mit einer durchschnittlichen Frequenz von $39,6 \pm 3,4 \%$ das 4,2-fache Niveau (+30,2%) im Vergleich zu SK2/7. Somit konnte die exklusive Fähigkeit von SK1/3/6, vermehrt mehrkernige Zellen zu generieren, anhand der Quantifizierung von vRZ *in vivo* und mn-Zellen *in vitro* aufgezeigt werden.

Der Vergleich der Expressionslevel von Marker-Genen neuraler Vorläuferzellen zwischen den Subklonen zeigte ein Muster, in dem sich der nicht-tumorigene SK2, die Riesenzell-generierenden SK1/3/6 und der kleinzellige SK7 voneinander separierten (siehe Abbildung A.8). SK1/3/6 zeigten eine relative Überexpression von *Nestin*, *NCAM1*, *SOX8* und *FGFR4*. SK7-Zellen exprimierten verstärkt

FABP7, *SOX9*, *OTX2* und *BMI1*. Die Expression von *NOTCH2* und *VCAM1* war hingegen bei SK2 am stärksten. *Vimentin* und *SOX2* wurden von SK2 und SK7 gegenüber SK1/3/6 stärker exprimiert. Die Subklone wiesen somit eine unterschiedliche Signatur von Markern neuraler Vorläuferzellen auf, die mit ihrem Verhalten nach Xenotransplantation einherging.

Um die Gruppierung der GNV019-Subklone untereinander auf der Basis von genomweiten molekularen Daten auszuweiten und zu präzisieren, wurde eine unsupervidierte hierarchische Clusteranalyse von Korrelationswerten der genomweiten Expressions- und Genotypisierungsprofile durchgeführt (siehe Abbildung 5.8). Bei Betrachtung der Genexpression und der Genotypen (B-Allel-Frequenz als Maß für das Aufkommen genetischer Aberrationen) konnte eine sehr starke Ähnlichkeit zwischen den Subklonen 1/3/6 beobachtet werden, SK7 zeigte Gemeinsamkeiten mit der parentalen Ursprungskultur. SK2 wies ein ähnliches Expressionsprofil wie die parentale Kultur auf, zeigte aber größere Unterschiede bezüglich der genetischen Aberrationen. Expressionsprofile von neuralen Vorläuferzellen, die aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitet worden waren (hESCdNP), der Glioblastom-Zelllinie U-87 und primärer Fibroblasten (FIBRO) wurden als Referenzproben in die Analyse mit eingeschlossen. Die neuralen Vorläuferzellen zeigten eine größere Ähnlichkeit zu SK1/3/6 als zu allen anderen GNV019-Kulturen. Fibroblasten und U-87 zeigten große Unterschiede zu allen anderen untersuchten Kulturen.

Die bisherigen Untersuchungen zur zellulären Heterogenität legen nahe, dass die 5 charakterisierten GNV019-Subklone durch 3 verschiedenartige Tumorzell-Hierarchien repräsentiert werden (SK1/3/6, SK2 und SK7). Diese funktionellen Einheiten weisen konsistente Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie *in vivo*, ihrer zellulären Plastizität *in vitro*, ihres globalen und neuralen Vorläufer-spezifischen Genexpressionsprofils sowie ihrer genetischen Aberrationen auf. Die hier angewandte Methode der Analyse von Subklonen bietet einen experimentellen Zugang, um zelluläre Hierarchien offenzulegen und diese speziell in Hinblick auf pharmakologische Studien weitergehend zu analysieren.

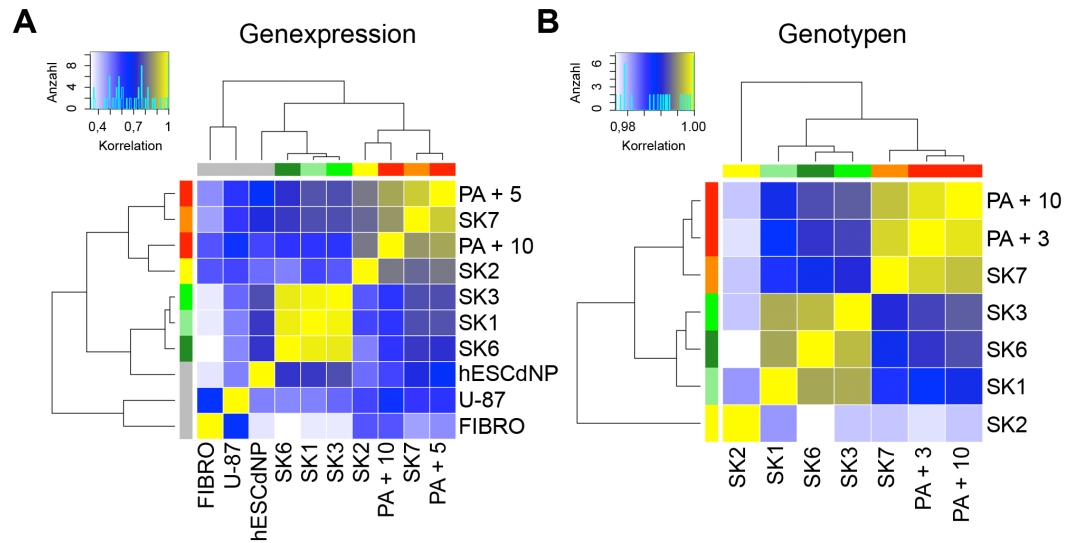


Abbildung 5.8: Ähnlichkeitsanalysen der GNV019-Subklone. Darstellung der hierarchischen Clusteranalysen von Korrelationswerten als *heatmaps*. Links: Korrelation der 1 000 (log₂-transformierten) Expressionswerte mit der größten Varianz zwischen allen Proben. Rechts: Korrelation der Genotypen (550 316 Messwerte der B-Allel-Frequenz). PA+3/5/10 = parentale GNV019-Kultur aus den Passagen 3, 5 und 10, FIBRO = humane Fibroblasten, U-87 = U-87-Glioblastom-Zelllinie, hESCdNP = neurale Vorläuferzellen, die aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden (Koch et al. 2009).

5.2.3 Selektion von Subklonen aufgrund unterschiedlicher Resistenzprofile

Die in Unterabschnitt 5.2.2 beschriebene Gruppenzuordnung von SK1/3/6, SK2 und SK7 stellte sich bereits in der Clusteranalyse der pharmakologischen Resistenz von parentalen und klonalen Kulturen der 5 untersuchten Glioblastom-Patienten dar (siehe Abbildung 5.3). Die Beobachtung, dass Subklone in ihrem Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika voneinander abgrenzbar sind, eröffnet auch die Möglichkeit, solchen Substanzen zu identifizieren, die eine selektive Wirkung auf Subklone aufweisen. So kann ein experimenteller Zugang zu der Fragestellung gewonnen werden, ob sich einzelne Subklone bzw. Tumorzell-Hierarchien innerhalb der parentalen Kultur gezielt anreichern oder vermindern lassen.

Um diese Hypothese zu unterstützen und ihre Anwendbarkeit zu testen, wurde in Folgeexperimenten der initiale pharmakologische Ansatz aus Unterabschnitt 5.1.4 weiter ausgedehnt, indem die Wirksamkeit von 160 zusätzlichen Substanzen synthetischen oder natürlichen Ursprungs („The Killer Collection“, siehe Tabelle A.1) an den GNV019-Subklonen untersucht wurde (siehe

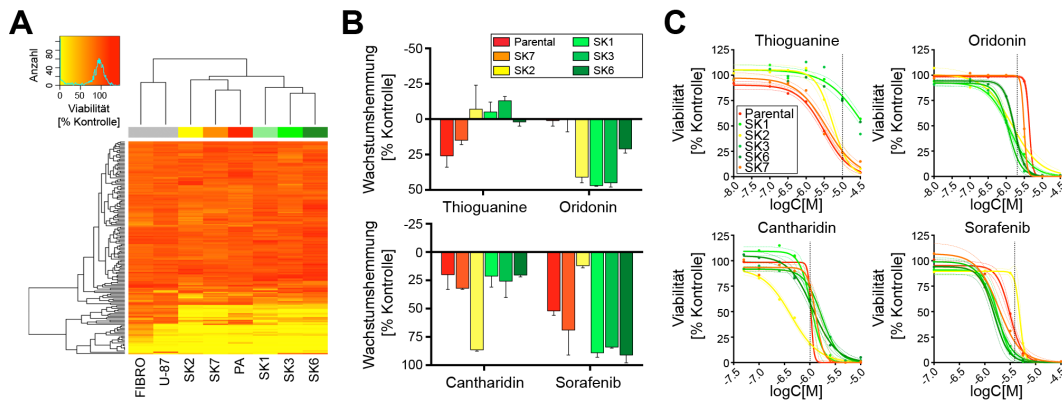


Abbildung 5.9: Identifikation von Substanzen mit differenzieller Wirksamkeit zwischen GNV019-Subklonen. (A) Clusteranalyse der zellulären Viabilität nach Behandlung mit der „Killer Collection“-Substanzbibliothek (jeweils $1 \mu\text{M}$). (B) Kandidaten-Substanzen zur pharmakologischen Selektion von Subklonen. Auszug aus 5.9A und Ergänzung um Sorafenib ($3,16 \mu\text{M}$) aus 5.3. (C) Pharmakodynamik der Kandidaten-Substanzen. Bunte gestrichelte Linien geben das 95% Konfidenzintervall der nicht-linearen Regressionskurve an. Gepunktete vertikale Linien geben die gewählte Konzentration für Selektionsversuche an. FIBRO = humane Fibroblasten, U-87 = U-87-Glioblastom-Zelllinie, PA = parentale GNV019-Zellen.

Tabellen A.11 & A.12). Mit Hilfe einer unsupervidierten hierarchischen Clusteranalyse wurde ermittelt, welche Subklone ein ähnliches pharmakologisches Ansprechverhalten gegenüber den 160 Substanzen aufweisen (siehe Abbildung 5.9A). Dabei konnte der initiale Befund bestätigt werden, dass SK1/3/6, SK2 und SK7 unterschiedlich auf die Behandlung reagieren (siehe Abbildung 5.3). Im nächsten Schritt wurden anhand der bisher erhobenen pharmakologischen Daten (siehe Abbildungen 5.3 & 5.9A) insgesamt 4 Substanzen identifiziert, die eine unterschiedliche Wirksamkeit auf die analysierten Subklone zeigten (siehe Abbildung 5.9B). Dabei zeigte Thioguanine stärkere Effekte gegenüber SK7, Oridonin gegenüber SK1/2/3/6, Cantharidin gegenüber SK2 und Sorafenib gegenüber SK1/3/6/7. Anhand dieser Substanzen wurde in der Folge untersucht, ob sie für eine gezielte Anreicherung von Subklonen innerhalb der parentalen Kultur geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde anschließend die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Kandidaten-Substanzen genauer untersucht, um diejenigen Konzentration zu bestimmen, bei der die größten Wirkungsunterschiede zwischen den einzelnen Subklonen zu beobachten sind (siehe Abbildung 5.9C). SK1/3/6 zeigten vergleichsweise hohe Resistenz nach der Anwendung von $10 \mu\text{M}$ Thioguanine. SK7 war resistenter als alle anderen Subklone, wenn $2 \mu\text{M}$ Oridonin appliziert wurden. SK2 zeigte im Vergleich zu allen anderen Subklonen eine hohe Sensitivität gegenüber $1 \mu\text{M}$ Cantharidin und eine ausgeprägte

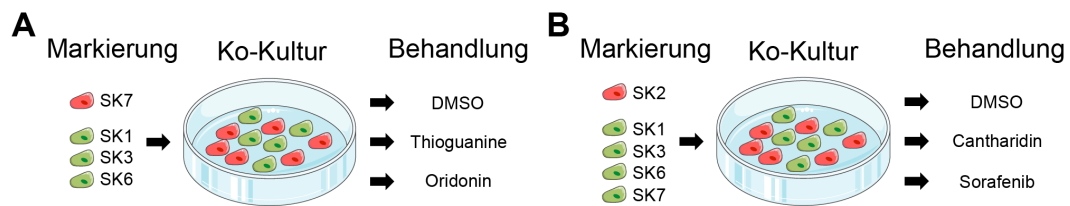


Abbildung 5.10: Schema der Ko-Kultur-Experimente. Für jedes Experiment wurden transient rot und grün fluoreszenzmarkierte Subklone im gleichen Verhältnis gemischt und mit den angegebenen Substanzen für eine Dauer von 5 Tagen behandelt. (A) Schema für die Behandlung von SK7 gegen SK1/3/6 mit Thioguanine und Oridonin. (B) Schema für die Behandlung von SK2 gegen SK1/3/6/7 mit Cantharidin und Sorafenib.

Resistenz gegenüber $3,16 \mu\text{M}$ Sorafenib.

Die Auswahl von Substanzen und die Ermittlung von geeigneten Konzentrationen für Selektionszwecke sind bisher in separaten Analysen an isolierten Subklonen durchgeführt worden. Da sich das Ansprechen von Subklonen in einem polyklonalen Umfeld jedoch anders verhalten könnte, wurden dazu eigens Versuche mit den GNV019-Subklonen unter definierten Bedingungen in Ko-Kultur durchgeführt (siehe Abbildung 5.10). Dafür wurde eine festgelegte Mischung von fluoreszenzmarkierten Subklonen einmalig mit einer der Kandidaten-Substanzen oder Lösungsmittel für 5 Tage behandelt, um anschließend die Zusammensetzung der Ko-Kulturen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen (siehe Abbildung 5.11A für eine repräsentative Darstellung). Die Verschiebung der unterschiedlich markierten Populationen wurde anschließend berechnet, indem die Frequenzen der Lösungsmittelkontrolle von denen der behandelten Kulturen subtrahiert wurden (siehe Abbildung 5.11B).

In Einklang mit den vorherigen Analysen an einzelnen Subklonen zeigten sich SK1/3/6 auch im polyklonalen Umfeld resistenter gegenüber Thioguanine als SK7. Durch die Behandlung konnten SK1/3/6 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um durchschnittlich $17,2 \pm 2,0 \%$ angereichert werden, während die Präsenz von SK7 um $17,0 \pm 2,4 \%$ reduziert wurde. Die erhöhte Resistenz von SK7 gegenüber Oridonin konnte ebenfalls in Ko-Kultur bestätigt werden. Der Anteil von SK7 erhöhte sich um $21,0 \pm 7,0 \%$ und der von SK1/3/6 verringerte sich um $21,4 \pm 6,4 \%$. Des Weiteren konnte auch die Relevanz der Vordaten zu Sorafenib (SK2: $+25,0 \pm 6,5 \%$; SK1/3/6/7: $-23,0 \pm 6,2 \%$) und Cantharidin (SK1/3/6/7: $+18,9 \pm 3,8 \%$; SK2: $-19,5 \pm 2,6 \%$) in Ko-Kultur-Experimenten bekräftigt werden (siehe Abbildung 5.11B).

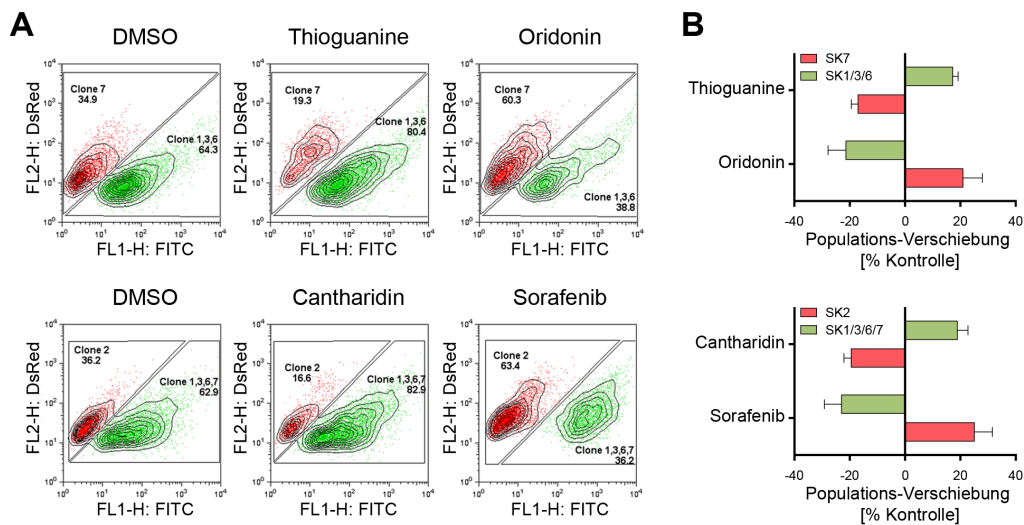


Abbildung 5.11: Selektion von Subklonen in Ko-Kultur. 5 Tage nach Beginn der Behandlung wurden mindestens 15 000 ko-kultivierte Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Repräsentative Messungen, um die Verschiebung von fluoreszenzmarkierten Populationen darzustellen. FL1-H: FITC gibt die Intensität des grün fluoreszierenden und FL2-H: DsRed die Intensität des rot fluoreszierenden Farbstoffs von markierten Zellen wider. (B) Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 jeweils unabhängigen Experimenten. Populationsverschiebungen wurden berechnet, indem die Frequenzen der rot und grün fluoreszierenden Populationen der Lösungsmittel-Behandlung von denen der Substanz-Behandlungen subtrahiert wurden. Clone = Subklon.

Die hier beschriebenen pharmakologischen Analysen haben herausgestellt, dass koexistierende Subklone verschiedene Resistenz-Muster aufweisen können. Die Relevanz dieser Unterschiede konnte in einem Ko-Kultur-Modell bestätigt werden, indem die pharmakologischen Wirksamkeitsprofile dazu verwendet wurden, Vorhersagen über die gezielte Anreicherung oder Verminderung von ausgewählten Subklonen in einem definierten polyklonalen Umfeld zu treffen.

5.2.4 Vorhersagen über polyklonale Dynamik *in vitro*

Die Ko-Kultur-Experimente konnten zeigen, dass der Anteil von Subklonen innerhalb einer Zellpopulation in Abhängigkeit von der ausgewählten Behandlung selektiv moduliert werden kann. Im Folgenden wurde dieser Befund im komplexeren Rahmen der ursprünglichen parentalen GNV019-Kultur untersucht, um zu testen, ob auch dort Vorhersagen über die Dynamik von Subklonen unter Therapie-Einfluss möglich sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die parentale Kultur eine heterogene Mischung von Zellen ist, in der die Anzahl und die Frequenz von bereits untersuchten und möglicherweise weiteren, bisher nicht charakterisierten Subklonen unbekannt sind. Im weiteren Verlauf werden die

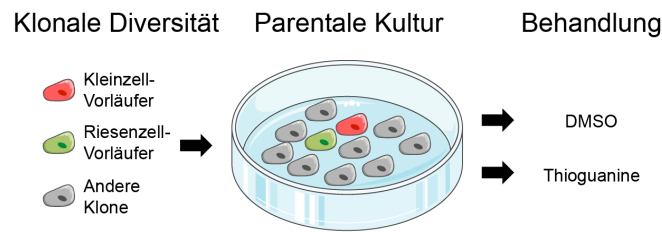


Abbildung 5.12: Schema der Selektion von Riesenzell-Vorläufern innerhalb der parentalen GNV019-Kultur.

Befunde, die durch die Analysen an den isolierten Subklonen SK1/2/3/6/7 erhoben wurden, auf die parentale Kultur angewendet. Es ist nicht auszuschließen, dass die ursprünglich untersuchten Subklone während der Folgeexperimente nicht mehr in der parentalen Kultur vertreten sind oder bislang unbekannte Subklone ähnliche Merkmale aufweisen. Deswegen werden die bisher herausgestellten Charakteristika der Subklone als SK1/3/6-, SK2- und SK7-ähnlich bezeichnet.

Gezielte Anreicherung SK1/3/6-ähnlicher Zellen mit multinukleärem Phänotyp

In einem ersten Ansatz wurde die parentale GNV019-Kultur als Zusammensetzung von Vorläuferzellen angesehen, die entweder imstande (wie z. B. die Thioguanine-resistenten SK1/3/6) oder außerstande (wie z. B. die Thioguanine-sensitiven SK2/7) waren, vermehrt (riesige) multinukleäre Zellen auszubilden (siehe Abbildungen 5.6 & 5.7). Diese Zellen wurden in histologischen Untersuchungen an GNV019-Xenotransplantaten, analog zur neuropathologischen Diagnostik, als vielkernige Riesenzellen (vRZ) und in Zellkultur-Experimenten als multinukleäre Zellen (mn-Zellen) bezeichnet (siehe Unterabschnitt 4.2.3). Das morphologische Merkmal, verstärkt vRZ/mn-Zellen entwickeln zu können (siehe Unterabschnitt 5.2.2), ermöglichte es in diesem Ansatz, das Ausmaß von pharmakologischer Selektion quantifizierbar zu machen.

In Zellkultur-Experimenten wurde dazu zuerst die parentale GNV019-Kultur mit Thioguanine oder Lösungsmittel behandelt und eine 4-tägige Differenzierungsphase angeschlossen, um die Entstehung von multinukleären Zellen zu begünstigen (siehe Abbildung 5.12). Anschließend wurde die Frequenz von multinukleären Zellen quantifiziert und miteinander verglichen. Nach Behandlung mit Thioguanine und anschließender Differenzierung stieg die Frequenz

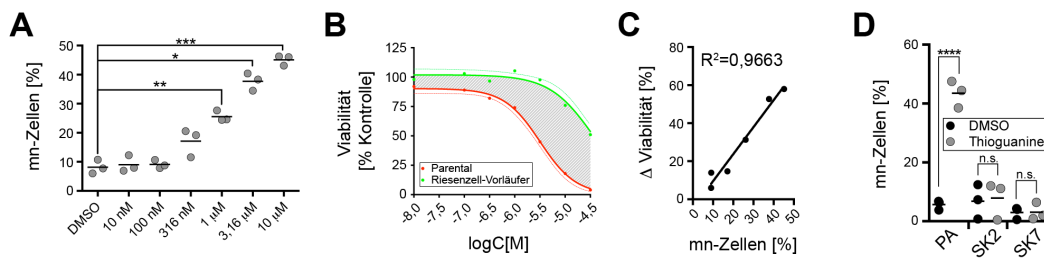


Abbildung 5.13: Anreicherung von multinukleären Zellen *in vitro*. (A) Anstieg der mn-Zell-Frequenz bei steigenden Thioguanine-Konzentrationen (5-tägige Behandlung mit anschließend 4-tägiger Differenzierung). Quantifizierung von durchschnittlich 306 ± 117 Zellen (3 unabhängige Experimente). (B) Thioguanine-Dosis-Wirkungs-Kurven der parentalen Kultur (rot) und Mittelwerte von SK1/3/6 (grün). Die grau markierte Fläche hebt die Differenz beider Kurven (Δ Viabilität) hervor. (C) Lineare Regression der mn-Zell-Frequenz (aus A) auf die Δ Viabilität (aus B). (D) Effekte von $10 \mu\text{M}$ Thioguanine und anschließender Differenzierung auf die mn-Zell-Frequenz der parentalen Kultur und der SK2/7. Quantifizierung von durchschnittlich 674 ± 428 Zellen (3 unabhängige Experimente). PA = parentale GNV019-Zellen. *One-way-* (A) und *two-way-* (D) ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

der mn-Zellen in der parentalen Kultur in Abhängigkeit von der zugeführten Thioguanine-Konzentration an (siehe Abbildung 5.13A). Für die Lösungsmittel-behandelte Kultur wurde eine Frequenz von $8,16 \pm 2,37$ % mn-Zellen bestimmt. Ein deutlicher Anstieg der Frequenz war ab einer Behandlung mit 316 nM Thioguanine ($17,1 \pm 4,86$ %) zu beobachten und ab einer Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ Thioguanine ($25,58 \pm 1,82$ %, $p = 0,002$) erreichte der Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle statistische Signifikanz. Bei der höchsten getesteten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Thioguanine konnte eine 5,5-fach höhere Frequenz ($+36,96$ %) von mn-Zellen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bestimmt werden ($45,12 \pm 1,76$ %, $p = 0,0008$). Die Zunahme an mehrkernigen Zellen korrelierte stark mit der Größe des Viabilitäts-Unterschiedes (Δ Viabilität) zwischen der parentalen Kultur und SK1/3/6, der anhand von Untersuchungen zur Pharmakodynamik an einzelnen Kulturen berechnet wurde ($R^2 = 0,9663$, siehe Abbildungen 5.13B & C).

Ungeachtet des Potenzials von SK1/3/6, mn-Zellen auszubilden, könnte allein die Anwendung von Thioguanine die Entstehung von multinukleären Zellen begünstigen. Um einen potenziellen Nebeneffekt der Substanz auszuschließen, wurde die Behandlung auch auf SK2/7 angewendet, die in bisherigen Experimenten außerstande waren, verstärkt multinukleäre Zellen zu bilden (siehe Abbildungen 5.6 & 5.7). Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Thioguanine und anschließende Differenzierung führten zu keinem signifikanten Anstieg von

mn-Zellen bei SK2 (1,15-fach, $p = 0,9996$) und SK7 (1,04-fach, $p > 0,9999$), während in einem parallelen Ansatz deren Ausbildung an der parentalen Kultur erneut bestätigt werden konnte (7,68-fach, $p < 0,0001$, siehe Abbildung 5.13D).

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass SK1/3/6, die verstärkt multinukleäre Zellen ausbilden können, resistenter gegenüber der Behandlung mit Thioguanine als andere Subklone sind. Diese Erkenntnisse wurden im Folgenden auf die polyklonale GNV019-Kultur übertragen. Nach der Behandlung der parentalen Kultur mit Thioguanine und anschließender Differenzierung konnte ein Frequenz-Anstieg von multinukleären Zellen beobachtet werden, dessen Ausmaß mit dem ausgeübten Selektionsdruck (Δ Viabilität) korrelierte. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass SK1/3/6-ähnliche Zellen durch die Behandlung mit Thioguanine spezifisch angereichert wurden.

Gezielte Anreicherung SK2-ähnlicher Zellen mit spezifischer Deletion auf Chr. 5q

Ein zweiter Ansatz zur Untersuchung klonaler Selektion innerhalb der GNV019-Kultur basierte auf einer 36 Megabasen umfassenden Deletion auf Chr. 5q14.1–q22.1, die ausschließlich bei SK2 nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5.14). Dieses spezifische genetische Merkmal ermöglichte die Nachverfolgung von pharmakologischen Selektionseffekten gegenüber SK2-ähnlichen Zellen durch die Bestimmung der Kopienzahl dieser Region. In Voruntersuchungen konnte für SK2 eine verstärkte Resistenz gegenüber Sorafenib und Sensitivität gegenüber Cantharidin gezeigt werden (siehe Abbildung 5.9). Die Selektion von SK2-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen Kultur durch Sorafenib sollte folglich durch eine abfallende Kopienzahl von Chr. 5q14.1–q22.1 messbar sein. Eine Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen durch die Sorafenib-Behandlung hätte darüber hinaus zur Folge, dass die Anfälligkeit der behandelten Kultur gegenüber einer sekundären Behandlung mit Cantharidin zunimmt (siehe Abbildung 5.15).

Veränderungen der Kopienzahl von Chr. 5q14.1–q22.1 wurden an extrahierter DNA der Sorafenib- bzw. Lösungsmittel-behandelten parentalen Kultur mittels RTQ-PCR bestimmt (siehe Unterabschnitt 4.3.2). DNA von SK2 und Leukozyten gesunder Spender wurden als Referenzproben für die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der spezifischen Deletion in die Analyse mit eingeschlossen.

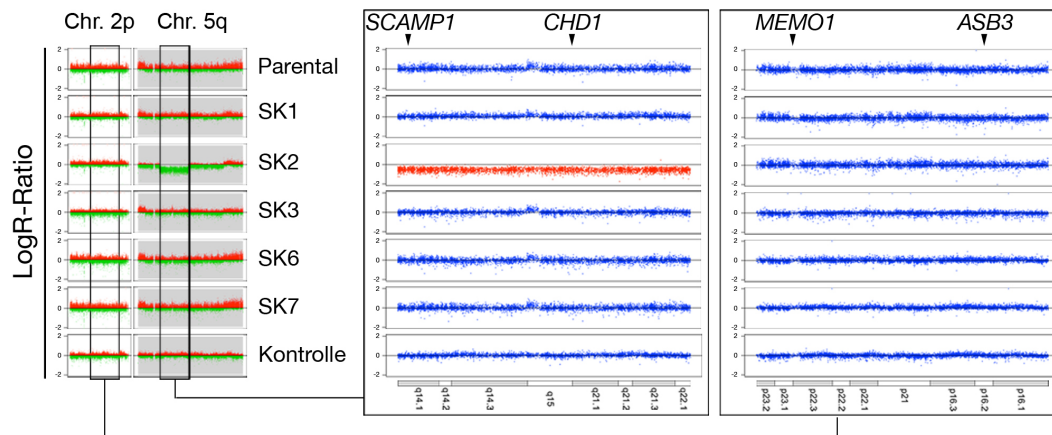


Abbildung 5.14: Darstellung der SK2-spezifischen Deletion auf Chr. 5q. Zur Illustration genetischer Aberrationen wurden die LogR-Ratios aus *microarray*-Genotypisierungen der parentalen GNV019-Kultur, den davon abgeleiteten Subklonen und von Leukozyten eines gesunden Blut-Spenders (Kontrolle) entlang ihrer chromosomalen Position dargestellt (LogR-Ratios < 0 grün, > 0 rot markiert, Skala von -2 bis +2). Links: Darstellung von Chr. 2p und 5q. Mitte: Vergrößerung der Region mit SK2-spezifischer Deletion (rot, Chr. 5q14.1–q22.1). Rechts: Ausgewählte Referenz-Region auf Chr. 2p mit unveränderten LogR-Ratios in allen GNV019-Kulturen. Für die hervorgehobenen Gene *SCAMP1*, *CHD1*, *MEMO1* und *ASB3* wurden PCR-Primer zur Bestimmung der Kopienzahl dieser Regionen mittels RTQ-PCR entworfen.

Die Behandlung erfolgte durch einmalige Zugabe von DMSO oder Sorafenib innerhalb eines 5-tägigen Behandlungszyklus. Die Lösungsmittelkontrolle wies eine Kopienzahl von $1,897 \pm 0,100$ für Chr. 5q14.1–q22.1 auf (siehe Abbildung 5.16A). Nach einem Zyklus Sorafenib-Gabe sank der Wert auf $1,520 \pm 0,095$ und erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle nach einem zweiten Behandlungszyklus ($1,317 \pm 0,105$, $p = 0,0479$). Für SK2 wurde eine Kopienzahl von $0,943 \pm 0,140$ ermittelt. Somit sank bei steigender Zuführung von Sorafenib die Kopienzahl der Chromosomenregion 5q14.1–q22.1 bei der parentalen Kultur, wie es bei einer Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen zu erwarten wäre.

Neben der Untersuchung des genetischen Merkmals der SK2-spezifischen Deletion für den Nachweis der Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen wurde sich auch die funktionelle Eigenschaft der erhöhten Sensitivität von SK2 gegenüber Cantharidin zunutze gemacht. Die Sorafenib-vorbehandelte parentale Kultur zeigte durch die sekundäre Behandlung mit Cantharidin eine signifikant stärkere Wachstumshemmung als eine Lösungsmittel-vorbehandelte Kultur ($21,00 \pm 8,66\%$ gegen $59,33 \pm 8,08\%$, $p = 0,0003$, siehe Abbildung 5.16B). Zur Unterstützung der Annahme, dass der beobachtete Effekt auf der Selektion

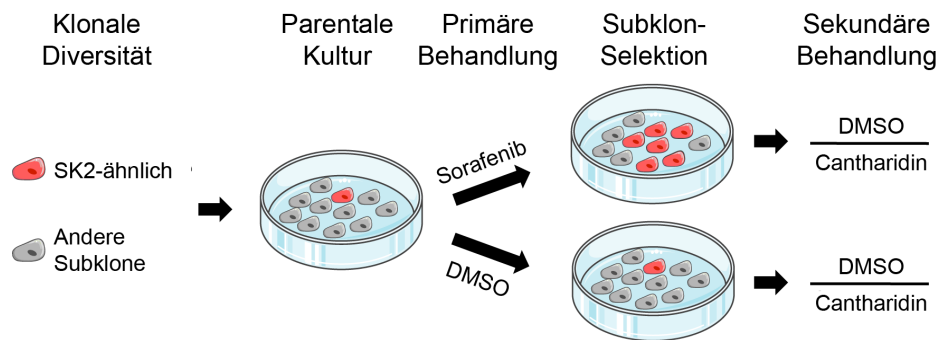


Abbildung 5.15: Schema zum Nachweis der Selektion von SK2-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen Kultur. Die GNV019-Kultur wurde mit $4\ \mu\text{M}$ Sorafenib oder 0,02% DMSO für 5 Tage in 1–2 Zyklen behandelt. Anschließend wurde DNA für die nachfolgende Bestimmung der Kopienzahl von Chr. 5q14.1–q22.1 gewonnen. In einem parallelen Ansatz wurden die Sorafenib- oder DMSO-vorbehandelten Kulturen zusätzlich mit $1\ \mu\text{M}$ Cantharidin oder 0,01% DMSO für 5 weitere Tage behandelt und anschließend die zelluläre Viabilität bestimmt.

von Subpopulationen innerhalb einer polyklonalen Kultur beruht, wurde das Behandlungsschema zusätzlich auf SK2 angewendet. Wie anhand der Vordaten zu erwarten war, reagierte SK2 mit einer stärkeren Wachstumshemmung auf Cantharidin als die parentale Kultur. Die Vorbehandlung von SK2 mit Sorafenib allein hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Hemmung durch die sekundäre Behandlung mit Cantharidin ($85,00 \pm 2,65\%$ gegen $92,33 \pm 2,08\%$, $p = 0,502$).

Sowohl auf genetischer als auch auf funktioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass die parentale GNV019-Kultur nach der Behandlung mit Sorafenib eine größere Ähnlichkeit zu SK2 aufwies als nach der Behandlung mit Lösungsmittel. Die hier verwendeten Methoden zum Nachweis der Selektion SK2-ähnlicher Zellen ermöglichten keine genauere Angabe über den Anreicherungsgrad, wie es zuvor für Thioguanine möglich war. Jedoch lässt sich anhand der in Abbildung 5.16 dargestellten Ergebnisse die Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen bei beiden Nachweismethoden auf etwa 60% der parentalen Kultur schätzen.

Gezielte Anreicherung von Subklonen bei Fall BN035 und BN046

Die personalisierte Analyse an Fall GNV019 hat gezeigt, dass anhand der pharmakologischen Profile von Subklonen Vorhersagen über deren gezielte Anreicherung *in vitro* getroffen werden können. Um zu überprüfen, ob das beschriebene Vorgehen auch bei anderen Fällen des Glioblastoms erfolgreich

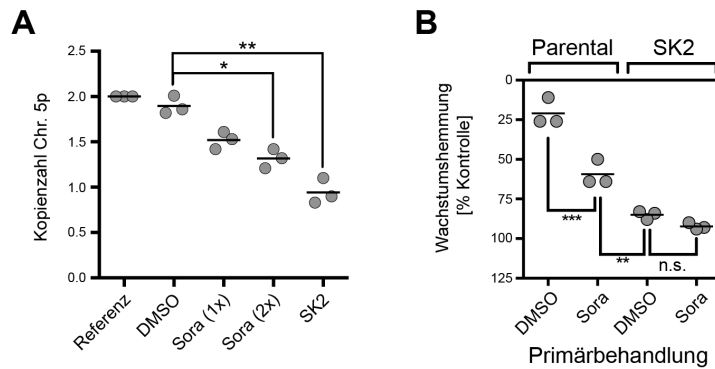


Abbildung 5.16: Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen *in vitro*. (A) Quantifizierung der Kopienzahl der Chromosomenregion 5q14.1–q22.1 mittels RTQ-PCR. Normalisierung der Werte anhand von gesunder humaner Leukozyten-DNA (Referenz). Behandlung der parentalen Kultur mit 0,02 % DMSO oder 1–2 Behandlungszyklen (jeweils 5-tägig) mit 4 μ M Sorafenib (Sora, 3 unabhängige Experimente). (B) Bestimmung der Wachstumsinhibition der Sorafenib- oder DMSO-vorbehandelten parentalen Kultur oder SK2 (4 μ M / 0,02 %) nach sekundärer Behandlung mit 1 μ M Cantharidin (3 unabhängige Experimente). *One-way*-ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

angewendet werden kann, wurde im Anschluss zusätzlich eine analoge Serie von Experimenten an den Zellkulturen von BN035 und BN046 durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Daten der genetischen Charakterisierung (siehe Abbildung 5.2) verwendet, um bei beiden Fällen Subklone mit spezifischen genetischen Aberrationen zu identifizieren. BN035 2-F02 zeigte als einziger der untersuchten BN035-Subklone eine Deletion auf Chr. 22. Diese wurde durch eine verringerte MLPA-Ratio der Gene *BID*, *NF2* und *WNT7B* repräsentiert (siehe Abbildung A.3A). Anhand von Fall BN046 konnten mit BN046 3-G10 und 4-F02 zwei Subklone identifiziert werden, die eine spezifische homozygote Deletion des Tumorsuppressorgens *CDKN2C* aufwiesen (siehe Abbildung A.4A).

Im nächsten Schritt wurden die bereits erhobenen pharmakologischen Profile der 20 Glioblastom-relevanten Substanzen (siehe Abbildung 5.3) verwendet, um geeignete Wirkstoffe für die gezielte Selektion von Subklonen zu identifizieren. BN035 2-F02 zeigte im Vergleich zu den anderen BN035-Subklonen eine höhere Sensitivität gegenüber Bortezomib und eine höhere Resistenz gegenüber Lonafarnib in Kombination mit TMZ (siehe Abbildung A.3B). BN046 3-G10 und 4-F02 zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Etoposide in Kombination mit TMZ und gegenüber 17-AAG (siehe Abbildung A.4B).

Wie bereits zuvor am Beispiel von GNV019 demonstriert, wurde im Anschluss die Relevanz des unterschiedlichen Ansprechverhaltens der Subklone

im polyklonalen Umfeld untersucht. In Ko-Kultur-Experimenten an BN035 konnte die Vorhersage bestätigt werden, dass der Anteil von BN035 2-F02 in der heterogenen Kultur durch die Behandlung mit Lonafarnib + TMZ und durch Bortezomib gezielt beeinflusst werden kann. Die Zugabe von $8 \mu\text{M}$ Lonafarnib + $50 \mu\text{M}$ TMZ führte zu einer Anreicherung und die Exposition gegenüber 400 pM Bortezomib zu einer Verminderung des Anteils von BN035 2-F02 innerhalb der Ko-Kultur (siehe Abbildungen A.3C & D). Auch bei Fall BN046 konnte solch eine gezielte Anreicherung von Subklonen gezeigt werden. Durch die Behandlung der Ko-Kultur mit $10 \mu\text{M}$ Etoposide + $50 \mu\text{M}$ TMZ oder mit $4 \mu\text{M}$ 17-AAG konnte der Anteil der Subklone BN046 3-G10 und 4-F02 in der Ko-Kultur erhöht werden (siehe Abbildungen A.4C & D).

Abschließend wurde anhand von BN035 und BN046 untersucht, ob sich der Anteil der oben genannten Subklone bzw. ähnlicher Zellen auch innerhalb der parentalen Kultur gezielt beeinflussen lässt. Wie zuvor bei SK2 am Fall GNV019 gezeigt, wurden dafür die erwarteten pharmakologischen Selektionseffekte mit Hilfe der Subklon-spezifischen genetischen Aberrationen verfolgt (siehe Abbildungen A.3E & A.4E). Der Nachweis einer veränderten Kopienzahl der Chr. 22-Gene *BID* & *NF2* (BN035) und von *CDKN2C* (BN046) wurde mittels RTQ-PCR durchgeführt. In Übereinstimmung mit den MLPA-Vordaten (siehe Abbildung A.3A) konnte bei der unbehandelten parentalen BN035-Kultur für Chr. 22 keine Aberration der als normal zu betrachtenden Kopienzahl von 2 festgestellt werden (siehe Abbildung A.3F). Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass der Anteil von BN035 2-F02-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen Kultur vergleichsweise gering ist, da ein hoher Anteil dieser Zellen zu einer geringeren Kopienzahl der Chr. 22-Gene führen würde. Vor diesem Hintergrund konnte mit der hier verwendeten Methode keine Verminderung des Anteils 2-F02-ähnlicher Zellen in der parentalen Kultur nach der Behandlung mit Bortezomib nachgewiesen werden (Kopienzahl $2,04 \pm 0,12$ gegen $1,997 \pm 0,16$, $p = 0,7619$). Demgegenüber konnte die Resistenz von 2-F02-ähnlichen Zellen gegenüber Lonafarnib in Kombination mit TMZ dazu verwendet werden, den Anteil dieser Zellen in der parentalen BN035-Kultur signifikant zu erhöhen (Kopienzahl $1,764 \pm 0,1$, $p = 0,0119$, siehe Abbildung A.3F).

Ähnlich wie bei Fall BN035 lässt sich für BN046 anhand der *CDKN2C*-Kopienzahl ebenfalls die Annahme ableiten, dass die BN046 3-G10- und 4-F02-

ähnlichen Zellen eine Minderheit innerhalb der parentalen Kultur darstellen (siehe Abbildungen A.4A & A.4F). Die Resistenz von 3-G10- und 4-F02-ähnlichen Zellen gegenüber Etoposide in Kombination mit TMZ oder gegenüber 17-AAG wurde dazu genutzt, diese Zellen in der BN046-Kultur anzureichern. Die erfolgreiche, jedoch nicht statistisch signifikante Anreicherung von BN046 3-G10 und 4-F02 spiegelt sich durch eine verringerte *CDKN2C*-Kopienzahl nach der Behandlung mit mit Etoposide + TMZ (Kopienzahl $0,36 \pm 0,04$ gegen $0,286 \pm 0,08$, $p = 0,2335$) und 17-AAG (Kopienzahl $0,26 \pm 0,02$, $p = 0,1065$) wieder (siehe Abbildung A.4F).

Die hier durchgeführten Versuche an den parentalen Kulturen von GNV019, BN035 und BN046 unterstützen die aufgestellte Hypothese, dass die Profilierung der pharmakologischen Resistenz an isolierten Subklonen dazu verwendet werden kann, Vorhersagen über Veränderungen der Tumor-Komposition in Abhängigkeit von der angewandten Behandlung aufzustellen. Dies konnte anhand der Selektion von Subklonen bzw. Zellen, die den bekannten Subklonen ähnlich sind, unter definierten Zellkultur-Bedingungen gezeigt werden.

5.2.5 Vorhersagen über polyklonale Dynamik *in vivo*

Im Folgenden wurde das Vorgehen zur Selektion der GNV019-Subklone in einem orthotopen Xenograft-Modell überprüft, um u. a. Einflüsse durch die Umgebung des Tumors besser berücksichtigen zu können (siehe Unterabschnitt 1.1.7). Immundefizienten SCID Beige-Mäusen wurden dazu 10^5 Zellen der parentalen Kultur in den frontalen Cortex transplantiert und nach 42 Tagen, als sich erfahrungsgemäß Tumoren mit Glioblastom-Charakteristika entwickelt hatten (siehe Abbildung 5.5), wurde mit der intraperitonealen Applikation von Thioguanine, Sorafenib oder den entsprechenden Lösungsmitteln NaOH und Kolliphor/EtOH begonnen. Der Selektionsnachweis erfolgte wie schon in Unterabschnitt 5.2.4 beschrieben über die Quantifizierung von multinukleären Zellen (hier vRZ) oder der Kopienzahl der SK2-spezifischen Deletion auf Chr. 5q14.1–q22.1.

Versuchstiere, die mit Lösungsmitteln behandelt wurden, zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 60,5 Tagen (jeweils $n = 3$, siehe Abbildung 5.17A). Die Anwendung von Thioguanine wurde aufgrund von beschriebenen myeloto-

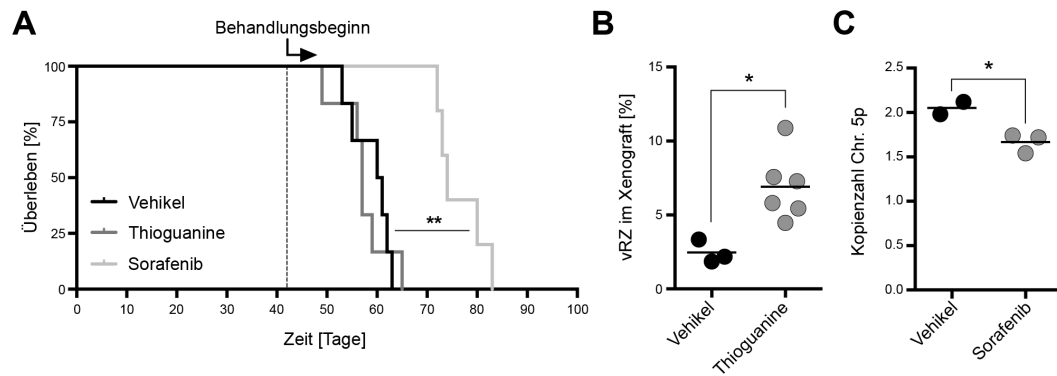


Abbildung 5.17: Anreicherung von GNV019-Subklonen *in vivo*. (A) Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeiten von Versuchstieren nach Xenotransplantation mit GNV019-Zellen und Behandlung mit Thioguanine (3-mal 10 mg/kg, n = 6), NaOH (0,02 M, n = 3), Sorafenib (100 mg/kg, n = 5) oder Kolliphor/EtOH (12,5%/12,5%, 75% ddH₂O, n = 3). Die vertikale gestrichelte Linie markiert den Behandlungsbeginn an Tag 42. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven der Lösungsmittelkontrollen (NaOH und Kolliphor/EtOH) in der Darstellung kombiniert, Signifikanzniveaus wurden für NaOH gegen Thioguanine und Kolliphor/EtOH gegen Sorafenib berechnet. (B) Geblindete Quantifizierung der vRZ in Versuchstieren, die mit NaOH (n = 3) oder Thioguanine (n = 6) behandelt wurden. (C) Quantifizierung der Kopienzahl von Chr. 5q14.1–q22.1 mittels RTQ-PCR an frisch mikrodissezierten Xenotransplantaten von Versuchstieren, die mit Kolliphor/EtOH (n = 2 verwertbare Proben) oder Sorafenib (n = 3 verwertbare Proben) behandelt wurden. Mantel-Cox-Test (A) und ungepaarter t-Test unter Annahme gleicher Varianzen (B und C), Signifikanzniveaus: *p < 0,05; **p < 0,01.

xischen Nebenwirkungen auf drei Injektionen beschränkt (Adams & Bowman 1963) und führte zu keiner Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens (57 Tage). Dennoch ergab die anschließende histologische Auswertung der Xenotransplantate einen signifikanten Anstieg der vRZ-Frequenz von $2,46 \pm 0,78\%$ bei Kontrolltieren auf $6,91 \pm 2,27\%$ nach der Behandlung mit Thioguanine (2,8-fach, $p = 0,0149$, siehe Abbildung 5.17B). Anders als bei Thioguanine, führte die Verabreichung von Sorafenib (17 Injektionen, Siegelin et al. 2010) zu einem signifikant verlängerten medianen Gesamtüberleben der Versuchstiere (74 Tage, $p = 0,0042$). Die anschließende Analyse der Kopienzahl von Chr. 5q14.1–q22.1 an mikrodissezierten Tumoren der Versuchstiere ergab einen signifikanten Abfall von $2,03 \pm 0,05$ bei den Kontrolltieren auf $1,83 \pm 0,06$ bei Sorafenib-behandelten Tieren ($p = 0,029$, siehe Abbildung 5.17C).

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Vorhersagen von polyklonaler Dynamik auch in einem *in vivo*-Modell anwendbar sind. Die systemische Behandlung mit Thioguanine führte zu einer Erhöhung der vRZ-Frequenz innerhalb der Tumoren, was auf eine Selektion von SK1/3/6-ähnlichen Zellen hindeutet. Gleichzeitig konnten auch die Befunde zur Selektion von SK2-ähnlichen Zellen

durch die Behandlung mit Sorafenib vom Zellkulturmodell auf das Xenograft-Modell übertragen werden. Sorafenib bewirkte ein erhöhtes Vorkommen der SK2-spezifischen Deletion auf Chr. 5q14.1–q22.1, was auf eine gesteigerte Frequenz von SK2-ähnlichen Zellen innerhalb des Tumors hindeutet.

Zusammengefasst konnte hier am Beispiel des Glioblastoms ein Vorgehen gezeigt werden, wie sich funktionelle Konsequenzen von intratumoraler Heterogenität untersuchen lassen können. Verschiedene Subklone eines Tumors konnten in Zellkultur stabil expandiert werden, um ihre genetischen und pharmakologischen Profile zu charakterisieren. Anhand der Pharmaprofile konnten Vorhersagen darüber getroffen werden, wie sich die zelluläre Komposition von heterogenen Tumoren *in vitro* und *in vivo* durch den Einfluss von ausgewählten Wirkstoffen verändern.

6. Diskussion

In diesem Kapitel werden die in dieser Studie erhobenen Daten zur intratumoralen Heterogenität im Glioblastom in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet und die Relevanz der über die Biologie dieser Erkrankung hinzugekommenen Erkenntnisse diskutiert.

6.1 Glioblastom – Viele Tumoren in einem?

Die gegenwärtige molekularbiologische Diagnostik an Tumorbiopsien ermöglicht es, Glioblastom-Patienten in homogenere Gruppen zu unterteilen, damit präzisere Aussagen über deren Prognose oder Therapieoptionen getroffen werden können. Dafür konnten Biomarker etabliert werden, wie z. B. der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors oder die Einteilung in eine „proneurale“, „neurale“, „klassische“ bzw. „mesenchymale“ Subklasse anhand des Genexpressionsprofils des Tumors (siehe Unterabschnitt 1.2.1). Darüber hinaus konnten häufig vorkommende Veränderungen des Erbguts bei Tumorzellen identifiziert werden, die Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Behandlung von einer Auswahl von Patienten darstellen. Dazu gehören u. a. die Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFRA und EGFR bzw. dessen mutierte Variante EGFRvIII (siehe Unterabschnitt 1.1.5).

Die Heterogenität des Glioblastoms wurde bisher vorwiegend anhand des Vergleichs von Tumoren verschiedener Patienten charakterisiert, ohne dabei die zelluläre Komposition individueller Tumoren zu berücksichtigen. Die Beobachtung, dass innerhalb eines einzelnen Tumors Subklone koexistieren, die fokale Amplifikationen unterschiedlicher Therapie-relevanter Rezeptor-Tyrosinkinasen aufweisen (Little et al. 2012; Snuderl et al. 2011), lenkte viel Aufmerksamkeit auf die möglichen Konsequenzen der intratumoralen Heterogenität. In einem

Begleitartikel zu der Studie von Snuderl et al. wurde die Befürchtung formuliert, dass man angesichts der Diversität von Subklonen „vielen Tumoren in einem“ gegenüberstehe und daraus gewaltige Anforderungen an die Diagnostik und Behandlung des Glioblastoms erwachsen könnten (Ene & Fine 2011).

Bisher ist erst wenig darüber bekannt, wie einzelne Subklone eines Tumors überhaupt auf diverse Chemotherapeutika ansprechen, wie stark intratumorale Unterschiede im Vergleich zu den bisher besser erforschten intertumoralen Unterschieden ausgeprägt sind und welche Relevanz diese Unterschiede für den Patienten besitzen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sollen dabei helfen, die Konsequenzen, die aus der klonalen Diversität beim Glioblastom entstehen, in Hinblick auf die chemotherapeutische Behandlung besser bewerten zu können.

6.1.1 Bewertung inter- und intratumoraler Diversität

Der Vergleich der intratumoralen Heterogenität mit der Präsenz von „vielen Tumoren in einem“ stellt anschaulich dar, dass Unterschiede, die bislang nur zwischen Glioblastomen verschiedener Patienten wahrgenommen wurden, auch bei verschiedenen Subklonen innerhalb eines Glioblastoms registriert werden können. Wie schon in Abschnitt 5.2 beschrieben, war es nicht der Schwerpunkt dieser Arbeit, das gesamte Ausmaß der intratumoralen Heterogenität zu erfassen, sondern deren Konsequenzen zu untersuchen. Jedoch wurden in dieser und anderen Studien neue Erkenntnisse zu Unterschieden hinsichtlich genetischer Aberrationen, des pharmakologischen Ansprechens und der Genexpression von Subklonen verschiedener Glioblastome gewonnen. Diese werden im Folgenden herangezogen, um eine Bewertung des bisher bekannten Ausmaßes von inter- und intratumoraler Heterogenität vorzunehmen.

Auf den Ebenen genetischer und epigenetischer Veränderungen (siehe Abbildung 5.2, Meyer et al. 2015), des pharmakologischen Ansprechens (siehe Abbildung 5.3) und der Genexpression (Meyer et al. 2015; Patel et al. 2014) konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede zwischen Subklonen verschiedener Glioblastome zumeist stärker ausgeprägt sind als die Unterschiede zwischen Subklonen eines Glioblastoms. Das bedeutet aber nicht, dass die intratumorale Diversität zu vernachlässigen sei, da viele dieser Unterschiede Therapie-relevante Biomarker, wie z. B. den Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors, molekula-

re Zielstrukturen, wie z. B. EGFR, PDGFRA oder MET, und die Zugehörigkeit zu einer bestimmten molekularen Subklasse betreffen können (siehe Abbildung 5.2, Meyer et al. 2015; Patel et al. 2014). Es ist naheliegend, dass dadurch ein Einfluss auf die allgemeine Biologie und speziell die pharmakologische Resistenz von Subklonen entsteht, der mit unmittelbaren Konsequenzen für die Behandlung der Erkrankung einhergeht.

6.1.2 Therapeutische Relevanz

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der pharmakologischen Resistenz von Subklonen aus 5 verschiedenen Tumoren hat gezeigt, dass eine Gruppierung anhand der 20 ausgewählten Substanzen, die diversen Wirkmechanismen folgen, größtenteils interindividuelle Unterschiede sichtbar macht. Betrachtet man aber das Spektrum der gemessenen pharmakologischen Resistenzen zwischen Subklonen eines Tumors, lässt sich bereits eine beachtliche Größenordnung feststellen, wenn weniger als 10 Subklone pro Patient untersucht werden. Im Durchschnitt aller 5 untersuchten Fälle konnte ein 2,32-facher Unterschied aus dem Median der Wirksamkeit zwischen dem sensitivsten und dem resistentesten Subklon eines Falls gegenüber allen Substanzen ermittelt werden (siehe Tabelle A.10). Diese Daten legen nahe, dass eine monotherapeutische Behandlungs-Strategie wahrscheinlich nicht das Wachstum aller Subklone gleichermaßen hemmen wird, was sich in einer Veränderung der klonalen Komposition des Tumors widerspiegeln müsste. Da sich keiner der untersuchten Subklone eines Patienten als besonders resistent gegenüber allen getesteten Substanzen erwiesen hat (siehe Tabelle A.13), könnte die Behandlung mit einer Kombination von Chemotherapeutika – unabhängig von möglichen synergistischen Effekten der Substanzen – die Wirksamkeit auf einen größeren Anteil von Subklonen ausdehnen und somit den gesamten Tumor effektiver behandeln.

Therapie gegen genetisch definierte Subpopulationen

Die Möglichkeiten, anhand der Tumor-Diagnostik Vorhersagen darüber zu treffen, welche Zellen auf eine bestimmte Therapie ansprechen, sind beim Glioblastom bisher sehr beschränkt. Bis jetzt konnte nur in wenigen klinischen Studien dargestellt werden, dass eine gezielte Behandlung wirkungsvoll gegen

spezifische Subpopulationen des Tumors sein kann. In einer klein angelegten klinischen Studie, in der Patienten entlang der Standardtherapie behandelt und zusätzlich gegen eine mutierte Variante des EGF-Rezeptors (EGFRvIII) vakziniert wurden, konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Patienten mit EGFRvIII-exprimierenden Zellen von 100% vor der Behandlung auf 12% zum Zeitpunkt des Rezidivs gesunken war (Sampson et al. 2010). Die zielgerichtete Behandlung zeigte demnach eine gute Wirksamkeit gegenüber EGFRvIII-exprimierenden Zellen, was sich auch in einer erhöhten mittleren Überlebenszeit von 26 Monaten (gegenüber 15 Monaten im Kontrollarm) ausdrückte, die jedoch in der groß angelegten Folgestudie ACT IV der Firma Celldex Therapeutics nicht bestätigt werden konnte (Celldex Therapeutics 2016). Auf der anderen Seite machen die Studien aber auch deutlich, dass gleichzeitig auch wirksame Therapien gegen die Subklone gefunden werden müssen, die das Zielmolekül nicht exprimieren und in diesem Szenario voraussichtlich für die Entstehung der Rezidive der meisten Patienten verantwortlich waren.

Die Erfahrung aus der vorliegenden Arbeit legt nahe, dass eine Behandlung, die nur gegenüber einzelnen Subklonen wirksam ist, fortlaufende Biopsien, Diagnostik und ein breites Spektrum an wirksamen zielgerichteten Therapien voraussetzt (Bedard et al. 2013; Huse & Aldape 2014; McGranahan & Swanton 2015; Watts 2015). Dieses Vorgehen würde einer Behandlung von „viele Tumoren in einem“ entsprechen, aber nach heutigen Gesichtspunkten wäre solch eine Subklon-orientierte Behandlungsstrategie nur mit einer begrenzten Anzahl von verschiedenen koexistierenden Subklonen durchführbar (Ene & Fine 2011).

Identifikation und Therapie gegen ubiquitäre Zielstrukturen

Eine alternative therapeutische Strategie, bei der die Gemeinsamkeiten von Subklonen vordergründig sind, stellt die Behandlung des Tumors durch eine Modulation ubiquitärer Zielmoleküle dar, die für möglichst alle Tumorzellen essenziell sind. Studien zur phylogenetischen Rekonstruktion der Tumor-Evolution beim niedriggradigen Gliom (Johnson et al. 2014; Suzuki et al. 2015) sowie dem Pankreaskarzinom (Yachida et al. 2010), dem Nierenzellkarzinom (Gerlinger et al. 2012) und dem Bronchialkarzinom (de Bruin et al. 2014; Zhang et al. 2014) haben gezeigt, dass verschiedene Tumorzellen eines Patienten häufig einen Satz allgegenwärtiger genetischer Veränderungen teilen, welche die Entstehung

des Tumors wahrscheinlich initial vorangetrieben haben (Yap et al. 2012). Die weite Verbreitung dieser Mutationen entlang des Tumors macht sie prinzipiell zu einem äußerst geeigneten therapeutischen Ziel, um der Heterogenität der Subklone entgegenzutreten. Bedingung für einen erfolgreichen Einsatz ist allerdings die fortbestehende Abhängigkeit von einer genetischen Veränderung bei allen Subklonen (Fisher et al. 2013). In diesem Szenario kann die funktionelle Analyse von Subklonen beispielsweise dabei helfen, die Mechanismen der Aufhebung von Abhängigkeiten aufzudecken.

Für das Glioblastom gibt es bisher keine vergleichbar ausführlichen Daten über die Verteilung treibender Veränderungen unter einzelnen Zellen eines Tumors und über die Reihenfolge ihrer Akquisition. Exomweite Sequenzierungsdaten verschiedener Tumorregionen in Gliomen weisen darauf hin, dass Mutationen von *TP53* und/oder *IDH1* häufiger als andere Mutationen in nahezu allen Tumorzellen präsent sind (Kim et al. 2015a; Suzuki et al. 2015). Die Erkenntnisse über Tumor-treibende genetische Veränderungen im Glioblastom, die anhand intertumoraler Vergleiche identifiziert wurden (siehe Unterabschnitt 1.1.5) und therapeutisch zugänglich sind, konnten bislang nicht für die Entwicklung neuer Therapieregime umgesetzt werden, die der Anwendung des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid in kontrollierten randomisierten klinischen Studien überlegen waren (Cloughesy et al. 2014; Gilbert et al. 2014a; Tanaka et al. 2013). Zum jetzigen Zeitpunkt scheint einer Strategie, die auf die Behandlung gemeinsamer genetischer Veränderungen abzielt, um möglichst alle Subklone gleichzeitig zu bekämpfen, noch nicht umsetzbar zu sein. Doch durch die schnell fortschreitende Anwendbarkeit genomweiter Sequenzierung von hunderten Einzelzellen aus verschiedenen Tumorregionen wird in naher Zukunft deutlicher herausgestellt werden können, wie genetische Veränderungen von Subklonen innerhalb des Glioblastoms verteilt sind und sich damit für einen solchen Ansatz eignen. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass ein Vorgehen gegen therapeutisch bisher unmittelbar unzugänglichen Zielmolekülen, wie z. B. mutierten Varianten von p53 oder IDH1, pharmakologisch (Bayer 2016; England et al. 2013; Rohle et al. 2013), immunologisch (Schumacher et al. 2014; Vermeij et al. 2011) oder durch gentherapeutische Ansätze (Okura et al. 2014) in Zukunft verbessert werden kann.

Therapie gegen funktionell definierte Subpopulationen

Durch die ausbleibenden Erfolge der zielgerichteten Therapie ist die Anwendung konventioneller Chemotherapie, die sich weitgehend gegen alle proliferierenden Zellen des Körpers richtet, auf absehbare Zeit die Therapieempfehlung für Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom (siehe Unterabschnitt 1.1.6).

Für die Entdeckung neuer wirksamer antineoplastischer Substanzen oder einer wirksamen Kombination von Substanzen bedarf es präklinischer funktioneller Studien, die auch das unterschiedliche Verhalten verschiedener Zellen in einem Tumor mitberücksichtigen (Bonavia et al. 2011; Francis et al. 2014; Janiszewska et al. 2014; Zhao et al. 2014a). In Abschnitt 5.1 konnte gezeigt werden, dass anhand von isolierten Subklonen Studien zur Untersuchung des Spektrums der genetischen und funktionellen intratumoralen Diversität durchgeführt werden können. Die hier angewandten Methoden lassen es zu, die Untersuchungen auch in einem deutlich größeren Maßstab auszuführen, damit das Ausmaß der Heterogenität zwischen Subklonen mit einer größeren Auflösung abgebildet werden kann und so die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass auch sehr seltene Subklone mitberücksichtigt werden. Selbst bei der Betrachtung der relativ geringen Anzahl von 33 Subklonen, die mit 20 verschiedenen Substanzen behandelt wurden, stellte sich heraus, dass eine beträchtliche intratumorale Diversität im Ansprechen gegenüber Chemotherapeutika – auch herkömmlichen wie z. B. Temozolomid oder Cisplatin und Etoposide in Kombination mit Temozolomid – vorliegt (siehe Abbildung 5.3 und Tabellen A.4 & A.10). Somit erlaubt das hier angewandte Vorgehen die Gewinnung von Erkenntnissen über die funktionellen Konsequenzen der intratumoralen Heterogenität, die anhand von rein deskriptiven Analysen bisher nicht erlangt werden können.

Durch die funktionelle Charakterisierung von isolierten Subklonen eröffnet sich die Möglichkeit, diese anhand diverser Verhaltensmustern zu gruppieren oder voneinander zu separieren, um somit einzelne Bestandteile des Tumors mit unterschiedlichen Funktionen getrennt voneinander untersuchen zu können (siehe Unterabschnitt 5.2.2). In therapeutischer Hinsicht könnte die Identifizierung von Subklonen mit Krankheits-relevantem malignen Verhalten, wie z. B. einer erhöhten Infiltration, Behandlungs-Resistenz, Angiogenese-Induktion oder Wachstums-Geschwindigkeit, wertvolle Erkenntnisse liefern. Der Einsatz einer evidenzbasierten Therapie gegen besonders bösartige Subklone könnte so

eine Maßnahme darstellen, um die Überlebenszeit von Patienten zu verlängern (Meyer et al. 2015). Darüber hinaus könnten vorteilhafte, unvorhergesehene oder synthetisch letal wirkende Substanz-Kombinationen durch Anwendung empirischer Untersuchungen im Hochdurchsatzverfahren an isolierten Subklonen identifiziert werden (Ashworth et al. 2011; Lee et al. 2012; Zhao et al. 2014a). Bedingung für die Umsetzung der genannten Strategien für die weitere Untersuchung im Tumormodell ist es, dass sich die Subklone, die isoliert voneinander analysiert wurden, auch im Umfeld des heterogenen Tumors entsprechend den Vorhersagen verhalten. Aus diesem Anlass wurde in dieser Studie das Konzept der Vorhersagbarkeit am Beispiel einer personalisierten Analyse der Therapie-assoziierten Veränderungen der intratumoralen Komposition des Falls GNV019 überprüft (siehe Unterabschnitte 5.2.4 & 5.2.5).

6.2 Homogenität separierter Tumorzellen

Die zelluläre Heterogenität innerhalb eines Tumors kann eine Vielzahl von verschiedenen Merkmalen, wie z. B. der Genetik, Genexpression oder Epigenetik, gleichzeitig betreffen. In einem idealen Versuchsansatz stünden Informationen zu all diesen Merkmalen von jeder einzelnen Zelle des Tumors zu jedem Zeitpunkt bereit, um sie mit funktionellen Daten zu verknüpfen.

Bisher beschränken sich die experimentellen Möglichkeiten der funktionellen Analyse von intratumoraler Heterogenität zumeist darauf, Tumorzellen anhand eines oder weniger Merkmale, wie z. B. der Expressionsstärke eines bestimmten Zelloberflächenmarkers, voneinander zu separieren. Das ermöglicht die Untersuchung von homogeneren Gruppen in Bezug auf das ausgewählte Merkmal, die jedoch in Hinblick auf andere Merkmale, wie z. B. dem Profil genetischer Veränderungen, nicht homogen sein müssen. Durch die vergleichende funktionelle Analyse dieser Gruppen soll offengelegt werden, ob anhand der gewählten Separationskriterien dennoch relevante biologische Funktionen definierter Gruppen aufgedeckt werden können (Altschuler & Wu 2010).

6.2.1 Separation intratumoralen Heterogenität für funktionelle Analysen

Um die verschiedenen Merkmale der intratumoralen Heterogenität zu berücksichtigen, können unterschiedliche Strategien der Separation von Tumorzellen für die funktionelle Analyse angewendet werden. Darunter fallen z. B. die Trennung von Tumorzellen anhand definierter phänotypischer Kriterien oder die Isolation genetisch distinkter zellulärer Entitäten (Subklone).

Isolation und Analyse phänotypisch distinkter Subpopulationen

Die intratumorale phänotypische Diversität des Glioblastoms lässt sich auf verschiedenen Ebenen betrachten. So können Tumorzellen u. a. anhand von Unterschieden in ihrer Genexpression (Lathia et al. 2015), ihrem Migrationsverhalten (Demuth et al. 2008) oder ihrer Proliferationsrate (Deleyrolle et al. 2011b) voneinander getrennt und charakterisiert werden.

Bisher basieren die meisten Studien zur funktionellen Charakterisierung von Subpopulationen auf Analysen von Tumorzellen, die anhand unterschiedlicher Expressionslevel von ausgewählten Zelloberflächenmarkern voneinander separiert wurden. Dabei gelang es, wesentliche Unterschiede zwischen Subpopulationen in Hinblick auf ihr Potenzial, Tumoren im Xenograft-Modell zu initiieren, sich selbst zu erneuern, in neuronale und gliale Zelltypen zu differenzieren und sich resistent gegenüber Therapie zu verhalten, festzustellen (u. a. Bao et al. 2006, 2008; Day et al. 2013; Lathia et al. 2010; Singh et al. 2004; Son et al. 2009).

Während eines längerfristigen Beobachtungszeitraums wirkt die dynamische Regulation der Genexpression der Homogenität von separierten Zellen allerdings entgegen. So konnte beim Glioblastom gezeigt werden, dass sowohl CD133⁺- als auch CD133⁻-Subpopulationen während ihrer Expansion *in vitro* in der Lage waren, CD133⁺- und CD133⁻-Tochterzellen hervorzubringen (Chen et al. 2010). In Studien am malignen Melanom konnte die Wiederherstellung von phänotypischer Heterogenität in separierten Subpopulationen anhand verschiedener Marker *in vivo* gezeigt werden (Quintana et al. 2010; Shackleton et al. 2009). Aufgrund der dynamischen Regulation von phänotypischen Merkmalen wurde in dieser Studie die Separation von zellulären Entitäten bevorzugt.

Isolation und Analyse genetisch distinkter zellulärer Entitäten

Das Ausmaß der genetischen Heterogenität eines Tumors wird durch die Anzahl von genetisch distinkten koexistierenden Subklonen wiedergegeben. Isolierte Subklone vererben ihre genetischen Merkmale während der Expansion an ihre Tochterzellen weiter und können durch den Einsatz geeigneter Modellsysteme über einen längeren Zeitraum untersucht werden (siehe Unterabschnitt 1.1.7). Die Abkömmlinge können sich jedoch trotz ihrer einheitlichen genetischen Identität in Hinsicht auf phänotypische und epigenetische Merkmale diversifizieren (Altschuler & Wu 2010). Eine Studie am kolorektalen Karzinom konnte diesen Vorgang eindrucksvoll nachweisen, insofern sich die phänotypische Heterogenität des ursprünglichen Tumors auch nach Xenotransplantation von einzelnen Tumorzellen des Patienten wieder auszubilden vermochte (Dalerba et al. 2011).

Erste beschreibende und funktionelle Untersuchungen zur intratumoralen Heterogenität von *in vitro* isolierten Subklonen wurden bereits Anfang der 1980er Jahre am Glioblastom durchgeführt. Dabei konnten intratumorale Unterschiede anhand der Karyotypen, der Zellmorphologien, der Genexpression, der Proliferationsraten und der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika festgestellt werden (Shapiro et al. 1981; Wikstrand et al. 1983; Yung et al. 1982).

Diese Befunde konnten in dieser und in anderen Studien unter Anwendung von moderneren Verfahren bestätigt werden (Galli et al. 2004; Meyer et al. 2015; Soda et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden von 5 primären Glioblastom-Zellkulturen insgesamt 81 Subklone isoliert (siehe Tabelle 5.2) und ihr monoklonaler Ursprung verifiziert (siehe Unterabschnitt 4.1.4). Mehrere der *in vitro* expandierten Subklone wurden für weitere Analysen ausgewählt (siehe Tabelle A.2) und zeigten dabei intratumorale Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie (siehe Abbildung A.6), ihrer DNA-Kopienzahl-Veränderungen (siehe Abbildung 5.2) sowie ihrer Chemoresistenz gegenüber 20 Glioblastom-relevanten Substanzen (siehe Abbildung 5.3). In einer tiefer gehenden vergleichenden Analyse der 5 Subklone des Falls GNV019 konnten zudem Unterschiede und Gemeinsamkeiten im tumorigenen Potenzial und der morphologischen Erscheinung des Tumors im Xenograft-Modell (siehe Abbildung 5.6) sowie in der zellulären Plastizität *in vitro* (siehe Abbildung 5.7) und der genomweiten Genexpression (siehe Abbildung 5.8A) demonstriert werden.

Dabei zeigte sich ein wiederkehrendes Muster von Gemeinsamkeiten zwischen den SK1/3/6 und Unterschieden dieser Subklone gegenüber SK2 und SK7.

Am Beispiel der Präsenz von vielkernigen Riesenzellen (vRZ) des Falls GNV019 lässt sich eingängig veranschaulichen, dass einzelne Merkmale eines Tumors anhand von isolierten Subklonen getrennt voneinander analysiert werden können. Von den untersuchten Subklonen waren ausschließlich die SK1/3/6 imstande, verstärkt vRZ auszubilden, während die SK2/7 dazu nicht befähigt waren (siehe Abbildung 5.6). In Bezug auf ihr Potenzial, vRZ auszubilden, zeigten die analysierten Subklone demnach eine extremere funktionelle Ausprägung als die parentale Kultur, die eine Überlagerung aus dem Verhalten aller Zellen widerspiegelt (Altschuler & Wu 2010). Dieses spezifische Verhalten wurde in dieser Studie dazu verwendet, die Frequenz von SK1/3/6-ähnlichen Zellen über längere Zeiträume in der parentalen Kultur zu verfolgen (siehe Unterabschnitte 5.2.4 & 5.2.5). Darüber hinaus bietet die Separation der Subklone anhand von Merkmalen auch die Möglichkeit, deren Ausprägung mittels mechanistischer Untersuchungen grundlegend zu erforschen.

6.3 Polyklonale Dynamik

Die Prinzipien der Darwin'schen Evolutionstheorie lassen sich auch im Kontext der zellulären Diversität eines Tumors beobachten. Tumorzellen stehen in ständiger Konkurrenz um Raum und Nährstoffe zueinander und die Zellen, die am besten an ihre aktuelle Umgebung angepasst sind, können ihren Anteil an der Population erhöhen. Durch die sich aufgrund von inneren und äußeren Einflüssen permanent ändernden Bedingungen innerhalb von Tumoren kommt es daher im Verlauf der Tumorentwicklung zu einer Dynamik in der zellulären Komposition (siehe Unterabschnitt 1.2.2, Greaves & Maley 2012).

6.3.1 Überwachung der polyklonalen Dynamik

Um ein tieferes Verständnis der Abläufe der zellulären Dynamik zu erlangen, ist es notwendig, Verfahren zu etablieren, mit denen sich die Veränderungen der Tumorkomposition im Patienten und in Modellsystemen verfolgen lassen. In Studien, die sich mit den Auswirkungen von Therapiemaßnahmen auf Tumoren beschäftigen, konnten Veränderungen der zellulären Architektur anhand von

genetischen (siehe Unterabschnitt 5.2.4, Campbell et al. 2008; Ding et al. 2012; Maheswaran et al. 2008; Szerlip et al. 2012) und phänotypischen Merkmalen (siehe Unterabschnitt 5.2.4, Almendro et al. 2014; Shipitsin et al. 2007) nachvollzogen werden.

In Zellkultur- und Xenograft-Modellen lässt sich zudem – unabhängig von der Präsenz spezifischer Merkmale bei Tumorzellen – durch genetische Manipulationen eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig zur Nachverfolgung individuell markieren. So können z. B. spezifische Nukleotidsequenzen (*barcodes*, Bhang et al. 2015), Fluoreszenzeigenschaften (Livet et al. 2007) oder zufällige lentivirale Integrationsstellen (Kreso et al. 2013) in die Zellen eingebracht werden.

6.3.2 Polyklonale Dynamik unter Therapie

Die Auswirkungen von therapeutischen Maßnahmen auf die klonale Architektur von Tumoren lassen sich am Patienten mit Hilfe von Biopsien untersuchen, die vor und während der Behandlung entnommen wurden. Da die Zugänglichkeit zu multiplen Biopsien während des Krankheitsverlaufs bei malignen soliden Tumoren sehr eingeschränkt ist, wurden bisher die meisten Erkenntnisse an hämatopoetischen Tumoren gewonnen (Burrell & Swanton 2014). Die begrenzte Verfügbarkeit von Proben solider Tumoren verdeutlicht den Bedarf an Modellsystemen, an denen die Prozesse der klonalen Selektion nachvollzogen und darüber hinaus auch experimentell modifiziert werden können.

In mehreren Studien, die sich mit der klonalen Zusammensetzung von Biopsien vor und nach der Behandlung befassten, ließen sich verschiedene Modelle der Tumor-Evolution beobachten (Burrell & Swanton 2014). Eines dieser Modelle beschreibt die Existenz von Subklonen mit endogener Therapieresistenz, die im Primärtumor eine Minderheit darstellen, aber nach der Behandlung das Rezidiv dominieren (u. a. Diaz et al. 2012; Maheswaran et al. 2008; Shah et al. 2002; Turke et al. 2010). Dieser Prozess der Selektion von präexistierenden resistenten Subklonen lässt sich auch in Zellkultur- und Xenograft-Modellen nachvollziehen (siehe Abbildungen 5.2.4 & 5.2.5, Bhang et al. 2015; Kreso et al. 2013). Zusätzlich bietet die Untersuchung außerhalb des Patienten eine experimentelle Plattform, um Subklone mit endogener Resistenz gegenüber verschiedenen Therapieansätzen zu identifizieren, zu charakterisieren und die polyklonale Dynamik des Tumors daraufhin gezielt zu beeinflussen.

6.3.3 Vorhersagen zur polyklonalen Dynamik

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Strategie angewendet, bei der zufällig ausgewählte Subklone aus heterogenen Primärkulturen des Glioblastoms isoliert und anschließend funktionell charakterisiert wurden. In einer detaillierten Analyse des Falls GNV019 wurde das unterschiedliche Ansprechen von Subklonen gegenüber 4 ausgewählten Substanzen ausgenutzt, um prospektive Studien über die polyklonale Dynamik durchzuführen (siehe Abbildungen 5.9B & C). In einem ersten Schritt konnte die gezielte Anreicherung markierter Subklone während der Behandlung in Ko-Kultur bestätigt werden (siehe Abbildung 5.11). Anschließend wurden die spezifischen Merkmale der Subklone, die aus der genetischen und funktionellen Charakterisierung hervorgegangen waren (siehe Abbildungen 5.14 & 5.7), dazu verwendet, den Anteil von SK1/3/6- und SK2-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen Kultur zu verfolgen. Abschließend konnte die Dynamik der betrachteten Subklone sowohl in Zellkultur als auch im Xenograft-Modell anhand der vorangegangenen Charakterisierung vorherbestimmt werden (siehe Abbildungen 5.13, 5.16 & 5.17). Untersuchungen an den Zellkulturen der Fälle BN035 und BN046 unterstützten den Befund, dass Vorhersagen zur Therapie-assoziierten polyklonalen Dynamik anhand vergleichender Analysen an Subklonen des Glioblastoms möglich sind (siehe Abbildungen A.3 & A.4).

Die Daten zeigen, dass die Primärtherapie einen deutlichen Einfluss auf die klonale Architektur des Glioblastoms haben kann und dass diese klonalen Selektionsprozesse bei der Behandlung von Tumoren vorab berücksichtigt werden können. Die separate Analyse der Subklone in Hinblick auf ihr Ansprechverhalten gegenüber einer Vielzahl an Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen bietet eine Möglichkeit, diesen Prozess besser vorhersehbar zu machen. Im Glioblastom ist dies von besonderer Relevanz, da die Resektion progredienter Tumoren nur in seltenen Fällen möglich ist (siehe Unterabschnitt 1.1.6). Anhand dieser Strategie könnte die Behandlung der Erkrankung durch die Anwendung einer individuell angepassten konkomitanten oder adjuvanten Kombinationstherapie in Zukunft verbessert werden.

In dieser Studie wurde die Durchführbarkeit eines Konzeptes zur Vorhersage der polyklonalen Dynamik am Fall GNV019 mit Hilfe von 4 unterschiedlich

wirksamen Substanzen gezeigt, die aber eine untergeordnete Bedeutung für die Therapie des Glioblastoms besitzen. Zukünftig soll daher ermittelt werden, ob dieses Konzept auf die Identifizierung von wirksamen Substanzen gegenüber Subklonen übertragen werden kann, die resistent gegenüber häufig angewandten Therapieregimen sind. Anhand von Untersuchungen an individuell gepaarten Proben aus primären und rezidivierten Tumoren könnten die Erkenntnisse aus Modellsystemen mit denen aus im Krankheitsverlauf entnommenen Biopsiematerial abgleichen und somit der Nutzen der Vorhersage von Therapie-assoziiertes polyklonaler Dynamik bewertet werden.

Alternative Strategien

Eine alternative Strategie zur Vorhersage von polyklonaler Dynamik beruht auf der Analyse der genetischen Heterogenität des Tumors und dem Einsatz zielgerichteter Therapeutika gegen verschiedene Subklone mit Tumor-treibenden genetischen Veränderungen. In einer Studie an einem Glioblastom, das aus einem Mosaik von Zellen mit einer *EGFR*-Amplifikation oder einer *PDGFRA + EGFR*-Ko-Amplifikation bestand, konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass die klonale Zusammensetzung der Kultur durch die Anwendung von Zielgen-spezifischen Faktoren willkürlich verändert werden konnte (Szerlip et al. 2012). Die Stimulation von *PDGFRA* durch dessen Liganden *PDGFB* führte zu einer selektiven Anreicherung der Zellen mit *PDGFRA + EGFR*-Ko-Amplifikation. Die Selektion konnte durch die Ergänzung von *PDGFB* mit dem *EGFR*-Inhibitor Gefitinib noch weiter verstärkt werden. Die Stimulation von *EGFR* mit *EGF* führte zu keiner Verschiebung der Verhältnisse, da sowohl die ausschließlich *EGFR*- als auch die ko-amplifizierten Zellen von dem Liganden profitierten. Die Zugabe von *EGF* und dem *PDGFRA*-Inhibitor Imatinib resultierte hingegen in einer Bevorteilung von Zellen, die ausschließlich eine *EGFR*-Amplifikation besaßen.

Bei der von Szerlip et al. beschriebenen Herangehensweise ist es nicht notwendig, Subklone zu isolieren und separat zu charakterisieren, da das Wachstum bzw. Überleben der betrachteten Zellpopulationen durch die Abhängigkeit von ihren genetischen Veränderungen vorherbestimmt ist. Bisher verlief die Anwendung von Inhibitoren gegenüber häufig auftretenden genetischen Veränderungen, u. a. auch von Gefitinib und Imatinib, in klinischen Studien beim Glioblastom enttäuschend, weshalb konventionelle Chemotherapie bei der Be-

handlung bisher unverzichtbar ist (Gilbert et al. 2014a; Wick et al. 2011). Bei anderen Tumorentitäten, wie z. B. dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und der chronisch myeloischen Leukämie, bei denen Ansätze der gezielten Therapie gegen genetische Veränderungen regelmäßig zum Einsatz kommen, könnten verwandte Strategien dazu dienen, erfolgversprechende Kombinationstherapien ausfindig zu machen (Bhang et al. 2015).

6.4 Potenzial und Limitationen

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Funktion und dem Schicksal einzelner Subklone im polyklonalen Umfeld des gesamten Tumors. Im Folgenden soll herausgestellt werden, wie das hier beschriebene Konzept der Subklon-Analyse in Hinblick auf grundlagenwissenschaftlich und translational relevanter Fragestellungen Anwendung finden kann und welche Faktoren sein Potenzial einschränken.

6.4.1 Funktionelle und mechanistische Analysen

Die funktionelle Analyse von separierten Tumor-Subklonen bietet eine *ex vivo*-Plattform, um die mechanistischen Grundlagen von Subklon-spezifischen Eigenschaften besser zu untersuchen. So wäre z. B. der Vergleich von SK1/3/6 und SK2/7 des Falls GNV019 dazu geeignet, den Mechanismus der Entstehung von vielkernigen Riesenzellen (Temme et al. 2010) *in vitro* und *in vivo* noch besser zu verstehen. Eine weitere relevante Fragestellung, die man anhand des Falls GNV019 bearbeiten könnte, wäre z. B. die Untersuchung des unterschiedlich ausgeprägten tumorigenen Potenzials der SK2 und SK1/3/6/7 in Xenograft-Experimenten.

Darüber hinaus könnte der Einsatz funktioneller Analysen von Subklonen dazu verwendet werden, das Verständnis der Mechanismen der Tumor-Evolution zu vergrößern. Durch genetische Untersuchungen lässt sich zwar die Phylogenie einzelner Tumoren beschreiben (siehe Unterabschnitt 1.2.2), aber es bedarf funktioneller Analysen, um erklären zu können, welchen Einfluss der Erwerb einzelner genetischer oder epigenetischer Veränderungen auf die *fitness* von Subklonen ausübt. Aus der in dieser Arbeit durchgeführten niedrigauflösenden Analyse von Kopienzahl-Veränderungen an 5 bis 18 Subklonen pro Fall (siehe

Abbildung 5.2) lassen sich bereits einige interessante Fragestellungen ableiten. So könnte in zukünftigen Studien z. B. die Funktion der Genamplifikationen von *PDGFRA* und *KIT* an Fall BN118 (3 von 18 Subklonen) oder von *EGFR* an Fall BN055 (12 von 16 Subklonen) im intratumoralen Kontext und ohne Einsatz genetischer Manipulationen untersucht werden.

6.4.2 Modellsysteme des Glioblastoms

Der Gebrauch von Modellsystemen ermöglicht es, die Biologie des Glioblastoms außerhalb des Patienten funktionell untersuchen zu können. Jedoch kann ein Tumormodell nicht das gesamte Ausmaß der Komplexität dieser Erkrankung wiedergeben, wie sie im Patienten vorzufinden ist (siehe Unterabschnitt 1.1.7). Im folgenden Unterabschnitt werden daher einige Gesichtspunkte der eingesetzten Modellsysteme diskutiert, die die Übertragbarkeit der darin erzeugten Befunde auf die klinische Anwendung einschränken können.

Erhalt der intratumoralen Heterogenität

Die Überführung von Tumorzellen aus dem Patienten in die Zellkultur setzt deren Anpassung an eine neue Umgebung voraus. Zellen, die unter diesen Bedingungen nicht überleben und expandieren, können nicht dauerhafter Bestandteil der primären Zellkultur sein, was die Untersuchung der klonalen Vielfalt einschränken könnte.

Studien an den konventionellen Nicht-Glioblastom-Zelllinien HCT-116, HeLa, K562 und HEK-293 T konnten zeigen, dass die zelluläre Heterogenität einer Kultur über einen für funktionelle Untersuchungen angemessenen Zeitraum größtenteils erhalten werden kann (Nolan-Stevaux et al. 2013; Porter et al. 2014). In dieser Arbeit lieferte die Präsenz von vRZ in der ursprünglichen Tumorbiopsie und in Xenotransplantaten der parentalen GNV019-Kultur entlang verschiedener Passagen Hinweise auf die Konservierung einzelner Subklone bzw. Subklon-ähnlicher Zellen. Aber es bedarf systematischer Untersuchungen mit Hilfe hochauflösender Verfahren, wie z. B. der genomweiten Sequenzierung (Ding et al. 2012; Navin et al. 2011), um zu erörtern, zu welchem Anteil die klonale Diversität bei der Etablierung und Expansion von primären Zellkulturen bzw. Xenotransplantaten mit den eingesetzten Methoden erhalten werden kann.

Darüber hinaus bietet die individuelle Markierung von Tumorzellen (Bhang et al. 2015; Kreso et al. 2013; Nolan-Stevaux et al. 2013; Porter et al. 2014) die Möglichkeit, die *ex vivo*-Bedingungen von Tumormodellen in gesonderten Studien zu optimieren, um ein besseres Abbild des individuellen Tumors für die Untersuchung der intratumoralen Heterogenität zu schaffen.

Erfassung zellulärer Entitäten

Die hier angewandte Strategie beruht auf der Isolation und Charakterisierung von Subklonen, die zum klonalen Wachstum befähigt sind. Alle anderen Tumorzellen, die als isolierte Einzelzellen nicht stabil expandiert werden können (siehe Tabelle 5.2), sind somit von der individuellen Charakterisierung ausgeschlossen. Darüber hinaus ist es auch notwendig, Erkenntnisse darüber zu sammeln, wie viele verschiedene Subklone in einem Tumor überhaupt koexistieren (siehe Abschnitt 5.2) und ob sich diese Vielfalt auch im Modellsystem darstellen und experimentell bearbeiten lässt.

In einer Studie, die sich mit dem Ausmaß von intratumoraler genetischer Heterogenität in 12 verschiedenen Tumorentitäten beschäftigte, ließen sich in 86 % der untersuchten 1 165 klinischen Tumorproben mindestens zwei koexistierende Subklone nachweisen. Die durchschnittliche Anzahl von koexistierenden Subklonen je Tumor belief sich beim Glioblastom auf etwa 4, was auch dem Durchschnitt aller untersuchten Tumorentitäten entsprach (Andor et al. 2015). Dieser Befund zeigt, dass es wahrscheinlich möglich ist, einen Großteil der klonalen Diversität für *ex vivo*-Studien zu erfassen, auch wenn in der Studie von Andor et al. nur Subklone mit einem Mindestanteil von 10 % der Tumormasse bewertet werden konnten.

Unter den gegebenen Voraussetzungen ist es wahrscheinlich noch nicht möglich, das Verhalten jeder einzelnen zellulären Entität eines Tumors anhand funktioneller Studien vorherzusagen. Die Reaktion aller nicht charakterisierten Zellen offenbart sich jedoch zwangsläufig bei der Validierung von Befunden an der parentalen Kultur und kann so indirekt bewertet werden. Anhand von Fall GNV019 konnte hier gezeigt werden, dass die Analyse von 5 Subklonen ausreichend war, um Vorhersagen zur polyklonalen Dynamik im heterogenen Umfeld der parentalen Kultur *in vitro* und *in vivo* treffen zu können (siehe Unterabschnitte 5.2.4 & 5.2.5).

Verteilung von Wirkstoffen

Funktionelle Untersuchungen in Zellkultur finden unter sehr genau definierten Bedingungen statt. Alle Zellen können so gleichermaßen einem Wirkstoff in einer festgelegten Konzentration zu einem gewählten Zeitpunkt für eine bestimmte Dauer ausgesetzt werden (siehe Abschnitt 4.1). Die Übertragung der erhobenen Befunde auf die Anwendung in Tiermodellen oder im Patienten stellt sich gleichwohl als Herausforderung dar, da dort Prozesse wie die Aufnahme, Ausscheidung, Metabolisierung oder die räumliche und zeitliche Verteilung von Wirkstoffen in einem weniger gut kontrollierten Umfeld ablaufen.

Beim Vergleich der GNV019-Subklone *in vitro* konnten Substanzen identifiziert werden, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eine selektive Wirkung auf bestimmte Subklone zeigten (siehe Unterabschnitt 5.2.3). Der Zusammenhang zwischen der applizierten Konzentration und dem Grad der Anreicherung von Subklonen konnte anhand von Thioguanine am ausführlichsten aufgezeigt werden. Je deutlicher sich die Wirksamkeit von Thioguanine zwischen den Subklonen unterschied, desto größer war auch der Anreicherungsgrad von resistenteren Subklonen in der parentalen Kultur (siehe Abbildungen 5.13B & C). Durch die Anwendung von 10 μ M Thioguanine konnte so in der Zellkultur eine Anreicherung von SK1/3/6-ähnlichen Zellen um den Faktor 5,53–7,68 erreicht werden (siehe Abbildungen 5.13A & D). Im Xenograft-Modell wurde dieser Befund zwar grundsätzlich bestätigt, jedoch war die Anreicherung im Vergleich zur Zellkultur geringer ausgeprägt (Faktor 2,8, siehe Abbildung 5.17). Die Ursachen dafür können vielfältig sein und wurden hier nicht systematisch untersucht. Eine mögliche Erklärung dafür ist aber, dass durch die dreimalige intraperitoneale Applikation von 10 mg/kg Thioguanine, die in Zellkultur bestimmte optimale Konzentration von 10 μ M im Tumor nicht bzw. nicht ausreichend lange erreicht werden konnte (Moore & LePage 1958). Weitere Gründe für die geringere Effizienz könnten z. B. die Akquisition von Resistenzmechanismen, der gewählte Behandlungszeitpunkt, eine eingeschränkte Differenzierung in vRZ oder die Einflussnahme der Tumorumgebung darstellen.

Angesichts der guten Zugänglichkeit von Wirkstoffen und der definierten Bedingungen in Zellkultur ist es wahrscheinlich, dass viele Substanzen mit Subklon-spezifischer Wirksamkeit identifiziert werden, die aufgrund ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften und einer limitierten maximal tolerierten Dosis

im Mausmodell und Patienten keine Anwendung finden können (Kola & Landis 2004). Für translationale Ansätze sollte man sich daher zuerst auf die Untersuchung von Wirkstoffen mit bekannter Pharmakokinetik beschränken.

Die Übertragbarkeit der in Modellsystemen erhobenen Befunde stellt eine große Herausforderung dar, die gesonderter Untersuchungen bedarf. Aber Fortschritte in der Entwicklung verbesserter Modelle für die Xenotransplantation oder Methoden der Zellkultur, die sich in das hier beschriebene Vorgehen zur Vorhersage der polyklonalen Dynamik in Tumoren integrieren lassen, könnten zukünftig zum Abbau von Einschränkungen genutzt werden.

6.4.3 Translationales Potenzial

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob es anhand der individuellen Analyse von separierten Subklonen prinzipiell möglich ist, Therapie-assoziierte Veränderungen der klonalen Komposition eines Tumors vorherzusagen. Die Früherkennung von präexistierenden Tumorzellen mit endogener Therapieresistenz könnte sich für die zukünftige Behandlung von Krebspatienten als vorteilhaft erweisen (Bedard et al. 2013; Diaz et al. 2012; Turke et al. 2010). Trotz der zuvor aufgeführten Einschränkungen durch den Gebrauch von Modellsystemen des Glioblastoms (siehe Unterabschnitt 6.4.2) könnte eine Anpassung der hier beschriebenen Vorgehensweise eine Grundlage für zukünftige klinische Anwendungen darstellen.

Dauer und Skalierung

Nach dem Eingang einer frischen Biopsie eines Glioblastoms könnten die Etablierung einer primären Zellkultur, die Isolation von ca. 20 Subklonen, die genetische Analyse und die Untersuchung der Wirksamkeit von etwa 160 Substanzen innerhalb von 2–3 Monaten abgeschlossen sein. Bei einem mittleren progressionsfreien Überleben von 6,2–7,3 Monaten unter Anwendung der Standardtherapie (Chinot et al. 2014; Gilbert et al. 2014b) könnten die in der personalisierten Analyse erzeugten Daten den meisten Patienten noch vor der Progression zur Verfügung stehen.

Im Umfang wird der Ablauf vorwiegend durch den Aufwand der einzelnen Arbeitsschritte und nicht durch das Tumormodell an sich limitiert. Die Au-

tomatisierung zeitaufwendiger Schritte in Zellkultur könnte daher nicht nur einzelne Prozesse standardisieren, sondern auch den Durchsatz an Subklonen und Substanzen noch um ein Vielfaches erhöhen. So würde die intratumorale Heterogenität des Tumors besser repräsentiert und die Anzahl potenziell einsetzbarer Substanzen deutlich vermehrt werden.

Erweiterung

Das hier beschriebene Vorgehen kann durch die Hinzunahme ergänzender Methoden weiter ausgebaut werden. Durch die individuelle Markierung von einzelnen Zellen, z. B. durch die gentechnische Einführung von *barcodes* (Bhang et al. 2015), lässt sich deren Dynamik im polyklonalen Umfeld mit standardisierten Methoden parallel nachverfolgen, ohne dazu auf die Ausprägung spezifischer Merkmale, wie z. B. die vermehrte Ausbildung von vRZ oder genetischer Veränderungen, angewiesen zu sein.

Die Suche nach wirksamen Mitteln gegen präexistierende resistente Subklone könnte außerdem anhand von Kombinationstherapien erweitert werden. Durch die Kombination diverser Substanzen können unerwartete und kontraintuitive Effekte auf Tumorzellen erzielt werden (Borisy et al. 2003; Zhao et al. 2014b). Gegenüber der Monotherapie könnte durch die Kombination von Substanzen somit eine größere Wirkung bei einer geringeren Dosierung erzielt werden. Durch die zeitgleiche Hemmung von überlebensnotwendigen Signalwegen kann so eine Tumorzell-spezifische synthetische Letalität hervorgerufen werden (Lee et al. 2012; McLornan et al. 2014), die gegenüber individuellen Subklonen oder der parentalen Kultur erforscht werden kann.

Die Charakterisierung des pharmakologischen Ansprechens verschiedener Subklone und die Vorhersage der polyklonalen Dynamik könnten ferner den Einsatz von kombinatorischen Behandlungsstrategien ermöglichen, mit denen die intratumorale Heterogenität eines Tumors zum Vorteil des Patienten genutzt werden könnte. Eine Möglichkeit wäre es z. B., mit einer primären Behandlung einen Subklon im Tumor anzureichern, der gegenüber einer sekundären Behandlung sehr gut anspricht (Zhao et al. 2014b). Ein erster Hinweis auf die Anwendbarkeit einer solchen Strategie ließ sich an der Serie von Experimenten zur Selektion SK2-ähnlicher Zellen bei GNV019 erkennen. SK2 zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten GNV019-Subklonen eine erhöhte Resistenz

gegenüber Sorafenib und eine hohe Sensitivität gegenüber Cantharidin (siehe Abbildungen 5.9B & C). Nach der gezielten Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen durch die Behandlung der parentalen Kultur mit Sorafenib sprach diese anschließend auf eine Folgebehandlung mit Cantharidin im Vergleich zum Kontrollarm ohne Sorafenib-Vorbehandlung signifikant besser an (siehe Abbildungen 5.15 & 5.16B). Das hier dargestellte Vorgehen bietet somit eine experimentelle *ex vivo*-Plattform, um das translationale Potenzial dieser und anderer Strategien zukünftig in weiteren präklinischen Studien ausführlich zu erproben.

Zukünftige Anforderungen

Anhand der bisher erhobenen Daten und unter Berücksichtigung der bereits genannten Einschränkungen kann das translationale Potenzial des hier beschriebenen Verfahrens noch nicht ausreichend bewertet werden. Im Folgenden wird eine Auswahl von Anforderungen beschrieben, deren Untersuchung dabei helfen soll, die Umsetzbarkeit für die klinische Anwendung besser einordnen zu können.

Das Konzept zur Vorhersage des Therapie-Einflusses auf die polyklonale Dynamik wurde *in vitro* an drei ausgewählten Fällen des Glioblastoms (GNV019, BN035, BN046) und *in vivo* an einem Fall (GNV019) gezeigt. Es bedarf weiterer Untersuchungen an zusätzlichen Fällen des Glioblastoms, um die Validität der Resultate zu verfestigen. Dabei könnte auch ermittelt werden, ob sich die empirisch erhobenen Subklon-spezifischen Verhaltensweisen, wie etwa die Resistenz von vRZ-Vorläuferzellen (GNV019 SK1/3/6) gegenüber Thioguanine, Glioblastom-übergreifend verallgemeinern lassen. Eine eindeutige Zuordnung von zellulären Funktionen und dem Ansprechen gegenüber Wirkstoffen würde die Eignung des Konzepts für die Anwendung in der klinischen Praxis erhöhen. Darüber hinaus bietet es sich an, die Anwendbarkeit der hier verfolgten Strategie auch an anderen Tumorentitäten zu überprüfen.

Bisher ist erst wenig über die Evolution von Tumoren im Verlauf der Behandlung bekannt. Eine weitere Anforderung für zukünftige Untersuchungen stellt daher die Entwicklung und Verifizierung von Modellen dar, die beschreiben können, woher die für die Tumorprogression verantwortlichen Zellen abstammen. Dabei ist es möglich, dass resistente Zellen schon vor der Behandlung präsent

waren und/oder direkt bzw. indirekt durch die Behandlung neu entstehen (Burrell & Swanton 2014). Selbst mit aktuellen Methoden der DNA-Sequenzierung ist die detaillierte Bearbeitung dieser Fragestellung zur Zeit noch nicht in einem adäquaten Umfang durchführbar, da die Frequenz von präexistierenden resistenten Subklonen unterhalb des Detektionslimits liegen könnte oder die Zellen zwar Teil des Tumorrestes, aber nicht Teil der eingegangenen Biopsie sind (Bhang et al. 2015; Burrell & Swanton 2014; Diaz et al. 2012; Robasky et al. 2014; Wang & Navin 2015).

Da in dem hier beschriebenen Verfahren Tumorzellen untersucht werden, die vor dem Therapiebeginn gewonnen wurden, ist die Frage nach dem Zeitpunkt der Existenz von resistenten bzw. für die Entstehung des Rezidivs verantwortlichen Subklonen von großer Bedeutung für dessen Eignung, weil die durch die Behandlung des Patienten möglicherweise neu entstandenen Subklone nicht Teil der Analyse der zuvor abgeleiteten Zellkulturen wären. Für einen Teil der Glioblastom-Patienten konnte gezeigt werden, dass sich die Frequenz von Punktmutationen in rezidierten Tumoren nach der Behandlung mit TMZ und Strahlentherapie deutlich erhöht (Hunter et al. 2006; Johnson et al. 2014; Kim et al. 2015a). Für diese Patienten wäre eine Analyse der zellulären Diversität zum Zeitpunkt vor der Behandlung möglicherweise ungeeignet, um die polyklonale Dynamik im Patienten vorherzusagen. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um zu klären, welchen Einfluss das angewandte Therapieregime auf die Neuentstehung von Subklonen hat und ob sich dieser Prozess auch außerhalb des Patienten in Tumormodellen nachvollziehen bzw. modellieren lässt (siehe Unterabschnitt 6.3.3).

Aktuelle Tumormodelle zeigen bisher nur begrenzte Fähigkeiten vorherzusagen, inwieweit eine an heterogenen Zellen als zytotoxisch oder zytostatisch bestimmte Substanz das progressionsfreie oder das Gesamtüberleben im Patienten verlängern kann (siehe Unterabschnitt 1.1.7, Bleicher et al. 2003). Eine wesentliche Voraussetzung der hier dargestellten Strategie ist es aber, dass die Substanzen, die im Modellsystem als wirksam gegen spezifische Subklone vorhergesagt wurden, auch zuverlässig auf die Situation im Patienten übertragen werden können. Daher ist es trotz der bereits beschriebenen Einschränkungen beim Zugang zu Tumorproben während des Krankheitsverlaufs (siehe Unterabschnitt 6.3.2) notwendig, in gesonderten Untersuchungen herauszufinden, ob

die Subklon-spezifische Wirksamkeit zuverlässig vorhergesagt werden kann und die dadurch beabsichtigten Konsequenzen eintreten (vergleiche Sampson et al. 2010).

Die anhand der Behandlung von Xenotransplantaten der GNV019-Kultur erhobenen Daten legen nahe, dass eine nachweisbare Subklon-spezifische Wirkung nicht zwangsläufig eine Verlängerung der Überlebenszeit hervorrufen muss. Die Verabreichung von Thioguanine führte zwar zu einer Anreicherung von SK1/3/6-ähnlichen Zellen, jedoch verlängerte sie die mittlere Überlebenszeit gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Sorafenib zu einer Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen und brachte den Versuchstieren einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Kontrolltieren ein (siehe Abbildungen 5.17A & C). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob zwischen der Überlebensverlängerung und dem Unvermögen von SK2, Tumoren nach der Xenotransplantation zu entwickeln, ein Zusammenhang besteht. Dieses Szenario und auch Ergebnisse aus klinischen Studien, wie z. B. den Vakzinierungsstudien gegen die EGFRvIII-Mutation (siehe Unterabschnitt 6.1.2, Celldex Therapeutics 2016; Sampson et al. 2010), zeigen die Bedeutung davon auf, in Zukunft genauer definieren zu können, welche Eigenschaften Subklone zu angemessenen Behandlungszielen machen. Höchste Priorität hat dabei die Untersuchung von endogenen Resistenzen gegenüber der Standardtherapie. Aber auch andere maligne Verhaltensweisen, wie z. B. eine gesteigerte Infiltration, die Fähigkeit zur Induktion von Angiogenese, ausgeprägte chromosomale Instabilität oder eine erhöhte Wachstums-Geschwindigkeit, können Subklone als geeignete Therapieziele exponieren (siehe Unterabschnitt 6.1.2).

7. Zusammenfassung

Tumoren können eine ausgeprägte zelluläre Heterogenität in genetischen und phänotypischen Merkmalen aufweisen. Uneinheitliches Ansprechen von Tumorzellen auf therapeutische Maßnahmen wird als eine mögliche Ursache für das Therapieversagen bei fortgeschrittenen Tumoren angesehen. Bisher ist aber erst wenig darüber bekannt, wie sehr sich einzelne Tumorzellen in ihrem Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen unterscheiden und welche Konsequenzen daraus für die zelluläre Zusammensetzung des Tumors entstehen.

In dieser Studie wurde an Modellsystemen des malignen Hirntumors Glioblastom untersucht, ob Therapie-assoziierte Veränderungen der klonalen Komposition eines Tumors vorhersagbar sind. Um das Ausmaß der genetischen und phänotypischen Heterogenität inter- und intratumoral zu erfassen, wurden von 5 Glioblastom-Patienten insgesamt 33 Subklone durch Expansion von separierten Einzelzellen isoliert, charakterisiert und miteinander verglichen. Die Analyse zeigte, dass koexistierende Subklone des gleichen Tumors diskrete genetische Veränderungen und eine deutliche Heterogenität in ihrem Ansprechen gegenüber einer Vielzahl von Substanzen mit potenziell antineoplastischer Wirkung gegenüber dem Glioblastom aufwiesen. In einer personalisierten Analyse konnten Substanzen mit unterschiedlicher Wirkung auf stabile, genetisch und phänotypisch heterogene, koexistierende Subklone genutzt werden, um Verschiebungen von Populationen innerhalb des heterogenen Tumors in Zellkulturen und Xenotransplantaten vorherzusagen.

Diese Befunde stellen eine bisher unberücksichtigte Strategie zur Aufarbeitung von funktionellen Konsequenzen der intratumoralen Heterogenität dar, mit der die Dynamik von Tumor-Subklonen untersucht und gezielt beeinflusst werden kann. In Zukunft könnten auf diese Weise Therapieansätze erarbeitet werden, in denen die individuelle Komposition eines Tumors stärker miteinbezogen wird.

8. Abstract

Tumors may display considerable intratumor heterogeneity of genetic and phenotypic traits. Heterogeneity of drug response among tumor cells could be identified as a potential source for treatment failure in advanced cancers. However, so far little is known about the variety of drug response profiles of single tumor cells and the consequences of therapeutic intervention on the architecture of solid tumors.

Here, model systems of the malignant brain tumor glioblastoma were used to explore the predictability of treatment-induced changes to the clonal composition of tumors. To capture the extent of genetic and phenotypic heterogeneity intra- and intertumorally, 33 single cell-derived subclones generated from five clinical glioblastoma specimens were isolated, characterized and compared. Subclones from individual tumors exhibited discrete genetic aberrations and a remarkable heterogeneity of resistance to a library of potential anti-glioblastoma compounds. In a personalized setting, compounds displaying differential pharmacologic sensitivity among stable genetic and phenotypic co-existing subclones could be used to predict therapy-dependent changes to the clonal composition within the heterogeneous tumor in cell cultures and xenografts.

These findings provide a previously unrecognized strategy for revealing functional consequences of intratumor heterogeneity by enabling predictive modeling of treatment-related subclone dynamics in human glioblastoma. Further development of this strategy may pave the way for therapy regimes that consider the clonal composition of individual tumors.

A. Ergänzende Abbildungen und Tabellen

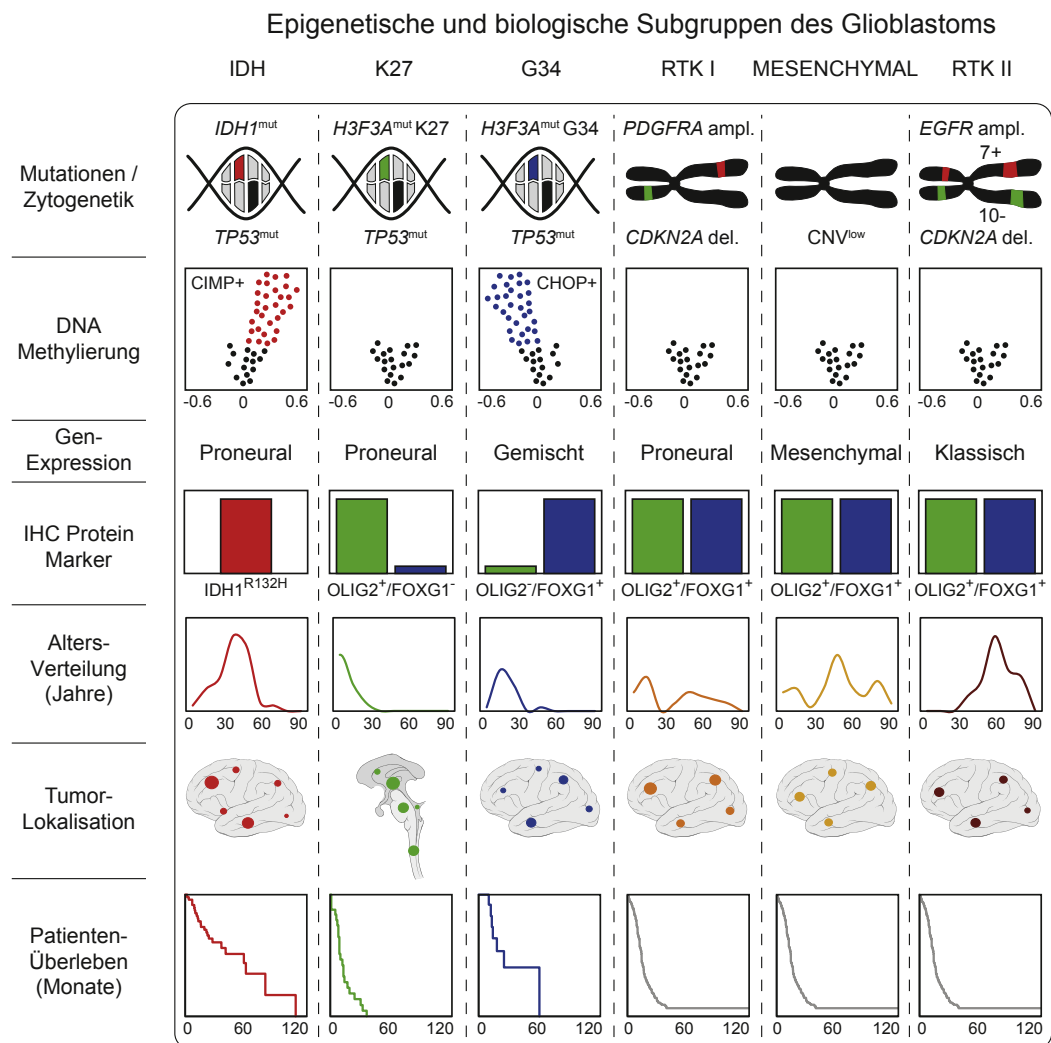


Abbildung A.1: Vereinfachte Zusammenfassung der wesentlichen Merkmale der 6 molekularen Subgruppen des Glioblastoms. Modifizierte Abbildung nach Sturm et al. 2012.

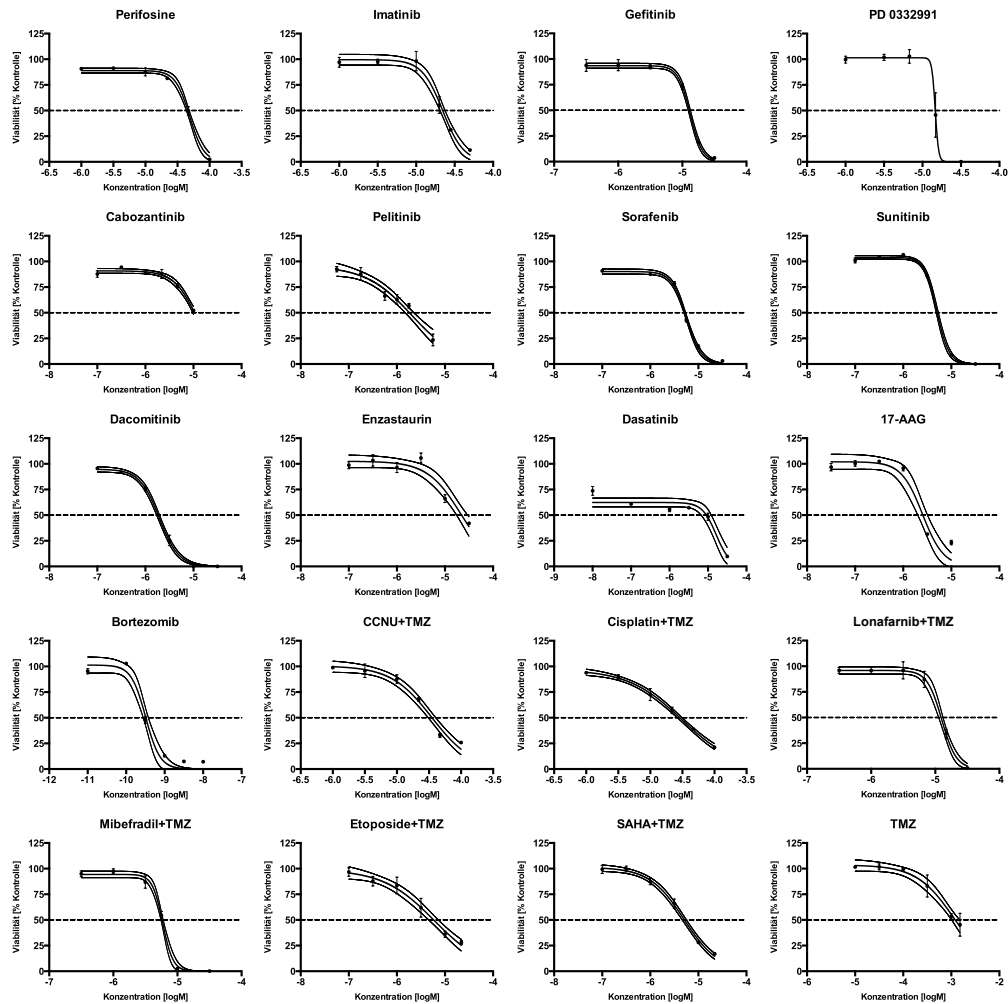


Abbildung A.2: Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven von 20 Glioblastom-relevanten Substanzen am Beispiel der parentalen Kultur von BN118. Die Messwerte der Viabilität für die verschiedenen Substanzkonzentrationen sind als Punkte und die Standardabweichung der Triplikate als Fehlerbalken dargestellt. Diese Werte dienen der Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven (durchgezogene Linie) und der 95%-Konfidenzbänder (gestrichelte Linie). Die gestrichelte horizontale Linie gibt die 50%ige Reduktion der Viabilität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle an. X-Achse: Substanzkonzentration [log M], Y-Achse: Viabilität [% Kontrolle], +TMZ: mit 50 μ M TMZ kombiniert.

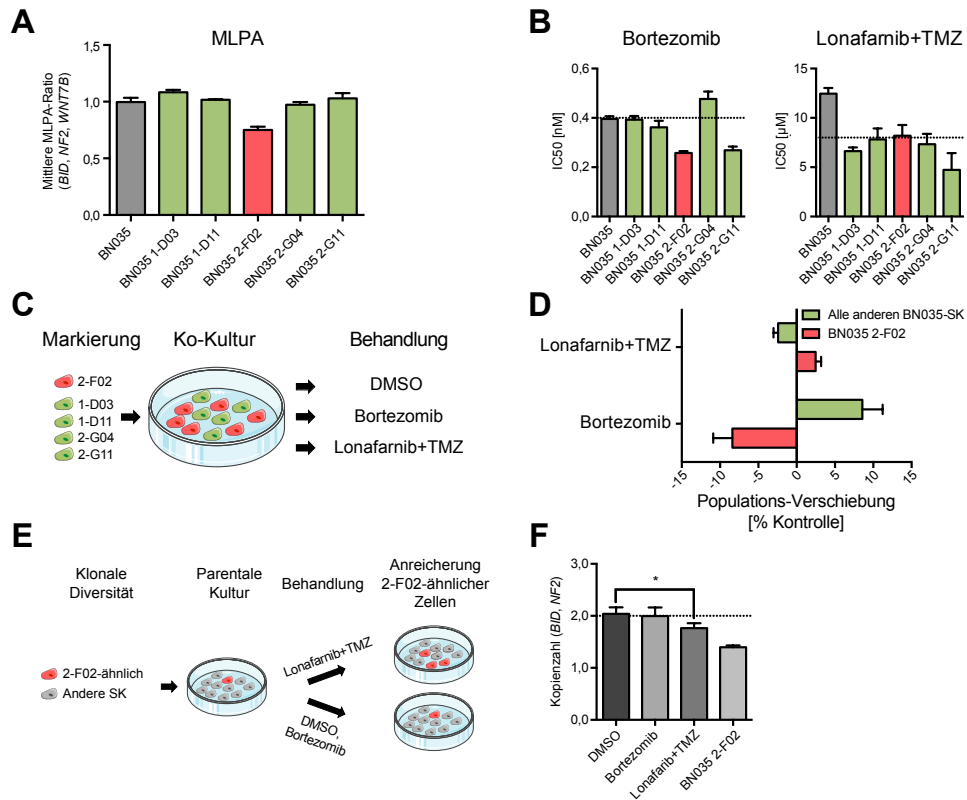


Abbildung A.3: Gezielte Selektion bei BN035. (A) MLPA-Ratio der Chr. 22-Gene *BID*, *NF2*, *WNT7B* der parentalen BN035-Kultur (grau) und davon abgeleiteten Subklonen. Subklon 2-F02 (rot) zeigt im Gegensatz zu den anderen Subklonen (grün) eine Deletion auf Chr. 22 (siehe Unterabschnitt 5.1.3). (B) IC_{50} -Werte von Substanzen mit Subklon-spezifischer Wirkung (siehe auch Tabelle A.3). Die horizontale Linie gibt die verwendete Konzentration für die folgenden Selektionsansätze wieder. (C) Schema der Ko-Kultur-Experimente für die Behandlung von BN035 2-F02 (rot) gegen alle anderen BN035-Subklone (grün) mit 400 pM Bortezomib und 8 μ M Lonafarnib + 50 μ M TMZ. Für jedes Experiment wurden die transient rot und grün fluoreszenzmarkierten Subklone im gleichen Verhältnis gemischt und mit den angegebenen Substanzen für eine Dauer von 3 Tagen einmalig behandelt. (D) Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 jeweils unabhängigen Ko-Kultur-Experimenten. Populationsverschiebungen wurden berechnet, indem die Frequenz der rot und grün fluoreszierenden Populationen der Lösungsmittel-Behandlung von denen der Substanz-Behandlungen subtrahiert wurde. (E) Schema der Selektion bzw. Depletion von 2-F02-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen BN035-Kultur. (F) Quantifizierung der Kopienzahl der Chr. 22-Gene *BID* & *NF2* bei der behandelten parentalen Kultur und dem unbehandelten Subklon 2-F02 mittels RTQ-PCR. Die Normalisierung der Werte erfolgte anhand humaner Leukozyten-DNA. Behandlung der parentalen Kultur in 2 Behandlungszyklen (jeweils 3-tägig) mit 0,55 % DMSO, 400 pM Bortezomib oder 8 μ M Lonafarnib + 50 μ M TMZ. Die horizontale Linie gibt die Kopienzahl der unbehandelten parentalen Kultur wieder (3 unabhängige Experimente). *One-way*-ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: * $p < 0,05$.

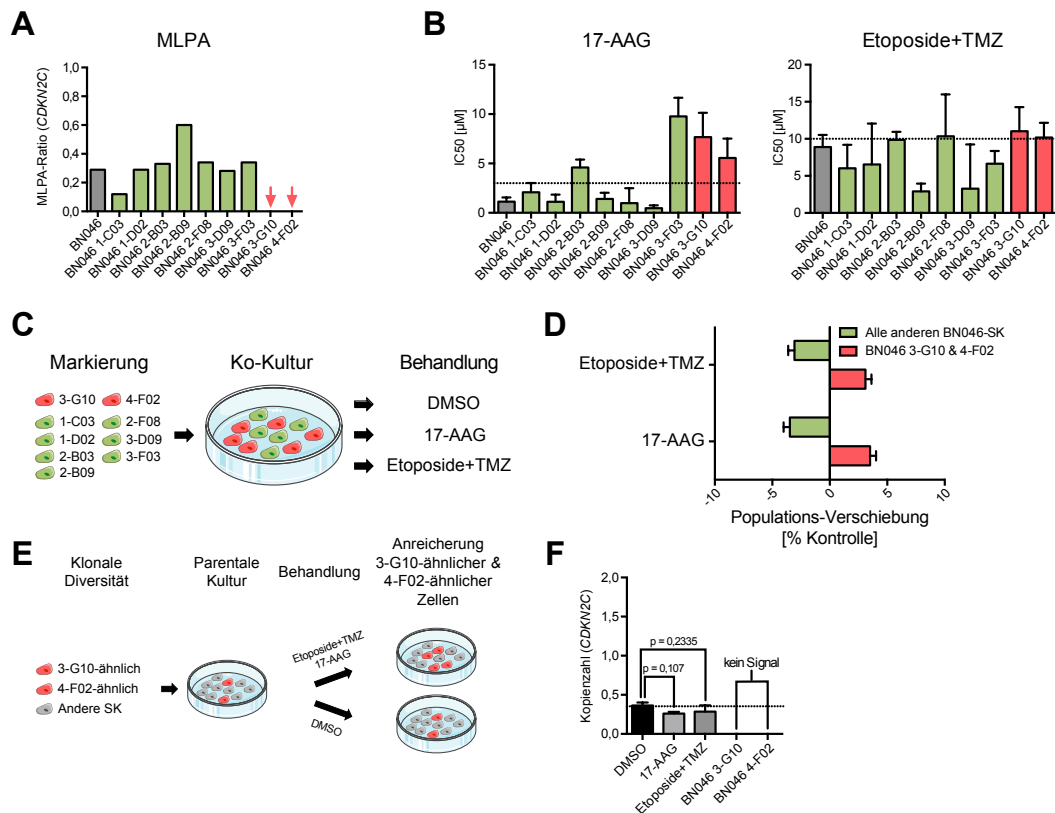


Abbildung A.4: Gezielte Selektion bei BN046. (A) MLPA-Ratio von *CDKN2C* bei der parentalen BN046-Kultur (grau) und davon abgeleiteten Subklonen. Die Subklone 3-G10 und 4-F02 (roter Pfeil, kein Signal) zeigen im Gegensatz zu den anderen Subklonen (grün) eine homozygote Deletion von *CDKN2C* (siehe Unterabschnitt 5.1.3). (B) IC₅₀-Werte von Substanzen mit Subklon-spezifischer Wirkung (siehe auch Tabelle A.3). Die horizontale Linie gibt die verwendete Konzentration für die folgenden Selektionsansätze wieder. (C) Schema der Ko-Kultur-Experimente für die Behandlung von BN046 3-G10 und 4-F02 (rot) gegen alle anderen BN046-Subklone (grün) mit 4 µM 17-AAG und 10 µM Etoposide + 50 µM TMZ. Für jedes Experiment wurden die transient rot und grün fluoreszenzmarkierten Subklone im gleichen Verhältnis gemischt und mit den angegebenen Substanzen für eine Dauer von 3 Tagen einmalig behandelt. (D) Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 jeweils unabhängigen Ko-Kultur-Experimenten. Populationsverschiebungen wurden berechnet, indem die Frequenz der rot und grün fluoreszierenden Populationen der Lösungsmittel-Behandlung von denen der Substanz-Behandlungen subtrahiert wurde. (E) Schema der Selektion von 3-G10 und 4-F02-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen BN046-Kultur. (F) Quantifizierung der Kopienzahl von *CDKN2C* bei der behandelten parentalen Kultur und den unbehandelten Subklonen 3-G10 und 4-F02 mittels RTQ-PCR. Die Normalisierung der Werte erfolgte anhand humaner Leukozyten-DNA. Behandlung der parentalen Kultur in 2 Behandlungszyklen (jeweils 3-tägig) mit 0,55 % DMSO, 4 µM 17-AAG oder 10 µM Etoposide + 50 µM TMZ. Die horizontale Linie gibt die Kopienzahl der unbehandelten parentalen Kultur wieder (3 unabhängige Experimente). *One-way-ANOVA* mit Tukeys Post-hoc-Test.

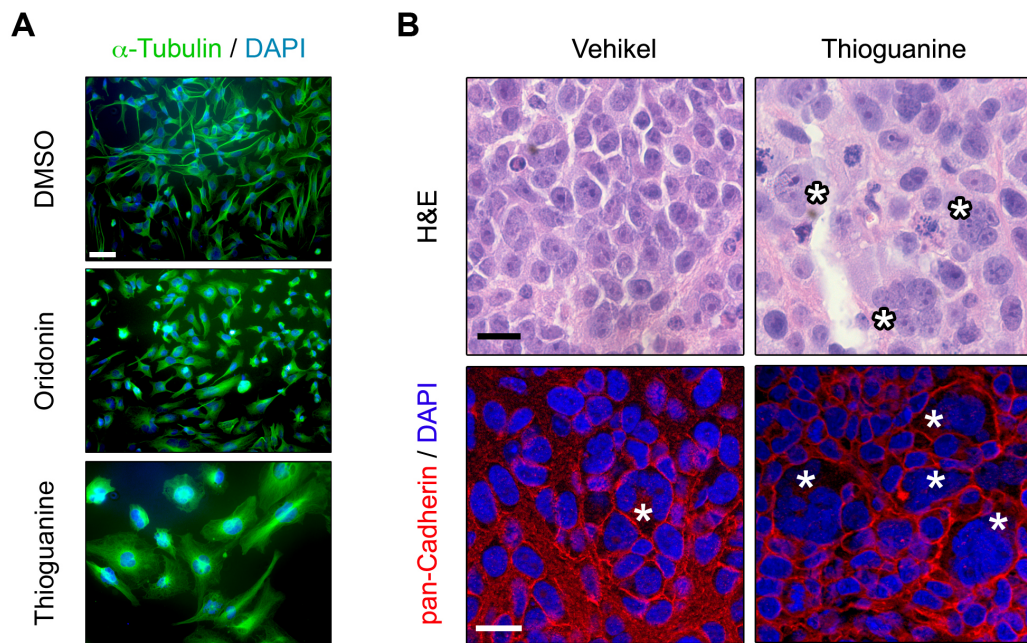


Abbildung A.5: Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenz- und H&E-Färbungen parentaler GNV019-Zellen zur Quantifizierung der Frequenz multinukleärer Zellen. (A) *In vitro*-Behandlung mit 0,1 % DMSO, 2 μ M Oridonin oder 10 μ M Thioguanine. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, die Färbung gegen α -Tubulin zeigt das Zytosol der Zellen. Maßstabsbalken = 50 μ m. (B) *In vivo*-Behandlung mit 0,02 M NaOH (Vehikel) oder 3-mal 10 mg/kg Thioguanine. Unten: Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, die Färbung gegen pan-Cadherin zeigt die äußere Umgrenzung der Zellen. Oben: H&E-Färbung einer anderen Region des gleichen Xenotransplantats. Sterne markieren vRZ. Maßstabsbalken = 20 μ m.

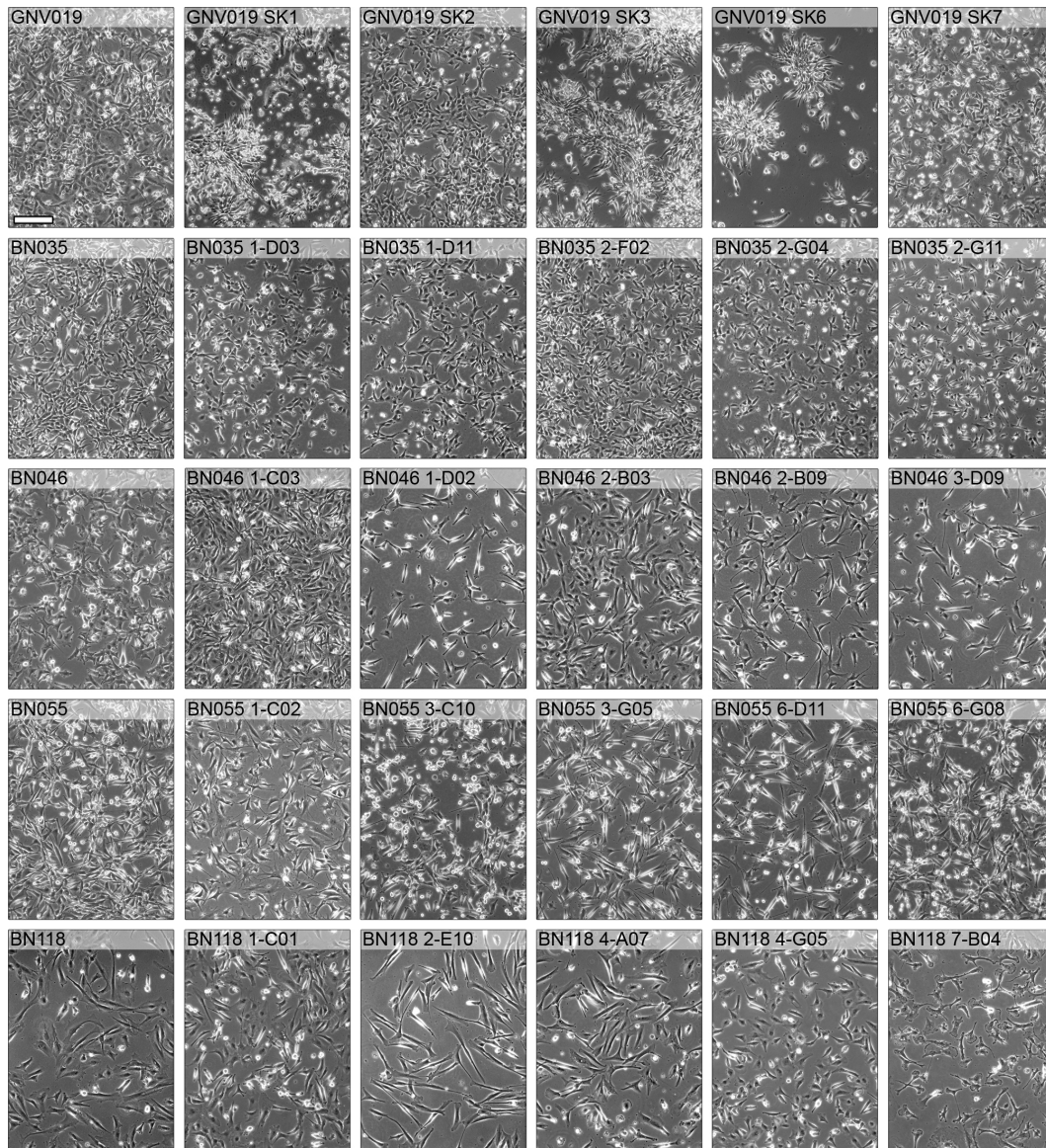


Abbildung A.6: Phasenkontrast-Aufnahmen von parentalen Kulturen und ausgewählten Subklonen. Maßstabsbalken = 100 μm .

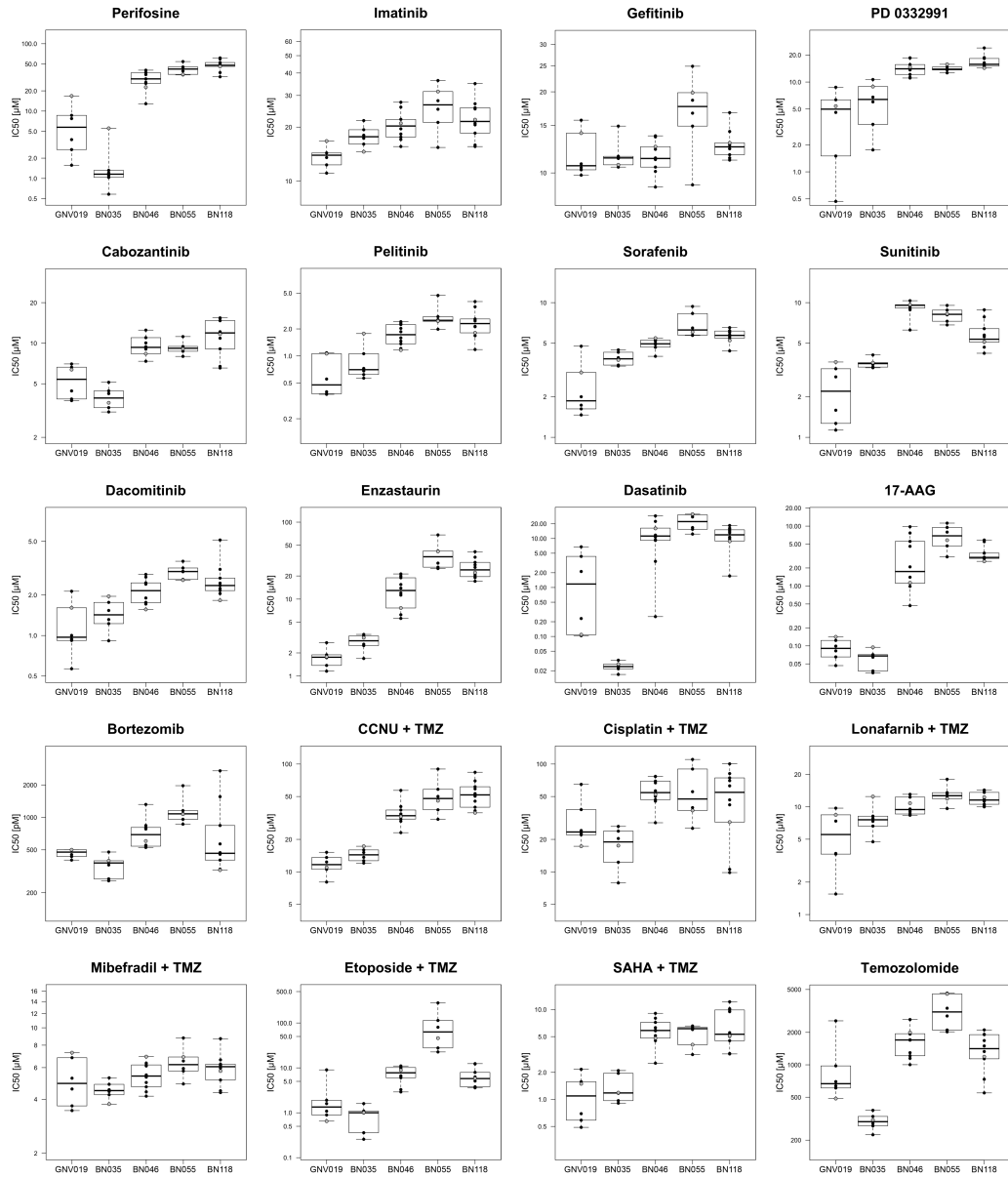


Abbildung A.7: Boxplots der 20 Substanzen mit IC₅₀-Werten von parentalen (schwarze Punkte) und klonalen (graue Punkte) Kulturen, gruppiert nach Patienten. Zur besseren Darstellung wurde die Y-Achse log₂-skaliert.

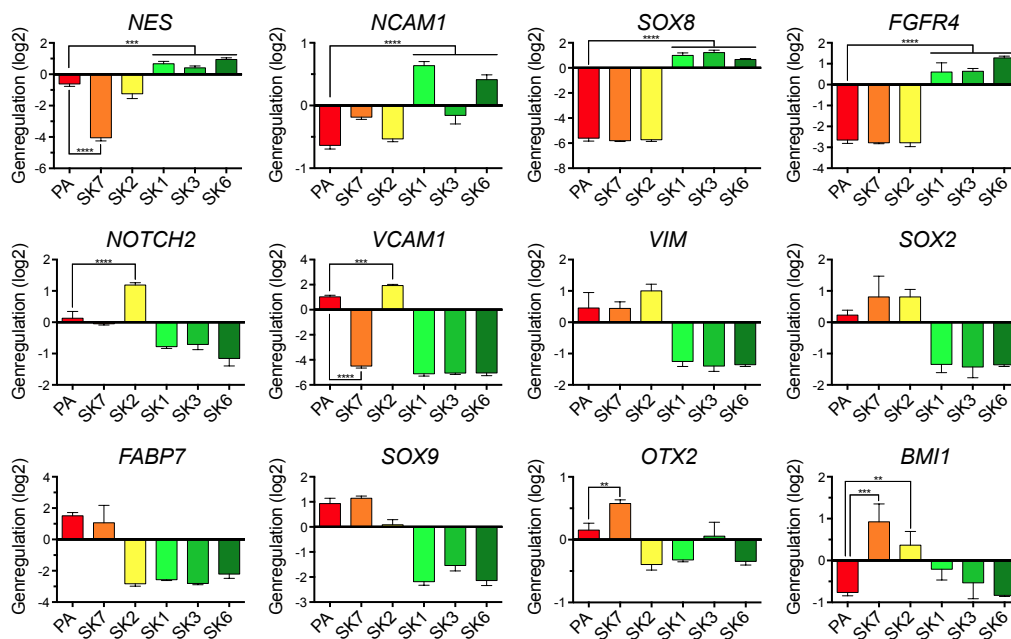


Abbildung A.8: Expression neuraler Stammzell-Marker bei GNV019-Kulturen. Mittelwert-zentrierte Expressionswerte sind als \log_2 -transformierte x-fache Genexpression dargestellt. Die Expressionswerte beruhen auf einer *microarray*-Analyse, die in biologischen Triplikaten durchgeführt und anschließend gemittelt wurde. PA = parentale GNV019-Zellen. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Nur ausgewählte Signifikanzniveaus werden präsentiert. Signifikanzniveaus von SK1/3/6 reflektieren den höchsten p-Wert, der von einem dieser Klone beim ANOVA-Signifikanztest mit Tukeys Post-hoc-Test erzielt wurde.

Code	Name	Code	Name	Code	Name	Code	Name
1A02	Gambogic acid	1E02	Methotrexate(+/-)	2A02	Cytochalasin D	2E02	Picropodophyllotoxin
1A03	Rotenone	1E03	Nitromide	2A03	Amygdalin	2E03	3H-1,2-Dithiole-3-Thione
1A04	Aklavine Hydrochloride	1E04	Quinacrine hydrochloride	2A04	Ellagic acid	2E04	Blasticidin S
1A05	Celastrol	1E05	Streptozosin	2A05	Benzyl isothiocyanate	2E05	4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2-one
1A06	Deguelin (-)	1E06	Thimerosal	2A06	Aklomide	2E06	2,3-Dichloro-5,8-dihydroxynaphthoquinone
1A07	Gambogic acid amide	1E07	Thioguanine	2A07	Floxuridine	2E07	2,2-Azo-bis-2-aminopropane
1A08	Rutilantinone	1E08	Tobramycin	2A08	Altretamine	2E08	4,4-Diisothiocyanostilbene-2,2-sulfonic acid sodium salt
1A09	2,6-Dimethoxyquinone	1E09	Vinblastine sulfate	2A09	Carmustine	2E09	2-Aminoguanidine hemisulfate
1A10	Juglone	1E10	Warfarin	2A10	Beta-Propiolactone	2E10	Methoprene (S)
1A11	Agelazine	1E11	Azaserine	2A11	Hycanthone	2E11	Clorsulon
1B02	Trichlormethine	1F02	Acriflavinium hydrochloride	2B02	Amsacrine	2F02	Garlicin
1B03	Sanguinarine sulfate	1F03	Iproniazid sulfate	2B03	Niclosamide	2F03	Ginkgolic acid
1B04	Veratine sulfate	1F04	Phenylmercuric acetate	2B04	Mitoxantrone hydrochloride	2F04	Auraptene
1B05	Dactinomycin	1F05	Azelaic acid	2B05	Urethane	2F05	Rubescensin A
1B06	Dichlorvos	1F06	Strychnine	2B06	Thiotepa	2F06	Nobiletin
1B07	Mitomycin C	1F07	Mycophenolic acid	2B07	Pipobroman	2F07	Vincristine sulfate
1B08	2,4-Dinitrophenol	1F08	Ouabain	2B08	Semustine	2F08	Rifaximin
1B09	Aminoglutethimide	1F09	Berberine chloride	2B09	Acyclovir	2F09	Perillyl alcohol
1B10	Mechlorethamine	1F10	Cantharidin	2B10	Benzalkonium chloride	2F10	Carmofur
1B11	Azathioprine	1F11	Phorbol myristate acetate	2B11	Etanidazole	2F11	6-Aminonicotinamide
1C02	Busulfan	1G02	Canavanine	2C02	Ciprofloxacin	2G02	Elaidylphosphocholine
1C03	Chlorambucil	1G03	Coralyne chloride	2C03	Leflunomide	2G03	7-Nitroindazole
1C04	Chloramphenicol	1G04	Harmaline	2C04	Paclitaxel	2G04	L-Alaninol
1C05	Chlorhexidine	1G05	Protoveratrine B	2C05	Tacrolimus	2G05	Tanshinone IIA
1C06	Chloroquine diphosphate	1G06	Ferulic acid	2C06	Sirolimus	2G06	Arsenic trioxide
1C07	Chlortetracycline hydrochloride	1G07	Picrotoxinin	2C07	Teniposide	2G07	Clofazimine
1C08	Clindamycin hydrochloride	1G08	Mimosine	2C08	Gossypol	2G08	Toremiphene citrate
1C09	Colchicine	1G09	Tretinon	2C09	Physcion	2G09	Fludarabine phosphate
1C10	Cyclophosphamide hydrate	1G10	Suramin	2C10	Cytochalasin A	2G10	Mupirocin
1C11	Cytarabine	1G11	Etoposide	2C11	Alendronate Sodium	2G11	Epirubicin hydrochloride
1D02	Dacarbazine	1H02	Lapachol	2D02	Tannic acid	2H02	Doxorubicin
1D03	Daunorubicin	1H03	Brucine	2D03	Formestane	2H03	Ifosfamide
1D04	Dibenzothiophene	1H04	Carboplatin	2D04	Ancitabine hydrochloride	2H04	Diloxanide furoate
1D05	Emetine	1H05	Cisplatin	2D05	Nimustine	2H05	Chlorophyllide Cu Complex Na Salt
1D06	Fluorouracil	1H06	Antimycin A	2D06	Norcantharidin	2H06	Triadimefon
1D07	Hexachlorophene	1H07	Azacitidine	2D07	Bovinoicidin	2H07	Dibenzoylmethane
1D08	Hydroxyurea	1H08	Acetarsol	2D08	Tetrandrine	2H08	Capsanthin
1D09	Amphotericin B	1H09	p-Fluorophenylalanine	2D09	Pristimerin	2H09	Benzanthrone
1D10	Melphalan	1H10	Cyclosporine	2D10	Atovaquone	2H10	Camptothecin
1D11	Mercaptopurine	1H11	Erysolin	2D11	10-Hydroxycamptothecin	2H11	Cytochalasin B

Tabelle A.1: Auflistung aller 160 Wirkstoffe der Substanz-Bibliothek „The Killer Collection“ mit Substanz-Code und Hersteller-Bezeichnung.

Subklon	MLPA	IC ₅₀ -Analyse
GNV019 SK1	x	x
GNV019 SK2	x	x
GNV019 SK3	x	x
GNV019 SK6	x	x
GNV019 SK7	x	x
BN035 1-D03	x	x
BN035 1-D11	x	x
BN035 2-F02	x	x
BN035 2-G04	x	x
BN035 2-G11	x	x
BN046 1-C03	x	x
BN046 1-D02	x	x
BN046 2-B03	x	x
BN046 2-B09	x	x
BN046 2-F08	x	x
BN046 3-D09	x	x
BN046 3-F03	x	x
BN046 3-G10	x	x
BN046 4-F02	x	x
BN055 1-C02	x	x
BN055 3-C10	x	x
BN055 3-G05	x	
BN055 5-A10	x	
BN055 5-D05	x	
BN055 6-B05	x	
BN055 6-B08	x	
BN055 6-D11	x	
BN055 6-G08	x	x
BN055 7-B03	x	
BN055 7-D11	x	
BN055 8-A10	x	
BN055 8-F05	x	x
BN055 8-F09	x	
BN055 8-G02	x	x
BN055 8-G07	x	
BN118 1-B10	x	
BN118 1-C01	x	x
BN118 1-F10	x	x
BN118 1-G07	x	x
BN118 2-B09	x	
BN118 2-E10	x	x
BN118 2-H03	x	
BN118 3-D07	x	x
BN118 3-F06	x	
BN118 3-G04	x	
BN118 4-A07	x	x
BN118 4-C02	x	
BN118 4-G05	x	x
BN118 5-C11	x	
BN118 7-B04	x	
BN118 7-D04	x	
BN118 7-F09	x	x
BN118 7-G04	x	x

Tabelle A.2: Auflistung der untersuchten Subklone und der daran angewandten Analyse-Methoden (siehe auch Abbildungen 5.2 & 5.3.)

	PER	IMA	GEF	PD	CAR	PEL	SORA	SUN	DAC	ENZ	DAS	AAG	BOR	CCNU*	CIS*	LON*	MIB*	ETO*	SAHA*	TMZ
	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[nM]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[μ M]	[mM]
BN035	5,56	14,59	10,72	8,90	3,61	1,78	3,75	3,58	1,96	3,15	0,027	0,095	0,396	17,27	17,51	12,46	3,76	1,01	1,19	0,31
BN035 1-D03	1,32	17,33	11,42	6,79	3,32	0,73	3,44	3,58	1,23	2,59	0,022	0,071	0,393	15,11	23,84	6,63	4,84	1,09	2,09	0,22
BN035 1-D11	1,04	19,34	11,31	10,67 [†]	4,22	0,57	3,90	3,48	1,54	2,49	0,025	0,038	0,362	13,65	12,28	7,82	5,26	0,26	1,17	0,38
BN035 2-F02	0,58	16,09	10,51	3,38	3,09	0,62	3,38	3,28	1,31	1,69	0,024	0,035	0,258	12,05	7,89	8,19	4,24	0,36	0,91	0,27
BN035 2-G04	1,11	21,75	14,92	6,02	5,13	1,06	4,46	4,09	1,76	3,32	0,033	0,065	0,477	15,97	20,38	7,33	4,52	0,99	1,95	0,29
BN035 2-G11	1,21	18,02	11,52	1,75	4,42	0,68	4,28	3,32	0,91	3,48	0,017	0,071	0,269	12,68	26,39	4,73	4,42	1,60	0,97	0,33
BN046	22,66	21,00	12,52	14,69	8,35	1,16	5,45	9,65	1,56	7,66	16,059	1,133	0,604	32,62	52,21	10,80	6,91	8,89	4,81	2,00 [†]
BN046 1-C03	37,46	21,08	12,23	12,15	12,50 [†]	1,46	4,67	9,59	2,72	18,94	11,724	2,086	0,841	34,48	66,96	8,98	4,96	6,03	4,50	1,30
BN046 1-D02	40,51	27,52	13,73	18,50	10,99 [†]	2,41	4,97	10,34	2,84	12,01	28,938	1,113	0,790	33,69	69,48	13,05	6,36	6,54	6,29	1,93 [†]
BN046 2-B03	26,76	19,57	11,36	11,27	10,99 [†]	1,37	4,92	9,65	2,46	21,25	3,412	4,594	1,319	37,46	76,54	13,05	5,46	9,85	5,80	1,15
BN046 2-B09	12,86	15,59	8,86	14,03	10,05	2,32	4,67	8,85	2,41	5,61	16,320	1,402	0,540	40,33	76,89	12,29	4,16	2,91	5,90	1,21
BN046 2-F08	30,02	25,85	13,60	18,61	9,04	1,86	5,18	9,43	1,71	11,27	9,429	0,986	0,540	32,47	46,74	9,54	6,13	10,34	5,13	1,71 [†]
BN046 3-D09	25,79	17,06	10,51	14,03	9,20	1,59	5,27	6,26	1,75	6,26	0,254	0,469	0,780	30,87	45,25	8,58	4,69	3,28	2,53	1,00
BN046 3-F03	34,80	22,10	11,21	15,66	9,42	2,24	4,00	9,54	2,43	19,94	22,354	9,772	0,807	29,48	50,08	9,32	5,31	6,64	9,08	1,69 [†]
BN046 3-G10	37,12	17,61	10,13	13,63	7,34	2,03	5,42	9,11	1,90	15,48	9,130	7,672	0,526	56,98	56,46	8,34	4,40	11,03	8,02	2,63 [†]
BN046 4-F02	30,16	18,31	11,26	11,08	7,34	1,21	4,92	9,70	1,76	13,87	10,728	5,556	0,552	23,09	28,54	8,50	6,21	10,17	7,20	1,95 [†]
BN055	35,12	31,56	19,85	15,75	9,08	2,45	6,05	8,26	2,58	41,69 [†]	31,369	5,818	1,072	45,67	37,12	11,90	6,88	45,92 [†]	4,07	4,55 [†]
BN055 1-C02	34,48	36,35	24,88	12,65	9,25	2,53	5,74	9,54	3,17	42,27 [†]	27,570	3,069	1,156	30,72	39,41	9,63	8,78	22,59 [†]	6,57	2,10 [†]
BN055 3-C10	54,42	28,06	18,61	13,95	11,19 [†]	2,74	6,48	8,80	2,98	68,23 [†]	30,373	9,495	0,959	50,08	55,43	13,17	6,54	80,35 [†]	6,33	4,62 [†]
BN055 6-G08	45,25	15,41	9,03	13,87	8,71	4,72	8,31	6,83	3,00	24,97	12,305	11,220 [†]	1,969	89,94	89,94	13,54	4,87	279,90 [†]	6,26	2,84 [†]
BN055 8-F05	44,84	21,25	14,92	13,63	9,46	1,98	9,38	8,12	3,56	29,34	15,424	7,941	1,087	58,31	110,41 [†]	18,02	5,74	113,76 [†]	6,00	3,35 [†]
BN055 8-G02	39,41	25,15	16,66	14,69	7,98	2,43	5,71	7,28	2,61	26,00	16,719	4,674	0,865	37,63	25,32	12,18	5,93	27,73 [†]	3,16	2,02 [†]
BN118	46,10	22,01	12,93	14,33	11,67 [†]	1,81	5,24	5,12	1,82	22,12	8,769	2,582	0,324	35,28	28,94	12,29	5,74	5,84	5,10	1,19
BN118 1-C01	47,39	20,59	12,29	15,04	14,72 [†]	2,56	6,52	8,85	2,67	30,02	18,419	3,524	0,567	53,18	74,45	13,60	6,21	5,71	5,53	1,50
BN118 1-F10	51,02	25,65	11,36	18,72	10,89 [†]	2,45	6,02	5,58	2,23	27,86	8,911	2,931	0,331	58,85	62,78	14,11	5,12	3,65	10,23	1,91
BN118 1-G07	46,31	25,25	12,29	16,21	6,54	2,58	6,16	4,21	2,45	19,60	9,817	2,880	0,471	83,93	100,46 [†]	10,56	5,96	6,29	9,90	1,33
BN118 2-E10	37,29	26,99	12,69	16,40	6,73	2,12	5,78	4,67	2,35	19,04	1,719	2,880	0,458	50,32	41,84	10,32	6,27	3,59	9,48	1,14
BN118 3-D07	48,49	18,53	11,68	15,30	12,16 [†]	2,14	6,19	5,12	3,10	35,08	14,228	5,492	2,707	69,80	81,64	14,31	6,63	12,22	12,22	1,68
BN118 4-A07	52,69	21,00	14,24	18,29	15,42 [†]	3,53	5,45	6,41	2,35	20,65	13,126	2,982	1,557	61,63	70,12	11,26	4,46	12,42	3,24	2,11
BN118 4-G05	32,32	34,95	16,74	23,98	15,31 [†]	4,04	5,65	7,84	5,12	17,07	16,189	5,851	0,841	45,25	46,52	11,74	8,70	7,94	5,02	1,92
BN118 7-F09	61,63	15,59	11,16	15,21	9,08	1,18	4,38	5,74	2,05	41,30	10,642	3,016	0,455	39,77	10,54	9,99	4,36	5,10	3,21	0,73
BN118 7-G04	59,40	15,90	12,93	14,36	14,68 [†]	1,68	5,49	5,09	2,16	25,85	15,055	3,544	0,401	36,95	9,84	11,36	6,18	3,79	4,50	0,55
GNV019	16,80	16,73	14,05	5,39	6,37	1,06	3,03	3,62	1,61	1,78	0,109	0,141	0,501	10,99	17,27	8,42	7,27	0,65	1,49	0,49
GNV019 SK1	1,57	12,33	9,81	4,59	4,42	0,38	1,73	1,27	0,57	2,72	4,312	0,047	0,433	8,03	22,66	1,55	3,46	1,90	0,49	0,61
GNV019 SK2	8,65	14,36	10,80	8,75	7,01	0,55	4,75	2,81	0,92	1,89	0,104	0,065	0,401	13,59	64,84	9,72	6,81	9,03	1,57	2,56 [†]
GNV019 SK3	2,68	13,54	10,46	0,47	3,85	0,37	1,63	1,13	0,94	1,73	2,120	0,123	0,501	12,33	37,81	3,64	4,56	1,60	0,69	0,98
GNV019 SK6	3,77	11,09	10,27	1,50	3,75	0,40	1,47	1,59	1,00	1,38	6,774	0,082	0,501	10,54	22,05	3,69	3,67	0,89	0,59	0,70
GNV019 SK7	7,74	14,36	15,69	6,34	6,63	1,08	2,00	3,23	2,13	1,16	0,232	0,099	0,451	15,18	24,18	7,37	5,24	1,08	2,16	0,64
AHNP	43,62	31,56	16,06	20,65	8,83	4,57	6,41	5,06	3,97	1,46 [†]	10,139	3,864	5,442	96,82	79,68	14,05	8,82	205,59 [†]	7,32	1,76 [†]

Tabelle A.3: Auflistung von IC₅₀-Werten aus Abbildung 5.3. Die vollständigen Namen der Substanzen sind in Tabelle A.4 aufgeführt. *CCNU, CIS, MIB, ETO und SAHA wurden mit 50 μ M TMZ kombiniert. [†]Approximierte IC₅₀-Werte durch nicht-lineares Regressionsmodell (42 von 780 Werten).

Substanz	Zielstruktur / Mechanismus	Vertreiber	Konzentrationen (Log10 M)	Vehikel	Referenz
Perifosine	AKT, PI3K	Selleckchem	-4,00; -4,33; -4,66; -5,00; -5,50; -6,00	EtOH	NCT00590954
Imatinib	PDGFR, KIT, ABL	Cayman Chemical	-4,30; -4,55; -4,70; -5,00; -5,50; -6,00	DMSO	NCT00039364
Gefitinib	EGFR (reversibel)	Cayman Chemical	-4,50; -4,75; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50	DMSO	NCT00052208
PD 0332991	CDK4/6	Selleckchem	-4,50; -4,83; -5,17; -5,50; -6,00; -7,00	DMSO	NCT01227434
Cabozantinib	MET, VEGFR2, RET	Selleckchem	-5,00; -5,33; -5,66; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	NCT00704288
Pelitinib	pan-ErbB (irreversibel)	Selleckchem	-5,25; -5,75; -6,00; -6,25; -6,75; -7,25	DMSO	k. A.
Sorafenib	B-Raf, C-Raf, VEGFR-2, PDGFRB	LKT Labs	-4,50; -5,00; -5,25; -5,50; -6,00; -7,00	DMSO	NCT00093613
Sunitinib	PDGFR, VEGFR, KIT	Selleckchem	-4,50; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	NCT00606008
Dacomitinib	pan-ErbB (irreversibel)	Selleckchem	-4,50; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	NCT01112527
Enzastaurin	PKCb	Selleckchem	-4,50; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	NCT00402116
Dasatinib	SRC, ABL, KIT	Selleckchem	-4,50; -5,00; -5,50; -6,00; -7,00; -8,00	DMSO	NCT00869401
17-AAG	HSP90	LKT Labs	-5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00; -7,50	DMSO	k. A.
Bortezomib	Proteasome	SCBT	-8,00; -8,50; -9,00; -9,50; -10,00; -11,00	DMSO	NCT00006773
TMZ	Alkylierend	Selleckchem	-2,82; -3,00; -3,50; -4,00; -4,50; -5,00	DMSO	NCT00006353
CCNU [†]	Alkylierend	Medac	-4,00; -4,33; -4,66; -5,00; -5,50; -6,00	DMSO	NCT01149109
Cisplatin [†]	DNA-Quervernetzung	LKT Labs	-4,00; -4,33; -4,66; -5,00; -5,50; -6,00	DMSO	NCT00360945
Lonafarnib [†]	F'Tase	Cayman Chemical	-4,50; -4,83; -5,17; -5,50; -6,00; -6,50	DMSO	NCT00612651
Mibefradil [†]	Calciumkanal-Blocker	SCBT	-4,50; -5,00; -5,25; -5,50; -6,00; -6,50	DMSO	NCT01480050
Etoposide [†]	Topoisomerase II	Cayman Chemical	-4,66; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	10.1002/cncr.11260
SAHA [†]	HDAC	Cayman Chemical	-4,66; -5,00; -5,50; -6,00; -6,50; -7,00	DMSO	NCT00268385

Tabelle A.4: Details zur Substanz-Bibliothek, die für die Analyse von inter- und intratumoraler Heterogenität verwendet wurde. Referenz: NCT-Registernummer von ClinicalTrials.gov (<https://www.clinicaltrials.gov/>) oder digitaler Objektbezeichner (DOI, *Digital Object Identifier*). [†]In Kombination mit 50 μ M TMZ.

Sonde	PA	SK1	SK2	SK3	SK6	SK7
CHD5	1,14	1,06	1,29	1,02	1,27	1,39
RPA2	1,29	1,27	1,64	1,08	1,41	1,46
CDKN2C	1,22	1,1	1,77	1,04	1,18	1,41
NTNG1	0,87	1,01	2,11	1,64	1,84	2,06
MDM4	1,38	1,23	1,35	1,23	1,46	1,29
AKT3	1,34	1,38	1,52	1,22	1,36	1,36
NAG	0,97	0,9	1,15	0,82	1	1,06
MYCN	1,22	1,61	2,08	0,88	1,08	2,16
APOB	1,08	0,99	1,13	0,84	0,88	0,88
PIK3CA	1,52	1,35	1,48	1,2	1,28	1,19
SOX2	1,1	1,17	1,53	1,04	1,2	1,05
OPAI	1,33	1,24	1,76	1,26	1,19	1,16
PDGFRA	2,25	3,1	3,63	2,94	2,86	2,96
KIT	2,16	2,7	2,89	2,66	2,45	2,48
SIM1	0,89	1,18	1,42	0,93	1	0,99
SGK1	0,93	0,9	1,4	0,97	0,82	0,91
ESR1	0,87	0,9	1,69	0,91	0,93	1,31
PARK2	1,23	1,22	2,11	1,33	1,61	2,1
PDGFA	1,06	1,28	1,75	1,15	1,14	1,38
TWIST1	1,05	1	1,38	1,12	0,98	1,2
FKBP9	1,2	1,2	1,45	1,21	1,15	1,29
EGFR	1,1	1,14	1,67	0,97	1,07	1,37
GUSB	1,25	1,29	1,21	1,17	1,07	1,17
CDK6	1,22	1,21	1,17	1,21	1,15	1,18
MET	1,08	1,06	0,81	0,95	1,08	
PRSS1	0,64	0,67	0,66	0,55	0,78	0,57
XRCC2	0,88	0,84	0,81	0,84	1,04	0,61
GLDC	0,73	0,55	0,58	0,72	0,75	1,11
CDKN2A	1,25	1,23	1,14	1,24	1,31	1,22
CDKN2B	1,13	1,21	0,98	1,35	1,01	1,22
ELAVL2	1,1	1,08	1,02	1,39	1,92	2,06
LINGO2	1,09	1,02	0,95	1,3	1,21	1,38
GRHPR	1,28	1,02	0,84	1,25	1,39	1,74
ZMYND11	1,01	0,99	1,08	0,91	1,18	1,13
OPTN	0,96	0,92	0,99	1,03	0,69	0,66
CREM	0,79	0,75	1,16	0,71	0,9	1,09
NEUROG3	0,7	0,69	1,22	0,75	0,73	0,92
PTEN	0,84	1,14	1,54	0,94	0,84	1,06
MGMT	0,78	0,77	1,06	0,75	0,71	0,79
PAX6	0,65	0,63	0,92	0,64	0,49	0,58
CD44	0,68	0,72	0,92	0,52	0,6	0,67
ALX4	1,07	1,13	1,51	1,07	1,26	0,89
CCND2	1,1	1,07	1,05	0,93	1,02	0,94
H2AFJ	1,17	0,99	1,15	0,83	0,91	0,92
PKP2	1,15	1,03	1,11	0,87	0,93	0,62
CDK4	0,97	1,07	0,82	1,01	1,03	0,61
MDM2	1,08	0,99	1,14	0,84	0,89	0,88
BRCA2	1,69	1,62	2,49	0,9	0,93	1,03
RB1	0,98	1,09	1,53	1,38	1,62	1,21
SPRY2	0,89	0,91	1,48	0,91	1,38	1,28
CHD8	1,44	1,31	1,32	1,25	1,58	1,64
ATL1	1,13	1,11	1,1	1,01	1,1	1,05
NUMB	1,37	1,28	2,58	1,75	2,11	2,23
TRPM1	0,86	0,93	1,25	1,07	1	1,33
SPRED1	0,98	0,79	1,62	0,94	0,86	0,94
FBN1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
NF1	1,25	1,28	1,9	1,31	1,28	1,14
HNF1B	0,92	1,09	1,58	0,95	1,01	0,77
BRIP1	0,84	0,72	1,56	0,82	0,97	1,48
STK11	1,28	1,04	1,17	1,2	1,17	1,18
CACNA1A	1,39	1,23	1,47	1,56	1,03	1,32
FKBP8	0,96	1,18	1,45	1,67	1,2	1,43
CCNE1	1,13	1,15	1,29	0,99	1,16	1,12
AURKC	1,09	1,15	1,73	1,22	1,08	1,22
SOX12	1,12	1,17	1,24	1,09	1,22	0,96
JAG1	0,98	1,07	1,33	0,92	1,16	0,86
PYGB	1,03	1,19	1,55	0,94	1,31	1,16
ID1	1,16	1,19	1,21	1,22	1,19	1,03
ZMYND8	0,93	0,97	1,04	1,19	1,3	1,45
KCNQ2	1	1,18	1,05	1,26	1,37	1,18
BD1	0,7	0,83	0,91	0,91	1,27	1,04
NF2	0,54	0,59	1,25	1,17	1,23	1,1
WNT7B	0,74	1,01	0,74	0,84	1,18	0,89

Tabelle A.5: Auflistung von GNV019-MLPA-Ratios.

Sonde	PA	1-D03	1-D11	2-F02	2-G04	2-G11
CHD5	1.01	1.11	1.05	0.93	1.02	1.09
RPA2	1.03	1.12	1.17	0.93	0.91	0.97
CDKN2C	1.03	1.03	0.97	0.94	0.92	0.96
NTNG1	1.01	1.05	0.98	0.99	0.97	0.93
MDM4	1.27	1.36	1.27	1.16	1.41	1.32
AKT3	1.54	1.53	1.53	1.47	1.6	1.57
NAG	1.01	0.96	1.05	1	1.07	0.97
MYCN	0.93	0.91	1.03	0.96	1	0.88
APOB	1	0.94	1.05	0.98	1.07	1.03
PIK3CA	1.54	1.37	1.5	1.46	1.37	1.46
SOX2	1.37	1.24	1.44	1.28	1.27	1.38
OPA1	1.55	1.59	1.66	1.49	1.45	1.51
PDGFRA	1.08	1.07	1.11	0.94	1.18	1.11
KIT	1.09	1.14	1.17	1.12	1.18	1.1
SIM1	1.44	1.46	1.39	1.43	1.35	1.37
SGK1	1.5	1.56	1.53	1.53	1.42	1.48
ESR1	1.37	1.43	1.4	1.76	1.38	1.3
PARK2	1.53	1.51	1.48	1.49	1.4	1.45
PDGFA	1.5	1.89	1.83	1.78	1.8	1.45
TWIST1	1.54	2.04	2.01	1.77	2.08	1.7
FKBP9	1.56	1.88	1.83	1.75	1.71	1.57
EGFR	1.65	2.1	2.19	1.9	2.14	1.63
GUSB	1.31	1.53	1.58	1.51	1.72	1.27
CDK6	1.2	1.43	1.37	1.35	1.36	1.13
MET	4	4	4	2.91	4	4
PRSS1	1.14	1.57	1.69	1.6	1.75	1.18
XRCC2	1.37	1.61	1.65	1.5	1.61	1.17
GLDC	0.55	0.55	0.58	0.57	0.55	0.49
CDKN2A	0	0	0	0	0	0
CDKN2B	0	0	0	0	0	0
ELAVL2	0.54	0.53	0.52	0.56	0.47	0.5
LINGO2	1	1	0.91	0.92	0.99	1.09
GRHR	1.06	1.14	1	0.95	0.96	0.99
ZMYND11	1.02	1.05	0.99	1.01	0.96	1.01
OPTN	1.1	1.1	0.95	0.91	0.95	1
CREM	1.05	1.05	1.02	1.08	0.96	1.02
NEUROG3	0.98	0.99	0.99	1.02	0.89	0.92
PTEN	0.99	0.99	0.89	1.01	0.88	0.94
MGMT	0.84	0.86	0.95	0.85	0.83	0.8
PAX6	0.83	0.88	0.95	0.81	0.97	0.82
CD44	1.08	1.01	1.11	1.11	1.09	1.06
ALX4	0.84	0.9	0.95	0.91	0.93	0.91
CCND2	0.96	1.18	1.46	0.96	1.38	1.36
H2AFJ	1.01	0.94	1	0.92	1.05	0.98
PKP2	1.03	1.02	1.09	0.96	1.08	0.99
CDK4	1.06	1	1.04	0.95	1.05	0.95
MDM2	1.03	0.99	1.05	1.02	1.08	1.01
BRCA2	0.95	0.94	0.96	0.87	0.91	0.93
RB1	0.98	0.95	0.94	0.96	0.91	0.88
SPRY2	1.04	0.97	0.96	0.91	0.78	0.91
CHD8	1.06	1	1	1.03	0.92	0.97
ATL1	1	1.11	0.97	0.87	0.95	1.03
NUMB	1.04	1.01	0.96	0.92	0.91	0.98
TRPM1	0.99	1.51	1.2	0.94	0.96	0.98
SPRED1	1.11	1.47	1.16	1	0.97	1.14
FBN1	0.65	1.05	0.83	0.51	0.48	0.57
NF1	0.9	0.88	0.89	0.88	0.84	0.94
HNF1B	1	1.04	1.07	0.99	1.01	1.1
BRIP1	0.97	0.99	0.97	0.92	0.92	0.95
STK11	0.96	0.95	0.9	0.87	0.99	0.92
CACNA1A	1.03	1.05	1.13	1.06	1.09	1.1
FKBP8	0.94	1.06	1.01	0.93	1.08	1.09
CCNE1	0.97	0.94	1.08	0.92	1.09	1.08
AURKC	0.93	0.99	0.97	0.89	1	0.95
SOX12	1.05	1.04	1.1	0.92	1.12	1.1
JAG1	1.05	1.04	1.1	1.1	1.14	1.03
PYGB	0.91	0.95	0.98	0.93	1	0.89
ID1	0.93	0.94	0.92	0.9	0.98	0.99
ZMYND8	0.98	0.98	0.93	0.91	0.9	0.86
KCNQ2	1	1.08	1.08	1.05	1.05	1
BID	0.97	1.06	1.02	0.72	0.96	0.98
NF2	1.04	1.09	1.02	0.75	1	1.07
WNT7B	0.98	1.1	1.01	0.78	0.96	1.04

Tabelle A.6: Auflistung von BN035-MLPA-Ratios.

Sonde	PA	1-C03	1-D02	2-B03	2-B09	2-F08	3-D09	3-F03	3-G10	4-F02
CHD5	1,37	1,12	1,39	1,63	1,19	1,6	1,65	1,56	1,23	1,3
RPA2	1,38	1,18	1,37	1,49	1,1	1,57	2,31	1,59	1,28	1,19
CDKN2C	0,29	0,12	0,29	0,33	0,6	0,34	0,22	0,34	0	0
NTNG1	0,85	0,68	0,9	0,9	0,63	0,97	1,35	0,99	0,6	0,6
MDM4	1,16	1,35	1,52	1,28	1,17	1,57	1,56	1,8	1,07	1,46
AKT3	1,19	1,17	1,25	1,3	0,84	1,26	0,95	1,21	0,57	0,84
NAG	0,96	1,08	1,18	0,81	1,03	0,91	1,14	1,26	1,16	1,28
MYCN	1,05	1,04	1,08	0,98	1	0,96	1,27	1,23	1,17	1,31
APOB	1,11	1,13	1,27	0,91	1,08	1	1,21	1,23	1,16	1,27
PIK3CA	1,3	1,38	1,41	0,81	1,29	0,96	1,06	1,54	1,34	1,59
SOX2	0,99	0,95	0,94	0,71	0,82	1,1	0,73	1,11	0,96	1,09
OPA1	1,27	1,18	1,28	0,85	1,07	1,02	0,96	1,12	0,98	1,08
PDGFRA	1,34	1,02	1,13	1,12	1,07	1,32	1,02	1,37	1,22	1,31
KIT	1,2	1,02	1,04	0,98	1,03	1,13	0,86	1,15	1,02	1,12
SIM1	1,19	1,08	1,13	1,28	1,11	1,22	0,85	1,2	1,21	1,09
SGK1	1,34	1,26	1,31	1,22	1,02	1,26	0,95	1,2	1,39	1,24
ESR1	1,3	1,16	1,07	1,33	1,15	1,28	1	1,06	1,2	1,07
PARK2	1,34	1,27	1,17	1,21	1,15	1,28	1,25	1,24	1,3	1,16
PDGFA	1,71	1,78	1,98	1,64	1,97	1,79	1,87	1,98	1,95	2,14
TWIST1	1,23	1,38	1,24	1,18	1,17	1,41	1,11	1,27	1,08	1,2
FKBP9	1,42	1,59	1,56	1,29	1,57	1,53	1,49	1,66	1,63	1,75
EGFR	1,5	1,49	1,48	1,37	1,47	1,42	1,43	1,33	1,19	1,28
GUSB	1,37	1,59	1,57	1,26	1,51	1,32	1,23	1,54	1,41	1,61
CDK6	1,33	1,6	1,67	1,2	1,83	1,34	1,52	1,75	1,33	1,8
MET	1,17	1,31	1,18	1,15	1,13	1,09	0,73	1,1	0,88	0,97
PRSS1	1,11	1,36	1,39	1,43	1,48	1,31	1,04	1,43	1,27	1,4
XRCC2	1,47	1,62	1,68	1,29	1,52	1,26	1,22	1,49	1,44	1,49
GLDC	1,16	1,06	1,07	1,23	0,84	0,97	1,09	1,02	1,29	1,15
CDKN2A	0	0	0	0	0	0	0,32	0,07	0	0
CDKN2B	0	0	0	0	0	0	1,13	0,24	0	0
ELAVL2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LINGO2	0	0	0	0	0	0	0,35	0,07	0	0
GRHR	0,88	0,81	0,89	0,93	0,84	1	0,62	0,82	0,96	0,84
ZMYND11	0,61	0,58	0,6	0,65	0,61	0,64	0,81	0,65	0,63	0,54
OPTN	0,58	0,54	0,53	0,64	0,65	0,62	0,48	0,62	0,56	0,55
CREM	0,65	0,58	0,56	0,66	0,6	0,71	0,64	0,67	0,61	0,6
NEUROG3	0,78	0,63	0,6	0,74	0,61	0,7	0,24	0,59	0,73	0,66
PTEN	0,67	0,66	0,64	0,65	0,57	0,62	0,47	0,58	0,66	0,53
MGMT	0,8	0,73	0,81	0,82	0,67	0,73	0,63	0,76	0,79	0,72
PAX6	0,94	1,01	1,02	0,84	0,95	0,96	1,06	1,15	1,3	1,66
CD44	1,1	1,19	1,13	0,83	0,94	0,77	0,99	1,1	1,32	1,6
ALX4	0,99	1,06	1,1	0,9	1,03	1,04	0,89	1,16	1,43	1,76
CCND2	0,79	1	0,98	0,98	0,75	1,06	0,69	1,08	0,92	0,93
H2AFJ	1,25	1,41	1,46	1,21	1,3	1,21	1,23	1,54	1,52	1,65
PKP2	1,25	1,32	1,31	1,1	1,1	1,24	1,02	1,38	1,29	1,33
CDK4	0,8	0,86	0,86	0,98	0,58	1,13	0,57	0,94	0,8	0,93
MDM2	1,2	1,35	1,42	1,04	1,28	1,13	1,28	1,43	1,27	1,48
BRCA2	1,08	0,97	1,02	1,2	0,56	0,93	0,66	1,12	1,1	1,04
RB1	1,04	0,99	1,01	1,18	0,59	0,97	0,69	1,12	1,1	1,02
SPRY2	0,93	0,79	0,72	0,85	0,52	0,89	0,65	0,8	0,77	0,68
CHD8	0,75	0,66	0,71	0,7	0,64	0,67	0,86	0,71	0,74	0,63
ATL1	0,56	0,53	0,59	0,72	0,58	0,74	0,27	0,61	0,62	0,56
NUMB	0,59	0,55	0,64	0,63	0,61	0,69	0,53	0,61	0,6	0,62
TRPM1	1,18	1,25	1,32	1,41	1,23	1,27	2,18	1,43	1,07	1,29
SPRED1	1,23	1,21	1,16	1,17	1,09	1,19	0,8	1,17	1	1,1
FBN1	1,24	1,15	1,16	1,33	1,14	1,27	0,27	1,18	1,01	1,13
NF1	1,15	1,07	1,05	0,96	0,83	1,05	0,48	1,07	1,07	1
HNF1B	1,4	1,25	1,35	1,26	1,09	1,28	1,36	1,19	1,47	1,28
BRIP1	1,16	1,04	1,09	1,15	1,11	1,25	0,95	1,17	1,22	1,14
STK11	0,98	0,69	0,9	0,57	1,14	0,93	0,76	1,03	0,92	1,2
CACNA1A	0,98	0,67	0,89	0,6	1,1	0,92	0,82	0,89	0,78	0,92
FKBP8	0,35	0,29	0,35	0,62	0,32	0,87	0,24	0,38	0,33	0,36
CCNE1	0,95	0,74	0,98	0,56	1,26	0,94	0,91	1,16	1,04	1,27
AURKC	0,87	0,6	0,82	0,58	0,94	0,95	0,83	0,87	0,78	0,84
SOX12	0,84	1,11	0,89	1,03	0,83	0,89	0,67	0,83	0,95	0,96
JAG1	0,98	1,18	0,92	1,07	0,93	0,86	0,85	0,83	0,98	1,03
PYGB	0,92	1,18	0,94	1,34	0,96	1,05	0,91	1,01	1,21	1,31
ID1	1	1,28	1,08	1,03	1,18	0,92	1,03	1,12	1,27	1,52
ZMYND8	1,07	1,29	1,12	1,14	1,23	1,02	1,14	1,17	1,37	1,56
KCNQ2	0,82	1,21	1,01	1,1	0,95	0,91	0,56	0,88	1,01	1,16
BID	0,79	0,68	0,72	0,66	0,66	0,69	0,79	0,74	0,7	0,68
NF2	0,81	0,7	0,72	0,68	0,7	0,73	0,43	0,69	0,72	0,67
WNT7B	0,79	0,77	0,76	0,7	0,62	0,64	0,69	0,7	0,7	0,73

Tabelle A.7: Auflistung von BN046-MLPA-Ratios.

Sonde	PA	1-C02	3-C10	3-G05	5-A10	5-D05	6-B05	6-B08	6-D11	6-G08	7-B03	7-D11	8-A10	8-F05	8-F09	8-G02	8-G07
CHD5	1,1	1,03	1,06	1,08	0,94	1,05	0,99	1,03	0,97	0,91	1,05	1,14	0,96	1,03	0,91	0,88	1,07
RPA2	1,06	1,03	0,99	1,02	1,09	0,86	1	1,12	1,03	0,93	0,86	0,87	0,97	1	0,89	0,83	0,84
CDKN2C	0,95	0,86	0,88	0,83	0,89	0,81	0,84	0,86	0,87	0,85	0,79	0,88	0,8	0,85	0,72	0,69	0,88
NTNG1	0,98	1	0,99	1,05	0,92	0,89	1,03	0,97	0,98	0,94	0,88	0,97	0,94	0,97	0,75	0,82	0,95
MDM4	0,53	1,16	1,03	1,24	0,77	0,9	0,87	0,86	0,9	0,92	0,87	1,01	0,92	1,03	0,69	0,81	1,04
AKT3	1,15	0,65	0,89	0,63	0,75	0,96	0,88	0,71	0,82	0,65	0,96	0,91	0,64	0,63	0,52	0,74	1,04
NAG	0,88	1,18	1,05	1,24	1,11	1,05	0,94	0,89	0,92	0,94	1,03	1,03	1,03	0,98	0,93	0,94	1,06
MYCN	1,09	1,19	1,16	1,21	1,03	1,05	1,05	1,11	1,08	1,16	0,91	0,98	1,17	1,27	1,21	1,05	1,11
APOB	1,02	1,24	1,12	1,22	1,2	1,2	1,14	1,3	1,1	1,16	1,12	1,12	1,23	1,2	1,12	1,15	1,16
PIK3CA	0,68	0,81	0,96	1,1	1,01	0,92	0,99	0,98	0,99	1	0,92	0,92	1,1	0,96	0,88	1,02	0,84
SOX2	0,6	0,9	1,18	1,15	0,86	0,96	0,92	0,74	0,95	0,98	0,84	0,82	1	0,99	0,94	0,89	0,81
QFA1	1,48	0,67	0,98	0,82	0,97	0,99	0,98	0,97	0,98	0,9	0,86	1,01	0,92	0,86	0,77	1,06	0,87
PDGFRA	1,36	0,96	1,09	0,97	0,99	1,07	0,99	1,02	1,03	1	1,08	0,94	1,05	1,05	1,15	1,08	1,07
KIT	1,43	0,9	0,92	0,87	0,99	1,01	0,91	0,89	0,95	0,89	1	1,01	0,85	0,83	0,81	1,05	1,08
SIM1	0,98	0,8	1,03	0,97	1,31	1,07	1,09	1,07	1,06	1,03	1	0,96	1,03	1,02	0,98	1,01	0,92
SGK1	0,94	0,78	0,94	0,98	1,12	0,97	1,04	1,08	1,05	1,02	0,8	0,75	1,01	1,08	0,99	0,94	0,68
ESR1	1,08	0,8	1,06	1	1,41	1,1	0,98	1,04	1,02	1,03	0,95	0,83	1,01	1,02	0,98	1,12	0,94
FARK2	1,1	0,71	1,06	1	1,12	1,06	1	0,99	0,95	1	0,91	0,94	1,02	1,03	0,96	0,93	1,06
PDGFA	2,52	2,14	2,36	2,14	1,9	1,79	2,11	2,07	2,21	2,29	1,79	1,94	2,33	2,48	2,29	1,71	1,71
TWIST1	1,65	1,57	1,46	1,49	2,2	1,96	1,39	1,23	1,42	1,3	1,86	1,83	1,28	1,24	0,98	1,48	1,75
EKBP9	1,7	2,02	2,02	2,08	1,95	1,74	1,87	1,75	1,95	1,9	1,82	1,94	1,94	2,03	1,75	1,87	1,66
EGFR	4	2,54	4	4	4	2,13	3,98	3,81	4	1,97	2,12	1,9	4	2,5	3,3	4	3,16
GUSB	1,69	1,93	1,78	2,1	1,92	2	1,83	1,69	1,79	1,85	2,01	1,8	1,89	1,77	1,67	1,74	1,87
CDK6	1,47	2	1,87	2,1	1,94	1,58	1,71	1,43	1,79	1,65	1,67	1,68	1,83	1,59	1,54	1,5	1,53
MBT	2,07	1,32	1,37	1,32	1,99	2,12	1,58	1,27	1,49	1,31	2,02	1,68	1,33	1,21	1,01	1,53	1,91
PRSS1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
XRCC2	2,14	1,76	1,82	1,79	1,85	1,8	1,81	1,57	1,8	1,75	1,66	1,92	1,79	1,69	1,76	1,86	1,47
GLDC	1	1,02	1,01	1	1,16	1,07	1,06	0,98	1,01	1,03	0,99	0,95	0,99	0,95	1,05	1,02	0,89
CDKN2A	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDKN2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ELAVL2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LINGO2	0,52	0,5	0,5	0,49	0,39	0,55	0,53	0,55	0,5	0,47	0,52	0,49	0,45	0,47	0,44	0,49	0,53
GRHR	1	1,01	0,99	1,02	1,16	1,05	1,09	1,12	1,1	1,07	1,06	0,93	1,04	1,05	1,07	1,06	0,79
ZMYND11	0,54	0,54	0,51	0,56	0,68	0,5	0,54	0,56	0,51	0,54	0,52	0,54	0,53	0,53	0,49	0,51	0,5
OPTN	0,6	0,52	0,55	0,55	0,65	0,59	0,53	0,53	0,54	0,54	0,57	0,56	0,51	0,51	0,56	0,59	0,54
CREM	0,56	0,54	0,54	0,53	0,67	0,51	0,55	0,53	0,56	0,55	0,53	0,48	0,52	0,55	0,54	0,58	0,48
NEUROG3	0,66	0,53	0,58	0,56	0,78	0,57	0,55	0,58	0,55	0,55	0,57	0,56	0,54	0,59	0,58	0,56	0,67
PTEN	0,53	0,51	0,43	0,47	0,52	0,54	0,46	0,55	0,49	0,48	0,47	0,47	0,47	0,51	0,5	0,44	0,6
MGMT	0,68	0,69	0,75	0,7	0,83	0,7	0,71	0,73	0,7	0,76	0,68	0,64	0,74	0,73	0,75	0,7	0,63
PAX6	0,85	1,14	0,86	1,3	1,04	0,98	1	1,08	1,05	1,08	0,9	0,96	1,18	1,19	0,87	1,12	0,81
CD44	1,09	1,05	0,96	1,12	0,79	0,91	1,02	1,04	1,09	1,02	0,8	0,89	1,04	1,03	0,86	0,97	0,78
ALX4	0,92	1,19	0,89	1,29	0,93	0,99	1,05	1,08	1,04	1,07	0,84	0,97	1,23	1,19	0,92	1,04	0,77
CCND2	1,1	1,15	0,95	1,24	1,01	1,03	0,96	1,06	0,99	1,06	0,88	0,75	1,04	1,05	0,99	1,16	1,01
H2AFJ	1,34	1,08	1,03	1,18	0,97	0,98	1,01	0,96	1,01	1,1	0,81	0,71	1,1	1,11	1,02	1,07	0,95
PKP2	1,13	1,13	1	1,29	1	0,96	1,05	1,12	1,01	1,05	0,9	0,82	1,2	1,08	1,08	1,14	0,98
CDK4	1,27	1,06	0,86	1,04	0,96	0,98	0,87	0,94	0,85	0,88	0,84	0,76	0,91	0,85	0,87	0,93	0,91
MDM2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3,07	4	4	4	4	4
BRCA2	1,05	0,77	1,01	0,96	1,24	1,06	1,05	1,03	1,02	0,98	0,92	1	1,03	1,03	1,04	1,05	0,99
RB1	1,02	0,73	1,03	0,9	1,26	0,96	0,99	0,98	0,97	0,92	0,91	0,97	0,9	0,94	0,93	0,91	1
SPRY2	1,02	0,71	0,87	0,73	0,93	0,73	0,72	0,8	0,72	0,62	0,65	0,82	0,64	0,59	0,76	0,71	0,88
CHD8	1,06	1,01	1	0,95	0,97	1,1	0,98	1,06	0,97	0,94	1,01	0,97	0,97	1,01	0,91	0,98	0,91
ATL1	1,1	1,12	1,06	0,98	1,15	0,96	1,04	0,98	1,02	1,06	0,95	0,96	0,95	1,01	0,98	1,02	0,71
NUMB	1,11	0,99	1,06	0,96	1,34	1,03	1	0,98	0,94	1,03	0,95	0,97	0,93	0,94	0,97	1,02	0,78
TRPM1	1,23	0,93	1,09	0,94	1,01	1,18	1	1,15	0,92	0,98	1,02	0,99	0,94	0,88	0,97	0,96	1,41
SPRED1	0,97	0,95	0,88	0,82	0,84	0,79	0,82	0,93	0,86	0,72	0,69	0,8	0,73	0,72	0,82	0,78	0,69
FBN1	1,16	0,98	1,1	0,96	1,43	1,03	0,96	1,05	0,97	0,94	0,9	0,97	0,94	0,87	0,99	0,97	1,03
NF1	0,57	0,9	0,85	0,86	1,02	0,96	0,91	0,95	0,89	0,9	0,93	1,05	0,68	0,94	0,86	0,89	1
HNF1B	1,01	0,98	1	1,02	0,95	1,05	1,05	1,1	1,09	1,11	1,03	0,91	0,79	1,15	1,01	1	0,91
BRIP1	1,02	1,04	1,02	0,94	1,22	1,09	1,13	1,02	1,08	1,04	1,03	0,99	0,85	1,13	1,07	1,14	0,99
STK11	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
CACNA1A	1,22	0,85	0,9	0,83	1,08	1,12	0,93	0,94	0,86	0,85	1,04	1,04	0,83	0,82	0,62	1,11	1,05
FKBP8	1,07	0,75	1,09	0,65	0,83	0,76	0,87	0,82	0,84	0,89	0,82	1,02	0,89	0,87	0,56	1,12	0,85
CCNE1	0,78	1,19	1,03	1,32	1,01	0,95	0,98	0,94	0,96	1,05	0,99	0,96	1,13	1,03	0,81	1,05	1,02
AURKC	2,13	0,93	1	0,85	1,11	1,05	0,96	1,03	0,99	0,91	0,98	0,99	0,92	0,97	0,89	0,96	1,1
SOX12	1,52	1,35	1,33	1,33	1,59	1,57	1,26	1,27	1,26	1,32	1,36	1,35	1,5	1,28	1,17	1,52	1,42
JAG1	2,11	1,1	1,37	1,32	1,25	1,38	1,32	1,26	1,38	1,22	1,22	1,37	1,19	1,22	1,04	1,24	0,77
PYGB	1,5	1,55	1,66	1,52	1,62	1,71	1,43	1,53	1,51	1,43	1,57	1,45	1,53	1,54	1,49	1,39	1,68
ID1	1,11	1,61	1,41	1,67	1,65	1,38	1,24	1,23	1,24	1,26	1,36	1,37	1,39	1,22	1,15	1,27	1,44
ZMYND8	1,41	1,94	1,71	1,92	1,47	1,29	1,28	1,25	1,4	1,35	1,35	1,33	1,39	1,4	1,38	1,28	1,41
KCNQ2	1,4	1,41	1,32	1,48	1,65	1,63	1,19	1,15	1,15	1,16	1,76	1,59	1,18	1,14	1,18	1,45	1,74
BID	1,1	1,04	1,04	0,96	0,91	0,78	0,93	1,06	0,92	0,95	0,9	0,95	0,92	0,99	0,96	0,92	0,88
NF2	1,15	1	1,09	0,92	0,83	0,96	0,92	1,11	1,11	0,95	0,95	1,01	0,97	0,97	0,96	1,03	0,87
WNT7B	0,91	1,04	0,97	0,99	0,81	0,82	1,02	0,77	1,03	1,01	0,93	0,95	1	0,94	0,96	0,93	0,77

Tabelle A.8: Auflistung von BN055-MLPA-Ratios.

Sonde	PA	1-B10	1-C01	1-F10	1-G07	2-B09	2-E10	2-H03	3-D07	3-F06	3-G04	4-A07	4-C02	4-G05	5-C11	7-B04	7-D04	7-F09	7-G04
CHD5	1,01	0,89	0,99	1,17	1,02	0,89	1,22	0,86	0,95	0,95	0,73	1,18	0,92	0,92	0,81	0,83	1,02	1	0,97
RPA2	1,06	0,99	0,88	1,11	1,53	1,17	0,93	0,99	0,89	1,15	0,88	1,07	0,97	1,41	0,58	1,24	0,26	1,05	1,02
CDKN2C	0,95	0,99	0,95	1,19	0,99	0,97	1,07	0,9	1,01	0,98	0,83	1,25	0,96	0,85	0,76	0,71	0,73	0,78	0,82
NTNG1	0,99	0,99	1,01	1,16	1,1	0,89	1,22	0,83	1,09	0,99	0,76	1,23	0,93	0,94	0,84	0,84	0,79	0,9	0,98
MDM4	1,11	1,01	0,99	1,16	1,42	1,1	1,12	0,92	0,95	0,92	1,05	1,01	0,95	1,06	0,7	1,21	1,22	1,13	1,31
AKT3	0,96	1,27	1,02	1,42	1,46	1,17	1,44	0,99	1,32	1,12	1,12	1,13	1,35	1	1,09	1,09	0,81	0,96	0,88
NAG	0,81	0,62	0,79	0,83	0,97	0,82	0,84	0,69	0,61	0,78	0,72	0,92	0,99	0,78	0,63	0,98	0,97	0,84	0,99
MYCN	0,92	0,69	0,73	1,1	0,98	0,77	0,97	0,63	0,73	0,79	0,68	0,85	0,94	0,78	0,8	1,12	0,93	0,87	0,95
APOB	0,86	0,9	0,82	1,1	1,13	0,76	0,86	0,63	0,9	0,76	0,8	0,92	0,95	0,76	0,97	0,97	0,97	0,9	1,02
PIK3CA	1,04	1,1	1,01	1,41	1,37	0,94	0,78	0,85	0,89	1,22	1,09	1,62	1,1	1,06	1,06	0,98	1,2	1,15	1,23
SOX2	1,71	1,27	1,28	1,82	2	0,96	0,92	1,01	1,16	1,39	1,42	1,84	1,1	1,49	1,23	1,22	1,55	1,28	1,41
OPA1	1,13	1,18	1,04	1,81	1,35	1,08	0,92	0,95	1,11	1,38	1,38	1,81	1,48	1,04	1,42	1	0,87	1,06	0,93
PDGFRA	1,22	0,81	0,77	1,19	2,68	0,81	3,78	0,86	0,9	0,83	0,74	3,6	1,11	0,74	0,96	0,97	0,84	0,79	0,8
KIT	1,16	1,04	0,76	1,24	2,37	0,9	3,41	0,98	1,07	0,96	0,95	4	1,19	0,82	1,18	1,02	0,73	0,78	0,81
SIM1	1,09	0,99	0,97	1,24	1,14	0,99	1,17	1,04	1,11	1,18	0,97	1,64	1,1	1	1,04	0,87	0,92	0,97	1,01
SGK1	1,13	0,92	0,89	1,12	1,64	1,11	0,88	1,13	0,91	1,4	1,14	1,34	1,22	1,65	0,64	1,15	1,12	1	1,03
ESR1	1,12	1,01	1,07	1,19	1,16	1,1	1,21	1,04	1,05	1,23	1,02	1,56	1,14	0,97	1,05	0,94	0,96	0,92	1,04
PARK2	1,18	1,04	1,05	1,07	1,04	1,05	1,13	0,97	1,01	1,19	1,12	1,55	1,09	0,97	1,01	0,86	0,4	1,07	1,09
PDGFA	1,01	0,71	0,77	1,6	1,24	0,65	1,03	0,66	0,69	0,96	0,69	1,02	0,99	0,81	0,94	1,08	0,93	0,88	0,92
FKBP9	1,01	0,89	0,82	1,45	1,4	0,77	0,85	0,83	0,83	1,01	0,85	1,16	0,97	0,86	1,11	1,08	0,91	0,86	0,9
EGFR	1,01	0,88	0,81	1,58	1,41	0,79	0,91	0,83	0,92	1,21	0,74	1,11	1,19	0,87	1,2	1,05	0,68	0,75	0,71
GUSB	1,13	0,9	0,89	1,27	1,27	0,82	0,87	0,91	0,93	1,1	0,79	1,21	1,04	0,83	1,26	1,06	0,9	0,81	1,02
CDK6	1,03	0,86	0,76	1,36	1,34	0,87	0,74	0,87	0,78	1,09	0,81	1,18	0,97	0,82	1,1	0,95	0,95	0,9	0,97
MET	1	1,26	0,9	1,28	1,33	0,87	0,87	0,98	1,2	1,21	0,82	1,3	1,19	0,85	1,49	1,01	0,71	0,88	0,85
PRSS1	1,3	1,14	1,05	1,36	1,42	1,06	0,96	1,13	1,23	1,22	1,06	1,54	1,04	0,95	1,52	1,38	1,33	1,41	1,33
XRCC2	0,97	0,89	0,76	1,48	1,44	0,77	0,88	0,81	0,89	1,11	0,81	1,14	1,12	0,86	1,29	1,08	0,79	0,82	0,86
GLDC	0,96	0,64	0,84	1,17	1,19	0,75	1,19	0,72	0,7	1,2	0,78	1,57	0,79	0,8	0,87	1,01	0,94	0,82	0,77
CDKN2A	0,98	0,7	0,7	1,02	1,79	0,88	0,84	0,73	0,67	1,36	0,86	1,47	0,86	1,23	0,64	1,3	0,71	0,62	0,64
CDKN2B	1,16	1,01	0,88	1,47	1,16	0,85	1,14	0,62	1,09	1,02	0,87	1,13	0,87	1,07	0,93	1,56	0,73	0,79	0,79
ELAVL2	1,04	0,84	0,97	1,36	1,03	0,79	1,53	0,55	0,95	1,05	0,9	1,11	0,82	0,76	1,28	1,09	1,64	0,86	0,95
LINGO2	1,06	0,8	0,84	1,25	1,17	0,89	1,33	0,58	0,95	1,23	0,84	1,22	0,87	0,89	1,1	1,03	0,87	0,72	0,84
GRHRP	1,01	0,67	0,74	0,98	1,44	0,8	1,02	0,71	0,62	1,24	0,77	1,54	0,84	1,09	0,66	1,32	0,91	0,75	0,74
ZMYND11	0,56	0,47	0,55	0,6	0,57	0,49	0,66	0,59	0,55	0,65	0,47	0,95	0,55	0,55	0,53	0,8	0,5	0,52	0,52
OPTN	0,54	0,47	0,55	0,58	0,51	0,52	0,68	0,59	0,47	0,57	0,5	1,02	0,46	0,48	0,55	0,8	0,57	0,52	0,51
CREM	0,56	0,52	0,5	0,61	0,62	0,53	0,59	0,6	0,49	0,66	0,5	0,99	0,59	0,53	0,51	0,86	0,44	0,47	0,5
NEUROG3	0,58	0,5	0,54	0,73	0,56	0,59	0,64	0,61	0,65	0,63	0,61	0,84	0,56	0,49	0,88	0,78	0,22	0,52	0,57
PTEN	0,58	0,59	0,58	0,77	0,53	0,68	0,63	0,58	0,69	0,57	0,78	0,79	0,6	0,53	0,61	0,82	0,65	0,56	0,57
MGMT	0,73	0,55	0,57	0,72	0,77	0,6	0,7	0,58	0,55	0,78	0,63	1,07	0,64	0,61	0,62	0,95	0,43	0,65	0,61
PAX6	0,86	0,79	0,77	1,13	1,16	0,74	0,84	0,59	0,75	0,81	0,72	0,97	0,89	0,79	0,57	1,04	0,91	0,86	0,95
CD44	0,87	0,77	0,69	1,13	1,05	0,91	0,83	0,59	0,81	0,84	0,75	1,1	1,03	0,8	0,56	1,03	0,9	0,72	0,75
ALX4	0,81	0,75	0,74	1,04	1,02	0,74	0,84	0,6	0,76	0,74	0,83	0,99	0,91	0,75	0,61	0,97	0,91	0,88	0,98
CCND2	0,92	0,62	0,64	0,8	1,21	0,54	1,09	0,62	0,6	1	0,54	1,04	0,92	0,54	0,62	0,92	0,64	0,56	0,76
H2AFJ	0,92	0,56	0,58	1,4	0,49	1,14	0,58	0,57	1,06	0,52	0,97	0,88	0,59	0,55	0,94	0,67	0,71	0,64	0,74
PKP2	0,95	0,59	0,61	0,99	1,36	0,57	1,11	0,65	0,59	1,02	0,56	1,01	0,97	0,54	0,57	1,01	0,75	0,66	0,74
CDK4	0,9	0,61	0,59	0,71	1,31	0,56	1,05	0,63	0,55	1	0,6	1,06	0,99	0,56	0,56	0,96	0,61	0,73	0,68
MDM2	0,93	0,6	0,54	1,08	1,36	0,62	1,1	0,68	0,62	1,07	0,58	1,08	1,07	0,54	0,65	0,95	0,61	0,43	0,58
BRCA2	1,11	0,9	1,07	1,19	1,02	0,93	1,29	0,89	1,1	1,09	0,95	1,76	1,05	0,89	1,07	1,15	0,86	1,01	0,97
RB1	1,04	1,11	0,98	1,32	1,08	1	1,11	0,93	1,19	1,18	1,07	1,79	1,03	0,97	1,27	1,13	0,77	0,93	0,91
SPRY2	1,08	1,06	1,09	1,29	1,15	1,08	1,19	0,94	1,12	1,17	1,18	1,7	1,16	1,04	0,99	1,18	0,9	0,77	0,93
CHD8	0,58	0,47	0,57	0,66	0,56	0,6	0,63	0,62	0,65	0,59	0,58	0,66	0,58	0,57	0,51	0,82	0,66	0,45	0,59
ATL1	0,62	0,44	0,58	0,62	0,61	0,53	0,65	0,61	0,51	0,6	0,5	0,89	0,49	0,54	0,52	0,85	0,51	0,57	0,5
NUMB	0,62	0,56	0,61	0,68	0,57	0,54	0,66	0,6	0,61	0,64	0,57	0,84	0,56	0,53	0,62	0,75	0,48	0,52	0,52
TRPM1	0,93	0,55	0,75	1,1	1,04	0,56	1,56	0,41	0,75	0,77	0,75	1,17	0,59	0,59	1,28	0,89	1,15	0,45	0,58
SPRED1	0,82	0,56	0,46	0,93	1,45	0,61	1,02	0,45	0,56	0,96	0,65	1,22	0,59	0,7	0,81	0,99	0,58	0,53	0,56
FBN1	0,67	0,52	0,6	0,72	0,87	0,56	0,98	0,48	0,61	0,58	0,63	1,08	0,58	0,52	0,89	0,79	0,59	0,52	0,54
NF1	0,97	0,82	0,96	1,05	0,97	0,83	1,12	0,87	0,9	0,92	1,11	1,11	0,77	0,86	0,89	0,65	0,87	0,89	0,85
HNF1B	1,14	1,02	1,05	1,23	1,56	1,24	1,04	1,48	1,02	1,31	1,2	1,56	1,46	1,62	0,79	1,41	1,22	1,09	1,17
BRIP1	1,06	0,97	1,09	1,2	1,2	1,03	1,22	1,16	1,05	1,19	0,96	1,65	1,16	1,09	1,03	0,71	0,93	0,95	0,98
STK11	1,18	0,9	1,01	1,12	1,3	0,99	0,96	0,8	0,82	0,97	0,99	1,07	1	0,88	1,25	1,12	1,11	1,17	1,17
CACNA1A	0,99	1,01	0,85	1,52	1,29	0,72	1,21	0,78	0,99	1,03	0,77	1,15	1,2	0,84	1,38	0,97	0,83	0,88	0,84
FKBP8	1,03	0,97	0,81	0,6	1,26	0,87	1,17	0,81	1,02	1,13	0,82	1,18	1,18	0,84	1,33	0,91	0,89	0,89	0,82
CCNE1	1,06	0,72	0,83	1,12	1,29	0,73	1,14	0,73	0,71	0,92	0,77	1,07	0,93	0,8	0,98	0,99	0,99	0,79	1,13
ATKCC	0,95	0,6	0,54	1,64	1,46	0,54	1,22	0,48	0,56	1,12	0,52	1,18	1,16	0,57	1,03	0,75	0,84	0,5	0,5
SOX12	0,79	0,92	0,85	0,63	0,97	0,85	0,8	0,92	0,9	0,82	0,9	0,99	1,07	0,79	0,91	1,19	0,89	0,88	0,84
JAG1	0,85	0,92	0,76	0,94	0,97	0,83	0,88	0,99	0,99	0,94	0,96	0,97	1,1	0,79	1,01	1,3	0,7	0,72	0,72
PYGB	0,94	0,76	0,72	0,92	0,86	0,65	0,87	0,76	0,78	0,75	0,81	1,05	0,98	0,84	0,83	1,25	0,85	0,63	0,74
ID1	0,96	0,75	0,71	0,93	0,98	0,79	0,69	0,87	0,68	0,82	0,7	1,06	1,03	0,85	0,85	1,			

	GNV019	BN035	BN046	BN055	BN118
Perifosine	5,5	2,26	3,15	1,58	1,91
Imatinib	1,3	1,35	1,77	2,36	2,24
Gefitinib	1,6	1,42	1,55	2,76	1,5
PD 0332991	18,68	6,08	1,68	1,16	1,67
Cabozantinib	1,87	1,66	1,7	1,4	2,36
Pelitinib	2,9	1,87	1,99	2,38	3,42
Sorafenib	3,24	1,32	1,36	1,64	1,49
Sunitinib	2,85	1,24	1,65	1,4	2,1
Dacomitinib	3,76	1,93	1,66	1,37	2,5
Enzastaurin	2,35	2,06	3,79	2,73	2,42
Dasatinib	65,29	1,95	113,91	2,47	10,72
17-AAG	2,63	2,01	20,84	3,66	2,03
Bortezomib	1,25	1,85	2,51	2,28	8,18
CCNU [†]	1,89	1,32	2,47	2,93	2,27
Cisplatin [†]	2,94	3,35	2,69	4,36	10,21
Lonafarnib [†]	6,26	1,73	1,56	1,87	1,43
Mibefradil [†]	1,97	1,24	1,53	1,8	2
Etoposide [†]	10,11	6,22	3,79	12,39	3,46
SAHA [†]	4,43	2,31	3,59	2,08	3,81
TMZ	4,2	1,69	2,62	2,29	3,84
Median	2,92	1,86	2,23	2,285	2,315

Tabelle A.10: Ratios von IC_{50} -Werten der resistentesten und sensitivsten Subklone pro Individuum für alle 20 Substanzen. [†]In Kombination mit $50 \mu M$ TMZ.

Code	Parental	SK1	SK2	SK3	SK6	SK7	FIBRO	U-87
1A02	0,0	1,3	0,0	0,0	21,9	0,0	0,0	0,0
1A03	13,5	11,0	0,0	4,4	7,2	6,7	90,5	95,7
1A04	30,1	11,0	12,2	20,4	13,6	16,2	44,9	8,0
1A05	52,9	9,5	0,0	0,0	4,3	0,9	105,4	60,9
1A06	88,6	92,3	71,6	93,7	74,9	92,1	107,5	95,0
1A07	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1A08	102,7	96,4	87,9	94,5	72,9	98,7	108,0	100,0
1A09	103,4	116,4	96,2	110,4	99,7	105,1	110,2	111,3
1A10	96,6	111,4	95,3	97,6	103,6	82,7	113,6	114,2
1A11	107,4	98,8	83,0	102,4	115,1	82,9	101,1	105,1
1B02	90,6	68,9	83,0	113,7	109,5	69,3	84,2	94,6
1B03	83,4	8,1	43,5	38,9	44,6	36,3	81,3	97,4
1B04	99,3	105,7	87,6	96,3	96,9	103,4	84,1	88,6
1B05	0,0	2,5	0,0	0,0	0,4	0,0	35,2	1,3
1B06	93,8	112,0	61,6	104,7	87,8	105,2	81,5	95,0
1B07	6,5	26,7	0,0	0,0	0,5	0,0	45,0	14,4
1B08	99,9	111,6	82,3	85,2	78,9	113,0	81,6	97,9
1B09	103,4	107,5	79,9	102,1	100,9	105,1	89,7	99,4
1B10	98,0	123,8	88,5	104,0	109,7	102,2	107,3	106,2
1B11	84,2	100,5	72,7	89,5	110,3	70,7	90,2	104,6
1C02	100,0	116,2	83,2	127,6	112,1	106,0	91,2	95,0
1C03	94,1	87,5	97,3	88,6	93,0	89,2	82,8	97,0
1C04	94,6	93,0	84,4	69,8	99,3	104,1	88,7	87,2
1C05	94,7	93,1	87,6	90,5	90,5	93,9	83,9	82,1
1C06	91,2	103,5	75,9	102,4	93,8	114,8	77,6	92,0
1C07	100,3	114,3	96,2	98,3	92,4	104,7	83,8	94,4
1C08	95,4	100,1	86,1	99,6	83,9	105,5	91,8	92,3
1C09	3,9	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	53,4	10,1
1C10	96,8	125,1	86,1	95,2	124,8	105,8	94,5	105,4
1C11	10,1	36,0	19,3	20,2	29,3	7,4	73,2	29,7
1D02	103,5	113,1	91,9	128,4	133,9	101,7	91,6	98,7
1D03	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	24,5	1,8
1D04	97,7	102,2	93,2	70,7	105,4	105,0	85,9	89,3
1D05	10,1	5,5	0,0	0,0	2,3	0,4	57,1	3,9
1D06	86,7	99,7	25,7	83,2	92,5	80,7	72,3	87,8
1D07	84,9	101,9	78,2	103,0	101,5	71,6	59,2	96,0
1D08	97,9	106,9	99,6	93,4	101,4	114,0	89,3	92,2
1D09	98,0	70,1	64,2	50,5	73,6	73,5	86,3	92,9
1D10	85,9	101,0	81,3	97,0	116,8	89,4	98,6	103,4
1D11	89,7	99,1	88,6	92,1	108,2	90,3	98,1	96,7
1E02	94,7	96,8	88,2	96,8	115,3	94,2	91,8	88,7
1E03	98,8	92,5	107,6	79,6	104,8	107,0	89,0	90,5
1E04	65,9	52,3	11,4	15,8	25,1	92,1	66,1	12,1
1E05	102,6	92,8	96,6	106,6	101,7	87,0	82,9	92,8
1E06	0,0	1,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1E07	62,8	107,1	89,1	100,6	96,9	91,2	74,7	68,3
1E08	110,6	105,7	96,2	93,0	99,4	114,7	84,0	101,0
1E09	0,0	2,6	0,0	4,8	5,3	0,0	63,0	7,7
1E10	95,6	100,0	108,1	101,5	116,0	107,0	89,2	95,1
1E11	73,8	95,0	82,6	84,6	96,4	78,8	86,9	92,8
1F02	65,0	60,8	103,3	111,1	90,4	40,9	72,6	50,2
1F03	99,7	99,6	107,9	98,1	107,2	109,6	90,5	105,8
1F04	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1F05	100,5	87,2	88,6	90,1	105,1	84,1	89,3	101,1
1F06	106,9	93,9	95,9	86,8	85,5	95,3	83,4	103,8
1F07	49,3	45,4	0,0	8,6	9,8	7,9	67,5	67,5
1F08	36,7	3,4	0,0	0,0	2,5	0,0	17,7	3,6
1F09	108,3	64,2	102,0	68,0	67,6	100,1	111,2	101,3
1F10	80,0	53,6	11,7	74,2	79,6	54,6	76,5	92,3
1F11	20,7	44,7	2,8	46,6	53,8	13,3	38,2	91,4
1G02	101,2	99,4	102,5	106,5	114,8	91,7	105,5	105,7
1G03	101,9	82,9	106,3	108,8	119,9	93,8	99,9	103,8
1G04	90,3	104,1	109,8	108,5	109,7	94,7	94,8	103,9
1G05	97,0	96,3	97,3	90,9	106,7	102,7	103,2	102,8
1G06	76,3	101,3	93,3	103,5	102,8	91,3	103,6	100,0
1G07	99,3	97,5	97,0	90,9	116,0	95,3	109,5	105,5
1G08	93,2	108,8	99,9	106,2	122,4	99,0	97,6	107,5
1G09	85,3	92,5	62,5	77,3	95,4	68,8	145,0	114,0
1G10	128,6	105,6	102,2	91,4	92,7	100,6	128,5	119,4
1G11	11,0	28,6	9,4	17,3	28,1	6,5	81,3	73,4
1H02	104,2	98,6	99,8	96,5	126,0	84,8	106,9	106,4
1H03	94,4	95,1	87,9	84,9	113,4	73,3	98,6	110,5
1H04	39,9	87,7	29,9	70,5	85,2	65,4	80,8	103,1
1H05	78,4	98,3	78,6	84,0	106,1	96,0	90,4	100,8
1H06	81,5	91,6	83,2	87,2	103,9	76,5	88,8	95,9
1H07	33,5	39,8	29,2	31,8	59,5	37,9	79,1	99,5
1H08	92,1	103,0	105,0	107,8	101,0	83,2	89,5	106,0
1H09	104,1	101,6	121,1	91,0	108,9	84,3	94,1	108,8
1H10	90,4	111,9	61,3	73,8	74,6	94,2	113,8	116,4
1H11	63,5	86,1	54,0	71,3	92,2	85,5	102,8	102,0

Tabelle A.11: Viabilitäts-Daten nach der Behandlung der GNV019-Kulturen mit den Substanzen der „Killer Collection“ (Teil 1). Angaben in Prozent gegenüber Lösungsmittelkontrolle.

Code	Parental	SK1	SK2	SK3	SK6	SK7	FIBRO	U-87
2A02	70,2	29,2	4,5	20,8	22,2	6,8	96,4	89,3
2A03	116,1	98,4	88,0	94,6	97,5	103,7	102,5	98,5
2A04	112,3	106,6	94,3	92,5	104,1	104,8	98,8	95,4
2A05	94,2	39,6	79,8	96,8	106,8	97,8	97,2	95,0
2A06	97,8	97,8	84,7	99,4	84,2	94,7	94,7	105,1
2A07	76,5	96,9	100,4	95,4	84,4	88,6	101,1	101,6
2A08	106,9	92,2	82,7	106,7	106,8	96,7	103,3	106,1
2A09	101,4	86,6	84,9	91,9	101,9	87,8	112,5	108,3
2A10	108,1	102,3	112,5	110,5	117,8	111,0	110,4	114,0
2A11	99,2	78,7	79,4	89,6	99,2	88,1	71,4	103,6
2B02	10,5	19,7	18,8	30,5	30,8	9,5	75,4	56,5
2B03	15,0	2,8	27,6	78,8	90,4	5,4	43,4	11,6
2B04	5,4	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	40,9	5,4
2B05	91,1	94,0	62,1	91,9	94,5	91,6	92,5	98,5
2B06	94,6	64,5	79,1	84,2	77,6	78,2	65,6	97,2
2B07	94,7	115,3	78,6	70,5	98,7	65,3	85,2	102,6
2B08	98,3	93,2	83,9	102,2	107,6	90,1	87,3	100,4
2B09	96,5	104,3	103,3	105,6	104,7	99,0	97,3	100,4
2B10	101,7	38,4	96,8	53,7	34,8	101,8	101,8	99,4
2B11	89,4	105,5	74,9	93,3	124,2	90,8	95,6	93,6
2C02	111,0	97,8	110,1	91,8	103,6	113,4	93,4	70,1
2C03	116,5	102,4	80,8	87,7	95,7	93,3	87,1	93,3
2C04	6,3	10,7	0,0	1,3	4,1	1,8	67,0	24,2
2C05	95,3	103,4	121,7	62,9	95,6	92,2	80,4	88,7
2C06	88,6	65,7	68,6	41,0	67,1	62,1	55,4	84,8
2C07	20,0	23,7	7,7	0,0	4,1	3,4	71,6	76,1
2C08	99,9	104,2	93,3	93,2	113,5	93,5	85,2	97,0
2C09	101,0	117,6	111,5	101,5	121,3	97,0	92,7	26,7
2C10	109,0	112,7	125,9	101,4	118,1	103,3	97,3	104,7
2C11	81,2	104,8	81,4	93,3	109,0	85,3	98,8	93,8
2D02	76,9	91,1	87,6	88,9	89,8	89,8	84,2	97,5
2D03	118,1	95,9	97,4	81,9	104,4	92,5	91,4	94,3
2D04	17,0	37,3	13,7	25,9	25,5	19,1	80,8	91,2
2D05	97,7	102,6	111,5	84,4	100,3	94,1	90,6	97,9
2D06	85,8	96,6	96,2	102,1	95,3	94,3	99,6	95,7
2D07	100,7	102,0	101,0	82,8	115,7	94,3	84,7	97,1
2D08	99,0	86,9	77,6	75,9	109,3	99,2	80,4	98,9
2D09	0,0	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	95,8
2D10	105,4	119,4	102,0	84,2	93,1	105,5	92,1	103,6
2D11	7,2	0,7	15,0	0,0	0,0	1,3	34,5	9,4
2E02	21,7	6,7	0,0	0,0	1,1	0,7	75,0	85,5
2E03	113,8	92,9	92,7	105,1	92,7	93,8	93,4	91,7
2E04	80,3	90,7	89,8	89,6	82,7	91,9	92,7	83,2
2E05	94,7	94,7	125,6	95,0	94,0	91,9	90,0	90,0
2E06	96,7	5,6	54,0	39,1	35,1	79,4	83,3	91,3
2E07	91,3	97,3	108,5	88,0	113,9	101,8	84,4	93,4
2E08	102,6	95,8	92,1	93,1	110,0	94,8	86,8	95,9
2E09	97,8	98,6	115,5	103,6	114,8	100,5	83,9	93,0
2E10	99,7	107,6	109,3	104,4	116,3	106,2	91,9	101,4
2E11	88,8	107,3	85,4	91,1	121,2	89,0	86,2	94,9
2F02	111,3	95,3	109,2	104,0	94,8	98,5	91,4	102,5
2F03	120,9	92,3	98,3	98,8	106,8	97,3	92,9	99,6
2F04	97,9	96,3	105,0	88,8	91,7	93,1	93,4	97,2
2F05	104,9	38,8	1,5	0,2	4,1	36,3	100,4	95,1
2F06	110,9	85,2	103,4	90,3	94,6	84,6	92,8	93,2
2F07	3,2	1,5	0,0	0,0	0,4	0,0	47,7	23,3
2F08	113,7	82,6	88,1	105,7	116,5	89,7	99,6	99,3
2F09	101,2	90,9	123,3	106,1	117,7	98,2	96,6	98,0
2F10	101,2	103,7	75,4	119,7	107,7	89,6	97,9	80,9
2F11	95,2	107,6	68,6	104,0	110,9	92,6	77,3	93,9
2G02	97,1	110,5	102,9	95,2	111,9	90,4	97,6	97,5
2G03	104,1	111,8	85,8	90,4	112,9	80,4	91,5	98,0
2G04	72,4	111,6	92,8	89,1	126,8	83,7	90,7	100,0
2G05	81,1	83,8	69,9	80,7	105,3	101,4	64,6	100,2
2G06	95,2	114,9	81,0	98,6	103,9	80,4	84,2	89,9
2G07	76,7	95,8	81,1	84,3	98,9	87,9	86,6	100,9
2G08	88,0	98,6	95,3	94,5	112,4	86,0	88,2	102,9
2G09	92,2	104,9	91,6	105,2	112,5	86,7	93,9	103,4
2G10	88,6	99,7	93,2	90,0	95,7	97,8	98,6	110,7
2G11	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	7,8	5,1
2H02	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	6,6	8,7
2H03	83,5	102,7	90,0	92,6	108,3	96,0	99,4	97,2
2H04	86,3	107,5	95,0	93,8	106,0	85,9	86,2	98,0
2H05	94,3	100,7	80,2	84,6	108,4	100,3	84,8	97,2
2H06	85,5	113,8	75,8	90,0	102,6	90,9	76,6	97,8
2H07	99,7	124,4	81,5	105,7	110,4	93,9	92,1	98,0
2H08	109,9	103,8	88,9	105,7	111,3	87,0	95,5	99,3
2H09	103,2	116,8	96,0	126,0	117,8	89,7	99,6	95,9
2H10	3,3	1,4	5,8	0,0	0,0	0,9	25,4	6,9
2H11	79,9	95,9	79,9	103,0	105,4	93,2	76,0	96,3

Tabelle A.12: Viabilitäts-Daten nach der Behandlung der GNV019-Kulturen mit den Substanzen der „Killer Collection“ (Teil 2). Angaben in Prozent gegenüber Lösungsmittelkontrolle.

Subklon	Kleinster Rang	Größter Rang	Mittlerer Rang
GNV019 SK1	1 / 5	5 / 5	2,10
GNV019 SK2	1 / 5	5 / 5	4,08
GNV019 SK3	1 / 5	5 / 5	2,70
GNV019 SK6	1 / 5	5 / 5	2,35
GNV019 SK7	1 / 5	5 / 5	3,78
BN035 1-D03	1 / 5	5 / 5	3,23
BN035 1-D11	1 / 5	5 / 5	3,05
BN035 2-F02	1 / 5	5 / 5	1,68
BN035 2-G04	3 / 5	5 / 5	3,98
BN035 2-G11	1 / 5	5 / 5	3,08
BN046 1-C03	2 / 9	9 / 9	5,23
BN046 1-D02	3 / 9	9 / 9	7,15
BN046 2-B03	2 / 9	9 / 9	5,38
BN046 2-B09	1 / 9	9 / 9	4,15
BN046 2-F08	1 / 9	9 / 9	5,00
BN046 3-D09	1 / 9	8 / 9	2,78
BN046 3-F03	1 / 9	9 / 9	5,65
BN046 3-G10	1 / 9	9 / 9	5,23
BN046 4-F02	1 / 9	8 / 9	4,45
BN055 1-C02	1 / 5	5 / 5	2,90
BN055 3-C10	2 / 5	5 / 5	3,85
BN055 6-G08	1 / 5	5 / 5	2,95
BN055 8-F05	1 / 5	5 / 5	3,20
BN055 8-G02	1 / 5	5 / 5	2,10
BN118 1-C01	2 / 9	9 / 9	5,98
BN118 1-F10	2 / 9	8 / 9	5,05
BN118 1-G07	1 / 9	9 / 9	4,75
BN118 2-E10	1 / 9	8 / 9	3,70
BN118 3-D07	3 / 9	9 / 9	6,35
BN118 4-A07	2 / 9	9 / 9	5,73
BN118 4-G05	1 / 9	9 / 9	6,50
BN118 7-F09	1 / 9	9 / 9	3,10
BN118 7-G04	1 / 9	8 / 9	3,85

Tabelle A.13: Intratumorale Rang-Analyse der Subklone. Für alle Subklone eines Tumors wurde die Rangfolge ihrer Sensitivität gegenüber allen 20 Substanzen (siehe Abbildung 5.3) anhand des Friedman-Tests ermittelt. Für jede Substanz wird dabei den sensitiven Subklonen ein niedriger und den resistenten Subklonen ein hoher Rang zugewiesen. In dieser Tabelle sind der jeweils kleinste und größte zugewiesene Rang von einer der 20 Substanzen sowie der durchschnittliche Rang aller Substanzen dargestellt.

Literaturverzeichnis

- J. E. Adair, S. K. Johnston, M. M. Mrugala, B. C. Beard, L. A. Guyman, et al. Gene therapy enhances chemotherapy tolerance and efficacy in glioblastoma patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9):4082–4092, 2014.
- D. H. Adams & B. M. Bowman. The Chemotherapy of Established Sarcoma 180 and Adenocarcinoma 755 Tumors with 6-Thioguanine. *Cancer Research*, 23:883–889, 1963.
- C. Adamson, O. O. Kanu, A. I. Mehta, C. Di, N. Lin, et al. Glioblastoma multiforme: A review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(8):1061–1083, 2009.
- C. A. Aktipis, A. M. Boddy, R. A. Gatenby, J. S. Brown, & C. C. Maley. Life history trade-offs in cancer evolution. *Nature Reviews Cancer*, 13(12):883–892, 2013.
- V. Almendro, A. Marusyk, & K. Polyak. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annual Review of Pathology*, 8(1):277–302, 2013.
- V. Almendro, Y.-K. Cheng, A. Randles, S. Itzkovitz, A. Marusyk, et al. Inference of Tumor Evolution during Chemotherapy by Computational Modeling and In Situ Analysis of Genetic and Phenotypic Cellular Diversity. *Cell Reports*, 6(3):514–527, 2014.
- S. J. Altschuler & L. F. Wu. Cellular heterogeneity: Do differences make a difference? *Cell*, 141(4):559–563, 2010.
- K. Anderson, C. Lutz, F. W. van Delft, C. M. Bateman, Y. Guo, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, 469(7330):356–361, 2011.
- N. Andor, T. A. Graham, M. Jansen, L. C. Xia, C. A. Aktipis, et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nature medicine*, 2015.
- A. Ashworth, C. J. Lord, & J. S. Reis-Filho. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell*, 145(1):30–38, 2011.
- S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120):756–760, 2006.

- S. Bao, Q. Wu, Z. Li, S. Sathornsumetee, H. Wang, et al. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Research*, 68(15):6043–6048, 2008.
- G. M. V. Barbagallo, M. D. Jenkinson, & A. R. Brodbelt. 'Recurrent' glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *British Journal of Neurosurgery*, 22(3):452–455, 2008.
- Bayer. Phase I Study of BAY1436032 in Isocitrate Dehydrogenase-1 (IDH1)-Mutant Advanced Solid Tumors. Aus: ClinicalTrials.gov [Internet]. *Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [2016 Juni 15]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02746081> NLM Identifier: NCT02746081*, 2016.
- P. L. Bedard, A. R. Hansen, M. J. Ratain, & L. L. Siu. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467):355–364, 2013.
- D. Beier, P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9):4010–4015, 2007.
- R. Beroukhim, G. Getz, L. Nghiemphu, J. Barretina, T. Hsueh, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50):20007–20012, 2007.
- H.-E. C. Bhang, D. A. Ruddy, V. Krishnamurthy Radhakrishna, J. X. Caushi, R. Zhao, et al. Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nature Medicine*, 21(5):440–448, 2015.
- K. H. Bleicher, H.-J. Böhm, K. Müller, & A. I. Alanine. Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(5):369–378, 2003.
- R. Bonavia, M.-d.-M. Inda, W. K. Cavenee, & F. B. Furnari. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Research*, 71(12):4055–4060, 2011.
- T. Bonnefoix, P. Bonnefoix, P. Verdiel, & J. J. Sotto. Fitting limiting dilution experiments with generalized linear models results in a test of the single-hit Poisson assumption. *Journal of Immunological Methods*, 194(2):113–119, 1996.
- A. A. Borisy, P. J. Elliott, N. W. Hurst, M. S. Lee, J. Lehar, et al. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13):7977–7982, 2003.
- C. W. Brennan, R. G. W. Verhaak, A. McKenna, B. Campos, H. Nounshmehr, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155(2):462–477, 2013.
- R. A. Burrell & C. Swanton. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular Oncology*, 8(6):1095–1111, 2014.

- P. J. Campbell, E. D. Pleasance, P. J. Stephens, E. Dicks, R. Rance, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35):13081–13086, 2008.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216):1061–1068, 2008.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Genome Characterization Center, K. Chang, C. J. Creighton, C. Davis, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10):1113–1120, 2013.
- Celldex Therapeutics. Phase III Study of Rindopepimut/GM-CSF in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma (ACT IV). Aus: ClinicalTrials.gov [Internet]. *Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [2016 Juni 15]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01480479> NLM Identifier: NCT01480479*, 2016.
- R. Chen, M. C. Nishimura, S. M. Bumbaca, S. Kharbanda, W. F. Forrest, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, 17(4):362–375, 2010.
- Z.-Y. Chen, W.-Z. Zhong, X.-C. Zhang, J. Su, X.-N. Yang, et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *The Oncologist*, 17(7):978–985, 2012.
- O. L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 370(8):709–722, 2014.
- S. Y. C. Choi, D. Lin, P. W. Gout, C. C. Collins, Y. Xu, et al. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79-80:222–237, 2014.
- M. F. Clarke, J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. M. Jamieson, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. In *Cancer Research*, pages 9339–9344, 2006.
- T. F. Cloughesy, W. K. Cavenee, & P. S. Mischel. Glioblastoma: From molecular pathology to targeted treatment. *Annual Review of Pathology*, 9(1):1–25, 2014.
- A. Crockford, M. Jamal-Hanjani, J. Hicks, & C. Swanton. Implications of intratumour heterogeneity for treatment stratification. *The Journal of Pathology*, 232(2):264–273, 2014.
- H. Cushing & P. Bailey. Classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. *JE Lippincott Comp., Philadelphia, London & Montreal*, 1926.

- P. Dalerba, T. Kalisky, D. Sahoo, P. S. Rajendran, M. E. Rothenberg, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nature Biotechnology*, 29(12):1120–1127, 2011.
- G. Damia & M. D’Incalci. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents—what are the optimal preclinical models? *European Journal of Cancer*, 45(16):2768–2781, 2009.
- J. E. Dancey, P. L. Bedard, N. Onetto, & T. J. Hudson. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell*, 148(3):409–420, 2012.
- B. W. Day, B. W. Stringer, F. Al-Ejeh, M. J. Ting, J. Wilson, et al. EphA3 Maintains Tumorigenicity and Is a Therapeutic Target in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Cell*, 23(2):238–248, 2013.
- E. C. de Bruin, N. McGranahan, R. Mitter, M. Salm, D. C. Wedge, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*, 346(6206):251–256, 2014.
- L. P. Deleyrolle, G. Ericksson, B. J. Morrison, J. A. Lopez, K. Burrage, et al. Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. *PLoS ONE*, 6(1):e15844, 2011a.
- L. P. Deleyrolle, A. Harding, K. Cato, F. A. Siebzehnrubl, M. Rahman, et al. Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 5):1331–1343, 2011b.
- T. Demuth, J. L. Rennert, D. B. Hoelzinger, L. B. Reavie, M. Nakada, et al. Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics*, 9: 54, 2008.
- P. J. Deschavanne & B. Fertil. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 34(1):251–266, 1996.
- L. A. Diaz, R. T. Williams, J. Wu, I. Kinde, J. R. Hecht, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486(7404): 537–540, 2012.
- L. Ding, T. J. Ley, D. E. Larson, C. A. Miller, D. C. Koboldt, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382):506–510, 2012.
- C. I. Ene & H. A. Fine. Many tumors in one: A daunting therapeutic prospect. *Cancer Cell*, 20(6):695–697, 2011.
- B. England, T. Huang, & M. Karsy. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(4):2063–2074, 2013.

- J. L. Fisher, J. A. Schwartzbaum, M. Wrensch, & J. L. Wiemels. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics*, 25(4):867–90–vii, 2007.
- R. Fisher, L. Pusztaï, & C. Swanton. Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. *British Journal of Cancer*, 108(3):479–485, 2013.
- J. M. Francis, C.-Z. Zhang, C. L. Maire, J. Jung, V. E. Manzo, et al. EGFR variant heterogeneity in glioblastoma resolved through single-nucleus sequencing. *Cancer Discovery*, 4(8):956–971, 2014.
- R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, et al. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19):7011, 2004.
- M. Gerlinger, A. J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 366(10):883–892, 2012.
- M. R. Gilbert, M. Wang, K. D. Aldape, R. Stupp, M. E. Hegi, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: A randomized phase III clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32):4085–4091, 2013.
- M. R. Gilbert, T. S. Armstrong, W. B. Pope, M. J. van den Bent, & P. Y. Wen. Facing the future of brain tumor clinical research. *Clinical Cancer Research*, 20(22):5591–5600, 2014a.
- M. R. Gilbert, J. J. Dignam, T. S. Armstrong, J. S. Wefel, D. T. Blumenthal, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 370(8):699–708, 2014b.
- J.-P. Gillet, S. Varma, & M. M. Gottesman. The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7):452–458, 2013.
- M. Greaves & C. C. Maley. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381):306–313, 2012.
- D. Hanahan & R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- B. K. Hecht, C. Turc-Carel, M. Chatel, P. Grellier, J. Gioanni, et al. Cytogenetics of malignant gliomas: I. The autosomes with reference to rearrangements. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 84(1):1–8, 1995.
- M. E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. de Tribolet, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10):997–1003, 2005.
- G. H. Heppner. Tumor heterogeneity. *Cancer Research*, 44(6):2259–2265, 1984.

- K. A. Hoadley, C. Yau, D. M. Wolf, A. D. Cherniack, D. Tamborero, et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell*, 158(4):929–944, 2014.
- C. Hunter, R. Smith, D. P. Cahill, P. Stephens, C. Stevens, et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Research*, 66(8):3987–3991, 2006.
- J. T. Huse & K. D. Aldape. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma. *Clinical Cancer Research*, 20(22):5601–5611, 2014.
- J. T. Huse & E. C. Holland. Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain Pathology*, 19(1):132–143, 2009.
- K. Ishizawa, Z. A. Rasheed, R. Karisch, Q. Wang, J. Kowalski, et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell*, 7(3):279–282, 2010.
- M. Janiszewska, F. Beca, & K. Polyak. Tumor heterogeneity: The Lernaean hydra of oncology? *Oncology*, 28(9):781–2– 784, 2014.
- B. E. Johnson, T. Mazor, C. Hong, M. Barnes, K. Aihara, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*, 343(6167):189–193, 2014.
- K. M. Joo, J. Kim, J. Jin, M. Kim, H. J. Seol, et al. Patient-specific orthotopic glioblastoma xenograft models recapitulate the histopathology and biology of human glioblastomas in situ. *Cell Reports*, 3(1):260–273, 2013.
- H. Kim, S. Zheng, S. S. Amini, S. M. Virk, T. Mikkelsen, et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Research*, 25(3):316–327, 2015a.
- J. Kim, I.-H. Lee, H. J. Cho, C.-K. Park, Y.-S. Jung, et al. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer cell*, 28(3):318–328, 2015b.
- P. Koch, T. Opitz, J. A. Steinbeck, J. Ladewig, & O. Brüstle. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9):3225–3230, 2009.
- P. Koch, P. Breuer, M. Peitz, J. Jungverdorben, J. Kesavan, et al. Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature*, 480(7378):543–546, 2011.
- I. Kola & J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8):711–715, 2004.

- A. Kreso, C. A. O'Brien, P. van Galen, O. I. Gan, F. Notta, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*, 339(6119):543–548, 2013.
- K. Kristiansen, S. Hagen, T. Kollevold, A. Torvik, I. Holme, et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: A prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer*, 47(4):649–652, 1981.
- P. Kruse & M. Patterson. *Tissue culture: Methods and applications*. Academic Press, New York, 1st edition, 1973.
- J. D. Lathia, J. Gallagher, J. M. Heddleston, J. Wang, C. E. Eyler, et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(5):421–432, 2010.
- J. D. Lathia, S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. L. Valentim, & J. N. Rich. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12):1203–1217, 2015.
- J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5):391–403, 2006.
- M. J. Lee, A. S. Ye, A. K. Gardino, A. M. Heijink, P. K. Sorger, et al. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell*, 149(4):780–794, 2012.
- S. E. Little, S. Popov, A. Jury, D. A. Bax, L. Doey, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Research*, 72(7):1614–1620, 2012.
- K. J. Livak & T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 25(4):402–408, 2001.
- J. Livet, T. A. Weissman, H. Kang, R. W. Draft, J. Lu, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166):56–62, 2007.
- D. N. Louis, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, & O. D. Wiestler. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. World Health Organization, Geneva, 4th edition, 2007a.
- D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2):97–109, 2007b.
- S. Maheswaran, L. V. Sequist, S. Nagrath, L. Ulkus, B. Brannigan, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *The New England Journal of Medicine*, 359(4):366–377, 2008.

- C. C. Maley, P. C. Galipeau, J. C. Finley, V. J. Wongsurawat, X. Li, et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nature Genetics*, 38(4):468–473, 2006.
- A. Marusyk & K. Polyak. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805(1):105–117, 2010.
- A. Marusyk, V. Almendro, & K. Polyak. Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, 12(5):323–334, 2012.
- N. McGranahan & C. Swanton. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. *Cancer Cell*, 27(1):15–26, 2015.
- D. P. McLornan, A. List, & G. J. Mufti. Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. *The New England Journal of Medicine*, 371(18):1725–1735, 2014.
- J. P. Medema. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*, 15(4):338–344, 2013.
- L. M. F. Merlo, J. W. Pepper, B. J. Reid, & C. C. Maley. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12):924–935, 2006.
- M. Meyer, J. Reimand, X. Lan, R. Head, X. Zhu, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3):851–856, 2015.
- E. C. Moore & G. A. LePage. The metabolism of 6-thioguanine in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research*, 18(9):1075–1083, Oct. 1958.
- E. A. Mroz, A. D. Tward, C. R. Pickering, J. N. Myers, R. L. Ferris, et al. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 119(16):3034–3042, 2013.
- N. Navin, J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 472(7341):90–94, 2011.
- S. Nobusawa, T. Watanabe, P. Kleihues, & H. Ohgaki. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical Cancer Research*, 15(19):6002–6007, 2009.
- O. Nolan-Stevaux, D. Tedesco, S. Ragan, M. Makhanov, A. Chenchik, et al. Measurement of Cancer Cell Growth Heterogeneity through Lentiviral Barcoding Identifies Clonal Dominance as a Characteristic of In Vivo Tumor Engraftment. *PloS ONE*, 8(6):e67316, 2013.

- H. Noushmehr, D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*, 17(5):510–522, 2010.
- P. C. Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260):23–28, 1976.
- J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, & F. Pognan. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *FEBS Journal*, 267(17):5421–5426, 2000.
- H. Ohgaki & P. Kleihues. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5):1445–1453, 2007.
- H. Ohgaki & P. Kleihues. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4):764–772, 2013.
- H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*, 64(19):6892–6899, 2004.
- H. Okura, C. A. Smith, & J. T. Rutka. Gene therapy for malignant glioma. *Molecular and Cellular Therapies*, 2014.
- A. Omuro & L. M. DeAngelis. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA*, 310(17):1842–1850, 2013.
- Q. T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology*, 16 Suppl 4(suppl 4):iv1–63, 2014.
- R. Pardal, M. F. Clarke, & S. J. Morrison. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12):895–902, 2003.
- J. K. Park, T. Hodges, L. Arko, M. Shen, D. Dello Iacono, et al. Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology*, 28(24):3838–3843, 2010.
- D. W. Parsons, S. Jones, X. Zhang, J. C.-H. Lin, R. J. Leary, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897):1807–1812, 2008.
- A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta, A. K. Shalek, S. M. Gillespie, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190):1396–1401, 2014.
- D. A. Peiffer, J. M. Le, F. J. Steemers, W. Chang, T. Jenniges, et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Research*, 16(9):1136–1148, 2006.

- A. Perry, K. D. Aldape, D. H. George, & P. C. Burger. Small cell astrocytoma: An aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer*, 101(10):2318–2326, 2004.
- S. G. M. Piccirillo, B. A. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, 444(7120):761, 2006.
- S. M. Pollard, K. Yoshikawa, I. D. Clarke, D. Danovi, S. Stricker, et al. Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell*, 4(6):568–580, 2009.
- S. N. Porter, L. C. Baker, D. Mittelman, & M. H. Porteus. Lentiviral and targeted cellular barcoding reveals ongoing clonal dynamics of cell lines in vitro and in vivo. *Genome Biology*, 15(5):R75, 2014.
- M. Preusser, S. de Ribaupierre, A. Wöhrer, S. C. Erridge, M. Hegi, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of Neurology*, 70(1):9–21, 2011.
- E. Quintana, M. Shackleton, M. Sabel, D. Fullen, T. Johnson, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456(7222):593, 2008.
- E. Quintana, M. Shackleton, H. R. Foster, D. R. Fullen, M. S. Sabel, et al. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell*, 18(5):510–523, 2010.
- T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, & I. L. Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859):105–111, 2001.
- L. Ricci-Vitiani, R. Pallini, M. Biffoni, M. Todaro, G. Invernici, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325):824–828, 2010.
- K. Robasky, N. E. Lewis, & G. M. Church. The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 15(1):56–62, 2014.
- D. Rohle, J. Popovici-Muller, N. Palaskas, Ş. Turcan, C. Grommes, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*, 340(6132):626–630, 2013.
- J. Romer & T. Curran. Targeting medulloblastoma: Small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Research*, 65(12):4975–4978, 2005.
- R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, 1988.

- W. Sakai, E. M. Swisher, B. Y. Karlan, M. K. Agarwal, J. Higgins, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182):1116–1120, 2008.
- J. H. Sampson, A. B. Heimberger, G. E. Archer, K. D. Aldape, A. H. Friedman, et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 28(31):4722–4729, 2010.
- B. Scheffler, N. M. Walton, D. D. Lin, A. K. Goetz, G. Enikolopov, et al. Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9353–9358, 2005.
- J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682, 2012.
- J. P. Schouten, C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12):e57, 2002.
- T. Schumacher, L. Bunse, S. Pusch, F. Sahm, B. Wiestler, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, 512(7514):324–327, 2014.
- J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, & M. Wrensch. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(9):494–503, 2006.
- J. L. Sebaugh. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2):128–134, 2011.
- C. Senft, A. Bink, K. Franz, H. Vatter, T. Gasser, et al. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: A randomised, controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 12(11):997–1003, 2011.
- M. Shackleton, E. Quintana, E. R. Fearon, & S. J. Morrison. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*, 138(5):822–829, 2009.
- N. P. Shah, J. M. Nicoll, B. Nagar, M. E. Gorre, & R. L. Paquette. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2002.
- J. R. Shapiro, W. K. Yung, & W. R. Shapiro. Isolation, karyotype, and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas. *Cancer Research*, 41(6):2349–2359, 1981.

- S. V. Sharma, D. A. Haber, & J. Settleman. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 10(4):241, 2010.
- A. T. Shaw, D.-W. Kim, K. Nakagawa, T. Seto, L. Crinó, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 368(25):2385–2394, 2013.
- S. Shete, F. J. Hosking, L. B. Robertson, S. E. Dobbins, M. Sanson, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature Genetics*, 41(8):899–904, 2009.
- M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 11(3):259–273, 2007.
- M. D. Siegelin, C. M. Raskett, C. A. Gilbert, A. H. Ross, & D. C. Altieri. Sorafenib exerts anti-glioma activity in vitro and in vivo. *Neuroscience Letters*, 478(3):165–170, 2010.
- S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015):396–401, 2004.
- S. A. Smallwood, H. J. Lee, C. Angermueller, F. Krueger, H. Saadeh, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nature Methods*, 11(8):817–820, 2014.
- M. Snuderl, L. Fazlollahi, L. P. Le, M. Nitta, B. H. Zhelyazkova, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell*, 20(6):810–817, 2011.
- M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153):561–566, 2007.
- Y. Soda, T. Marumoto, D. Friedmann-Morvinski, M. Soda, F. Liu, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11):4274–4280, 2011.
- M. J. Son, K. Woolard, D.-H. Nam, J. Lee, & H. A. Fine. SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma. *Cell Stem Cell*, 4(5):440–452, 2009.
- A. Sottoriva, I. Spiteri, S. G. M. Piccirillo, A. Touloumis, V. P. Collins, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10):4009–4014, 2013.

- J. M. Stommel, A. C. Kimmelman, H. Ying, R. Nabioullin, A. H. Ponugoti, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*, 318(5848):287–290, 2007.
- W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*, 7(5):392–401, 2006.
- W. Stummer, H.-J. Reulen, T. Meinel, U. Pichlmeier, W. Schumacher, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 62(3):564–576, 2008.
- R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10):987–996, 2005.
- R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. B. Taphoorn, 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*, 10(5):459–466, 2009.
- D. Sturm, H. Witt, V. Hovestadt, D.-A. Khuong-Quang, D. T. Jones, et al. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell*, 22(4):425–437, 2012.
- H. Suzuki, K. Aoki, K. Chiba, Y. Sato, Y. Shiozawa, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genetics*, 47(5):458–468, 2015.
- N. J. Szerlip, A. Pedraza, D. Chakravarty, M. Azim, J. McGuire, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8):3041–3046, 2012.
- S. Tanaka, D. N. Louis, W. T. Curry, T. T. Batchelor, & J. Dietrich. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: No longer a dead end? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(1):14–26, 2013.
- B. S. Taylor, J. Barretina, N. D. Socci, P. Decarolis, M. Ladanyi, et al. Functional copy-number alterations in cancer. *PloS ONE*, 3(9):e3179, 2008.
- A. Temme, K. D. Geiger, R. Wiedemuth, K. Conseur, T. Pietsch, et al. Giant cell glioblastoma is associated with altered aurora b expression and concomitant p53 mutation. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(6):632–642, 2010.
- S. Turcan, D. Rohle, A. Goenka, L. A. Walsh, F. Fang, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483(7390):479–483, 2012.

- A. B. Turke, K. Zejnullahu, Y.-L. Wu, Y. Song, D. Dias-Santagata, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*, 17(1):77–88, 2010.
- R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1):98–110, 2010.
- R. Vermeij, N. Leffers, S. H. van der Burg, C. J. Melief, T. Daemen, et al. Immunological and clinical effects of vaccines targeting p53-overexpressing malignancies. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011:702146, 2011.
- L. Vermeulen, M. R. Sprick, K. Kemper, G. Stassi, & J. P. Medema. Cancer stem cells – old concepts, new insights. *Cell Death & Differentiation*, 15(6):947–958, 2008.
- K. Visnyei, H. Onodera, R. Damoiseaux, K. Saigusa, S. Petrosyan, et al. A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma stem cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(10):1818–1828, 2011.
- J. E. Visvader & G. J. Lindeman. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10):755, 2008.
- M. D. Walker, E. Alexander, W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal of Neurosurgery*, 49(3):333–343, 1978.
- Y. Wang & N. E. Navin. Advances and Applications of Single-Cell Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, 58(4):598–609, 2015.
- C. Watts. Clonal diversity in glioblastoma: Is it clinically relevant? *Future Oncology*, 11(12):1703–1706, 2015.
- J. N. Weinstein. Drug discovery: Cell lines battle cancer. *Nature*, 483(7391):544, 2012.
- M. Weller, T. Cloughesy, J. R. Perry, & W. Wick. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro-Oncology*, 15(1):4–27, 2013.
- W. Wick, M. Weller, M. Weiler, T. Batchelor, A. W. Yung, et al. Pathway inhibition: Emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 13(6):566–579, 2011.
- A. Wieland, D. Trageser, S. Gogolok, R. Reinartz, H. Höfer, et al. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(15):4124–4136, 2013.
- C. J. Wikstrand, S. H. Bigner, & D. D. Bigner. Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 43(7):3327–3334, 1983.

- M. Wensch, R. B. Jenkins, J. S. Chang, R.-F. Yeh, Y. Xiao, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nature Genetics*, 41(8):905–908, 2009.
- H. Wurdak, S. Zhu, A. Romero, M. Lorget, J. Watson, et al. An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 6(1):37–47, 2010.
- S. Yachida, S. Jones, I. Bozic, T. Antal, R. Leary, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467(7319):1114–1117, 2010.
- T. A. Yap, M. Gerlinger, P. A. Futreal, L. Pusztai, & C. Swanton. Intratumor heterogeneity: Seeing the wood for the trees. *Science Translational Medicine*, 4(127):127ps10, 2012.
- W. K. Yung, J. R. Shapiro, & W. R. Shapiro. Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Research*, 42(3):992–998, 1982.
- J. Zhang, J. Fujimoto, J. Zhang, D. C. Wedge, X. Song, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, 346(6206):256–259, 2014.
- B. Zhao, M. T. Hemann, & D. A. Lauffenburger. Intratumor heterogeneity alters most effective drugs in designed combinations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29):10773–10778, 2014a.
- B. Zhao, J. R. Pritchard, D. A. Lauffenburger, & M. T. Hemann. Addressing genetic tumor heterogeneity through computationally predictive combination therapy. *Cancer Discovery*, 4(2):166–174, 2014b.
- B.-B. S. Zhou, H. Zhang, M. Damelin, K. G. Geles, J. C. Grindley, et al. Tumour-initiating cells: Challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(10):806, 2009.
- Z. Zhu, M. A. Khan, M. Weiler, J. Blaes, L. Jestaedt, et al. Targeting self-renewal in high-grade brain tumors leads to loss of brain tumor stem cells and prolonged survival. *Cell Stem Cell*, 15(2):185–198, 2014.

Abkürzungsverzeichnis

ABX	Antibiotika & Antimykotika-Lösung (<i>antibiotic-antimycotic</i> , siehe Unterabschnitt 3.4.1)
AHNP	Adulte humane neurale Vorläuferzellen (<i>adult human neural progenitors</i>)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CAS	<i>Chemical abstracts service</i>
Chr.	Chromosom
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser (<i>aqua bidest</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EF	EGF und FGF-2 Supplement (siehe Unterabschnitt 3.4.2)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrische Zell-Sortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
H&E	Hämatoxylin & Eosin

hESCdNP	Neurale Vorläuferzellen aus humanen embryonalen Stammzellen (<i>human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells</i>)
IC₅₀	Absolute inhibitorische Konzentration 50 (<i>absolute inhibitory concentration 50</i>)
iFISH	Immunfluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
IHC	Immunhistochemie
k. A.	Keine Angabe
L-PO	Poly-L-Ornithin (siehe Unterabschnitt 3.4.2)
LDA	Limitierende Verdünnungskultur (<i>limiting dilution assay</i>)
MLPA	Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
mn-Zellen	Multinukleäre Zellen
MTP	Mikrotiterplatte
MRT	Magnetresonanztomographie
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
PA	Parental
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Triton X-100 (siehe Unterabschnitt 3.4.2)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Populationsverdoppelungen (<i>population doublings</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RTQ-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SK	Subklon
SOSE	Natrim-selenit
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMZ	Temozolomide
vRZ	Vielkernige Riesenzellen

Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht über statistisch signifikante Kopienzahl-Aberrationen im Glioblastom	5
1.2	Schema zur Tumorheterogenität	12
1.3	Schema der verzweigten Tumorprogression	18
4.1	Verifizierung des Einzelzell-Ursprungs am Beispiel von Subklon BN118 6-D02	38
5.1	Stabilität der parentalen GNV019-Zellen während der Kultivierung	59
5.2	Profil genetischer Aberrationen von 33 Glioblastom-Subklonen .	62
5.3	Pharmakologisches Resistenzprofil von 33 Subklonen	64
5.4	Histologie der GNV019-Tumorbiopsie	66
5.5	Orthotope Xenotransplantation von GNV019-Zellen	67
5.6	Morphologie und vRZ-Frequenz der GNV019-Subklone	68
5.7	Differenzierungspotenzial der GNV019-Subklone	69
5.8	Ähnlichkeitsanalysen der GNV019-Subklone	71
5.9	Identifikation von Substanzen mit differenzieller Wirksamkeit zwischen GNV019-Subklonen	72
5.10	Schema der Ko-Kultur-Experimente	73
5.11	Selektion von Subklonen in Ko-Kultur	74
5.12	Schema der Selektion von Riesenzell-Vorläufern innerhalb der parentalen GNV019-Kultur	75
5.13	Anreicherung von multinukleären Zellen <i>in vitro</i>	76
5.14	Darstellung der SK2-spezifischen Deletion auf Chr. 5q	78
5.15	Schema zum Nachweis der Selektion von SK2-ähnlichen Zellen innerhalb der parentalen Kultur	79
5.16	Anreicherung von SK2-ähnlichen Zellen <i>in vitro</i>	80
5.17	Anreicherung von GNV019-Subklonen <i>in vivo</i>	83

A.1 Vereinfachte Zusammenfassung der wesentlichen Merkmale der 6 molekularen Subgruppen des Glioblastoms	111
A.2 Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven von 20 Glioblastom-relevanten Substanzen am Beispiel der parentalen Kultur von BN118	112
A.3 Gezielte Selektion bei BN035	113
A.4 Gezielte Selektion bei BN046	114
A.5 Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenz- und H&E-Färbungen parentaler GNV019-Zellen zur Quantifizierung der Frequenz multinukleärer Zellen	115
A.6 Phasenkontrast-Aufnahmen von parentalen Kulturen und ausgewählten Subklonen	116
A.7 Boxplots der 20 Substanzen mit IC_{50} -Werten von parentalen und klonalen Kulturen, gruppiert nach Patienten	117
A.8 Expression neuraler Stammzell-Marker bei GNV019-Kulturen	118

Tabellenverzeichnis

4.1	RTQ-PCR-Reaktionsansatz	50
4.2	RTQ-PCR-Programm	51
5.1	Klinische Daten zu Glioblastom-Patienten	58
5.2	Bilanz der Subklon-Isolation sowie Übersicht über die Isolations- Methoden und die Isolations-Effizienz pro Fall	61
A.1	Auflistung aller 160 Wirkstoffe der Substanz-Bibliothek „The Killer Collection“ mit Substanz-Code und Hersteller-Bezeichnung	119
A.2	Auflistung der untersuchten Subklone und der daran angewand- ten Analyse-Methoden	120
A.3	Auflistung von IC ₅₀ -Werten aus Abbildung 5.3	121
A.4	Details zur Substanz-Bibliothek, die für die Analyse von inter- und intratumoraler Heterogenität verwendet wurde	122
A.5	Auflistung von GNV019-MLPA-Ratios	123
A.6	Auflistung von BN035-MLPA-Ratios	124
A.7	Auflistung von BN046-MLPA-Ratios	125
A.8	Auflistung von BN055-MLPA-Ratios	126
A.9	Auflistung von BN118-MLPA-Ratios	127
A.10	Ratios von IC ₅₀ -Werten der resistentesten und sensitivsten Sub- klone pro Individuum für alle 20 Substanzen	128
A.11	Viabilitäts-Daten nach der Behandlung der GNV019-Kulturen mit den Substanzen der „Killer Collection“ (Teil 1)	129
A.12	Viabilitäts-Daten nach der Behandlung der GNV019-Kulturen mit den Substanzen der „Killer Collection“ (Teil 2)	130
A.13	Intratumorale Rang-Analyse der Subklone	131

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Björn Scheffler, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe „Stem Cell Pathologies“ am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie der Universität Bonn durchzuführen. Er hat mich immer unterstützt und gefördert. Darüber hinaus hat er es mir ermöglicht, neben den Studien zu meiner Dissertation auch an weiteren Forschungsprojekten arbeiten zu können.

Ich danke Prof. Dr. Oliver Brüstle, der mir die Durchführung meiner Forschungsprojekte am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie unter solch hervorragenden Bedingungen ermöglichte.

Prof. Dr. Hubert Schorle möchte ich sehr herzlich für die intensive Begutachtung meiner Dissertationsschrift danken.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich PD Dr. Martin Glas aussprechen, der mir zu jeder Zeit mit außerordentlicher Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Der Volkswagenstiftung und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) danke ich für die Finanzierung meiner Forschungstätigkeiten.

Ich danke meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie: Insbesondere Heike Höfer, Anja Wieland, Daniel Trageser, Mihaela Keller, Sabine Normann, Sied Kebir, Anke Leinhass, Laurèl Rauschenbach, Niklas Schäfer, Andreas Till, Marius Küpper, Franziska Lorbeer, Sabine Gogolok, Dennis Plenker, Lil Klaas, Diana Bastgen, Philipp Koch, Barbara Steinfarz und Ramona Schelle.

Bei folgenden Kollaborationspartnern an anderen Forschungseinrichtungen möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich bedanken: Shanshan Wang, Tong Zheng, Brent A. Reynolds, David W. Pincus, Dennis A. Steindler (Department of Neurosurgery, University of Florida, Gainesville, FL, USA), Daniel J. Silver (Department of Cellular and Molecular Medicine, Cleveland Clinic Lerner Research Institute, OH, USA), Rolf Fimmers (Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie, Universität Bonn), Timothy M. Shepherd (Department of Neuroradiology, NYU Langone Medical Center, NY, USA), Axel M. Hillmer (Cancer Therapeutics and Stratified Oncology, Genome Institute of Singapore, Singapur), Sven Cichon, Stefan Herms (Departement Biomedizin, Universitätsspital Basel, Schweiz), Nadine Fricker, Dietlinde Stienen (Institut für Humangenetik, Universität Bonn), Fatima Kreusch, Andrea Staratschek-Jox, Joachim Schultze (Abteilung Genomik & Immunoregulation des Life & Medical Sciences Institute, LIMES), Robert Schuit und Suvi Savola (MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande), Hans-Ulrich Schildhaus (Abteilung Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen), Amy A. Smith (University of Florida Health Cancer Center, Orlando, FL, USA), Torsten Pietsch (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn), Anthony Yachnis (Department of Pathology, Immunology, & Lab Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA), Ying Liu (Department of Neurosurgery and Center for Stem Cell & Regen Medicine, The Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, The University of Texas Health Science Center, Houston, TX, USA) und Matthias Simon (Neurochirurgische Universitätsklinik Bonn).

Meinen Eltern, meinen Großeltern, meinem Bruder, meiner Frau und meinen Töchtern danke ich für ihr Verständnis und die moralische Unterstützung.