

**Charakterisierung von Tumorstammzellen des  
Medulloblastoms und Analyse ihrer molekularen  
Regulation**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

**Androniki Karathanassi**

aus

Rüsselsheim

Bonn 2014

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

1. Gutachter (Betreuer): Prof. Dr. med. Torsten Pietsch

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Hoch

Tag der Promotion: 10.11.2014

Erscheinungsjahr: 2015



*ΑΦΙΕΡΩΣΗ*

*Στην μνήμη του παππού μου Εμμανουήλ Κ. Καραθανάση*

*Και*

*Στον πατέρα μου Δημήτρη.*

*WIDMUNG*

*Dem Andenken meines Großvaters Emmanouil K. Karathanassi.*

*Und*

*Meinem Vater Dimitrios.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tumorstammzellen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Cerebellum .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Zell-Architektur, anatomische und molekulare Strukturen des Cerebellums .....	3
<b>1.3 Medulloblastom .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Klassifikation und Ursachen .....	6
<b>1.4 Medulloblastom-relevante Entwicklungskontroll-signalwege .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Die Sonic Hedgehog-Signalwegskaskade .....	9
1.4.1.1 Das Patched (ptc <sup>+/-</sup> ) Maus-Modell.....	12
1.4.2 Notch-Signalweg.....	13
1.4.3 WNT-Signalweg .....	14
1.4.4 Pharmakologische Aktivierung oder Blockade der Shh-, WNT- und Notch-Signalwege	15
1.4.4.1 Modulation des Shh-Pathway.....	15
1.4.4.2 Modulation des Notch-Pathways.....	16
1.4.4.3 Modulation des WNT-Pathways.....	17
<b>1.5 CD133.....</b>	<b>19</b>
1.5.1 CD133 als Stammzellmarker .....	19
1.5.2 Prominin/CD133: Topologie.....	19
<b>1.6 Tumorstammzellmarker und Methoden.....</b>	<b>21</b>
1.6.1 Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität als Stammzell-Marker .....	22
1.6.2 Das Konzept der Label Retaining Cells (LRC's) .....	23
<b>1.7 Zielsetzung .....</b>	<b>25</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 MATERIALIEN .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Chemikalien .....	27
2.1.2 Reagenzien und Kits .....	28
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	28
2.1.4 Antikörper .....	29
2.1.5 Materialien für die real-time PCR (TaqMan) .....	31
2.1.6 Zelllinien und Materialien für Zellkultur und zellbasierte Assays .....	32
2.1.6.1 Permanente Zellkultur .....	32
2.1.6.2 Zellkultur-Medien.....	32
2.1.6.3 Serumhaltige Medien und Medienzusätze.....	32
2.1.6.4 Stammzellmedien und -zusätze, rekombinante Faktoren.....	33
2.1.6.5 Verwendete Medien für die Zellkultur.....	33
2.1.7 Liganden, Agonisten und Antagonisten.....	33
2.1.8 Plastikmaterialien.....	34

2.1.9	Sonstiges .....	35
2.1.10	Geräte ohne / mit Software und sonstige Software .....	35
2.1.10.1	Geräte ohne / mit Software .....	35
2.1.10.2	Sonstige Software .....	36
<b>2.2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>37</b>
2.2.1	Standardkulturbedingungen: humane Zellen.....	37
2.2.2	Gewinnung muriner Primärkulturen aus dem Patched-Modell .....	37
2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	38
2.2.4	Kryokonservierung und Auftauen der Zelllinien.....	38
2.2.5	Beschichtung von Zellkultur-Platten .....	39
2.2.6	Mycoplasmen-Test .....	39
2.2.6.1	Nachweis mittels Hoechst 33258-Färbung.....	39
2.2.6.2	Nachweis mittels qualitativer PCR.....	40
2.2.7	Stammzell-Assays .....	40
2.2.7.1	Klonogenizitäts-Assays (Neurosphären-Assays) .....	40
2.2.7.2	Replating-Assays.....	41
2.2.8	Label Retaining-Assays .....	41
2.2.9	Bestrahlung von Zellen .....	42
2.2.10	FACS-basierte Methoden .....	43
2.2.10.1	Durchflusszytometrie .....	43
2.2.10.2	Lichtsignalgeometrie: Histogramm und Dot-Plot.....	46
2.2.10.3	Messparameter.....	48
2.2.11	CD133-Markierung: Humane und murine Zelllinien .....	48
2.2.12	Anreicherung von CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>-</sup> -Fraktionen bei humanen Zellen .....	49
2.2.13	ALDEFLUOR Assay .....	50
2.2.14	Doppelfärbung zur Zellzyklus-Analyse und CD133-Expression.....	51
2.2.15	RNA-Extraktion für die Microarray-Hybridisierung .....	52
2.2.15.1	Protokoll zur RNA-Isolierung: TRIZOL .....	52
2.2.15.2	Aufbereitung von DEPC-Wasser .....	53
2.2.15.3	RNeasy-Nachreinigung.....	53
2.2.15.4	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	53
2.2.15.5	Herstellung und Analyse-Verfahren.....	53
2.2.15.6	cDNA-Synthese und Validierung mittels real-time RT-PCR .....	55
2.2.16	Immunhistochemie.....	58
2.2.16.1	Zellkultivierung: Stammzell- und Differenzierungs-Medium.....	58
2.2.16.2	Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitten: Paraffin-Einbettung der Zellpellets.....	58
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung von humanen Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter: Untersuchungen zu dem CD133-Antigen und dem Selbsterneuerungs-Potential.....</b>	<b>59</b>
3.1.1	Klonogenizität-Fähigkeit von CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>-</sup> Zellfraktionen .....	59
3.1.2	Untersuchung der Selbsterneuerungs-Fähigkeit durch Replating-Assays.....	61

3.1.2.1	Assoziation der CD133-Expression mit dem Repopulationspotential Neurosphärenbildung).....	64
3.1.2.2	Die D3484-Neurosphären weisen eine variable CD133-Expression auf .....	65
3.1.3	mRNA-Genexpressionsunterschiede von CD133-positiv und CD133-negativ angereicherten Zellfraktionen mittels Microarray-Analyse.....	67
3.1.3.1	Gewinnung von CD133 differentiell exprimierenden Zellpopulationen: Zellkultur, AutoMACS-Separation und RNA-Isolierung.....	67
3.1.3.2	Microarray-Analyse: Überexprimierte Gene in den CD133-angereicherten Populationen .....	69
3.1.3.3	Validierung der Kandidatengene mittels real-time RT-PCR .....	70
3.1.4	Zellzyklus-Analysen der CD133-Subpopulationen.....	72
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zu der Entwicklungskontrollsignalwegs-abhängigen Neurosphären-Kapazität von Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter.....</b>	<b>74</b>
3.2.1	Beeinflussung der Neurosphärenbildung durch Entwicklungskontroll-Signalwege.....	74
3.2.1.1	Sonic Hedgehog-Inhibition mit Cyclopamin hat Konzentrations-abhängig einen aktivierenden und inhibierenden Effekt auf die Klonogenizität .....	77
3.2.1.2	Sonic Hedgehog-Inhibition mit GANT-61 .....	77
3.2.2	Klonogenizität von murinen <i>ptc<sup>+/-</sup></i> -Medulloblastomzellen: Abhängigkeit vom Shh-Signalweg.....	78
3.2.2.1	Shh-Inhibition durch GANT-61 und Cyclopamin.....	79
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	79
<b>3.3</b>	<b>Immuncytochemische Färbungen zum Nachweis der Differenzierungsfähigkeit ....</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Identifikation von Zellpopulationen in Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter .....</b>	<b>85</b>
3.4.1	Humane Zelllinien: Aldehyddehydrogenase-Aktivität-, CD133-Expression und Doppelmarkierung .....	85
3.4.2	Murine Zelllinien: Aldehyddehydrogenase-Aktivitäts-, Prominin1-Expression und Doppelmarkierung .....	87
<b>3.5</b>	<b>Die DAOY-Medulloblastom-Zelllinie enthält keine Label Retaining-Zellen .....</b>	<b>88</b>
<b>3.6</b>	<b>Beeinflussung der Neurosphären-Bildung von Medulloblastomzellen durch Strahlentherapie .....</b>	<b>90</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation von Medulloblastomzellen mit Stammzell-Charakter durch Entwicklungskontroll-Signalwege.....</b>	<b>93</b>
4.1.1	Pharmakologische Modulation des Selbsterneuerungs-Potentials .....	93
<b>4.2</b>	<b>Differenzierungsfähigkeit von Medulloblastom-Neurosphären .....</b>	<b>97</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleichende Charakterisierung des Medulloblastom-Stammzellphänotyps mittels CD133 und anderer Marker .....</b>	<b>101</b>
<b>4.4</b>	<b>Identifizierung und Validierung differentiell in CD133-Populationen exprimierter Gene.....</b>	<b>104</b>

4.5	Schlussfolgerung zur Rolle der CD133-Expression im Medulloblastom .....	106
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	108
6	AUSBLICK .....	110
7	ZITATIONSQUELLEN .....	111
7.1	Literatur.....	111
7.2	Internet-Quellen .....	127
8	VERZEICHNISSE .....	128
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	128
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	132
8.3	Tabellenverzeichnis .....	134
9	TAGUNGEN .....	135
9.1	Vorträge .....	135
10	DANKSAGUNG .....	136
11	ANHANG .....	138
11.1	Differentiell überexprimierte Gene / Gengruppen aus der Microarray-Analyse ....	138
11.2	Immunhistochemische Färbungen .....	141
11.3	Doppelfärbung: ALDH-Aktivität und CD133 / Prominin.....	149

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Tumorstammzellen

Die Transformation von normalen adulten (Stamm-)Zellen führt zur malignen proliferativen Veränderung, letztlich zur Tumorentstehung. Tumore des Gehirns wie das Medulloblastom sollen Zellen mit Stammzell-Eigenschaften enthalten. Mit der Einführung der Tumorstammzelltheorie hat man sich ein besseres Verständnis der Tumorentstehung und –heterogenität erhofft, um gezielt Therapien zu entwickeln.

Zuerst wurde die hämatopoietische Stammzelle und seine maligne Form, die leukämische Stammzelle (Brenton *et al.*, 2006) identifiziert. Später wurden ähnliche Zellen auch in anderen Krebsarten identifiziert. Dies führte zur Entwicklung von zwei Modellen, dem stochastischen Modell und dem hierarchischen oder Tumorstammzell-Modell (Cancer Stem Cell (CSC)-Modell). Das stochastische Modell besagt, dass Klone von nicht-differenzierten Tumorzellen eine Anzahl von Mutationen auf zufällige Weise anhäufen. Dadurch erzeugen die transformierten Zellen die Tumormasse. Jede Tumorzelle kann theoretisch einen neuen Tumor generieren (Hadjipanayis *et al.*, 2009).

Das CSC-Modell dagegen schlägt eine Hierarchie vor. Diese geht von einer selbsterneuerbaren Tumorzelle aus, die auf ihrem Weg zur Ausdifferenzierung über das Stadium der proliferierenden, transienten Zelle geht, den Transit-Amplifying Zellen (Sell, 2010).

In der Arbeit von O'Brien *et al.* 2010 wird erläutert, dass beide Modelle von sehr wenigen tumorerzeugenden Zellen innerhalb der Tumormasse ausgehen. Der Unterschied zwischen den beiden Modellen läge darin, dass die Tumorstammzellen im Tumorstammzell-Modell mittels spezifischer Zellmarker isoliert werden können. Die Autoren beschreiben, dass beim stochastischen Modell die Zellen, welche fähig zur Tumorausbildung sind, sich im Zellzyklus befinden oder in diesen eintreten. Es ist ein stochastisches Ereignis. In diesem Fall können diese bösartigen Zellen nicht isoliert oder identifiziert werden.

Für die Interpretation und Anwendung des CSC-Konzeptes gibt es unterschiedliche Arbeitsdefinitionen. Maenhut *et al.* 2010, kristallisierten drei Eigenschaften heraus. Danach exprimiert die Population der CSC's eine distinkte Palette von Oberflächenmarkern, die die Charakterisierung und Isolierung ermöglichen. Die zweite Eigenschaft skizziert die Population mit tumorigener Kapazität, aus der zwei Populationen innerhalb eines Tumors hervorgehen. Es ist eine Tumorstammzellpopulation, die sich selbst-erneuern kann und immortalisiert ist, und die andere Population ist eine mit limitiertem Wachstum und daher eher als harmlosere

Population anzusehen. Die dritte Eigenschaft bezieht sich auf die Bewahrung der Heterogenität im Tumorgewebe. Als Folge hiervon werden im Xenograft-Modell alle Tumorzelltypen rekapituliert, die bereits im Elterntumor vorhanden waren, hergeleitet aus der hierarchischen Entwicklung der differenzierten Linien.

## 1.2 Cerebellum

### 1.2.1 Zell-Architektur, anatomische und molekulare Strukturen des Cerebellums

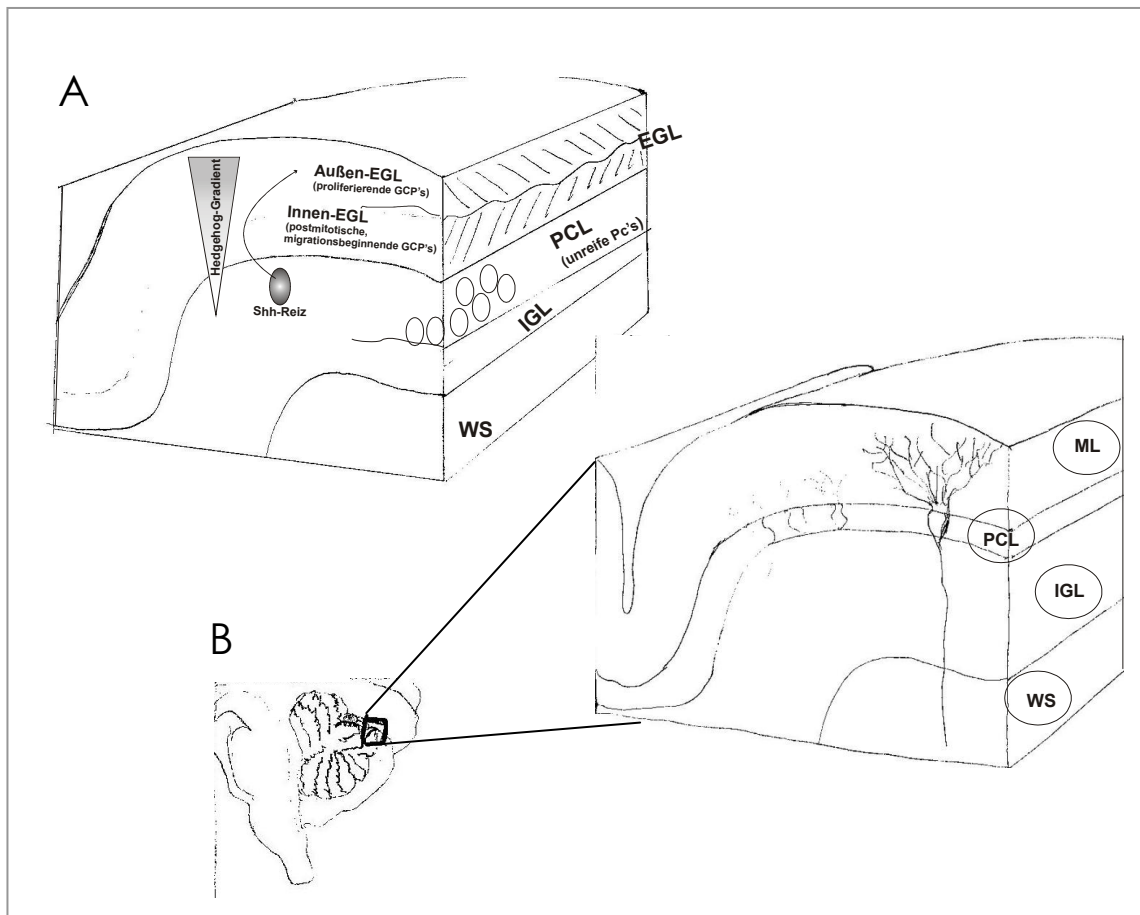
Das Cerebellum macht ungefähr 10 % am Volumen des Gesamtgehirnes aus und im reifen Kleinhirn finden sich hier mehr als die Hälfte aller Neurone (Wang & Zoghbi, 2001). Die Kontrolle der Motorik, der Koordination, der Feinmechanik der Bewegungen und der Augenmotorik obliegen den Kleinhirn-Funktionen. Gleichgewichts-Kontrolle und Lernprozesse unterliegen ebenfalls den Aktivitäten des Cerebellums, bei denen sensorische und motorische Funktionen beteiligt sind. Des Weiteren gehören sprachliche Verarbeitung und räumliches Gedächtnis zu den Kleinhirn-Leistungen (Kheradmand & Zee, 2011). Bei der embryonalen Entwicklung des Cerebellums tragen zwei proliferative Kompartimente zur Entstehung bei. Aus der dorsomedial liegenden Ventrikulären Zone (VZ), die entlang der IV. Ventrikel verläuft und Teil der cerebellären Anlage ist, entspringen die Purkinje-Zellen und andere Neuronentypen des Cerebellums. Aus der rhombischen Lippe entstehen die Vorläuferzellen der Körnerzell-Neurone, die GCP's (Granule Cell Precursors) (Srivastava & Nalbantoglu, 2010; Hatten & Russel, 2011; Wang & Zoghbi, 2001).

Wechsler-Reya (2003) führt aus, dass im embryonalen Stadium die GCP's, die in der rhombischen Lippe entstehen, die äußere Körnerzellschicht und damit die Aussenschicht des Cerebellums bilden, die EGL (External Germinal Layer). Die Spezifikation der Vorläuferzellen wird durch den Transkriptionsfaktor *Atonal 1* vermittelt. Dieser wird in den Körnerzellprogenitoren der EGL exprimiert. Das *Atonal* (Drosophila) homologe Gen bei der Maus ist *Math1*. *Math1*-Knockout-Mäuse sind nicht in der Lage, Körnerzellen zu entwickeln und zeigen eine defekte Kleinhirnentwicklung (Ben-Arie *et al.*, 1997). In der frühen postnatalen Phase proliferieren die GCP's und bilden durch klonale Expansion eine neue Schicht von Körnerzell-Neuronen, die innere EGL-Schicht. Diese Zellen treten aus dem Zellzyklus, differenzieren aus und wandern nach innen, während sie die *Math1*-Expression ausschalten (Ben-Arie *et al.*, 1997). Währenddessen proliferieren die äußeren Körnerzellvorläuferzellen (äußere EGL) weiter. Dort verbinden sich die differenzierten Körnerzellen durch lange Axone mit den Purkinje-Zellen. Sie wandern weiter durch die Molekularschicht (ML) und Purkinjezellschicht (PCL). Durch Migration erreichen sie ihren letzten Standort, die IGL, wo die terminale Differenzierung erfolgt (Wechsler-Reya, 2003).

Im adulten Kleinhirn hat sich die EGL zurückentwickelt (siehe Abbildung 1). Die Zeitspanne, in der die GCP-Proliferation, Ausdifferenzierung zu Körnerzellen und Migration erfolgt, beträgt etwa drei Wochen bei Mäusen und etwa 1 bis 2 Jahre beim



Menschen. In diesem entwicklungsbiologisch relevanten Prozess ist das Sonic Hedgehog(Shh)-Signal aktiv, wobei Shh von den Purkinje-Zellen produziert wird, um die GCP-Proliferation zu stimulieren. Daher wird Shh als Regulator der Körnerproliferation angesehen (Wechsler-Reya, 2003; Vaillant & Monard, 2009; Wang & Zoghbi, 2001; Srivastava & Nalbantoglu, 2010; ten Donkelaar *et al.* 2003).



**Abbildung 1: Darstellung des frühen postnatalen (A) und adulten Cerebellums (B). Vertikale Schnittansicht des cerebellären Cortex. Bild A: P1 (Postnatal Tag 1) bei der Maus. Bild B: Adultes Cerebellum. Das adulte Cerebellum besteht aus drei typischen Zellschichten: der Molekularschicht, der Purkinjezellschicht und der inneren Körnerzellschicht. EGL: External Granulal Layer; Externe Körnerzellschicht. PCL: Purkinje Cell Layer; Purkinjezellschicht. ML: Molecular Layer; Molekulare Zellschicht; IGL: Internal Granule Layer; Innen-Körnerzellschicht. WS: Weisse Substanz. Shh: Sonic Hedgehog. (Angelehnt und modifiziert nach Ghez C, Thach WT, The Cerebellum, URL: .**

[http://www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel\\_ch42\\_Cerebellum.pdf](http://www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel_ch42_Cerebellum.pdf) .; Wang & Zoghbi, 2001; Di Marcotullio *et al.*, 2006).

Die anatomische Struktur des Cerebellums des adulten Individuums besteht aus dem cerebellären Cortex (siehe *Abbildung 1B*), der in vielen Fissuren und in vielen Lappen

unterteilt ist, und der weissen Substanz. Der cerebelläre Cortex (Kleinhirnrinde) ist in drei Schichten unterteilt:

1. Die Molekularschicht (ML, Molecular Layer) mit den Stern- und Korbzell-Neuronen.
2. Die Purkinjezellschicht (PCL, Purkinje Cell Layer) mit den Purkinje Zellen und den Bergmann-Gliazellen.
3. Die Innen-Körnerzellschicht (IGL, Internal Granule Layer) mit den Körnerzellneuronen, den Golgi-Zellen und den Astrocyten.
4. Schließlich, die weisse Substanz, die Nervenfaserbahnen, Astrocyten, Oligodendrocyten und die tief in der weissen Substanz des Cerebellums gelegenen cerebelläre Nuclei enthält (Behesti & Marino, 2009; [http://www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel\\_ch42\\_Cerebellum.pdf](http://www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel_ch42_Cerebellum.pdf) [04.03.2013]).

Die Regulation der Proliferation und Ausdifferenzierung der Körnervorläuferzellen ist entscheidend für die Kleinhirnentwicklung. Die Körnervorläuferzellen der frühen postnatalen äußeren EGL-Schicht exprimieren Gene wie *Ccnd2*, *Ptch*, *Smo*, *Gli-1* und *Gli-2*, welche in der Zellproliferation beteiligt sind. Die innere EGL-Schicht exprimiert Gene, die einen Zellzyklus-Austritt und eine frühe Differenzierung andeuten, wie *p27kip1*, *Neuro D* und das *Neuron-specific class III  $\beta$ -Gen* (Srivastava & Nalbantoglu, 2010).

In der cerebellären Entwicklung unterliegen die Prozesse der Proliferation und der Ausdifferenzierung einer strengen Regulation von positiv und negativ wirkenden Signalwegen und Signal-Molekülen. Als positive Regulatoren werden die Shh-, Notch- und Wnt-Signalwege betrachtet. Der BMP-Signalweg gilt als negativer Regulator der GCP-Proliferation (Hatten & Russel, 2011). Arbeiten über den Shh-Signalweg verdeutlichen seine grundlegende Bedeutung, welcher eine mitogene Wirkung auf die Körnerzellvorläuferzell-Proliferation ausübt (Hatten & Russel, 2011). Auf diesen Signalweg wird weiter unten im Detail eingegangen. Weitere Reize zur GCP-Proliferation kommen aus Faktoren der extrazellulären Matrix. So ist z.B. die äußere EGL reich an Heparansulfat-Proteoglykane, die den Shh-mitogenen Einfluss auf die GCP-Proliferation und -Interaktion mit der Umgebung begünstigen (Vaillant & Monard, 2009). Wachstumsfaktoren stimulieren als Mitogene die Körnervorläuferzellen, das Medulloblastom und Stammzell-ähnliche Charakteristika; dies sind EGF, bFGF (FGF-2), IGF-1, -2 (Wechsler-Reya & Scott, 1999; Patti *et al.*, 2000). Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) soll unter den genannten das wichtigste Mitogen für die Selbsterneuerungseigenschaften bei der Sphärenbildung und der Regulation von Tumorstammzellen sein (Soeda *et al.*, 2008). bFGF kann als Mitogen fungieren, jedoch ist seine Wirkung auf die GCP-Proliferation noch nicht ganz aufgeschlüsselt worden. bFGF wird von cerebellären Astrocyten und den Purkinje-Zellen sezerniert (Wechsler Reya, 2003). bFGF soll auf eine Shh-abhängige Antwort inaktivierend wirken und eine GCP-Ausdifferenzierung mittels Beteiligung des

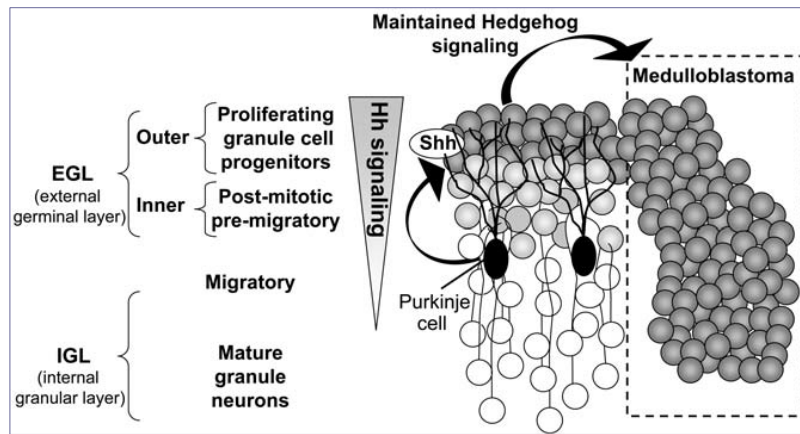
MAPK-Signalweges herbeiführen, während eine GCP-Proliferation von bFGF alleine begünstigt werden kann. Diese Erkenntnisse wurden aus dem Maus-Modell hergeleitet (Wechsler-Reya RJ & Scott MP, 1999; Vaillant & Monard, 2009). Jedoch wurde eine bFGF-proliferative Wirkung auf GCP's, aus Untersuchungen wie sie von Lee und Kollegen im Jahr 2005 veröffentlicht wurden, widerlegt. Es wird über eine fehlende Proliferation von postnatalen cerebellären murinen GCP's in Anwesenheit von bFGF berichtet, während murine Nicht-Körnerzellvorläuferzellen, eine Subpopulation von Vorläuferzellen, unter bFGF-Zugabe proliferieren konnten. Infolgedessen diskriminieren die Autoren dieser Forschungsarbeit die Existenz unterschiedlicher auf bFGF-reagierenden Subpopulationen. Bei der gleichen Arbeit wurde festgestellt, dass sich eine Shh-Behandlung positiv auf das GCP-Wachstum auswirkt (Lee *et al.*, 2005). Weiter soll IGF-2 mit Shh synergistisch Komponenten des Shh-Signalweges verstärken. Dies regt die GCP-Proliferation an (Vaillant C & Monard D, 2009). Eine weitere Studie zeigte, dass IGF-2 mittels des IGF-1-Rezeptors die Proliferation von murinen Körnervorläufer- und Medulloblastomzellen kontrolliert und soll mit Shh synergistisch mitogene Effekte zeigen (Hartmann *et al.*, 2005). Multipotente cerebelläre Stammzellen konnten sowohl im embryonalen als auch im postnatalen Stadium nachgewiesen werden. Diese behielten *in vitro* regional-spezifische Eigenschaften des Cerebellums aus denen diese entstammten. Die Ausdifferenzierung von neuralen Stammzellen des adulten Cerebellums könnte womöglich von Faktoren der umliegenden Nische der Stamm- und Vorläuferzellen gefördert werden (Klein *et al.*, 2005).

### **1.3 Medulloblastom**

#### 1.3.1 Klassifikation und Ursachen

Die Etymologie dieses Wortes geht auf das Wort *Medulloblast* zurück, welches von Bailey & Cushing (1920) (zit. nach: Rorke 1994) eingeführt wurde. Rorke (1994) illustriert die geschichtliche Formierung der Nomenklatur und Klassifikation. Sie führt an, dass die beiden oben genannten Forscher ein hypothetisches Klassifikations-Konzept für den im Cerebellum entstehenden Primärtumor schufen, aus dem ein neuer Terminus entstand. Nämlich, dass der Tumor aus einer „Ursprungszelle“ des Zentralnervensystems hervorgehe, welcher embryonalem, neuroepitheliale Ursprungs sei als auch histologisch Differenzierungs-Kapazität aufwiese. Um die unterschiedlichen Subtypen

der Gehirntumore zu unterscheiden, wurde später das Medulloblastom zu den PNET's (primitive neuroektodermale Tumore) gezählt. Dieses vereinheitlichende Konzept wurde aber aufgrund von Unterschieden dieser Tumoren wieder verlassen. Nach der WHO-Tumorklassifikation hat es den WHO-Grad IV. Es trifft überwiegend Kleinkinder und Jugendliche unter 16 Jahren, deshalb zählt das Medulloblastom zu den kindlichen Tumoren. Nach der histopathologischen Beurteilung von Schnittpräparaten werden unterschiedliche Subkategorien diagnostiziert (Schlegel *et al.*, 2004).



**Abbildung 2: Modell der Körnerzell-Entwicklung im Maus-Cerebellum.** Undifferenzierte Körnerzellen proliferieren durch den Shh-Reiz, welches von Purkinje-Zellen in der äußeren EGL sezerniert wird und wandern in die innere EGL, nachdem die Körnerzellen aus dem Zellzyklus austreten. Zum Ausreifen wandern diese weiter in der IGL für die terminale Ausdifferenzierung. Es herrscht ein Shh-Signalgradient mit der höchsten Aktivität in der äußeren EGL-Schicht und der niedrigsten in der inneren. Können die Körnerzellen den Zellzyklus nicht verlassen, verbleiben sie in der Außen-EGL und proliferieren ungehemmt mit der Folge der Medulloblastom-Bildung. Aus: Di Marcotullio *et al.*, 2006

Es wird davon ausgegangen, dass Medulloblastome sich durch genetische Veränderungen von unreifen neuronalen Progenitorzellen des Kleinhirns ableiten, deren Identität umstritten ist. Es gibt Hinweise, dass zumindest ein Teil der Medulloblastome von spezifischen Vorläuferzellen des Cerebellums, den äußeren Körnerzellprogenitoren/-vorläuferzellen ausgehen (Bühren *et al.*, 2000; Kheradmand & Zee, 2011; Srivastava & Nalbantoglu, 2010; Hatten & Roussel, 2011). Nachdem sich die IGL gebildet hat, führt wahrscheinlich eine autokrine Shh-Produktion in der EGL zu einer massiven Proliferation der Körnerzellen, die nicht fähig sind, in Richtung IGL zu migrieren, und die letztendlich in einer Tumorbildung (siehe Abbildung 2) resultiert. Deshalb kommt dem Shh-Signalweg eine wichtige Rolle als Regulator zu. Ob die Ausführung des Programmes zu einer zellentwicklungs-relevanten und schließlich zelltypspezifischen Ausdifferenzierung führen

soll, oder zur Proliferation während des noch unreifen Cerebellums, ist nicht ganz geklärt (Raffel, 2004).

Die meisten Medulloblastomen entstehen im Dach des vierten Ventrikels, betreffen daher auch die cerebelläre Vermis, und füllen mit der wachsenden Tumormasse diese aus. Der Tumor kann nekrotische und verkalkte Flächen aufweisen. Mikroskopisch besitzen die Zellen wenig Cytoplasma und zeigen neuronale oder gliale Differenzierung. Inseln besser differenzierter Zellen finden sich in der desmoplastischen Variante. Die grosszellige Variante zeigt grosse und pleomorphe Zellen. Immunhistologisch färbt sich der Tumor oft für Synaptophysin an. Dieser Marker weist auf eine neuronale Differenzierung hin. GFAP als Marker der glialen Differenzierung, wird selten in diesem Tumor gefunden und deutet einen astrocytären Phänotyp bei einem Teil der Tumorzellen an (Raffel, 2004). Die vielen Varianten spiegeln die morphologische und cytogenetische Heterogenität dieses Tumors wieder (Gilbertson & Ellison 2008) und führen zu einer Klassifikation von histopathologischen Subtypen: die klassische, desmoplastische, noduläre, anaplastische und die großzellige Medulloblastom-Variante (Hatten & Russel 2011). Hierbei sollen die klassischen Medulloblastome aus der Ventrikulären Zone entstehen und die desmoplastische Variante aus den Körnervorläuferzellen in der EGL, und beide werden mit einem multipotentem Stammzell- und Vorläuferzell-Phänotypen assoziiert. Jedoch werden weitere Gewebe-Regionen, aus denen die Ursprungszellen des Medulloblastoms entspringen könnten diskutiert (Manoranjan *et al.*, 2013).

Aufgrund der unzureichenden Aufklärung der Medulloblastom-Ursprungszelle und der Heterogenität der histologischen Erscheinung wurden weitere molekulare Klassifikations-Systeme etabliert. Dies sind (1) WNT-Signalwegsaktivierung, (2) SHH-Signalwegsaktivierung, (3) MYC-Überexpression, (4) Nicht-definierte genetische Anomalien (Genetische Zugewinne oder Verluste), Defekte in der epigenetischen Regulation, aberrante Tumorsuppressor-Gene (Hatten & Russel 2011). Ein molekulares Profil zur Subgruppierung wurde kürzlich von Kool *et al.* (2012) publiziert, in dem das Medulloblastom in die WNT-, Shh-, Gruppe 3- und Gruppe 4-Subtypen unterteilt wird.

## 1.4 Medulloblastom-relevante Entwicklungskontroll-signalwege

### 1.4.1 Die Sonic Hedgehog-Signalwegskaskade

Eine wesentliche Komponente des Hedgehog-Signalweges ist der Patched1 (Ptc1)-Rezeptor, ein 12-Transmembran-Protein. Das Patched-Transmembranprotein fungiert als Shh-Rezeptor und als Antagonist des Shh-Signalweges (Wechsler-Reya, 2003). Patched (*PTCH* für humanes, *Ptc* für das Maus-Gen) (Wetmore, 2003) gilt deshalb auch als Tumorsuppressor-Gen. Die Signalwegs-Maschinerie wird als konserviert zwischen *Drosophila melanogaster* (Arthropoda) und den Vertebraten betrachtet (Di Marcotullio *et al.*, 2006; Scales & de Sauvage *et al.*, 2009).

Obwohl die molekulare Maschinerie des Sonic Hedgehog-Signalweges nicht vollständig verstanden ist, ist das primäre Cilium entscheidend für die Signaltransduktion. Ptc1 verhindert die Akkumulation von Smo an dieser Organelle und damit inhibiert es, indem es dort selbst residiert. Nach einer Signalwegs-Aktivierung, wenn Shh an Ptc1 gebunden hat, verlässt Ptc1 das Cilium und Smo kann sich dort ansammeln (Rohatgi *et al.*, 2007).

Die Hedgehog-Signaltransduktionskette bei Vertebraten schließt im Wesentlichen folgende Prozesse ein:

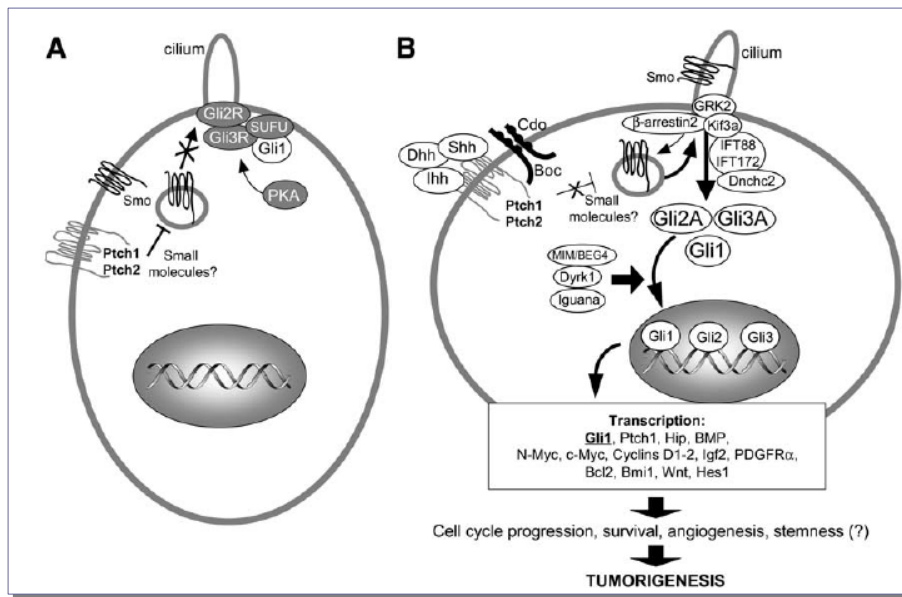
*Bei fehlender Hh-Stimulierung:*

Ein Komplex von SuFu (Suppressor of Fused) mit Gli-1 und den ungekürzten Proteinen Gli-2 und -3 formiert sich. SuFu isoliert diese im Cytoplasma und stabilisiert diese zunächst. Gleichzeitig wird die nucleäre Translokation verhindert. Ein weiterer Komplex ist nachgeschaltet. Dieser wird aus der Protein Kinase A (PKA), der Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) und Casein-Kinase 1a (CK1a) gebildet. Dieser Komplex zusammen mit SuFu und Kif7 (Kinesin-4 Familien-Mitglied) phosphoryliert den C-Terminus der nicht-abgespaltenen Gli-2 und -3-Proteine. Daraus resultieren durch proteasomalen Abbau am C-Terminus verkürzte Gli-2, -3-Proteine, die als Repressoren fungieren. Diese inhibieren die Transkription von Zielgenen. Inhibierung des Signalweges kann auf der Höhe des Smo und SuFu (Gli-Antagonist), welches die Gli-Faktoren bindet und den nukleären Transfer behindert, erfolgen (Hooper & Scott, 2005; Di Marcotullio *et al.*, 2006; Scales & de Sauvage *et al.*, 2009).

*Bei Hh-Stimulierung:*

Casein-Kinase 1 (CK1a) und die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase GRK2 phosphorylieren Smoothened am C-Terminus. Dies führt zu einer Konformationsänderung. Diese trägt, abhängig von  $\beta$ -Arrestin und der Kinesin-2 Motor Untereinheit Kif3a, zum Transport und der Rekrutierung von Smoothened an der

Membran des primären Ciliums. Weiter soll die Konformationsänderung durch die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen zur Signaltransduktion beitragen. Jedenfalls soll Smoothed nach Aktivierung mittels der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen hyperphosphoryliert vorliegen. Ein weiterer Schritt folgt von dem aktivierten Smoothed, welches zunächst die Disassemblierung der Gli's von SuFu herbeiführt. Kif7 könnte dabei mitwirken. Diese Dissoziation schützt vor der Abspaltung der C-Domäne und der Bildung der Repressor-Form, sowie der Entstehung zu Gli-Aktivatoren. Die Aktivatoren Gli-1 und -2, sowie das nicht-verkürzte Gli-3 Protein, akkumulieren im Cilium, und translozieren weiter in den Nucleus, wo sie die Transkription von Hedgehog-Zielgenen aktivieren (Ryan & Chiang, 2012; Robbins *et al.*, 2012; Teglund & Toftgård, 2010; Meloni *et al.*, 2006; Di Marcotullio *et al.*, 2006). Das Trio der Gli-Proteine transloziert in den Nucleus und bindet an GLI-Promotoren, um die Signalwegs-spezifische Transkription von Zielgenen zu induzieren. Gli-1 amplifiziert im Nucleus initial das Aktivierungs-Signal und führt zur Expression von *GLI1* selbst und anderer Zielgene. Eine Erhöhung des Expressionslevels der *GLI1*-mRNA gilt als Maß für die Shh-Signalwegsaktivität bzw. als Zeichen einer Signalwegsaktivierung. Gli-1 ist der Hauptaktivator. Die *GLI*-Gene (Glioma associated Oncogene) sind Zink-Finger Transkriptionsfaktoren und vermitteln die Signalwegs-induzierte Transkription von Zielmolekülen (siehe Abbildung 3). Inhibierung des Signalweges kann auf der Höhe des Smo und SuFu (Gli-Antagonist), welches die Gli-Faktoren bindet und den nukleären Transfer behindert, erfolgen (Hooper & Scott, 2005; Di Marcotullio *et al.*, 2006; Scales & de Sauvage *et al.*, 2009). Negative Regulatoren des Sonic Hedgehog Signalweges wie PKA können zu dessen Inhibierung führen, mit und ohne Shh-Stimulation, indem der SuFu-Gli Komplex das primäre Cilium nicht erreichen kann, wodurch weiter die Dissoziation des Komplexes verhindert wird (Scales & de Sauvage, 2009; Tukachinsky *et al.*, 2010). Smo ist auf der Plasma-Membran lokalisiert, in intrazellulären Vesikeln und auf Primärzilien. Bei der Aktivierung von Smo findet die Phosphorylierung durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 2 (GRK2) statt, wobei weiterhin das  $\beta$ -Arrestin-2 als Scaffold-Protein eingeschaltet wird, um Smo zu internalisieren. Die Interaktion des Ptc zu Smo ist nicht ganz verstanden, denn Smo kann von hydrophoben niedrig-molekularen Substanzen (small molecules) moduliert werden. (Di Marcotullio *et al.*, 2006; Scales & de Sauvage *et al.*, 2009). Ein Mutations-bedingter Funktionsverlust von Patched führt zu einer unkontrollierten Aktivierung von Smo und damit zur Induktion Wachstums-fördernder Gene.



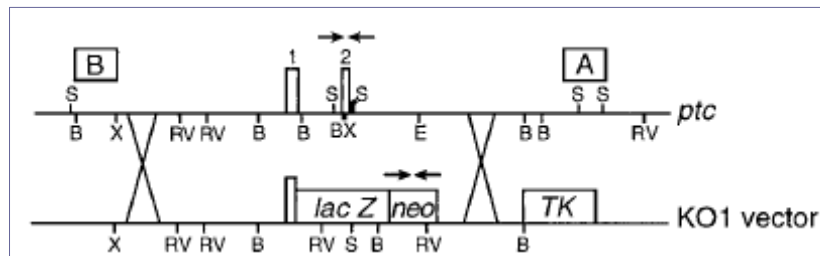
**Abbildung 3: Mechanismus der Ptc-vermittelten Signal-Aktivierung des Shh-Weges.** (A) zeigt die wichtigsten Regulatoren bei Inaktivierung, wie Gli-2 und Gli-3, die als Repressoren fungieren. (B) Die Signalaktivierung führt zur Rekrutierung eines Komplexes, mit der Folge, dass Gli-Proteine in den Nucleus transloziert werden, wo die Transkription von Zielgenen erfolgt. Dabei wirken die Gli-Proteine als Aktivatoren. Aus: Di Marcotullio *et al.*, 2006.

Im Cerebellum sollen ungefähr 25% der Tumore aus Körnervorläuferzellen entstehen. Signalwegsaktivierende Mutationen von Komponenten der Sonic Hedgehog-Signaltransduktions-Kette tragen zur Tumorentwicklung bei (Gibson *et al.*, 2010). Bekannte Mutationen betreffen *PTC* (Punktmutationen), *SMO* und *SuFu* (Suppressor of Fused). Mutation von *SuFu* resultiert in einem verkürzten *SuFu*, das unfähig ist, das *GLI-1*-Gen aus dem Nucleus herauszuschleusen und bringt eine permanente Aktivierung mit sich (Wetmore, 2003). Eine weitere Ursache ist die chromosomale Deletion des 17p-Arms, die zum Isochromosom 17q führt, und mögliche Tumorsuppressor-Gene verändert. Dieses ist bei über 50% dieses Tumors zu finden. Deletion des Tumorsuppressor-Gens *REN*, welches auf 17p liegt, führt zur unkontrollierten Signalweiterleitung von Hedgehog. Der *REN* Loss-of-Function Zustand ist in allen 17p-deletierten Medulloblastomen gefunden worden. Es wurde diskutiert, ob die fehlende Funktion von *REN* den undifferenzierten Status der sich entwickelnden Körnerzellen (GCP) aufrecht erhalten könnte, wodurch diese einen Stammzell-Charakter annehmen könnten. Weiterhin sind unmittelbar betroffene Gene des Hedgehog-Signalweges beeinflusst, die aufgrund dieser Deletion zu tumorösen Veränderungen beitragen (Ellison, 2002; Feretti *et al.*, 2005).



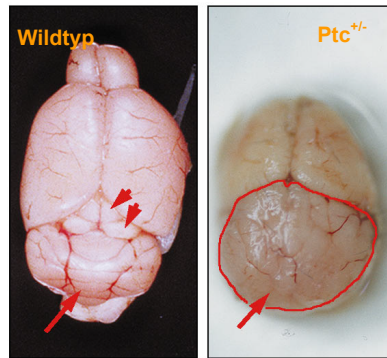
1.4.1.1 Das Patched ( $ptc^{+/-}$ ) Maus-Modell

Im  $ptc^{+/-}$ -Modell wurde ein Allel des *Ptc1*-Gens durch homologe Rekombination inaktiviert, indem ein Teil von Exon 1 und das ganze Exon 2 durch das *LacZ*-Gen und ein Neomycinresistenz-Gen ausgetauscht wurde (siehe Abbildung 4) (Goodrich *et al.*, 1997).



**Abbildung 4:  $Ptc^{+/-}$ -Knockout-Konstruktion.** Der das *LacZ*- und *Neo*-Gen, folgend aus dem Maus-Protamine 1 (mP1) Intron und einer Polyadenylierungs-Sequenz enthaltende KO1-Vektor wurde in 129-abgeleitete R1 embryonale Stammzellen mittels Elektroporation transfiziert. Daraus entstehende Klone wurden in Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen injiziert. Aus den resultierenden Chimären wurden Männchen mit Weibchen der B6D2F1-Mauslinie gepaart, um heterozygote Individuen zu erhalten. Für homozygote *ptc*-negative Embryos (bereits *in utero* letal), wurden die Heterozygoten miteinander gepaart. (Aus: Goodrich *et al.* 1997; <http://jaxmice.jax.org/strain/003081.html> [04.03.2013], The Jackson Laboratory, JAX<sup>®</sup> mice Database).

$Ptc^{-/-}$ -Mäuse sind nicht lebensfähig. Im Embryonalalter zwischen E9 und E10.5 sterben diese Embryos ab. Sie zeigen ein offenes Neuralrohr und Herzschäden. Die Frequenz der  $Ptc^{+/-}$ -Mäuse, Medulloblastome zu entwickeln, liegt bei 14%. 4% der Tiere entwickeln ein Rhabdomyosarkom. Erkrankte Mäuse fallen durch Bewegungsträgheit, gestörte Bewegungskoordination und durch eine beulenartig erhobene Schädeldecke auf. In Geweben, die das *Ptc*-Gen exprimieren, wird *LacZ* als Indikatorgen exprimiert. Durch Färbung kann dadurch die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges visualisiert werden. Die Aktivierung des *LacZ*-Gens, das zur  $\beta$ -Galactosidase-Expression führt, kann durch Blaufärbung des Substrates X-Gal dargestellt werden. Die Tumormasse ist weich bis gallertartig und infiltriert das Kleinhirn (siehe Abbildung 5). In diesem Mausmodell kommen auch Rhabdomyosarkome an Muskeln der Extremitäten im abdominalen Bereich vor (Pietsch *et al.*, 1997; Goodrich *et al.*, 1997; Corcoran & Scott, 2001; Raffel, 2004; Wetmore, 2003).



**Abbildung 5: Dorsale Ansichten des Kleinhirns bei Wildtyp- und  $Ptc^{+/-}$ -Mäusen.** Rechts: Vom Medulloblastom überwucherte Strukturen des Cerebellums. Modifiziert nach Goodrich *et al.* 1997.

#### 1.4.2 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg spielt eine wichtige Rolle, die Balance zwischen Proliferation und Apoptose von Zellen während Entwicklungs-Prozessen zu regulieren. Er kontrolliert die Selbsterneuerung und die Multipotenz von Stamm- und Tumorstammzellen. *In vitro* und *in vivo* wurde gezeigt, dass dieser Signalweg den Stammzell-Pool durch Liganden-Aktivierung expandiert (Wang *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2012; Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2006). Neurale Stammzellen exprimieren den Notch-Effektor CBF1 (C-promoter binding factor 1) stärker als intermediäre neuronale Vorläuferzellen. Neurale Stammzellen differenzieren zu intermediären neuronalen Vorläuferzellen, wenn CBF1 herunterreguliert wurde. Dagegen führte eine Aktivierung des CBF1 bei Vorläuferzellen nicht zur Umwandlung in neurale Stammzellen. Möglicherweise unterscheidet die CBF1-Aktivierung zwischen Stamm- und Vorläuferzelltypen (Mizutani *et al.*, 2007).

Weiterhin vermittelt der Notch-Signalweg die Signaltransduktion von benachbarten Zellen und ist in Zellschicksal und Musterbildung während der embryonalen Entwicklung involviert. Die Notch-Familie besteht aus Notch-1, -2, -3, und -4. Notch ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Domäne, welche Wiederholungen der EGF-like-Domäne aufweist, sowie eine intrazelluläre Domäne besitzt. Die Notch-Liganden, die von Donor-Zellen exprimiert werden, sind ebenfalls Transmembranproteine, die aus drei Proteinen der Delta-Like Familie (DLL-1, -3, -4) und zwei Jagged Proteine (JAG-1, und -2) bestehen. Die Signalweiterleitung von zwei benachbarten Zellen beginnt mit der Bindung eines Liganden an Notch auf der Seite der rezeptortragenden Zelle. Es kommt zu zwei enzymatischen Abspaltungen, einmal extrazellulär durch  $\alpha$ -Sekretasen, ADAM-10 und ADAM-17 ( $\alpha$  disintegrin and metalloprotease), und intrazellulär durch den  $\gamma$ -Sekretase/Presenilin-Komplex. Die

Domäne NICD (Notch intracellular domain) wird abgespalten, und transloziert in den Nukleus, wobei Co-Repressoren aus CSL (CBF1/Suppressor of hairless/LAG-1) Transkriptionsfaktoren ersetzt werden. Darauf folgend werden Co-Aktivatoren rekrutiert. Zielgene des Signalweges sind die Transkriptionsfaktoren *Hes*, *c-myc*, *NF- $\kappa$ B2* und *p21*. Notch soll eine Rolle bei der Proliferation und Blockierung der Differenzierung von Körnervorläuferzellen, sowie der Medulloblastom-Entwicklung spielen. Notch-Blockade führte zu einer verringerten Klonogenizität. Damit wurde die Aufrechterhaltung von Stammzell-Eigenschaften im Medulloblastom durch Notch beschrieben. Eine Blockade unterdrückt die Expression des Hes1-Proteins. Dies bewirkt Zellzyklus-Austritt, Apoptose und Ausdifferenzierung in Medulloblastom-Zelllinien. Eine Notch-Blockade reduzierte ebenfalls die CD133-positive Population, was als Hinweis dafür betrachtet wird, dass die Stammzellen verringert wurden (Fan *et al.*, 2006 und 2010; Guessous *et al.*, 2008; Solecki *et al.*, 2001). Eine wichtige Rolle des Notch-Signalweges betrifft die Regulation des Zellzyklus. Des Weiteren kann Hypoxie den JAG1-Liganden aktivieren und die Selbsterneuerung von Stammzellen und die Tumor-Metastasierung fördern (Ables *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2011).

### 1.4.3 WNT-Signalweg

Wnt-Moleküle (*Drosophila-Wingless*, Proto-Onkogen *Int-1* in der Maus) sind extrazelluläre Signalproteine, die den Wnt-Signalweg aktivieren (Pollard & Earnshaw, 2007). Beim WNT-Signalweg existieren der kanonische und nicht-kanonische Signalweg. Der kanonische Signalweg ist an der Determination des Zellschicksals und der Zellproliferation beteiligt und spielt eine Rolle während der embryonalen Entwicklung und der Gewebe-Homöostase. Der nicht-kanonische Signalweg kontrolliert die Zell-Bewegung und die Gewebe-Polarität. Welche WNT-Signale transduziert werden, hängt von der Expression der signalspezifischen intrazellulären WNT-Regulatoren und Rezeptoren ab. Findet keine WNT-Signalaktivierung statt, wird die zentrale Komponente  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und abgebaut, indem es mit APC (Adenomatous polyposis coli) und AXIN einen Komplex eingeht. Durch GSK-3 $\beta$  und Casein-Kinase (CKI $\alpha$ ) wird  $\beta$ -Catenin an seiner NH<sub>2</sub>-terminalen Degradations-Box phosphoryliert. Die NH<sub>2</sub>-terminale Degradations-Box wird wiederum für den nachfolgenden Proteasom-vermittelten Abbau durch den  $\beta$ TRCP1- oder  $\beta$ TRCP2-Komplex polyubiquitinyliert. Die kanonische  $\beta$ -Catenin/WNT-Signalkaskade wird durch die Rezeptoren der Frizzled-Familie und dem LRP5/LRP6-Korezeptor vermittelt. Dabei wird ein FZD-DVL-Komplex mit dem LRP5/6-AXIN-FRAT-Komplex assembliert, um GSK-3 $\beta$  zu inaktivieren. Wird  $\beta$ -Catenin nicht phosphoryliert, akkumuliert

und transloziert es in den Nukleus. Nukleäres  $\beta$ -Catenin bildet einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, sowie mit weiteren Proteinen und anderen Coaktivatoren. Dieser nukleäre Komplex aktiviert die Transkription von Zielgenen, unter anderem *DKK1*, *WISP1*, *MYC*, *CCND1*. An dem nicht-kanonischen Signalweg nehmen Rezeptoren der Frizzled-Familie und die ROR2/RYK Co-Rezeptoren teil. Die Signale werden weiter durch die Dishevelled- oder  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskade vermittelt. Zur Krebsentstehung tragen epigenetisches Silencing, oder Loss-of-function-Mutationen von negativen Regulatoren des kanonischen WNT-Signalweges bei. Hierzu trägt auch die gestörte Interaktion mit anderen Signalwegen, welche die Gewebe-Homöostase, Selbst-Erneuerung von normalen Stammzellen, Differenzierung von Vorläuferzellen (Transit Amplifying Zellen) und Proliferation regulieren bei. Diese Signalwege sind unter anderem die FGF-, Notch-, Hedgehog- und TGF $\beta$ - (Transforming growth factor  $\beta$ /bone morphogenetic Protein) -Signalwege (Katoh & Katoh, 2007).

### 1.4.4 Pharmakologische Aktivierung oder Blockade der Shh-, WNT- und Notch-Signalwege

Die molekulare Modulation der Entwicklungskontrollsignalwege durch spezifische Agenzien blockiert oder aktiviert ihre Funktion. Das Studium der Auswirkung auf das Potential zur Bildung von Tumorneurosphären kann Hinweise auf neue verbesserte Ansätze geben.

#### 1.4.4.1 Modulation des Shh-Pathway

Die Aktivierung oder Hemmung des Sonic Hedgehog-Signalweges auf dem Level von Smoothened (Smo) ist nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass Ptc1 katalytisch (Taipale *et al.*, 2002) wirkt, ebenso dass endogene niedrig-molekulare Substanzen teilnehmen. Die Modulation von Smo mittels Agonisten könnte zu einem besseren Verständnis beitragen. Beobachtungen deuten an, dass Smo unterschiedliche Protein-Konformationen einnehmen und dadurch variierende Aktivität erlangen kann (Chen *et al.*, 2002).

**SAG** ist ein synthetisch hergestelltes Molekül und aktiviert die Signaltransduktion der Sonic Hedgehog-Signalkette. Es ist ein Chlorbenzothiophen-enthaltendes Molekül, welches neuronale und gliale Vorläuferzellen zum Proliferieren anregt, ohne sich auf die

Differenzierung auszuwirken (Bragina *et al.*, 2010). SAG bindet direkt an Smo und aktiviert den Signalweg (Luciferase-Reporteraktivität) in geringen Konzentrationen im nM-Bereich. In hohen (ungefähr ab 1  $\mu$ M) Konzentrationen wirkt es inhibierend. Die halbmaximale Konzentration zur Aktivierung des Shh-Signalweges liegt bei einem EC<sub>50</sub>-Wert von  $\approx$ 3 nM. SAG und KAAD (siehe unten) wirken antagonistisch, da beide am gleichen Molekül binden. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Signalweges durch SAG nach Transfektion von Ptch1-Molekülen abnahm. Weiter wurde gefunden, dass eine hohe Ptc1-Expression mit der Zunahme von Cyclopamin-Bindung an Smo zusammenfällt (Chen JK *et al.*, 2002).

**SANT-1** ist ein Antagonist und bindet ebenfalls am Smo. SANT-1 hat einen IC<sub>50</sub>-Wert von 20 nM. SANT-1 konnte die Stimulierung des Signalweges durch die SAG-Aktivität um das 60-fache abschwächen im Vergleich zu der 10-fachen Verringerung der anderen Antagonisten mit ähnlicher chemischen Struktur SANT-2, -3, und SANT-4 (Chen JK *et al.*, 2002).

**Cyclopamin** ist ein teratogenes Alkaloid der Pflanze *Veratrum californicum* (Kornlilie) und wirkt antagonistisch am Smoothened-Molekül der Hedgehog-Signalkette. Es gehörte zu den ersten spezifischen Inhibitoren aus der Klasse der *small molecules*, das identifiziert wurde.

Zellen wurden mit einem Luciferase-Reporter und mit Smo-cDNA transfiziert und mit 5  $\mu$ M Cyclopamin behandelt. Diese zeigten als Folge, eine verringerte Expression des Luciferase-Reporters im Vergleich zu nicht mit Cyclopamin behandelten Zellen, die Smo überexprimierten. Cyclopamin-Resistenz wurde in Smo-Mutanten beobachtet, dagegen hatte Cyclopamin in Wildtyp-Smo exprimierenden Zellen bei Shh-Aktivierung inhibierend gewirkt. **KAAD-Cyclopamin** ist ein chemisch synthetisiertes Derivat des Cyclopamins und ist 10- bis 20-fach potenter als Cyclopamin. Es wurde entwickelt, um die toxische Wirkung von Cyclopamin in hohen Konzentrationen ab 10  $\mu$ M zu umgehen (Taipale, 2000; Chen *et al.*, 2002; Stecca & Ruiz i Altaba, 2005).

#### 1.4.4.2 Modulation des Notch-Pathways

In Therapieansätzen zur Krebsbehandlung werden auch  $\gamma$ -Sekretase-Blocker eingesetzt. Die Aktivierung des Signalweges erfolgt nach Ligandenbindung durch proteolytische Spaltungen des Notch-Transmembran-Rezeptors, an extra- und intrazellulären Stellen, der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase entsprechend. Intrazellulär erreicht NICD durch Translokation den Nukleus, um dort die Transkription von Zielgenen wie *Hes1* und *Hey1* zu initiieren, die die Differenzierung steuern (Nam *et al.*, 2008).

**DAPT** (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) ist ein  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor, welches die Produktion der A $\beta$ -Peptiden im Gehirn durch Inhibition

von  $\gamma$ -Sekretasen reduziert (Dovey *et al.*, 2001). Im Medulloblastom wurde nach Behandlung mit DAPT das Wachstum reduziert und führte zum Arrest der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Shih & Wang, 2007).

**L-685,458** (5S)-(tert-Butoxycarbonylamino)-6-phenyl-(4R)-hydroxy-(2R)-benzylhexanoyl)-L-leucy-L-phenylalaninamide und **LY-411575** (N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide) sind weitere  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren. L-685,458 zeigt Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor (A $\beta$ -PP) inhibierende Aktivität (Shearman *et al.*, 2000). Die effektive Hemmung von L-685,458 geht auf eine nicht-kompetitive Bindung an der  $\gamma$ -Sekretase zurück (Tian *et al.*, 2002). LY-411575 ist ebenfalls ein potenter Inhibitor. Aus zellbasierten Assays ist ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,082 nM bekannt (Wong *et al.*, 2004).

### 1.4.4.3 Modulation des WNT-Pathways

Für die Differenzierung und Stammzell-Kontrolle von Stammzell-ähnlichen Zellen stellt der WNT-Signalweg einen wichtigen Akteur dar. Wnt-Moleküle bilden eine grosse Familie aus sekretierten, hydrophoben Glykoproteinen, sie sind an unterschiedlichen Entwicklungs-Prozessen beteiligt. Wnt-Liganden binden an Frizzled-Rezeptoren und LRP5/6-Korezeptoren an der Zelloberfläche. Dies führt zur Veränderung der  $\beta$ -Catenin-Konzentration im Cytoplasma und im Nukleus, wo Zielgene des Wnt-Signalweges transkribiert werden (Mikels & Nusse, 2006). Modulation der WNT-Aktivierung kann ebenfalls durch die unterschiedliche Dosis an  $\beta$ -Catenin erfolgen, abhängig vom Verlust oder Defekt des APC-Gens. Diese wirkt sich auf den Differenzierungs-Grad bzw. Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit von embryonalen Stammzellen aus (Kielman *et al.*, 2002).

Das **Wnt-3A-Protein** vermittelt die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signaltransduktion und ist bei neuralen Stammzellen entscheidend für den Erhalt der Selbsterneuerungsfähigkeit (Willert *et al.*, 2003).

**Dkk-1** ist ein spezifischer Inhibitor des Wnt-Signalweges. Dkk-1 bindet an der extrazellulären Domäne des LRP5/6 Ko-Rezeptors. Dieser enthält vier EGF-ähnliche Domänen, an die der Antagonist Dkk-1 bindet. Die Bindung des Dkk-1 an den LRP5/6-Rezeptor verhindert die Bildung des aktiven Wnt-Frizzled-LRP5/6 Rezeptor-Komplexes und blockiert damit den kanonischen Wnt-Signalweg (Zorn, 2001).

**GSK-3 $\beta$**  ist ein multifunktionales Enzym, welches an vielen Regulationsprozessen beteiligt ist, wie Metabolismus, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und in der Tumorentwicklung. Eine anti- oder pro-aktive Rolle von GSK-3 $\beta$  im Tumor ist nicht klar. Eines der gut untersuchten Substrate von GSK-3 $\beta$  ist das  $\beta$ -Catenin des Wnt-Signalweges (Luo, 2009). Der GSK-3 $\beta$  Inhibitor XII, TWS119, ist ein zell-permeables Pyrrolopyrimidin.

Dieser ist ein potenter Inhibitor des Substrates GSK-3 $\beta$ , welches die  $\beta$ -Catenin-Konzentration erhöht. Die genaue Wirkung des GSK-3 $\beta$  Inhibitors ist nicht bekannt; es gibt Hinweise, dass er die Aufrechterhaltung des neuronalen Progenitorzellpools durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges oder die neuronale Ausdifferenzierung induzieren kann. In embryonalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor die neuronale Differenzierung induziert (Ding *et al.*, 2003).

**WNT-Ag** ist ein zell-permeables Pyrimidin und wirkt als Aktivator des WNT-Signalweges, ohne die GSK-3 $\beta$ -Aktivität zu inhibieren. Er soll die  $\beta$ -Catenin-abhängige WNT-Signalwegsaktivität stimulieren (Liu *et al.*, 2005). In der Literatur gelten der WNT-Ag und der GSK-3 $\beta$ -Inhibitor als Aktivatoren des Signalweges, indem durch Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-Level Zielgene des Signalweges exprimiert werden (Lim *et al.*, 2008).

## 1.5 CD133

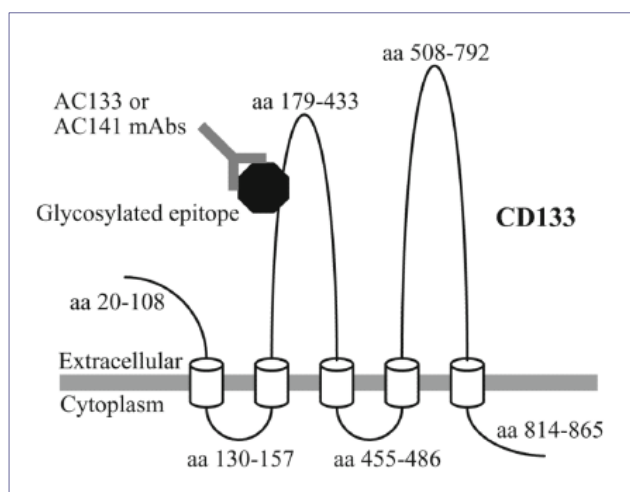
### 1.5.1 CD133 als Stammzellmarker

CD133 wird auf Stammzell-ähnlichen Zellen exprimiert. Erstmals in Blutzellen wurden doppelt-positive AC133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-Populationen als humane hämatopoetische Stammzellen und AC133<sup>-</sup>/CD34<sup>dim</sup>-Populationen als Progenitorzellen beschrieben (Yin *et al.*, 1997). Die Fähigkeit zur Tumorentstehung aus einer CD133<sup>+</sup>-Subpopulation mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften wurde in der Arbeit von Singh *et al.* 2004 beschrieben. Einzelzell-Suspensionen von Gehirntumoren (Glioblastom und Medulloblastom) wurden in CD133<sup>+</sup>- und CD133<sup>-</sup>-Zellen separiert, die *in vivo* und *in vitro* untersucht wurden. Nach Xenograft-Transplantation in immundefiziente NOD-SCID Mäusen konnten nur CD133<sup>+</sup>-Zellen den ursprünglichen Tumor rekapitulieren, jedoch nicht die CD133<sup>-</sup>-Population. Selbst das Einpflanzen von 50 000 bis 100 000 CD133<sup>-</sup>-Zellen initiierte keinen Tumor. *In vitro* wurde die Selbsterneuerungskapazität der CD133<sup>+</sup>-Einzelzellen im Sphärenbildungs-Assay gezeigt. Nach dieser Arbeit sind CD133-positive Zellen proliferativ und *in vitro* selbsterneuernd. Nur positive Zellen können CD133-positive und CD133-negative Zellen generieren und in serieller Transplantation Tumoren bilden. Aus der Erkenntnis, dass aus CD133-positiven Zellen sowohl positive als auch negative hervorgehen, leiteten die Autoren die Existenz einer Tumorchierarchie ab und schrieben dem CD133<sup>+</sup>-Antigen die Eigenschaften zu, eine Tumor-initiiierende Subpopulation zu definieren.

### 1.5.2 Prominin/CD133: Topologie

CD133 ist ein Oberflächenprotein. Sein glykosyliertes Epitop, welches von den Antikörpern AC133 und AC141 erkannt wird, gilt als Tumorstammzell-Marker. CD133 ist ein 5-Transmembranprotein mit 2 großen extra- und 2 kleinen intrazellulären Schleifen (siehe Abbildung 6). Das NH<sub>2</sub>-terminale Ende ragt im extrazellulären Raum heraus; das COOH-terminale Ende befindet sich im Cytoplasma (Bidlingmaier *et al.*, 2008).





**Abbildung 6: Topologie von CD133.** Das glykosylierte Epitop wird von den monoklonalen Antikörpern AC133 und AC141 erkannt (Bidlingmaier *et al.*, 2008).

In der Arbeit von Fargeas *et al.*, 2003 werden die Proteinfamilie des CD133 und seiner Spleißvarianten in einer Nomenklatur zusammengefasst. Es handelt sich um die sogenannte Prominin-Familie (lat. *prominere* = prominent sein). Das in Maus-Neuroepithelzellen zuerst entdeckte Protein ist auf Plasmamembran-Ausstülpungen lokalisiert und wird so seinem Namen gerecht. Zu dem humanen Protein zeigt das murine Prominin-1 eine 60% Homologie der Aminosäure-Sequenz (Bidlingmaier *et al.*, 2008). Allgemein wird CD133 auch Prominin-1 genannt, da es sich um eine orthologe Gruppe handelt. Dabei ist zu beachten, dass das humane CD133-Protein nicht mit dem AC133-Antigen synonym ist. Das AC133-Antigen bezieht sich auf das glykosylierte Epitop auf dem CD133- bzw. Prominin-1- Molekül. AC133 soll auf nicht-differenzierte Zellen beschränkt sein, während das CD133 / Prominin-Protein breit exprimiert ist. Aus dieser Erkenntnis heraus wurde CD133/AC133 als Tumorstammzellmarker etabliert.

Das humane *PROM1*-Gen steht unter der transkriptionellen Kontrolle von fünf alternativen Promotoren. Durch alternatives Splicing resultieren 7 mRNA-Transkripte. Davon sind die Isoform 1 und 2 glykosyliert, und damit spezifisch für Stamm- und Vorläuferzellen (Shmelkov *et al.*, 2004; Yu *et al.* 2002; Ferrandina *et al.*, 2009). Weiterhin sollen CD133<sup>+</sup>-Zellen eine Rolle bei der Regulation von Signalwegen spielen. Eine andere biologische Funktion ist die Beteiligung von CD133 an der Plasmamembran-Topologie. Allgemein wird es als ein Marker von tumorigenen und klonogenen Populationen in heterogenen Tumoren betrachtet, jedoch ist die biologische Funktion nicht genau verstanden (Mizrak *et al.*, 2008).

### 1.6 Tumorstammzellmarker und Methoden

Die auf das Medulloblastom übertragene CSC-Hypothese eröffnet neue Gedankenwege, die Entstehung dieses Tumors zu verstehen, um auf eine bessere medizinische Behandlung hin zu arbeiten.

Für das Studium von Medulloblastomstammzellen wird eine Anreicherung von solchen Subpopulationen angestrebt. Dies wird mittels bekannter Methoden aus den Untersuchungen von embryonalen und adulten Stammzellen erreicht. Zu erwähnen wäre die Ausnutzung der Selbsterneuerungs-Kapazität mittels Neurosphären-Assays, der Tumorstammzellmarker CD133, die Schutzmechanismen von Zellen wie die Aldehydehydrogenase-Aktivität und Seiten-Populationen (side population), und die Quiescence als Eigenschaft von Stammzellen (Srivastava & Nalbantoglu, 2010; Manoranjan *et al.*, 2012).

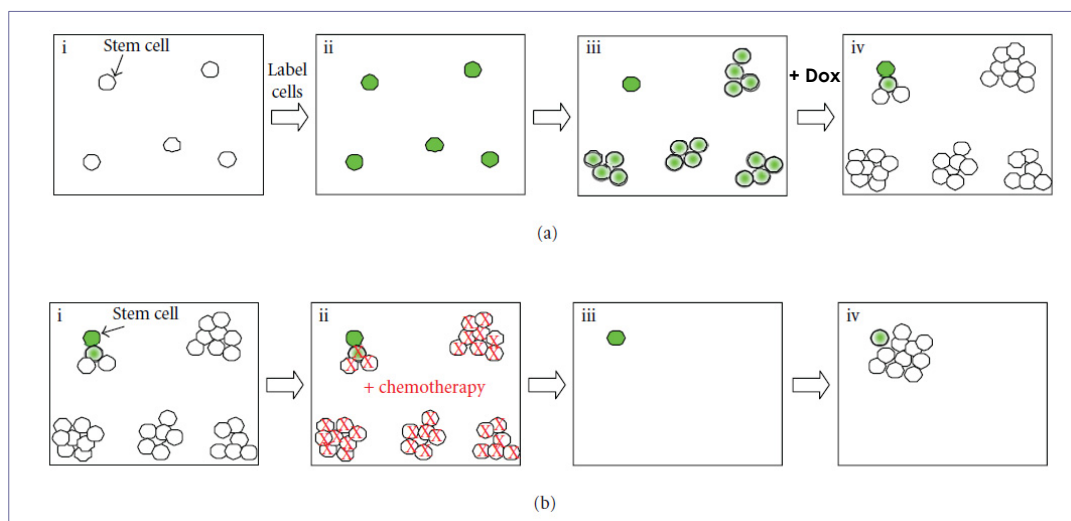
Identifizierte embryonale Stammzellmarker regulieren Pluripotenz und Differenzierung. Die embryonale Stammzell-Differenzierung wird durch das Netzwerk der Transkriptionsfaktorproteine Nanog-Sox2-Oct4 reguliert. Bei der malignen Transformation durch adulte Stammzellen sollen „Stemmes“-Gene beteiligt sein. Einige Schlüssel-Stammzellgene sind *NESTIN*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* (Kashyap *et al.*, 2009). Potentielle Tumorstammzellmarker, die für die Identifikation von solchen Stamm- bzw. Tumorstammzell-Populationen bei unterschiedlichen Tumorentitäten eingesetzt wurden, sind mannigfaltig und uneinheitlich. Daher werden für die Aufklärung einer CSC-Hierarchie weitere Werkzeuge und Überlegungen diskutiert (Garvalov & Acker, 2011; O'Brien *et al.*, 2010; Subramaniam *et al.*, 2010).

### 1.6.1 Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität als Stammzell-Marker

Als Marker zur Identifikation und Charakterisierung von Stammzellen und Tumorstammzellen wird in vielen Geweben und Tumoren die Aldehyddehydrogenase-Aktivität (ALDH) betrachtet. Viele Aldehyde besitzen Zytotoxizität und sind kanzerogen. Die Zelle besitzt unterschiedliche Enzymklassen, um diese zu metabolisieren. Aldehyde sind wegen der elektrophilen Carbonyl-Gruppe hochreaktiv (Lindahl, 1992). Die NAD(P<sup>+</sup>)-abhängige irreversible Oxidation von exogenen und endogenen Aldehyden geschieht durch die Enzyme der ALDH-Superfamilie, die aus 19 funktionellen Genen besteht und evolutionär konserviert sind (Marchitti, 2008; Marcato *et al.*, 2011). ALDH-Aktivität wandelt in normalen und malignen Stammzellen Retinol zu Retinsäure um, welches wichtig für die Differenzierung von Zellen ist. Toxische Produkte werden durch die ALDH-Aktivität unschädlich für die Zelle gemacht (Ginestier *et al.*, 2007). Einige Isoenzyme werden stärker im Tumorstammzell-Kontext diskutiert. Dies sind vor allem ALDH1A1 und ALDH1A3. ALDH1A1 wurde im Brustkrebs als Tumorstammzellmarker identifiziert (Charafe-Jauffret *et al.*, 2008). ALDH1A1 ist ein cytosolisches Isoenzym und besitzt ein breites Wirkungsspektrum. ALDH1A3 kommt im Cytosol als Homodimer vor und nimmt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung ein (Marchitti, 2008; Marcato *et al.*, 2011). Ginestier *et al.* (2007) wiesen im Brustkrebs ALDEFLUOR-positive Populationen mit funktionellen Stammzell-ähnlichen Charakteristika nach, die nicht in den ALDH-negativen Populationen vorkamen. Durch Immunfärbungen identifizierte ALDH1-Populationen im Brustkrebs dienten als Prediktor für schlechtes klinisches Outcome. Auch Douville *et al.*, 2009 und Jiang *et al.*, 2009 schreiben der ALDH1-Aktivität den Status eines Stamm- bzw. Tumorstammzellmarkers im Krebs zu. Der ALDEFLUOR-Assay sei laut Herstellerangaben entwickelt worden, um die Aktivität der ALDH1-Familie zu detektieren. Allerdings konnte bewiesen werden, dass ALDH1A1-Defizienz bei hämatopoetischen Mauszellen im ALDEFLUOR-Assay sich nicht auf die ALDEFLUOR-Intensität auswirkte (Levi *et al.*, 2008). Die vom ALDEFLUOR-Assay detektierte ALDH-Aktivität gilt als solide Methode in der Stammzellforschung. Bei murinen Gehirnzellen konnten neurale Stammzellen mit Multipotenz und Selbsterneuerungsfähigkeit auf diesem Assay basierend identifiziert werden (Storms *et al.*, 1999; Corti *et al.*, 2006). ALDH1A1- und ALDH1A3-Expression wurde in einigen Tumoren mit dem ALDEFLUOR-Assay korreliert. In diesem Assay werden innerhalb einer Stammzell-Population undifferenzierte Zellen als stärker ALDH-positiv gefunden als weiter differenzierte (Moreb 2008; Marcato *et al.*, 2011).

1.6.2 Das Konzept der Label Retaining Cells (LRC's)

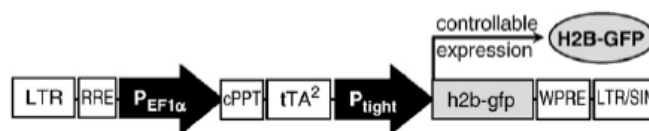
Tumorstammzellen sollen sich ähnlich wie die normalen bzw. adulten Stammzellen verhalten. Bei einer Chemotherapie sollen die langsam proliferierenden Stammzellen überleben. Der Zustand wird als Quiescence charakterisiert. Diese Zellen können den Tumor re-initiiieren, während die übrigen Zellen die Therapie nicht überleben. Für die Tumor-Resistenz gegenüber Chemotherapie wird angenommen, dass die Zellzyklus-Kontrolle, antiapoptotische Proteine, erhöhte Expression von DNA-Reparaturgenen, eine Hochregulation von Zellpumpen zur Ausschleusung von toxischen Substanzen, sowie eine höhere metabolische Aktivität der CSC durch ALDH beitragen. Die Quiescence wird deshalb als ein Mechanismus zum Überleben von CSC's betrachtet. In Ovarialtumoren bei der Maus wurde belegt, dass der CSC-Pool sich nach Bestrahlung durch höhere Klonogenizität auszeichnete und zu aggressiven Sekundär-Tumoren führte (Moore & Lyle, 2011). Label Retaining Zellen (siehe Abbildung 7) sind Zellen mit einer Fluoreszenz-markierten DNA, die diese lange behalten, da sie sich nicht bzw. langsam teilen, also sich im Ruhezustand befinden oder sich asymmetrisch teilen (Rando, 2007).



**Abbildung 7: Das Konzept der LRC's.** „Markierte“ Zellen (i), sind H2B-GFP-markiert und werden mit Doxycyclin (Dox) gepulst (iv). Schnell-proliferierende Zellen teilen sich und nach einigen Passagen verlieren sie die grüne GFP-Expression, während einige übrig bleiben, die langsam-proliferieren bzw. LRC's entsprechen. Diese wenigen Zellen (Stammzellen) sollen einer Chemo- oder Bestrahlungstherapie widerstehen (Modifiziert nach: Moore & Lyle, 2011).

Für das Studium von ruhenden, nicht-teilungsaktiven Stammzell-ähnlichen Populationen gibt es verschiedene Ansätze. Das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin wurde bisher

häufig eingesetzt, welches sich als eine nicht-sensitive und nicht für Stammzelluntersuchungen spezifische Methode herausstellte. Dieses kann nur während der S-Phase des Zellzyklus, also bei neu-synthetisierter DNA eingebaut werden (Foudi, *et al.*, 2009; Sottocornola & Lo Celso, 2012). Eine andere Herangehensweise stellt der Label Retaining Assay dar. Die Arbeitsgruppe von Fuchs erzeugte eine transgene Maus-Linie mit einem mittels Tet-Off-System kontrollierbaren Histon 2B-GFP-Reportergen. Damit konnten sie langsam-teilende epitheliale Hautstammzellen untersuchen. Nach Gabe von Doxycyclin im Trinkwasser der Mäuse in einem Zeitraum zwischen 4 Wochen und 4 Monaten, erlosch die grüne GFP-Fluoreszenz weitestgehend. Nur im Haarwurzellbereich wurde eine GFP-Expression nachgewiesen, welche in Label Retaining Zellen lokalisiert war. Damit konnten sie das Zellschicksal von langsam-teilenden Zellen verfolgen sowie Stammzell-ähnliche Eigenschaften dieses Zellareals untersuchen (Tumbar *et al.*, 2004). Eine ähnliche, unter einer Doxycyclin-Induktion entwickelte Tet-Off-Expressions-Kassette (siehe Abbildung 8) mit dem Histon H2B-GFP-Reportergen wurde von der Arbeitsgruppe Kirschner etabliert, welches in dieser Arbeit angewendet wurde (Falkowska-Hansen, 2010). Das Transgen verteilt sich wie die DNA. Nach Induktion mit Doxycyclin schwindet bei jeder Teilung ein Teil an grüner Fluoreszenz durch die Weitergabe und Verteilung an die Tochterzellen. Eine bewährte Methode hierfür stellte das Verwenden von lentiviralen Vektoren dar. Diese können proliferative sowie nicht-mitotisch aktive bzw. differenzierte Zellen infizieren und das transgene Konstrukt stabil in das Genom integrieren (Kafri *et al.*, 2000). Das Identifizieren von Label Retaining Zellen wurde bereits bei soliden Tumoren, wie dem Brustkrebs (Krishnamurthy *et al.*, 2008; Pece *et al.*, 2010), dem Melanom (Roesch *et al.*, 2010), dem Pankreas-Krebs (Dembinski & Krauss, 2009) und dem Glioblastom (Deleyrolle *et al.*, 2011) erwähnt.



**Abbildung 8: Tet-Off-H2B-GFP lentiviraler Reporter.** *PEF-1α*: Elongationsfaktor 1α-Promoter; *tTA2*, *Ptight*: Tet-transactivator und Promoter; *LTR/SIN*: Self inactivating retroviral long terminal repeat Sequenzen; *RRE*: HIV Rev Response-Element; *cPPT*: Central polypurine tract; *WPRE*: Woodchuck Hepatitis-Virus post-transkriptionales Regulations-Element. Für die Herstellung des Plasmid-Vektors wurden pWPXL-Tet-Off-Advanced-TRE-Tight-H2B-GFP u.a. die Vektoren pTet-Off-Advanced und pTRE-Tight verwendet (Falkowska-Hansen, 2010).

### 1.7 Zielsetzung

Das Medulloblastom ist ein wenig differenzierter Tumor des Cerebellums mit Stammzell-ähnlichen Charakteristika, der aus pathogenetisch unterschiedlichen Subtypen besteht. Mit Hilfe des Gehirn- und Tumorstammzellmarkers CD133 wurde versucht, Populationen von Medulloblastomzellen mit deregulierten Signalwegen zu diskriminieren. Ziel dieser Arbeit war zu analysieren, ob Tumorstammzellen aus verschiedenen Medulloblastomsubtypen ähnliche oder differente biologische und genetische Charakteristika aufweisen. Der Forschungsgegenstand dieser Arbeit sollte folgende Fragen und Untersuchungen umfassen:

1. Das Verhalten von Stammzell-ähnlichen Medulloblastomzellen basierend auf dem CD133-Tumorstammzellmarker zu untersuchen.
  - Der Stammzellcharakter der Medulloblastom-Zelllinien und CD133-Medulloblastom-Subpopulationen sollte durch Neurosphären-Assays belegt werden.
  - Die Identifikation von differentiell exprimierten Genen sollte durch die Fraktionierung von hoch und niedrig CD133-exprimierenden Subpopulationen erreicht werden.
  - Die Verteilung der Zellzyklus-Phasen der CD133-Subpopulationen sollte untersucht werden.
2. Wie ist der Einfluß der Entwicklungskontrollsignalwege auf den Tumorstammzellpool in Medulloblastomen?
  - Die Untersuchung sollte durch Applikation von spezifischen Agonisten und Antagonisten hinsichtlich der Klonogenizität durchgeführt werden.
  - Der Hedgehog-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Cerebellums. Hier sollte schwerpunktmäßig die Auswirkung spezifischer Hedgehog-Antagonisten auf die Neurosphärenbildung analysiert werden.
3. Die Differenzierungs-Fähigkeit der Neurosphären-Zellen sollte durch Initiierung einer Ausdifferenzierung untersucht werden.
4. Können in den Medulloblastom-Zellkulturen Stammzell-ähnliche Subpopulationen durch andere Ansätze identifiziert werden, die Tumorstammzell-Subpopulationen und den CD133-Tumorstammzellpool weiter eingrenzen können? Die Untersuchung sollte durch den Aldefluor- und den Label-Retaining Assay durchgeführt werden. Diese Methoden haben sich bei anderen Entitäten als bewährt herausgestellt.
5. Wie wirkt sich die  $\gamma$ -Bestrahlung auf die Neurosphärenbildung der verschiedenen Medulloblastomzelllinien aus? Die mögliche Resistenz der Tumorstammzellen, die zu Rezidiven führen können, sollte hiermit getestet werden.

## EINLEITUNG

---

Neue Einblicke in die Pathogenese und Zellbiologie des Medulloblastoms sollen durch diese Arbeit gewonnen werden.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien in Pulver- bzw. flüssiger Form wurden von den angegebenen Firmen erhalten:

2-Propanol	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
7-AAD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Aceton	Riedel-de Haen AG (Seelze, Deutschland)
Aqua ad injectabilia	Serag-Wiessner KG (Naila, Deutschland)
bisBenzimide H 33258 (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Borsäure	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Chloroform	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Doxycycline Hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DPBS (1x)	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt,
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Eosin G (gelblich)	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Mayers Hämalaunlösung	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
peqGOLD Universal-Agarose	PEQLAB Biotechnologie GMBH (Erlangen, Deutschland)
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ribonuklease A	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Xylencyanol	Merck Chemicals, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)



## 2.1.2 Reagenzien und Kits

ALDEFLUOR™ Kit	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
Amplifikation Kit aus Amplifier A+B	Ventana Medical Systems (Roche) (Tucson, Arizona, USA)
CD133 Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Cell Conditioning Solution (CC1)	Ventana Medical Systems (Roche) (Tucson, Arizona, USA)
DNA-Marker pUC 19 Msp I	MBBL (Bielefeld, Deutschland)
DNase I, RNase-frei	Ambion (Berlin, Deutschland)
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
FcR Blocking Reagent, murin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Fluoromount G	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach, Deutschland)
Indirect CD133 Microbead Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Target Retrieval Solution, 10x konzentriert	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
TRizol® Reagent	Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
Venor® GeM-Mykoplasmen Detektions Kit	Minerva Biolabs GmbH (Berlin-Köpenick, Deutschland)

## 2.1.3 Puffer und Lösungen

6x DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 15% (w/v) Ficoll Typ 400; in Millipore-H <sub>2</sub> O. Autoklaviert bei RT lagern.
7-AAD	1 mg/ml Stocklösung: 1 mg 7-AAD in 50 µl Ethanol lösen und mit 950 µl PBS auf 1000 µl auffüllen. Im Dunkeln bei 4 °C lagern.
10x TBE - Puffer	107,6 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml EDTA (9,3 g EDTA, 0,5 M, pH 8.0) – ad 1 Liter mit dH <sub>2</sub> O.
10x DNase I-Puffer (-20 °C)	100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Ethidiumbromidlösung	1% einer wässrigen 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid-Lösung zu einer 1 mg/ml Gebrauchslösung aufbereitet.
MACS-Puffer	0,5% BSA und 2 mM EDTA in PBS. Bei 4 °C kühl lagern.
PI-Stocklösung	1 mg/ml 3,8-Diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6-phenylphenanthridiniumiodid-methiodid in PBS gelöst.

### 2.1.4 Antikörper

ALEXA FLUOR 633,

Goat anti-mouse IgG

Invitrogen - Life Technologies Corporation (Karlsruhe,  
Deutschland

Anti-Prominin-1-PE, murin

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

CD133/2 (293C3)-APC, human

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

CD133/2(293C3)-PE, human

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Mouse IgG2b-PE (clone 293C3),

Isotyp-Kontrolle, monoclonal

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

## MATERIALIEN UND METHODEN

Antikörper	Reaktivität (h=human; m=murin; r=rabbit; g=goat)	Ig-Klasse	Herstellerfirma	Antigen-Demaskierung mit Hitze (Vorbehandlung)	Verdünnung
ALDH1A1	r-anti-h	monoklonal	Abcam (Cambridge, United Kingdom)	7,5 Min. Hochdruck-Erhitzung (Dampfkochtopf); DAKO Target Retrieval Solution 10x konzentriert, pH 6.0	1:50
CD15	m-anti-h	monoklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	30 Min.; Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:200
GFAP	r-anti-h	polyklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	keine	1:1000
MAP-2C	m-anti-h	monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland),	60 Min.; Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:20000
MIB-1(Ki-67)	m-anti-h	monoklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	60 Min. Hitze und Amplifikation (Kit)	1:150
Nanog	g-anti-h	polyklonal	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)	Mikrowelle, Puffer: DAKO Target Retrieval Solution 10x konzentriert, pH 6.0	1:20
NeuN	m-anti-h	monoklonal	Merck Chemicals GmbH (Millipore) GmbH (Schwalbach, Deutschland)	60 Min. und Amplifikation (Kit); Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:100
NFP	m-anti-h	monoklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	Amplifikation (Kit)	1:1000
S100-beta	r-anti-h	polyklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	30 Min.; Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:2000
Sox2	r-anti-h	polyklonal	Merck Chemicals GmbH (Millipore) GmbH (Schwalbach, Deutschland)	60 Min., Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:150
Synaptophysin	m-anti-h	monoklonal	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	60 Min.; Puffer: Cell Conditioning Solution (CC1), pH-Wert basisch	1:50

**Tabelle 1: Antikörper und Bedingungen der immunhistochemischen Färbungen von Paraffin-eingebetteten Zellpellets.**

2.1.5 Materialien für die real-time PCR (TaqMan)

Folgende Materialien und Reagenzien wurden von *Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland* bezogen:

High Capacity RNA-to-cDNA Kit

TaqMan® Gene Expression Assays Extra Small – 75

TaqMan® Fast Advanced Master Mix

MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate

MicroAmp® Optical Adhesive Film

Gene Symbol	TaqMan® Gene Expression Assays	Amplikon Länge (bp)
AAF4	Hs00232683_m1*	75
ALDH1A3	Hs00167476_m1*	60
BACE2	Hs00273238_m1*	69
CHN2	Hs00906968_m1*	113
GUCA1A	Hs00181172_m1*	67
IGSF11	Hs00541322_m1*	100
MPPED2	Hs00155582_m1*	71
PDLIM1	Hs00253222_m1*	135
PEX5L	Hs00912933_m1*	64
PRKCQ	Hs00989970_m1*	60
PROM1	Hs01009250_m1*	75
RRAGD	Hs00222001_m1*	61
STK17B	Hs00177790_m1*	104
TAF8	Hs00373264_m1*	71
TFAP2C	Hs00231476_m1*	73
TTR	Hs00174914_m1*	56
ZNF224	Hs00273760_m1*	59
ZNF286A	Hs00276637_m1*	84

**Tabelle 2: Assays zum Validieren der differentiell exprimierten Gene aus der Microarray-Analyse.**

2.1.6 Zelllinien und Materialien für Zellkultur und zellbasierte Assays

2.1.6.1 Permanente Zellkultur

Zelllinien – humane	Literatur / Quelle
D283 Med	Friedman <i>et al.</i> , 1985
D341 Med	Friedman <i>et al.</i> , 1988
DAOY	Jacobsen <i>et al.</i> , 1985
D425 Med	He <i>et al.</i> , 1991
MHH-MED-1, MHH-MED-3	Pietsch <i>et al.</i> , 1994
1580Wü, MEB-MED 8A, MEB-MED-8S	Pietsch, unpublizierte Daten
D3484	Zelllinie aus Medulloblastom-Metastase (Pleurapunktat) eines 2-jährigen Patienten.
Zelllinien – murine	
SJMM4	Li <i>et al.</i> , 2003
D2855, D3419, D3578, D3713, D3799	Zelllinie generiert aus Tumoren im Ptc <sup>+/-</sup> -Mausmodell. Goodrich <i>et al.</i> , 2007

Tabelle 3: Quellenangabe der verwendeten Zelllinien.

2.1.6.2 Zellkultur-Medien

2.1.6.3 Serumhaltige Medien und Medienzusätze

0,05% Trypsin-EDTA (1x), Phenol-Rot	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Cell Freezing Medium DMSO 1x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
DMEM, High Glucose	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
FCS	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Human-Serum, off the clot, Typ AB	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
L-Glutamine 200 mM (100x)	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Versene-Lösung	GIBCO®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.6.4 Stammzellmedien und –zusätze, rekombinante Faktoren

0.2% Heparin-Lösung	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
NeuroCult® NS-A Differentiation Kit (Human)	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human)	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
NeuroCult® Proliferation Kit (Mouse)	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
Recombinantes humanes bFGF	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Recombinantes humanes EGF	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Recombinantes humanes LIF	Chemicon Millipore GmbH (Schwalbach/Ts., Deutschland)

### 2.1.6.5 Verwendete Medien für die Zellkultur

<i>Medienzusammensetzung</i>	<i>Zelllinien (humane, murine)</i>
<i>RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin</i>	D283 Med, DAOY
<i>DMEM, 10% humanes Serum, 2 mM L-Glutamin, 2 mM Natrium-Pyruvat</i>	1580Wü, D341 Med, D425 Med, MEB-Med-8S
<i>DMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 2 mM Natrium-Pyruvat</i>	MEB-Med 8A, SJMM4
<i>RPMI 1640, 15% FCS, 2 mM L-Glutamin</i>	D3484
<i>NeuroCult® NS-A Proliferation Kit (Human), 25 ng/ml rhEGF, 20 ng/ml rhFGF</i>	D2855, D3419, D3578, D3713, D3799

**Tabelle 4: Medienmischungen für die permanente Zellkultur.**

### 2.1.7 Liganden, Agonisten und Antagonisten

DAPT	BIOMOL GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Dkk-1, recombinant human	R&D Systems (Minneapolis, U.S.A)
GANT-61	TOCRIS Bioscience, (Missouri, U.S.A)
GSK-3β-Inhibitor XII, TWS119	CALBIOCHEM Merck4Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
KAAD-Cyclopamine	CALBIOCHEM Merck4Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
L-685,458	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
LY-411575	Boehringer; Patent WO0019210, Patent WO9828268; Czirr <i>et al.</i> , 2007

SAG	CALBIOCHEM Merck4Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
SANT-1	CALBIOCHEM Merck4Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
Shh, recombinant human	R&D Systems (Minneapolis, U.S.A)
Shh, recombinant mouse	R&D Systems (Minneapolis, U.S.A)
TRC-Cyclopamine	Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)
Wnt-3A, recombinant human	R&D Systems (Minneapolis, U.S.A)
WNT-Ag	CALBIOCHEM Merck4Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
Tomatidine HCl	BIOMOL International, L. P. (Pennsylvania, U.S.A)

	<i>Antagonist / Agonist</i>	<i>Lösungsmittel</i>
<i>Sonic Hedgehog-Signalweg</i>	TRC-Cyclopamine, KAAD-Cyclopamine SANT-1, SAG	abs. Ethanol DMSO
<i>Notch-Signalweg</i>	DAPT, LY-411575, L-684,458	DMSO
<i>Wnt-Signalweg</i>	GSK-3 $\beta$ -Inhibitor Wnt-Ag rhDkk-1, rhWnt-3A	abs. Ethanol DMSO PBS

**Tabelle 5: Lösungsmittel der Liganden für die Neurosphären-Assays.**

## 2.1.8 Plastikmaterialien

0,22  $\mu$ m Stericup and Steritop

Vacuum Filter Cups

Millipore, (Schwalbach/Ts., Deutschland)

15 ml-, 50 ml-Röhrchen

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

CELLSTAR 24-Zellkultur Loch-Platten

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Combitips plus, Pipettenspitzen, steril

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Einmal-Plastikpipetten, steril

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Kapseln (Tissue-LochHistoScreen Cassettes)

Microm International GmbH (Walldorf, Deutschland)

Kryoröhrchen (Thermoscientific

Nunc Cryotube Vials)

Thermo Fisher Scientific Inc. (Roskilde, Dänemark)

Nalgene Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container

(Einfrier-Behälter mit Isopropanol)

Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)

Pipetten-Spitzen

Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Pre-Separations Filter, 30  $\mu$ m

Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach, Deutschland)

Reaktions-Gefäße (0.2 ml; 0,6 ml, farblos)

Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Sterile 24-Loch-Platten

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Sterile 96-Loch-Platten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturflasche, 50 ml, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

## 2.1.9 Sonstiges

DAKO Pen	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
----------	--

## 2.1.10 Geräte ohne / mit Software und sonstige Software

### 2.1.10.1 Geräte ohne / mit Software

7500 Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems (Carlsbad, California, U.S.A)
ACCURI C6 Cytometer	BD Accuri Cytometers (Ann Arbor, MI U.S.A) <i>BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.15</i>
Analyse-, Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
autoMACS™-Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Bestrahlungsgerät	
Radsource RS 2000	Rad Source Technologies, Inc. (Suwanee, GA U.S.A)
CO <sub>2</sub> -Zellinkubator	Heraeus Instruments GmbH (Osterode, Deutschland)
COULTER® EPICS® XL™	
Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Inc. Industrial Estate Mervue, Galway, Irland <i>SYSTEM II Software Version 3.0</i>
Diagnostik-Mikroskop	OLYMPUS BX51, Olympus opticals co., LTD, Tokyo, Japan <i>Software Analysis Imaging, cell ^B imaging software olympus</i>
Digital-Kamera,	
Canon PowerShot A620	Canon Deutschland GmbH (Krefeld, Deutschland)
Eppendorf Zentrifugen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Hämocytometer	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Inversionsmikroskop für Zellkultur:	
Mikroskop ZEISS Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Multipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Magnet- und Heizrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
NanoDrop-1000 Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Wilmington U.S.A) <i>Software-Version: Nanodrop 3.01.1</i>



pH-Labormessgerät, pH 211 Microprozessor pH Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH (Kehl, Deutschland)
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl )	Gilson International Deutschland (Limburg an der Lahn, Deutschland)
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann Laborgeräte (Louisville, Kentucky, U.S.A)
Stickstofftank, Chronos 350 Biosafe	Messer Griesheim (Bad Soden, Deutschland)
T3000 Thermocycler	Whatman Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vortexer	U.S.A Scientific, Inc. (Ocala, Florida, U.S.A)
Zellkulturbank HERA Safe KSP	Thermo Elektron LED GmbH, (Langenselbold, Deutschland)

### 2.1.10.2 Sonstige Software

DataAssist™, Version 2.0	Applied Biosystems ((Carlsbad, California, U.S.A)
SIGMA STAT-Software	Systat Software GmbH (Erkrath, Deutschland) Software-Version 3.01.0
WEASEL-Software	Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (Parkville, Victoria, Australia) Weasel Vers 2.3

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Standardkulturbedingungen: humane Zellen

Die Medulloblastom-Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank passagiert. Sie wurden in einem Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Die Zellen wurden je nach Konfluenz entweder passagiert, oder das Medium wurde alle 5 Tage gewechselt. Für die Passagierung der adhären Zellen wurden entweder Zellen mit einer Pipette vom Boden der Kulturflasche abgekratzt oder mit 2 ml Trypsin-Lösung für 10 Minuten inkubiert und dann 1 bis 2 Tropfen von der Zellsuspension in eine neue Flasche mit 5 bis 7 ml frischem Medium überführt. Für Experimente wurde für das Ablösen der adhären Zellen ausschließlich eine gebrauchsfertige EDTA-Lösung (Versene) verwendet. Nach der visuellen Kontrolle der ablösenden Zellen wurden diese in ein Röhrchen gesammelt, bei ca. 115  $\times$ g bis 180  $\times$ g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Pellet resuspendiert und mit einem vielfachen Volumen von PBS gewaschen und zentrifugiert. Ein Mediumwechsel bei Suspensionszellen erfolgte durch Abnahme des Kulturüberstandes und Ersetzen mit frischem Medium nach Sedimentation der Zellen bzw. Zellcluster. Humanes Serum für Medien wurde vor der Verwendung Hitze-behandelt, um das Komplement-System zu inaktivieren. Das humane Serum wurde durch einen 0,1  $\mu$ m-Filter steril filtriert und in 50 ml-Röhrchen aliquotiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 56 °C im Wasserbad für 30 Minuten.

### 2.2.2 Gewinnung muriner Primärkulturen aus dem Patched-Modell

Nach Einschlafen mittels CO<sub>2</sub> wurden Tumor-tragende *ptc<sup>+/-</sup>*-Mäuse durch Genickbruch getötet. Nach Dekontamination mittels 70% Ethanol wurde die Maus dekapitiert und der Schädel unter sterilen Bedingungen frei präpariert. Nach Präparieren des Cerebellums wurde der Tumor entnommen und in eine mit 5 ml Neurocult-Medium gefüllte sterile Petrischale gelegt. Mit Pinzette und Skalpell wurde das Gewebe sorgfältig zerkleinert. Die Suspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt, grössere Tumorgewebeschnitte mittels Sedimentation entfernt und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, um kleinste Zellverbände bis Einzellzellen zu gewinnen. Nach Zugabe von Neurocult-Medium wurde durch Pipettieren eine Suspension hergestellt. Nach nochmaligem Waschen in Kulturmedium wurden die

Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Plastik-Kulturflaschen ausgesät. Nach Inkubieren für 24 Stunden wurde lichtmikroskopisch der Zustand und die Konfluenz überprüft und das Medium gewechselt. Die Subkultivierung führte zu kontinuierlichen Zelllinien. Dafür wurde als Standardkulturbedingung Neurocult-complete Medium unter Zugabe von 25 ng/ $\mu$ l rh EGF und 20 ng/ $\mu$ l rh bFGF verwendet.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension (50  $\mu$ l) mit 50  $\mu$ l Trypanblau-Lösung gemischt und mithilfe des Hämocytometers die Anzahl der vitalen und der toten Zellen in den vier rechteckigen Feldern bestimmt. Die lebenden Zellen blieben ungefärbt und brachen das Licht, die toten färbten sich wegen der nicht-intakten Zellmembran blau an. Es wurde der Mittelwert gebildet und mit der Formel  $c = n/v$  die Zellzahl in Zellen/ml berechnet.  $c$  ist die Konzentration der Zellen,  $n$  ist die Anzahl der Zellen gebildet aus dem Mittelwert der vier Quadranten und  $v$  ist das Volumen der Zähl-Kammer.  $v$  errechnet sich aus: Fläche x Tiefe = (1 mm x 1 mm) x 0,1 mm = 0,1 mm<sup>3</sup> = 1 x 10<sup>-4</sup> ml. Zusätzlich wird die Formel mit dem Verdünnungs-Faktor 2 multipliziert:  $c = n/v \times 2$  (Zellen/ml).

### 2.2.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden Zellen mit Medium gewaschen, pelletiert, dann vorsichtig mit 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das DMSO-enthaltende Einfriermedium wurde vorher bei 4 °C aufgetaut und kühl verwendet. Es folgte ein schrittweises, schonendes Einfrieren der Zellen. Zuerst wurden die Röhrchen im Einfrier-Behälter mit Isopropanol bei -80 °C aufbewahrt und dann im Stickstoff-Tank längerfristig gelagert.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen bei RT aufgetaut und mit frischem vorerwärmten Medium vorsichtig resuspendiert. Das DMSO wurde durch dreimaliges Waschen mit Medium entfernt, und die Zellen schließlich in eine Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.5 Beschichtung von Zellkultur-Platten

Es wurden 6-Loch-Zellkultur-Platten mit einer in PBS verdünnten Poly-L-Lysin-Lösung und der Endkonzentration von 20 µg/ml beschichtet. Nach Induktion der Platten bei 37 °C für 30 Minuten wurden sie zweimal mit PBS gewaschen.

### 2.2.6 Mycoplasmen-Test

Nach dem Auftauen von Zellen wurden diese nach 2-3 Passagen auf eine Kontamination mit Mycoplasmen überprüft.

#### 2.2.6.1 Nachweis mittels Hoechst 33258-Färbung

Zellen wurden auf Petrischalen angezüchtet, danach mit PBS gewaschen und mit einem 1:3-Gemisch von eiskaltem *Aceton:Methanol*, 1:2 mit PBS verdünnt, dann mit dem Aceton Methanol-Gemisch (1:3) für 10 Minuten fixiert. Anschliessend wurde 2x mit dest. Wasser, und mit PBS gewaschen. Mit einem DAKO Pen (Flüssigkeits-abweisend, reduziert benötigte Färbelösung) wurde die Zellprobe umkreist. Danach folgte die Zellkernfärbung mit einer 50 µg/ml Hoechst 33258-Lösung in PBS. Ungefähr 2 ml wurden auf die Petrischale gegeben und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen und mit dest. Wasser gewaschen. Nach Eindeckeln mittels Fluoromount G (+4 °C) wurden die Färbungen an einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Der Nachweis von cytoplasmatischer Mycoplasmen-Nucleinsäure erfolgte anhand punktchen-artiger Strukturen um den Nukleus herum. Die Petrischalen wurden bei +4 °C dunkel aufbewahrt.

### 2.2.6.2 Nachweis mittels qualitativer PCR

Unter Verwendung des Venor® GeM-Mykoplasmen Dektions Kit wurde nach Anleitung eine PCR des Zellkulturüberstandes durchgeführt. Das Produkt wurde auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und die Größe der Banden bestimmt; hierdurch kann eine Kontamination nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Die in dem Kit enthaltenden Kontrollen umfassten eine positive Kontrolle für die Verifikation der Ergebnisse, und eine interne Amplifikationskontrolle.

### 2.2.7 Stammzell-Assays

#### 2.2.7.1 Klonogenizitäts-Assays (Neurosphären-Assays)

Zellsuspensionen wurden durch Zellsiebe mit 30 µm Poren-Durchmesser (Miltenyi Biotec) gegeben, um große Zellklumpen zu entfernen. Anschliessend wurde kräftig titriert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Ein Aliquot wurde jeweils entnommen, um die Zell-Bestimmung mit Trypanblau mithilfe der Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) vorzunehmen. Das Stammzellmedium bestand aus dem Neurocult-complete Medium, angereichert mit 25 ng/µl rhEGF, 20 ng/µl rhbFGF, 10 ng/µl rhLIF und 10 ng/ml Heparin. Das Neurocult-complete Medium setzte sich aus dem Neurocult-Medium und dem Proliferations-Supplement zusammen, welches erst direkt vor Anwendung zum Neurocult-Medium gegeben wurde. Die auf eine bestimmte Zelldichte eingestellte Zellsuspension wurde in den Löchern einer 96-Loch-Platte oder 24-Loch-Platte verteilt.

Jedes Loch der 96-Loch-Platte wurde mit 200 µl Zellsuspension gefüllt. Jede zu testende Zellprobe (unbehandelt bzw. behandelt) wurden in 20 Löchern inkubiert, wobei die äußeren Löcher mit Aqua dest. befüllt wurden, um einem Verdunsten entgegenzuwirken. An jedem zweiten Tag wurden je 25 µl pro Loch fertig angesetztes Stammzellmedium zugegeben. Nach 10 bis 12 Tagen wurde der Neurosphären-Assay am Invers-Mikroskop ausgewertet. Es wurden die gebildeten Neurosphären pro Loch gezählt.

### 2.2.7.2 Replating-Assays

Die Kapazität zur Selbsterneuerung kann mit einem wiederholten Ausplattieren von Zellen der Neurosphären, den sogenannten Replating-Assays, untersucht werden. Dafür wurden zunächst Neurosphären-Assays angesetzt und wie unter 2.2.7.1 beschrieben verfahren. Hierfür wurden 24-Loch-Platten verwendet. Quadruplikate wurden für jede zu testende Zellprobe angesetzt. Jedes Loch wurde mit 2 ml à 1000 Zellen/ml befüllt.

Nach dem Auszählen der Neurosphären der ersten Generation wurden die Zellen vereinzelt und nochmalig ausgesät, höchstens bis zur fünften Generation. Die Neurosphären der ersten Generation wurden in ein Röhrchen gesammelt, mit PBS gewaschen, ihre Zellen vereinzelt und erneut unter den gleichen Bedingungen ausgesät.

### 2.2.8 Label Retaining-Assays

Es wurde ein Tet-Off kontrolliertes H2B-GFP lentivirales Konstrukt verwendet, mit dem die Zellen transduziert wurden. Nach Induktion mit 10 ng/ml Doxycyclin wurde die Expression von H2B-GFP ausgeschaltet. Zellen, die keine DNA replizieren, behalten das grün-fluoreszierende GFP im Kern. Für die Expressions-Kassette wurden Tet-Off Regulator-Elemente und ein mit dem mit GFP fusionierten Histon-Gen konstruiert und in einem lentiviralen Vektor übertragen (siehe Abbildung 8; Falkowska-Hansen, 2010). Damit wurden die DAOY Medulloblastomzellen transfiziert.

Die DAOY/H2B-GFP Zellen wurden mit 10 ng/ml Doxycyclin behandelt, um die GFP-Expression zu unterdrücken und so als Kultur in Serum-enthaltendem Medium kultiviert. Für die Testreihen wurden zunächst die mit Doxycyclin behandelten DAOY/H2B-GFP-Zellen (keine GFP-Expression) in zwei Ansätzen weiterkultiviert. Die GFP-negativen, denen bei jedem Passagieren Doxycyclin zugegeben wurde und die GFP-positiven, die nicht mit Doxycyclin behandelten Kontrollzellen. Die positiven GFP-exprimierenden Zellen wurden aus den negativen Zellen generiert, denen kein Doxycyclin zugegeben wurde, bis diese maximale GFP-Expression erreichten. Die Hintergrundaktivität wurde mit der Analyse der GFP-negativen Kontrollzellen überprüft. Mit den GFP-positiven Kontrollzellen wurde die maximal induzierte GFP-Expression festgestellt.

Zur Untersuchung von persistierenden grünen DAOY/H2B-GFP-Zellen dienten als Ausgangszellen die GFP-positiven Kontrollzellen. Diese Ausgangszellen, die als Label Retaining Zellproben bezeichnet wurden, wurden anschliessend nachdem sie konfluent

wurden, passagiert und 10 ng/ml Doxycyclin zugegeben. Die Kontrollzellen, sowohl GFP-negative als auch GFP-positive, wurden ebenfalls passagiert. Vor dem Passagieren wurde fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch die GFP-Expression aller Zellproben überprüft. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Testzellen in Puffer, welches 0,5 % BSA in PBS-gelöst enthielt, resuspendiert und bis zur Messung kühl und dunkel auf Eis gehalten.

### 2.2.9 Bestrahlung von Zellen

Zellen wurden nach dem Überführen von der Zellkulturflasche in ein Röhrchen einmal mit PBS gewaschen, durch ein Zellsieb mit 30 µm Poren-Durchmesser zur Zellklumpen-Entfernung gegeben und mit Trypanblau gefärbt. Die Zellkonzentration wurde auf 1000 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in Stammzellmedium aufgenommen und in zwei T-25cm<sup>2</sup>-Flaschen mit jeweils 4 ml Medium überführt. Diese wurden in das Bestrahlungsgerät Radsource RS 2000 plaziert. Die Bestrahlungsrate betrug 37 mGy/sec und die applizierte Gesamt-Bestrahlungs-Dosis betrug 2 Gy oder 5 Gy. Es wurde eine Spannung von 160 kV und eine Stromstärke von 25 mA am Bestrahlungsgerät (HET, Haus für Experimentelle Therapie, Universitätsklinik Bonn) angelegt. Bei der Röntgenstrahlung handelte es sich um eine 160 kV Gammastrahlung. Der weitere Schritt folgte unter der Zellkulturbank. Die bestrahlte Zellsuspension wurde auf das entsprechende Volumen mit Stammzellmedium gebracht und in den Löchern der 24-Loch-Platten mit 2 ml pro Loch ausgesät. Die anschließende Inkubation im Brutschrank dauerte 12 Tage.

### 2.2.10 FACS-basierte Methoden

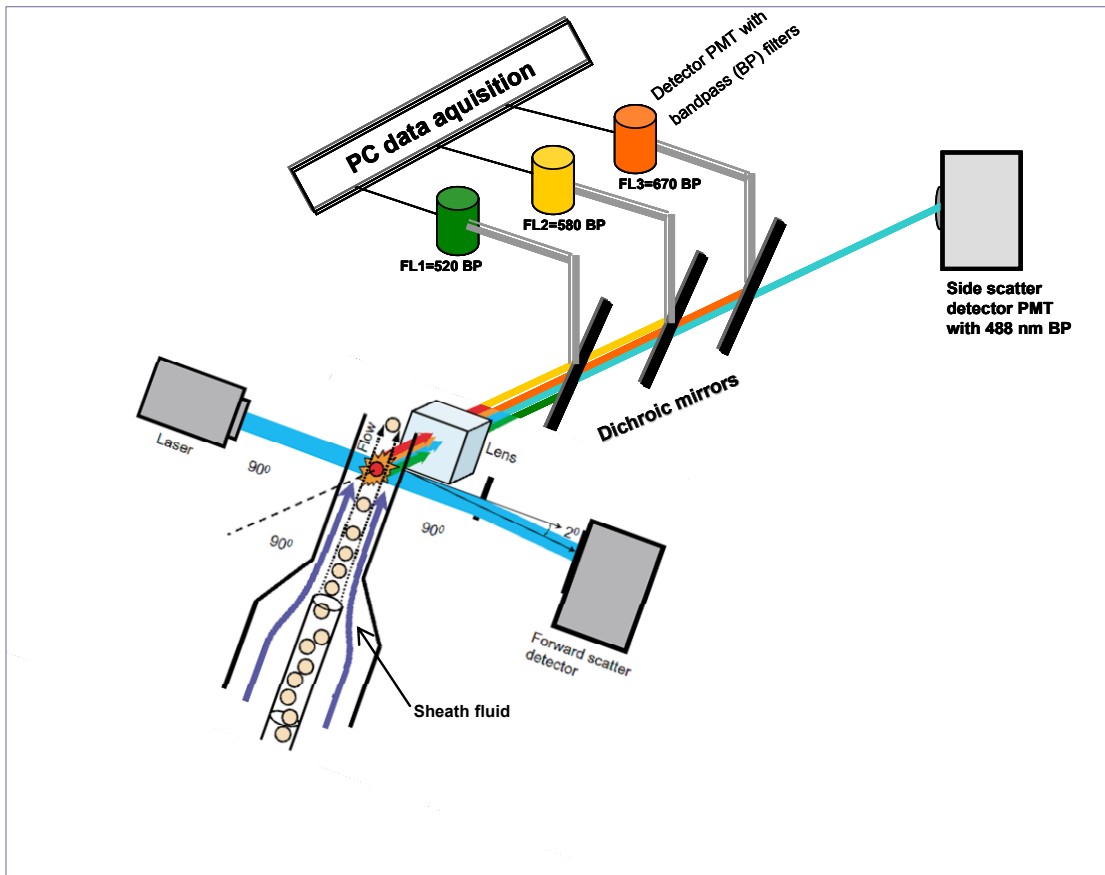
#### 2.2.10.1 Durchflusszytometrie

Bei FACS-Analysen (Flow Activated Cell Sorting) handelt es sich um durchflusszytometrische Analysen, die an speziellen FACS-Geräten, den Durchflusszytometern, durchgeführt werden. Die Durchflusszytometrie bestimmt die Zelleigenschaften Lichtstreuung und Fluoreszenz. Detektoren für den „Forward Scatter“ (FSC) und „Side Scatter“ (SSC) erfassen die Lichtsignale des Vorwärts-Streulichtes entlang des anregenden Lasers und das Seiten-Streulicht (im 90°-Winkel zum anregenden Laserstrahl).

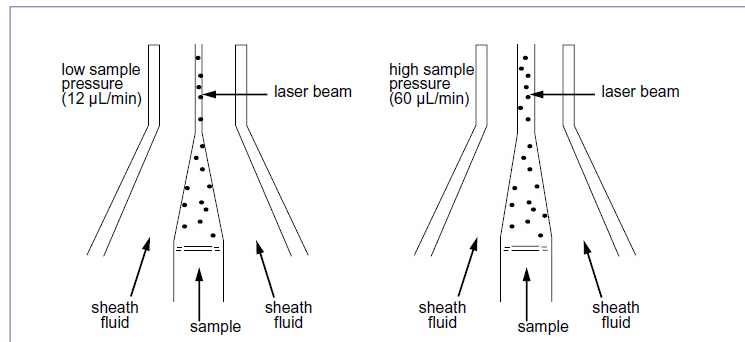
Das Vorwärts-Streulicht ist proportional zu der Größe der Zelle. Entscheidend für die Kalkulation ist der Brechungs-Index zwischen der Zelle und dem Medium. Dieser ist groß bei Zellen mit intakter Membran und klein bei toten Zellen. Der Index wird auch von der Stärke der Licht-Absorption der Zelle je nach ihrer Oberflächenstruktur beeinflusst. Das Seiten-Streulicht erfasst granuläre Strukturen des Cytoplasmas und steht für die Detektion der Granularität einer Zelle (Shapiro HM: Practical Flow Cytometry, 2003).

Die mit Antikörpern gefärbten Zellen werden am Durchflusszytometer von der Düse angesaugt und danach durch die „Durchflusszelle“ geleitet, treten dann in den Durchflusskanal ein und stabilisieren sich mittig in einer Linie mittels einer hydrodynamischen Fokussierung (siehe Abbildung 10). Diese entsteht aufgrund der Strömung der Umhüllflüssigkeit („Sheath fluid“), die den inneren Probenflüssigkeits-Strahl beschleunigt. Dabei wird die Zellsuspension „gestreckt“ und es werden die Signale der Streuung und der Fluoreszenz der einzelnen Zellen gemessen, während sie den Laserstrahl passieren (Corver & Cornellisse, 2002).





**Abbildung 9: Vereinfachtes Schema der Anordnung des optischen Systemes eines Durchflusszytometers.**  
 Angelehnt und modifiziert nach: Corver & Cornillisse, 2002; Shapiro HM: Practical Flow Cytometry, 2003.



**Abbildung 10: Hydrodynamische Fokussierung in einer Durchflusszelle.** Der Druck der Probenflüssigkeit ist größer als der der Umhüllflüssigkeit. Der Druck der Probenflüssigkeit wird erhöht, und der Probenstrahl wird breiter. Dabei werden viele Zellen durchgelassen. Bei niedrigem Druck passieren die Zellen den Laserstrahl einzeln und eine größere Auflösung kann erhalten werden.

([http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf))

[04.03.2013].

Zur Anregung der Fluoreszenz verwendet man gewöhnlich einen 20-mW-Argon-Laser (488 nm). Die Fluoreszenzen FL1 (520 nm, grünes Licht), FL2 (580 nm, oranges Licht) und FL3 (670 nm, rotes Licht) werden im Durchflusszytometer (siehe Abbildung 9) durch Filter und Spiegel zu den entsprechenden Detektoren geleitet, von einem Photomultiplier (PMT) verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Die Emissionsspektren der Farbstoffe führen zu spektrale Überlappungen (siehe Abbildung 11). Die spektralen Überlappungen der Fluoreszenzen werden soweit möglich von Bandpassfiltern getrennt und nachträglich mittels elektronischer Kompensation korrigiert. Die Bandpassfilter lassen nur Signale der gewünschten Wellenlänge durch. Daneben regulieren Long-Pass- und Short-Pass-Filter die kurz- und langwellige Transmission. Long-Pass-Filter lassen nur langwelliges Emmissions-Licht und Short-Pass-Filter entsprechend kurzwelliges durch. Bei der Analyse von Zellen tritt auch in unterschiedlichem Ausmass Autofluoreszenz auf. Diese entsteht, wenn intrazelluläre Flavine oder Aldehyde eine Eigenfluoreszenz entwickeln oder wenn die Zellsuspension unzureichend gewaschen wurde. Eigenfluoreszenz ist in der ungefärbten Probe zu erkennen (Shapiro HM: Practical Flow Cytometry, 2003).

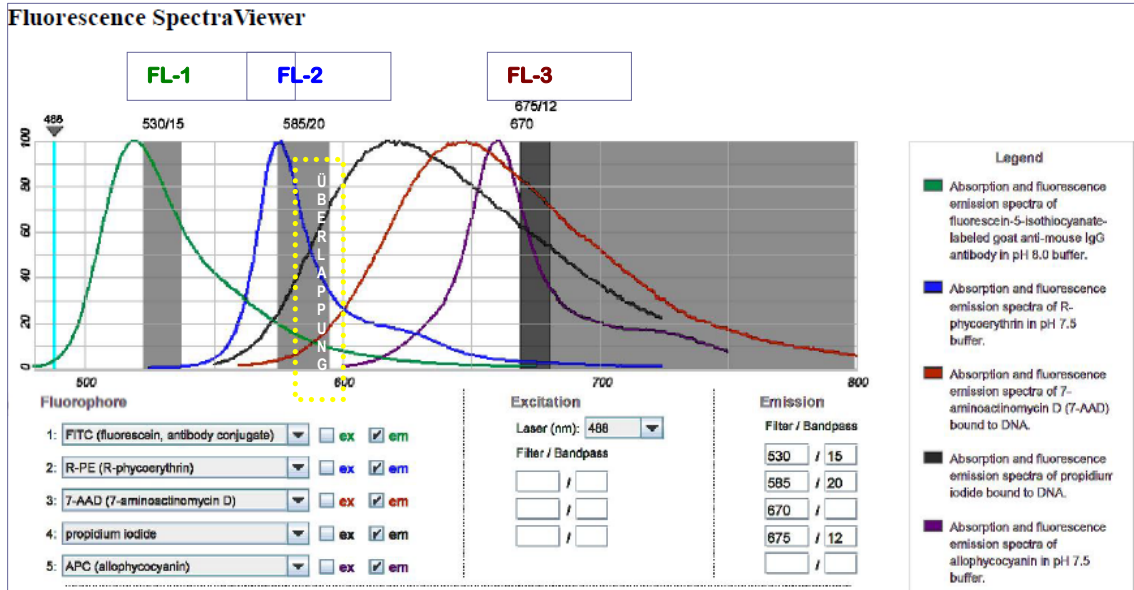


Abbildung 11: Spektrale Überlappung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorescence Spectra Viewer).

FITC und Propidium-Iodid (PI) strahlen beide im FL-2 Kanal ein. PI erscheint zusätzlich im FL-3-Kanal. Zahlen für die Bandpass-Filter wurden von der Auflistung für das ACCURI-Gerät übernommen. Die spektrale Überlappung wird durch die gelbe Umrandung angezeigt. Allophycocyanin (APC) wird von einem roten Laser bei 640 nm angeregt (Extinktionsspektrum) und bei 675 nm in einem FL-4 Kanal (hier nicht eingezeichnet) beim ACCURI-Gerät detektiert. (Fluorescence Spectra Viewer aus: <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer>)

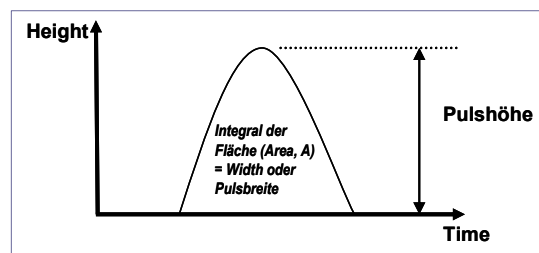
### 2.2.10.2 Lichtsignalgeometrie: Histogramm und Dot-Plot

Das Messsignal der einzelnen Zelle besteht aus auf der Abszissenachse aufgetragener Zeit (t) und der Spannung auf der Ordinatenachse. Die Amplitude des Peaks ist die Intensität oder das Maximum des Meßsignals, welche Informationen über die Helligkeit gibt. Die Pulsbreite des Messsignals auf der x-Achse wird von dem Integral der Fläche unter der Kurve ermittelt.

Für die Datenanalyse werden die Messungen als Histogramme und Dot-Plots dargestellt. Nachdem alle Messsignale für jede Zelle aufgenommen werden, werden die Daten als Populationen in Histogramme, als eindimensionale Aufzeichnung eines Kanals, oder als Dot-Plots, in denen die Intensitäten der Farbsignale als Wolken in zweidimensionaler Darstellung von zwei Kanälen erscheinen, wiedergegeben.

Drei Parameterdarstellungen eines Kanals können gewählt werden: FL(Kanal)-A, FL(Kanal)-H und FL(Kanal)-W (siehe Abbildung 12). Gewöhnlich wird im FL(Kanal)-A analysiert, um die volle Information aus den zu messenden fluoreszierenden Partikeln zu erhalten. Der FL(Kanal)-W gibt Auskunft über die Weite der Partikel. Anhand dieses Kanals können Doubletten identifiziert werden. Größere Zellklumpen müssen vor der

Messung durch Filtration durch eine engmaschige Gaze mit einer bis zu 20  $\mu\text{M}$  Porenöffnung entfernt werden. Datenrelevante Signale sind solche oberhalb des gesetzten Schwellenwertes, des Thresholds. Das Festsetzen dieses Wertes eliminiert Zelltrümmer und das Hintergrundrauschen der Messungen aus der Auswertung. Die Auswertung wird mit dem Einkreisen von Populationen in Gates vollführt. Diese Population wird als 100% gesetzt und weiter in einem neuen Analysekasten, einem Histogramm oder Dot-Plot, analysiert. So entstehen aus der Eltern- weitere Unterpopulationen F1, F2 etc.



**Abbildung 12: Lichtsignalgeometrie.** Setzt sich aus der Pulshöhe (Height) des Peaks und der Pulsbreite des Flächenintegrals zusammen.

### 2.2.10.3 Messparameter

Für die durchflusszytometrische Analysen wurden bei jeder Immunphänotypisierung 30 000 bis 50 000 Zellen aufgenommen, für die Zellzyklus-Analysen jedoch 50 000 Zellen bis 100 000 Zellen. Im FL2-Kanal wurde das Fluorophor PE, im FL1-Kanal das BODIPY und im FL3-Kanal 7-AAD detektiert. Die Proben wurden auf eine Konzentration von höchstens 1 Mio. Zellen/ml eingestellt.

Die Messungen erfolgten zum Teil an einem Coulter Durchflusszytometer-Gerät und zum Teil an einem ACCURI-Durchflusszytometer-Gerät. Die elektrische Spannung am PMT (PMT-Voltage) wird bei den herkömmlichen Geräten je nach Probe eingestellt, um die Messung ganz im Analyse-Fenster zu sehen. Beim ACCURI-Durchflusszytometer hingegen ist diese festgesetzt. Dies wird durch das 24-Bit Digital Processing erreicht. Aus einem 24-bit Analog-to-Digital Converter (ADC) werden PMT-Signale konvertiert.

### 2.2.11 CD133-Markierung: Humane und murine Zelllinien

Für die direkte CD133-Markierung der humanen Zellen wurde der Antikörper CD133/2 (293C3)-PE der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dieser Antikörper wurde auch APC-markiert eingesetzt. Für die murinen Zellen wurde der monoklonale Antikörper Anti-Prominin-1-PE (Klon MB9-3G8) benutzt.

Suspensionszellen oder mit der EDTA-enthaltenden Versene-Lösung abgelöste adhärenente Zellen wurden in 15ml-Röhrchen überführt und zum Waschen in MACS-Puffer aufgenommen und bei 115-180  $\times g$  für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 3,33  $\mu g/ml$  eingesetzt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden nicht-gefärbte Zellen als Negativ-Kontrolle benötigt, sowie die markierte Probe. Die Negativ-Kontrolle diente dazu, eine mögliche Autofluoreszenz zu detektieren. Die Inkubationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu dem Zellpellet der markierten Probe wurden 50  $\mu l$  FcR-Blocking Reagent (FcR Blocking Reagent, human oder FcR Blocking Reagent, murin) zugegeben folgend von 50  $\mu l$  MACS-Puffer, und anschliessend der Antikörper zugesetzt. Das FcR-Blocking Reagent sollte die Fc-Rezeptor-vermittelte Färbung blockieren. Der Inkubations-Schritt dauerte 10 Minuten. Inkubiert wurde auf Eis und im Dunkeln. Danach folgte der Wasch-Schritt mit dem Resuspendieren eines vielfachen an Volumen der Zellsuspension mit MACS-Puffer. Die Zellen wurden weiter für 5 Minuten bei 4 °C und 115

xg bis 180 xg zentrifugiert. Anschliessend wurden für die durchflusszytometrische Analyse die Zellen in 500 µl oder 1000 µl MACS-Puffer aufgenommen.

### 2.2.12 Anreicherung von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup>-Fraktionen bei humanen Zellen

Für die magnetische Anreicherung von humanen Zellen mittels CD133-Markierung wurden die Zelllinien D283 Med, 1580Wü und D3484 verwendet. Die magnetische Zell-Markierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurde mit einem Isolations-Kit der Firma Miltenyi Biotec gearbeitet. Nach der Kultivierung der Zellen wurden die adhärennten Linien mit gekühlter Versene-Lösung abgelöst und gewaschen. Daraufhin wurden die abgelösten Zellen bzw. die Suspensionszellen in gekühltem PBS aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Wiederholt in PBS aufgenommen wurde ein Aliquot zur Zellzahl-Bestimmung entnommen. Die Ausgangszellzahl zur Markierung betrug 500 000 Zellen bis  $2 \times 10^7$  Zellen. Es wurde darauf geachtet, dass eine Einzellzellsuspension vorlag. Diese wurde mittels Titration und anschliessend Gabe durch einen Filter der Maschenweite von 30 µm, um die Zellklumpen zu entfernen, erreicht.

Die Zellen wurden wie folgt mit dem CD133 Cell Isolation Kit magnetisch markiert: Nach der Zellzahl-Bestimmung wurde das Zellpellet mit 200 µl FcR Blocking Reagent in 600 µl steril filtriertem MACS-Puffer resuspendiert und danach mit 200 µl CD133 MicroBeads versetzt. Die Zellen wurden gut vermischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurde kurz vor dem Sortieren mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert.

Bei der Färbung der Zellen mit dem alternativen Kit (Indirect CD133 Microbead Kit) handelte es sich um eine indirekte magnetische Markierung. Nach der Zellzahl-Bestimmung wurde das Zellpellet mit 100 µl FcR Blocking Reagent in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert und anschliessend mit 100 µl CD133/1 (AC133)-Biotin versetzt, gut gemischt und für ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden 20 µl Antikörper CD133/2 (293C3) zugegeben und für weitere 10 Minuten im Dunkeln und auf Eis die Zellen inkubiert, um anschliessend die Reinheit der AutoMACS-Separation zu bestimmen. Es folgte ein Waschschrift, und der Überstand wurde verworfen. Weiter wurde das Zellpellet in 200 µl Anti-Biotin MicroBead-Lösung resuspendiert und mit 300 µl steril

filtriertem MACS-Puffer die Zellen gut gemischt. Kurz vor dem Separieren folgte ein Waschschriff und das Aufnehmen des Zellpellets in MACS-Puffer.

Am AutoMACS-Separator (autoMACS™-Separator) wurde mit dem Programm „posselds“ die Separation in positiver und negativer Fraktion gestartet. Nachfolgend wurden die Fraktionen durchflusszytometrisch auf die CD133-Expression bzw. die Reinheit der Sortierung geprüft.

### 2.2.13 ALDEFLUOR Assay

In diesem Assay wird die Aldehyddehydrogenase-Aktivität von Zellen gemessen. Intrazelluläre Aldehyde werden von ALDH1 oxidiert und dadurch unschädlich gemacht bzw. detoxifiziert. Die Charakterisierung von Stammzell-Eigenschaften der Medulloblastom-Zellen anhand dieser Enzym-Aktivität erfolgte mit dem ALDEFLUOR Assay.

Das Fluorophor ist hierbei das BODIPY, welches in der durchflusszytometrischen Analyse im FL1-Kanal detektiert wird. Das aktive Substrat ist BAAA-DA (BODIPY-Aminoacetaldehyde Diethyl Acetal). Dieses wird von der Aldehyddehydrogenase zum fluoreszierenden BAA (BODIPY-Aminoacetat) umgesetzt. Die Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers behandelt. Der Assay musste vor dem Verwenden aktiviert werden, indem dem trockenen Pulver-Reagenz 25 µl DMSO zugesetzt und für 1 Minute inkubiert wurde, dann 25 µl einer 2N HCl-Lösung zugegeben und für 15 Minuten bei Raum-Temperatur inkubiert wurde. Mit 360 µl ALDEFLUOR-Puffer wurde ein Endvolumen von 400 µl erzielt. Das aktivierte Reagenz wurde in 20 µl Aliquots geteilt und bei -20 °C gelagert.

Der ALDEFLUOR-Puffer enthielt Inhibitoren, um aktiv den Austritt des Aldefluor-Produktes durch die ABC-Transporter zu verhindern. Die Zellen wurden nach dem Waschen und der Zellzahl-Bestimmung mit dem Hämocytometer auf 1 Million Zellen/ml eingestellt. Das Zellpellet im „Test“-Röhrchen wurde mit 5 µl aktiviertem ALDEFLUOR in 1 ml ALDEFLUOR Puffer resuspendiert. Für das „Kontroll“-Röhrchen wurden 5 µl DEAB vorpipettiert und 500 µl Zellsuspension zugesetzt, welche aus dem „Test“-Röhrchen entnommen wurde. „Kontroll“- und „Test“-Röhrchen enthielten zum Schluß das gleiche Volumen von 500 µl. Es folgte eine Inkubations-Dauer von 40 Minuten bei 37 °C im Wasserbad. Danach wurde sofort bei 115 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl ALDEFLUOR-Puffer aufgenommen. Für eine Doppelfärbung mit dem

CD133/2-PE wurde das Zellpellet zusätzlich, wie unter 2.2.11 angeführt, gefärbt. Anschliessend wurde gewaschen und ALDEFUOR-Puffer zugesetzt. Aktiviertes BAAA wurde in der Endkonzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. DEAB wurde als Negativ-Kontrolle, in der Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  verwendet; es blockiert die ALDH-Aktivität.

### 2.2.14 Doppelfärbung zur Zellzyklus-Analyse und CD133-Expression

Für die Doppelmarkierung von CD133 und des Zellzyklus wurde folgendes Protokoll angewendet:

1. Zunächst wurden die Zellen für CD133 gefärbt wie unter 2.2.11 beschrieben. Nach dem Waschen wurde jede Probe auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Es wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen vereinzelt vorlagen. Anschliessend wurden die Zellen pelletiert.
2. Es folgte der Fixierungsschritt, indem dem Zellpellet im 15 ml-Röhrchen 1 ml eiskaltes 70% Methanol unter ständigem Vortexen zugeträufelt wurde, damit die Zellen nicht aggregierten. Die Zellen inkubierten für 60 Minuten auf Eis.
3. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und bei 180 bis 259  $\times g$  für 5 Minuten zentrifugiert.
4. Das Pellet wurde in 425  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und 100  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration RNase A (50  $\mu\text{l}$  Stocklösung) zugegeben. Die RNase A sollte die RNA inaktivieren, weil sonst das Ergebnis der Zellzyklus-Messung verfälscht würde. Die Zellen inkubierten im Dunkeln für 40 Minuten bei RT.
5. Für die Markierung der Zellzyklus-Phasen wurden 25  $\mu\text{l}$  PI (1 mg/ml PI-Stocklösung in PBS gelöst) zugegeben, gut gevortexet und direkt gemessen.
6. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden 50 000 bis 100 000 Events eingestellt und bei der langsamen Durchflussrate die Daten gesammelt. Zellklumpen wurden nach der Analyse durch Gaten ausgeschlossen.



### 2.2.15 RNA-Extraktion für die Microarray-Hybridisierung

#### 2.2.15.1 Protokoll zur RNA-Isolierung: TRIZOL

Für die Gewinnung totaler RNA aus den Zellen wurde das Protokoll des TRIZOL-Reagenzes angewendet:

1. Das Zellpellet wurde in einem Eppendorf-Gefäß überführt und mit 750 µl (zweite Runde: 500µl; vgl. Punkt 9) TRIZOL durch pipettieren und vortexen gut homogenisiert.
2. Inkubation des Homogenats für fünf Minuten bei Raumtemperatur.
3. Zugabe von 300 µl (zweite Runde: 100µl; vgl. Punkt 9) Chloroform. Nach ca. 15-minütigem Schütteln wurde für 3 Minuten bei RT inkubiert.
4. Weiter wurden die Proben für 15 Minuten bei +4 °C und 12 000  $\times g$  zentrifugiert. Es entstand eine organische schwach-rote Phenol-Chlorophorm-Phase, eine schmale Interphase und die wässrige Phase.
5. Die in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 375 µl (zweite Runde: 250µl; vgl. Punkt 9) Isopropanol präzipitiert.
6. Einer Inkubations-Zeit von 10 Minuten bei RT folgte ein Zentrifugations-Schritt für 10 Minuten bei +4 °C und 12 000  $\times g$ .
7. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 750 µl (zweite Runde: 500µl; vgl. Punkt 9) 70% (zweite Runde: 75%; vgl. Punkt 9) Ethanol gewaschen und gevortexet. Durch Zentrifugieren bei 7500  $\times g$  4 °C für 5 Minuten pelletiert und kurz zum Trocknen stehen gelassen.
8. Anschließend wurde es in 24 µl DEPC-Wasser aufgenommen und mit 3 µl DNase-Puffer, 2 µl DNase I sowie 1 µl RNasin Plus RNase-Inhibitor ein DNase-Verdau für 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock durchgeführt.
9. Die Proben wurden bei – 80 °C eingefroren oder mit 500 µl TRIZOL eine *zweite Runde* der Aufreinigung begonnen, um eine hochreine, von Nucleoproteinen freie RNA zu erhalten.
10. Hierfür wurden 500 µl TRIZOL zugegeben, gevortexet und Schritt 1 bis 7 wiederholt, jedoch mit den in Klammern aufgeführten Volumenangaben.
11. Die RNA wurde mit 50 µl DEPC-Wasser aufgelöst und bei –80 °C eingefroren.

### 2.2.15.2 Aufbereitung von DEPC-Wasser

Die RNA wurde in RNase-freiem DEPC-Wasser aufgelöst. Dazu wurde Milli-Q-Wasser mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einer Flasche für 6 Stunden oder über Nacht gerührt. Anschliessend wurde das DEPC-Wasser autoklaviert. Dabei wird DEPC vollständig zersetzt. Das DEPC modifiziert die Histidin-Reste der RNasen und inhibiert deren enzymatische Aktivität.

### 2.2.15.3 RNeasy-Nachreinigung

Da für die Hybridisierung von cDNA auf einem Microarray-Chip eine hochreine RNA Voraussetzung war, wurden für jede Probe zwei Aufreinigungs-Zyklen vorgenommen. Für die Zelllinie D283 Med wurde ausschliesslich das TRIZOL-Protokoll angewandt. Für die Zelllinie D3484 wurde zuerst mit dem TRIZOL-Protokoll bis zum DNase-Verdau extrahiert und anschliessend eine RNeasy-Nachreinigung durchgeführt. Für die zweite Aufreinigung wurde das Protokoll für RNA-Aufreinigung (*RNA Cleanup*) von Qiagen verwendet.

### 2.2.15.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Es wurden 2 µl Aliquots der RNA entnommen und am NanoDrop-1000 Spektrophotometer die Konzentration und Reinheit gemessen. Die Reinheit der RNA wurde an dem Wert des 260/280-Quotienten abgelesen. Für eine reine RNA ohne Kontaminationen, die bei 280 nm absorbiert, liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,1. Ein Wert unterhalb 1,8 weist auf mögliche Protein-Kontaminationen hin und bei einem Wert über 2,1 kann von degradierter RNA und von freien Nukleotiden ausgegangen werden.

### 2.2.15.5 Herstellung und Analyse-Verfahren

Die Hybridisierungen und die initiale Auswertung der Microarray-Chips wurden von Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen, durchgeführt. Es wurden je Probe bis zu 200 ng RNA verwendet. Es wurde das GeneChip® 3' IVT Express Kit für die Amplifikation und die cDNA-Synthese verwendet und der Genom-Chip „Human Genome U133 Plus 2.0 Array“ von Affymetrix hybridisiert. Die Hybridisierung, das Waschen und die Färbung der Arrays wurde nach dem Standard-Protokoll des Affymetrix GeneChip Protokolls (Version 2) durchgeführt und die Chips

dann an einem GC Scanner 3000 mit G7 Update gemessen. Für die biostatistische Auswertung wurde zunächst eine Cluster-Analyse (Unsupervised) durchgeführt, welche deskriptiv Gene aufzeigen kann, die als differentiell exprimiert auftreten bzw. sich ähnlich verhalten.

In der hierarchischen Cluster-Analyse werden diese Gene aus ähnlichen Experimenten nebeneinander geordnet. In diesem Dendrogramm steht *rot* für die überdurchschnittliche Expression und *grün* für die unterdurchschnittliche, bezogen auf die mittlere Intensität aller *Probe Sets*. Eine „comparison study“ mit dem Affymetrix MAS5 Comparison Algorithmus wurde durchgeführt. Hierbei wird die zu untersuchende Probe (CD133-positive Probe) mit einer Referenzprobe als Baseline (CD133-negative Probe) verglichen.

Zunächst wurde normalisiert und danach die Vergleichs-Analyse durchgeführt. Es wurde für jedes Probenpaar die Intensität des Expressions-Signals des Experimentes von der der Baseline abgezogen. Anschließend wurden Signifikations-Levels angelegt, um die Sensitivität und die Spezifität zu erhöhen. Ein Algorithmus berechnet den *Change p-value* aus dem Vergleichen der Signale der beiden verglichenen Proben und zeigt die Signifikanz des Parameters (Change Call) „Zunahme“ oder „Abnahme“ des Signals. Die Berechnung des Change Call führt zu der „Zunahme“ (Increase Call) oder „Abnahme“ (Decrease Call). Diese werden durch einen Wilcoxon's Signed Rank Test ermittelt und ein Wert bei 0.5 festgelegt, wobei keine Veränderung des Signals angezeigt wird. Werte bei 0.0 zeigen die Zunahme des Transkript-Levels an und Werte um die 1.0 die Abnahme. Ein zweiter Algorithmus berechnet den Signal Log Ratio-Wert, um quantitativ die Genexpressionsveränderung von differentiell exprimierten Gene aufzuzeigen. Der Logarithmus wird angewendet, damit sowohl sehr kleine als auch große Werte der Genexpressionsveränderung angezeigt werden, gegenüber der linearen Berechnung. Der Signal Log Ratio ist der  $\log_2$ -Wert. Der  $\log_2$ -Wert kann mit der empirischen Formel  $2^{\text{Signal Log Ratio}}$  (Fold Change) gleichgesetzt werden.

Der Signal Log Ratio-Wert (für Werte  $\geq 1$ ) von 1 ist gleich wie Fold Change = 2

$$(2^{\text{Signal Log Ratio}} = 2^1 = 2 \text{ oder } \log_2 = 1 \text{ ist gleich } 2^1 = 2).$$

Für negative Werte ( $\leq -1$ ) gilt: Fold Change =  $(-1) * (2^{-\text{Signal Log Ratio}})$ .

### 2.2.15.6 cDNA-Synthese und Validierung mittels real-time RT-PCR

Die Expression der ausgewählten Gene wurde mit der real-Time RT-PCR untersucht.

#### Erster Schritt: cDNA-Synthese

Für die cDNA-Einzelstrang-Synthese wurde dem Protokoll des „High Capacity RNA-to-cDNA Kit“ von Applied Biosystems gefolgt. Nach folgendem Pipettierschema für einen 10 µl-Ansatz wurde vorgegangen:

<b><u>cDNA-Synthese</u></b>	
2x RT Puffer	10 µl
20x RT Enzym-Mix	1 µl
2 µg RNA	bis 9 µl
Nuclease-freies Wasser	bis 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

<b><u>Thermocycler-Programm</u></b>	
<i>Biometra T300</i>	
Schritt 1:	37 °C für 60 Minuten
Schritt 2:	95 °C für 5 Minuten
Schritt 3:	4 °C, Pause
Lagerung:	bei -20 °C

Danach wurde die erfolgreiche Konvertierung mit einer Kontroll-PCR belegt. Es wurde das Housekeeping-Gen *β-Actin* bestimmt:

<b><u>Ansatz der PCR für β-Actin:</u></b>	
10xPCR-Puffer	1 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,3 µl
10 mM dNTP	0,4 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Aqua Injectabilis	5,2 µl
10 µM Forward-Primer	1 µl
10 µM Reverse-Primer	1 µl
cDNA-Probe	
bzw. Wasser-Kontrolle	1 µl
Gesamtvolumen:	10 µl

<b><u>Thermocycler-Programm</u></b>	
Denaturierung:	94 °C      5 Min.
36 Zyklen:	
Denaturierung	94 °C      30 Sek.
Annealing	56 °C      60 Sek.
Extension	72 °C      60 Sek.
Abschliessende	
Extension:	72 °C      10 Sek.
Pause	4 °C

Für das 2% Agarose-Gel wurde Agarose eingewogen und in 0,5x TBE-Puffer gekocht. Das Gel wurde nach Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung in eine Gelkammer gegossen und Taschenhalter eingesetzt. Nachdem es erstarrt war, wurden die Proben mit 6x-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Der DNA-Marker pUC 19 Msp I wurde aufgetragen, um die Bandengröße zu bestimmen. Mit der Agarosegel-Elektrophorese wurden die PCR-Fragmente dargestellt. Bei der Elektrophorese wandert die Nucleinsäure gemäß ihrer Größe. Es wird eine elektrische Spannung angelegt und das

negativ geladene Phosphat-Gerüst des Amplifikates wandert zum positiven Pol hin. Eine Spannung von 120 V wurden angelegt.

*Zweiter Schritt: Reaktionsplatte beladen und Festlegung der Programm-Konditionen der qRT-PCR*

Für die Validierung wurden die *TaqMan Gene Expression Assays* von Applied Biosystems erworben. Ausgewählt wurden die Inventoried Assays. Diese besaßen ein von der Firma vorgefertigtes Primer-Design von Vor- und Rückwärts-Primern, mit einer Intron-umspannenden Sequenz, damit keine genomische DNA detektiert wird. Hierfür wurde nach den Protokoll-Angaben des Herstellers der PCR-Reaktions-Mix hergestellt, welcher in den Löchern der 96-Loch-Platte verteilt wurde und nachfolgend die entsprechenden Assays (*TaqMan® Gene Expression Assays Primer*) für jedes Zielgen in Triplikaten pipettiert. Jedes Loch enthielt 10 µl Volumen nach dem folgenden Ansatz:

<b>Reaktionsvolumen (1x Ansatz): 10 µl</b>	
20x TaqMan GeneExpression Assay	0,5 µl
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	5 µl
cDNA (1 bis 100 ng)	2 µl
RNase-freies Wasser	2,5 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>10 µl</b>

Die Quantifizierung der Testprobe/Experiment (CD133-positives cDNA-Material) wurde in Bezug zu der Referenzprobe/Calibrator (CD133-negatives cDNA-Material) berechnet, weshalb in jeder Messung Löcher mit dem Calibrator belegt wurden. Die Fast-96-Loch-Platte wurde zum Schluss mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt. Bei jeder beladenen Reaktionsplatte wurden immer eine Kontrolle mit Wasser (No Template control) statt der cDNA, sowie die endogene Kontrolle *18s rRNA* (*TaqMan® Endogenous Control Assays 18s rRNA*) mitgeführt. Ebenso wurde *PROMININ* immer als positive Kontrolle mitbestätigt. Die Platten wurden nachfolgend in das Gerät des 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) eingesetzt, und das folgende Programm wurde eingestellt:

<b>Programm zur Quantifizierung der PCR-Amplifkate</b>		
		Temperatur    Zeit (Min.)
<b>Schritt 1</b>	Polymerase-Aktivierung	95 °C    20
	50 Zyklen:	
<b>Schritt 2</b>	Denaturierung	95 °C    3
	Anlagerung / Verlängerung	60 °C    30

Wesentliches Merkmal der TaqMan-PCR ist eine zwei-Schritt RT-PCR, die zur Einzelstrang-cDNA Synthese mit den Random Primern des „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ führt. Die nachfolgende real-time PCR, die mit den TaqMan® Gene Expression Assays erfolgte, enthält eine Sonde mit einem Minor Groove Binder (MGB), welche 6-FAM Fluoreszenz-markiert ist. Die Verstärkung des Fluoreszenz-Signals entsteht bei jeder Runde der Amplifikation, so dass die Fluoreszenz proportional zur enthaltenden Transkript-Menge des Zielgens steigt.

*Dritter Schritt: Auswertung*

Die Vergleichsmethode (Comparative Methode) für die relative Quantifizierung wurde angewendet, um die Expressionshöhe der Test- (CD133-positives angereichertes Material) relativ zur Referenzprobe/Calibrator (CD133-negatives angereichertes Material) zu berechnen. An der Amplifikations-Kurve wird der C<sub>t</sub>-Wert (Threshold Cycle) abgelesen. Dieser ist der Schnittpunkt der Zyklus-Anzahl an der Threshold-Linie.

Mit der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  wird die Transkriptmenge berechnet. Diese beschreibt die exponentielle Vervielfachung des Transkripts ausgehend von dessen Verdopplung beim ersten Zyklus (Fold Change). Mittels der Normalisierung wurden die Mittelwerte der Proben für jedes Zielgen gebildet und von den Mittelwerten der endogenen Kontrolle abgezogen, entsprechend dem  $\Delta Ct$ -Wert. Der Expressionsunterschied wird mit dem  $\Delta\Delta Ct$ -Wert beschrieben:

$$\Delta Ct_{\text{Testprobe}} = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{endogene Kontrolle}} ; \Delta Ct_{\text{Calibrator}} = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{endogene Kontrolle}}$$

$$\Rightarrow \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Testprobe}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$$

Zu der endogenen Kontrolle normalisiert und relativ zum Calibrator ergibt sich die

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Für die statistische Signifikanz wurden die C<sub>t</sub>-Rohwerte mit der Formel  $2^{-Ct}$  umgewandelt und mit diesen die statistische Signifikanz berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Aufgrund der Zielgen-Anzahl wurden mehrere Platten für jedes Experiment beladen. Die Verrechnung der Messungen zu einem Experiment und einem Darstellungs-Diagramm wurde, unter Zuhilfenahme der Software DataAssist™ zur Basis 2 logarithmiert, zusammengestellt (Xia *et al.*, 2010).

### 2.2.16 Immunhistochemie

#### 2.2.16.1 Zellkultivierung: Stammzell- und Differenzierungs-Medium

Zellen wurden zuerst in Zellkulturflaschen expandiert und anschließend nach einem Mediumwechsel in Neurocult complete-Medium mit den angegebenen Faktoren umgesetzt. In diesem Medium wurden die Neurosphären für 10 bis 12 Tage gezüchtet. Nach diesem Zeitraum wuchsen die Neurosphären weiter im Differenzierungsmedium (Differentiation-Kit) in Abwesenheit der mitogenen Faktoren für 9 bis 12 Tage. Schließlich wurden diese zum Einparaffinieren weiterverarbeitet. Diese wurden als „Differenzierte Neurosphären“ bezeichnet. Diese Kultur für die Herstellung von Paraffinschnitten der „Neurosphären“ dauerte 16 bis 20 Tage.

#### 2.2.16.2 Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitten: Paraffin-Einbettung der Zellpellets

Zellpellets wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Danach wurde mit PBS gewaschen und die Pellets auf ein kleines, viereckiges Filterpapier überführt. Ein paar Tropfen Hämalaun wurden auf das Papier gegeben, dieses nach innen gefaltet und in eine Kapsel eingeschlossen. Jede Kapsel wurde mit einem Bleistift mit einer intern vergebenen Identifikations-Nummer gekennzeichnet. Die Kapseln wurden darauffolgend in einen Einbettautomaten über Nacht zum Entwässern mittels einer alkoholischen Reihe gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellpellets in den Kapseln in Paraffinblöcke eingebettet. Danach wurden 3 µm dünne Schnitte am Mikrotom angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Weiter wurden die Antikörper-Färbungen nach in der *Tabelle 1* angegebenen Parametern durchgeführt.

Die H&E-Färbung diente der Untersuchung von Kern und Cytoplasma. Hämalaun färbt als positiver geladener Farbstoff den Nukleus an. Eosin färbt als Gegenfärbung das Cytoplasma an.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Charakterisierung von humanen Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter: Untersuchungen zu dem CD133-Antigen und dem Selbsterneuerungs-Potential

Das Zelloberflächenantigen CD133 wird als Tumorstammzellmarker in Gehirntumoren angesehen. Die Fraktion CD133-positiver Zellen soll die Stammzell-enthaltende Population sein, die Tumore ausbilden kann, und die CD133-negative Zellfraktion soll eher differenziertere Zellen mit limitierter Proliferationsfähigkeit enthalten (Singh *et al.*, 2004). Demnach sollten nur CD133-exprimierende Gehirntumorzellen sich selbst erneuern und zum Tumor expandieren können, während CD133-negative Zellen diese Eigenschaft nicht haben sollten, da sie sich nicht selbst-erneuern können.

In dieser Arbeit sollten CD133- hoch- und niedrigexprimierte Subpopulationen hinsichtlich des Neurosphärenpotentials analysiert werden, sowie mit diesen Zellzyklus-Analysen durchgeführt werden. In einem weiteren Teil sollten Expressionsunterschiede auf Transkriptionsebene herausgearbeitet werden, um Unterschiede dieser Populationen darzustellen und möglicherweise weitere Hirntumor-Stammzellmarker zu finden. Darüber hinaus sollten die Medulloblastom-Zelllinien auf ihre Selbsterneuerungs-Kapazität untersucht werden.

#### 3.1.1 Klonogenizitäts-Fähigkeit von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup> Zellfraktionen

Zunächst wurden zehn Medulloblastom-Zelllinien durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer CD133-Expression analysiert. Es zeigte sich, dass die CD133-Expression innerhalb der CD133-exprimierenden Zelllinien sehr variabel war (siehe Tabelle 6). Für weitere Experimente wurden dann die Medulloblastom-Zelllinien D283 Med, 1580Wü und D3484 verwendet, die eine CD133-Expression in Subpopulationen zeigten. Zunächst erfolgte die Anreicherung von CD133(+)- und CD133(-)-Zellfraktionen von D283 Med und 1580Wü mittels der AutoMACS-Separation.



## ERGEBNISSE

CD133-exprimierende Zellen			CD133-niedrig exprimierende Zellen						CD133-divergierende Expression: D3484-Zellkultur	
D283Med	1580Wü	D425Med	DAOY	D341Med	Mhh-Med 1	Mhh-Med 3	Meb-Med 8A	Meb-Med 8S	D3484	
96.9%	70.6%	8.7% (#)	2.8% (#)	2.3%	0.0%	0.2%	0.2%	0.7%	a)	40.6% (#)
									b)	14.5%
									c)	62.8% (Adhärenente Zellen)
										32.8 % (Suspensionszellen)

**Tabelle 6: Repräsentative Werte der CD133-Expressionen aus den durchflusszytometrischen Messungen der Medulloblastom-Zelllinien.** a), b): Gesammelte Zellsuspensionen aus den adhärenierenden und den freischwimmenden Subpopulationen b) stellt das biologische Replikat zu einem anderen Zeitpunkt der CD133-Ermittlung dar. c): Getrennt analysierte Subpopulationen aus Zellsuspensionen der adhärenent und der in Suspension wachsenden Zellen. (#): Messung ohne Isotyp-Kontrolle durchgeführt.

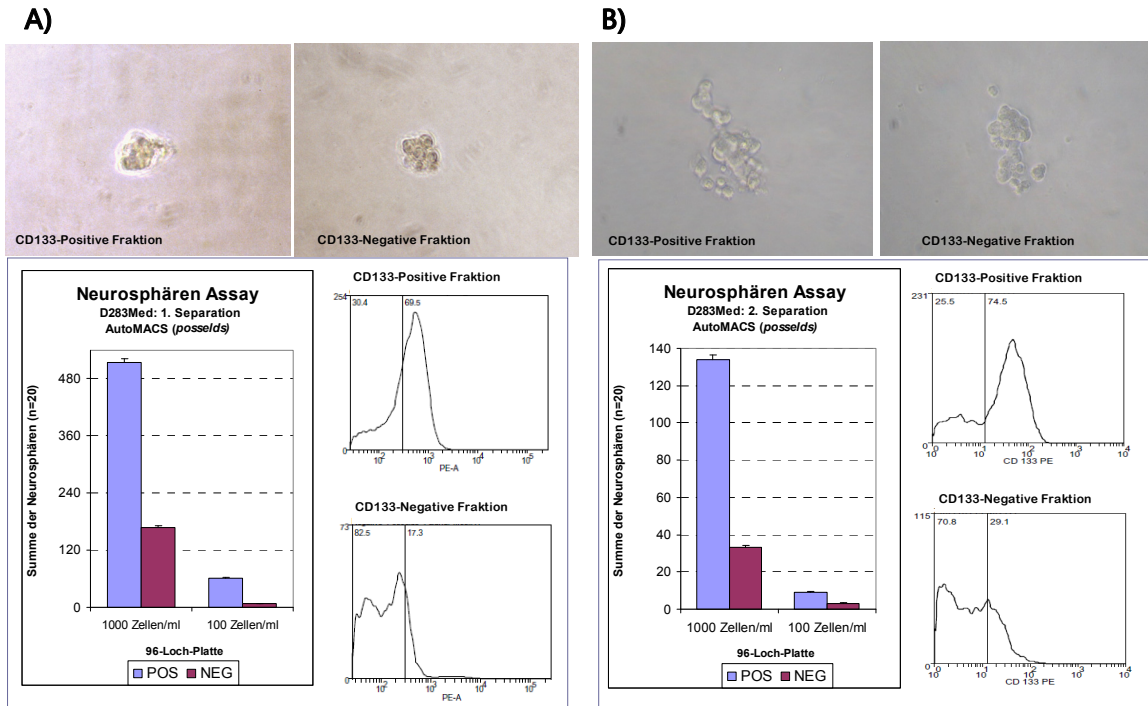
Die Zellen wurden mit dem Antikörper CD133/1 und nachfolgend mit Magnet-Beads markiert. Gleichzeitig wurden die Zellen gegen das Epitop von CD133/2-PE gefärbt, um die Effektivität der Separation durchflusszytometrisch analysieren zu können.

Als Erstes wurden die separierten Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung untersucht (Neurosphären-Assays). Die separierten D283 Med Zellen wurden mittels durchflusszytometrischen Analysen überprüft und anschließend im Neurosphären-Assay ausgesät.

Die CD133-Separation von D283 Med-Zellen (siehe Abbildung 13) ergab 69,5% (A) bzw. 74,5% (B) CD133-positive Zellen in der positiven (angereicherten) Fraktion. Die negativen Fraktionen enthielten 82,5% bzw. 70,8% CD133-negative Zellen. Eine signifikant höhere Neurosphären-bildende Kapazität fand sich jeweils bei der positiven (angereicherten) Fraktion.

Die 1580Wü-Zellen zeigten sich in diesem Versuch sehr empfindlich; ein klonogener Assay aus separierten CD133-positiv und negativ angereicherten Fraktionen konnte nicht ausgewertet werden.

Zwei Subpopulationen der D3484-Zelllinie wurden auf die Klonogenitäts-Fähigkeit hin untersucht. Höher CD133-exprimierende adhärenente Zellen und weniger CD133-exprimierende, nicht-adhärenente Zellcluster einer Gesamtkultur wurden geerntet und Neurosphären-Assays durchgeführt. Beide Subpopulationen bildeten im ähnlichem Maße Neurosphären aus (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 13: Neurosphären-Assays und durchflusszytometrische Kontroll-Analysen von CD133-positiven und CD133-negativen Fraktionen der Zelllinie D283 Med.** A) und B) zeigen zwei unabhängige Experimente. Neurosphären-Assays von positiven versus negativen Fraktionen;  $P \leq 0,001$  (Mann-Whitney Rank Sum Test).

Insgesamt zeigten diese Versuche, dass die Neurosphären-Bildung nicht zwangsläufig mit der CD133-Expression assoziiert war, und dass die Hypothese sich nicht für jede Zelllinie bestätigen ließ.

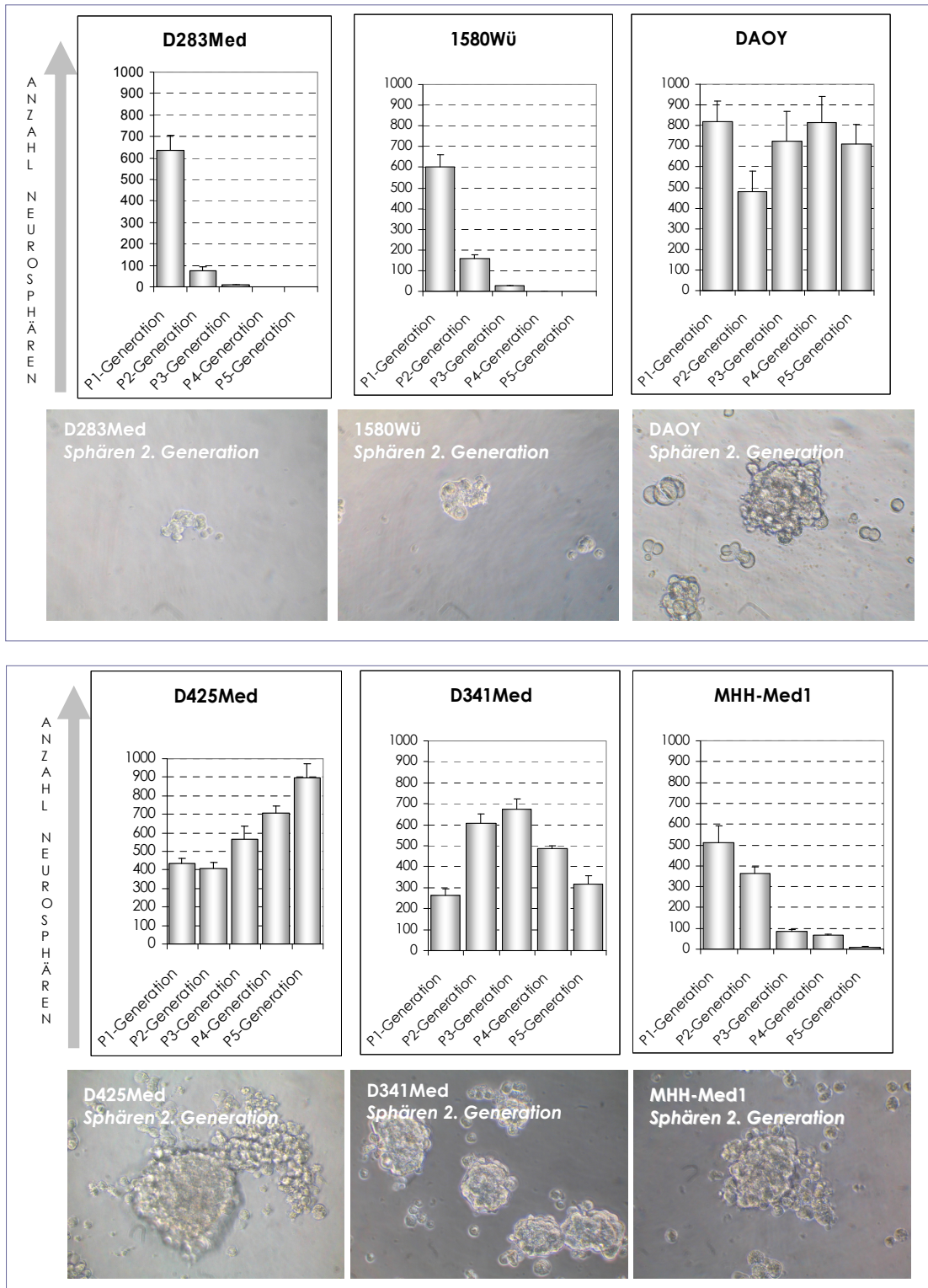
### 3.1.2 Untersuchung der Selbsterneuerung-Fähigkeit durch Replating-Assays

Um das Selbsterneuerungspotential näher zu betrachten, wurden Klonogenizitäts-Assays mit permanenten humanen Medulloblastom-Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden in geringer Dichte in definiertem Medium ausgesät. Unter diesen Bedingungen starben differenzierende Zellen ab, während neurale Stammzellen sich teilten und Neurosphären ausbildeten. Die Propagation der auf Mitogene ansprechenden Neurosphären führte durch Replattierung der vereinzelteten Zellen bei jeder Runde oder Passage zu einer geometrischen Expansion (Vescovi *et al.*, 2006). Vereinzeltete Zellen wurden in definiertem serumfreiem Medium ausgesät und mit den humanen

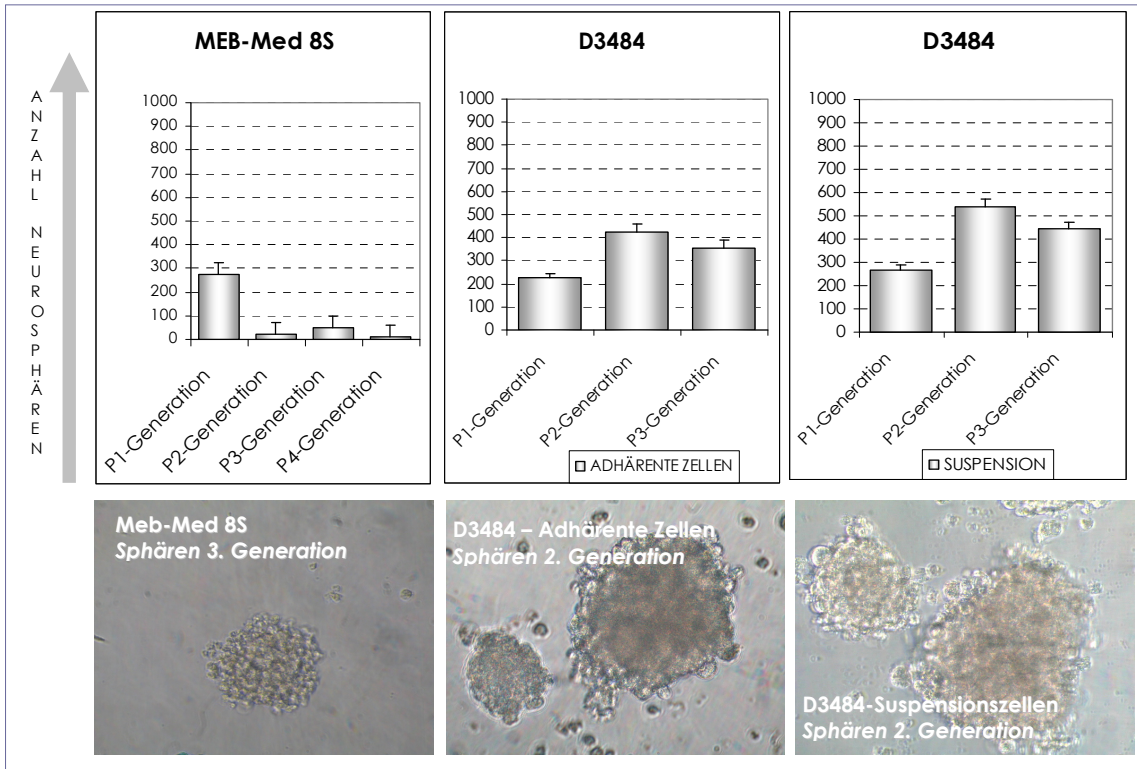
rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF, bFGF, LIF sowie Heparin versetzt. Heparin wurde zugesetzt, um die Wirkung von bFGF zu verstärken. Die Bindungsaffinität von bFGF wird von Heparin/Heparansulfat moduliert. bFGF fördert das Wachstum von undifferenzierten Zellen und steigert die Klonogenizität (Dvorak *et al.*, 2006). EGF als Mitogen verstärkt ebenso das Wachstum der selbst-erneuernden Kolonien (Soeda *et al.*, 2008). Die Assays wurden nach 12 Tagen Inkubationsdauer gestoppt und es wurde die Anzahl der gebildeten Sphären erfasst.

Die Replating-Assays (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15) zeigten, dass nicht alle Zellen zur Neurosphärenbildung unter serumfreien Kulturbedingungen fähig waren. So wiesen die Zelllinien DAOY, D425 Med und D341 Med das stärkste neurosphärenbildende Potential auf. Die Neurosphären waren unterschiedlich in Geometrie und Größe. D283 Med und 1580Wü wiesen eine geringe Kapazität zur Neurosphärenbildung; sie zeigten die kleinsten Sphären und konnten sich nur bis zur dritten Generation erneuern.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 14: Replating-Assays von D283 Med, 1580Wü, DAOY, D425 Med, D341 Med, MHH-Med1.** Es ist jeweils der Mittelwert der Anzahl der Neurosphären von je 4 Löchern dargestellt. Die Zellkonzentration bei der Aussaat betrug 1000 Zellen/ml je Loch. Bilder: 32x Vergrößerung.



**Abbildung 15: Replating-Assays (vergleiche Abb. 24a) von MEB-Med-8S, D3484 (adhärente und Suspensions-Zellen).** Meb-Med 8S: Es wurden 1000 Zellen/ml pro Loch ausgesät und 4 Löcher für die Mittelwert-Berechnung ausgezählt; D3484: 10 000 Zellen/ml pro Loch und 6 Löcher wurden jeweils ausgelesen. Bilder: 32x Vergrößerung.

### 3.1.2.1 Assoziation der CD133-Expression mit dem Repopulationspotential (Neurosphärenbildung)

Die Repopulations-Aktivität der oben untersuchten Zelllinien steht nicht direkt mit der CD133-Expressionsstärke in Korrelation (siehe Abbildung 16).

CD133-hoch exprimierende Zellen: > 3 %	CD133-niedrig exprimierende Zellen: < 3 %	Repopulations-Potential	
		Hoch bzw. unlimitiert	Gering bzw. limitiert
D283Med - 1580Wü - D425Med - D3484	DAOY - D341Med - MHH-Med1 - MEB-Med 8S	DAOY - D425Med - D341Med - D3484	D283Med - 1580Wü - MEB-Med 8S - MHH-Med1

**Abbildung 16: Vergleichende Übersicht zur CD133-Expressionsstärke der in Serum-haltigem Medium kultivierten und durchflusszytometrisch analysierten Zelllinien und des Repopulations-Potentials.**

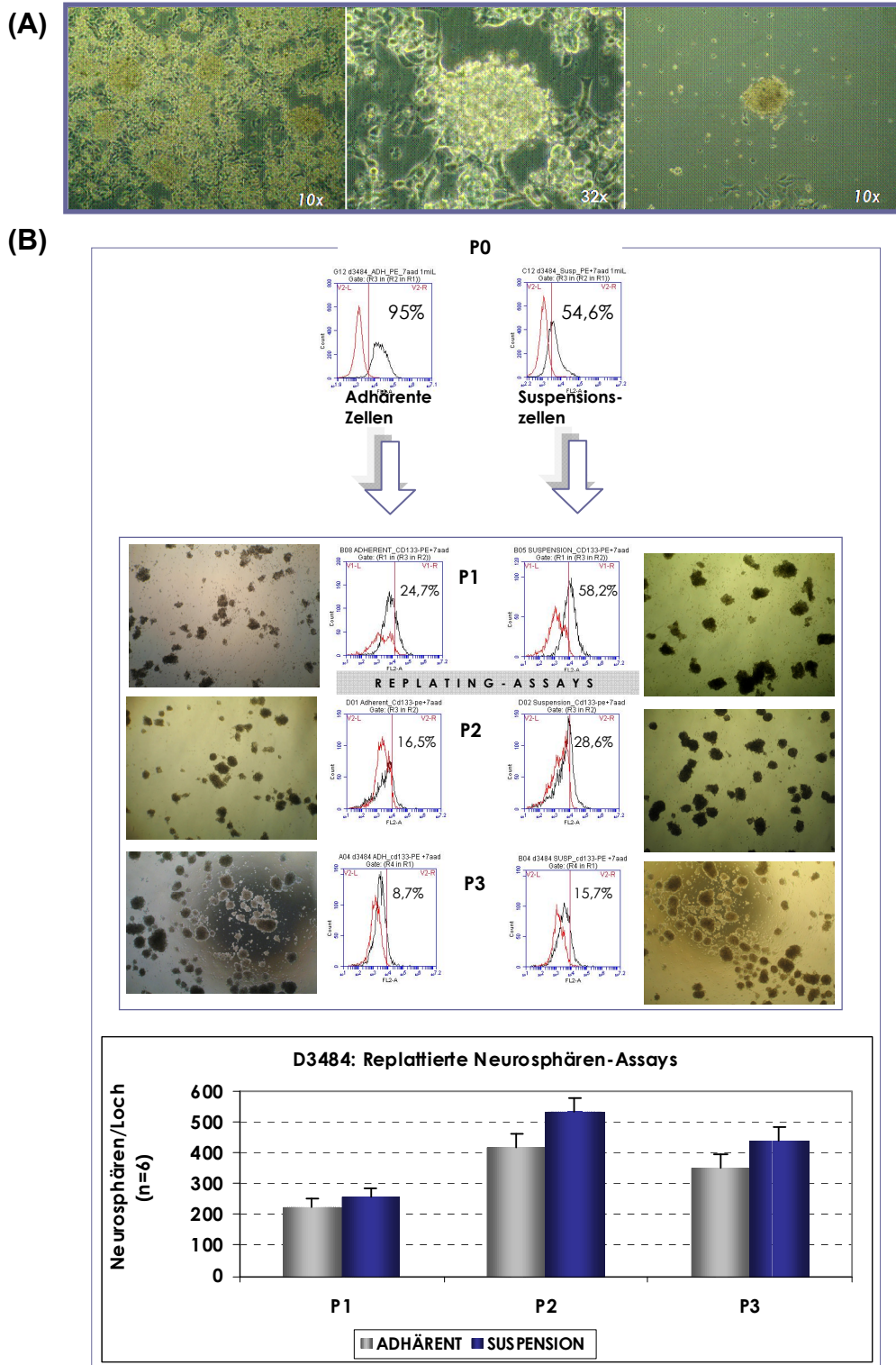
### 3.1.2.2 Die D3484-Neurosphären weisen eine variable CD133-Expression auf

Eine CD133-abhängige Neurosphären-Bildungsfähigkeit der beiden Subtypen der D3484-Zelllinie wurde weiter durch repetitive Neurosphären-Assays analysiert, um dem CD133-Expressionsstatus der beiden Subpopulationen nachzugehen.

Dazu wurden die adhärenenten Zellen und Suspensionszellen dieser Zelllinie durchflusszytometrisch hinsichtlich der CD133-Expression der in Serum-haltigem Medium kultivierten Ausgangszellen (P0) analysiert (vergleiche Abbildung 17a). Anschließend wurden Neurosphären generiert (P1) und wiederholt bis zur dritten Generation als Neurosphären-Assays ausplattiert (siehe Abbildung 17).

Die Ausgangs-Expressionen der adhärenenten Zellen waren bis zu ca. 95% CD133-positiv und die Suspensionszellen bis zu 54%. Die CD133-Expression nahm stetig ab, bei jedem Replaten beider Zellphänotypen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die CD133-Expression von unterschiedlichen Faktoren abhängig sein könnte.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 17: (A)** Repräsentative Bilder der Morphologie der in Serum-haltigem Medium passagierten D3484 Zellen. **(B)** Neurosphärenkapazität und CD133-Expression der Generationen aus der Ausgangs-Zellkultur der adhärennten (links) und den Suspensionszellen D3484 (rechts) entsprechend, sowie aus den wiederausgesäten Neurosphären-Assays. Durchflusszytometrische Analysen der Generationen (P1, P2, P3) aus den Replating Assays für D3484, den adhärennten (links) und den Suspensionszellen (rechts). Überlappung aus Isotyp-Kontrolle (rot) und CD133-markierter Probe (schwarz). *Bilder:* Darstellung der Neurosphären, hervorgegangen aus den adhärennten (links) und den Suspensionszellen (rechts) einer Gesamtkultur (P0). 4x-Vergrößerung. *Diagramm:* Neurosphärenpotential. Das Aussäen der D3484-Zellen in einem Neurosphären-Assay erfolgte in 24-Loch-Platten mit 10 000 Zellen/ml in einem Volumen von 2 ml pro Loch. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte aus n=6 ausgezählten Löchern.



3.1.3 mRNA-Genexpressionsunterschiede von CD133-positiv und CD133-negativ angereicherten Zellfraktionen mittels Microarray-Analyse

3.1.3.1 Gewinnung von CD133 differentiell exprimierenden Zellpopulationen: Zellkultur, AutoMACS-Separation und RNA-Isolierung

Genexpressionsunterschiede auf mRNA-Ebene zwischen den CD133 positiven und -negativen Fraktionen sollten mittels Microarray-Hybridisierung untersucht werden.

D283 Med ist eine permanente Medulloblastom-Zelllinie mit einer hohen CD133-Expression. Die erzielte Reinheit bei der Anreicherung mittels der AutoMACS-Separation divergierte zwischen den Experimenten. Der positive Anteil vor der Separation bei dem Probenpaar 1 lag bei 67,9 % (nicht gezeigt). Nach der Separation war die angereicherte Fraktion (R1913) zu 73 % CD133-positiv und die negativ angereicherte Fraktion (R1914) zu 58.1 % CD133-negativ (siehe Abbildung 18). Aufgrund der stark schwankenden Zellausbeute wurde versucht, die negative (abgereicherte) Fraktion aus einer AutoMACS-Separation zu kultivieren, um mehr Zellen und somit eine ausreichende Menge an Material für die RNA-Extraktion zu erhalten. Die CD133-„positive“ Probe (R2056) entsprach einer unseparierten Zellkultur mit ungefähr 95% CD133-Expression. Die Vergleichs-Probe (CD133-abgereicherte Fraktion (R2057)) wurde von kultivierten, abgereicherten Zellen erhalten (siehe Tabelle 7).

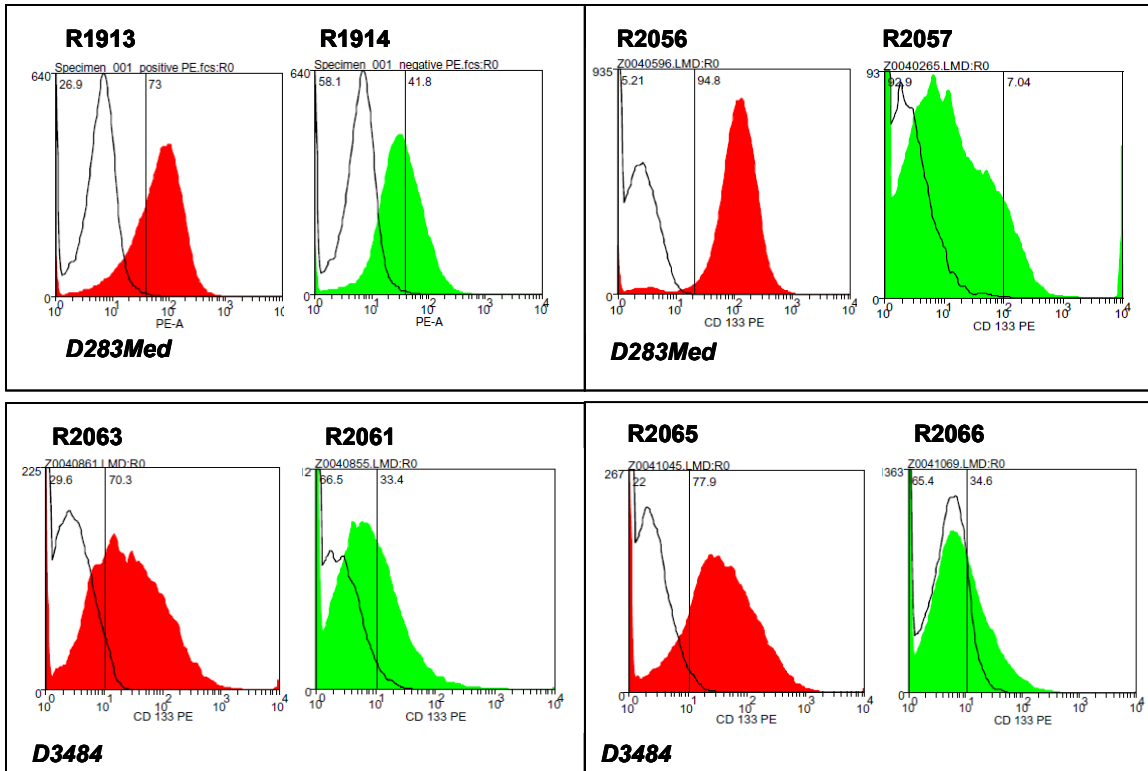
	RNA-Proben	Zelllinie	RNA-Nummer	AutoMACS-Programm: posselds bzw. Zellkultur	FACS-Analyse	RNA-Reinheit: 260/280-Wert	RNA-Konzentration (in 50 µl-Volumen)
<i>I</i>	Probenpaar 1	D283Med	R1913	Positive Fraktion	CD133high/+	1,9	540 ng/ml
			R1914	Negative Fraktion	CD133low/-	1,9	3050 ng/ml
<i>II</i>	Probenpaar 2	D283Med	R2056	Ausgangs-Zellkultur	CD133high/+	1,9	3491 ng/ml
			R2057	Negative Fraktion	CD133low/-	2	1570 ng/ml
<i>III</i>	Probenpaar 1	D3484	R2063	Adhärenente Zellen	CD133high/+	2,1	1708.6 ng/ml
			R2061	Suspensions-Zellen	CD133low/-	2,1	2353.5 ng/ml
<i>IV</i>	Probenpaar 2	D3484	R2065	Adhärenente Zellen	CD133high/+	2	467.3 ng/ml
			R2066	Suspensions-Zellen	CD133low/-	2,1	2916.9 ng/ml

**Tabelle 7: CD133<sup>hoch</sup> und CD133<sup>niedrig</sup> –exprimierende Zellen der D283 Med und D3484. RNA-Proben für die Microarray-Analyse. Bei R2056 handelte es sich um RNA der Ausgangs-Zellkultur.**

Bei der D3484-Zelllinie wurden wiederum ohne Separation die CD133 differentiell exprimierende adhärenente Subpopulation (70% positiv), mit den Suspensionszellen (30% positiv) verglichen. Dies sind die Proben *III* und *IV* in der Tabelle 7 zu finden. Einen



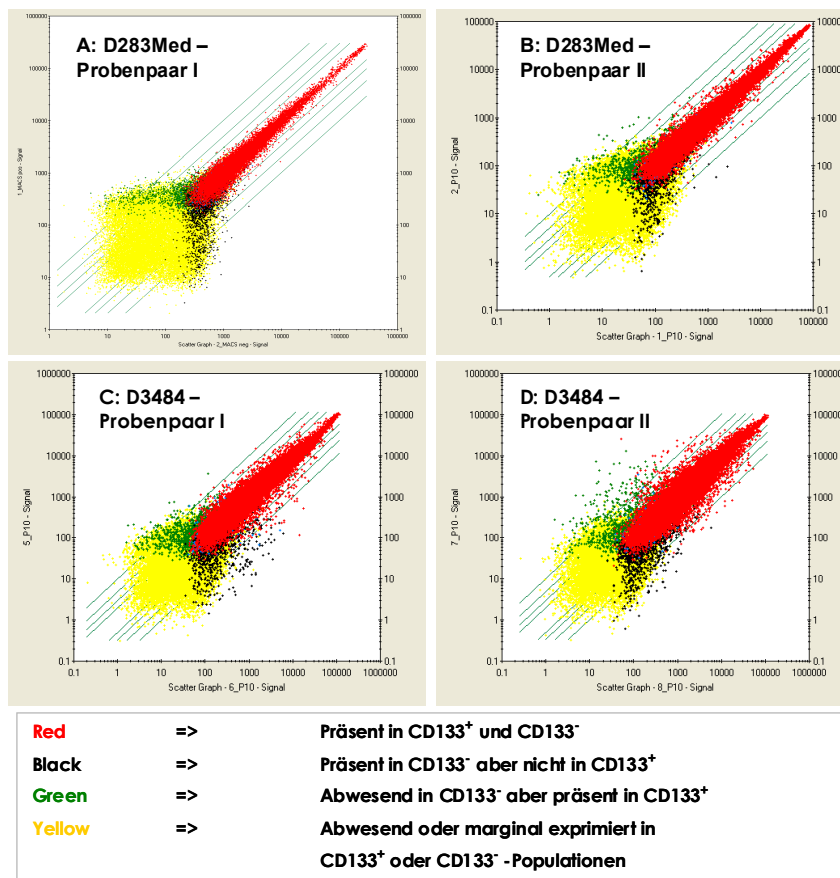
gesamten Überblick über die Proben und deren CD133-Expression für die weitere Microarray-Analyse liefern *Tabelle 7* und *Abbildung 18* entsprechend.



**Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analysen der CD133-Expression.** Die beiden Kästen oben zeigen die CD133-separierten D283 Med-Populationen. Unten sind die beiden Replikate der D3484-Zelllinie, hoch- und gering-exprimierenden CD133-Populationen (Einzelheiten, siehe Tabelle 7). Adhärenzte D3484 (hohe CD133-Expression) und der in Suspension wachsenden D3484-Zellpopulationen (niedrige CD133-Expression). Die rote Farbe stellt jeweils die CD133-positivere Fraktion und grün die CD133-niedriger exprimierende Fraktion bzw. die Referenz-Probe dar.

### 3.1.3.2 Microarray-Analyse: Überexprimierte Gene in den CD133-angereicherten Populationen

Es wurde ein Vergleich von separierten Zellen mittels magnetischer Markierung sowie von nicht-separierten Zellkulturen mit unterschiedlicher CD133-Expression durchgeführt. Ziel war es, trotz nicht einheitlicher experimenteller Bedingungen CD133-assoziierte Genpopulationen zu finden.



**Abbildung 19: Scatter Plots der differentiellen Analyse der beiden Zelllinien.** Auf der x-Achse sind die CD133-niedrigexprimierten und auf der y-Achse sind die CD133-hochexprimierten Proben aufgetragen.

Einen ersten, einfachen Überblick geben die Scatter Plots (siehe Abbildung 19) über die Anhäufung und Intensität der überexprimierten Gene (grüne Punkte) der differentiellen Genexpression. Alle Vergleichspaare zeigten ein ähnliches Muster.

Es folgte die Auswahl der fünf am deutlichsten unterschiedlich exprimierten Kandidatengenen, die in allen CD133-angereicherten Fraktionen überexprimiert vorkamen (siehe Tabelle 8), um validiert zu werden.

	<i>D283Med</i>		<i>D3484</i>			
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>		
Probeset	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung
204304_s_at	1.45	1.5	2.9	2.1	PROM1	prominin 1
205413_at	0.82	3	2.3	1.3	MPPED2	metallophosphoesterase domain containing 2
208690_s_at	0.49	1.1	0.7	0.5	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1
210038_at	0.48	0.5	0.9	1.4	PRKCQ	protein kinase C, theta
217867_x_at	0.45	0.8	1.8	2.1	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2
222446_s_at	0.36	0.6	1.8	2	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2
226525_at	0.41	0.6	2.1	2.3	STK17B	serine/threonine kinase 17b

**Tabelle 8: Überexprimierte Gene in CD133-angereicherten Proben beider Zelllinien.** Signal Log Ratio: Expressionsverhältnis von Experiment (CD133-positive Probe) zu Baseline (CD133-negative Referenzprobe) als Logarithmus zur Basis 2. Die Potenz  $2^n$  gibt das Vielfache der Überexpression an und  $n$  stellt den Signal Log Ratio-Wert dar.

Darüber hinaus wurde noch nach weiteren differentiell exprimierten Genen, besonders nach Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern, zur Validierung gesucht (siehe Absatz 11.1, Tabelle 11 im Anhang).

### 3.1.3.3 Validierung der Kandidatengene mittels real-time RT-PCR

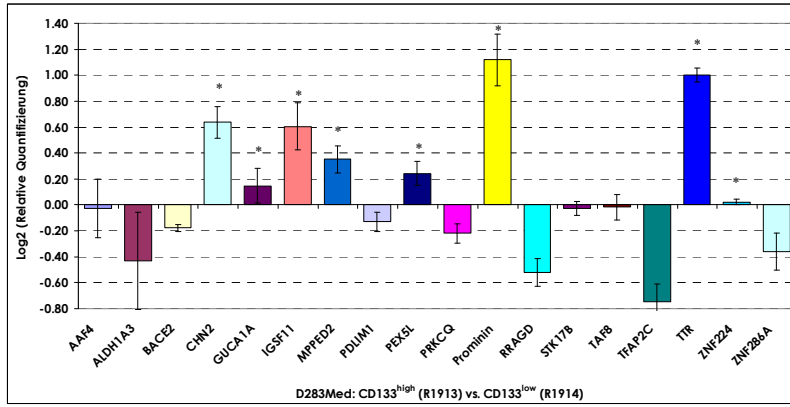
Zur Verifizierung der überexprimierten Kandidatengene in den CD133<sup>+</sup>-Fraktionen, welche die Microarray-Analyse hervorbrachte, wurde die real-time RT-PCR eingesetzt. Im Detail wurden folgende Gene für die quantitative RT-PCR ausgewählt:

*PROM1, MPPED2, PDLIM1, PRKCQ, BACE2, STK17B, AAF4, ALDH1A3, CHN2, GUCA1A, IGSF11, PEX5L, RRAGD, TAF8, TFAP2C, TTR, ZNF286A, ZNF224.*

Wie aus der *Abbildung 20* zu entnehmen ist, konnten nur drei Gene, *MPPED2, TTR und PROMININ1*, in allen CD133-positiven Zellfraktionen als überexprimiert bestätigt werden.

# ERGEBNISSE

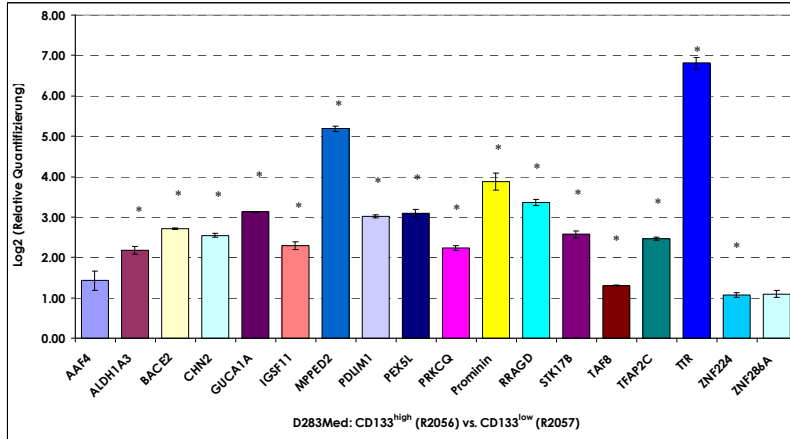
D283Med



Paired t-test  
(SigmaStat-Software):  
CD133<sup>high</sup> vs.  
CD133<sup>low</sup>.  
\*: statistisch  
signifikant.

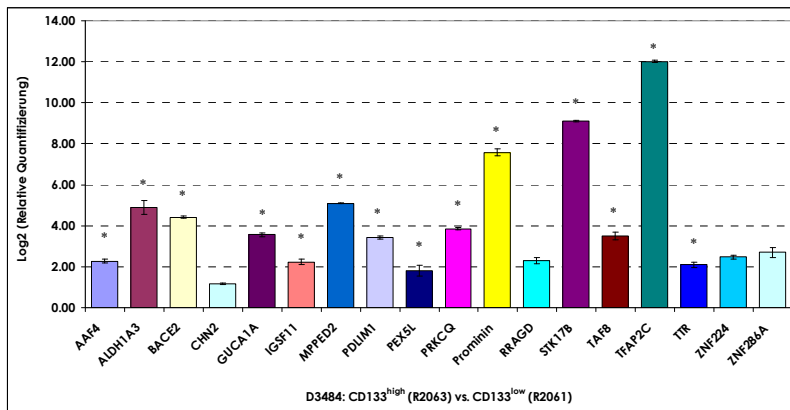
CHN2: P = 0.007;  
GUCA1A: P = 0.008;  
IGSF11: P = 0.011;  
MPPE2: P = 0.002;  
PEX5L: P = 0.001;  
Prominin: P = <0.001;  
TTR: P = 0.002;  
ZNF224: P = 0.003.

D3484



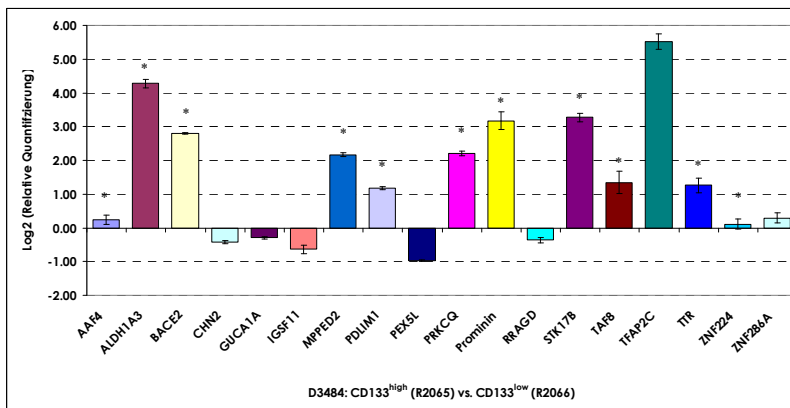
Paired t-test  
(SigmaStat-Software):  
CD133<sup>high</sup> vs.  
CD133<sup>low</sup>.  
\*: statistisch  
signifikant.

ALDH1A3: P = 0.004;  
BACE2: P = <0.001;  
CHN2: P = <0.001;  
GUCA1A: P = <0.001;  
IGSF11: P = 0.004;  
MPPE2: P = <0.001;  
PDLM1: P = <0.001;  
PEX5L: P = 0.002;  
PRKCQ: P = 0.013;  
Prominin: P = <0.001;  
RRAGD: P = <0.001;  
STK17B: P = 0.004;  
TAF8: P = 0.002;  
TFAP2C: P = 0.007;  
TTR: P = 0.004;  
ZNF224: P = 0.050.



Paired t-test  
(SigmaStat-Software):  
CD133<sup>high</sup> vs.  
CD133<sup>low</sup>.  
\*: statistisch  
signifikant.

AAF4: P = 0.006;  
ALDH1A3: P = 0.002;  
BACE2: P = 0.002;  
GUCA1A: P = 0.004;  
IGSF11: P = 0.018;  
MPPE2: P = 0.004;  
PDLM1: P = 0.015;  
PEX5L: P = 0.012;  
PRKCQ: P = <0.001;  
Prominin: P = <0.001;  
STK17B: P = 0.006;  
TAF8: P = 0.007;  
TFAP2C: P = 0.020;  
TTR: P = 0.011.



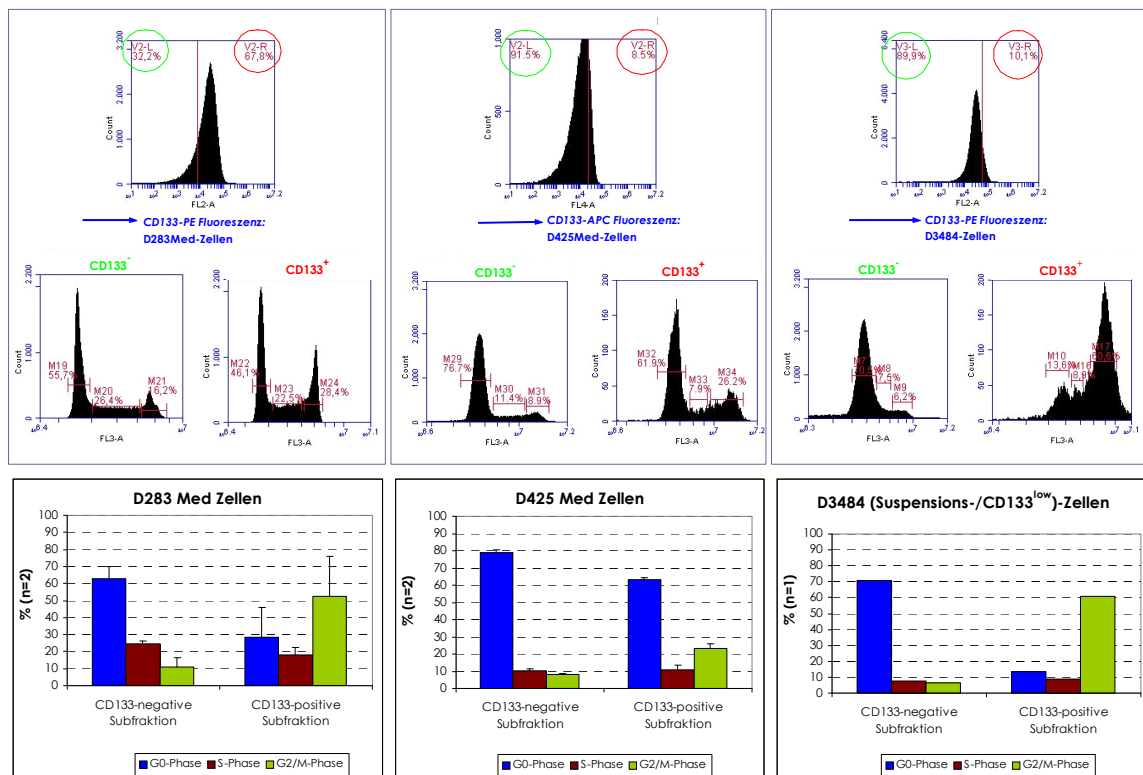
Paired t-test  
(SigmaStat-Software):  
CD133<sup>high</sup> vs.  
CD133<sup>low</sup>.  
\*: statistisch  
signifikant.

AAF4: P = 0.014;  
ALDH1A3: P = 0.004;  
BACE2: P = <0.001;  
MPPE2: P = 0.003;  
PDLM1: P = 0.028;  
PRKCQ: P = 0.007;  
Prominin: P = <0.001;  
STK17B: P = 0.003;  
TAF8: P = <0.001;  
TFAP2C: P = 0.009;  
TTR: P = 0.032;  
ZNF224: P = 0.038.

Abbildung 20: Validierung der in der Microarray-Analyse erhaltenen hochregulierten Gene in allen 4 Probenpaaren. PROMININ1 wurde als Positiv-Kontrolle mituntersucht. Die Signifikanz wurde aus der Probe (CD133<sup>high</sup>) vs. Referenz-Kontrolle (CD133<sup>low</sup>) mit dem gepaarten t-Test-Verfahren (SigmaStat-Software) berechnet.

### 3.1.4 Zellzyklus-Analysen der CD133-Subpopulationen

Den Stammzell- bzw. Tumorstammzell-ähnlichen Populationen werden ruhende, nicht-replikative Zustände zugeschrieben. Daher war es von Interesse, mit dem CD133-Tumorstammzellmarker zu untersuchen, ob die unterschiedlichen CD133-Fractionen eine differente Zellzyklusverteilung aufweisen. Hierzu folgte nach der Oberflächenfärbung mit dem Antikörper gegen das Antigen AC133 eine Methanolfixierung. Anschliessend erfolgte die DNA-Markierung durch eine Propidiumiodid(PI)-Färbung, um die Zellzyklus-Phasen der CD133-Fractionen zu messen. Für diesen Zweck wurden die Zelllinien D283 Med, D425 Med und D3484 herangezogen (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Prozentuale Anteile der Zellzyklus-Phasen von CD133-positiven und CD133-negativen Subpopulationen.** CD133-Oberflächenexpression und PI-Markierung der Zelllinien, (FACS-Histogramm, oben; grüner Kreis: negativer Anteil; roter Kreis: positiver Anteil). Die FACS-Bilder (Mitte) repräsentieren die Messungen, aus denen die Diagramme hervorgingen (unten). Die Oberflächen-Färbungen der Zellen wurden mit: (i) anti-CD133-PE für D283Med-Zellen, (ii) anti-CD133-APC für die D425Med-Zellen und (iii) anti-CD133-PE für D3484 durchgeführt. Für die Zellzyklus-Analysen wurde die DNA nach Methanol-Fixierung mit PI markiert.

CD133-positive D283 Med-Zellen mit hoher CD133-Expression befanden sich überwiegend in der G2/M-Phase, während sich die CD133-negativen Zellen eher in der G0-Phase befanden. Im Vergleich dazu zeigten die D425 Med Zellen dagegen eine sehr

geringe CD133-Expression. Die kleine CD133<sup>+</sup>-Subpopulation befand sich auch vermehrt in der G2/M-Phase. D3484-Suspensionszellen besaßen eine moderate CD133-Expression, und die Verteilung der Zellzyklus-Phasen entsprach der D283 Med Zelllinie. So befanden sich die CD133-positiven Zellen teilungsaktiv in der G2/M-Phase und die negativen CD133-Zellen überwiegend in der G0-Phase. Insgesamt kann gefolgert werden, dass die CD133-exprimierenden Zellen mit der G2/M-Phase assoziiert vorkommen und sich somit im Zellzyklus befinden.

### 3.2 Untersuchungen zu der Entwicklungskontrollsignalwegs-abhängigen Neurosphären-Kapazität von Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter

#### 3.2.1 Beeinflussung der Neurosphärenbildung durch Entwicklungskontrollsignalwege

Zur Untersuchung der Beteiligung der Signalwege bei der Neurosphärenbildung wurden Neurosphären-Assays durchgeführt. Hierzu wurden humane Medulloblastom-Zelllinien unter Zugabe von Signalwegs-spezifischen Inhibitoren und Liganden kultiviert.

Der Sonic Hedgehog-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese einer Medulloblastom-Subgruppe. Hinsichtlich der Selbsterneuerungsfähigkeit hatte das rekombinante Protein Shh einen nur schwachen, variablen Einfluß. Das Neurosphärenwachstum wurde bei Zugabe von Shh nur bei der Linie D283 Med geringfügig stimuliert. Der Agonist SAG indessen scheint einen signifikanten Neurosphären-fördernden Einfluss bei einer Zelllinie (MEB-Med-8S) zu haben, während die Hemmung des Sonic Hedgehog-Signalweges mit dem Inhibitor SANT-1 sich nicht deutlich auf die Sphärenbildung auswirkte.

Der im Neurosphären-Assay eingesetzte Smoothened-Antagonist Cyclopamin führte hinsichtlich der Klonogenizität sowohl zu aktivierenden als auch hemmenden Antworten bei den verschiedenen Medulloblastom-Zelllinien. 1580Wü war sensitiv für Cyclopamin; es führte zur Reduktion der Neurosphären, dagegen bei der MEB-Med-8S-Linie stimulierend (siehe Abbildung 23). Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, hatte Cyclopamin auch auf die D3484-Zelllinie ähnliche Effekte.

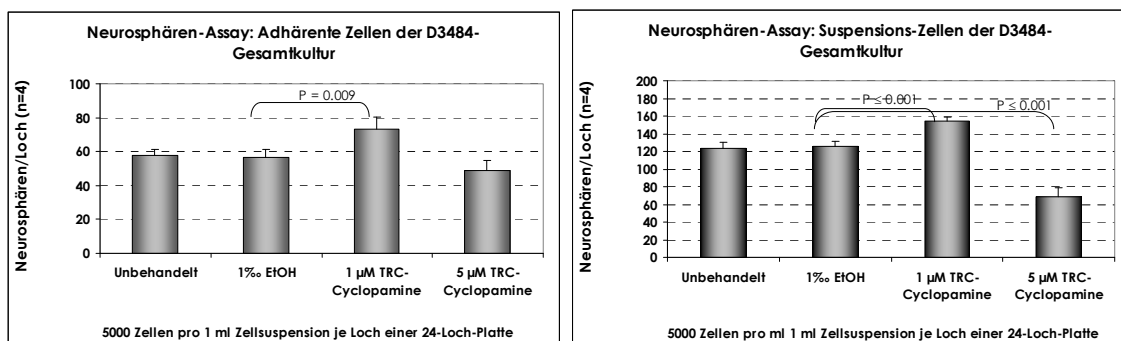


Abbildung 22: Stimulierung der Neurosphärenbildung von Cyclopamin-behandelten D3484-Zellen.

Eine Dosis-Wirkungs-Kurve bei der Zelllinie D425 Med gab Aufschluss über die unterschiedliche Wirkung verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren Cyclopamin und KAAD-Cyclopamin. Diese wirkten in einem mittleren Konzentrations-Bereich aktivierend auf die Neurosphärenbildung der D425 Med Zellen, jedoch nicht bei höheren Konzentrationen (siehe Abbildung 24).

Eine Blockierung des Notch-Signalweges führte bei den untersuchten Zelllinien zum Teil zu einer Blockade des Neurosphären-Wachstums. Von den untersuchten Zelllinien zeigte die Blockierung mit den drei Notch-Inhibitoren nur bei den D425 Med- und MEB-Med-8S-Zellen keine Wirkung. Der Notch-Inhibitor DAPT hatte keinen Effekt.

Der kanonische Wnt-Signalweg nimmt ebenfalls an der Stammzellaufrechterhaltung teil, und seine Deregulierung fördert die Tumorbildung. Auch die Agonisten und Antagonisten des Wnt-Signalweges wirkten sich unterschiedlich auf die Medulloblastom-Neurosphärenbildung bei den einzelnen Medulloblastom-Zelllinien aus. Die drei Agonisten der Wnt-Signaltransduktion Wnt-3A, WNT-Ag und GSK-3 $\beta$ -Inhibitor beeinflussten unterschiedlich die Klonogenizität. Der Ligand Wnt-3A könnte eine Neurosphären-stimulierende Fähigkeit besitzen; diese war allerdings nicht stark ausgeprägt. Keine signifikanten Antworten lieferte die Behandlung der Zelllinien mit dem Liganden WNT-Ag, jedoch eine Tendenz zur verringerten Neurosphärenbildung, wie bei der 1580Wü-Zelllinie zu sehen war. In den hier durchgeführten Assays wies der GSK-3 $\beta$ -Inhibitor eine eher fördernde Wirkung bei den MEB-Med-8S- Medulloblastom-Neurosphären auf. Bei einer Behandlung mit dem Wnt-Antagonisten Dkk-1 sprachen nur die DAOY- Zellen auf die Zugabe dieses rekombinanten Proteins mit einer signifikanten Inhibierung der Neurosphärenbildung an.

Die gleichzeitige Behandlung mit den rekombinanten Proteinen Wnt-3A mit Dkk-1 führte bei den Zelllinien D425 Med und MEB-Med-8S zu einer signifikant höheren Sphärenbildung. Bei der DAOY-Zelllinie ergab Wnt-3A und Dkk-1 eine verringerte Neurosphärenkapazität, die der signifikanten Dkk-1-Inhibierung ähnlich war. Die Zugabe von WNT-Ag zusammen mit dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor führte zu keiner signifikanten Veränderung auf die Selbsterneuerungs-Fähigkeit. Die Stimulation von WNT-Ag mit Dkk-1 führte dagegen zu einer signifikant höheren Neurosphärenbildung bei der MEB-Med 8S-Zelllinie und zu einer Unterdrückung der Klonogenizität bei den Zelllinien DAOY und 1580Wü, die signifikant war. Bei einer weiteren Untersuchung begünstigte die Stimulation mit den Agonisten Wnt-3A und dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor signifikant die Selbsterneuerungs-Fähigkeit bei den D425 Med- und DAOY-Zellen. Die Ko-Stimulierung von rhShh und rhWnt-3A zeigte eine Tendenz sowohl zu einer Zu- als auch einer Abnahme der klonogenen Aggregate. Jedoch war bei allen mit Wnt-3A behandelten Zellen eine Neigung zur Aktivierung erkennbar.



# ERGEBNISSE

SonicHedgehog-Signalweg				Notch-Signalweg			Wnt-Signalweg				
AGONISTEN		ANTAGONISTEN		ANTAGONISTEN			AGONIST	AGONIST	ANTAGONIST		
SAG	rhShh	TRC-Cyclopamine	KAAD-Cyclopamine	SANT-1	DAPT	LY-411575	L-684.458	rhWnt-3A	Wnt-Ag	GSK-3beta-Inhibitor	Dkk-1

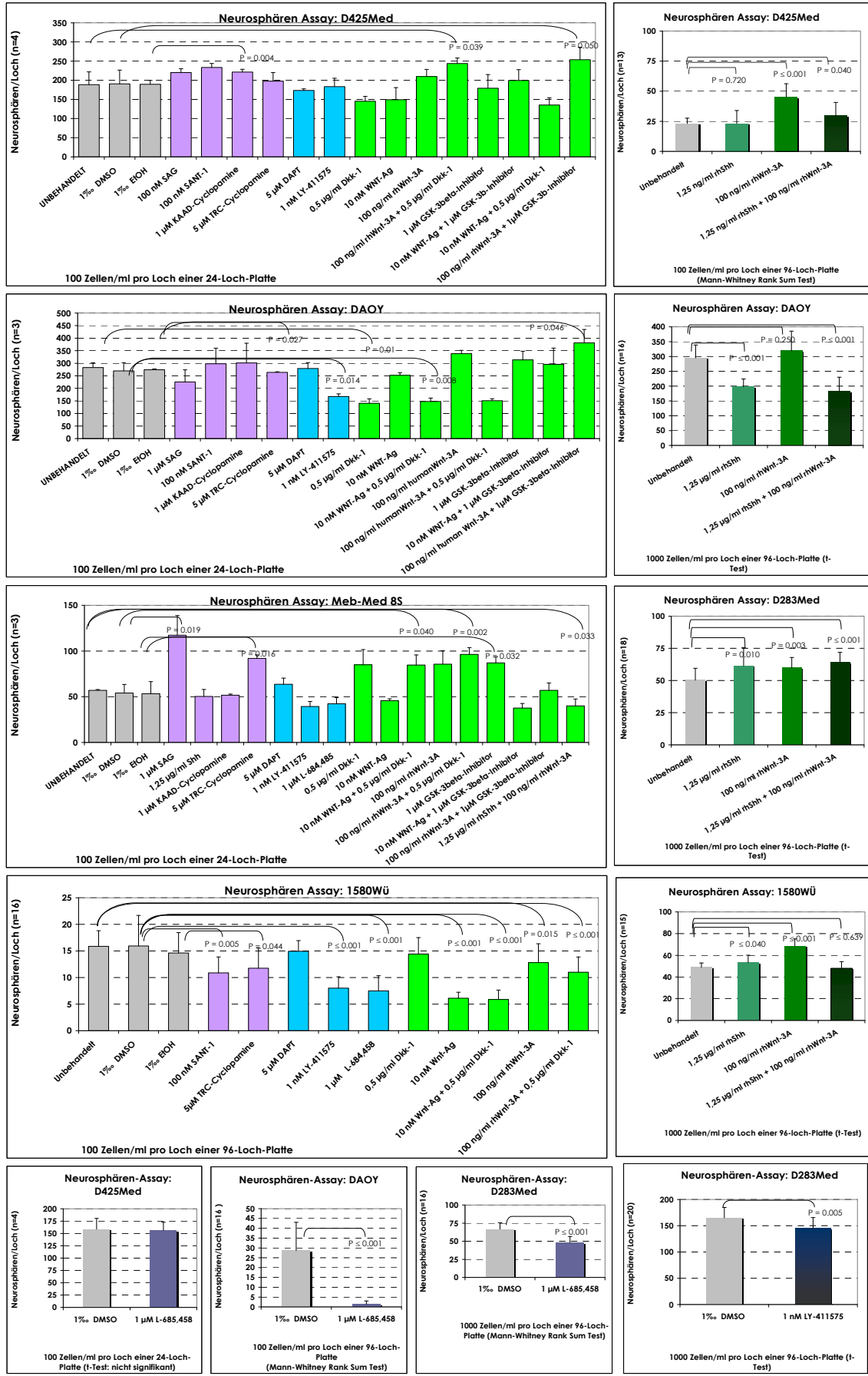
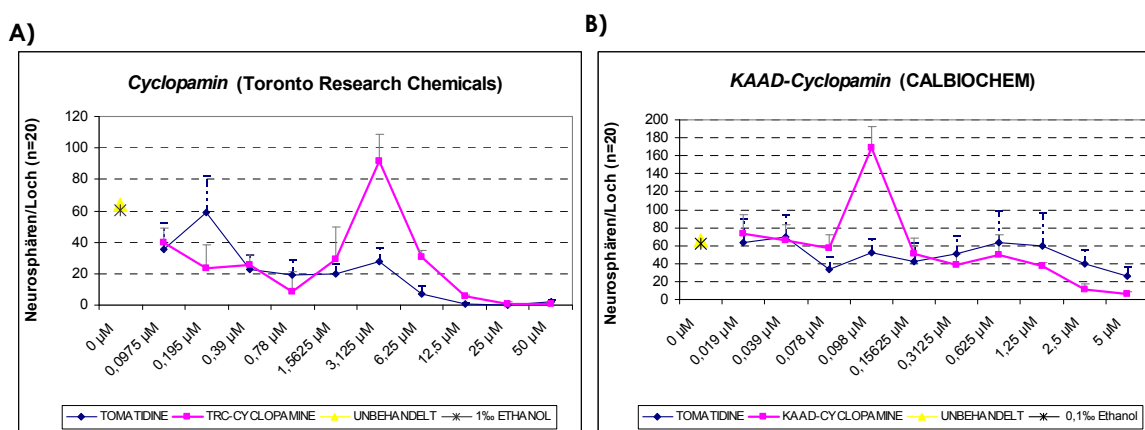


Abbildung 23: Zu- oder Abnahme der Neurospärenbildung nach Agonisten- oder Inhibitoren-Applikation für die Shh-, Notch- und Wnt-Signalwege.

### 3.2.1.1 Sonic Hedgehog-Inhibition mit Cyclopamin hat Konzentrationsabhängig einen aktivierenden und inhibierenden Effekt auf die Klonogenizität

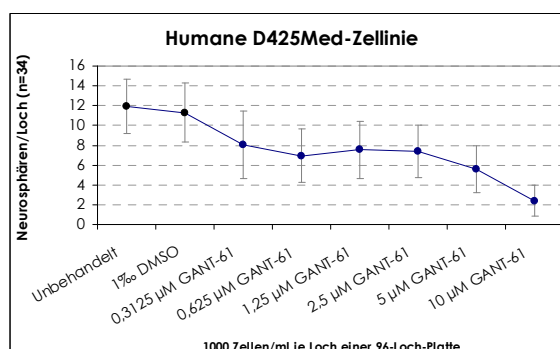
Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für Cyclopamin und das KAAD-Cyclopamin erstellt. KAAD-Cyclopamin ist potenter und deshalb in geringeren Konzentrationen einsetzbar. Beide Cyclopamin-Derivate zeigten ein Konzentrations-Fenster, in dem die Neurosphärenbildung erhöht wurde.



**Abbildung 24: Neurosphärenbildung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclopamin (A) und KAAD-Cyclopamin (B).** Als Kontrollen dienten: (i) unbehandelte, (ii) mit Lösungsmittel versetzte, in welchem der Inhibitor gelöst war, Zellsuspensionen; (iii) Tomatidin-behandelte Zellsuspension. Tomatidin ist ein dem Cyclopamin struktur-ähnliches Steroid, welches den Hedgehog-Signalweg nicht inhibieren soll (Watkins et al., 2003).

### 3.2.1.2 Sonic Hedgehog-Inhibition mit GANT-61

Hingegen hemmte der Hedgehog-Inhibitor GANT-61 die Sphärenbildung bei der D425 Med Zelllinie; bis 2,5 µM verläuft die Kurve annähernd linear und ab 2,5 µM findet eine stärkere Inhibition statt, wie die Dosis-Wirkungs-Kurve unten zeigt.

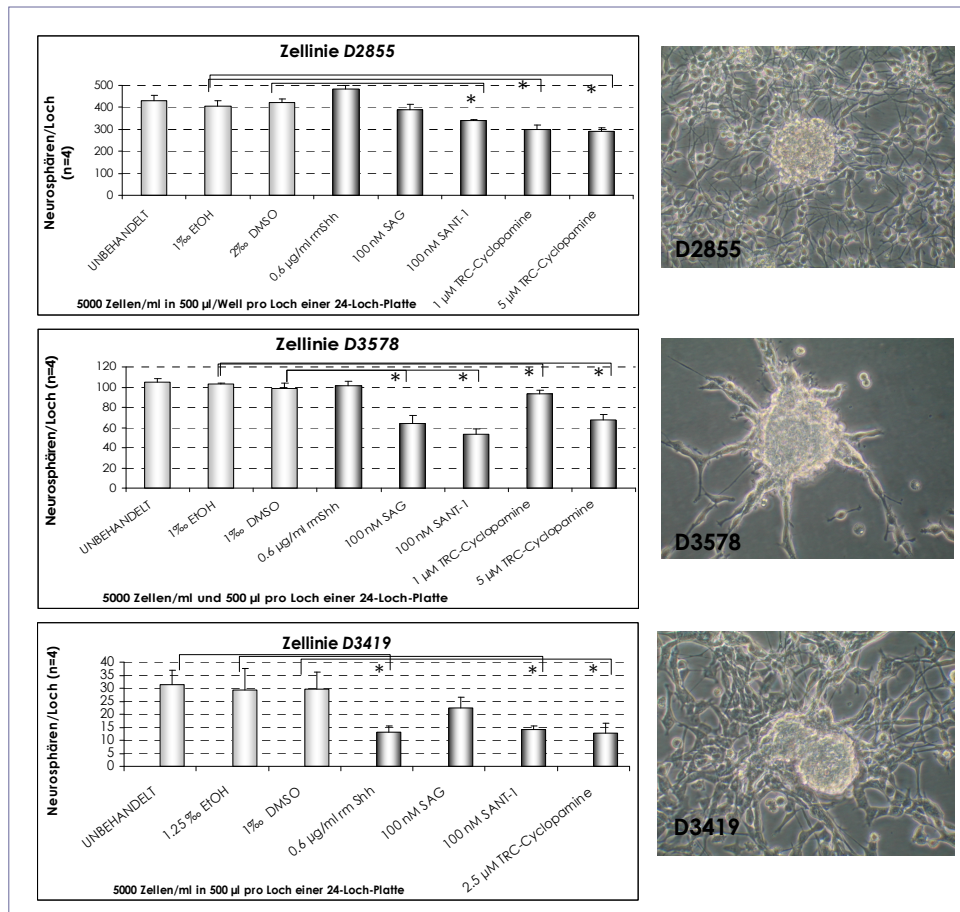


**Abbildung 25: GANT-61 inhibiert die Neurosphären-Bildung.**

### 3.2.2 Klonogenizität von murinen $ptc^{+/-}$ -Medulloblastomzellen: Abhängigkeit vom Shh-Signalweg

Drei neu etablierte, murine  $ptc^{+/-}$ -Medulloblastomlinien wurden mit Agonisten und Antagonisten des Sonic Hedgehog-Signalweges behandelt und das Neurosphärenpotential untersucht.

Die aktivierenden Liganden des Sonic Hedgehog-Signalweges, Shh und SAG, sowie die Inhibitoren SANT-1 und Cyclopamin neigten dazu, die Klonogenizität zu unterdrücken. Die Behandlung der Zellen mit Cyclopamin bei 2,5  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M führte zur statistisch signifikanten Reduzierung der Neurosphären (siehe Abbildung 26).

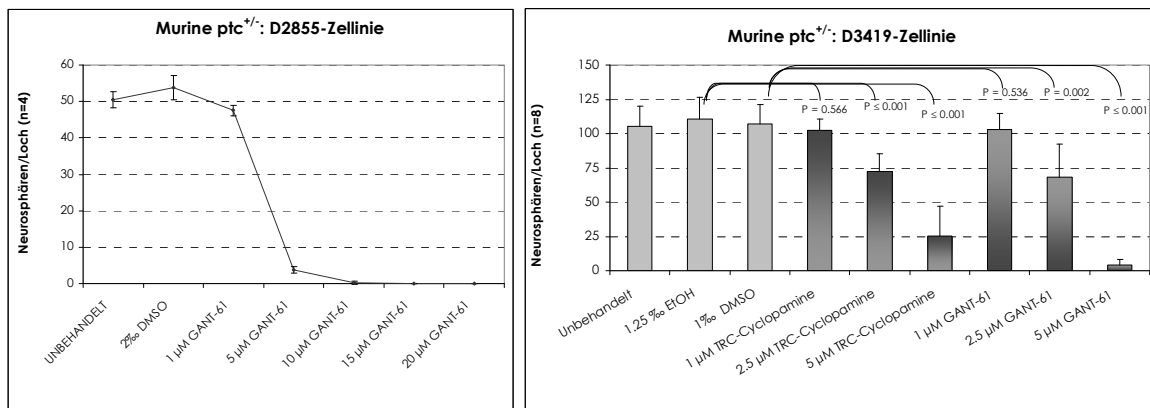


**Abbildung 26: Neurosphären-Bildung nach Inkubation mit Agonisten bzw. Antagonisten des Shh-Signalweges.** Repräsentative Bilder der charakteristischen Spären-Bildung der murinen Zellen (unbehandelt). 32x Vergrößerung. **Bilder rechts:** Morphologie der  $ptc^{+/-}$ -Maus-Zelllinien, die bei der Subkultivierung in Serum-freiem Stammzell-Medium mit den humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF und FGF propagiert wurden.

### 3.2.2.1 Shh-Inhibition durch GANT-61 und Cyclopamin

Weiterhin wurde die Blockierung des Sonic Hedgehog-Signalweges durch den Inhibitor GANT-61 bei unterschiedlichen Konzentrationen genauer untersucht. GANT-61 unterband die Neurosphärenbildung bei beiden Zelllinien im ähnlichen Konzentrationsbereich (siehe Abbildung 27).

Vergleichend fällt hier der inhibitorische Effekt beider Antagonisten, GANT-61 und Cyclopamin, für beide Zelllinien ähnlich aus, wie auf Abbildung 27 zu erkennen ist.



**Abbildung 27: Inhibition der Neurosphärenbildung mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen behandelte D2855- und D3419-Zellen.**

### 3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus den erläuterten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich die Neurosphären-Bildungskapazität in den einzelnen Medulloblastom-Zelllinien nach Signalwegs-Modulation deutlich unterschied. Darin spiegelt sich eine unterschiedliche Sensitivität der Neurosphären-Bildungsantworten in den einzelnen Medulloblastom-Zelllinien und eine Konzentrations-Abhängigkeit der Signalwegs-spezifischen Substanzen wider. So lässt sich eine Resistenz bei den Zelllinien D425 Med und MEB-Med-8S gegenüber der Sonic Hedgehog- und Notch-Signalwegs-Blockade feststellen. Bei Betrachtung der drei Signalwege scheint die Notch-Blockade effektiv die selbsterneuernde Kapazität zu blockieren (abgesehen von der Linie D425 Med). Überraschend waren die Stimulationen mit Antagonisten des Sonic Hedgehog-Signalweges im humanen Zellsystem, ebenso die teilweise blockierende Wirkung des Agonisten WNT-Ag. Jedoch ließ sich eine deutliche Inhibition mit dem Gli-1-Inhibitor GANT-61 im humanen und murinem Zellmodell nachweisen. Eine Inhibition mit dem Wnt-Antagonisten Dkk-1 konnte

## ERGEBNISSE

---

ebenfalls nachgewiesen werden; allerdings sprachen nur die DAOY-Zellen bei einer Dkk-1-Behandlung mit einer niedrigen Neurosphären-Kapazität an.

### 3.3 Immuncytochemische Färbungen zum Nachweis der Differenzierungsfähigkeit

Das Medulloblastom erscheint mikroskopisch meist undifferenziert bis beginnend differenziert. Der undifferenzierte Tumor weist runde bis polygonale Zellen auf mit vergrößerten Nuclei und wenig Cytoplasma. Die beginnend-differenzierten Medulloblastom-Zellen weisen eine neuronale und/oder astrogliale Differenzierung auf. Sie enthalten mehr Cytoplasma mit mehr Organellen (Inoue et al., 1994).

	D283Med Neurosphären	D283Med Differenzierte Neurosphären	DAOY Neurosphären	DAOY Differenzierte Neurosphären	D425Med Neurosphären	D425Med Differenzierte Neurosphären	1580Wü Neurosphären	1580Wü Differenzierte Neurosphären	Meb-Med 8S Neurosphären	Meb-Med 8S Differenzierte Neurosphären	D3484 Neurosphären	D3484 Differenzierte Neurosphären
GFAP	+	++	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Map2C	+	+	++	+	+	+	+	+	-	++	+++	++
MIB1	+++	+	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
Synaptophysin	+	+	+	+	++	+	+++	++	-	+	+++ (Cyt.)	++++
NFP	+	+	+	-	-	-	+/ (Cyt., Nucl.)	+/ (Cyt.)	-	-	-	-
NeuN	+/ (Cyt., Nucl.)	+	+/ (Cyt.)	+/ (Cyt.)	-	-	+/ (Cyt.)	+/ (Cyt.)	+++	+++	++ (Cyt.)	+++ (Cyt., Nucl.)
S-100beta	++	+	++	++	++	+	++	++	+	++	+	-
Sox2	-	++	++	++	+++	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nanog	+	+	-	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD15	++	+	+++	+++	-	+	+	+	n.d.	n.d.	++	++
ALDH1A1	-	-	+	+	n.d.	-	-	-	-	-	-	-
beta-Catenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	++	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	++	+

**Tabelle 9: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Neurosphären in Stammzellmedium und Neurosphären kultiviert in Differenzierungsmedium („differenzierte Neurosphären“).** Die Wertung bezog sich auf die Frequenz der positiven Zellen relativ zum gesamten Zellmaterial eines Objektträgers. Die Definition der Wertung war wie folgt (in Prozent der positiven Zellen): „-“: 0%; „+“: 1-10%; „++“: 10-50%; „+++“: 50-90%; „++++“: >90%. Cyt.: cytoplasmatisch; Nucl.: Nucleär. n.d.: nicht durchgeführt.

In diesen Experimenten sollte das Potential der Tumorzellen untersucht werden, auszudifferenzieren. Nach Kultivierung der Zellen in Serum-freiem Stammzellmedium wurden sie anschliessend in Serum-freiem Differenzierungs-Medium kultiviert wie unter Materialien und Methoden beschrieben, in dem die Zellen ausdifferenzieren sollten. Es

sollten zwei Zellproben resultieren: 1.) Neurosphären, 2.) Differenzierte Neurosphären. Die Zellkulturen wurden geerntet und in Paraffinblöcke eingeschlossen. Die Paraffinschnitte wurden immunocytochemisch für neuronale und astrogliale Antigene, sowie für Stammzellmarker gefärbt (siehe Absatz 11.2, Anhang).

Die Kern-Cytoplasma-Relation gibt erste Hinweise auf eine fortgeschrittene Differenzierung. Erscheint der Kern relativ groß, dann sind die Zellen meist mitotisch aktiv und relativ unreif bzw. undifferenziert, bei einer geringeren Kern-/Plasma-Relation wird auf eine Ausreifung geschlossen (Hillemanns *et al.*, 1968). D283 Med-Neurosphären wiesen, im Gegensatz zu den differenzierten Neurosphären, eine hohe Kern-Cytoplasma Relation auf. Der Proliferations-Marker MIB1 (Ki-67) nahm bei den im Differenzierungsmedium kultivierten und differenzierten Neurosphären ab, welches für differenziertere Zellen typisch ist, und die GFAP-Expression nahm zu. CD15, ein Vorläuferzell-Marker, wurde bei den differenzierten Neurosphären der D283 Med-Zellen weniger exprimiert. Gleichzeitig zeigten differenzierte Neurosphären der D283 Med einen Neugewinn an Sox2.

Die H&E-Färbung von DAOY zeigte bei beiden Zellkulturen keinen Unterschied. Der MIB1- und Map2C-Marker wurde bei den in Differenzierungs-Medium gewachsenen Neurosphären weniger exprimiert als bei den Neurosphären. Dies könnte für eine leichte Verschiebung in Richtung Ausdifferenzierung sprechen.

Bei der H&E-Färbung der D425 Med Linie fand sich in beiden Zellproben eine gleich hohe Kern zu Cytoplasma-Relation. Der MIB1-Marker wurde ebenfalls gleich stark in beiden Zellkulturen exprimiert. Eine Veränderung der Markerexpression vollzog sich bei den „differenzierten Neurosphären“ nur in einer Abnahme von Synaptophysin, S100 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin. Demnach ist bei dieser Zelllinie der Wechsel von einem unreiferen Status zu einem mehr ausdifferenzierteren nicht erkennbar.

Bei 1580Wü waren auf der Seite der „differenzierten Neurosphären“ die Marker für MIB1 und Synaptophysin weniger exprimiert als bei den Neurosphären. Allerdings war die Neurofilament-Expression bei beiden sichtbar.

Die H&E-Färbung für Meb-Med-8S zeigte bei den Neurosphären eine höhere Kern zu Cytoplasma-Relation als bei den differenzierten Neurosphären und ging mit der Abnahme von MIB1 bei den „differenzierten Neurosphären“ einher. Die zur Differenzierung angeregten Neurosphären zeigten bei Meb-Med-8S eine Zunahme der Map2C-Expression. Die Expression von NeuN, Synaptophysin und die Zunahme von S100 $\beta$  deutet die neurozytäre Richtung der Reifung an.

Die D3484-Zellen zeigte eine Differenzierungs-Verschiebung zu einem reiferen Marker-Repertoire. Bei den „differenzierten Neurosphären“ nahm Map2C ab, während Synaptophysin und NeuN zunahmen.

Die Befunde (siehe Tabelle 9) lassen den Schluss zu, dass unter den verwendeten Kulturbedingungen keine vollkommene Ausdifferenzierung der Tumorzellen erreicht werden konnte. Bei einigen der behandelten Zelllinien fand sich nur eine Verschiebung des Differenzierungs-Grades innerhalb der gleichen Differenzierungs-Richtung. Weiterhin waren die NeuN-Färbungen überwiegend cytoplasmatisch anstatt nucleär, sowie das S100 $\beta$ -Protein, welches nucleär und cytoplasmatisch nachweisbar war. Aussergewöhnlich war die bei der Linie D283 Med nachweisbare Expression des Sox2-Markers nur bei den „differenzierten Neurosphären“. Lediglich bei der Zelllinie D425 Med führte die Kultivierung unter differenzierenden Bedingungen nicht zu einer erkennbaren Veränderung der Markerexpression.

Aus diesem Anlass wurden an zwei Medulloblastom-Zelllinien (D425 Med und D3484) die Neurosphären unter veränderten Bedingungen kultiviert, um eine Differenzierung aufgrund von Adhäsion zu erreichen. Auf Poly-L-Lysin beschichtetem Boden wuchsen Neurosphären der D425 Med im Stammzell- und Differenzierungsmedium. Wie Tabelle 10a zeigt, ist hierbei ein Unterschied zu erkennen.

Die  $\beta$ -Catenin Expression zeigt sich verringert. Bei den mit Shh-behandelten „differenzierten Neurosphären“, wurde  $\beta$ -Catenin stark exprimiert, und die S100 $\beta$ -Expression nahm ebenfalls zu (siehe Tabelle 10a, letzte Spalte) im Vergleich zu den nicht mit Shh behandelten Neurosphären und den differenzierten Neurosphären. Ebenso liegt eine gleich starke (bei allen 4 Probenbedingungen) Sox2-Expression vor.

Die D3484-Zelllinie wurde gleich wie D425 Med behandelt. Auf unbeschichtetem Untergrund (siehe Tabelle 10b) scheint D3484 differenzierungsfähiger zu sein (siehe Synaptophysin, NeuN,  $\beta$ -Catenin). Dieses Verhalten findet sich ähnlich unter den Bedingungen mit dem auf dem Poly L-Lysin beschichteten Boden (Synaptophysin- und NeuN-Zunahme bei den differenzierten Sphären).

Die Behandlung mit dem rekombinanten Protein Sonic Hedgehog erfolgte, um eine mögliche Regulation des Differenzierungspotentials zu untersuchen (siehe Tabelle 10).

Wenn die Neurosphären und „differenzierte Neurosphären“ mit 2  $\mu$ g/ml rhShh behandelt wurden, war kein wesentlicher Unterschied zu verzeichnen. Lediglich die NeuN-Expression nahm bei den differenzierten, mit Shh-behandelten Neurosphären ab gegenüber der stärkeren NeuN-Expression bei der differenzierten Probe ohne Shh. Ebenfalls war der CD15-Marker weniger exprimiert, verglichen zu den Proben ohne rhShh.



# ERGEBNISSE

a)	D425Med Neurosphären	D425Med <b>Differenzierte</b> Neurosphären	D425Med Neurosph. + rh Shh	D425Med <b>Differenzierte</b> Neurosphären + rh Shh	b)	D3484 Neurosphären	D3484 <b>Differenzierte</b> Neurosphären	D3484 Neurosphären + rh Shh	D3484 <b>Differenzierte</b> Neurosphären + rh Shh
	GFAP	-	-	-		+	GFAP	-	+
Map2C	+	+	-	-	Map2C	+++	+++	+++	++
MIB1	++	++	++	++	MIB1	++	++	++	++
Synaptophysin	++	++	++	++	Synaptophysin	+	++	++	++
NFP	-	-	-	-	NFP	-	-	-	-
NeuN	-	-	-	+	NeuN	-	++	+	+
S-100beta	+	+	+	++	S-100beta	+	-	-	+
Sox2	+++	+++	+++	+++	Sox2	unspezifisch	+	+	+
CD15	-	+	+	+	CD15	+++	+++	++	++
beta-Catenin	-	-	+	++	beta-Catenin	++	++	++	++

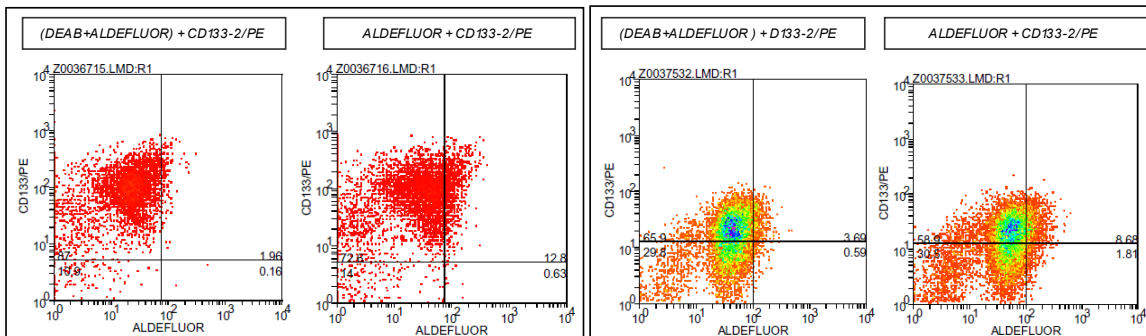
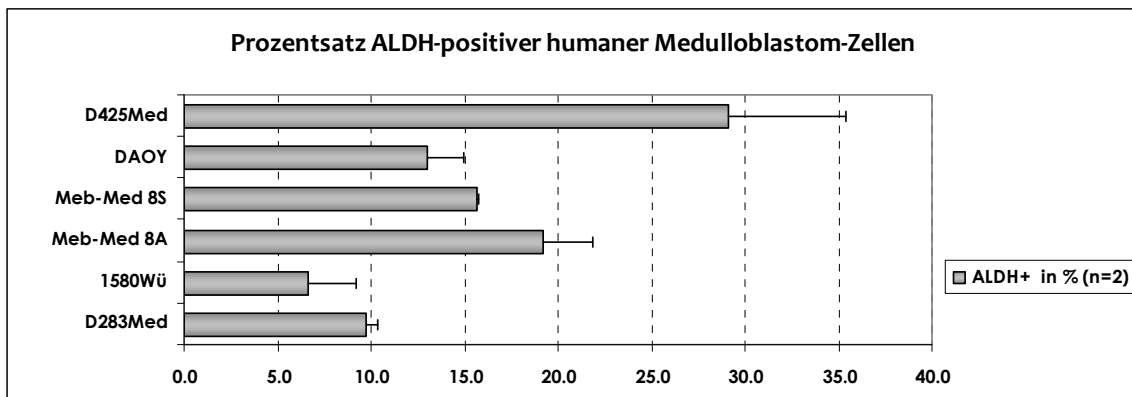
**Tabelle 10: Neurosphären der a) D425 Med und b) D3484-Linien auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten in Stammzell- und Differenzierungsmedium (differenzierte Neurosphären) kultiviert, +/- Shh. Cyt.: Cytoplasmatisch. Definition der Wertung: siehe Tabelle 9.**

### 3.4 Identifikation von Zellpopulationen in Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter

#### 3.4.1 Humane Zelllinien: Aldehyddehydrogenase-Aktivität-, CD133-Expression und Doppelmarkierung

Die Aldehyddehydrogenase-Aktivität als etablierter Stammzell-Marker sollte gemessen werden, um den Tumorstammzell-Pool weiter *in vitro* zu charakterisieren.

Mittels des Aldefluor-Assays wurde durchflusszytometrisch die ALDH-Aktivität der humanen Medulloblastom-Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurde CD133 gefärbt (Doppelmarkierung).

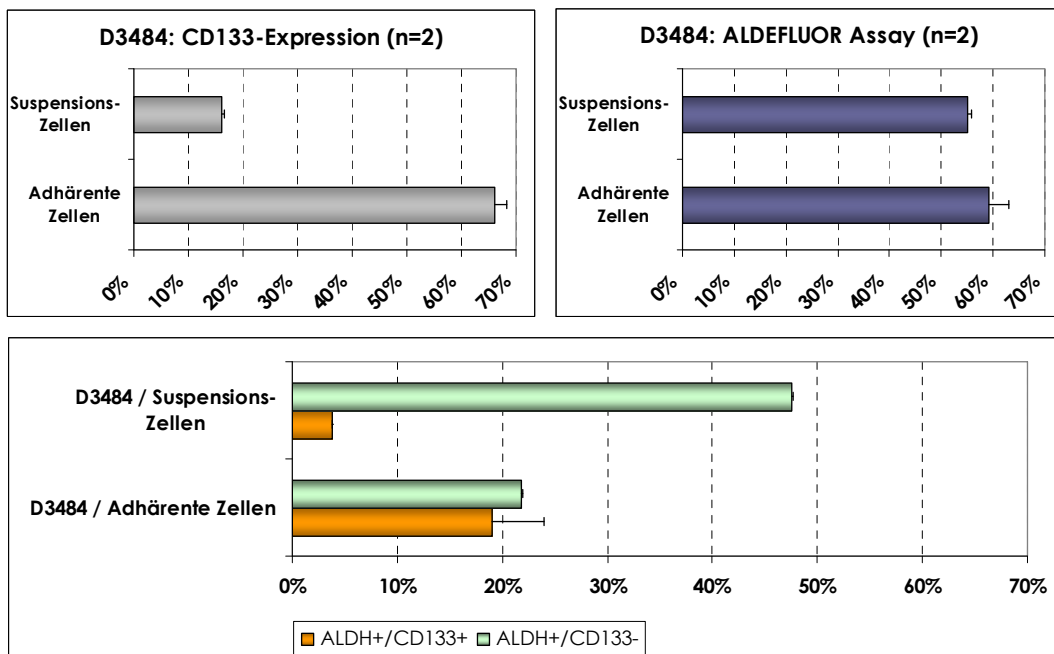


**Abbildung 28: ALDH-Expressionsprofil und Koexpression von CD133.** Oben: Das Diagramm zeigt eine Übersicht der ALDH-Positivität bei Medulloblastomzelllinien. Durchflusszytometrische Analysen der ALDEFLUOR(AF)-Färbungen; vergleiche Abbildung 33. Unten: Expression von CD133 und Aldefluor-Aktivität bei der D283 Med- und 1580Wü-Zelllinie. n=2 Messungen; von links nach rechts: jeweils DEAB-Spezifitäts-Kontrolle und ALDEFLUOR-Färbung.

Es ist ersichtlich, dass die untersuchten Zelllinien ALDH-positive Populationen aufwiesen (siehe Abbildung 28, oben). Aus den durchflusszytometrischen Analysen der Koexpression (siehe Abbildung 28, unten) der beiden Marker in D283 Med- und 1580Wü-

Zellen ist die ALDH<sup>+</sup>-Subpopulation überwiegend in der CD133-positiven und weniger in der CD133-negativen Unterpopulation aufzufinden.

Die Medulloblastom-Zelllinie D3484 zeigte eine hohe ALDH-positive Fraktion. Die AF<sup>+</sup>-Zellen betragen 50 bis 60%, sowohl der adhärenenten als auch der in Suspension befindlichen Zellen (siehe Abbildung 29, oben). Die Ergebnisse der Doppel-Markierung (siehe Abbildung 29, unten) mit dem ALDEFLUOR-Reagenz und dem CD133-Marker sind in der Verteilung der Subpopulationen unterschiedlich. Bei den Suspensions-Zellen findet sich die größte ALDH-Expression überwiegend in der CD133-negativen Subpopulation. Bei der adhärenenten/CD133-positiven Fraktion, sind die Unterpopulationen ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> etwa gleich verteilt. Dies führt zu dem Schluss, dass keine direkte Beziehung der CD133-Population zu der ALDH<sup>+</sup>-Population besteht.



**Abbildung 29: CD133- und ALDH-Expression bei der D3484-Zelllinie.** Oben: Einfach-Markierungen für CD133 und ALDH-Aktivität bei humanen D3484 Zellen (Suspension vs. adhärenente Zellen). Unten: Doppel-Markierungen mit dem ALDEFLUOR-Reagenz und dem CD133/2-PE Antikörper. Verteilung der Subpopulationen von ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>. Durchflusszytometrische Analysen: siehe Abbildung 34.

3.4.2 Murine Zelllinien: Aldehyddehydrogenase-Aktivitäts-, Prominin1-Expression und Doppelmarkierung

Die murinen *ptc*<sup>+/-</sup> Medulloblastomzellen besitzen unterschiedliche Expressions-Level für Prominin1 und verschieden große ALDH-positive Populationen unter den sechs gemessenen Zelllinien. Eine hohe ALDH+/Prom1+ Subpopulation zeigten nur die Linien SJMM4 und D3578 (siehe Abbildung 30).

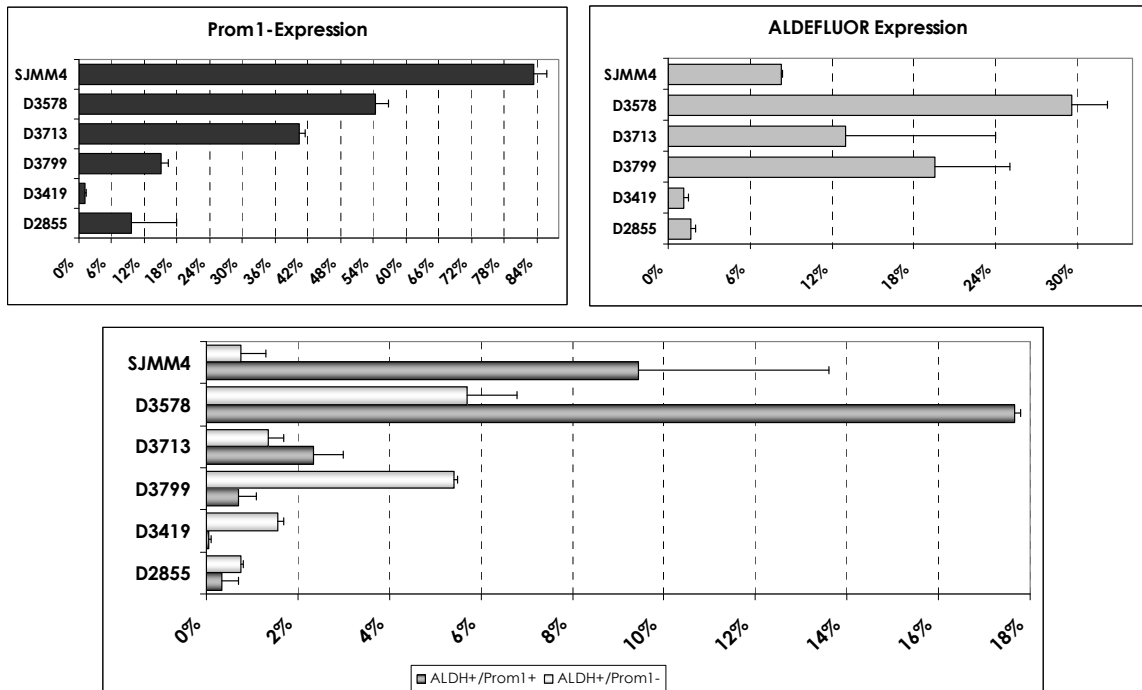
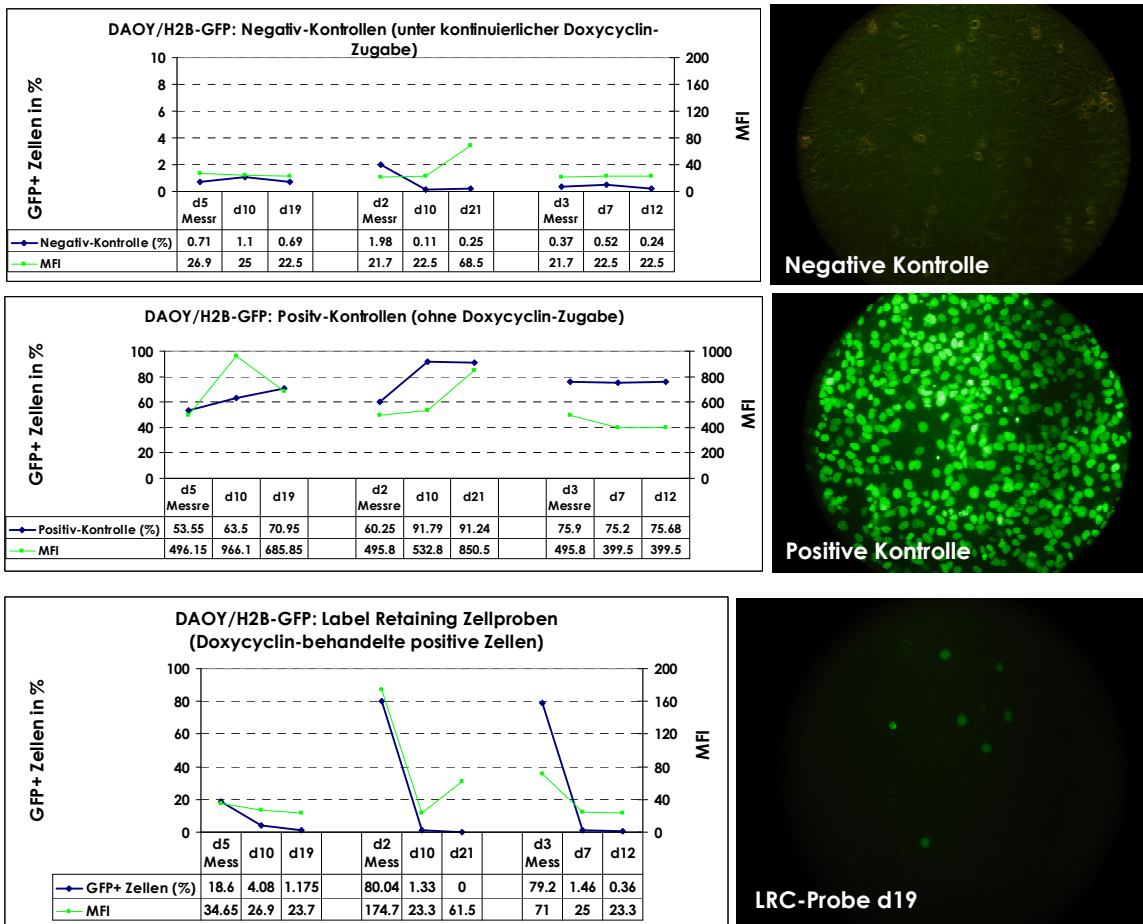


Abbildung 30: ALDH- und Prom1-Subpopulationen bei den Mäusen aus den durchflusszytometrischen Analysen (n=2). (Durchflusszytometrische Analysen: siehe Abbildung 35 und Abbildung 36).

### 3.5 Die DAOY-Medulloblastom-Zelllinie enthält keine Label Retaining-Zellen

Zur Charakterisierung von ruhenden bzw. langsam proliferierenden Zellen wurden DAOY-Zellen mit dem lentiviralen H2B-GFP Reporter-Konstrukt stabil transduziert (siehe Abbildung 8). Der Versuchsansatz sah vor, dass als Startzellen für die Messreihen die nicht-induzierten, grünen, GFP-exprimierenden Zellen dienen sollten, die bei jeder Passage mit Doxycyclin – welches das Tet-off-Konstrukt induziert und die GFP-Expression unterbindet - behandelt werden sollten. Eine Farb-Retention sollte in einer Subpopulation zu erkennen sein, die aus langsam-teilenden Zellen, die die GFP-Expression beibehalten, besteht, während schnell-proliferierende Zellen sie verlieren sollte. Als Positiv-Kontrolle dienten die nicht-induzierten, grünen, GFP-positiven Zellen und als Negativ-Kontrolle die durch Doxycyclin-induzierten, GFP-negativen Zellen.



**Abbildung 31: Untersuchung von Label Retaining-Zellen an der DAOY-Zelllinie mittels durchflusszytometrischer Analyse aus drei unabhängigen Messreihen.** d: Tage nach dem Aussäen bzw. Passagieren der Zellen. Negative bzw. Positive Kontrolle (%): Anteil an GFP+ in %. MFI: Mean Fluorescence Intensity, mittlere Fluoreszenz-Intensität. Bilder: Fluoreszenz-Mikroskopie.

An dieser Untersuchung sollte das Austesten der Klonogenitätsfähigkeit aus FACS-sortierten GFP(+) und GFP(-) -Zellen anknüpfen.

Bei den DAOY-Zellen fanden sich ohne Doxycyclin-Behandlung anfangs etwa 80% GFP-exprimierende Zellen. Die Ergebnisse der Kultivierung von GFP<sup>+</sup>-Zellen (Test- bzw. Label Retaining Zell-Probe) mit 10 ng/ml Doxycyclin im Medium werden in der Abbildung 31 veranschaulicht.

Nach 7 und 10 Tagen waren nur noch wenige vereinzelte GFP<sup>+</sup> -Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse und nach mikroskopischer Kontrolle nachweisbar. Somit wurde angenommen, dass Label-Retaining Zellen in dieser Zelllinie nicht in signifikanter Zahl nachgewiesen werden können, die länger als 7 Tage grün blieben und als langsam-proliferierende Zellen zu bezeichnen wären. Die geplante, weitere Analyse dieser Zellen, mittels FACS-Sortierung der GFP<sup>+</sup>-Zellen einen Neurosphären-Assay durchzuführen, scheiterte daran, dass nach der Sortierung sich eine Wachstums-Inhibition einstellte.

### 3.6 Beeinflussung der Neurosphären-Bildung von Medulloblastomzellen durch Strahlentherapie

Zellen wurden bis zum Erreichen einer mittleren Zelldichte kultiviert. Jeweils zwei Kulturflaschen wurden in einem Bestrahlungsgerät mit 2 Gy und 5 Gy bestrahlt. Die Klonogenizitätsfähigkeit der bestrahlten Zellen wurde in Stammzellmedium getestet.

Die bestrahlten D425 Med-Zellen zeigten eindeutig eine höhere Radioresistenz im Vergleich zu DAOY-Zellen (siehe Abbildung 32). Auch eine höhere Resistenz gegenüber der D283 Med (nicht gezeigt) lag vor, die bereits nach 2 Gy Bestrahlungsdosis nicht mehr fähig waren, Neurosphären zu bilden. Im Umkehrschluss könnte das bedeuten, dass die D425-Med-Zellen eine resistenterere Tumorstammzell-ähnliche Population enthalten als die anderen Zelllinien.

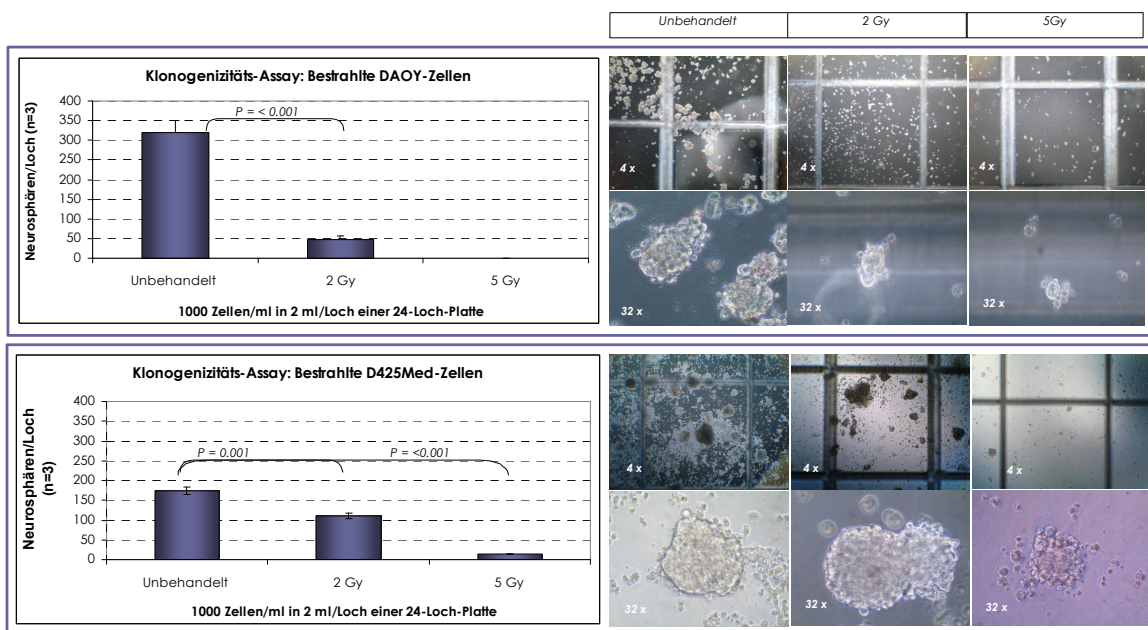


Abbildung 32: Klonogenizität (Neurosphärenbildung) nach Bestrahlung: DAOY (obere Reihe) und D425 Med Zellen (untere Reihe). t-test.

## 4 DISKUSSION

Das Medulloblastom ist ein Tumor des Kleinhirns und tritt überwiegend im Kindesalter auf. Trotz multimodaler Therapie kommt es in ungefähr der Hälfte der Patienten zu Rückfällen mit ungünstigem Verlauf. Histologisch handelt es sich um einen wenig ausdifferenzierten Tumor. Medulloblastome ähneln cytologisch unreifen neuronalen Progenitorzellen. Das Medulloblastom besteht aus distinkten Varianten mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen und genetischen Eigenschaften (Pietsch *et al.*, 2004).

Eine pathologische Aktivierung von Entwicklungskontrollsignalwegen in Subgruppen des Medulloblastoms, so des Hedgehog-, des Wnt (wingless)- und Notch-Signalweges konnte gezeigt werden, die im Zusammenhang mit der Identifizierung von Stammzell-ähnlichen Medulloblastomzellen stehen (Rodini *et al.*, 2010). Teilweise werden diese Aktivierungen durch somatische Genmutationen beteiligter Komponenten der Signalwege bewirkt. Keimbahnmutationen im APC-Gen, welches einen negativen Regulator des Wnt-Signalweges kodiert, oder im *PTCH1*-Gen, welches einen Suppressor im Hedgehog-Signalweg kodiert, führen in den betroffenen Patienten zu einer drastisch erhöhten Inzidenz von Medulloblastomen im Rahmen von Tumorprädispositionssyndromen (Turcot- bzw. Gorlin-Syndrom); dies stellt einen weiteren Hinweis für die Bedeutung dieser Signalwege für die Pathogenese des Medulloblastoms dar (Gilbertson *et al.*, 2004; Ellison, 2002). Ähnlich wie in hämatologischen Neoplasien sind auch in Medulloblastomen in den letzten Jahren Tumorzellen mit Stammzellcharakter identifiziert worden, die auf der Zelloberfläche CD133 (human) bzw. Prominin (murin), ein 5-Transmembranprotein noch unklarer Funktion, tragen. Uchida *et al.* gelang es 2000, aus humanem fötalen Gehirn mittels FACS-Sortierung CD133-positive Zellen anzureichern, die teilweise *in vitro* Neurosphären ausbilden konnten. Im Jahr 2005 konnten Lee *et al.* neurale Stammzellen aus dem murinen Kleinhirn basierend auf dem Prominin-1 Marker isolieren, die Multipotenzfähigkeit zeigten (Lee *et al.*, 2005). Andere Gruppen konnten ebenfalls mit ähnlicher Methodik aus Gehirntumoren (Medulloblastomen und hochgradigen Gliomen) CD133-positive, *in vitro* Neurosphären-bildende, und im Xenotransplantat Tumor-initierende Zellen isolieren (Singh *et al.*, 2003; Hemmati *et al.*, 2003). Hohe PROM1 mRNA Spiegel wurden mit einer schlechten Prognose in kindlichen Medulloblastomen bzw. einer höheren Wahrscheinlichkeit zu metastasieren assoziiert (Raso *et al.*, 2011). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine CD133(+) Tumorstammzellfraktion für die Tumorbiologie des Medulloblastoms von wichtiger Bedeutung sein könnte.

Der CSC (Cancer Stem Cells)-Hypothese zufolge entsteht ein Tumor hierarchisch und nur aus einer kleinen Anzahl von transformierten Zellen mit besonderen Charakteristika,



so der Expression von Stammzellmarkern wie CD133, und mit Selbsterneuerungspotential assoziiert. Diese werden wie normale neurale Stammzellen durch die Aktivität von Entwicklungskontroll-Signalwegen kontrolliert (Joo *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2004; Hemmati, 2003).

Charakteristika wie die Quiescence werden den Stammzellen zugeschrieben, bei der sie in Ruhe verharren und nicht im Zellzyklus sind, um das Stammzell-Kompartiment vor Schäden zu bewahren. Das Gegenteil der Quiescence ist, wenn ein Teil des Stammzell-Kompartiments in den Zellzyklus eintritt, um auszudifferenzieren und die Proliferation angeregt wird, damit die Stammzellen später ausdifferenzieren bzw. ihre volle Funktion erlangen können. Anstatt der Ausreifung kann die Stammzelle auch den Weg der Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotentials einschlagen, um als Reservoir von Stammzellen zu dienen. All dies wird von Regulator-Molekülen des Zellzyklus strikt geregelt (Li, 2011). Eine Störung der Zellzyklus-Maschinerie trägt zur Tumorprogression bei (Pogoriler *et al.*, 2006; Wechsler-Reya & Scott, 2001). Deshalb gibt es unterschiedliche methodische Herangehensweisen zur Isolierung und Charakterisierung von Stammzellen, u.a. die Charakterisierung von nicht- oder langsam-proliferierenden Zellen und Charakterisierung von Zellen mit Expression des CD133-Tumorstammzellmarkers.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Identifizierung und Anreicherung von CD133<sup>+</sup> - Zellen und deren Charakterisierung, um Einblicke in die molekulare Regulation von Medulloblastomstammzellen zu erhalten. Bei der Regulation von CD133-positiven Tumorstammzell-ähnlichen Populationen sollen Entwicklungskontrollsignalwege involviert sein. Daher war es nach Erarbeitung des CD133-Profiles der Medulloblastomzellen von Bedeutung, wesentliche Kontrollsignalwege (Hedgehog, Notch, Wnt), die im Medulloblastom pathogenetisch relevant sind, auf ihrer Auswirkung zu testen. Darüber hinaus sollten Tumorstammzell-ähnliche Zellen mit alternativen Methoden charakterisiert werden. So war es ein Ziel, die Existenz einer ruhenden oder langsam-proliferierenden Stamm- bzw. Tumorstammzelle in der Medulloblastom-Kultur zu untersuchen. Neben einem tieferen Verständnis der zellulären Hierarchie dieser Tumoren ist das Fernziel, neuartige Therapieansätze zu finden, die auch den Stammzellpool der Medulloblastome treffen.

## 4.1 Regulation von Medulloblastomzellen mit Stammzell-Charakter durch Entwicklungskontrollsignalwege

Die Selbsterneuerungs-Kapazität wurde an etablierten Medulloblastom-Zelllinien untersucht. Diese Eigenschaft wurde im Neurosphären-Assay unter definierten Kulturbedingungen in Serum-freier Kultur unter Zusatz von Wachstumsfaktoren geprüft, nämlich ob aus vereinzelt Zellen Neurosphären heranwachsen (klonale Analyse)(Chaichana *et al.*, 2006; Ahmed, 2009).

Die Propagierung der Neurosphären-Assays über mehrere Generationen (Replating Assays) zeigt, ob die Fähigkeit, Neurosphären auszubilden, limitiert ist oder nicht. Demnach geben diese *in vitro* Assays Aufschluss über das Selbsterneuerungspotential als ein Tumorstammzell-Charakteristikum.

Die Zelllinien unterschieden sich deutlich. D283 Med, 1580Wü, MHH-Med1 und MEB-Med-8S zeigten ein limitiertes, während DAOY, D425 Med, D341 Med und D3484 unbegrenztes Neurosphären-Wachstum in Replating Assays aufwiesen. Basierend auf den Ergebnissen der Repopulations-Assays kann angenommen werden, dass die untersuchten Zelllinien unter den getesteten Kulturbedingungen Vorläuferzellen mit geringerem und höherem Stammzell-Potential enthalten.

### 4.1.1 Pharmakologische Modulation des Selbsterneuerungspotentials

An der Pathogenese des Medulloblastoms sind aktivierte Signalwege beteiligt, die Mutationen in Signalwegskomponenten enthalten können und zur unkontrollierten Proliferation führen (Hatten & Russel, 2011). Diese molekularen Veränderungen sollen zu transformierten (Stamm-)Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften, den CSC's, führen. Dieselben Signalwege regulieren die physiologische, neurale Stammzell-Proliferation. Die pharmakologische Applikation spezifischer Liganden und Inhibitoren für die drei Entwicklungskontrollsignalwege sollte die Signalwegs-Abhängigkeit der Neurosphärenbildung beleuchten, um daraus Ansatzpunkte für verbesserte therapeutische Ansätze zu erkennen (Rodini *et al.*, 2010).

Die Modulation der Signalwege in humanen und murinen *in vitro*-Systemen erbrachte, dass die Bedeutung der Aktivität der Hedgehog-, Notch-, und Wnt-Signalwege für die Selbsterneuerungs-Kapazität in den Linien variabel war. Dieses Ergebnis könnte auf die

unterschiedlichen Tumor-Subtypen oder eine unterschiedliche Plastizität der Stammzell-ähnlichen Medulloblastomzellen zurück zu führen sein. Die Medulloblastom-Zelllinien besitzen unterschiedliche Entwicklungsursprünge und repräsentieren unterschiedliche Signalwegs-abhängige Subtypen, mit denen die Heterogenität erklärt wird (Bühren *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2010). Aktuelle Arbeiten unterstützen eine molekulare Subgruppierung in vier Hauptgruppen des Medulloblastoms (WNT, SHH, Gruppe 3 und 4) (Taylor *et al.*, 2012).

Die Sonic Hedgehog-Signalgebung wurde mit rekombinantem humanem Shh- und SAG-Protein agonistisch stimuliert. Insgesamt konnte nur eine geringe Modulation der Klonogenizität mittels des rekombinanten Proteins Shh und des SAG-Moleküls als Agonisten festgestellt werden. Das Sonic Hedgehog-Protein stellt den natürlichen Liganden des Patched-Rezeptors dar und führt zur Aktivierung des Signalweges, indem Smoothened von Patched freigesetzt wird (Meloni *et al.*, 2006). Nur eine Zelllinie (D283 Med) zeigte eine höhere Neurosphärenbildung gegenüber der Kontrolle. Die Aktivität des nachgeschalteten Smoothened-Proteins wurde mit dem kleinen, synthetischen Molekül, dem Shh-Agonist SAG, moduliert, die ebenfalls in Abwesenheit von Patched erfolgen kann (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002). Die Klonogenizität war hier nur bei der Zelllinie MEB-Med-8S höher gegenüber den nicht-behandelten Kontroll-Neurosphären. Bei den murinen  $ptc^{+/-}$ -Medulloblastomen wirkte SAG sogar inhibierend. Dieser Effekt könnte durch die Shh-Signalmodulation durch FGF-Signaltransduktion begründet sein, die in Körnerzellen beschrieben wurde (Wechsler-Reya & Scott, 1999). Ein weiterer Grund könnte die Herunterregulierung der Signaltransduktion des Smoothened-Moleküls bei kultivierten murinen Medulloblastomzellen (Sasai *et al.*, 2006) sein.

Zur Blockade der Sonic Hedgehog-Signaltransduktion wurden die Inhibitoren Cyclopamin, KAAD-Cyclopamin, SANT-1 und GANT-61 eingesetzt. Diese Antagonisten blockierten in den humanen Zellen zum Teil die Neurosphären-Bildung. Bei den hier getesteten  $ptc^{+/-}$ -abgeleiteten Medulloblastomzellen wirkte sich die Cyclopamin-Inhibition effektiver auf die Kolonie-Bildung als bei den humanen Medulloblastom-Neurosphären. Somit scheinen  $ptc^{+/-}$ -Medulloblastomlinien Populationen zu enthalten, die von der Shh-Signalgebung abhängen könnten. Bei den humanen Zellen dagegen konnte das Wachstum in dieser Arbeit im ähnlichen Konzentrationsbereich gehemmt werden, wie Romer *et al.* dies 2004 beschrieben. Diese Arbeit (Romer *et al.*, 2004) suggeriert weiter, dass eine geringere Konzentration für die Signalswegsaktivierung, jedoch eine hohe Cyclopamin-Konzentration für die Wachstumshemmung nötig sei. An murinen Körnerzellen konnten sie mittels eines Gli-Luciferase Reporters zeigen, dass der Shh-Signalweg bereits bei 0,5  $\mu$ M Cyclopamin inhibiert wurde, während das Wachstum bei 10–30  $\mu$ M inhibiert wurde. In der gleichen Arbeit wird behauptet, dass der Shh-Signalweg bei kultivierten Medulloblastomzellen zwischen Smo und Gli-1 in der

Signalwegskette supprimiert vorliegen muss. Deshalb schliessen Romer *et al.* (2004), dass eine Smo-Aktivität für die Proliferation von Medulloblastomzellen in Kultur nicht relevant sei. Eine Smo-Aktivität könnte ebenfalls für die Neurosphären-Bildung keine Rolle spielen. Darüber hinaus aber könnten bei der Shh-Signalumgebung, und zwar zwischen Smo und Gli-1, weitere Faktoren zwischengeschaltet sein, die ein Tumorstammzell-Verhalten aktivieren könnten. Die Vermehrung von Neurosphären durch Antagonisierung des Shh-Signalweges bei der humanen Zelllinie D425 Med (siehe Abbildung 24) in einem bestimmten Konzentrationsbereich war jedoch überraschend. Zhang *et al.* (2009) haben ebenfalls einen stimulatorischen Effekt bei der Behandlung von Brustkrebs-Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Cyclopamin festgestellt, der zur Hochregulation von Zielgenen des Shh-Signalweges führte. Ebenfalls wird über eine Cholesterin-Akkumulation berichtet, die bei weniger als 10  $\mu\text{M}$  Cyclopamin nachgewiesen wurde. In koloniebildenden Assays hingegen, führen die Autoren weiter auf, reduzierten sich die klonogenen Sphären erst ab 20  $\mu\text{M}$  Cyclopamin. Dagegen wirkte die Ko-Inkubation von 10 ng/ml Shh-N (aminoterminales Shh) und 10  $\mu\text{M}$  Cyclopamin antagonistisch auf das Netzwerk der Hedgehog-Genexpression (Zhang *et al.*, 2009). Eine andere Arbeit wiederum berichtet, dass CD133-niedrig exprimierende Zelllinien, wie DAOY, sensitiver gegenüber einer Cyclopamin-Behandlung (16  $\mu\text{M}$ ) hinsichtlich der Neurosphärenbildung sind als hoch-exprimierende Zelllinien wie die D283 Med (Enguita-Germán *et al.*, 2010). Bislang wird vermutet, dass Tumore als Folge von onkogenen Mutationen des Signalweges resistent gegenüber einer Cyclopamin-Behandlung werden könnten (Chen *et al.*, 2002). Zusätzlich könne Cyclopamin nur bei Shh-assoziierten Tumoren, die durch einen Verlust der ptc-Funktion bedingt sind, wirken. Die Cyclopamin-Inhibition würde aufgehoben werden, wenn Mutationen auf Höhe des Smo-Proteins oder Downstream-Komponenten stattfinden (Taipale *et al.*, 2000). Weiterhin könnte Cyclopamin eine zu niedrige Affinität zum Smo-Molekül aufweisen und daher möglicherweise nicht effektiv sein (Romer *et al.*, 2004). Im Gegensatz zum Smo-Antagonist Cyclopamin, blockiert GANT-61 downstream des Smo- und SuFu-Proteins das Gli-Molekül des Shh-Signalapparates. Gli-1 steuert nach nucleärer Translokation die transkriptionelle Aktivität (Lauth *et al.*, 2007). Behandlung der Zellen mit GANT-61 führte hier bei der D425-Med-Zelllinie und bei den murinen Medulloblastom-Zellen zu einer Inhibition der Neurosphärenbildung. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei GANT-61 um einen effektiven Antagonisten des Shh-Signalweges handelt.

Die mit  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren vermittelte Blockierung des Notch-Signalweges stellt eine weitere therapeutische Option bei Gehirntumoren und dem Medulloblastom dar. Glioblastomzellen zum Beispiel zeigten zum Teil Resistenz bei einer länger anhaltenden Notch-Blockade als Monotherapie (Schreck *et al.*, 2010), jedoch war diese Blockade fähig, die Tumorneurosphären-Bildung zu vermindern (Schreck *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Fan *et al.* 2006 zeigte, dass bei einer Notch-Blockade mittels  $\gamma$ -Sekretase-

Inhibitoren die Medulloblastom-Bildung im Xenotransplantat-Modell inhibiert wurde. Die Blockierung des Notch-Signalweges führte hier ebenfalls zur verminderten Kapazität, Neurosphären zu bilden. Bei allen hier mit den  $\gamma$ -Sekretase Antagonisten behandelten Zelllinien zeigte sich tendenziell eine Reduktion der Neurosphären-Bildung. Am stärksten wirkten die Antagonisten LY-411575 und L-684,458.

Der kanonische Wnt-Signalweg hat wesentliche Bedeutung in der Tumorstammzell-Biologie (Reya & Clevers, 2005; Guessous *et al.*, 2008). Die Stimulierung oder Blockierung dieses Signalweges und die kostimulatorischen sowie kompetitiven Ansätze führten zum Teil zu verändertem Neurosphärenbildungspotential. Aus den Ko-Stimulierungen folgte z.B. eine vermehrte Neurosphärenbildung bei den Zelllinien D425 Med und MEB-Med-8S nach einer unterbindenden (Dkk-1-Antagonist), sowie auch nach einer stimulierenden (GSK-3 $\beta$ -Inhibitor) Applikation, jeweils zusammen mit dem Liganden Wnt-3a, bei den Zelllinien D425 Med und DAOY. Diese Antwort könnte eine Resistenz bedeuten, bei der eine WNT-Signalwegs-Aktivierung beteiligt sein könnte. Die D425 Med-Zelllinie zeigte im Allgemeinen unter allen blockierenden Versuchen die deutlichste Resistenz. Dies konnte auch im Bestrahlungs-Versuch vergleichend zu den anderen Linien festgestellt werden. Eine WNT-Signalwegs-Inhibierung durch Dkk-1 führte nur in der DAOY-Zelllinie zur Unterdrückung der klonalen Tumorsphärenbildung. Im Medulloblastom soll endogenes Dkk-1 epigenetisch herabreguliert sein; nach Reexpression soll Dkk-1 aber in der Lage sein, die Neurosphärenbildung zu reduzieren (Vibhakar *et al.*, 2007). Der GSK-3 $\beta$ -Inhibitor zeigte unter allen behandelten Zelllinien nur bei der MEB-Med-8S-Zelllinie einen signifikanten Einfluß auf die Neurosphärenbildung. Für die GSK-3 $\beta$ -Inhibition werden unterschiedliche Aktivitäten beschrieben. Patel & Woodgett berichteten im Jahr 2008, von einer Erhöhung als auch von einer Reduktion des klonogenen Potentials durch GSK-3 $\beta$ -Inhibierung. Eine reduzierte GSK-3 $\beta$ -Aktivität bewirkte eine Dosis-abhängige Erhöhung der Klonogenizität bei embryonalen Stammzellen, aber eine reduzierte Klonogenizität bei Glioblastomzellen (Wray *et al.*, 2012; Korur *et al.*, 2009). Überraschend war die Stimulierung durch den Wnt-Agonisten WNT-Ag, der unerwartet zu einer reduzierten Klonogenizität führte, was jedoch nicht in allen Fällen signifikant war.

Die Beteiligung der drei hier untersuchten Entwicklungskontrollsignalwege auf die Neurosphärenbildungsfähigkeit lassen eine unterschiedliche Konzentrations-abhängige Sensitivität und eine Zelltyp-spezifische Resistenz nach einer pharmakologischen Modulation erkennen. Die hier untersuchten Medulloblastom-Zelllinien repräsentieren unterschiedliche Subtypen des Medulloblastoms, und weisen offensichtlich eine erhebliche Variabilität ihrer Regulation auf.

## 4.2 Differenzierungsfähigkeit von Medulloblastom-Neurosphären

Die Histogenese des Medulloblastoms ist nicht abschliessend geklärt. Klar ist, dass es sich um einen Tumor mit divergierender Differenzierungskapazität handelt, welcher unterschiedliche Ursprünge besitzen soll in Hinblick auf die unterschiedlichen histologischen Varianten (Ellison, 2002). Selbsterneuernde Tumorstammzellen stellen nicht-terminal differenzierte Zellen mit Proliferationsvermögen dar, die das Tumorwachstum begünstigen. Deren terminale Differenzierung zu induzieren, könnte einen Therapie-Ansatz darstellen (Sell, 2004). In dieser Arbeit wurde deshalb die Differenzierungsfähigkeit der Neurosphären unter Serum-freien, differenzierenden Kulturbedingungen getestet. Neurosphären und differenzierte Neurosphären wurden in Paraffinblöcke eingeschlossen, um Immunfärbungen mit Differenzierungsmarkern durchzuführen.

Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse (siehe Tabelle 9) aus der Untersuchung zur Neurosphären-Differenzierung eine Verschiebung innerhalb ihres Reifegrades, welche einen intermediären Vorläuferzell-Status mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad anzeigen könnte. Weiter suggeriert dieses Ergebnis, dass das Medulloblastom nur ein niedriges Differenzierungspotential besitzt. So zeigten die „D283 Med Neurosphären“ einen eher unreiferen astrozytären (S100 $\beta$ ) Vorläufer (CD15-Expression)-Zelltyp mit höherer Proliferation; im Vergleich dazu die „D283 Med Differenzierte Neurosphären“ mit einem eher astroglialen (GFAP-Expression) Vorläufer-Differenzierungszelltyp und abnehmender CD15-Expression, die mit einem erhöhten Differenzierungsgrad einhergehen könnte. Die „DAOY Neurosphären“ zeigen einen neuro-astrozytären (Map2C- und S100 $\beta$ -Expression) Phänotypen vergleichsweise zu der eher astrozytären Vorläuferzelltyp-geprägten Probe der „DAOY Differenzierte Neurosphären“. Map2C ist ein in Neuronen und Dendriten exprimierter neuronaler Marker. Die MAP2- (Microtubuli-Assoziiertes Protein 2) Proteine tragen weiter zusammen mit den Mikrotubuli an dem Initiierungsprozess von Neuriten bei (LeClerc *et al.*, 1993; Dehmelt *et al.* 2003). S100 $\beta$  ist ein Marker für astrozytäre Zellen (Raponi *et al.*, 2007). Weiterhin ist für diese Zelllinie eine Expression des Stammzellmarkers ALDH1A1 bei beiden Proben zu finden. Dies könnte auf eine Differenzierungsresistenz hindeuten. In der Literatur berichten Li und seine Kollegen im Jahr 2004 bei der D283 Med-Zelllinie das Erreichen eines weiter differenzierten Phänotyps mittels Differenzierungs-induzierenden Agenzien, während bei der DAOY-Zelllinie eine Differenzierungsresistenz festgestellt wurde. Die Reaktivität des glialen Markers GFAP und des neuronalen Synaptophysin-Markers als Differenzierungsmarker soll für die DAOY-Zellen nach Behandlung marginal gewesen

sein (Li *et al.*, 2004). Synaptophysin ist in präsynaptischen Vesikeln und Neuronen zu finden. Außerdem gilt Synaptophysin als zuverlässiger Marker für neuronale Tumore sowie dem Medulloblastom (Schwechheimer *et al.*, 1987). Die Untersuchung über die Differenzierungsfähigkeit bei den „D425 Med Neurosphären“ legt eine neuro-astrozytäre Differenzierung nahe, da mehr Synaptophysin und S-100 $\beta$  als bei der Probe „D425 Med Differenzierte Neurosphären“ exprimiert wurde und letztere einen eher unreiferen Vorläuferzellstatus mit geringerer CD15-Expression zeigte. Für die „1580Wü Neurosphären“ ist eine neuro-astrozytäre Differenzierungs-Richtung (Map2C, Synaptophysin, S100 $\beta$ ) erkennbar, die sich möglicherweise in den „1580Wü Differenzierten Neurosphären“ durch den leichten Rückgang des Proliferationsmarkers MIB-1 verstärkt. Auch hier könnte es sich bei den Linien D425 Med und 1580Wü um eine Differenzierungsresistenz handeln. Die Ausgangs-Differenzierung bei den „MEB-Med-8S Neurosphären“ lässt eine neuronale Ausrichtung erkennen, die eine deutliche Differenzierungsverschiebung durch die Map2C-, Synaptophysin- und S100 $\beta$ -Expressionen in einen stärkeren neuronalen Phänotypen in den „MEB-Med-8S Differenzierte Neurosphären“ durchmacht. Die Linie D3484 zeigt sich in beiden Proben, den „D3484 Neurosphären“ und „D3484 Differenzierten Neurosphären“, schwach neuro-astrozytär bis neuronal differenziert. Eine Abschwächung der Map2C-Expression, die leichte Verstärkung der Synaptophysin- und die deutliche NeuN-Expression in der Probe unter differenzierenden Bedingungen spricht für einen höheren Differenzierungs-Grad und zwar zu einem mehr neuronalen Phänotypen. Bei allen hier untersuchten Zelllinien war der NeuN-Marker überwiegend schwach cytoplasmatisch und weniger im Kern exprimiert – außer bei der MEB-Med-8S Zelllinie. NeuN ist ein Marker, der die terminale Differenzierung von Neuronen im Kern anzeigt (Mullen *et al.*, 1992). Möglicherweise könnte eine cytoplasmatische Expression eine unvollständige Ausreifung bzw. einen unreifen Status bedeuten (Sarnat *et al.* 1998).

Des Weiteren konnte in den Proben unter differenzierenden Bedingungen der Stammzellmarker Sox2 und der Vorläuferzellmarker CD15 nachgewiesen werden. Der Artikel von Pevny & Nicolis berichtet über Sox2, dass es die Eigenschaften von Gehirnstammzellen und den unreifen Charakter bei Vorläuferzellen aufrechterhält. Seine Funktion soll Dosis- und Kontext-abhängig sein. Deshalb wäre eine Sox2-Expression auch bei Differenzierungs-Prozessen von entscheidender Bedeutung. So führte eine teilweise verminderte Sox2-Expression zu Differenzierungs-Defekten bei normalen Stammzellen des Telencephalons, die überraschenderweise normale Selbsterneuerungs-Aktivität behielten. Ebenso kann es durch Herrunterregulieren der entsprechenden Gene eine Ausdifferenzierung verhindern (Pevny & Nicolis, 2010). Wahrscheinlich handelt es sich hier ebenfalls um eine Dosis-abhängige Sox2-Expression, die eine Differenzierung vermitteln könnte, welche durch die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht weiter aufgeschlüsselt werden kann. CD15 (Syn.: SSEA-1) soll mit

Stammzell-Eigenschaften assoziiert sein, da es auf embryonalen pluripotenten und adulten neuronalen Stammzellen exprimiert wird (Capela & Temple, 2002). CD15<sup>+</sup>-Zellen zeigten Selbsterneuerungs-Kapazität, Multipotenz-Fähigkeit und waren in der Lage, einen Tumor zu initiieren (Son *et al.*, 2009; Read *et al.*, 2009). CD15 konnte auf den Linien immunhistochemisch nachgewiesen werden. Allerdings wurden einzelne CD15-positive Zellen in der Linie D425 Med erst unter Differenzierungs-Bedingungen nachgewiesen. Die Bedeutung dieses Befundes bleibt unklar.

Unter adhäsiven Differenzierungs-Bedingungen (siehe Tabelle 10) unterschied sich das induzierte Differenzierungspotential-Muster unwesentlich im Vergleich zu demjenigen ohne Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Substrat (siehe Tabelle 9). Eine weitere Beobachtung unter denselben Bedingungen bei Shh-Zugabe führte zu den „D425 Med Differenzierten Neurosphären+Shh“ zu einer verstärkten astrozytären Mehr-expression (S-100 $\beta$ ) und zu einer Shh-vermittelten  $\beta$ -Catenin-Expression. Demnach scheint eine  $\beta$ -Catenin-Signalgebung im Zuge eines Differenzierungsprozesses von dem Shh-Signalweg verstärkt bzw. induziert zu werden. Die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges durch seine nucleäre Akkumulation findet sich in Neoplasien wie den Gehirntumoren wieder. Unter den vielen Funktionen von  $\beta$ -Catenin wurde im Zentralnervensystem der Maus gezeigt, dass es in der Unterdrückung der Differenzierung und folglich an dem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung beteiligt sein kann (Morin, 1999; Zechner *et al.*, 2003). Dagegen führten diese Bedingungen bei der D3484-Linie zu einem Shh-vermitteltem Rückgang der Map2C-, NeuN- und S-100 $\beta$ -Expression in dem Versuchsansatz „D3484 Differenzierte Neurosphären+Shh“ im Vergleich zu der Spalte „D3484 Differenzierte Neurosphären“ (siehe Tabelle 10).

Rekapitulierend lässt sich feststellen, dass die Markerexpression in den Medulloblastom-Zelllinien sehr variabel war. Dies könnte auf eine limitierte Differenzierungsfähigkeit hindeuten. In der Literatur wird ein pluripotentes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren beschrieben, welches das Gleichgewicht zwischen der Stammzell-Pluripotenz und der Stammzell-Differenzierung reguliert. Die Überexpression von Stammzell-spezifischen Proteinen (Nanog, Oct4, Sox2) in schlecht differenzierten Tumoren werden weiter von c-myc und von Proteinen der Polycomp-Gruppe wie dem Bmi-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1) reguliert, die bei der Regulation der Differenzierung mit den pluripotenten Genen kooperieren (Kashyap *et al.*, 2009). Die Mechanismen, die zur Differenzierungsresistenz führen, sind unklar; möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit den genetischen Veränderungen der Zellen. So liegt zum Beispiel c-MYC im Medulloblastom oft überexprimiert vor (von Bueren *et al.*, 2009). Eine Resistenz des Ausdifferenzierens bei Gehirntumorstammzellen wird ebenfalls von Zhang *et al.*, 2006 erwähnt. Zu einer weiteren Erklärung könnte die Arbeit von Laywell *et al.* im Jahr



2005 beitragen. Primäre murine neurale Neurosphären konnten *in vitro* zu „hybriden Differenzierungs-Phänotypen“ einer einzelnen Zelle, einem „Neuronen-Astrozyten“, differenziert werden. Diesen Mischformen wurde ein intermediärer Transdifferenzierungs- bzw. Dedifferenzierungs-Zustand zugeschrieben. Einerseits dürften die *in vitro* Konditionen solche hybriden Phänotypen hervorrufen, andererseits könnten solche intermediären Phänotypen *in vivo* während der Tumorentstehung existieren, die unter Bedingungen wie Stress das neurale Zellschicksal beeinträchtigen könnten (Laywell et al. 2005).

### 4.3 Vergleichende Charakterisierung des Medulloblastom-Stammzellphänotyps mittels CD133 und anderer Marker

Das glykosylierte Epitop AC133 des CD133-Moleküls wird als Stammzell- bzw. Tumorstammzellmarker diskutiert. Die Rolle der Expression und Regulation von diesem Epitop im Tumor als Stammzellmarker ist nicht vollständig bekannt. Die Eignung von CD133 als Tumorstammzellmarker in Medulloblastom-Zelllinien sollte hier untersucht werden. Konkret sollte die Fähigkeit, Neurosphären zu bilden, in CD133-positiv und CD133-negativ angereicherten Subpopulationen getestet, sowie die Aldehyddehydrogenase-Aktivität (ALDEFLUOR Assay) in den CD133-Subpopulationen untersucht werden. Schließlich sollten differenziell exprimierte Gene in der Microarray-Analyse identifiziert und mit unabhängiger Methodik validiert werden.

Die AutoMACS-angereicherte CD133-positive Fraktion der D283 Med-Zellen zeigte ein höheres Neurosphären-Wachstum als die CD133-negativen Zellen. Allerdings erlangte die CD133-negative Fraktion nach Rekultivierung das Ausgangs-CD133-Expressionsprofil wieder. Das Ergebnis für D283 Med würde mit der Hypothese übereinstimmen, dass die CD133-positiven Zellen höhere Selbsterneuerungsfähigkeiten besitzen im Gegensatz zu den CD133-negativen. Die D3484-Zelllinie zeigte allerdings keinen Unterschied im Neurosphären-Potential zwischen CD133-höher und CD133-weniger exprimierenden Zellen. Die Potenz, Neurosphären auszubilden, war zwischen den verschiedenen Zelllinien deutlich variabel, und korrelierte nicht immer mit der CD133-Expression. Dies führt zu dem Schluss, dass die CD133-Expression nicht zwangsläufig mit der Selbsterneuerungsfähigkeit im Medulloblastom zusammenhängt.

Zur weiteren Charakterisierung diente der ALDEFLUOR-Assay. Eine hohe ALDH-Expression gilt als Marker für Stammzell-ähnliche Zellpopulationen in humanen und murinen Geweben und Tumoren, die mittels ALDEFLUOR-Assay identifiziert und isoliert werden können (Alison *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnten bei humanen als auch bei den murinen Medulloblastom-Zelllinien positive Populationen mit dem ALDEFLUOR (AF)-Assay nachgewiesen werden. Die Expression von CD133 als Stammzellmarker und die ALDEFLUOR-Positivität war unabhängig; es liessen sich Subpopulationen diskriminieren mit unterschiedlicher Verteilung und Stärke der beiden Marker. Ein ähnlicher Befund zeigte sich bei den Shh-Signalweg-aktivierten murinen *ptc*-Medulloblastomzellen. Daraus lässt sich schließen, dass weitere, zur Heterogenität beitragende biologische Mechanismen existieren müssen.

Über das Stammzell-Potential von ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Subpopulationen findet man in der Literatur unterschiedliche Einstufungen. Im hepatozellulärem Karzinom wurde gezeigt, dass die ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Subfraktion die Tumorstammzell-Population spezifischer charakterisieren kann (Ma *et al.*, 2008). Andere Arbeiten stützen die Hypothese, dass

alleine die ALDH-Aktivität ausreichend für die Identifizierung von Zellen mit höherem tumorigenem Potential sei (Kim *et al.*, 2011). Sullivan *et al.*, 2010 zeigten, dass im Lungen-Adenokarzinom eine stark ALDH-positive Stammzellpopulation klonogener und tumorigener als die ALDH-negative war.

Verschiedene zur ALDH-Familie gehörende Genprodukte werden als Tumorstammzellmarker betrachtet, darunter ALDH1A1 und ALDH1A3. Es ist wenig bekannt, welche Isoformen an der ALDH-Aktivität im ALDEFLUOR-Assay beteiligt sind, denen eine Rolle als Stammzell-Marker zugewiesen werden könnte. *ALDH1A1*-Expression soll mit einer schlechten Prognose bei Patienten korrelieren (Li *et al.*, 2010; Alison *et al.*, 2010; Marcato *et al.*, 2011). So konnte eine geringe Expression von ALDH1A1 nur bei DAOY immunhistologisch, dagegen ALDH1A3 (mit CD133 koexprimiert) bei Zellen der D283 Med-Linie und der D3484-Linie mittels der quantitativen real-time PCR nachgewiesen werden. Wie weit diese Expression den Tumorstammzell-Phänotyp im Medulloblastom repräsentiert, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Zellzyklus-Analysen stellen eine weitere Möglichkeit dar, aktive, im Zyklus befindliche Populationen von ruhenden zu beschreiben. Für Stammzellen gilt es, die Balance zwischen ruhendem und differenziertem Status zu halten. Ihre Aufgabe besteht darin, einerseits genügend selbsterneuernde Stammzellen bereitzustellen und gleichzeitig nicht auszdifferenzieren (Doe, 2008). Die Signale aus der Umgebung (Stammzell-Nische) für die Kontrolle der Selbsterneuerung, der Ausdifferenzierung und Apoptose sind nicht ganz klar. Stammzellen verbleiben meist in der G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase. Sie mobilisieren sich erst, in die S(Synthese)-Phase überzutreten, wenn mitogene Stimuli dazu anregen oder DNA-Schäden zu reparieren sind (Cai *et al.*, 2004). Die Hypothese der langsam-teilenden, aber aufgrund der Anhäufung von Mutationen unendlich proliferierenden CSC'S wirft die Frage auf, welche Beziehung zwischen Quiescence und Proliferation von CD133-Subpopulationen besteht (Yu *et al.*, 2011). Die CD133-Subpopulationen – positive und negative - sollten hier auf den Zellzyklus-Status untersucht werden, um die Assoziation der CD133-Expression zu undifferenziertem bzw. ruhendem Status zu prüfen.

Mittels Darstellung des DNA-Gehaltes und gleichzeitiger CD133-Messung zeigte sich, dass sich von der CD133-positiven Fraktion mehr Zellen im Zellzyklus befanden als von der CD133-negativen Fraktion. Jedoch lässt dieses Ergebnis keine direkten Schlüsse auf die in der CD133-positiven Fraktion enthaltenen Tumorstammzellen zu, da diese nur eine kleine Subpopulation darstellen. Dass die CD133-Expression bei den hochproliferierenden Zellen (G<sub>2</sub>-Phase) und die wenig CD133-exprimierenden Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase anzutreffen sind, wurde auch in der Arbeit von Jaksch *et al.* (2008) publiziert, welche Ergebnisse aus verschiedenen Zelltypen resümierten. Ähnlich wie in dieser Arbeit befanden sich die CD133-positive Zellen im Zellzyklus, waren somit aktiver als die CD133-negativen Blutzellen, wie Grskovic *et al.*, 2004 beschreibt.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Stammzellen ergibt sich aus der Hypothese, dass Stammzellen langsam-proliferierend bzw. ruhend sind. Unterschiedliche Techniken für die Isolierung solcher Zellen wurden etabliert. Langsam-teilende Zellen mit den Eigenschaften der Selbsterneuerung, der Proliferation und der Multipotenz konnten im Glioblastom identifiziert werden (Deleyrolle *et al.*, 2011). Besonders effektiv ist der Nachweis sogenannter „Label Retaining Cells“ (LRC) im Gewebe bzw. Zellkultur, für solche sich langsam-teilende Zellen. Dabei wird mithilfe eines lentiviralen Vektors eine Tet-regulierte Histon H2B-GFP-Expressionskassette in Zellen eingebracht und sogenannte Label Retaining Zellen nachgewiesen (Falkowska-Hansen, 2010). Die ruhende Natur der Tumorstammzellen soll zur Resistenz gegenüber der Chemotherapie und zur Bildung von Tumorzidiven beitragen (Moore & Lyle, 2011). In dieser Arbeit wurden DAOY-Zellen stabil mit diesem Konstrukt infiziert. Nach ungefähr 7-10 Tagen konnten nur noch einzelne grüne GFP<sup>+</sup>-Zellen mikroskopisch beobachtet werden. Dass nur ganz wenige, langsam-teilende grüne Zellen übrig blieben, die bei darauffolgenden Passagen nicht mehr nachgewiesen werden konnten, könnte an einer hohen Proliferationsrate dieser Zelllinie liegen. Dieses Zellmodell war somit nicht geeignet, um ausreichende LRC-Zellen zu isolieren bzw. zu charakterisieren. Venezia *et al.* postulierten im Jahr 2004 die Existenz von proliferativen und quieszenten Zonen im Knochenmark, die Nischen-abhängig sind. Bei hämatopoetischen Stammzellen fanden sie heraus, dass Gene des Zellzyklus und der Zell-Migration zur frühen und späten Phase der Proliferation exprimiert werden. Bei den Phasen der Quiescence wurden antiproliferative Gene und solche des JAK/STAT-Signalweges als aktiviert beschrieben. Hinzu wird eine Zunahme der Zell-Zell-Adhäsion und gleichzeitiger Reduktion der Zell-Migration als eine Eigenschaft der Quiescence erklärt, und auf die Expression von Endoglin als repräsentativen Kandidaten hingewiesen (Venezia *et al.*, 2004).

#### 4.4 Identifizierung und Validierung differentiell in CD133- Populationen exprimierter Gene

Die Microarray-Analyse zeigte einige neue CD133-koregulierte Kandidaten-Gene auf. Die Validierung mittels der real-time RT-PCR brachte zwei CD133-assoziierte Gene aus allen vier Vergleichsansätzen (siehe Tabelle 7; Abbildung 20) hervor, das *MPPED2*- und *TTR*-Gen. Diese könnten neue Marker für Medulloblastomzellen mit Stammzellcharakter darstellen.

*MPPED2* (Metallophosphoesterase domain containing 2) ist eine Metallophosphoesterase, über deren genaue Funktion nur wenig bekannt ist. Bisher wurde sie im fötalen Gehirn exprimiert vorgefunden (Schwartz *et al.* 1995). Sie könnte als Marker zur weiteren Subfraktionierung von CD133-Medulloblastomsubpopulationen eingesetzt werden.

*TTR* (Transthyretin), welches auch als Präalbumin bekannt ist, zeigte vergleichsweise zu den anderen Genen die höchste Überexpression in den CD133-angereicherten Medulloblastom-Fractionen. Es kodiert für ein Transporter-Protein von lipophilen Molekülen, u.a. Hormonen und Retinoiden, wie Retinol (Vitamin A). Es wird im Gehirn im Epithel des Plexus choroideus synthetisiert und in die cerebrospinale Flüssigkeit abgegeben (Albrecht *et al.*, 1995). Weitere bekannte Aufgaben von Transthyretin sind, dass es vornehmlich das Schilddrüsen-Hormon in das zentrale Nervensystem transportiert. Ausser den extrazellulären Aufgaben von Transthyretin wurde es ferner mit einer intrazellulären Rolle belegt. Es wurde in den Mitochondrien und im Nucleus des humanen retinalen Pigment-Epithels detektiert, wo es auf subzellulärer Ebene als cytosolisches Transporter-Protein das Thyroxin-Hormon zur richtigen Bindungsstelle hinführen könnte (Getz *et al.*, 1999). Ein Fehlen von *TTR* bedeutet verminderten Transport des Thyroxin-Hormons, was sich auf die Thyroxin-Homöostase auswirkt, und betroffene Zellpopulationen können ihr Zellprogramm nicht ausführen. In Vorläuferzellen der subventrikulären Zone führte dies bei *TTR*<sup>-/-</sup>-Mäusen zur reduzierten Apoptose (Richardson *et al.*, 2007). Wahrscheinlich spielt das Expressions-Niveau eine Rolle. Im Medulloblastom wurde das Vorhandensein einer niedrigen Expression gezeigt (Albrecht *et al.*, 1995). Ebenfalls signifikant niedriger exprimiert wurde es in Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden (Velayudhan *et al.*, 2012).

Eine Doppelmarkierung von CD133<sup>+</sup>/*TTR*<sup>+</sup>-Zellen würde eine weitere Subfraktionierung, und die weitere Charakterisierung von *TTR* im Medulloblastom erlauben. Transthyretin könnte als ein potentieller Biomarker (CD133<sup>+</sup>/*TTR*<sup>+</sup>) zum Aufspüren von metastasierenden Stammzell-ähnlichen Medulloblastom-Zellen in Betracht gezogen

werden, welche im Liquor oder im Blut vorkommen könnten. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung wird es als ein Kandidaten-Marker diskutiert (Velayudhan *et al.*, 2012).

Eine differentielle Genexpressionsanalyse wurde in einer anderen Arbeit bei der DAOY-Medulloblastom-Zelllinie durchgeführt. Dabei konnten hochregulierte Gene im CD133-positiven angereicherten Zellmaterial entdeckt werden, die für die Wnt- und Notch-Signalwege, sowie für die Neoangiogenese typisch sind. Weder MPPED2 noch TTR wurden in dieser Arbeit gefunden (Gu *et al.*, 2011). Transkriptom-Profile von CD133-assoziierten Genen des Glioblastoms zeigten, dass die meisten CD133-hochregulierte Gene in Zellzyklus-Prozessen wie der Mitoseregulation involviert sind, und Ähnlichkeit der CD133-Signatur mit der von humanen embryonalen und neuronalen Stammzellen aufwiesen (Yan *et al.*, 2011). Weitere Arbeiten im Glioblastom suggerieren, dass aufgrund des Transkriptionsprofils beide (CD133-positive und CD133-negative) Subpopulationen Tumorstammzell-Eigenschaften besäßen, die unterschiedliche Ursprünge hätten und die sich molekular unterscheiden würden (Lottaz *et al.*, 2010; Beier *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2008).

## 4.5 Schlussfolgerung zur Rolle der CD133-Expression im Medulloblastom

Verschiedene Arbeiten zur Regulation von CD133 in unterschiedlichen Entitäten und über seine Rolle als Tumorstammzellmarker liegen vor.

Das CD133-Stammzellantigen wird auf transkriptioneller, post-translationaler und epigenetischer Ebene durch DNA-Methylierung reguliert. Seine Regulation scheint komplex zu sein. Pellacani *et al.* (2011) berichten, dass die DNA-Methylierung des CD133-Promoters, Zellkultivierungsbedingungen und andere Mechanismen die CD133-Expression bei etablierten Zelllinien des Prostata-Karzinoms regulieren können.

Über posttranslationale Modifikationen, wie die N-Glykosylierung und Sialylierung wird berichtet, dass sie die Stabilität des AC133-Epitopes auf dem CD133-Glycoprotein beeinträchtigen (Zhou *et al.*, 2010; Mak *et al.*, 2011).

Der CD133-Stammzellmarker wird des Weiteren durch Stress-Faktoren moduliert (z. B. Hypoxie). Die Arbeit von Blazek *et al.* (2007) belegt, dass Hypoxie in DAOY-Zellen zur Erweiterung der CD133-positiven Fraktion führt. In Glioblastomzellen (Griguer *et al.*, 2008) führte die Hypoxie zur Erweiterung des CD133-Sektors, die transient und reversibel war. Während der Bildung der Tumormasse sind Tumorzellen der Hypoxie ausgesetzt. Unter Hypoxie werden embryonale Stammzellen undifferenziert aufrecht gehalten (Zachar *et al.*, 2010). Durch das Hypoxie-abhängige HIF-Gen konnten in Tumorzellen Stammzellmarker induziert werden (Mathieu *et al.*, 2011).

Dass die meisten Zelllinien während der *in vitro* Kultur niedrige CD133-Levels haben, wird bisher auf die normoxischen Inkubations-Bedingungen zurückgeführt (Griguer *et al.*, 2008). Es ist bekannt, dass Gehirn-Tumorstammzellen von der Mikroumgebung (vaskuläre Nische) abhängig sind und die Selbst-erneuernde Fraktion dadurch aufrecht erhalten wird (Calabrese *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden variierende CD133-Expressionslevel festgestellt. Ein Vergleich der CD133-Expressionsangaben in Medulloblastomzellen in verschiedenen Publikationen ergibt, dass zum Beispiel DAOY-Zellen 20,6% CD133 (Blazek, *et al.* 2006) exprimierten. In der Arbeit von Fan *et al.*, (2006) werden Werte für CD133-positive Zellen von ~10% für DAOY und ~60% für D425 Med angegeben. Andere Werte über die Zelllinien Meb-Med 8A von 29,38% und für die D283 Med 8,96% (Kim *et al.*, 2009, AACR Abstract) werden erwähnt, die stark von den in dieser Arbeit gemessenen positiven Fraktionen divergieren. Diese Unterschiede dürften mit den Zellkulturbedingungen zusammenhängen und mit zufälligen Selektionsprozessen, die während der Kultur stattfinden. Grskovic *et al.*, 2004 konnte ebenfalls belegen, dass unterschiedliche Serum-angereicherte Zellmedien sich auf den Zellzyklus von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup>-Zellen und auf deren Anreicherung auswirken, die jedoch prospektiv genutzt werden könnten.

Diese Daten zeigen, dass es sich bei der CD133-positiven Fraktion nicht um eine feste Subpopulation von Zellen handelt, sondern um eine variable Population in einem bestimmten Funktionszustand.

Eine weitere Beobachtung an der D3484-Linie ergab, dass die CD133-Expression abhängig von der Adhäsion auf dem Untergrund der Polystyrol-Zellkulturflasche sein könnte. Zell-Adhäsion könnte das glykosylierte AC133-Epitop regulieren. Aus den Genetrail-Ergebnissen der Microarray-Analyse in dieser Arbeit wurden in der CD133-positiven Fraktion assoziierte Gengruppen über Interaktionen der extrazellulären Matrix und der fokalen Adhäsion gefunden (siehe Tabelle 12, Anhang). Diese Zellen könnten als Zellmodell für weiterführende Untersuchungen zu Selbsterneuerungs- und Differenzierungs-Eigenschaften dienen. Ähnlich entwickelten Kuçi *et al.* (2003) aus CD133-positiven peripheren Blutzellen auf Plastik adhärente Zellen mit Ausläufern, die zu CD133-negativen Zellen wurden. Darauffolgend bildeten diese Zellen nicht-adhärente Klone von CD133-positiven Zellen.

Die Rolle von CD133 als Stammzellmarker wird noch diskutiert. So wird suggeriert, dass sein Nutzen eher in der Kombination mit anderen Markern oder Anwendungen läge, Stammzell-ähnliche Populationen zu identifizieren (Wu & Wu, 2009).



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Medulloblastom, welches aus unreifen neuralen Zellen des Kleinhirnes entsteht, zeigt eine zelluläre und molekulare Heterogenität. Die CSC-Hypothese soll zu einem besseren Verständnis der Tumorbilogie mithilfe eines hierarchisch aufgebauten Modells verhelfen. Wesentliche Aspekte dieser Hypothese sind die Selbsterneuerungs- und Differenzierungs-Fähigkeit von Tumorstammzellen. Dabei stehen die sich selbsterneuernden Tumorstammzellen unter der Kontrolle von Signalwegen, die dereguliert/aktiviert sein und zur unkontrollierten Proliferation führen können. Im Medulloblastom wurden CD133-positive Zellen mit Stammzeleigenschaften identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Charakterisierung von Tumorstammzellen des Medulloblastoms und die Analyse ihrer molekularen Regulation zunächst mithilfe des CD133-Tumorstammzellmarkers analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass CD133-positive Subpopulationen der D283 Med Linie eine höhere Kapazität zur Neurosphärenbildung hatte als CD133-negative. Jedoch korrelierte die Potenz, Neurosphären auszubilden, nicht in allen Zellmodellen mit der Expression des Tumorstammzellmarkers CD133. Die verschiedenen untersuchten Medulloblastomzellen wiesen *in vitro* ein unterschiedliches ausgeprägtes Selbsterneuerungs-Potential auf. Des Weiteren wurden in CD133-angereicherten Zellpopulationen differentiell exprimierte Gene mittels Array-Hybridisierung identifiziert und mittels quantitativer PCR (Taqman) validiert. In der CD133-angereicherten Population konnten wir das im pränatalen Gehirn exprimierte Gen *MPPED2*, sowie *TTR* (Transthyretin) als überexprimiert identifizieren. Zellzyklus-Analysen ergaben, dass sich CD133-positive Populationen eher im Zellzyklus befinden und CD133-negative in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase. Im DAOY-Zellmodell konnten wir keine langsam proliferierenden Stammzellen mit der Methode des Label Retaining nachweisen. Die in Stammzellen und Vorläuferzellen erhöhte Aldehyddehydrogenase-Aktivität wurde als weiteres Charakteristikum untersucht. Hierbei fanden sich überlappende CD133<sup>+</sup>- und ALDH<sup>+</sup>-Populationen, mit Nachweis einer doppelt positiven Fraktion. Die Entwicklungskontrollsignalwege Sonic Hedgehog, Notch und Wnt regulieren das Zellschicksal von normalen Stammzellen und von Tumorstammzellen. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Zellen von diesen drei Entwicklungskontrollsignalwegen mittels spezifischer Inhibierung oder Stimulierung führte zu einer heterogenen Antwort in Hinsicht auf die Bildung von Neurosphären. Dieses Ergebnis weist erneut auf die Diversität des aus unterschiedlichen Zelltypen entstehenden Medulloblastoms auf. Die Differenzierungs-Fähigkeit von Neurosphären fand sich eingeschränkt; es konnten auch unter differenzierenden Bedingungen Stammzell- bzw. Vorläufermarker wie Sox2 nachgewiesen werden; eine terminale Differenzierung der Medulloblastomzellen blieb aus. Die Charakterisierung von

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Medulloblastom-Stammzellen und ihre Bedeutung für die Klinik der Patienten bedarf weiterer Analysen.

## 6 AUSBLICK

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass beim Medulloblastom die Selbsterneuerungs-Kapazität und Differenzierungsfähigkeit von Zellen mit Stammzell-Eigenschaften sehr heterogen ist. Ihre Neurosphärenbildungskapazität wurde von Signalwegs-spezifischen pharmakologischen Substanzen unterschiedlich beeinflusst, und deshalb die Bedeutung solcher Substanzen für die Therapie zurzeit unklar bleibt.

Weitere Analysen könnten die Bedeutung der Entwicklungskontrollsignalwege auf Medulloblastom-Tumorstammzellen sowie die Funktion der in dieser Population hochexprimierten Transkripte aufdecken. Die aus der CD133-Microarray-Analyse identifizierte Gene könnten als Tumorstammzell-Marker weiter untersucht werden. Mittels AutoMACS-Separierung konnten lediglich relativ geringe Effizienzen erreicht werden. Neue Technologien, wie zum Beispiel der DEPArray™ (Silicon Biosystems) könnten verwendet werden, um einzeln markierte Zellen mit einer >98%-igen Separations-Effizienz zu sortieren. Eine verbesserte Aufreinigung der CD133-positiven Medulloblastompopulation könnte aufschlussgebend zur Regulation der CD133-Expression beitragen. Alternativ könnten Fluoreszenz-markierte von nicht-fluoreszenten Zellen mittels eines Mikromanipulators isoliert und weiter untersucht werden. Untersuchungen von mehrfach-positiven Subpopulationen könnten dazu beitragen, ein besseres Bild über die Hierarchie und das Differenzierungspotential dieser Zellpopulationen zu erhalten und deren tumorigenes Potential im Mausmodell bzw. ihre klinische Bedeutung weiter zu erforschen.

## 7 ZITATIONSQUELLEN

### 7.1 Literatur

#### A

- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci.* 12(5):269-283
- Ahmed S (2009). The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem.* 106(1): 1-6
- Albrecht S, Bayer TA, Kraus JA, Pietsch T (1995). Transthyretin expression in medulloblastomas and medulloblastoma cell lines. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 21(5): 399-409
- Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, Nicholson LJ (2010). Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol.* 222(4): 335-344
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RDG (2006). Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature.* 442:823-826
- Audia JE, Hyslop PA, Nissen JS, Thompson, RC, Tung, JS, and Tanner LI. (April 6, 2000) Patent WO0019210

#### B

- Bailey P, Cushing H: Medulloblastoma cerebelli: a common type of mid-cerebellar glioma of childhood. *Arch Neurol Psychiatry* 1925. 14:192-224, zitiert nach: Rorke, LB. (1994). Experimental Production of Primitive Neuroectodermal Tumors and its Relevance to human Neuro-Oncology. *American Journal of Pathology.* 144(3): 444-448
- Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature.* 390(6656):169-172
- Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B (2008). The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl).* 86(9):1025-1032
- Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia (2007). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 67(1): 1-5
- Bragina O, Sergejeva S, Serg M, Zarkovsky T, Maloverjan A, Kogerman P, Zarkovsky A (2010). Smoothed agonist augments proliferation and survival of neural cells. *Neurosci Lett.* 482(2):81-85
- Bühren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T (2000). Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct

histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59(3):229-240

**C**

Cai J, Weiss ML, Rao MS (2004). In search of "stemness". *Experimental Hematology.* 32: 585-598

Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 11(1): 69-82

Capela A, Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal (2002). 35(5): 865-875

Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quiñones-Hinojosa A (2006). Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. *Stem Cells.* 24(12):2851-2857

Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Daniel B, Wicha MS (2008). Cancer stem cells in breast: Current opinion and future challenges. *Pathobiology.* 75: 75-84

Chen J, Kesari S, Rooney C, Strack PR, Chen J, Shen H, Wu L, Griffin JD (2010). Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres. *Genes Cancer.* 1(8): 822-835

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16(21):2743-2748

Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA (2002). Small molecule modulation of Smoothened activity. *PNAS.* 99(22): 14071-14076

Corcoran RB, Scott MP (2001). A mouse model for medulloblastoma and basal cell nervus syndrome. *Journal of Neuro-Oncology.* 53:307-318

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2006). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* 24(4):975-985

Corver WE, Cornelisse CJ (2002). Flow Cytometry of human solid tumours: clinical and research applications. *Current Diagnostic Pathology.* 8: 249-267

Czirr E, Leuchtenberger S, Dorner-Ciossek C, Schneider A, Jucker M, Koo EH, Pietrzik CU, Baumann K, Weggen S (2007). Insensitivity to Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J Biol Chem.* 282(34):24504-24513

**D**

- Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, Halpain S (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci.* 23(29):9479-9490
- Deleyrolle LP, Harding A, Cato K, Siebzehrubl FA, Rahman M, Azari H, Olson S, Gabrielli B, Osborne G, Vescovi A, Reynolds BA (2011). Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain.* 134(Pt 5):1331-1343
- Dembinski JL, Krauss S (2009). Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 26(7):611-623
- Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Screpant I, Gulino A. (2006). Suppressors of Hedgehog Signaling. *Molecular Neurobiology.* 34(3): 193-204
- Ding S, Wu TY, Brinker A, Peters EC, Hur W, Gray NS, Schultz PG (2003). Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):7632-7637
- Doe CQ (2008). Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development.* 135: 1575-1587
- Dong-Ok Kim, Young-Shin Ra, and Hee-Jin Cho (2009). CANCER STEM CELLS: ISOLATION AND CHARACTERIZATION 2 -- POSTER PRESENTATIONS. Abstract #4887: The biological implication of CD133, cancer stem cell marker expression in medulloblastoma cells. AACR Meeting Abstracts
- Douville J, Beaulieu R, Balicki D (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 18(1):17-25
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Audia JE (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem.* 76(1):173-181
- Dvorak P, Dvorakova D, Hampl A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells (2006). *FEBS Lett.* 580(12): 2869-2874

**E**

- Ellison D (2002). Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28(4): 257-282

Enguita-Germán M, Schiapparelli P, Rey JA, Castresana JS (2010). CD133+ cells from medulloblastoma and PNET cell lines are more resistant to cyclopamine inhibition of the sonic hedgehog signaling pathway than CD133- cells. *Tumour Biol.* 31(5): 381-390

**F**

Falkowska-Hansen B, Kollar J, Grüner BM, Schanz M, Boukamp P, Siveke J, Rethwilm A, Kirschner M. (2010). An inducible Tet-Off-H2B-GFP lentiviral reporter vector for detection and in vivo isolation of label-retaining cells. *Experimental Cell Research*, 316(11):1885-1895

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 28(1):5-16

Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG (2006). Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res.* 66(15): 7445-7452

Fargeas CA, Corbeil DA, Huttner WB (2003). AC133-Antigene, CD133, Prominin-1, Prominin-2, Etc. Prominin Family Gene Products in Need of a Rational Nomenclature. *Stem Cells.* 21:506-508

Feretti E, Smaele E, Marcotullio L., Srepanti I., Gulino A. (2005).: Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends in Molecular Medicine.* 11(12):537-545

Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G (2009). Targeting CD133 antigen in Cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 13(7):823-837

Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V, Hock H (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 27(1):84-90

Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL, Porter JA (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol.* 1(2):10 94

Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Brodeur GM, He XM, Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Brodeur GM, He XM, Wikstrand CJ, Kurtzberg J, Berens ME, Halperin EC, et al (1988). Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. *Am J Pathol.* 130(3):472-484

Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, Halperin EC, Bigner DD (1985). Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44(6):592-605

**G**

- Garvalov BK, Acker T (2011). Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies. *J Mol Med (Berl)*. 89(2):95-107
- Getz RK, Kennedy BG, Mangini NJ. Transthyretin localization in cultured and native human retinal pigment epithelium (1999). *Exp Eye Res*. 68(5): 629-636
- Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 468(7327):1095-1099
- Gilbertson RJ (2004). Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol*. 5(4): 209-218
- Gilbertson RJ, Ellison DW (2008). The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu Rev. Pathol. Mech. Dis*. 3:341-365
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer C, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 1(5): 555-567
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higinns KM, Scott PM (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 277:1109-1113
- Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR Jr, Gillespie GY. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma (2008). *PLoS One*. 3(11): e3655
- Grskovica B, Ruzicka K, Karimia A, Qujeqa D, Muller MM (2004). Cell cycle analysis of the CD133+ and CD133- cells isolated from umbilical cord blood (2004). *Clinica Chimica Acta*. 343: 173-178
- Gu C, Yokota N, Gao Y, Yamamoto J, Tokuyama T, Namba H (2011). Gene expression of growth signaling pathways is up-regulated in CD133-positive medulloblastoma cells. *Oncol Lett*. 2(2): 357-361
- Gu JW, Rizzo P, Pannuti A, Golde T, Osborne B, Miele L (2012). Notch signals in the endothelium and cancer "stem-like" cells: opportunities for cancer therapy. *Vasc Cell*. 4:7
- Guessous F, Li Y, Abounader R (2008). Signaling pathways in medulloblastoma. *J Cell Physiol*. 217(3): 577-583

**H**

- Hadjipanayis CG., Van Meir EG (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trend in molecular medicine*. 15(11): 519-530



- Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, Dani I, Denkhau D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K, Pietsch T (2005). Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol.* 166(4):1153-1162
- Hatten ME, Roussel MF (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 34(3): 134-142
- He XM, Wikstrand CJ, Friedman HS, Bigner SH, Pleasure S, Trojanowski JQ, Bigner DD (1991). Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell lines (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts. *Lab Invest.* 64(6):833-843
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25): 15178-15183
- Hillemanns HG, Sixtus-Klug B, Prestel E. (1968). Cytoplasma-Kernrelationen der Malignitätsstufen des Cervixepithels, gemessen mit dem Integrationsocular I. *Archiv für Gynäkologie.* 206: 82-97
- Hooper JE, Scott MP (2005). Communicating with Hedgehogs *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4): 306-317

**I**

- Inoue HK, Kohga H, Zama A, Ono N, Nakamura M (1994). Differentiation potential in medulloblastomas and primitive gliomas. *Med. Electron Microsc.* 27 (1): 1-7

**J**

- Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985). Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44(5):472-485
- Jaksch M, Múnera J, Bajpai R, Terskikh A, Oshima RG. Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines (2008). *Cancer Res.* 68(19):7882-7886
- Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res.* 7(3): 330-338
- Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, Park WY, Lee DS, Kim H, Nam DH (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest.* 88(8): 808-815

## K

- Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM (2000). Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther.* 1(6):516-521
- Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Schaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells and Development.* 18(7): 1093-1108
- Katoh, M. und Katoh M. (2007). WNT signaling pathway and stem cells signalling network. *Clinical Cancer Research.* 14: 4042-4045
- Kheradmand A, Zee DS. Cerebellum and ocular motor control (2011). *Front Neurol.* 2: 53
- Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 32(4): 594-605
- Kim MP, Fleming JB, Wang H, Abbruzzese JL, Choi W, Kopetz S, McConkey DJ, Evans DB, Gallick GE (2011). ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One.* 6(6): e20636
- Klein C, Butt SJ, Machold RP, Johnson JE, Fishell G (2005). Cerebellum- and forebrain-derived stem cells possess intrinsic regional character. *Development.* 132(20):4497-4508
- Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Bäcklund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 123(4): 473-484
- Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P Jr, et al. (2009) GSK3b Regulates Differentiation and Growth Arrest in Glioblastoma. *PLoS ONE.* 4(10): e7443
- Krishnamurthy K, Wang G, Rokhfeld D, Bieberich E (2008). Deoxycholate promotes survival of breast cancer cells by reducing the level of pro-apoptotic ceramide. *Breast Cancer Res.* 10(6):R106
- Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R (2003). Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood.* 101(3): 869-876

## L

- Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(20): 8455-8460
- Laywell ED, Kearns SM, Zheng T, Chen KA, Deng J, Chen HX, Roper SN, Steindler DA (2005). Neuron-to-astrocyte transition: phenotypic fluidity and the formation of hybrid asters in differentiating neurospheres. *J Comp Neurol*. 493(3):321-333
- LeClerc N, Kosik KS, Cowan N, Pienkowski TP, Baas PW (1993). Process formation in Sf9 cells induced by the expression of a microtubule-associated protein 2C-like construct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(13):6223-6227
- Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB, Johnson JE, Wechsler-Reya RJ (2005). Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci*. 8(6): 723-729
- Levi BP, Yilmaz OH, Duester G, Morrison SJ (2009). Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood*. 113(8):1670-1680
- Li J (2011). Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Exp Hematol*. 39(5): 511-520
- Li L, Connelly MC, Wetmore C, Curran T, Morgan JI (2003). Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res*. 63(11):2733-2736
- Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F (2010). ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest* 90(2): 234-244
- Li XN, Parikh S, Shu Q, Jung HL, Chow CW, Perlaky L, Leung HC, Su J, Blaney S, Lau CC (2004). Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res*. 10(3):1150-1159
- Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L, Romero IA, Couraud PO, Weksler BB, Hladky SB, Barrand MA (2008). Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J Neurochem*. 106(4):1855-1865
- Lindahl R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4,5):283-335
- Liu J, Wu X, Mitchell B, Kintner C, Ding S, Schultz PG (2005). A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44(13): 1987-1990
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method (2001). *Methods*. 25(4):402-408
- Luo J (2009). Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*. 273(2):194-200

**M**

- Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, Guan XY. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations (2008). *Mol Cancer Res.* 6(7):1146-1153
- Maenhut C, Dumont JE, Roger PP, Van Staveren WCG (2010). Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis.* 131(2): 149-158
- Mak AB, Blakely KM, Williams RA, Penttilä PA, Shukalyuk AI, Osman KT, Kasimer D, Ketela T, Moffat J (2011). CD133 protein N-glycosylation processing contributes to cell surface recognition of the primitive cell marker AC133 epitope. *J Biol Chem.* 286(47): 41046-41056
- Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N, Doble BW, Dunn SE, Scheinemann K, Singh SK (2012). Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways. *Pediatr Res.* 71(4 Pt 2): 516-522
- Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N, Doble BW, Dunn SE, Scheinemann K, Singh SK (2013). Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett.* 338(1): 23-31
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW (2011). Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 10(9): 1378-1384
- Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW (2011). Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* 29(1): 32-45
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4(6): 697-720
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* 71(13): 4640-4652
- Meloni AR, Fralish GB, Kelly P, Salahpour A, Chen JK, Wechsler-Reya RJ, Lefkowitz RJ, Caron MG (2006). Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol.* 26(20): 7550-7560
- Mikels AJ, Nusse R (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene.* 25(57): 7461-7468
- Mizrak D., Brittan M., Alison MR (2008). CD133: molecule of the moment. *J. Pathol.* 214: 3-9

Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N (2007). Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature*. 449(7160):351-355

Moore N, Lyle S. (2011). Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol*. 2011: 1-11

Moreb JS (2008). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 3(4):237-246

Morin PJ (1999). beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*. 21(12):1021-1030

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in Vertebrates. *Development*. 116(1): 201-211

## N

Nam DH, Jeon HM, Kim S, Kim MH, Lee YJ, Lee MS, Kim H, Joo KM, Lee DS, Price JE, Bang SI, Park WY (2008). Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. *Clin Cancer Res*. 14(13):4059-4066

## O

O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal (2010). *Clin Cancer Res*. 16(12):3113-3120

## P

Patel S, Woodgett J (2008). Glycogen Synthase Kinase-3 and Cancer: Good Cop, Bad Cop? *Cancer Cell*. 14: 351–353

Patti R, Reddy CD, Georger B, Grotzer MA, Raghunath M, Sutton LN, Phillips PC (2000). Autocrine secreted insulin-like growth factor-I stimulates MAP kinase-dependent mitogenic effects in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Int J Oncol*. 16(3):577-584

Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, Bernard L, Viale G, Pelicci PG, Di Fiore PP (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 140(1):62-73

Pellacani D, Packer RJ, Frame FM, Oldridge EE, Berry PA, Labarthe MC, Stower MJ, Simms MS, Collins AT, Maitland NJ (2011). Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol Cancer*. 10:94

Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells (2010). *Int J Biochem Cell*. 42(3): 421-424

Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Ockler R, Freihoff D, Albrecht S, Wiestler OD, Zeltzer P, Riehm H (1994). Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 54(12):3278-3287

- Pietsch T, Taylor MD, Rutka JT. Molecular pathogenesis of childhood brain Tumors (2004). *J Neurooncol.* 70(2): 203-215
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, Deimling A, Wainwright B, Trench GC, Wiestler OD, Wicking C (1997). Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of drosophila patched. *Cancer Research.* 57:2085-2088
- Pogoriler J, Millen K, Utset M, Du W (2006). Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Development.* 133(19): 3929-3937
- Pollard TD, Earnshaw WC (2007). *Cell Biology.* 2. Aufl. Philadelphia (U.S.A) Spektrum Akademischer Verlag, S. 560
- R**
- Raffel C. (2004). Medulloblastoma: Molecular genetics and animal models. *Neoplasia.* 6(4): 310-322
- Rando TA (2007). The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell.* 129(7): 1239-1243
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia.* 55(2):165-177
- Raso A, Mascelli S, Biassoni R, Nozza P, Kool M, Pistorio A, Ugolotti E, Milanaccio C, Pignatelli S, Ferraro M, Pavanello M, Ravegnani M, Cama A, Garrè ML, Capra V (2011). High levels of PROM1 (CD133) transcript are a potential predictor of poor prognosis in medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 13(5): 500-508
- Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ (2009). Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell.* 15(2): 135-147
- Reya T, Clevers H (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434(7035):843-850
- Richardson SJ, Lemkine GF, Alfama G, Hassani Z, Demeneix BA. Cell division and apoptosis in the adult neural stem cell niche are differentially affected in transthyretin null mice (2007). *Neurosci Lett.* 421(3): 234-238
- Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal.* 16;5(246):re6
- Rodini CO, Suzuki DE, Nakahata AM, Pereira MC, Janjoppi L, Toledo SR, Okamoto OK (2010). Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. *Arq Neuropsiquiatr.* 68(6): 947-952

- Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*. 141(4):583-594
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*. 317(5836): 372-376
- Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T. (2004). Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in *Ptc1<sup>+/-</sup>p53<sup>-/-</sup>* mice. *Cancer Cell*, 6(3): 229-240
- Rorke, LB. (1994). Experimental Production of Primitive Neuroectodermal Tumors and its Relevance to human Neuro-Oncology. *American Journal of Pathology*. 144(3):444-448
- Ryan KE, Chiang C (2012). Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem*. 287(22):17905-17913

**S**

- Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system (1998). *Brain Dev*. 20(2): 88-94
- Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T (2006). Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res*. 66(8): 4215-4222
- Scales SJ, de Sauvage FJ (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. (30)6: 303-312
- Schlegel, J., Peraud, A., Herms, J. (2004). In: WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerck Verlag München. S.3-21
- Schreck KC, Taylor P, Marchionni L, Gopalakrishnan V, Bar EE, Gaiano N, Eberhart CG (2010). The Notch target *Hes1* directly modulates *Gli1* expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. *Clin Cancer Res*. 16(24):6060-6070
- Schwartz F, Eisenman R, Knoll J, Gessler M, Bruns G (1995). cDNA sequence, genomic organization, and evolutionary conservation of a novel gene from the WAGR region. *Genomics*. 29(2): 526-532
- Schwechheimer K, Wiedenmann B, Franke WW (1987). Synaptophysin: a reliable marker for medulloblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 411(1):53-59
- Sell S (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 51(1):1-28
- Sell S (2010). On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol*. 176(6):2584-2594
- Shapiro HM (2003). *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New Jersey (U.S.A.)

Wiley-Liss

- Shearman MS, Beher D, Clarke EE, Lewis HD, Harrison T, Hunt P, Nadin A, Smith AL, Stevenson G, Castro JL (2000). L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry*. 39(30): 8698-8704
- Shih leM, Wang TL (2007). Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*. 67(5):1879-1882
- Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S (2004). Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*. 103(6):2055-2061
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267–7273
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 63(18): 5821-5828
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432: 396-401
- Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura S, Nakashima S, Kunisada T, Iwama T (2008). Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem*. 283(16): 10958-10966
- Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2001). Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*. 31(4):557-568
- Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 4(5): 440-452
- Sottocornola R, Lo Celso C (2012). Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Res Ther*. 3(2):10
- Srivastava VK, Nalbantoglu J. (2010). The cellular and developmental biology of medulloblastoma: current perspectives on experimental therapeutics. *Cancer Biol Ther*. 9(11): 843-852
- Stecca B, Ruiz i Altaba A (2005). Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *J Neurobiol*. 15;64(4):476-490
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9118-9123
- Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, CW, Anant, S. (2010). Cancer Stem Cells: A Novel Paradigm for Cancer Prevention and Treatment. *Mini Rev Med Chem*. 10(5): 359–371



Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao B, Schuster K, Shao C, Larsen JE, Sullivan LA, Honorio S, Xie Y, Scaglioni PP, DiMaio JM, Gazdar AF, Shay JW, Wistuba II, Minna JD (2010). Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Research*. 23: 9937–9948

**T**

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*. 406(6799):1005-1009

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 418(6900): 892-897

Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. (2006). The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest*. 86:1203–1207

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 123(4): 465-472

Teglund S, Toftgård R (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 1805(2):181-208

ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HO, Renier WO (2003). Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*. 250(9):1025-1036

Tian G, Sobotka-Briner CD, Zysk J, Liu X, Birr C, Sylvester MA, Edwards PD, Scott CD, Greenberg BD (2002). Linear Non-competitive Inhibition of Solubilized Human gamma - Secretase by Pepstatin A Methyl ester, L685458, Sulfonamides, and Benzodiazepines. *J Biol Chem*. 277(35):31499-31505

Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J Cell Biol* 191(2):415-428

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin (2004). *Science*. 303(5656):359-363

**U**

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(26):14720-14725

**V**

- Vaillant C, Monard D (2009). SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*. 8(3):291-301
- Velayudhan L, Killick R, Hye A, Kinsey A, Güntert A, Lynham S, Ward M, Leung R, Lourdasamy A, To AW, Powell J, Lovestone S (2012). Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 28(2): 369-375
- Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2(10): e301
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 6(6): 425-436
- Vibhakar R, Foltz G, Yoon JG, Field L, Lee H, Ryu GY, Pierson J, Davidson B, Madan A. (2007). Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 9(2):135-144
- von Bueren AO, Shalaby T, Oehler-Jänne C, Arnold L, Stearns D, Eberhart CG, Arcaro A, Pruschy M, Grotzer MA (2009). RNA interference-mediated c-MYC inhibition prevents cell growth and decreases sensitivity to radio- and chemotherapy in childhood medulloblastoma cells. *BMC Cancer* 9:10

**W**

- Wang VY, Zoghbi HY (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci*. 2(7):484-491
- Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH (2009). Emerging role of Notch in stem cells and Cancer (. *Cancer Lett*. 279(1):8-12
- Wechsler-Reya R, Scott MP (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*. 24:385-428
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. 22(1): 103-114
- Wetmore C (2003). Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. *Current Opinion in Genetics and Development*. 13: 34-42
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423(6938): 448-452
- Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM (2004). Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-Amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*. 279(13):12876-12882

Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, Smith A. (2012). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature Cell Biology*. 13(7): 838–845

Wu J, Tung JS, Thorsett ED, Pleiss MA, Nissen JS, Neitz J, Latimer LH, John V, Freedman S, Britton TC, Audia JE, Reel JK, Mabry TE, Dressman BA, Cwi CL, Droste JJ, Henry SS, McDaniel SL, Scott WL, Stucky RD, and Potter WJ. (July 2, 1998) Patent WO9828268

Wu Y, Wu PY (2009). CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev*. 18(8): 1127-1134

## X

Xia M, Sherlock J, Hegerich P, You X, Lee K, Walworth C, Spier E (2010). DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists Vol. I IMECS 2010

Xing F, Okuda H, Watabe M, Kobayashi A, Pai SK, Liu W, Pandey PR, Fukuda K, Hirota S, Sugai T, Wakabayashi G, Koeda K, Kashiwaba M, Suzuki K, Chiba T, Endo M, Mo YY, Watabe K (2011). Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene*. 29. 30(39):4075-4086

## Y

Yan X, Ma L, Yi D, Yoon JG, Diercks A, Foltz G, Price ND, Hood LE, Tian Q (2011). A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(4): 1591-1596

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

Yu X, Lin Y, Yan X, Tian Q, Li L, Lin EH (2011). CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? *Curr Colorectal Cancer Rep*. 7: 253–259

Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen (2002). *J Biol Chem*. 277(23):20711-20716

## Z

Zachar V, Prasad SM, Weli SC, Gabrielsen A, Petersen K, Petersen MB, Fink T (2010). The effect of human embryonic stem cells (hESCs) long-term normoxic and hypoxic cultures on the maintenance of pluripotency. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(3-4): 276-283

Zechner D, Fujita Y, Hülsken J, Müller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB 3rd, Birchmeier W, Birchmeier C (2003). beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol*. 258(2):406-418

- Zhang QB, Ji XY, Huang Q, Dong J, Zhu YD, Lan Q (2006). Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res.* 16(12): 909-915
- Zhang X, Harrington N, Moraes RC, Wu MF, Hilsenbeck SG, Lewis MT (2009). Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothed (Smo). *Breast Cancer Res Treat.* 115(3):505-521
- Zhou F, Cui C, Ge Y, Chen H, Li Q, Yang Z, Wu G, Sun S, Chen K, Gu J, Jiang J, Wei Y (2010). Alpha2,3-Sialylation regulates the stability of stem cell marker CD133. *J Biochem.* 148(3): 273-280
- Zorn AM (2001). Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol.* 11(15):R592-R595

## 7.2 Internet-Quellen

*http*

[//www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel\\_ch42\\_Cerebellum.pdf](http://www.weizmann.ac.il/neurobiology/labs/ulanovsky/IntroSystemsNeuroscience/Kandel_ch42_Cerebellum.pdf)

[//jaxmice.jax.org/strain/003081.html](http://jaxmice.jax.org/strain/003081.html)

[//probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer](http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer)

[//www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf)

## 8 VERZEICHNISSE

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
ADC	Analog-to-Digital Converter
AF	ALDEFLUOR
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AXIN	Axis inhibition protein
BAA	BODIPY-Aminoacetat
BAAA-DA	BODIPY-Aminoacetaldehyde Diethyl Acetal
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BODIPY	Boron-dipyrromethene
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa; ungefähr
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSC	Cancer Stem Cell; Krebsstammzelle
CSL	CBFI/Suppressor of hairless/LAG-1
CV	Coefficient of variation; Variationskoeffizient
DAPT	N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DEAB	Diethylaminobenzaldehyde
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dkk-1	Dickkopf related protein-1
DLL	Delta-Like Familie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	deoxy-Nucleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration

## VERZEICHNISSE

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	External Granule Layer
et al.	et alii/alia
FACS	Fluorescence activated flow sorting
FcR	Fc Rezeptor
FL	Fluoreszenzlicht
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GANT-61	2,2'-[[Dihydro-2-(4-pyridinyl)-1,3(2H,4H)- pyrimidinediyl]bis(methylene)]bis[N,N-dimethylbenzenamine]
GC	Granule Cell Precursor bzw. Granule Cell Progenitor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLI	GLI-Kruppel family member
GLI gene	Glioma associated oncogene
GRK2	G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 2
GSK-3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
H&E	Hämatoxylin&Eosin
H2B	Histon-2B
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HET	Haus für Experimentelle Therapie
IGL	Internal Granule Layer
KAAD	3-Keto-N-(aminoethyl-aminocaproyl-dihydrocinnamoyl)
kV	Kilovolt
LacZ-Gen	$\beta$ -Galactosidase
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRC	Label Retaining Zelle
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
mA	Milliampère
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
mg	Milligramm
mGY	Milli-Gray
Mio.	Million
ml	Milliliter
ML	Molekularschicht
mRNA	messenger; Boten-RNA
mW	Milliwatt
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
n.d.	nicht durchgeführt

NAD(P <sup>+</sup> )	oxidiertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat
ng	Nanogramm
NH <sub>2</sub> -	Amino-
NICD	Notch intracellular domain; Intrazelluläre Notch-Domäne
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Purkinjzellschicht
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodide
PKA	Proteinkinase A
PMT	Photomultiplier
PNET	Primitive neuroektodermale Tumore
PTC	Patched
REN	Renin
rh	rekombinant human
RNA	Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAG	Smo Agonist
SANT-1	Shh Signaling Antagonist V
Sec.	Sekunde
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SSC	Side scatter; Seitwärtsstreulicht
SuFu	Suppressor of Fused
Syn.	Synonym
t	Zeit
T-25cm <sup>2</sup>	Tissue culture flask; Zellkulturflasche
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS/Borat/EDTA-Puffer
TGFβ	Transforming growth factor β/bone morphogenetic protein
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumenanteil
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VZ	Ventrikuläre Zone

## VERZEICHNISSE

---

WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
xg	Gravitationskraft
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
z. B.	zum Beispiel



## 8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung des frühen postnatalen (A) und adulten Cerebellums (B).
- Abbildung 2: Modell der Körnerzell-Entwicklung im Maus-Cerebellum.
- Abbildung 3: Mechanismus der Ptc-vermittelten Signal-Aktivierung des Shh-Weges.
- Abbildung 4: Ptc<sup>+/-</sup>-Knockout-Konstruktion.
- Abbildung 5: Dorsale Ansichten des Kleinhirnes bei Wildtyp- und Ptc<sup>+/-</sup>-Mäusen.
- Abbildung 6: Topologie von CD133.
- Abbildung 7: Das Konzept der LRC's.
- Abbildung 8: Tet-Off-H2B-GFP lentiviraler Reporter.
- Abbildung 9: Vereinfachtes Schema der Anordnung des optischen Systemes eines Durchflusszytometers.
- Abbildung 10: Hydrodynamische Fokussierung in einer Durchflusszelle.
- Abbildung 11: Spektrale Überlappung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorescence Spectra Viewer).
- Abbildung 12: Lichtsignalgeometrie. Setzt sich aus der Pulshöhe (Height) des Peaks und der Pulsbreite des Flächenintegrals zusammen.
- Abbildung 13: Neurosphären-Assays und durchflusszytometrische Kontroll-Analysen von CD133-positiven und CD133-negativen Fraktionen der Zelllinie D283 Med.
- Abbildung 14: Replating-Assays von D283 Med, 1580Wü, DAOY, D425 Med, D341 Med, MHH-Med1.
- Abbildung 15: Replating-Assays (vergleiche Abb. 24a) von MEB-Med-8S, D3484 (adhärente und Suspensions-Zellen).
- Abbildung 16: Vergleichende Übersicht zur CD133-Expressionsstärke der in Serum-haltigem Medium kultivierten und durchflusszytometrisch analysierten Zelllinien und des Repopulations-Potentials.
- Abbildung 17: (A) Repräsentative Bilder der Morphologie der in Serum-haltigem Medium passagierten D3484 Zellen. (B) Neurosphärenkapazität und CD133-Expression der Generationen aus der Ausgangs-Zellkultur der adhärennten (links) und den Suspensionszellen D3484 (rechts) entsprechend, sowie aus den wiederausgesäten Neurosphären-Assays.
- Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analysen der CD133-Expression.
- Abbildung 19: Scatter Plots der differentiellen Analyse der beiden Zelllinien.
- Abbildung 20: Validierung der in der Microarray-Analyse erhaltenen hochregulierten Gene in allen 4 Probenpaaren.
- Abbildung 21: Prozentuale Anteile der Zellzyklus-Phasen von CD133-positiven und CD133-negativen Subpopulationen.

- Abbildung 22: Stimulierung der Neurosphärenbildung von Cyclopamin-behandelten D3484-Zellen.
- Abbildung 23: Zu- oder Abnahme der Neurosphärenbildung nach Agonisten- oder Inhibitoren-Applikation für die Shh-, Notch- und Wnt-Signalwege.
- Abbildung 24: Neurosphärenbildung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclopamin (A) und KAAD-Cyclopamin (B).
- Abbildung 25: GANT-61 inhibiert die Neurosphären-Bildung.
- Abbildung 26: Neurosphären-Bildung nach Inkubation mit Agonisten bzw. Antagonisten des Shh-Signalweges.
- Abbildung 27: Inhibitor der Neurosphärenbildung mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen behandelte D2855- und D3419-Zellen.
- Abbildung 28: ALDH-Expressionsprofil und Koexpression von CD133.
- Abbildung 29: CD133- und ALDH-Expression bei der D3484-Zelllinie.
- Abbildung 30: ALDH- und Prom1-Subpopulationen bei den Mäusen aus den durchflusszytometrischen Analysen (n=2).
- Abbildung 31: Untersuchung von Label Retaining-Zellen an der DAOY-Zelllinie mittels durchflusszytometrischer Analyse aus drei unabhängigen Messreihen.
- Abbildung 32: Klonogenizität (Neurosphärenbildung) nach Bestrahlung: DAOY (obere Reihe) und D425 Med Zellen (untere Reihe).
- Abbildung 33: FACS-Analysen der humanen Medulloblastomzelllinien.
- Abbildung 34: FACS-Analysen der humanen Medulloblastomzelllinie D3484; zweifach gemessen.
- Abbildung 35: FACS-Analysen für Prominin1 und ALDEFLUOR der murinen Zelllinien D2855, D3419, D3799.
- Abbildung 36: FACS-Analysen für Prominin1 und ALDEFLUOR der murinen Zelllinien D3713, D3578, SJMM4.

### 8.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Antikörper und Bedingungen der immunhistochemischen Färbungen von Paraffin-eingebetteten Zellpellets.
- Tabelle 2: Assays zum Validieren der differentiell exprimierten Gene aus der Microarray-Analyse.
- Tabelle 3: Quellenangabe der verwendeten Zelllinien.
- Tabelle 4: Medienmischungen für die permanente Zellkultur.
- Tabelle 5: Lösungsmittel der Liganden für die Neurosphären-Assays.
- Tabelle 6: Repräsentative Werte der CD133-Expressionen aus den durchflusszytometrischen Messungen der Medulloblastom-Zelllinien.
- Tabelle 7: *CD133<sup>hoch</sup>* und *CD133<sup>niedrig</sup>* –exprimierende Zellen der D283 Med und D3484. RNA-Proben für die Microarray-Analyse.
- Tabelle 8: Überexprimierte Gene in CD133-angereicherten Proben beider Zelllinien.
- Tabelle 9: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Neurosphären in Stammzellmedium und Neurosphären kultiviert in Differenzierungsmedium („differenzierte Neurosphären“).
- Tabelle 10: Neurosphären der a) D425 Med und b) D3484-Linien auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten in Stammzell- und Differenzierungsmedium (differenzierte Neurosphären) kultiviert, -/+ Shh.
- Tabelle 11: Hochregulierte Gene in der CD133-positiven Subpopulation der D283Med-Zelllinie a) und b), sowie der D3484-Replikate, c) und d) entsprechend.
- Tabelle 12: Genetrail-Ergebnisse von hochregulierten Gengruppen bei der D283Med und D3484-Linie der CD133-positiven Fraktionen ( $P < 0,05$ ).

## **9 TAGUNGEN**

### **9.1 Vorträge**

XX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Lüneburger Heide, 6. - 9. Juni 2007. „CD133 expression of medulloblastoma cells: Relation to colony-forming activity“.

XXIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Lüneburger Heide, 7.-10. Juli 2010. „Characterization of medulloblastoma tumor stem cells“.

## 10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Torsten Pietsch, für seine Betreuung und Unterstützung in jeder Hinsicht, sein Vertrauen mir dieses interessante und anspruchsvolle Dissertationsthema zu überlassen, und der freundlichen Aufnahme in dem Institut für Neuropathologie, sowie das Ermöglichen frei zu denken und arbeiten.

Herrn Professor Dr. Michael Hoch möchte ich danken für die Begutachtung dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. I. Schmidt-Wolf bedanken für seine großzügige Hilfe und Erlaubnis an dem Durchflusszytometer, dem Coulter-Gerät, der Hämatologie und Onkologie (Mediz. Klinik und Poliklinik III im Venusberg) meine Analysen durchzuführen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Lange für ihre bedingungslose Hilfe und den genüsslichen Gesprächen mit ihr. Stets hatte sie ein freundliches, fröhliches und gutes Wort parat. Vernachlässigen möchte ich nicht Frau Läufigens und Frau Schenkel ebenfalls für ihre Hilfe.

Bei Herrn Professor Knolle und Frau Silke Hegenbarth möchte ich mich für die Benutzung des AutoMACS-Gerätes bedanken.

Für die professionelle Hilfe und der Erstellung der Microarray-Chips und –Analysen gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Uniklinikum Essen. Weiter, Herrn Klaus L. Meyer, Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Universität Düsseldorf, für die Zell-Sortierung am FACS-Sorter.

Die  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren DAPT, L-685,458 und LY-411575 wurden mir freundlicherweise von Frau Dr.rer.nat. Eva Czirr, AG Molekulare Neuropathologie, Institut für Neuropathologie, Uniklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt, für die ich mich bedanken möchte.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Frank van Landeghem bedanken, für seine Unterstützung bei einigen histologischen Färbungen, sowie den Damen und Herren im histologischen Labor.

Herrn Ulrich Klatt möchte ich danken, dass er immer für mich da war, wenn irgendwas am Rechner nicht lief, sowie den Hilfen zu den graphischen Bearbeitungen.

Frau Dr. Anke Waha und Herrn Dr. Andreas Waha für ihr offenes Ohr; besonders Frau Dr. Anke Waha danke ich für die Einführung in die real-time PCR. Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Martin Holst und Herrn Dr. Tobias Goschczik für die nie verweigerte Hilfe und ihren wertvollen Tipps.

Weiter möchte ich mich bei Allen im Institut und Labor für die heiteren Momente und ihrer einladenden Umgangsart bedanken, besonders bei Frau Dorota Denkhaus und Frau Anja zur Mühlen, die außerdem eine große Hilfe im Labor darstellten.

Aufgrund meiner ausgedehnten Verweilphasen am Diagnostik-Mikroskop möchte ich mich bei allen Ärzten ganz herzlich für ihr Verständnis bedanken.

Bei der Deutschen Krebshilfe für die Finanzierung und dem Forschungsverbund „Tumorstammzellen“ der Deutschen Krebshilfe. Bei Herrn Professor Dr. Beltinger möchte ich mich für den stetigen Informationsfluss per E-Mail bedanken.

Mein letztes Dankeswort gilt meinem Vater, meiner Mutter und meinem Bruder.

# 11 ANHANG

## 11.1 Differentiell überexprimierte Gene / Gengruppen aus der Microarray-Analyse

a) <i>D283Med, Probenpaar , I</i>					b) <i>D283Med, D283Med, Probenpaar Probenpaar 1, I 2, II</i>				
Probeset	Signal Log Ratio	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung		Probeset	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung
204304_s_at	1.45	PROM1	prominin 1		204304_s_at	1.45	1.5	PROM1	prominin 1
207575_at	5.28	GOLGA6	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 6		209660_at	1.66	4.3	TTR	transthyretin
205473_at	5.03	ATP6V1B1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1		205413_at	0.82	3	MPPED2	metallophosphoesterase domain containing 2
1556176_at	4.8	TAF8	TAF8 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor		206062_at	0.38	1.7	GUCA1A	guanylate cyclase activator 1A (retina)
1553261_x_at	4.65	ALS2CR11	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 11		221523_s_at	0.38	1.6	RRAGD	Ras-related GTP binding D
239898_x_at	4.54	ZNF286A	zinc finger protein 286A		1255_g_at	0.54	1.5	GUCA1A	guanylate cyclase activator 1A (retina)
1555326_a_at	3.5	ADAM9	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)		219642_s_at	1.04	1.5	PEX5L	peroxisomal biogenesis factor 5-like
227341_at	3.33	BEND7	BEN domain containing 7		221524_s_at	0.44	1.4	RRAGD	Ras-related GTP binding D
229042_s_at	3.25	DYNC1H1	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1		208690_s_at	0.49	1.1	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1
232864_s_at	3.2	AFF4	AF4/FMR2 family, member 4		210163_at	0.72	1.1	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
220019_s_at	2.71	ZNF224	zinc finger protein 224		213832_at	0.39	1.1	KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3
204530_s_at	2.45	TOX	thymocyte selection-associated high mobility group box		216512_s_at	0.73	1.1	DCT	dopachrome tautomerase
223627_at	2.14	MEX3B	mex-3 homolog B (C. elegans)		201924_at	0.39	0.9	AFF1	AF4/FMR2 family, member 1
225034_at	2.12	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1		228375_at	1.11	0.9	IGSF11	immunoglobulin superfamily, member 11
209920_at	2.05	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II		204451_at	0.45	0.8	FZD1	frizzled homolog 1 (Drosophila)
227169_at	1.82	DNAJC18	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 18		213385_at	0.89	0.8	CHN2	chimerin (chimaerin) 2
239068_at	1.81	GNL1	guanine nucleotide binding protein-like 1		217867_x_at	0.45	0.8	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2
209660_at	1.66	TTR	transthyretin		218684_at	0.74	0.8	LRRC8D	leucine rich repeat containing 8 family, member D
239282_at	1.56	CCDC41	coiled-coil domain containing 41		242447_at	0.67	0.8	C3orf70	chromosome 3 open reading frame 70
1555167_s_at	1.41	NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase		1557385_at	0.38	0.6	FAM161A	family with sequence similarity 161, member A
217862_at	1.39	PIAS1	protein inhibitor of activated STAT, 1		209436_at	0.6	0.6	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein
206105_at	1.37	AFF2	AF4/FMR2 family, member 2		222446_s_at	0.36	0.6	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2
229000_at	1.34	ZNF77	zinc finger protein 77		226525_at	0.41	0.6	STK17B	serine/threonine kinase 17b
228563_at	1.28	GJC1	gap junction protein, gamma 1, 45kDa		229254_at	0.61	0.6	MFSD4	major facilitator superfamily domain containing 4
204491_at	1.17	PDE4D	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific		238778_at	0.49	0.6	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)
205129_at	1.16	NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin, 3		37892_at	0.46	0.6	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
219679_s_at	1.11	WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil		200612_s_at	0.81	0.5	AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
228375_at	1.11	IGSF11	immunoglobulin superfamily, member 11		201554_x_at	0.45	0.5	GYG1	glycogenin 1
219642_s_at	1.04	PEX5L	peroxisomal biogenesis factor 5-like		203740_at	0.69	0.5	MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6
207642_at	1.01	HCRT	hypocretin (orexin) neuropeptide precursor		210039_s_at	0.69	0.5	PRKCC	protein kinase C, theta

# ANHANG

c) <i>D3484, Probenpaar 1, III</i> <i>D3484, Probenpaar 2, IV</i>					d) <i>D3484, Probenpaar 1, III</i> <i>D3484, Probenpaar 2, IV</i> <span style="float: right;">(Fortsetzung)</span>				
Probeset	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung	Probeset	Signal Log Ratio	Signal Log Ratio	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung
204304_s_at	2.9	2.1	PROM1	prominin 1	209541_at	3.7	2.8	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
201667_at	7.1	8.6	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	38918_at	3.5	2.6	SOX13	SRY (sex determining region Y)-box 13
211427_s_at	6.9	4.4	KCNJ13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	221958_s_at	3.3	2.7	WLS	wntless homolog (Drosophila)
205856_at	6.8	4.6	SLC14A1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	202196_s_at	3.1	1.8	DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
217525_at	6.4	7.7	OLFML1	olfactomedin-like 1	216268_s_at	3	3.1	JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)
229151_at	6.3	6.9	SLC14A1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	221245_s_at	3	4.2	FZD5	frizzled homolog 5 (Drosophila)
210179_at	6.2	5.6	KCNJ13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	209099_x_at	2.8	3.7	JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)
211959_at	6.1	8.9	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	219213_at	2.8	2.9	JAM2	junctional adhesion molecule 2
213069_at	5.9	6.5	HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)	228950_s_at	2.8	2.5	WLS	wntless homolog (Drosophila)
1569054_at	5.6	7.6	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	202718_at	2.6	3.7	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
223316_at	5.4	5.8	CCDC3	coiled-coil domain containing 3	203394_s_at	2.4	2.7	HES1	hairly and enhancer of split 1, (Drosophila)
205051_s_at	5.3	6.7	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	203167_at	2.3	4.6	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
238943_at	5.3	5	FIBCD1	fibrinogen C domain containing 1	217028_at	2.3	2	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
1555253_at	5.2	6.4	COL25A1	collagen, type XXV, alpha 1	231798_at	2.3	1.9	NOG	noggin
205107_s_at	5.2	3.2	EFNA4	ephrin-A4	242455_at	2.2	3.5	POU3F2	POU class 3 homeobox 2
205945_at	5.2	3.3	IL6R	interleukin 6 receptor	226913_s_at	1.9	5.7	SOX8	SRY (sex determining region Y)-box 8
204187_at	5.1	3.4	GMPR	guanosine monophosphate reductase	208891_at	1.8	2	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
201147_s_at	4.9	5.4	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	222162_s_at	1.6	1.7	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
201655_s_at	4.9	4.4	HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2	202936_s_at	1.4	1.3	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
206618_at	4.9	3.7	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	205990_s_at	1.4	1.9	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
201280_s_at	4.8	5.5	DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	205201_at	1.2	3.2	GLI3	GLI family zinc finger 3
219255_x_at	4.8	5.9	IL17RB	interleukin 17 receptor B	212385_at	1.2	0.7	TCF4	transcription factor 4
203088_at	4.7	7.2	FBLN5	fibulin 5	203085_s_at	1.1	2.3	TGFB1	transforming growth factor, beta 1
209189_at	4.7	4.2	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	204032_at	2.1	2.6	BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3
212554_at	4.7	4.5	CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	226814_at	2	2.9	ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9
220087_at	4.7	4.8	BCMO1	beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	226913_s_at	1.9	5.7	SOX8	SRY (sex determining region Y)-box 8
226333_at	4.7	3.4	IL6R	interleukin 6 receptor	238592_at	1.2	2.6	PDLIM3	PDZ and LIM domain 3
238049_at	4.7	1.6	GRAMD3	GRAM domain containing 3	209501_at	1.2	1.5	CDR2	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa
201150_s_at	4.6	4.6	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	212385_at	1.2	0.7	TCF4	transcription factor 4
213342_at	4.6	4.1	YAP1	Yes-associated protein 1	201426_s_at	1.1	1.2	VIM	vimentin
1553764_a_at	4.5	4.7	JUB	jub, ajuba homolog (Xenopus laevis)	209591_s_at	1.1	1.2	BMP7	bone morphogenetic protein 7
205413_at	2.3	1.3	MPPED2	metallophosphoesterase domain containing 2	202440_s_at	1.1	1.1	ST5	suppression of tumorigenicity 5
203180_at	2.1	3.2	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	212761_at	1.1	0.5	TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
217867_x_at	1.8	2.1	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	213698_at	1.1	1.4	ZMYM6	zinc finger, MYM-type 6
205286_at	1.5	6	TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma	219051_x_at	1.4	1.7	METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator

Tabelle 11: Hochregulierte Gene in der CD133-positiven Subpopulation der D283Med-Zelllinie a) und b), sowie der D3484-Replikate, c) und d) entsprechend.



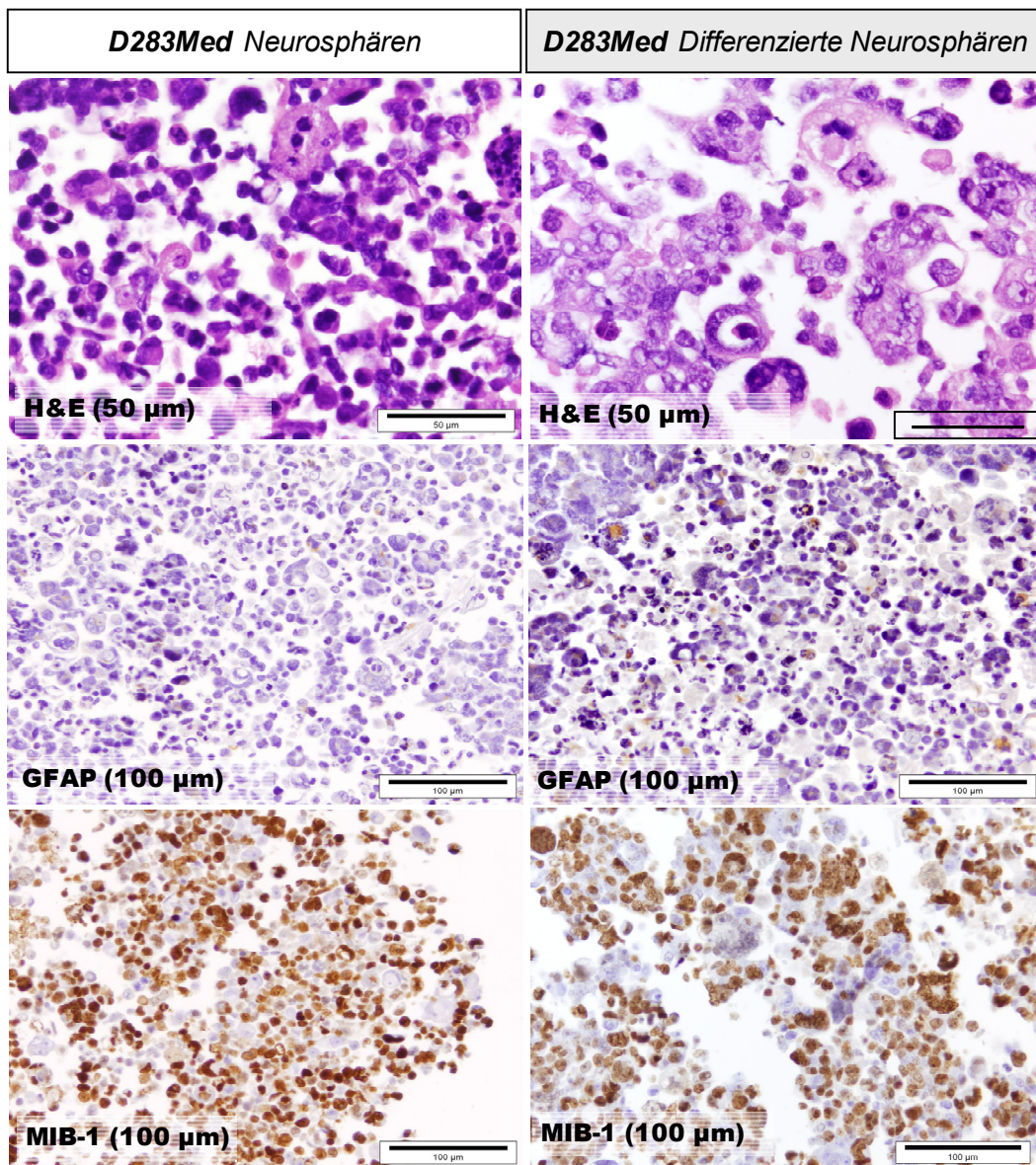
	Category	Subcategory	expected	observed	p-value
<b>D283Med/II</b>	<b>KEGG</b>	<i>ECM-receptor interaction</i>	8,63527	19	0,0355369
	<b>KEGG</b>	<i>Focal adhesion</i>	26,4946	43	0,0355369
<b>D3484</b>	<b>KEGG</b>	<i>Cell cycle</i>	16,3373	32	0,0124496
	<b>TRANSPATH</b>	<i>Aurora-A cell cycle regulation</i>	1,37209	5	0,0375585
	<b>TRANSPATH</b>	<i>Aurora-B cell cycle regulation</i>	1,71512	6	0,0375585

**Tabelle 12: Genetrail-Ergebnisse von hochregulierten Gengruppen bei der D283Med und D3484-Linie der**

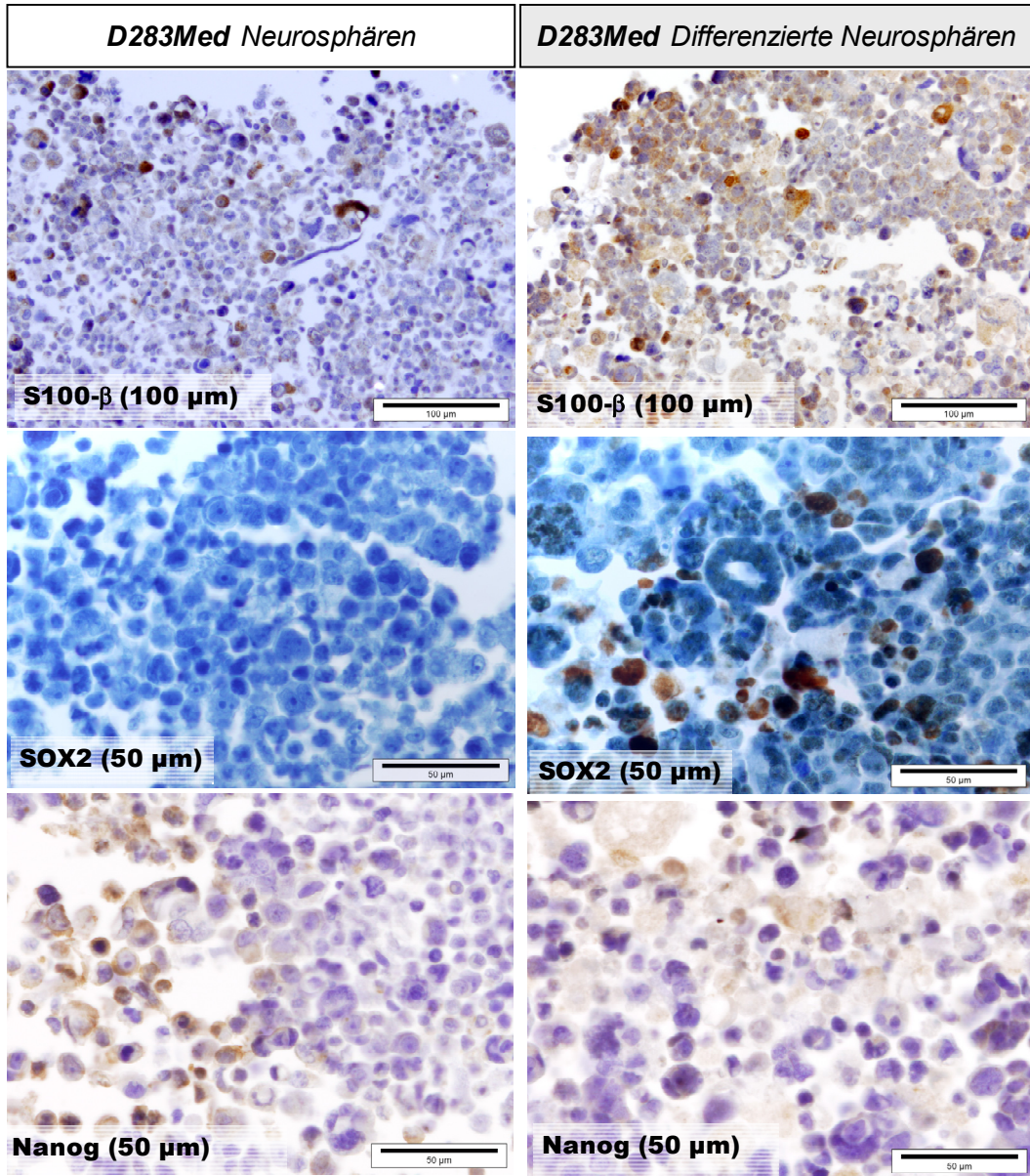
**CD133-positiven Fraktionen (P<0,05).** Zwei Gen-Gruppen aus KEGG erschienen für das Probenpaar 2 der CD133-positiven D283Med-Zellen. Es handelt sich um hochregulierte Gen-Gruppen, die an Signalwegen der extrazellulären Matrix und der Adhäsion beteiligt sind. Bei den CD133-hoch- vs. CD133-niedrig exprimierenden Proben beider Probenpaare der D3484-Linie finden sich Gene des Zellzyklus als hochreguliert. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) als eine Sammlung von Datenbanken, versucht globale biologische Informationen durch die Interaktionen von Genen mit unterschiedlichen Parametern innerhalb einer lebenden Zelle zu geben. Zwei Gengruppen fanden sich in TRANSPATH, der Datenbank aus beteiligten Signalmolekülen eines Signalweges (gruppierte Signalwegsreaktionen). Die Familie der Aurora-Kinasen könnte bei der Regulation der Zellzyklusphasen beteiligt sein, die als überexprimiert in CD133-positive Medulloblastomzellen vorkommen.

## 11.2 Immunhistochemische Färbungen

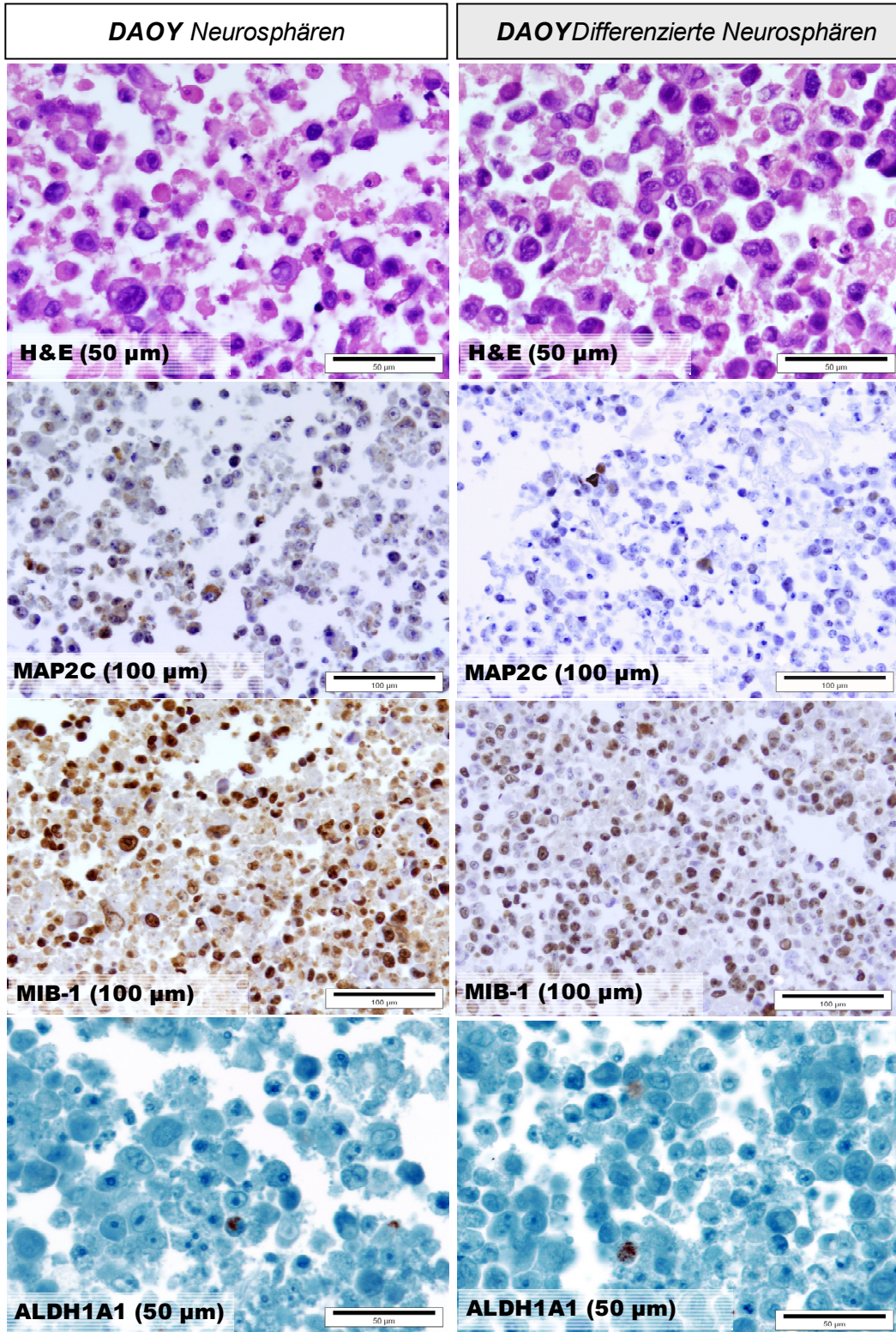
In Stammzellmedium generierte Neurosphären sowie in Differenzierungsmedium differenzierte Neurosphären, von denen Paraffinschnitte hergestellt und immunhistochemisch für Differenzierungsmarker und einige Stammzellmarker, wie Sox2, Nanog und ALDH1A1 gefärbt wurden, sind unten abgebildet.



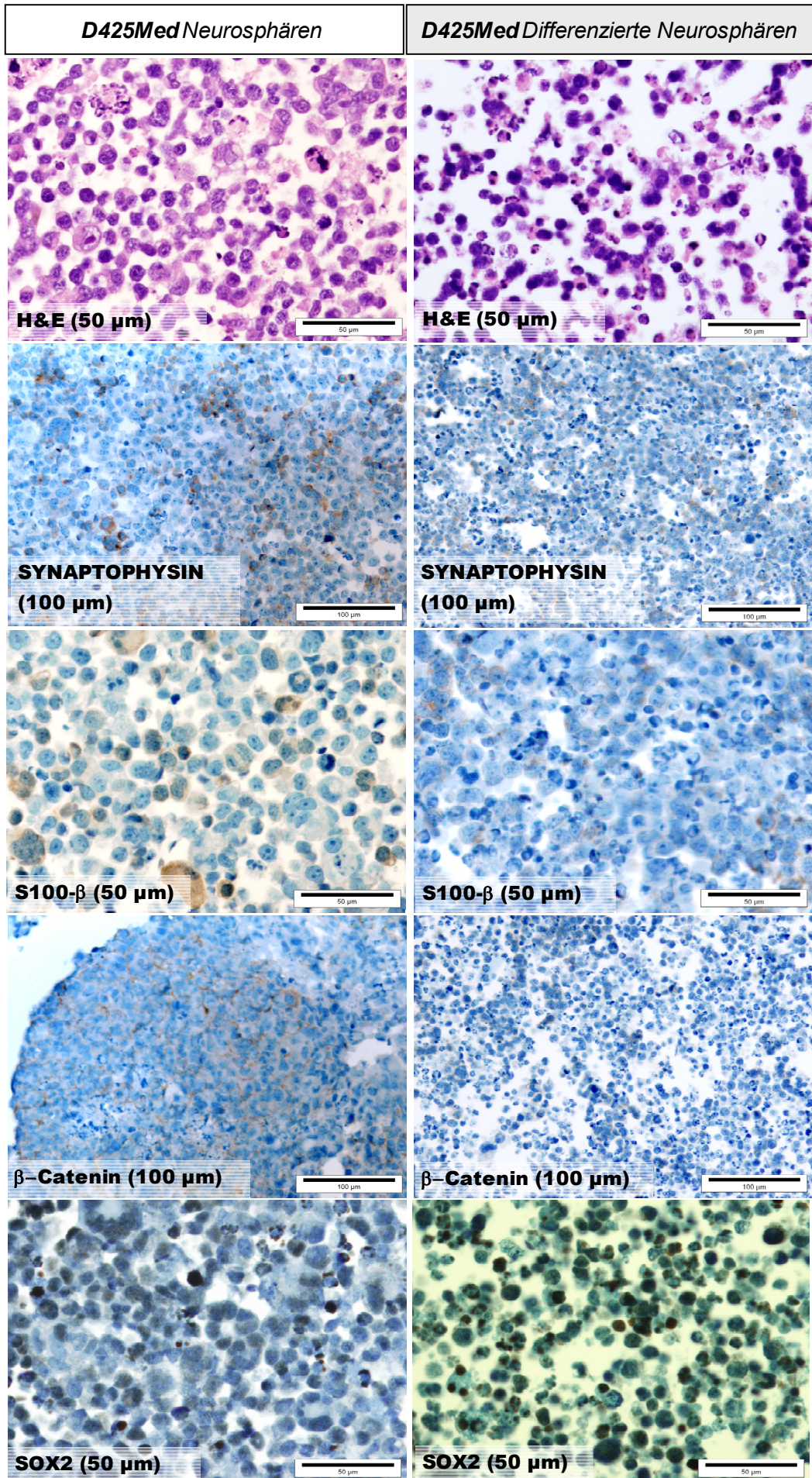




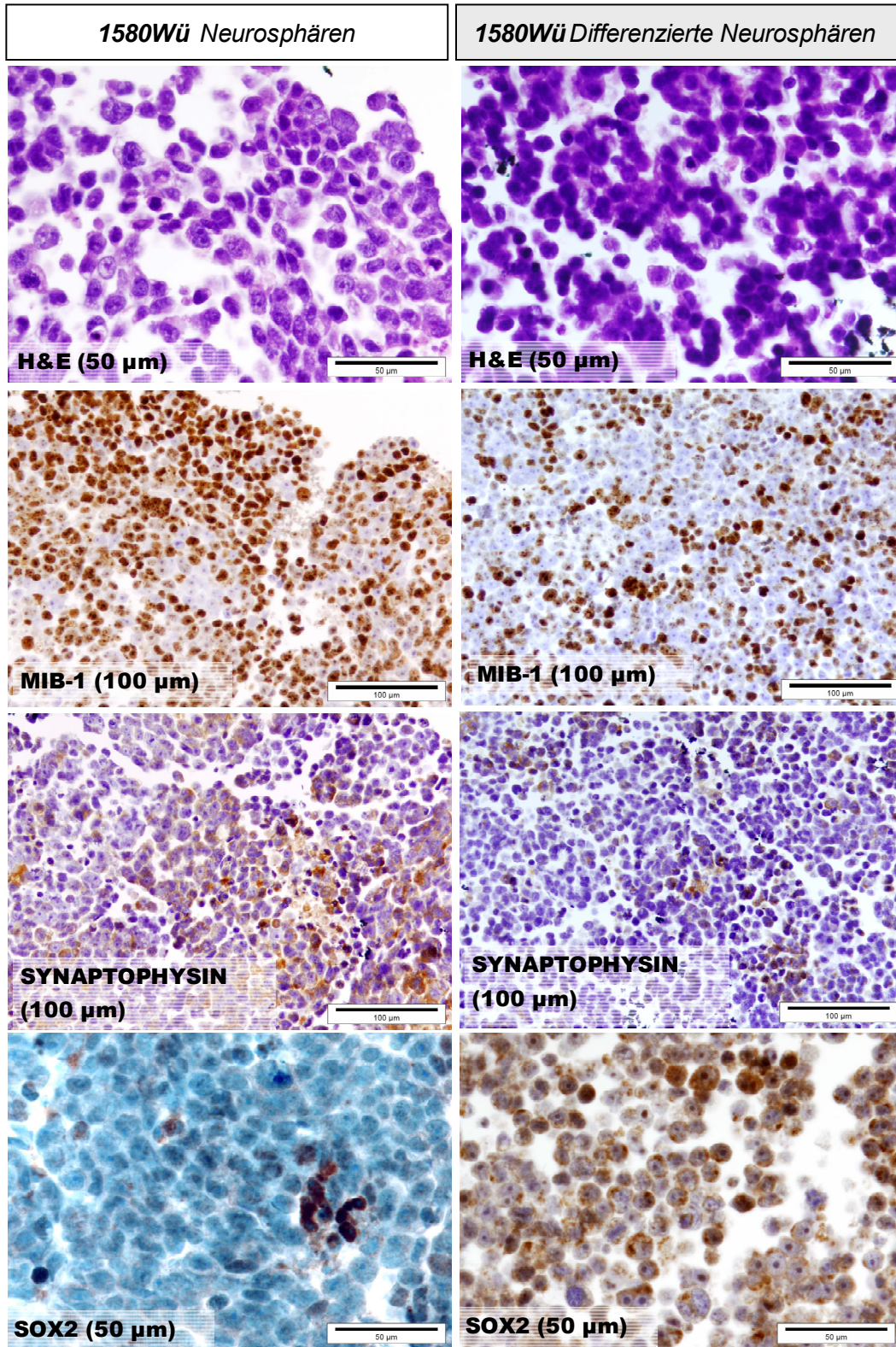




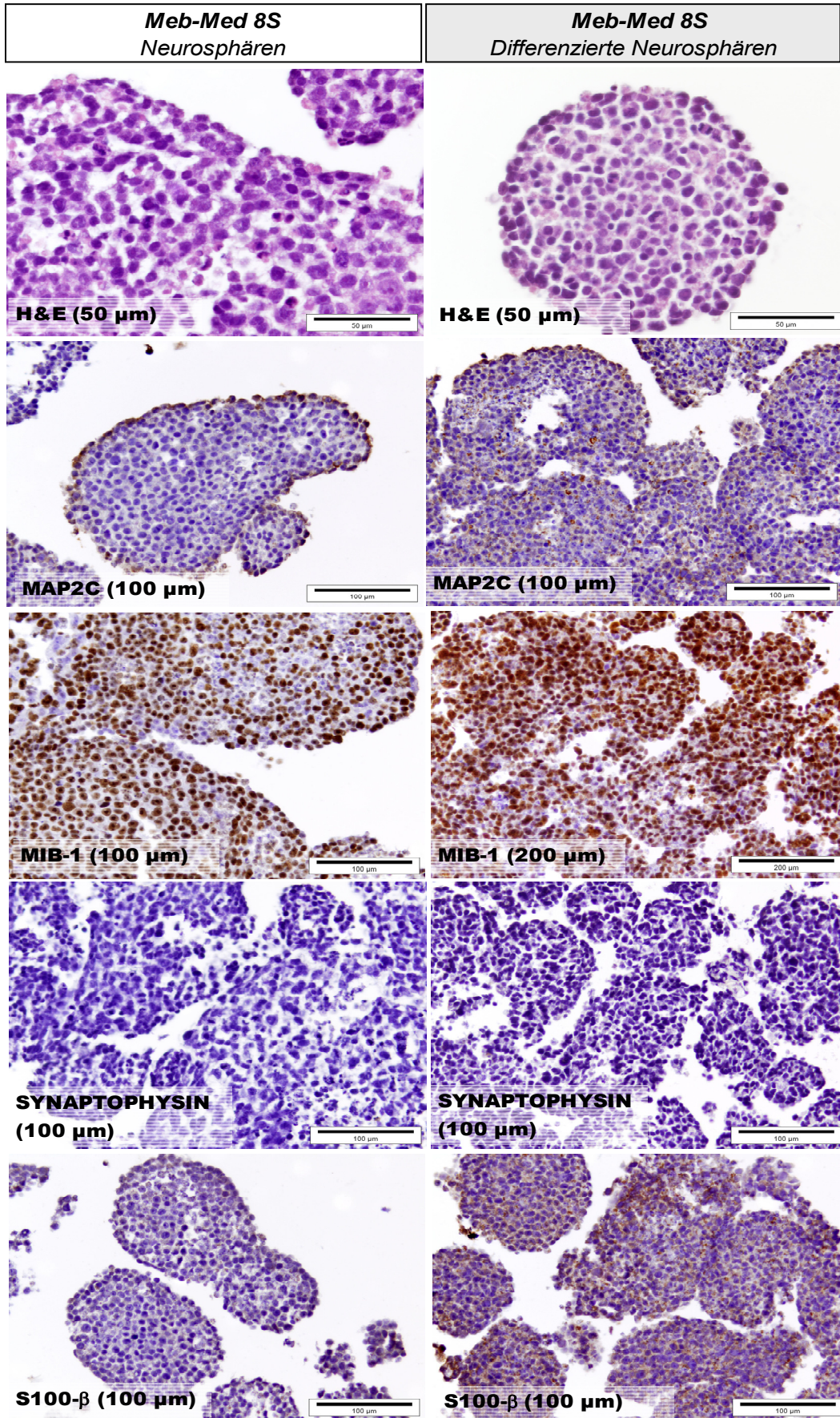




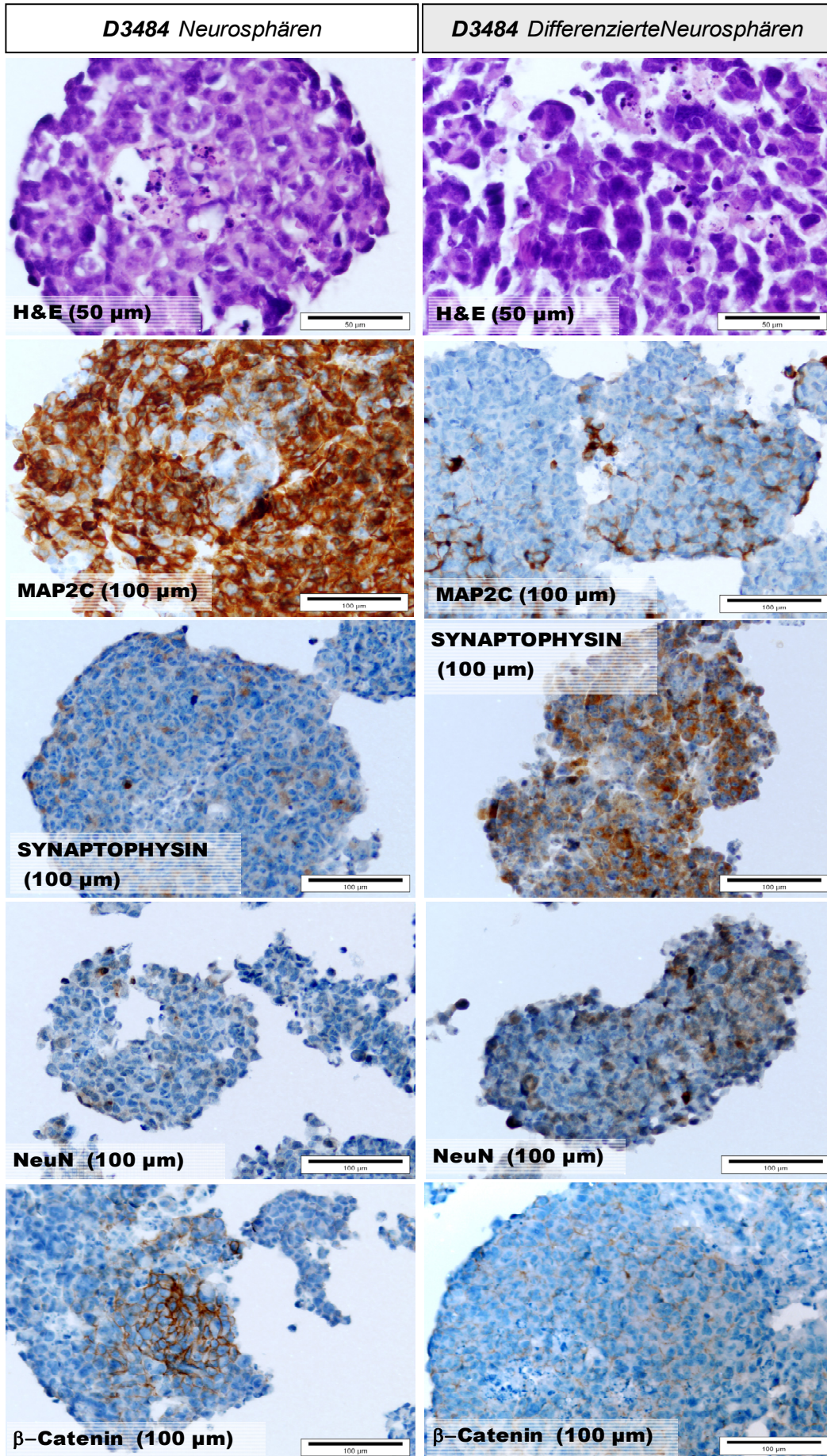






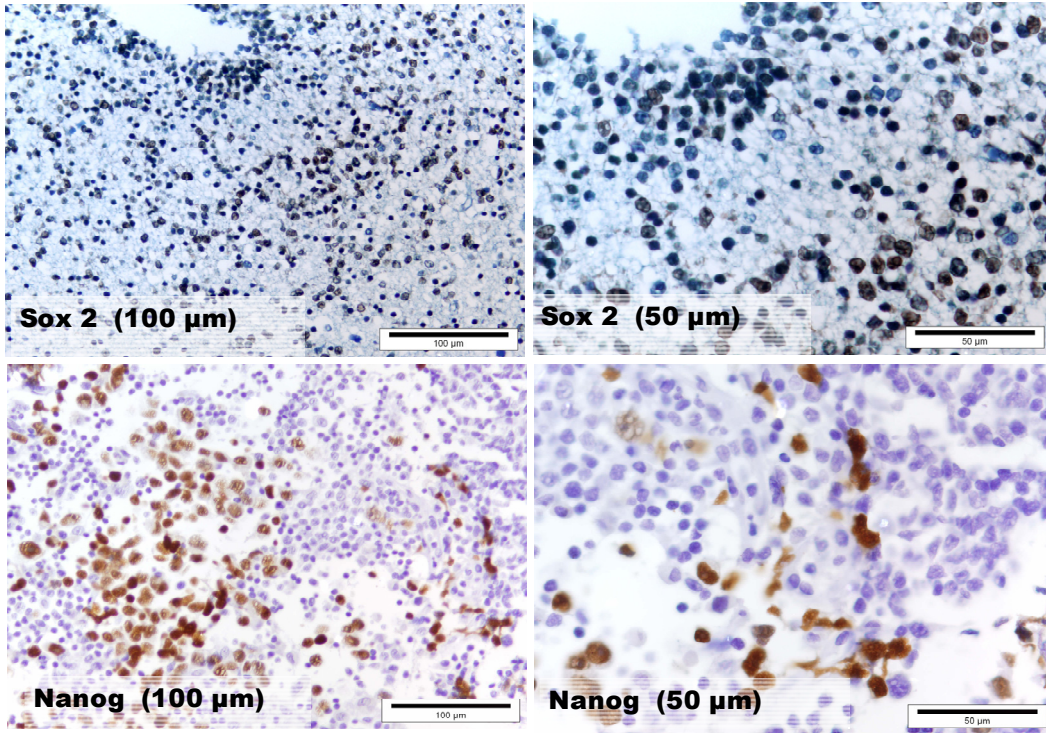








**Kontrolle: Sox 2 - Nanog**



11.3 Doppelfärbung: ALDH-Aktivität und CD133 / Prominin

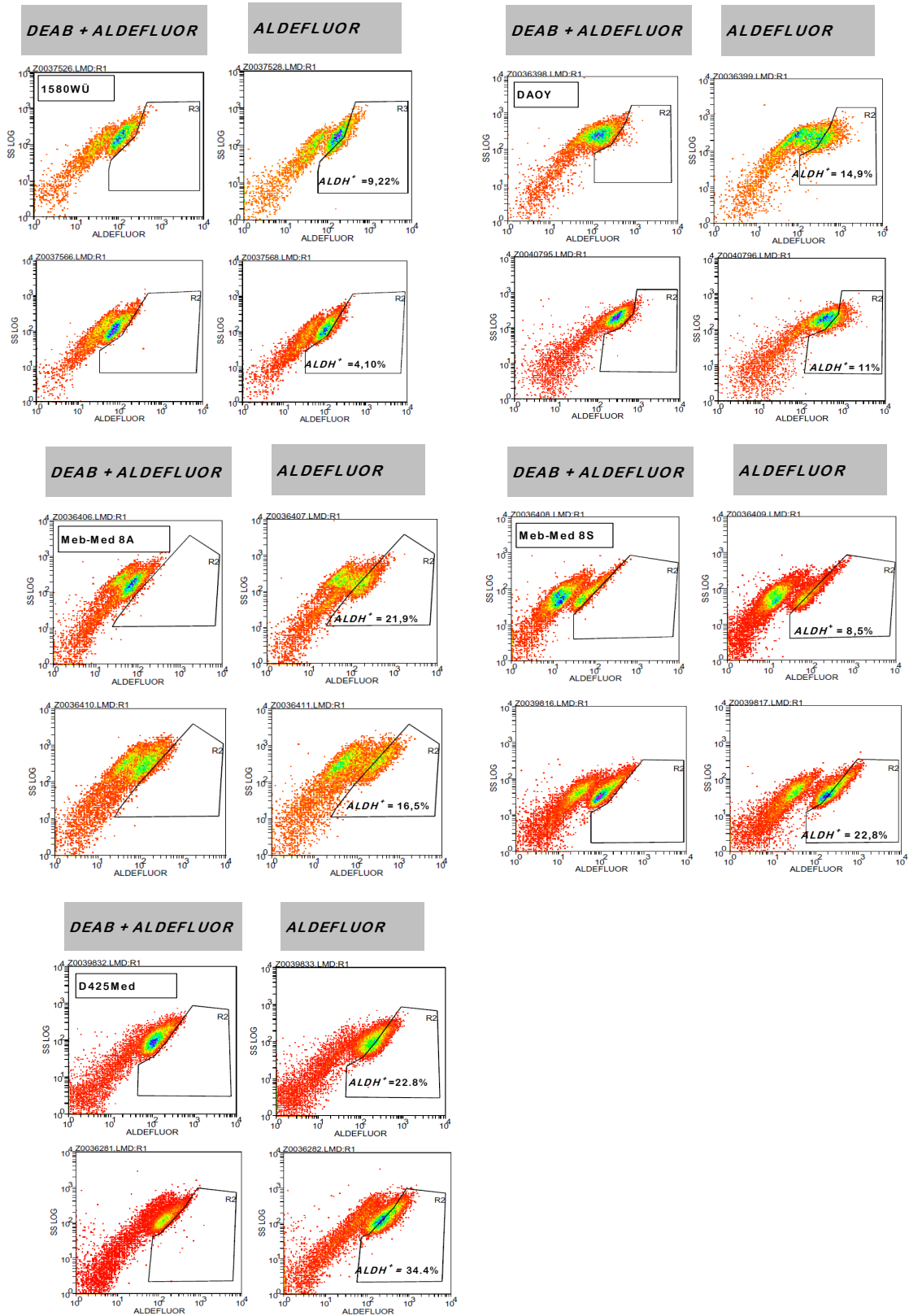
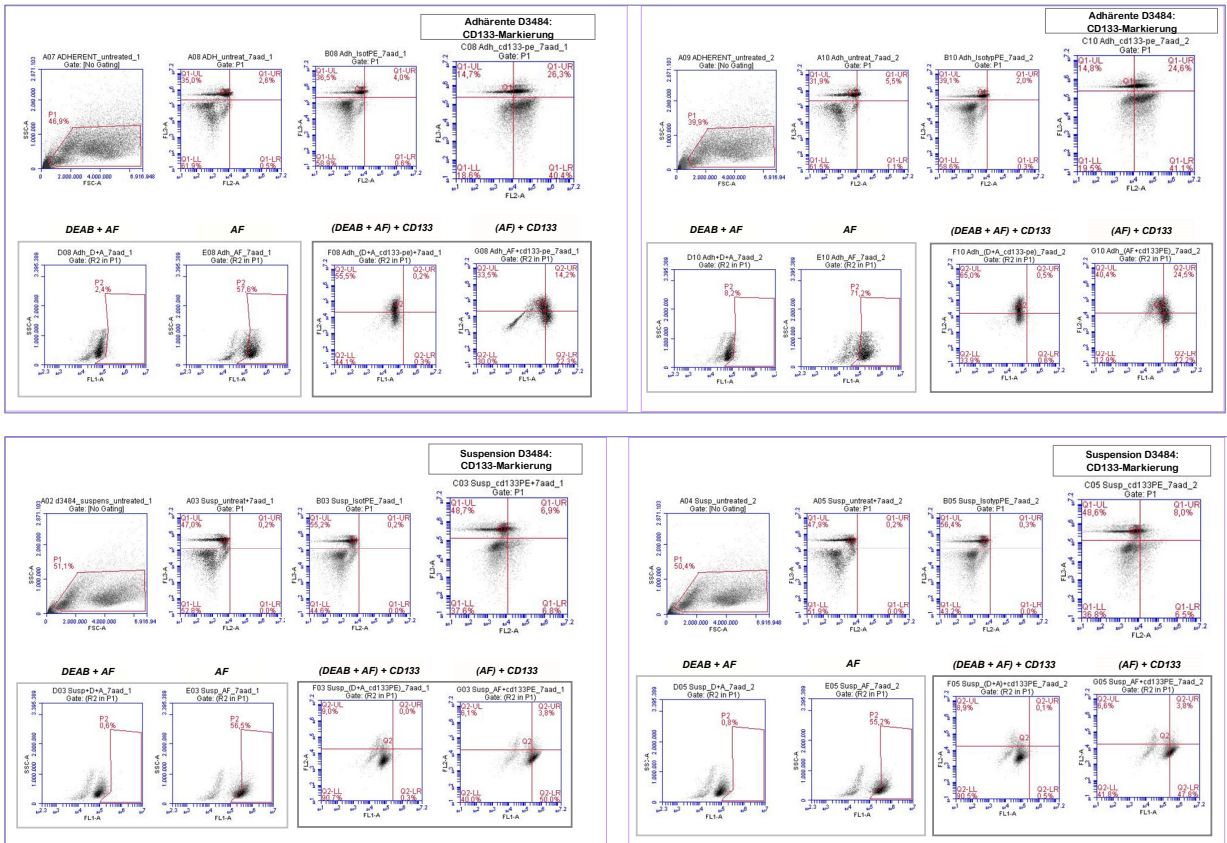


Abbildung 33: FACS-Analysen der humanen Medulloblastomzelllinien. Einfachmarkierungen mit dem ALDEFLUOR-Reagenz. DEAB und ALDEFLUOR stellte die Negativ-Kontrolle. Zweifach gemessen.



**Abbildung 34: FACS-Analysen der humanen Medulloblastomzelllinie D3484; zweifach gemessen. Oben: adhärenz D3484; unten: D3484 in Suspension.** Wiederholungs-Messungen nebeneinander dargestellt. Einfachmarkierungen mit dem ALDEFLUOR-Reagenz und für die CD133-Expression. Doppelmarkierungen mit ALDEFLUOR (FL1-Kanal) und CD133-PE/2-Antikörper (FL2-Kanal). DEAB und ALDEFLUOR stellte die Negativ-Kontrolle.

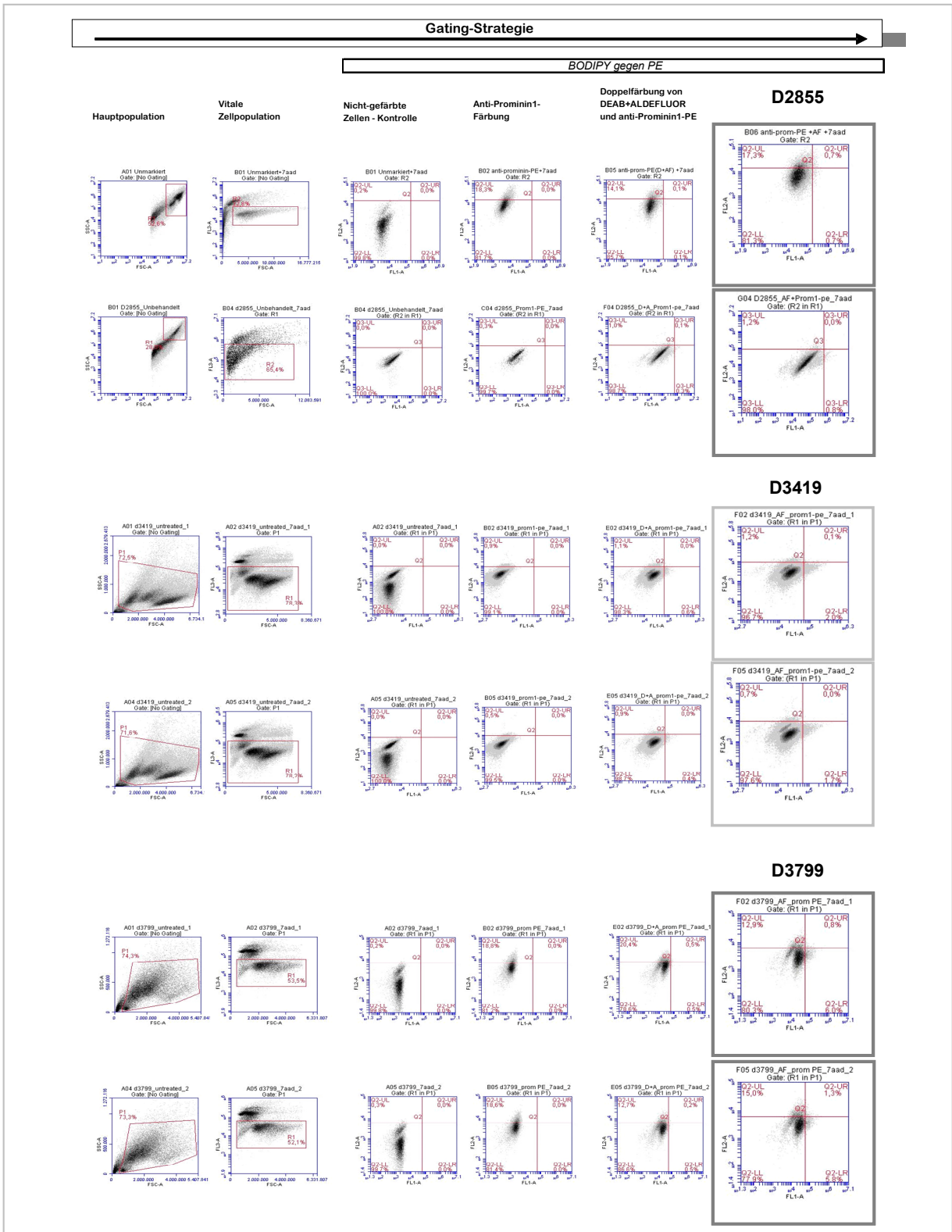


Abbildung 35: FACS-Analysen für Prominin1 und ALDEFLUOR der murinen Zelllinien D2855, D3419, D3799.



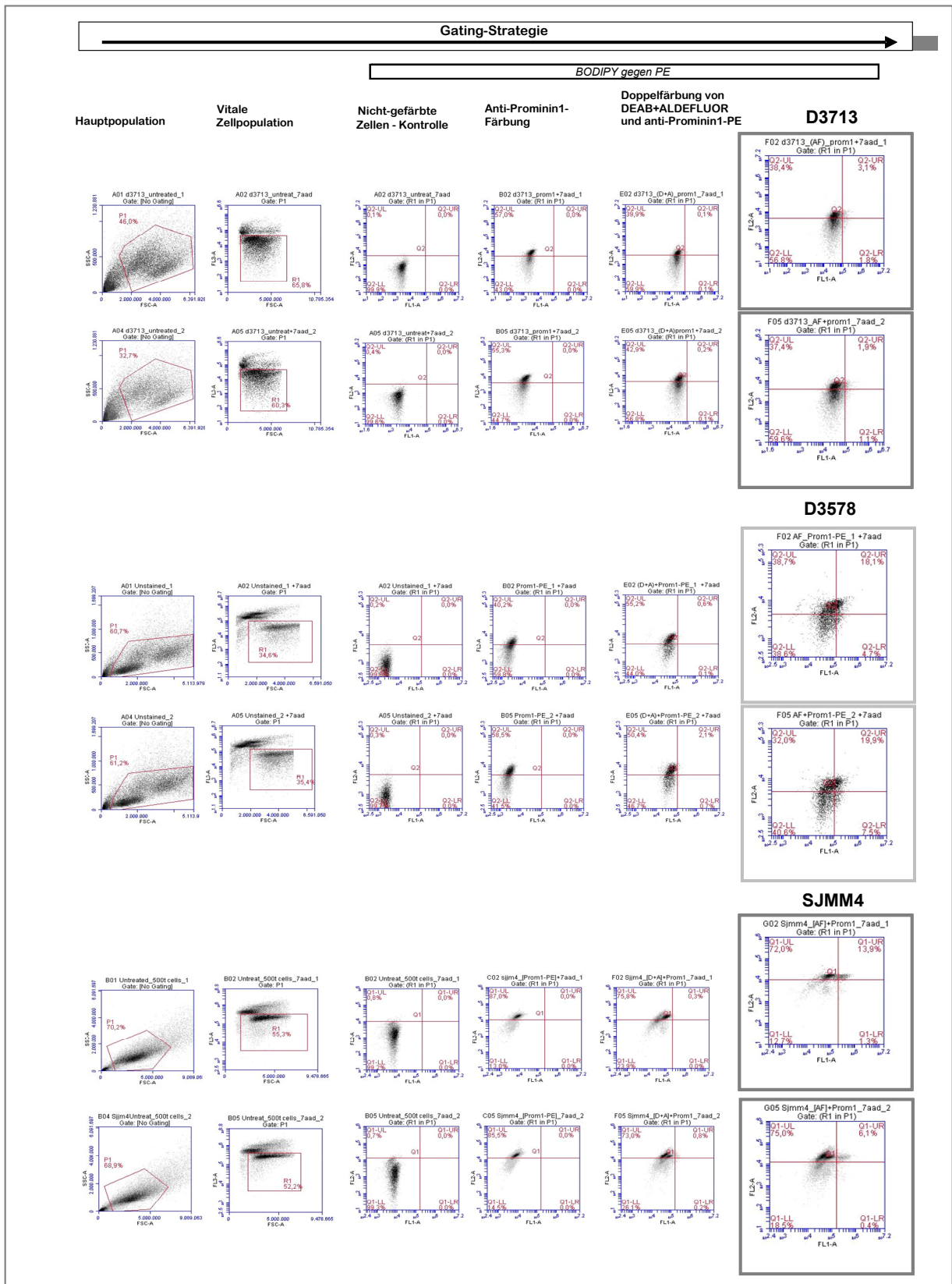


Abbildung 36: FACS-Analysen für Prominin1 und ALDEFLUOR der murinen Zelllinien D3713, D3578, SJMM4.