

**Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier**

**Epigenetische Regulation der Sox2- (sex determining
region Y (SRY)- box 2) Expression in stammzellähnlichen
Gliomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Sven Lichthardt
aus Fürth (Bayern)

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tobias Bäumer

Tag der mündlichen Prüfung: 9.4.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 9.4.2019

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Klinik und Diagnostik des Glioblastoma multiforme.....	1
1.2 Genetische Basis des Glioblastoma multiforme.....	2
1.3 Therapie des Glioblastoma multiforme.....	5
1.4 Gliomstammzellen.....	7
1.5 Pluripotenzfaktoren.....	12
1.6 Epigenetische Regulation von Genexpression.....	13
1.7 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultur.....	26
2.2.2 Durchflusszytometrie.....	27
2.2.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot.....	29
2.2.4 Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP).....	31
2.2.5 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	36
2.2.6 Statistik.....	42
3 Ergebnisse.....	43
3.1 Konzept und Vorarbeiten.....	43
3.1.1 Sox2-Proteinexpression in Mutterkulturen.....	43
3.1.2 Vorarbeiten für die Methylierungsspezifische PCR (MSP).....	44
3.1.3 Vorarbeiten zur Chromatinimmunpräzipitation.....	47
3.2 Analyse des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen in GBM-Klonen.....	48
3.2.1 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1338.....	49
3.2.2 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1440.....	51
3.2.3 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1452.....	53
3.2.4 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1464.....	55
3.2.5 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1495.....	57
3.2.6 Fazit der MSP-Analyse.....	59
3.3 Epigenetische Analysen ausgewählter SLGC-Kulturen mittels ChIP.....	60

Inhaltsverzeichnis

3.4	Durchflusszytometrische Analyse der CD133-Expression in GBM- und GSarc-Klonen....	66
3.4.1	Anteil an CD133+ Zellen – T1338-Klone	67
3.4.2	Anteil an CD133+ Zellen – T1371-Klone	68
3.4.3	Anteil an CD133+ Zellen – T1447-Klone	69
3.4.4	Anteil an CD133+ Zellen – T1452 Klone	70
3.4.5	Anteil an CD133+ Zellen – T1495-Klone	71
3.4.6	Fazit der Durchflusszytometrie	72
3.5	Korrelationsanalysen.....	73
3.5.1	Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3.....	73
3.5.2	Korrelation des Anteils CD133+ Zellen und Sox2-Promotormethylierung.....	75
4	Diskussion.....	77
4.1	Der Anteil CD133+ Zellen variiert zwischen den SLGC-Klonen und Mutterkulturen	78
4.2	Die Sox2-Promotormethylierung variiert in Abhängigkeit von Region und SLGC-Linie...	83
4.3	Offenes und geschlossenes Chromatin im Bereich von Sox2- und Oct3/4-Promotor	89
4.4	Evaluation des Modells der zellulären Hierarchie anhand von CD133- und Sox2-Daten	92
4.5	Konklusion und kritischer Ausblick.....	94
5	Zusammenfassung.....	95
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Anhang	105
7.1	Ethik-Votum	105
7.2	Abbildungen	107
8	Danksagungen.....	108
9	Lebenslauf	109
10	Eidesstattliche Erklärung.....	111

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien	18
Tab. 2: Geräte und Software	19
Tab. 3: Pipetten und weiteres Zubehör	20
Tab. 4: Puffer und Lösungen.....	20
Tab. 5: Chemikalien und Enzyme.....	21
Tab. 6a: Zellkulturmedien.....	22
Tab. 6b: Komponenten für Zellkulturmedien	22
Tab. 7: Kits	22
Tab. 8: Antikörper für Durchflusszytometrie, Western-Blot und Chromatinimmunpräzipitation	23
Tab. 9: Oligonukleotide für methylierungsspezifische PCR.....	23
Tab. 10: Primer für die PCR nach Chromatinimmunpräzipitation.....	24
Tab. 11: Charakteristika der für SLGC-Mutterkulturen verwendeten Primärtumoren	24
Tab. 12: Modifizierte DNA zur Optimierung der MSP	25
Tab. 13: Komponenten des Trenn- und Sammelgels der SDS-PAGE	30
Tab. 14: Komponenten des MSP-Master-Mixes.....	35
Tab. 15: Komponenten des Master-Mixes der CHIP-PCR	40
Tab. 16: Anteil CD133+ Zellen in der T1338 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen.....	67
Tab. 17: Anteil CD133+ Zellen in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen.....	68
Tab. 18: Anteil CD133+ Zellen in der T1447 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen.....	69
Tab. 19: Anteil CD133+ Zellen in der T1452 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen.....	70
Tab. 20: Anteil CD133+ Zellen in der T1495 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Veränderungen in der Pathogenese unterschiedlicher Subtypen des Glioblastoma multiforme.....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des (A) klonalen Evolutionsmodells und des (B) Tumorstammzellmodells	7
Abb. 3: Epigenetische Regulationsmechanismen.	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der Bisulfitreaktion (A) und deren Abhängigkeit des Methylierungsstatus (B).....	32
Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der ChIP (Chromatinimmunpräzipitation).	36
Abb. 6: Western-Blot-Analyse zur Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Sox2 in ausgewählten SLGC-Mutterkulturen von Glioblastomen und Gliosarkomen.	43
Abb. 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der MSP-Produkte, die bei MgCl ₂ -Konzentrationen von 1,5 bis 2,5 mM amplifiziert wurden.	45
Abb. 8: Agarosegelelektrophorese des isolierten Chromatins nach Freisetzung und Reinigung der DNA.	47
Abb. 9: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1338.....	49
Abb. 10: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1338 Mutterkultur und abgeleiteter Klone.	50
Abb. 11: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1440.....	51
Abb. 12: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1440 Mutterkultur und abgeleiteter Klone.	52
Abb. 13: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1452.....	53
Abb. 14: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der von T1452 Mutterkultur abgeleiteter Klone.	54
Abb. 15: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1464.....	55
Abb. 16: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der von T1464 Mutterkultur abgeleiteter Klone.	56
Abb. 17: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1495.....	57
Abb. 18: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1495 Mutterkultur und abgeleiteter Klone.	58
Abb. 19: Darstellung der relativen Methylierung der Sox2- Promotorregionen 2 (A) und 3 (B). ...	59
Abb. 20: Semi-quantitative PCR des RPL 30 Exon 3 nach Chromatinimmunpräzipitation.	60
Abb. 21: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) des Sox2-Promotors.....	62
Abb. 22: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) des Oct3/4-Promotors.	64
Abb. 23: Punktwolkendiagramm eines Isotyp-Antikörper (B) und CD133/2-PE (C) markierten Aliquots der SLGC-Linie T1452 cl-20 p18.....	66
Abb. 24: Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 in SLGC-Linien.....	73
Abb. 25: Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 (rot) und 3 (blau) gegen den Anteil CD133+ Zellen.....	75
Abb. 26: Durchflusszytometrie der CD133-Expression verschiedener SLGC-Linien.	107

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
A	Adenin
ABC	engl.: adenosine triphosphate-binding cassette
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCPC	Gehirn-Tumor-propagierende Zelle
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BIT	Bovines Albumin/Insulin/Transferrin
bp	Basenpaare
BTPS	engl.: brain tumor polyposis syndrome
BTSC	Gehirntumorstammzelle
C	Cytosin
CaCo2	Kolonkarzinomzelllinie
CAnaCore	Cell Analysis Core Facility
Cas9	CRISPR associated protein 9
CBTRUS	engl.: Central Brain Tumor Registry of the United States
CD	engl.: cluster of differentiation
CD133	Prominin-1
CD31/PECAM	engl.: platelet endothelial cell adhesion molecule
CD44	Hyaluronsäurerezeptor
CDKN2A	engl.: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CI	Konfidenzintervall
cl	Klonkultur
c-myc	engl.: cancers-Myelocytomatosis gene
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin
CRISPR	engl.: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFZ	Durchfluszytometrie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ESC	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FABP7	engl.: fatty acid binding protein 7
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Abkürzungsverzeichnis

FGF4	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4
FSC	engl.: forward scatter
G	Guanin
GABRA1	Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor (Alpha 1 Untereinheit)
GAMPO	engl.: Goat F(ab') ₂ Fragment Anti-Mouse IgG-Peroxidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GARPO	engl.: Goat F(ab') ₂ Fragment Anti-Rabbit IgG-Peroxidase
GBM	Glioblastoma multiforme
GSC	Gliomstammzelle
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histon
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histondeacetylase
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HMG	engl.: high-mobility group
huEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
hu-bFGF	humaner basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
JLB	engl.: Jurkat lysis buffer
K	Lysylrest
kbp	kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Klf4	engl.: Kruppel-like factor 4
lncRNA	engl.: long non-coding RNA
MC	Mutterkultur
MeCP2	engl.: methyl-CpG-binding protein 2
MERTK	engl.: proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesium-2-Chlorid
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase
MIAT	engl.: myocardial infarction associated transcript
miRNA	microRNA
MLH1	Mut L Homolog 1
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	Mut S Homolog 2
MSP	methylierungsspezifische PCR
MTIC	engl.: 5-(3- <i>N</i> -methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	engl.: non-coding RNA
NEFL	engl.: neurofilament light polypeptide
NF1	Neurofibromin 1

Abkürzungsverzeichnis

NF- κ B	engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPC	neurale Progenitorzelle
NSC	neurale Stammzelle
Oct3/4	engl.: octamer-binding-protein 4
p	Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFRA	engl.: platelet-derived growth factor receptor A
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMS2	engl.: postmeiotic segregation increased 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POU	Pit-2, Oct-1 oder Oct-2, Unc86
PTEN	engl.: phosphatase and tensin homolog
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RNA	Ribonukleinsäure
RPL 30	Ribosomales Protein 30
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCID	engl.: severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	engl.: small interfering RNA
SLC12A5	engl.: potassium-chloride transporter member 5
SLGC	engl.: stem-like glioma cell
Sox2	engl.: sex determining region Y-box 2
SRY	engl.: sex determining region Y
SSC	engl.: side scatter
SYT1	Synaptotagmin-1
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TE	TRIS-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEN	TRIS-EDTA-NaCl
TIC	tumorinitiierende Zelle
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumorsuppressor p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U87-MG	engl.: Uppsala 87 Malignant Glioma
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WB	Western-Blot
WCE	Gesamtzellproteinextrakt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem
α	Antikörper

1 Einleitung

1.1 Klinik und Diagnostik des Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein hochmaligner glialer Tumor astrozytären Ursprungs, welcher zu diffus-infiltrativem Wachstum sowie rascher Ausbreitung entlang kompakter Myelinbahnen neigt (Aguzzi et al., 2008).

Der Begriff Glioblastoma multiforme wurde bereits 1926 von Percival Bailey und Harvey Cushing geprägt. Maßgeblich hierfür war zum einen die Hypothese, dass sich die Tumoren aus Glioblasten entwickeln, zum anderen die Beobachtung, dass das Erscheinungsbild mit Nekrosen, Einblutungen und Zysten sehr variabel (multiform) sein kann (Bailey und Cushing, 1926). Im weiteren Verlauf erfolgte die Einteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO: „*World Health Organisation*“) und liegt aktuell in der fünften Auflage vor (Louis et al., 2016). Seit 2016 werden Gliome neben histopathologischen Kriterien, wie Mitoseaktivität, Nekrosen oder mikrovaskulärer Proliferation, und der Prognose zusätzlich durch molekulargenetische und immunhistochemische Eigenschaften in vier Grade unterteilt. Das GBM als maligner Tumor neuroepithelialer Herkunft mit schlechter Prognose wird dem WHO-Grad IV zugeordnet. Dabei wird zwischen GBMs mit Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Wildtyp und solchen mit IDH-Mutationen unterschieden. Weiterhin werden Mutationen in Genen, die für die Tumorsuppressoren TP53 oder PTEN kodieren sowie die Expression von Faktoren, die mit einer primitiven neuralen Differenzierung assoziiert sind, in die Klassifikation einbezogen (Louis et al., 2016).

Die „*Central Brain Tumor Registry of the United States*“ (CBTRUS) registrierte zwischen 2004 und 2008 die Anzahl diagnostizierter primärer Gehirn- und ZNS-Tumoren der USA. Mit einer Inzidenz von 3,2 pro 100.000 Einwohner macht das GBM 16% aller Gehirn- und ZNS-Tumoren aus. Als Tumor, welcher bevorzugt im höheren Lebensalter auftritt, erreicht das GBM die maximale Inzidenz zwischen dem 75. und 84. Lebensjahr, wobei Männer etwa 1,6-mal häufiger betroffen sind als Frauen (Dolecek et al., 2012).

Etablierte Screeningverfahren, wie die Mammographie oder Koloskopie (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012, 2014), finden in der Diagnostik und somit Früherkennung von GBMs keine praktikable Anwendung aufgrund der – oft innerhalb von Wochen – raschen Entstehung (Weller, 2014). Die klinische Symptomatik ist durch oftmals unspezifische Symptome (z.B. persistierende Kopfschmerzen) nicht wegweisend. Neu aufgetretene Paresen oder erstmalige fokale/generalisierte Krampfanfälle können Hinweise auf das Vorliegen eines intrakraniellen, malignen Prozesses sein (Müller, 2010).

Zur Diagnosesicherung ist die Schnittbildgebung in Form von vorzugsweise der Magnetresonanztomographie (MRT) oder auch der Computertomographie (CT) neben der

Probengewinnung zur histopathologischen Untersuchung notwendig. In der Schnittbildgebung stellen sich Glioblastome als inhomogene Strukturen aufgrund von Nekrosen, Einblutungen oder Ödemen mit einer kräftigen, typischerweise girlanden- oder ringförmigen Kontrastmittelaufnahme dar (Reiser et al., 2006; Weller, 2014).

Typischerweise ist das GBM in den (frontotemporalen) Großhirnhemisphären lokalisiert und dehnt sich durch diffus-infiltratives Wachstum entlang von Myelinbahnen häufig über den Balken bis in die kontralaterale Hemisphäre, mit dem Bild eines sog. Schmetterlingsglioms, aus. Die Schnittfläche der GBMs bietet ein inhomogenes, „buntes“ Bild, welches von Nekrosen, Einblutungen und grau-weißem Tumorgewebe gebildet wird. Die Mikroskopie zeigt zellreiche, polymorphe Tumoren mit sehr hohen Mitoseraten (Aguzzi et al., 2008).

1.2 Genetische Basis des Glioblastoma multiforme

Risikofaktoren zur Entstehung des GBMs sind weitestgehend ungeklärt. Während diverse exogene Faktoren Thema verschiedener Studien waren, konnte lediglich die therapeutische Bestrahlung als gesicherter Risikofaktor identifiziert werden (Ohgaki und Kleihues, 2005a; Omuro und DeAngelis, 2013). Darüber hinaus konnte bei einigen hereditären Syndromen, wie dem LiFraumeni-Syndrom (TP53-Mutation) oder dem Turcot-Syndrom/BTPS Typ I (engl.: *brain tumor polyposis syndrome*; Mutationen: MSH2-, MLH1- und PMS2-Gen), ein gehäuftes Auftreten von GBMs festgestellt werden (Louis und Deimling, 1995; Omuro und DeAngelis, 2013; Ostrom et al., 2014; Ozerov et al., 2013).

Die Einteilung des GBMs erfolgt anhand klinischer und molekulargenetischer Kriterien in vier Subtypen: das klassische, das mesenchymale, das neurale und das proneurale GBM (van Meir et al., 2010). Zudem wird zwischen primären und sekundären GBMs unterschieden (Aguzzi et al., 2008). Das primäre GBM entsteht *de novo* ohne bekannte Vorläuferläsionen. Das sekundäre GBM entwickelt sich aus niedergradigen Gliomen. Anzumerken ist hierbei, dass sekundäre GBMs vornehmlich im jüngeren Lebensalter auftreten (Ohgaki und Kleihues, 2005b). Auf molekulargenetischer Ebene unterscheiden sich die Tumoren durch unterschiedliche Mutationen (Verhaak et al., 2010). Das sekundäre GBM weist ähnliche Mutationen auf wie der Subtyp der proneuralen primären GBMs (Abb. 1).

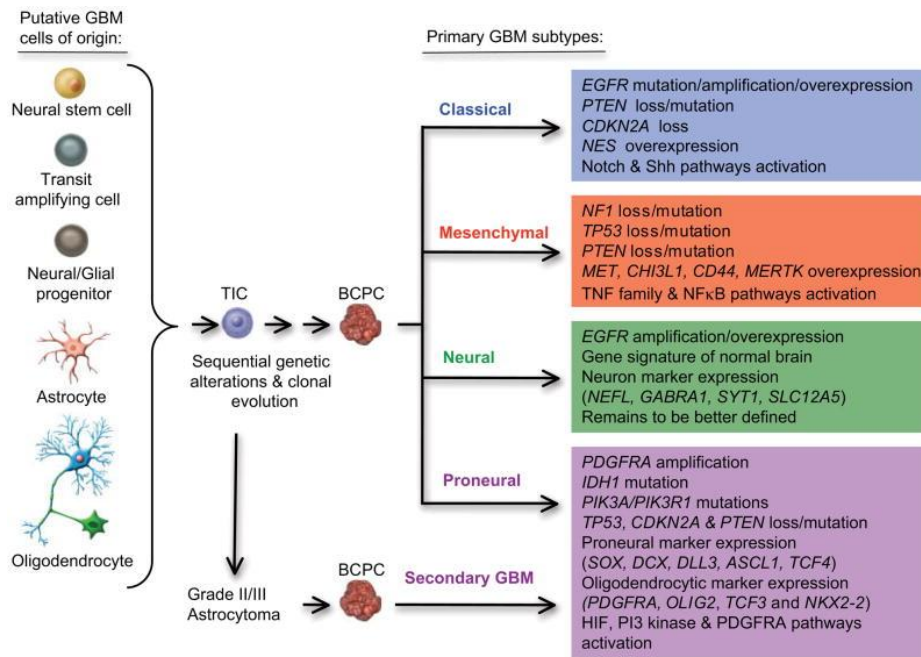


Abb. 1: Genetische Veränderungen in der Pathogenese unterschiedlicher Subtypen des Glioblastoma multiforme. Das normale Gehirn setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen: den neuronalen Stammzellen (NSC), den neuronalen Progenitorzellen (NPC) und reifen glialen Derivaten (Astrozyten/Oligodendrozyten). Erfahren diese Zellen genetische Alterationen, entsteht die Population von tumor-initiiierenden Zellen (TIC). Nach Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen werden TICs zu Hirn-Tumor-propagierenden Zellen (BCPC). Transkriptions- und Proteinanalysen führten zur Definition von vier Subtypen von GBMs. Die Abkürzungen der Schlüsselmutationen werden im Folgenden erklärt: EGFR, *epidermal growth factor receptor*, TP53, *tumor protein 53* PTEN, *phosphatase and tensin homolog*, TNF, *tumor necrosis factor*, PDGFRA, *platelet-derived growth factor receptor-A*, IDH, *isocitrate dehydrogenase*, PI3K, *phosphoinositol 3-kinase*, HIF, *hypoxia-inducible factor*, NF1, *Neurofibromatosis type 1*, SOX2, *sex determining region Y – box 2* (adaptiert aus van Meir et al., 2010).

Durch Genom- und Transkriptomanalysen des TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) -Konsortiums wurde eine Vielzahl an Mutationen in GBMs nachgewiesen (Abb. 1). Dabei sind typischerweise eine von zwei Rezeptortyrosinkinasen (EGFR oder PDGFRA) dereguliert sowie ein Tumorsuppressor, meist TP53 oder PTEN, mutiert. Die veränderte Genexpression bzw. –suppression spiegelt sich in unterschiedlichen Charakteristika der Tumoren wider. Für die GBM-Subtypen wurden folgende Charakteristika definiert (Phillips et al., 2006; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Verhaak et al., 2010).

- (I) Der klassische GBM-Subtyp weist Charakteristika hochproliferativer Zellen auf. Es werden gehäuft Veränderungen der Chromosomen 7, 9 und 10 beobachtet, welche zu einer Amplifikation des *egfr*-Gens und somit zu einer Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) sowie zu einem Verlust des Tumorsuppressors PTEN (engl.: *phosphatase and tensin homolog*) und zu Mutationen im CDKN2A-Lokus führen. Der CDKN2A-Lokus kodiert für die Faktoren p16^{ink4A} und p14^{ARF}, die in der Regulation des Seneszenz- bzw. Apoptose-Signalwegs wichtige Funktionen haben. Zudem wird eine Überexpression von Markern neuraler Stamm- und Vorläuferzellen wie Nestin sowie in den Notch- und Sonic hedgehog-Signalwegen beobachtet (Quelle et al., 2015; van Meir et al., 2010).
- (II) Der mesenchymale GBM-Subtyp ist gekennzeichnet durch ein Expressionsprofil mit mesenchymalen und angiogenetischen Eigenschaften. Gehäuft sind die Inaktivierung der Tumorsuppressoren NF1 (engl.: *neurofibromin 1*), TP53 und PTEN. Weiterhin finden sich eine Deregulierung des NF-κB-Signalwegs (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und die erhöhte Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 und der Rezeptortyrosinkinase MERTK (engl.: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER*) als astrozytäre Marker (van Meir et al., 2010).
- (III) Der proneurale GBM-Subtyp ähnelt vom Expressionsprofil dem neuraler Zellen und Gewebe mit einer hohen Expression oligodendrozytischer und proneuraler Entwicklungsgene. Dieser vor allem jüngere Patienten betreffende GBM-Subtyp ist durch die Überexpression bzw. Mutation des *pdgfra*-Gens (engl.: *platelet-derived growth factor receptor*) gekennzeichnet. Weiterhin sind Mutationen in den Isocitrat-Dehydrogenasen IDH1 und 2 charakteristisch für diesen GBM-Subtyp. Mutationen des IDH1/2-Gens treten ebenfalls in niedriggradigeren Gliomen und den sekundären GBMs auf, weshalb das sekundäre GBM dem proneuralen Subtyp sehr nahe steht (van Meir et al., 2010). IDH-Mutationen werden als positiver prognostischer Marker angesehen (Parsons et al., 2008; Weller et al., 2012).
- (IV) Der neurale GBM-Subtyp ist weniger gut charakterisiert. Man fasst in dieser Gruppe genetische Signaturen ähnlich des normalen Hirngewebes zusammen. So wurden neurale Marker wie NEFL (engl.: *neurofilament light polypeptide*), GABRA1 (engl.: *Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1*), SYT1 (Synaptotagmin-1) und SLC12A5 (engl.: *Potassium-chloride transporter member 5*) als Merkmale eingestuft (van Meir et al., 2010).

1.3 Therapie des Glioblastoma multiforme

Bis 2005 bestand die Standardtherapie des GBMs in der Resektion mit anschließender Bestrahlung bei bis dato frustrierten Ergebnissen in Therapieversuchen mit Chemotherapeutika (Schneider et al., 2010).

Die Primärtherapie des GBMs besteht – unter Berücksichtigung der allgemeinen Operabilität – in der Resektion (Weller, 2014). Dies konnte in einer randomisierten Studie – mit nur geringer Fallzahl – anhand des Vergleichs von Resektion gegen alleinige Tumorbiopsie mit anschließender Bestrahlung gezeigt werden (Vuorinen et al., 2003). Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur Bedeutung der Kompletresektion in Hinblick auf das Gesamtüberleben. In diesen wurde durch die Gabe des Prodrugs 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), welches sich in Form fluoreszierender Porphyrine in malignen Gliomen einlagert, im Vergleich zur Weißlicht-gestützten Resektion eine höhere Rate an Kompletresektionen erzielt, was in einem höheren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben resultierte (Stummer et al., 2006; 2008). Durch die Resektion werden primär die Ziele der histologischen Sicherung, Tumormassenreduktion mit Entlastung anliegender neurologischer Strukturen sowie Zytoreduktion mit besserer Behandlung des Residualtumors erreicht (Toms et al., 1999). Da sich das GBM jedoch durch ein diffuses, infiltratives Wachstum auszeichnet, ist eine R0-Resektion (Resektion im Gesunden) nicht möglich (Giese et al., 2003). Neben der Resektion zählt die postoperative Bestrahlung des Tumors inklusive 2cm Tumorrand zur Standardtherapie des GBMs (Laperriere et al., 2002).

Der Einsatz von Chemotherapeutika in der Behandlung des GBMs änderte sich durch die Ergebnisse der Studiengruppe um Roger Stupp. Die Arbeitsgruppe verglich die Wirksamkeit einer Therapie mit dem alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ) im Vergleich zur alleinigen postoperativen Strahlentherapie (Stupp et al., 2005). Hierzu wurden drei Patientenkollektive randomisiert, welche postoperativ eine Bestrahlung als Monotherapie oder eine simultane oder anschließende Therapie mit TMZ erhielten. TMZ ist ein Prodrug, das oral appliziert wird. Der aktive Metabolit MTIC (engl.: *5-(3-N-methyltriazin-1-yl)-imidazole-4-carboxamide*) bewirkt die Methylierung von Basen der DNA. Die Methylierung der O⁶-Gruppe der Base Guanin ist zytotoxisch. Sie führt dadurch zu Mismatch-Reparaturprozessen und nachfolgend zum Zellzyklusarrest. Die unerwünschten klinischen Nebenwirkungen von TMZ sind eher gering und umfassen Fatigue, Übelkeit und Erbrechen sowie Knochenmarksuppression (Thomas et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass das Gesamtüberleben bei additiver TMZ-Gabe signifikant länger ist als in der Kontrollgruppe. Die mediane Überlebensrate betrug 14,6 Monate (Bestrahlung und TMZ) gegenüber von 12,1 Monaten (Bestrahlung). Auch die Langzeitergebnisse zeigten einen deutlichen Überlebensvorteil der Patienten, welche zusätzlich mit TMZ behandelt wurden. So betrug die 5-Jahresüberlebensrate 9,8% für Patienten mit TMZ-Behandlung gegenüber einer 5-Jahresüberlebensrate von 1,9% bei Patienten, welche lediglich bestrahlt wurden. Zusätzliche Subgruppenanalysen zeigten, dass insbesondere Patienten mit einem

Einleitung

hypermethylierten Promotor des O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)-Gens, und somit verminderter MGMT-Expression, von der Therapie mit TMZ profitieren. Bei MGMT handelt es sich um ein DNA-Reparaturprotein, welches Methylgruppen an der O⁶-Position des Guanins entfernt und somit die TMZ-induzierten DNA-Schäden behebt und die Apoptose verhindert. Hohe MGMT-Spiegel in Tumorzellen vermitteln daher einen resistenten Phänotyp, da der alkylierende Effekt von Therapeutika, wie TMZ, aufgehoben wird und es zu Therapieversagen kommen kann. Insgesamt zeigten die klinischen Studien, dass TMZ bei geringer Toxizität als sinnvolles adjuvantes Therapeutikum eingesetzt werden kann, was auch Einzug in die aktuellen Leitlinien gefunden hat. Dies gilt mit der Einschränkung, dass die Wirksamkeit der TMZ-Therapie vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors und somit der MGMT-Aktivität abhängig ist; der MGMT-Status ist daher ein bedeutender prädiktiver Marker (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2005; 2007; 2009). Ergänzend hierzu konnte gezeigt werden, dass auch ältere Patienten mit einem methylierten MGMT-Promotor von der TMZ-Therapie profitieren (Malmstrom et al., 2012; Wick et al., 2012).

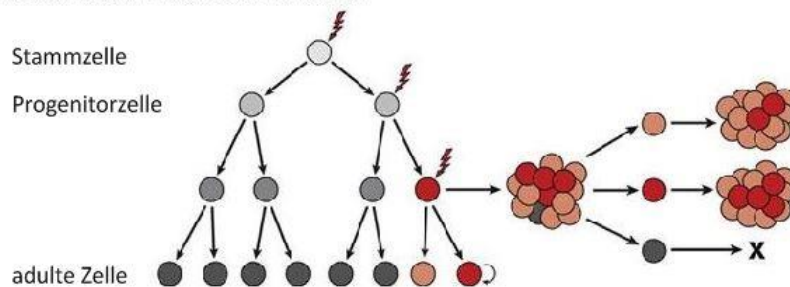
Trotz der beschriebenen Optimierung der Therapie mit TMZ ist die Behandlung der Patienten palliativ und kurative Therapien fehlen komplett. Das Versagen der GBM-Therapie kann auf vier wesentliche Hauptprobleme zusammengefasst werden (Ohka et al., 2012): **(I)** Wie oben erläutert, ist der MGMT-Status von entscheidender Bedeutung für das Ansprechen auf die TMZ-Therapie. **(II)** Zusätzlich wird die TMZ-Therapie durch niedrige TMZ-Wirkspiegel im Tumor, aufgrund des verminderten Transports über die Blut-Hirn-Schranke sowie der Expression von Transportproteinen in den Tumorzellen (Beier et al., 2011), eingeschränkt. **(III)** Weiterhin liegen komplexe Veränderungen in verschiedenen Signalwegen (z.B. VEGF (engl.: *vascular endothelial growth factor*) oder EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) vor, sodass Proliferation, Apoptose, Migration und Angiogenese dereguliert sind. **(IV)** Nach heutigen Erkenntnissen scheint die Existenz von Gliomstammzellen, auf die im Folgenden eingegangen wird, eine entscheidende Rolle zu spielen, da diese Zellen die Standardtherapie überleben und zur Rezidivbildung beitragen (Huse und Holland, 2010; Ohka et al., 2012; Schonberg et al., 2014; van Meir et al., 2010).

1.4 Gliomstammzellen

Die Tumor-initiiierenden Mutationen können sowohl neurale Stammzellen (NSC) und Progenitoren (NPC) als auch differenzierte gliale Zellen betreffen (Abb. 1) (van Meir et al., 2010). Ausgehend von einem Klon neoplastisch veränderter Zellen entsteht der Tumor, wobei die Zellen im Verlauf der Tumorentwicklung weitere Mutationen und epigenetische Veränderungen anreichern (Visvader und Lindeman, 2012).

Zwei Modelle beschreiben die Prozesse in der Tumorgenese. Das Modell der „klonalen Evolution“ geht davon aus, dass alle Abkömmlinge der Tumor-induzierenden Zelle Tochterzellen bilden können, die zur Tumorprogression beitragen und lediglich der Selektion des Mikroumfelds unterliegen (Abb. 2A) (Nowell, 1976). Das Tumorstammzell-Modell geht dagegen von der Vermutung aus, dass die Zellen im Tumor hierarchisch organisiert sind und nur die Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften Tochterzellen generieren. Weiter differenzierte Tumorzellen wären demnach nicht in der Lage neue Tumorzellen zu generieren (Abb. 2B).

A Klonales Evolutionsmodell



B Tumorstammzellmodell

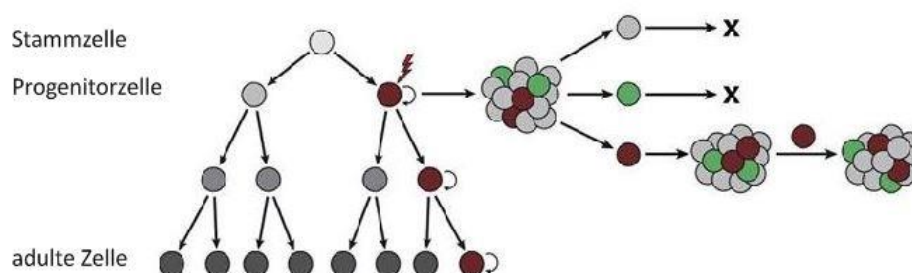


Abb. 2: Schematische Darstellung des (A) klonalen Evolutionsmodells und des (B) Tumorstammzellmodells (A) Das Modell der klonalen Evolution ist ein nicht-hierarchisches Modell, in welchem eine Reihe von Mutationen einen dominanten Tumorklon (rot) generiert. Von diesem ausgehende Zellen (rot, orange) haben ein ähnliches kanzerogenes Potential. Zusätzlich entstehen Zellen (grau) mit einem niedrigen kanzerogenen Potential. **(B)** Das Tumorstammzellmodell beschreibt hierarchisch organisierte Zellen. Dabei besitzt nur eine Subpopulation (braun) ein kanzerogenes Potential, da nur diese die Fähigkeit zur Selbsterneuerung hat. Durch Differenzierung dieser Subpopulation entstehen alle Zellen im Tumor sowie eine Zell-Heterogenität. - (adaptiert aus Visvader und Lindeman, 2012)

Einleitung

Tumorstammzellen wurden erstmals von den Autoren Lapidot et al. (1994) sowie Bonnet und Dick (1997) bei einer akuten myeloischen Leukämie im Tiermodell beschrieben. Im weiteren Verlauf wurde dieses Modell auch für andere Tumorentitäten bestätigt (Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Eramo et al., 2008).

Erstmalig erfolgte die Isolierung von Gliomstammzellen durch Singh und Kollegen (Singh et al., 2004a; 2004b), die mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CD133/Prominin-1 und der Technik des FACS (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*) Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften gewinnen konnten. Diese Zellen waren charakterisiert durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation *in vitro*. Weiterhin generierten diese Zellen nach Xenotransplantation in das Gehirn immunsupprimierter Mäuse orthotope Tumore, die sich nach Xenotransplantation in die Zellderivate des Ausgangstumors differenzierten (Singh et al., 2003; 2004a; 2004b). Neben dem Potential zur Selbsterneuerung und Tumorbildung zeichnen sich Gliomstammzellen durch die Bildung von Sphären aus (Galli et al., 2004; Ignatova et al., 2002; Reya et al., 2001), wobei die Fähigkeit zur Sphärenbildung kein stringentes Kriterium ist (Chen et al., 2010; Choschick et al., 2014; Schonberg et al., 2014). Einen universellen Marker für Gliomstammzellen gibt es bis dato nicht, obwohl einige Forscher das oben erwähnte Protein CD133 als solchen einstufen und ihre Forschung an CD133+ Zellen durchführen (Schonberg et al., 2014).

Chen et al. (2010) definierten drei Typen von Gliomstammzellen bzw. Progenitoren, wobei die eigentliche Stammzelle (Typ-I-Zelle) CD133- ist. Diese Typ-I-Zelle kann sich selbst erneuern oder CD133+ Typ-II-Zellen generieren. Die CD133+ Typ-II-Zelle besitzt ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, kann aber auch CD133- Typ-III-Zellen generieren, die weiter differenzierte Tumorzellen bilden. Allen Subpopulationen war gemeinsam, dass sie zur Sphärenbildung und Tumorinduktion nach Xenotransplantation im Mausmodell befähigt waren. Jedoch unterschieden sich die Zellen bezüglich Wachstumsverhalten, Differenzierungsgrad und Tumorigenität deutlich. Die von Typ-I-Zellen abgeleiteten orthotopen Tumoren wiesen im Vergleich zu den von Typ-II-Zellen abgeleiteten Tumoren ein schnelleres und invasiveres Wachstum sowie eine schlechtere Differenzierung auf. Die von Typ-III-Zellen abgeleiteten orthotopen Tumoren waren die am weitesten differenzierten mit der geringsten Proliferation und Invasivität. Auf der Basis dieser Daten wurde ein hierarchisches Modell postuliert, in dem die Typ-I-Zelle die Stammzelle ist.

Die in der Literatur häufig verwendeten Begriffe BTSC (engl.: *brain tumor stem cell*) und GSC (engl.: *glioma stem cell*) vernachlässigen Befunde von Chen und Kollegen, die CD133 als Marker für Progenitoren identifizierten, die aus der eigentlichen Gliomstammzelle entstehen und *in vivo* und *in vitro* eine zelluläre Hierarchie etablieren (Chen et al., 2010). In dieser Arbeit werden Kulturen mit Gliomstammzellen daher als SLGC (engl.: *stem-like glioma cell*)-Kulturen bezeichnet, um der Tatsache gerecht zu werden, dass in den Kulturen Gliomzellen verschiedener Differenzierungsstadien existieren und sowohl CD133+ als auch CD133- Zellen die Fähigkeit zur

Einleitung

Selbsterneuerung und Tumorbildung in Mausmodellen aufweisen (Beier et al., 2007; Chen et al., 2010).

SLGCs werden in serumfreiem Medium kultiviert, da Serum die Stammzeleigenschaften reduziert und eine Differenzierung bewirkt (Lee et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass aus primären GBMs isolierte Zellen unter serumfreien Konditionen eine große Ähnlichkeit zu adulten neuronalen Stammzellen aufwiesen und die Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Differenzierung erhalten blieben und sich die Genexpression im Verlauf der Kultivierung nicht wesentlich von der des Ausgangstumors unterschied. Diese Zellen wiesen zudem eine embryonale Signatur auf, d.h. es werden Proteine exprimiert, die typischerweise in embryonalen Stammzellen nachzuweisen sind (Ben-Porath et al., 2008).

Intrinsische und extrinsische Faktoren tragen maßgeblich zur Balance aus Selbsterneuerung und Differenzierung bei. *In vivo* spielen die Stammzellnischen eine zentrale Rolle, da sie durch eine bestimmte Mikroumgebung die Stammzellhomöostase aufrechterhalten (Lathia et al., 2011; Moore und Lemischka, 2006). Nischen, in denen der Stammzellstatus der SLGCs sowie die Fähigkeit zur Angiogenese durch die Mikroumgebung erhalten bleiben, werden in perivaskuläre und perinekrotische Nische unterschieden. In beiden scheint die Hypoxie eine entscheidende Rolle zu spielen (Schiffer et al., 2014). Die Vermutung, dass sich SLGCs vermehrt in Nischen befinden, wurde durch den Nachweis von CD133+ Zellen in perivaskulärem Gewebe sowie in pseudopallisadenartigen Formationen perinekrotisch bei diffusen und anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen erhärtet. In der perivaskulären Nische werden SLGCs von Faktoren aus dem Mikroumfeld beeinflusst. Andererseits sezernieren SLGCs Faktoren, die die Angiogenese und Neovaskularisierung während der Progression des GBMs massiv beeinflussen (Christensen et al., 2008; He et al., 2012).

Hardee und Zagzag (2012) beschrieben fünf Mechanismen zur Neovaskularisierung, bei denen SLGCs verschiedene Aufgaben übernehmen: **(I)** Gefäßkooption (Nutzung bestehender Gefäße) **(II)** Angiogenese (Gefäßbildung aus bestehenden Gefäßen) **(III)** Vaskulogenese (Gefäßneubildung) **(IV)** Vaskuläre Mimikry (Bildung intratumoraler, gefäßähnlicher Kanäle) **(V)** Endothel-Transdifferenzierung.

Es wurde gezeigt, dass eine strikte Regulierung in der Ausbildung der Gefäßversorgung von GBMs herrscht. Bei Möglichkeit der Gefäßkooption wurde eine vermehrte Expression des angiogenetischen Antagonisten Angiopoietin-2 nachgewiesen. Im Rahmen von Nekrose und Hypoxie wurden jedoch eine vermehrte Expression von HIF-1 (engl.: *hypoxia-induced factor 1*) sowie VEGF nachgewiesen, welche eine Angiogenese provozieren (Fischer et al., 2005; Holash et al., 1999). Die Autoren Ricci-Vitiani et al. (2010) zeigten, dass SLGCs die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in CD31-positive Zellen haben. Andererseits wurde beschrieben, dass durch Endothelzellen die Zahl CD133-positiver Zellen durch eine verbesserte Mikroumgebung erhöht

Einleitung

wurde (Calabrese et al., 2007). Darüber hinaus wurde in Grad IV Astrozytomen ein vaskuläres Mimikry nachgewiesen (Yue und Chen, 2005).

Die Hypoxie in der Nische scheint für den Erhalt der SLGCs wichtig. So kann Hypoxie eine vermehrte Bildung von Sphären bewirken und die Expression von Stammzellmarkern wie Sox2, Oct3/4 und Nanog fördern. Zudem erwies sich der *mgmt*-Promotor in hypoxischen Arealen als hypomethyliert, was zu einer vermehrten MGMT-Expression und somit geringerer Wirksamkeit von TMZ führen kann (Heddleston et al., 2011; Schonberg et al., 2014). Dies könnte eine mögliche Ursache für das Überleben von SLGCs unter TMZ-Therapie sein.

Das Überleben von SLGCs unter TMZ-Behandlung wurde 2012 an einem genetisch veränderten Mausmodell gezeigt, in dem die GBM-Zellen mit Nestinexpression (ein Marker für undifferenzierte neurale Zellen) die Therapie überlebten und die Rezidivbildung bewirkten (Chen et al., 2012). Die *in vitro* Daten sind weniger klar. So zeigten Liu und Kollegen (Liu et al., 2006) eine vermehrte Resistenz von CD133+ Zellen nach TMZ-Gabe, während Beier und Kollegen (Beier et al., 2008) eine Verminderung an CD133+ Zellen beobachteten. Darüber hinaus wurden Evidenzen für eine vermehrte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Carboplatin, Paclitaxel und Etoposid gewonnen (Liu et al., 2006). Zusätzlich scheint eine vermehrte Expression von ABC-Transportern (engl.: *adenosine triphosphate-binding cassette*) durch Efflux des Chemotherapeutikums für die Chemoresistenz verantwortlich zu sein (Angelastro und Lame, 2010; Martín et al., 2013). Eine gesteigerte Resistenz von SLGCs gegenüber der Strahlentherapie wurde 2006 *in vitro* festgestellt, wobei diese Experimente zwischen CD133+ und CD133- Kulturen unterschieden (Bao et al., 2006). Im Vergleich zu CD133- wiesen CD133+ Zellen eine gesteigerte Expression von DNA-Reparaturproteinen auf und aktivierten Reparaturprozesse effizienter und es wurden nach Bestrahlung höhere Anteile an CD133+ Zellen nachgewiesen (Bao et al., 2006).

In den vergangenen Jahren wurden einige Signalwege, wie beispielsweise der Notch-, PI3K/Akt- und Hedgehog-Signalweg, identifiziert, die für den Erhalt der Stammzeleigenschaften von Bedeutung sind (Schonberg et al., 2014). Weiterhin wurde die Expression der Pluripotenzfaktoren Sox2, Nanog und Oct3/4 beschrieben. Diese Faktoren sind in embryonalen Stammzellen exprimiert und können im Zusammenspiel mit c-myc oder Klf4 Pluripotenz in differenzierten Zellen von Mensch und Nager erzeugen (Nakagawa et al., 2008).

Bei den oben beschriebenen Daten wurde in der Regel das hierarchische Modell von Chen et al. (2010) außer Acht gelassen. Häufig wurden CD133+ Zellen für die Experimente eingesetzt, die nach dem Modell von Chen et al. nicht die eigentliche Gliomstammzelle, sondern einen weiter differenzierten Progenitor repräsentieren. Ungeachtet dessen zeichnen sich die Gliomstammzellen (Typ-I-Zelle) und die Progenitoren (Typ II- und Typ III-Zelle) durch Gemeinsamkeiten aus, darunter die Expression von Pluripotenzfaktoren (Schonberg et al., 2014).

Einleitung

Für den Pluripotenz- und Transkriptionsfaktor Oct3/4 wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Expression nur sehr gering ist, was sich durch die Hypermethylierung des Promotors des oct3/4-Gens erklären lässt (Choschzick et al., 2014). Dagegen ergaben unsere Analysen und die anderer Arbeitsgruppen Hinweise auf eine differentielle Expression von Sox2 in SLGCs (Choschzick et al., 2014; Takahashi und Yamanaka, 2006).

1.5 Pluripotenzfaktoren

Der Pluripotenzfaktor Sox2 (engl.: *sex-determining region Y (SRY)-related box protein 2*) ist ein Transkriptionsfaktor mit 317 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 34 kDa. Das humane Sox2-Gen ist auf Chromosom 3 lokalisiert (Annovazzi et al., 2011). Sox2 ist nur einer von mehreren Pluripotenzfaktoren, der direkt auf transkriptioneller Ebene oder indirekt über positive „*feedback loops*“ mit weiteren Transkriptionsfaktoren (z.B. Oct3/4 und Nanog) zusammenwirkt, die den Stammzellstatus von Zellen aufrechterhalten (Rizzino, 2009).

Der Transkriptionsfaktor Oct3/4 (engl.: *octamer-binding protein 3/4; POU5F1*) ist ein Protein der Familie der *Octamer-binding Proteine*, welche spezifisch an das Octamer-motif (ATGCAAAT) binden. Das humane POU5F1-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert (Zhao, 2013). In embryonalen Stammzellen (ESC) bindet Sox2 zusammen mit Oct3/4 an das HMG/POU-Motif und wirkt dabei als transkriptioneller Aktivator von Genen, die z.B. für Nanog bzw. fgf4 (engl.: *fibroblast growth factor 4*) kodieren. Sox2 und Oct3/4 können sich zudem selbst und gegenseitig stimulieren. Es wurde gezeigt, dass Sox2 und Oct4 essentiell für die Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen sind (Rizzino, 2009). Weiterhin scheint Sox2 in der embryonalen Neuro- und Gliogenese eine Rolle zu spielen, wobei der Faktor in den neuralen Stammzellen beobachtet wird. Sox2 wird aber auch in den Neurosphären adulter neuraler Stammzellen in *in-vitro* Kulturen exprimiert, weshalb vermutet wird, dass Sox2 ein Marker für undifferenzierte und proliferierende neurale Zellen ist (Annovazzi et al., 2011). Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad von Tumoren des zentralen Nervensystems und der Sox2-Expression nachgewiesen (Annovazzi et al., 2011). Dabei könnte Sox2 die Expression von Schlüsselgenen und Signalwegen regulieren, die für die Malignität von GBMs bedeutsam sind (Berezovsky et al., 2014). Eine erhöhte Sox2-Expression wurde in hyperproliferativen GBM-Arealen sowie den perinekrotischen Palisaden nachgewiesen (Schiffer et al., 2014; Schneider et al., 2010).

In einem transgenen SCID-(engl.: *severe combined immunodeficiency*)-Maus-Modell wurde mittels eines siRNA-knock-down das Sox2-Gen in tumorinitiierenden Zellen herunter reguliert, was zu einem deutlichen Rückgang der Zellzahl und Tumorigenität führte (Gangemi et al., 2009). Des Weiteren führte eine Sox2-spezifische T-Zell-vermittelte Immuntherapie zur Lyse von Gliomzellen (Schmitz et al., 2007). Somit scheint Sox2 essentiell für die Selbsterneuerung von Gliomstammzellen und könnte möglicherweise ein potentielles Ziel für Therapien sein.

Über die Regulation der Sox2-Expression in SLGCs ist wenig bekannt. Auf Grund der Daten von Chen et al. (2010) kann davon ausgegangen werden, dass Sox2 in Typ I-, II- und III-Zellen exprimiert wird, allerdings mit vermindertem Level bei steigender Differenzierung. Allerdings wurde nicht untersucht, inwiefern Sox2- und CD133-Expression miteinander assoziiert sind. Sicher ist hingegen, dass die Sox2-Expression in differenzierten GBM-Zellen gering ist oder fehlt (Annovazzi et al., 2011; Fong et al., 2008; Ikushima et al., 2009). Über die Mechanismen zur Verminderung des Sox2-Levels

Einleitung

während der Differenzierung von GBM-Zellen war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Die Regulation könnte neben der Bindung von Aktivatoren und Repressoren im Sox2-Promotor verschiedenen epigenetischen Prozessen unterliegen.

1.6 Epigenetische Regulation von Genexpression

Der Begriff Epigenetik beschreibt Veränderungen der Genexpression, die unabhängig von Veränderungen der primären DNA-Sequenzen auftreten und an Tochterzellen weitergegeben werden können (Sharma et al., 2010). Hierbei werden vier Hauptgruppen von epigenetischen Mechanismen unterschieden, die auf verschiedenen Levels die Genexpression regulieren: **(I)** DNA-Methylierung **(II)** kovalente Histonmodifikation **(III)** nicht-kovalente Mechanismen und **(IV)** nicht-kodierende RNAs (Sharma et al., 2010).

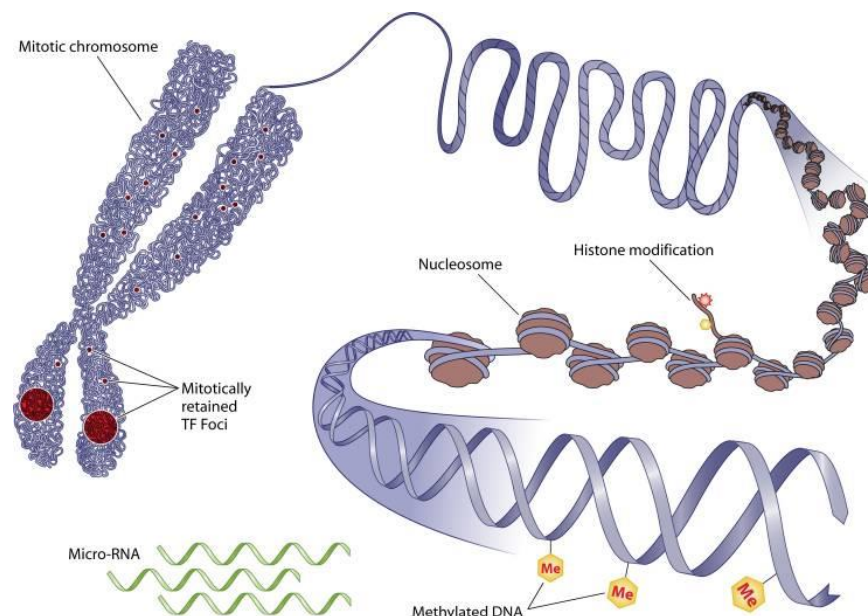


Abb. 3: Epigenetische Regulationsmechanismen.

Die Genexpression in Säugetieren wird von genetischen und epigenetischen Mechanismen kontrolliert. Die Abbildung illustriert drei Mechanismen. (I) Histonmodifikation: Modifikationen führen zu strukturellen Veränderungen der Nucleosomen und somit Zugänglichkeit oder Rekrutierung von non-Histon Proteinen. (II) DNA-Methylierung: Die Methylierung der Base Cytosin in den CpG-Inseln von Promotorregionen verändert die Transkription bestimmter Gene und somit deren Expression. (III) miRNA: nicht-kodierende RNAs beeinflussen durch unterschiedliche Mechanismen die Gentranskription und Genexpression (adaptiert aus Zaidi et al., 2010).

Einleitung

Die DNA-Methylierung ist eine der am meisten untersuchten epigenetischen Modifizierungen in den Zellen von Säugetieren. Dabei handelt es sich typischerweise um eine kovalente Modifizierung der Base Cytosin in CpG-Dinukleotiden den sog. CpG-Inseln. CpG-Inseln treten häufig in den CpG-reichen DNA-Abschnitten von Promotoren auf und liegen dort in repetitiver Sequenz vor (Sharma et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass etwa 70% der CpG-Inseln mit humanen Genen assoziiert sind und über die Hälfte hiervon in Promotorregionen angereichert sind. 56% der untersuchten Gene hatten CpG-Inseln überlappend zur Startstelle der Transkription (Wang und Leung, 2004). Die kovalente Modifizierung ist die Methylierung in der Position 5 der Base Cytosin (^{5m}Cytosin) und wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert (Hashimoto et al., 2015). Man unterscheidet zwischen Erhaltungsmethylierung (Methylierung nach Replikation) und „*de-novo*“-Methylierung (Methylierung an neuen Positionen beider DNA-Stränge) (Passarge, 2008). Am ^{5m}Cytosin binden Regulatoren der Transkription, wie z.B. das Protein MeCP2 (engl.: *Methyl-CpG-binding protein 2*) oder verwandte Faktoren (Cheng und Qiu, 2014). MeCP2 und die verwandten Proteine rekrutieren Co-Repressorkomplexe, die u.a. Histondeacetylasen (HDACs) enthalten und somit ein *Gensilencing* bewirken (Sharma et al., 2010). Ging man zunächst davon aus, dass DNA-Methylierung stets zum *Gensilencing* führt, weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass die Auswirkungen mit dem Kontext variieren und die Beziehung zwischen Methylierung und Transkription durchaus nuanciert ist (Jones, 2012).

Die kovalente Modifizierung von Histonen stellt einen weiteren epigenetischen Mechanismus dar. Betroffen sind die vier Histone des Nukleosoms (auch als Kern-Histone bezeichnet) (Zhang und Reinberg, 2001). Das Nukleosom ist die fundamentale Einheit des Chromatins, welches aus einem Oktamer der Kern-Histone H2A und H2B sowie H3 und H4 besteht, wobei von jedem Histon 2 Kopien vorliegen. Um diesen Proteinkomplex ist die doppelsträngige DNA (ca. 1¼ Windungen entsprechend 147 Basenpaaren) gewunden (Luger et al., 1997). Neben der globulären C-terminalen Domäne besitzen die Kern-Histone einen N-terminalen Bereich, der in der englischsprachigen Literatur als „*histone tail*“ bezeichnet wird (Morales und Richard-Foy, 2000). Die posttranslationalen kovalenten Modifizierungen der Kern-Histone, wie Methylierung, Acetylierung, Ubiquitilierung, Sumoylierung und Phosphorylierung, erfolgen fast ausschließlich in den „*histone tails*“ (Kouzarides, 2007). Die Benennung der Modifizierungen erfolgt nach folgender Regel: Name des Kern-Histons, modifizierter Aminosäurerest, dessen Position sowie Art der Modifizierung (z.B. H3K27me_{2/3}: Di- oder Tri-Methylierung des Histons H3 im Lysylrest 27) (Turner, 2005). Die Histonmodifizierung H3K27me_{2/3} ist ein Beispiel für eine typische „*repressive mark*“, d.h. H3K27me_{2/3} tritt immer in transkriptionell stillen Chromatinbereichen auf und ist ein Zeichen für die dauerhafte Repression von Transkription (Ferrari et al., 2014). Die Gesamtheit der Modifizierungen in einem Chromatinbereich bezeichnet man als den „Histon-Code“ (Jenuwein und Allis, 2001).

Einleitung

Durch kovalente Modifizierungen des Chromatins werden Schlüsselprozesse, wie Transkription, Replikation und Reparatur reguliert. Hinsichtlich der Transkription durch die RNA-Polymerase II können sowohl die Aktivierung als auch die Repression durch den Histon-Code beeinflusst werden (Kulaeva et al., 2007). Welcher Effekt resultiert, hängt einerseits von der Art der Modifizierung ab, andererseits aber auch von den betroffenen Aminosäureresten und der Summe der Veränderungen (Kouzarides, 2007). Es gibt Histonmodifizierungen die ausschließlich als „*active marks*“- oder „*repressive marks*“ wirken, andere zeigen einen ambivalenten Status an (Sharma et al., 2010). Die Modifizierungen H3K9ac und H3K14ac (ac, Acetylierung) sind typische „*active marks*“, H3K9me3 und die genannte H3K27me_{2/3} (me, Methylierung) Modifizierung dagegen typische „*repressive marks*“ (Dong und Weng, 2013). Methylierungen, insbesondere Mono-Methylierungen wie H3K4me, H3K9me oder H3K79me, können aber auch mit transkriptionell aktivem Chromatin vereinbar sein. Zumindest in einigen Fällen ist die Mono-Methylierung typisch für einen ambivalenten Zustand, d.h. je nach Kontext ist die betreffende Modifizierung mit aktivem oder stillem Chromatin assoziiert. So wurde gezeigt, dass beispielsweise die Histonmodifizierungen H3K9ac und H3K4me₃ eine Veränderung der Chromatinstruktur bewirken, welche zu einer Transkriptionsaktivierung führen können (Fullgrabe et al., 2011; Liang et al., 2004). Weiterhin ist zwar die Mono- nicht aber die Trimethylierung des Histons H3 im Lysylrest K27 (H3K27me versus H3K27me₃), mit der Transkription vereinbar; H3K27me_{2/3} bewirkt somit eine Transkriptionsrepression (Kouzarides, 2007). Die genannten Methylierungen konnten in embryonalen Stammzellen (ESC; engl.: *embryonic stem cells*) als koexistent nachgewiesen werden. Der Histon-Code ist einerseits ein essentieller Regulator für den Erhalt des Stammzellcharakters von ESCs, aber andererseits auch für deren Fähigkeit zur Differenzierung (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006).

Zu den nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs, engl.: *non-coding RNA*) werden miRNAs gezählt, die Genexpression durch posttranslationales *gensilencing* von Zielgenen verändern (Sharma et al., 2010). Die ncRNAs silencen Transkriptionsfaktoren, die für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters notwendig sind. So interagieren beispielsweise die lncRNA (engl.: *long non-coding RNA*) H19 mit Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, oder die lncRNA MIAT (engl.: *myocardial infarction associated transcript*) mit den Transkriptionsfaktoren Nanog, c-Myc oder Oct-4. Darüber hinaus sind Interaktionen mit anderen miRNAs beschrieben oder auch eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) (Zhang et al., 2015).

1.7 Fragestellung

Aus den oben beschriebenen Daten resultiert ein Widerspruch zur Bedeutung von CD133 als Marker für Tumorstammzellen im GBM. Wie beschrieben wurde zunächst angenommen, dass CD133 ein *bona fide* Marker für die Gliomstammzelle ist und dass eine hohe Expression von CD133 mit einem hohen Grad an Stammzeleigenschaften assoziiert ist. Die Daten von Chen et al. (2010) lassen aber vermuten, dass CD133 nicht der Marker der Gliomstammzelle (Typ-I-Zelle), sondern der weiter differenzierten Typ-II-Zelle ist. Die Differenzierung der Typ-II-Zelle in eine Typ-III-Zelle ist wiederum mit einem Abschalten der CD133-Expression assoziiert. Da in *in-vitro* Kulturen von Gliomstammzellen stets wechselnde Anteile an Typ I-, II- und III-Zellen vorliegen, verwenden wir in unserer Arbeitsgruppe den Begriff SLGC, um diesen Sachverhalt zu unterstreichen und darauf hinzuweisen, dass *in vitro*-Kulturen von Gliomzellen analog zur *in vivo*-Situation hierarchisch organisiert sind. Die in unserer Arbeitsgruppe angelegten SLGC-Kulturen werden durch Medium-Selektion und nicht durch Sortierung mittels CD133-FACS (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) gewonnen. In nahezu allen Fällen wird eine von beiden Methoden in der Gliomstammzell-Forschung eingesetzt (Dirks, 2010). Sollte es in einer GBM-Biopsie eines Patienten mehrere Typen von genetisch und/oder epigenetisch verschiedenen Gliomstammzellen geben, sollten sich diese in der ursprünglich gewonnenen SLGC-Mutterkultur befinden. Verschiedene Typen von SLGCs könnten im Patienten durch klonale Evolution und nachfolgende Selektion entstanden sein (Greaves und Maley, 2012; Scott und Marusyk, 2017). Um die Hypothese zu prüfen, dass genetisch und/oder epigenetisch verschiedene SLGCs vorkommen, wurden von SLGC-Mutterkulturen mittels „*limited dilution assay*“ Klone gewonnen. Meine Aufgabe bestand darin, diese Klone mittels MSP (Methylierungsspezifische PCR) und Durchflusszytometrie zu analysieren und die mögliche Bedeutung von (i) Sox2 und (ii) CD133 als SLGC-Marker zu bewerten. Weiterhin sollte die epigenetische Regulation des Sox2-Promotors untersucht werden. Die „*limited dilution assays*“ und die initiale Expansion der Klone wurden von Kollegen der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Da insbesondere die Sox2-Expression in den Klonen kritisch für deren Stammzellcharakter sein sollte (Kap. 1.5, S.12), wurde die Regulation der Sox2-Proteinexpression untersucht.

Vor allem wurde die Methylierung des Sox2-Promotors in CpG-Inseln mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) analysiert. Die MSP ist eine anerkannte Methode zum Nachweis methylierter und unmethylierter DNA-Sequenzen in definierten Promotorregionen, weil sie Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus der Promotoren einzelner Gene zulässt (Herman et al., 1996). Es wurden mehrere verschiedene Primerpaare eingesetzt und ermittelt, ob deren Methylierung variiert und sich in der Proteinexpression widerspiegelt. Dann wurden mit dem Primerpaar MSP-Analysen von SLGC-Mutterkulturen und –Klonen durchgeführt, der Unterschiede in der Methylierung erkennen ließ. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob die Klone SLGCs mit

Einleitung

verschiedenem Stammzellstatus bzw. auf unterschiedlichen Differenzierungsleveln darstellen.

Weiterhin sollten erste Erkenntnisse dazu gewonnen werden, ob die Regulierung der Sox2-Expression mit einem „offenen“ oder „geschlossenen“ Chromatinstatus assoziiert ist. Dazu wurde die Methode der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) eingesetzt, die die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen ermöglicht (Collas, 2010). Die 1988 erstmals beschriebene Methode (Solomon et al., 1988) beinhaltet einen *in-vivo Cross-link* von DNA mit Protein-Komplexen und die anschließende Protein-spezifische Immunpräzipitation (IP). Die nachfolgende PCR identifiziert die DNA-Bereiche, in denen der untersuchte Faktor gebunden hat. Hier wurden eine „*repressive mark*“, eine „*active mark*“ sowie eine „*bivalent mark*“ untersucht. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen die modifizierten Histone H3K27me2/3, H3K9ac und H3K4me3 sowie Sox2 und Oct3/4 durchgeführt. Nachfolgend wurde die über die IP isolierte DNA mittels PCR auf die Anwesenheit von Sox2-Promotor-Sequenzen analysiert.

Erstaunlicherweise werden die 2010 von Chen und Kollegen publizierte Daten zur hierarchischen Organisation von Gliomstammzellen (GSCs) von vielen Arbeitsgruppen ignoriert und die Untersuchungen an Gliomstammzellen nach wie vor mit CD133-sortierten Zellen durchgeführt. Dieser Sachverhalt ist sehr kritisch für die Aussagekraft der Analysen. Zu den Beobachtungen von Chen et al. (2010) gibt es keine Bestätigung in der Literatur. Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich somit in unserer Arbeitsgruppe die Frage, wie mit diesem Problem umzugehen sei. Im zweiten Teil der Arbeit charakterisierte ich daher die Klone verschiedener GSC-Mutterkulturen auf den Gehalt an CD133+ Zellen. Dabei standen zwei Aspekte im Vordergrund. Erstens sollte der Gehalt von CD133+ Zellen zwischen Klonkulturen identischer Passagen verglichen werden, um Hinweise darauf zu erhalten, welche Bedeutung CD133 als Marker in zukünftigen Analysen haben kann. Zweitens sollte der CD133-Gehalt von Klonkulturen relativ zur epigenetischen Regulation von Sox2 betrachtet werden, um die Befunde des Chen-Modells einordnen zu können.

Für beide Ansätze wurden Klonkulturen geerntet und die Zellen mit einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD133/Prominin-1 inkubiert. Der Anteil CD133+ Zellen in den Suspensionen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und mit den anderen Daten der Klonkulturen (Passagen, Sox2) verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden alle Materialien und Geräte aufgelistet (Tab. 1 – Tab. 10), die für die Methoden verwendet wurden. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen (Durchmesser: 1,2cm)	Karl Hecht Glaswarenfabrik, Sondheim, D
Einmal-Pipetten: 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Einmal-Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D Starlab, Ahrensburg, D
Einmal-Plastikröhrchen 15ml, 50ml Round bottom 12ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D BD Biosciences, Heidelberg, D
Filter, CellTrics 50µm	Partec, Görlitz, D
Filtermembran	Hahnemühle, Dassel, D
Nitrozellulosemembran (0,45µm)	BioRad, München, D
Pasteurpipetten mit / ohne Watte	Roth, Karlsruhe, D
Peha-soft M	Hartmann, Heidenheim, D
Reaktionsgefäße: 0,2 ml (für PCR; Nuklease-frei) 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Biozym, Oldendorf, D Eppendorf, Hamburg, D
Well Platten (6 / 24 / 96)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen: 25cm² (T25), 75cm² (T75)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen (Durchmesser: 10cm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

Material und Methoden

Tab. 2: Geräte und Software

	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav:	2540 EL	Tuttnauer, Wesel, D
Bildbearbeitung:	GIMP 2.8	FSFE, Düsseldorf, D
	CorelDraw Essentials 4	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Block-Thermostat:	MBT 250	ETG, Ilmenau, D
Blotkammer:	Transblot SD	Bio-Rad, München, D
Brutschrank:	Heraeus HERAcell	Thermo Scientific, Schwerte, D
ChemiDoc XRS		Bio-Rad, München, D
Software:	QuantityOne Version 4.6.2	
Durchflusszytometer:	LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, D
Software:	FACS Diva 6.1	
Elektrophoresekammer:		
Agarosegele:	Horizon 11.14	Biometra, Göttingen, D
	MidiLarge	Thermo Scientific, Schwerte, D
SDS-PAGE:	Mini-Protean III Cell	Bio-Rad, München, D
Heizblock	LS1	VLM, Leopoldshöhe, D
Lichtmikroskop:	Leitz Labovert FS	Leitz, Wetzlar, D
Magnetrührer:	Ikamag Rec-G	Janke & Kunkel, Staufen, D
Mikrowelle		Bosch, Stuttgart, D
PCR-Thermocycler:		
	PTC-200	MJ Research, Waltham, MA, USA
	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, D
PCR- Werkbank:	UVC/T-AR	PeqLab, Erlangen, D
Photometer	Helios Omega UV-Vis	Thermo Scientific, Schwerte, D
Spannungsquellen:		
	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
	Electrophoresis Power - Supply ps 400	Appligene
	Power Pac 300	BioRad Laboratories, München, D
Statistik:	SPSS v24	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D
Taumel-Schüttler:	GFL	GFL, Burgwedel, D
Ultraschallgerät:	Sonopuls HD 2070	Bandelin Elektronik, Berlin, D
Vortexer:	Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
	Art.-Nr. 444-1372	VWR International, Darmstadt, D
Waagen:	AE 200	Mettler-Toledo, Gießen, D
	PB 602	
Zellkultur-Werkbank:		
	Nuaire Class II Type A/B3	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Zentrifugen:	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
	Rotina 380 R	Hettich, Tuttlingen, D

Material und Methoden

Tab. 3: Pipetten und weiteres Zubehör

Bezeichnung	Hersteller
Cooler: -20°C MiniCooler (0,5-2ml) Eppendorf PCR Cooler	Brand, Wertheim, D Eppendorf, Hamburg, D
Nanoküvette	Thermo Scientific, Schwerte, D
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht Glaswarenfabrik, Sondheim, D
Pipetten:	
Gilson pipetman P1000, P200, P20	Gilson, Middleton WI, USA
Labmate 100-1000 µl	High Tech Lab, Warschau, PL
Starpet 2 µl	Starlab, Ahrensburg, D

Tab. 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhalt
3 M NaOH	1g NaOH in 8,3ml dH ₂ O
20 mM NaOH / 90 % EtOH	900µl EtOH (100%), 93,4µl dH ₂ O, 6,6µl 3M NaOH
DMEM pH 7,4	133,8g DMEM, 3,7g NaHCO ₃ in 10l dH ₂ O
FACS-Puffer	40 ml PBS (1x), 200µl FCS (0,5%), 160µl 0,5M EDTA (2mM)
Gelelektrophoresepuffer (1x)	25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS
JLB-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8), 150mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% Triton-X-100
Laemmli-Puffer (2x)	25 ml Sammelgelpuffer, 40 ml 10% SDS, 20 ml Glycerol (85%), 10ml β-Mercaptoethanol, 5 ml 2,5% Bromphenolblau-Lösung
PBS (10x)	80g NaCl, 2g KCl, 9,2g Na ₂ HPO ₄ , 2g KH ₂ PO ₄ (2g) mit dH ₂ O auf 1000ml
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl mit 1% SDS, pH 6,8
TBE (10x)	108g Tris-Base, 55g Borsäure, 9,3g EDTA mit dH ₂ O auf 1000ml
TEN (1x)	2,4g Tris-HCl (pH 7,5), 400µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 17,5 NaCl; mit dH ₂ O auf 1000ml
TE-Puffer	10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA
Transferpuffer	47,9 mM Tris-Base, 38,6 mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl mit 1% SDS, pH 8,8
Waschpuffer	1xPBS, 0,05% Tween 20

dH₂O: destilliertes Wasser; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; EtOH: Ethanol; FACS: *fluorescence activated cell sorting*; FCS: fetales Kälberserum; HCl: Chlorwasserstoff; JLB: *Jurkat lysis buffer*; KCl: Kaliumchlorid; KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat; NaCl: Natriumchlorid; NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat; Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat; NaOH: Natriumhydroxid; PBS: *phosphate buffered saline*; pH: pH-Wert; SDS: Natriumdodecylsulfat; TBE: *TRIS-Borat-EDTA*; TE: *TRIS-EDTA*; TEN: *TRIS-EDTA-NaCl*.

Material und Methoden

Tab. 5: Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller
2 – Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Acridinorange	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	Bio-Rad, München, D
Agarose	Biozym, Oldendorf, D
APS 10%	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Borsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Bradford-Reagenz (5x)	Bio-Rad, München, D
DEPC- behandeltes Wasser; nukleasefrei	Ambion, Darmstadt, D
Detektionslösung Western-Blot:	
Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Schwerte, D
DNA-Längenstandard:	
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder #SM1333	Thermo Scientific, Schwerte, D
DNA-Ladepuffer:	
6 x Orange Loading Dye #R0631	Thermo Scientific, Schwerte, D
6 x Loading Dye #R0611	Thermo Scientific, Schwerte, D
dNTPs (je 10mM ATP, CTP, GTP, TTP)	PeqLab, Erlangen, D
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ethanol (100%)	J.T. Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Bio-Rad, München, D
FcR-Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ (25mM)	PeqLab, Erlangen, D
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
NaCl	J.T. Baker, Griesheim, D
SDS Ultra Pure	Th. Geyer, Berlin, D
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, D
PIC	Roche, Mannheim, D
PCR-Reaktionspuffer (10 x)	PeqLab, Erlangen, D
PMSF	Merck, Darmstadt, D
Proteinmarker:	
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Reaktionspuffer S (10x)	PeqLab, Erlangen, D
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	PeqLab, Erlangen, D
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tris-Base	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco, Karlsruhe, D
Trockenmilch-Pulver	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim, D

APS: Ammoniumpersulfat; ATP: Adenosintriphosphat; CTP: Cytidintriphosphat; DEPC: Diethylpyrocarbonat; DNA: Desoxyribonukleinsäure; dNTP: Desoxynukleotid-5'-Triphosphat; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; GTP: Guanosintriphosphat; KCl: Kaliumchlorid; KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat; MgCl₂: Magnesiumchlorid; NaCl: Natriumchlorid; Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat; NaOH: Natriumhydroxid; PCR: Polymerasekettenreaktion; PIC: Protease-Inhibitor-Cocktail; PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid; SDS: Natriumdodecylsulfat; TEMED: Tetramethylethylendiamin; TTP: Thymidintriphosphat.

Material und Methoden

Tab. 6a: Zellkulturmedien

Medium	Komponente	Konzentration	Volumen
Basismedium (500ml)	DMEM/Ham's F12 Medium		480ml
	L-Glutamin	200mM	10ml
	Streptomycin / Penicillin	1ng/10µl	5ml
	Amphotericin	81ng/10µl	5ml
F-Medium (500ml)	DMEM/Ham's F12 Medium		450ml
	FCS		50ml
	Streptomycin / Penicillin	1ng/10µl	5ml
	Amphotericin	81ng/10µl	5ml
N-Medium (200ml)	Basismedium		160ml
	BIT		40ml
	huEGF	20ng/ml	40µl
	Hu-bFGF	20ng/ml	40µl
CaCo-Medium (50ml)	DMEM/Ham's F12 Medium		40ml
	FCS		10ml
	Streptomycin / Penicillin	1ng/10µl	500µl
Stopp-Medium (50ml)	Basismedium		45ml
	FCS		5ml

BIT: Bovines Albumin/Insulin/Transferrin; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; FCS: fetales Kälberserum; huEGF: *human epidermal growth factor*; hu-bFGF: *human basic fibroblast growth factor*.

Tab. 6b: Komponenten für Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Amphotericin B (81ng/10µl)	PromoCell, Heidelberg, D
BasicFGF, human, rekombinant	PromoCell, Heidelberg, D
BIT-9500	Provitro, Berlin, D
DMEM/Ham's F12 Medium	Biochrom, Berlin, D
EGF, human, rekombinant	PromoCell, Heidelberg, D
FCS	PromoCell, Heidelberg, D
L-Glutamin (200mM)	PromoCell, Heidelberg, D
Streptomycin / Penicillin (1ng/10µl)	PromoCell, Heidelberg, D

BIT: bovin Albumin/Insulin/Transferrin; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; EGF: *epidermal growth factor*; FCS: fetales Kälberserum; FGF: *fibroblast growth factor*.

Tab. 7: Kits

Bezeichnung	Hersteller
CpGenome DNA Modification Kit S7820	Millipore, Schwalbach, D
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen, Hilden, D
SimpleCHIP Enzymatic Chromatin IP (Agarose Beads) #9002	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA

Material und Methoden

Tab. 8: Antikörper für Durchflusszytometrie, Western-Blot und Chromatinimmunpräzipitation

Methode	Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
DFZ	CD 133/2 - PE	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	1:11
	IgG2b - PE	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	1:11
WB	α SOX2	Kaninchen	Millipore, Schwalbach, D	1:1000
	α pan Aktin	Maus	Millipore, Schwalbach, D	1:2000
	α GARPO	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, D	1:5000
	α GAMPO	Ziege	Beckman Coulter, Krefeld, D	1:5000
ChIP	αH3 (#4620)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:50
	αIgG (#2729)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:100
	αSOX2 (#5024)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:50
	αH3K9ac (#9671)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:50
	αH3K9me2/3 (#5327)	Maus	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:100
	αH3K4me3 (#9751)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers MA, USA	1:50

ac: acetyliert; ChIP: Chromatinimmunpräzipitation; DFZ: Durchflusszytometrie; GAMPO: *goat anti-mouse IgG peroxidase*; GARPO: *goat anti-rabbit IgG peroxidase*; H: Histon; IgG: Immunglobulin G; K: Lysylrest; me: methyliert; PE: *phycoerythrin*; SOX2: (*sex determining region Y*)-box 2; WB: Western-Blot; α: Antikörper.

Tab. 9: Oligonukleotide für methylierungsspezifische PCR

Primer	Syntheserichtung	Sequenz (5' nach 3')	Fragmentlänge [bp]
U1	Vorwärts	GAATTAGTGTATGGATAGTTATGTGTATATGAATG	116
	Rückwärts	CTACACCATACACATTAACCCAAATACTACA	
M1	Vorwärts	CGTATGGATAGTTACGCGTATATGAAC	102
	Rückwärts	GTACGCATTAACCCGAATACTACG	
U2	Vorwärts	GTGGGTTGGGTTTGTGTATAGTG	120
	Rückwärts	CCAACCACCACCACATAAAATTACCA	
M2	Vorwärts	GGTCGGGTTTCGCGTATAGC	110
	Rückwärts	CCGCCGCGATAAAATTACCG	
U3	Vorwärts	TGTTTATTTATTTTTTTGAAAAGGTG	210
	Rückwärts	CTCAAACCCAACCTCACTACCAA	
M3	Vorwärts	TGTTTATTTATTTTTTCGAAAAGGCG	207
	Rückwärts	GAACCCAACCTCGCTACCGAA	

A: Adenin; bp: Basenpaare; C: Cytosin; G: Guanin; M: Primerpaar methyliert; T: Thymin; U: Primerpaar unmethyliert.

Material und Methoden

Tab. 10: Primer für die PCR nach Chromatinimmunpräzipitation

Bezeichnung	Größe [bp]	Hersteller
RPL 30 Exon 3 (#7014)	171	Cell Signaling, Danvers MA, USA
Sox2 (#4649)	80	Cell Signaling, Danvers MA, USA
Oct3/4 (#4641)	99	Cell Signaling, Danvers MA, USA

Oct 3/4: *octamer-binding protein 3/4*; RPL 30: Ribosomales Protein 30; Sox2: (*sex determining region Y*)-box 2.

SLGC-Linien

Für die Nutzung von Tumorproben für das Anlegen von Zellkulturen und die nachfolgenden Arbeiten mit diesen liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Aktenzeichen: 08-070; siehe Anhang). Die Patienten stimmten nach Aufklärung der Teilnahme an der Studie durch Unterschrift zu.

Die für diese Arbeit verwendeten Zellen entstammen humanen, primären Gehirntumoren, welche durch Mitarbeiter der Klinik für Neurochirurgie des UKSH Campus Lübeck operativ entfernt wurden. Die histologische Klassifikation erfolgte durch das Institut für Pathologie des UKSH Campus Lübeck. WHO-Grad und Tumorentität der Primärtumoren sowie verwendete Nummerierung der Zelllinien sind Tab. 11 zu entnehmen. Sämtliche Zelllinien wurden im Labor (AG Zechel) etabliert.

Tab. 11: Charakteristika der für SLGC-Mutterkulturen verwendeten Primärtumoren

Zelllinie	Tumorentität	WHO-Grad	Patientencharakteristika
T1338	Glioblastom	IV	57 Jahre männlich
T1371	Gliosarkom	IV	76 Jahre weiblich
T1389	Glioblastom	IV	60 Jahre männlich
T1440	Glioblastom	IV	58 Jahre männlich
T1442	Glioblastom	IV	66 Jahre männlich
T1447	Gliosarkom	IV	68 Jahre weiblich
T1452	Glioblastom	IV	57 Jahre männlich
T1464	Glioblastom	IV	66 Jahre weiblich
T1495	Glioblastom	IV	70 Jahre weiblich
T1495 SCID	Glioblastom	IV	Orthotoper Tumor einer SCID-Maus
T1522	Glioblastom	IV	67 Jahre männlich

SCID: *severe combined immunodeficiency*.

Aus 10 SLGC-Mutterkulturen (Tab. 11) und daraus abgeleiteten Klonen wurden genomische DNAs für die Bisulfitmodifikation gewonnen. Weiterhin wurde aus ausgewählten Zelllinien und Klonen (T1371, T1440, T1442, T1495) Chromatin zur Chromatinimmunpräzipitation hergestellt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden fünf (T1338, T1371, T1447, T1452, T1495) und für die

Material und Methoden

Western-Blot-Analyse wurden sieben (T1389, T1440, T1442, T1447, T1452, T1495, T1495 SCID, T1522) ausgewählte Zelllinien verwendet. Die Klone wurden von den Kollegen im Labor durch „*limited dilution assay*“ angelegt und sind dem entsprechenden Kapitel zu entnehmen.

Zur Optimierung der MSP-Methode wurden DNA-Proben von SLGC-Linien verwendet, die zuvor im Labor modifiziert wurden und von denen bekannt war, dass sie mit einem Vergleichsprimer (MGMT methyliert/unmethyliert; nicht dargestellt) reproduzierbare Ergebnisse ergaben. Diese bisulfit-modifizierten DNAs wurden mir zur Verfügung gestellt (Tab. 12). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese Proben mit den Code-Nummern P1 – P8 benannt.

Tab. 12: Modifizierte DNA zur Optimierung der MSP

Zelllinie		Tumorentität	Zelllinie
P1	T1338	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur
P2	T1338	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur
P3	T1389	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur
P4	T1389	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur
P5	T1371	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur
P6	T1371	Gliosarkom	SLGC-Mutterkultur
P7	U87-MG	Glioblastom	Etablierte GBM-Zelllinie
P8	T1440	Glioblastom	SLGC-Mutterkultur

SLGC: *stem-like glioma cell*; T plus Nummer: SLGC-Kultur; U87-MG: *Uppsala 87 Malignant Glioma*.

Als Kontrollen für die Analysen kamen weiterhin zwei etablierte Zelllinien zum Einsatz. Dabei handelte es sich einerseits um die Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2 (Fogh et al., 1977) für die Durchflusszytometrie, die dem Labor von Herrn Prof. Dr. Dr. Habermann (Chirurgie, UKSH, Campus Lübeck) zur Verfügung gestellt wurde. Andererseits wurde die etablierte GBM-Zelllinie U87 (Jacobs et al., 2011) eingesetzt, die dem Labor von der Arbeitsgruppe Westphal (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

SLGC-Mutterkulturen und Klone wurden im Labor von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe expandiert.

Für die Kultivierung von SLGC-Linien wurde N-Medium und für CaCo2 und U87 CaCo-Medium eingesetzt (Tab. 6a). Die Kulturen wurden im Zellkulturinkubator in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Ab einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert, wobei sich die Verdünnung (1/2 bis 1/20) der Zellen in der Tochterkultur nach dem Wachstumsverhalten der Zelllinien richtete.

Die Zellen wurden zunächst nach Absaugen des Zellkulturmediums mit Trypsin/EDTA enzymatisch vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Proteolyse wurde – bei in serumhaltigem Medium kultivierten Zelllinien (U87-MG und CaCo2) – durch F-Medium gestoppt. Bei den in serumfreiem Medium kultivierten SLGC-Zelllinien wurde die Trypsin-Reaktion durch ein spezielles Stopp-Medium (Tab. 6a) beendet. Anschließend wurde die Suspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 5min bei 250xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 1x PBS (Tab. 4) resuspendiert, für 3-5min mechanisch dissoziiert und die Zellsuspension mit einer dem Proliferationsverhalten angepassten Menge an Medium in eine neue Zellkulturflasche (T25) überführt oder in 10cm Kulturschalen plattiert.

Die Zellernte begann mit dem Absaugen des Kulturmediums und zwei Waschschritten mit 1xPBS. Anschließend wurde den Zellen 1ml 1xTEN (Tab. 4) zugeführt. Für die 10cm-Schalen wurden die Zellen mit einem Gummispatel vom Boden mechanisch gelöst. Für T25-Zellkulturflaschen erfolgte die Ernte enzymatisch mit Trypsin/EDTA, gefolgt von einem Waschschriff in 1xPBS und Suspendieren in 1ml 1xTEN. In allen Fällen folgte eine Pelletierung in einem 1,5ml Reaktionsgefäß durch Zentrifugierung für 1min bei 4.000rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge (Heraeus Pico 17). Der Überstand wurde möglichst quantitativ entnommen und verworfen. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung (Western-Blot-Analyse, MSP) bei -20°C gelagert.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Analyse des Anteils an Zellen einer Kultur, die das Oberflächenmolekül CD133 exprimierten, erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es wurden SLGC-Mutterkulturen und davon abgeleitete Klone aus Glioblastomen und Gliosarkomen untersucht. Die Zellen wurden in T25-Kulturgefäßen kultiviert. Da das CD133/Prominin1-Molekül von Trypsin nicht angegriffen wird, erfolgte die Ernte von Zellen enzymatisch mit Trypsin/EDTA. Als Positivkontrolle für CD133+ Kulturen wurden CaCo₂-Zellen mitgeführt.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur „Quantifizierung von Zellen oder Partikeln aufgrund ihrer relativen Größe, relativen Granularität/Komplexität und relativen Fluoreszenzintensität mit Hilfe von Laserstrahlung. Im Durchflusszytometer passieren die zellulären Bestandteile einer Probe nacheinander einen Laserstrahl. Dabei wird das Laserlicht in Abhängigkeit von ihrer Größe (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung) in verschiedene Richtungen gestreut“ (Arndt, 2009). Eine Markierung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern erlaubt die Expressionsanalyse zellulärer Antigene und somit eine Phänotypisierung der zu untersuchenden Zellpopulation (Arndt, 2009).

Zunächst wurden die Zellen lichtmikroskopisch bezüglich des Wachstumsverhaltens beurteilt und in adhärenente Zellen, Wachstum als Sphären oder Mischformen unterteilt. Hiernach richtete sich das Vorgehen bei der Zellernte für die Durchflusszytometrie.

Bei adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und 1ml Trypsin/EDTA zugefügt. Die Zellen wurden bis zur Ablösung bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit 1ml Stopp-Medium (Tab. 6a) beendet. Anschließend wurden die Zellen für 4min bei 250xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1ml 1x PBS resuspendiert und die Proben auf Eis gestellt.

Sphären wurden direkt in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 4min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in 1ml Trypsin/EDTA resuspendiert und dabei mechanisch mit einer Pasteurpipette dissoziiert. Sobald eine homogene Suspension entstanden war, wurde die Reaktion mit 1ml Stopp-Medium beendet, die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Resuspension in 1ml 1x PBS und eine erneute Zentrifugierung. Die Zellen wurden danach in 1ml 1xPBS gut suspendiert und auf Eis gelagert.

Bei Zelllinien, die sowohl sphärische als auch adhärenente Zellen enthielten, wurden die Zellen des Überstands in ein Zentrifugenröhrchen überführt und analog zum Protokoll für Sphären behandelt. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen adhärenenten Zellen wurden gemäß dem oben beschriebenen Protokoll für adhärenente Zellen behandelt. Nach dem Waschen mit 1xPBS wurden die beiden Suspensionen vereinigt und bis auf Weiteres auf Eis gelagert.

Material und Methoden

Die CaCo₂-Zellen wurden analog zu den adhärennten SLGC-Linien geerntet, wobei die Trypsinierung mit CaCo₂-Medium (Tab. 6a) beendet wurde.

Für die Durchflusszytometrie wurden die in 1ml 1xPBS suspendierten Zellen zu gleichen Anteilen in drei 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 1min bei 4.000 rpm und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 80 µl FACS-Puffer (Tab. 4) resuspendiert. Danach wurden 20µl FcR-Blocking-Reagenz dazu pipettiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Es folgte die Zugabe von 10µl PE-gekoppelter CD133- Antikörper oder 10µl der Isotypkontrolle IgG2b-PE (Tab. 8) pro Reaktionsgefäß. Das dritte Zellaliquot blieb ohne Antikörper und diente später als Autofluoreszenzkontrolle. Die Zellen wurden 15min auf Eis inkubiert und danach 1ml FACS-Puffer (Tab. 4) zugefügt. Zellsuspensionen, die sich von Sphärenkulturen ableiten, wurden anschließend einmal über eine Filtermembran filtriert, um Aggregate zu eliminieren, welche das Durchflusszytometer okkludieren könnten. Es folgte die Zentrifugierung für 10min bei 4.000 rpm und Raumtemperatur (Tischzentrifuge Heraeus Pico 17), der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets in 500µl FACS-Puffer resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte anschließend am Durchflusszytometer (LSR II) in der CAnaCore Facility des Universitätsklinikums (Institut für systemische Entzündungsforschung; Leitung: Prof. Dr. J. Kohl) unter Verwendung der Software FACS – Diva 6.1. Es wurden je 10.000 Zellen gezählt und die Ergebnisse als Punktwolkendiagramm dargestellt. Bei der Messung wurden die Zellen zunächst anhand der Größe mittels Vorwärtsstreulicht (FSC; engl.: *forward scatter*) sowie der Granularität mittels Seitstreulicht (SSC; engl.: *side scatter*) detektiert. Der Messbereich wurde angepasst, um Zellfragmente sowie –konglomerate auszuschließen und somit nur korrekt dissoziierte Zellen zu detektieren. Die Detektion von CD133 erfolgte mittels eines PE-gekoppelten (engl.: *phycoerythrin*) Antikörpers. Durch rechnerische Normierung gegen die Autofluoreszenz und die Isotyp-Kontrolle wurde der Anteil CD133+ Zellen ermittelt.

2.2.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot

Die Expression von Sox2 in Glioblastom- und Gliosarkomzelllinien wurde mittels Western-Blot-Methode analysiert. Hierzu wurden Gesamtzellproteinextrakte aus Zelllinien hergestellt. Die Zellen wurden wie auf Seite 26 beschrieben geerntet.

Proteinextraktion

Die Proteinextraktion aus den Zellen zur Gewinnung des Gesamtzellproteinextrakts (WCE; engl.: *whole cell extract*) erfolgte nach Resuspension der Zellpellets in eiskaltem JLB-Lysepuffer (Tab. 4). Der Puffer enthielt 2µl PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail; Tab. 5) und 0,5µl einer gesättigten, alkoholischen PMSF- (Phenylmethylsulfonylfluorid) Lösung. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. In Abhängigkeit von der Pelletgröße variierte die eingesetzte Menge an JLB-Puffer zwischen 100-500µl. Nach 30-minütiger Inkubation der Proben wurde bei 4°C für 10min bei 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels „Bradford-Assay“. Die Methode beruht darauf, dass es zur Komplexbildung der Proteine mit dem Bradford-Reagenz kommt und dies mit einer farblichen Veränderung einhergeht, die photometrisch erfasst wird (Maniatis et al., 1989). 2µl Proteinextrakt wurden in 800µl 1xPBS pipettiert und mit 200µl 5x Bradford-Reagenz versetzt, gründlich gemischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte am Omega UV-Vis-Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=595\text{nm}$. Als Referenz diente eine proteinfreie Probe mit 1xBradford-Reagenz. Mittels einer mit Serumalbumin erstellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration graphisch ermittelt. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) nach Laemmli eingesetzt (Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1989). Dieses Verfahren ermöglicht durch die im Ladepuffer (2xLaemmli-Puffer) enthaltenen Reagenzien Natriumdodecylsulfat und β -Mercaptoethanol die Denaturierung der Proteine sowie die Aufhebung der Proteineigenladung. Durch proportionale Bindung von SDS zur Molekülmasse werden die Proteine negativ geladen und die elektrophoretische Trennung erfolgt entsprechend der Molekülmasse. Das Gelsystem besteht aus einem Trenn- (10%) und Sammelgel (4%) (Tab. 13). Für analytische Gele wurden zunächst 5µl Proteinextrakt mit 5µl 1xPBS und 10µl 2xLaemmli-Puffer vermischt und aufgetrennt. Für präparative Gele wurden 15µg Proteinextrakt pro Spur analysiert. Parallel zu den Proben wurden 5µl Proteinmarker (Tab. 5) aufgetrennt. Die SDS-PAGE erfolgte mit dem Protean III SDS-PAGE System bei 200V für 45min in 1x Gelelektrophoresepuffer.

Material und Methoden

Tab. 13: Komponenten des Trenn- und Sammelgels der SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Aqua dest.	2,00 ml	1,80 ml
Trenngelpuffer (Tab. 4)	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (Tab. 4)	-	0,75 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 8%)	1,66 ml	0,40 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	15 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	3 µl	4 µl

Western-Blot

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (0,45µm) im sog. Semi dry-Verfahren. Hierzu wurden zunächst die SDS-PAGE-Gele 10min in Transferpuffer (Tab. 4) inkubiert. Währenddessen wurden 3 Filterpapiere ebenfalls mit Transferpuffer benetzt und übereinandergelegt. Hierauf wurde zunächst zentral die in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran platziert und darüber das äquilibrierte Gel gelegt. Abschließend folgten drei weitere benetzte Filterpapiere. Der Transfer wurde bei 12V für 1h in der Blotkammer TransBlot SD durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran zum Absättigen von Bindungsstellen für 15min unter kontinuierlicher Bewegung in 2% Blockierpuffer (1xPBS, 2% Trockenmilch) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem für Sox2-spezifischen Antikörper (Tab. 8) in 2% Blockierpuffer (1xPBS, 2% Trockenmilch) über Nacht bei 4°C in Plastikbeuteln. Nach Inkubation wurde der überschüssige, nicht-gebundene Primärantikörper in drei 10-minütigen Waschschritten mittels Waschpuffer (Tab. 4) entfernt. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (GARPO, Tab. 8) bei Raumtemperatur. Es folgte erneut das Entfernen überschüssiger Antikörper in drei Waschschritten (s.o.).

Abschließend wurde die Antikörperbindung mit 750µl Detektionslösung am ChemiDoc XRS detektiert. Das in der Detektionslösung enthaltene Luminol wird hierbei durch die Peroxidase umgesetzt, wobei Licht emittiert wird. Nach der Detektion von Sox2 erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit Antikörpern gegen Aktin und/oder GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) (Tab. 8). Diese dienten als Ladekontrollen, da die Proteine Aktin und GAPDH ubiquitär in Zellen exprimiert werden. Im Falle der Aktin-Kontrolle erfolgte nach der Inkubation mit dem Primärantikörper die mit dem Sekundärantikörper GAMPO (Tab. 8). Im Falle von GAPDH war der Antikörper bereits mit der Peroxidase gekoppelt, womit die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfiel. Die Sox2-Signale wurden mit Hilfe der Software Quantity One (Tab. 2) quantifiziert und als relative Expression zu den Aktin- bzw. GAPDH-Signalen ausgedrückt.

2.2.4 Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)

Bei dieser Methode wird zunächst genomische DNA aus Zellen isoliert und dann mit Hilfe von Bisulfit modifiziert. Dabei wird die Base Cytosin im alkalischen Milieu zu Uracil desaminiert, während 5-Methylcytosin unverändert aus der Reaktion hervorgeht. Mithilfe geeigneter Primer lässt sich das Ergebnis mittels PCR überprüfen, da nur Cytosin – nicht aber Uracil – mit der Base Guanin eine Basenpaarung eingeht (Abb. 4).

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung sowie –Reinigung wurden mittels des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Tab. 7) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Zellpellets in 200µl 1xPBS resuspendiert, 20µl Proteinase K zugegeben und für 1h bei 56°C inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Freisetzung der DNA und ein Verdau von Proteinen. Anschließend wurden erst 200µl AL-Puffer und dann 200µl 100%-iges Ethanol dazu pipettiert und gemischt. Das Lysat wurde komplett auf die Membran der DNeasy-Säulen überführt und die DNA unter Zentrifugierung an die Säule gebunden. Dies wurde für 1min bei 8.000xg und Raumtemperatur durchgeführt. Es folgten zwei Reinigungsschritte, wobei je 500µl AW1- bzw. AW2-Puffer auf die Membran gegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert wurde. Zur Trocknung der DNA-Säulen folgte eine dreiminütige Zentrifugierung bei 15.000xg und Raumtemperatur. Danach erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 100µl AE-Puffer. Dabei wurde zunächst der Puffer für 5min bei Raumtemperatur auf der Säule inkubiert und danach für 2min bei 15.000xg zentrifugiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4°C.

Ein Aliquot der isolierten DNA wurde auf 0,5%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid (10mg/ml) unter UV-Licht im ChemiDox XRS detektiert.

Agarosegelelektrophorese

Agarosegele fanden in mehrfacher Hinsicht Anwendung.

Einerseits wurde damit die Integrität und Menge der isolierten genomischen DNA untersucht (0,5% Gel). Andererseits wurden die Produkte der PCR-Analysen im Rahmen der MSP (Methylierungsspezifische PCR; 2% Gel) und der ChIP (Chromatinimmunpräzipitation; 2% Gel) analysiert. Weiterhin wurden die Chromatinpräparationen auf einem 1% Gel aufgetrennt. In allen Fällen wurde die Agarose durch Aufkochen in 100ml 1xTBE (Tab. 4) gelöst, nach Abkühlen auf ca. 45°C mit 2µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) versetzt und dann in die Gelküvette gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer mit Laufpuffer (1xTBE-Puffer) überschichtet und die DNA aufgetragen. Die verwendeten Ladepuffer waren „6x Loading Dye“ (Tab. 5) für die genomische DNA sowie „6x Orange Loading Dye“ (Tab. 5) für die PCR-Fragmente. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V.

Material und Methoden

Zur Mengenbestimmung der genomischen DNA wurde diese parallel zu 5µl und 10µl eines DNA-Längenstandards (Tab. 5) mit bekannter Konzentration elektrophoretisch auf 0,5 TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Durch Vergleich der Signalstärke der obersten Markerbande (20kbp) und derjenigen der genomischen DNA wurde die Konzentration der DNA-Präparate empirisch ermittelt. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden diese analog zur genomischen DNA auf TBE-Agarosegelen aufgetrennt und die Bandenintensität mit der einer bekannten Marker-Bande ähnlicher Fragmentlänge verglichen. Allerdings erfolgte im Fall der MSP primär ein Vergleich der Produkte der U- (unmethyliert) und M- (methyliert) PCRs derselben DNA untereinander. Im Falle der CHIP dienten die Input- und Isotyp-Kontrolle als Referenzen (s.u.). Für die Quantifizierung wurde stets die Software QuantityOne eingesetzt und die Signalstärke ermittelt.

DNA-Modifikation

Die Modifikation der DNA erfolgte mittels Bisulfitreaktion in alkalischer Lösung. Dazu wurde die DNA mit Natriumbisulfit behandelt, wodurch zunächst am C6 des unmethylierten Cytosins sulfoniert wurde. In den weiteren Schritten erfolgte die Desaminierung zu Uracyl-Sulfonat und die Umwandlung in Uracil (Abb. 4, A). Methyliertes Cytosin blieb hierbei unverändert (Abb. 4, B).

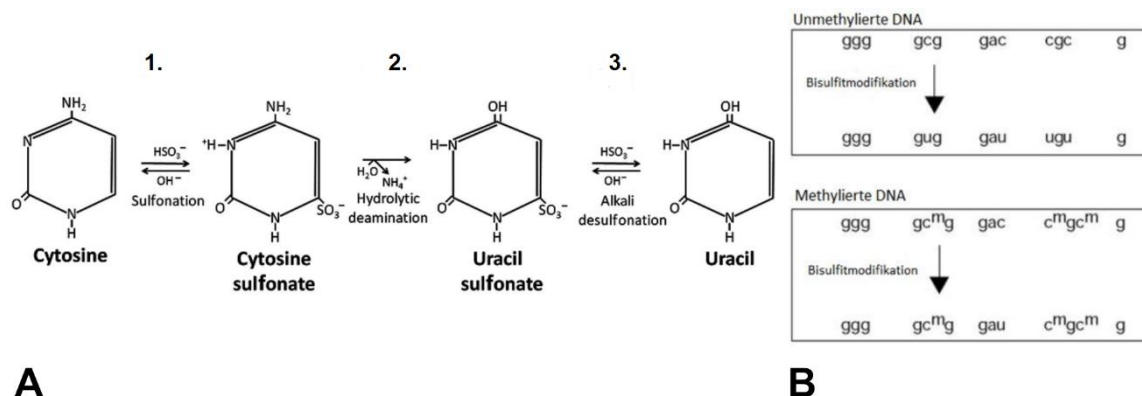


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bisulfitreaktion (A) und deren Abhängigkeit des Methylierungsstatus (B). (A) 1. Reversible Sulfonierung an C⁶-Atom des Cytosins 2. Hydrolytische Desaminierung an C⁴ 3. Alkalische Desulfonierung an C⁶. (B) Konversion des unmethylierten Cytosins in Uracil (oben). Keine Konversion von 5-Methylcytosin (unten) (adaptiert aus (Kristensen und Hansen, 2009) (A) und (CpGenome™-DNA Modification Kit S7820¹)(B)).

Die Bisulfitmodifikation wurde mit dem „CpGenome DNA Modification Kit“ (Tab. 7) nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Lösungen wurden frisch angesetzt: 3M NaOH, 20mM

¹ CpGenome™ DNA Modification Kit S7820.

http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/CMN_/S7820.20050610.pdf

Tag des Zugriffs: 14.01.2017.

Material und Methoden

NaOH / 90% Ethanol und das im Kit enthaltene Reagenz I. Das bei -20°C gelagerte Reagenz I wurde zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend pro DNA-Probe 0,227 g abgewogen und in je 0,571 ml dH₂O gelöst. Mittels pH-Indikatorpapier wurde in 20 µl Schritten mit 3 M NaOH der Ziel-pH von 5,0 titriert. 1 µg modifizierte DNA wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100µl verdünnt, anschließend 7 µl 3 M NaOH hinzupipettiert und für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 550 µl Reagenz I wurde das Gemisch bei 50°C über Nacht inkubiert. Im Weiteren wurde das Reagenz II frisch angesetzt. Zunächst wurde 1 µl 2-Mercaptoethanol in 20 ml dH₂O verdünnt und Reagenz II auf Raumtemperatur erwärmt. Pro Probe wurden dann 1,35 g Reagenz II abgewogen und in 750 µl 2-Mercaptoethanol-dH₂O gründlich gelöst.

Die in Reagenz III enthaltene Glasmilch, welche die modifizierte DNA bindet, wurde durch Schütteln und Vortexen gründlich resuspendiert und 5µl davon in jede Probe pipettiert. Danach wurden 750µl Reagenz II zugefügt und für 10min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wird in diesem Schritt an die Glasmilch immobilisiert. Nach Zentrifugierung für 1min bei 10.000xg und Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Glasmilch wurde nun mehrmals gewaschen. Im ersten Waschschrift wurde in 1ml 70% EtOH resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Es folgte eine Zentrifugierung für 3min bei 14.000xg. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde die Glasmilch in 50µl 20mM NaOH/90% EtOH resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten analog drei Waschschriffe mit 90% EtOH und eine abschließende Zentrifugierung für 3min bei 14.000xg und Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Proben bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Elution der DNA von der Glasmilch wurde diese in 30µl DNase/RNase-freiem dH₂O suspendiert und für 15min bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Glasmilch durch Zentrifugierung für 3min bei 10.000xg pelletiert, zweimal je 15µl modifizierte DNA abpipettiert und in ein 0,75ml Reaktionsgefäß überführt. Die modifizierten Proben wurden bis zur MSP bei -20°C gelagert.

Primer für die MSP-Analyse

Die für die MSP benötigten spezifischen Primer entstammen den Publikationen „*Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas*“ (Primer U1, M1, U2, M2: (Alonso et al., 2011)) sowie „*Hypermethylation of SOX2 Promoter in Endometrial Carcinogenesis*“ (Primer U3, M3: (Wong et al., 2010)) bzw. „*Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and chorioncarcinoma*“ (Primer U3, M3: (Li et al., 2008)) und sind in Tab. 9 aufgelistet.

Die Ermittlung der Länge der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch den Abgleich der Primersequenzen unter Berücksichtigung der durch Bisulfit veränderten Basen mit Hilfe der

Material und Methoden

Datenbank von *HomoloGene*² nach dem Genlokus NM_003106 für *Sox2* (*H. sapiens*) durchsucht (Wong et al., 2010). Diese Nukleotidsequenz wurde inklusive 1.000bp der 5'-Region der Promotorsequenz heruntergeladen. Die theoretisch durch die Bisulfitreaktion veränderten Basen wurden identifiziert und mit der ursprünglichen Sequenz abgeglichen, wobei für Vorwärts- und Rückwärts-Primer unterschiedliche Herangehensweisen notwendig waren, da Uracil in der DNA durch Thymin zu ersetzen ist und im Komplementärstrang zur modifizierten Base (C→U) Adenin steht. In der Ermittlung der Primersequenzen in Bezug auf den Methylierungsstatus wurde nach CpG-Inseln gesucht, an welchen die DNA vorwiegend methyliert werden sollte und die daher methyliertes Cytosin, welches durch Bisulfit unverändert bleibt, enthält.

Optimierung der PCR-Reaktion

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse in der MSP wurden neben den Parametern Annealing-Temperatur und Zyklenzahl auch die Stringenz der PCR verändert. Unter Stringenz versteht man den Prozentsatz an möglichen homologen Interaktionen von Primer und Zielsequenz, wobei bei hoher Stringenz nur identische Nukleinsäuren paaren (Lang, 2006). Der Parameter wurde durch Änderung des Mg^{2+} -Ionen-Gehalts beeinflusst.

Das für die PCR benötigte Mg^{2+} wurde in Form von $MgCl_2$ bereitgestellt. Mg^{2+} bewirkt die Stabilisierung der Primer-Bindung an die DNA sowie die Bindung der Polymerase an die Primer und dient als Cofaktor für die Polymerase. Generell wird davon ausgegangen, dass eine zu geringe $MgCl_2$ -Konzentration die Qualität der PCR-Produkte verringert, eine zu hohe Konzentration dagegen die Bildung unspezifischer Produkte fördert (Hartmann, 2007). Die zur Optimierung getesteten $MgCl_2$ -Konzentrationen lagen bei 1,5 mM, 2,0mM und 2,5mM und wurden mit jedem der in Tab. 9 genannten Primern durchgeführt. Anschließend wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, hinsichtlich spezifischer Banden sowie deren Intensität bewertet und somit die optimale $MgCl_2$ -Konzentration bestimmt.

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>

Material und Methoden

Durchführung der methylierungsspezifischen PCR

Nach Optimierung der Bedingungen erfolgte die methylierungsspezifische PCR (MSP) nach unten genanntem Protokoll.

Es wurden stets die Primer zur Amplifizierung der methylierten und unmethylierten Promotorregion in parallelen Reaktionen eingesetzt und die Produkte des M-Ansatz (methylierter Status) in Relation zum U-Ansatz (unmethylierter Status) quantifiziert.

Tab. 14: Komponenten des MSP-Master-Mixes

Komponente	Menge [μ l]	
	U	M
Nuklease-freies Wasser	16,5	16,1
dNTP (10mM ATP, CTP, GTP, TTP)	0,5	0,5
Primer	Reverse (10pmol/l)	0,4
	Forward (10pmol/l)	0,4
10 x Reaktionspuffer S	2	2
MgCl ₂ (25mM)	-	0,4
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	0,2	0,2
Master-Mix	20	20

ATP: Adenosintriphosphat; CTP: Cytidintriphosphat; dNTP: Desoxynukleosidtriphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; M: methyliert; MgCl₂: Magnesiumchlorid; TTP: Thymidintriphosphat; U: unmethyliert.

Für die PCR wurde stets ein Mastermix (Tab. 14) eingesetzt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten aufgetaut, gemischt und auf Eis gelagert. Der Mastermix wurde auf Eis zusammenpipettiert, wobei die in Tab. 14 genannte Reihenfolge befolgt wurde. Von diesem Gemisch wurden je 19 μ l in ein 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend 1 μ l der modifizierten DNA zupipettiert. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden direkt vom PCR-„cooler“ (4°C) in den 94°C heißen PCR-Block überführt und dort 3min inkubiert. Es folgten 45 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Denaturierung (94°C, 45sec), Annealing (68°C, 45sec), Synthese (72°C, 45sec). Abweichend davon wurde die DNA-Amplifizierung mittels Primerpaar 3 unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung (94°C, 45sec), Annealing (55°C, 45sec), Synthese (72°C, 60sec); 45 Zyklen. In allen Fällen erfolgte ein abschließender Syntheseschritt für 10 min bei 72°C und die Abkühlung auf 4°C.

Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, die DEPC-behandeltes Wasser anstelle modifizierter DNA enthält. Die PCR-Produkte wurden auf 2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und im ChemiDoc XRS mit der Software QuantityOne quantifiziert.

2.2.5 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatinimmunpräzipitation ist eine Methode, um die Interaktion zwischen Proteinen und DNA zu untersuchen (Abb. 5). Hierzu wird ein cross-link des Chromatins mittels Formaldehyd verursacht und die zu untersuchenden Protein-DNA-Komplexe mittels Immunopräzipitation unter Einsatz bestimmter Antikörper gereinigt (Orlando und Paro, 1993). Neben der Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen kann insbesondere die Interaktion von Promotoren diverser Gene mit Transkriptionsfaktoren und Histonen analysiert werden (Gade und Kalvakolanu, 2012).

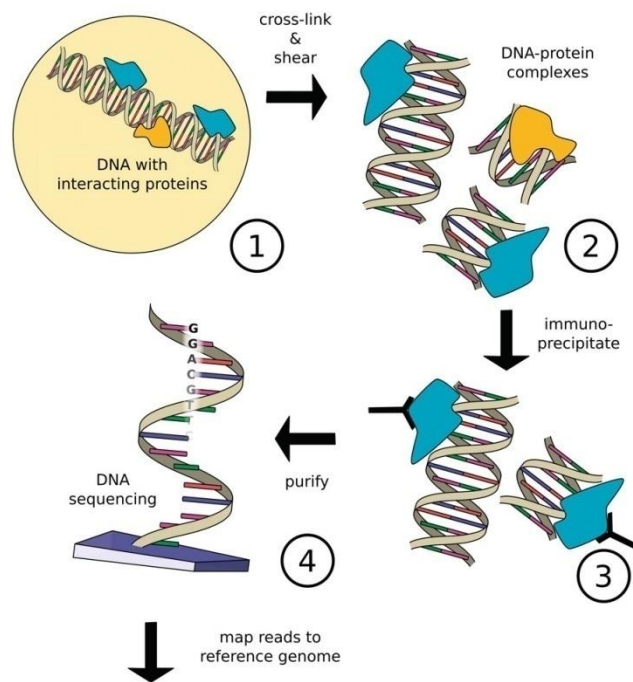


Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der ChIP (Chromatinimmunpräzipitation). (1) Cross-link der DNA-Protein-Interaktion mittels Formaldehyd und Fragmentierung der DNA-Segmente. (2) Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein. (3) Isolierung der präzipitierten DNA-Abschnitte. (4) Amplifizierung der spezifischen DNA-Segmente (adaptiert aus Szalkowski und Schmid, 2011).

Die initialen Arbeiten erfolgten nach Herstellerprotokoll (*SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Agarose Beads) #9002*, CellSignaling Technology; Tab. 7) und wurden entsprechend den unten genannten Angaben modifiziert.

Material und Methoden

Cross-link und Isolierung des Chromatins

Zur Isolierung des Chromatins wurden die Zelllinien stets ohne Zuhilfenahme von Trypsin geerntet.

Zunächst wurde in den Kulturschalen mittels 135µl Formaldehyd 37% pro 10cm Schale (27µl pro ml Medium; Endkonzentration 1%) die Bildung der DNA-Protein-Komplexe (*cross-link*) durchgeführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 100µl 10xGlycin-Puffer pro ml Medium die Fixierung gestoppt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und das Entfernen der Flüssigkeit. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und Zentrifugierung bei 4°C. Es wurden zwei Waschschriffe mit je 20ml 1xPBS durchgeführt. Zelllinien mit adhärenem Wachstum wurden direkt in den Zellkulturschalen gewaschen, die sphärischen Kulturen dagegen in sterile Einmalplastik-Röhrchen überführt und während der Waschschriffe für 5min bei 1000 x g pelletiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 1ml PBS-PMSF-Puffer (1xPBS, Phenylmethylsulfonfluorid, Verdünnung 1:1000) resuspendiert und 5min inkubiert. Bei PMSF handelt es sich um einen Protease-Inhibitor, welcher unerwünschten enzymatischen Proteinabbau verhindern kann. Hiernach wurden die Zellen mechanisch mittels Plastikspatel von den Zellkulturschalen gelöst und in sterile Einmalplastikröhrchen überführt. Die sphärischen Kulturen wurden analog in den Plastikröhrchen behandelt. Der weitere Versuchsablauf war unabhängig vom Wachstumsverhalten identisch und die abgenommenen Überstände wurden asserviert und für spätere Analysen aufbewahrt.

Nach Zentrifugierung für 5 min bei 2000 x g wurde zunächst der Überstand abgenommen (Ü1) und die Zellen zur Lyse der Plasmamembran in 10ml Puffer A (5µl 1M DTT, Dithiothreitol; 50µl 200x PIC, Protease-Inhibitor-Cocktail; 10µl PMSF) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation unter mehrfacher Inversion wurden die Nuklei für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und erneut der Überstand abgenommen (Ü2). Anschließend wurden die Nuklei für 10 min unter wiederholter Inversion mit 10ml Puffer B (0,05% 1M DTT) inkubiert und erneut zentrifugiert (2.000 x g, 5min). Der Überstand (Ü3) wurde asserviert.

Die Pellets wurden anschließend in 1ml Puffer B (s.o.) resuspendiert und je 500µl pro ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 2,5µl Mikrokokken Nuklease – einer Endo-Exonuklease – pro 500µl erfolgte eine enzymatische Chromatinfragmentierung bei Inkubation bei 37°C. Die Reaktionsgefäße wurden dabei mehrfach invertiert. Zur Untersuchung eines optimalen Nukleaseverdaus wurde die Reaktion sowohl nach 30min als auch nach 40min beendet. Als Stopp-Medium dienten 50µl 0,5M EDTA pro 500µl Suspension. Nach Zentrifugierung für 1min bei 10.000 x g wurden erneut die Überstände abgenommen (ÜNE). Nach Resuspendierung in 1ml 1xChIP-Puffer (5µl 200x PIC; 1µl PMSF) wurden die lysierten Zellen in 15ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und eine Chromatinfragmentierung durch Ultraschall durchgeführt. Dieser Schritt diente zudem der Fragmentierung der Nuklei. Nach 2-3 Durchgängen der Sonifizierung (je 3 Zyklen, 7sec,

Material und Methoden

Intensität: 30%) wurde je 1 Tropfen pro Probe lichtmikroskopisch analysiert und mit der Probe vor der Behandlung verglichen. Dabei wurde Acridinorange eingesetzt, das intakte Zellstrukturen erkennen lässt, und eine Aussage über Intaktheit von Kern-Membranen erlaubt. Gegebenenfalls wurde die Sonifizierung wiederholt. Die Probe wurde hiernach erneut zentrifugiert (10min, 4.000rpm) und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das isolierte Chromatin befand sich im Überstand, das Pellet wurde für Kontrollzwecke asserviert (ÜNP). Es folgte die Chromatinanalyse.

Chromatinanalyse

Zunächst erfolgte die qualitative Analyse des isolierten Chromatins. Hierzu wurden 50µl des asservierten Chromatins mit 100µl Nuklease-freiem Wasser, 6µl NaCl und 2µl RNase A (10mg/ml) gemischt, um eventuell vorhandene RNA enzymatisch zu hydrolysieren. Der Vorgang erfolgte im Wärmeblock für 45min bei 37°C. Anschließend erfolgte der enzymatische Abbau der Chromatin-Proteine und somit Freisetzung der DNA. Dazu wurden den Proben 2µl Proteinase K (20mg/ml) hinzugefügt und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Nach der Freisetzung der DNA aus den Nukleosomen erfolgte deren Aufreinigung mittels DNA-Spinsäulen. Hierzu wurden die Proben mit 750µl DNA-Bindepuffer gemischt und auf die Säulen aufgetragen. Durch Zentrifugierung bei Raumtemperatur für 30sec bei 15.000 x g wurde die DNA an die Membran der DNA-Säulen gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen durch Zugabe von 750µl Waschpuffer gewaschen. Nach Zentrifugierung für 30sec bei 15.000 x g und Raumtemperatur wurde erneut der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule erneut unter oben genannten Bedingungen für 2min trocken zentrifugiert. Es folgte die Elution der DNA durch Zugabe von 50µl Elutionsreagenz, 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugierung unter oben genannten Bedingungen für 1min. Der Durchfluss mit der eluierten DNA wurde für weitere Analysen asserviert.

Zunächst erfolgte die Analyse des gereinigten Chromatins auf einem 1%-igen Agarosegel. Durch die während der Präparation zugegebene Mikrokokken-Nuklease wurde das Chromatin während der Manipulation (siehe oben) in nukleosomale Einheiten fragmentiert. Da in jedem Nukleosom ca. 147bp DNA enthalten sind, sollten in den Agarosegelen mehrere Banden zwischen ca. 150 und 750bp detektiert werden. Chromatinpräparationen mit mono- bis penta-nukleosomalen Fragmenten werden als optimal eingestuft (laborinterne Erfahrungswerte). Für die Analyse wurden 12µl des eluierten Chromatins mit 2µl Ladepuffer (6x Orange Loading Dye) gemischt und neben einem DNA-Massenstandard aufgetragen. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde anschließend am ChemiDocXRS detektiert. Zur Konzentrationsbestimmung des Chromatins wurden 1,5µl Eluat auf eine Nano-Küvette überführt und am Photometer gemessen.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

In der Chromatinimmunpräzipitation werden durch spezifische Antikörper mit der DNA interagierende Proteine gebunden. Durch Bindung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe an Agarose-Beads können die gebundenen DNA-Sequenzen isoliert und weiter analysiert werden.

Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung des Chromatins wurde das für die ChIP notwendige Volumen der Chromatinimmunpräparationen rechnerisch ermittelt (10-20µg pro Ansatz). Die benötigte Menge wurde mit 1xChIP-Puffer (0,5% 200x PIC) auf 500µl verdünnt. Hiervon wurden je 10µl verdünntes Chromatin als Input-Kontrolle bei -20°C asserviert.

Anschließend wurden die Suspensionen mit den unter Tabelle 10 gelisteten Antikörper versetzt. Als Positivkontrolle wurde der Histon H3 – Antikörper verwendet, welcher das ubiquitär vorkommende Histon H3 bindet; als Negativkontrolle wurde ein IgG eingesetzt, der nicht an die Nukleosomen bindet, aber Auskunft über die sogenannte „*signal noise ratio*“ gibt. Als weiterer Schritt zur Minimierung von „Hintergrundsignalen“ wurde das Chromatin unmittelbar vor der Antikörperzugabe einem sogenannten „*pre-clearing*“ unterzogen. Dazu wurde die identische Menge Protein A/Protein G-Agarose-Beads wie für die Immunpräzipitation (IP, siehe unten) mit dem Chromatin über Nacht bei 4°C auf einem Rotator gemischt. Die Agarosebeads wurden für 1min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand mit dem Chromatin auf die Reaktionsgefäße für die IP verteilt.

Die zur IP eingesetzten Antikörper richteten sich gegen Sox2, das acetylierte Histon H3K9ac sowie die methylierten Histone H3K27me2/3 und H3K4me3. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rotator. Nach Abschluss der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Proben mit 30µl in ChIP-Puffer äquilibrierten Protein A/Protein G-Agarose-Beads versetzt und bei 4°C für 4h unter Rotation inkubiert. In diesem Schritt binden die Antikörper-Chromatinkomplexe an das immobilisierte Protein A/Protein G, weshalb in der Fachliteratur von „*capturing*“ gesprochen wird. Um nicht gebundene Chromatin- oder Chromatin-Antikörper-Komplexe von den auf den Agarosebeads immobilisierten Proben zu trennen, erfolgten mehrere Waschschrte. Hierzu wurden die Suspensionen in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 1min bei 6.000rpm und Raumtemperatur in der Pico-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und asserviert. Das Pellet mit den Bead-Antigen-Antikörper-Komplexen wurde in 1ml low-salt-Waschpuffer (1xChIP-Puffer) gründlich resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zwischendurch mehrfach invertiert. Es erfolgte die Zentrifugierung unter o.g. Bedingungen und der Überstand wurde ebenfalls abgenommen und asserviert. Dieser Waschschrte wurde zweimal wiederholt.

Abschließend wurde der Waschschrte analog mit 1ml high-salt-Waschpuffer (1ml 1xChIP-Puffer; 70µl 5M NaCl) wiederholt. Daraufhin wurde direkt mit der Elution der DNA aus den immunpräzipitierten Komplexen begonnen.

Material und Methoden

Um die DNA aus den Protein-Komplexen zu lösen, wurden die Agarosebeads mit dem immunpräzipitierten Material in 150µl 1xElutionspuffer gründlich resuspendiert und bei 65°C für 30min unter wiederholtem Invertieren inkubiert. Dabei lösen sich die DNA-Protein-Komplexe von den Agarosebeads. Nach Zentrifugierung für 1min bei 6.000rpm und Raumtemperatur wurde das im Überstand enthaltene Chromatin in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufhebung des Cross-links erfolgte durch enzymatische Behandlung mit einer Protease. Dazu wurde jede Probe mit 6µl 5M NaCl und 2µl Proteinase K versetzt und für mindestens 4h bei 65°C inkubiert. Die durch den Verdau freigesetzten immunpräzipitierten DNA-Fragmente wurden über Spin-Säulen gereinigt. Dazu wurde oben genanntes Protokoll (siehe Chromatinanalyse) eingesetzt und die DNA mit 50µl DNA Elutionsreagenz von den Säulen eluiert. Die gereinigte DNA wurde bis zur weiteren Analyse durch PCR bei -20°C gelagert.

Polymerasekettenreaktion der immunpräzipitierten DNA

Die verwendeten Primerpaare (RPL 30 Exon 3, Sox2, Oct4) waren kommerziell erwerblich (Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA) und sind Tab. 10 zu entnehmen. Die Primersequenzen werden vom Hersteller nicht preisgegeben. Es wurde ein Mastermix mit den Komponenten nuklease-freies Wasser, Desoxynukleosidtriphosphaten, forward/reverse Primer-Mix, 10x Polymerasepuffer und Taq-Polymerase wie in Tab. 15 gelistet angesetzt.

Tab. 15: Komponenten des Master-Mixes der CHIP-PCR

Komponente	Menge [µl]
Nuklease-freies Wasser	13,5
dNTP (10mM, ATP, CTP,GTP,TTP))	0,4
Primer-Mix (10pmol/µl, forward/reverse Primer)	2
10 x Polymerasepuffer	2
Taq-Polymerase (5Units/µl)	0,2
Master-Mix	18,1

ATP: Adenosintriphosphat; CTP: Cytidintriphosphat; dNTP: Desoxynukleosidtriphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; TTP: Thymidintriphosphat.

Analog zur methylierungsspezifischen PCR wurde der Mastermix stets frisch angesetzt. Von diesem Gemisch wurden 18µl in ein 0,2ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und 2µl eluierte DNA-Fragmente zugegeben. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden direkt vom PCR-„cooler“ (4°C) in den 94°C heißen PCR-Block überführt und dort 3min inkubiert. Es folgten 32 Zyklen unter folgenden Bedingungen für RPL30 Exon 3: Denaturierung (94°C, 30sec), Annealing (60°C, 30sec), Synthese (72°C, 30sec). Abweichend davon wurde die DNA-Amplifikation mittels Primerpaaren für Sox2 und Oct4 unter nachstehenden Bedingungen für 36 Zyklen durchgeführt: Denaturierung (94°C, 30sec), Annealing

Material und Methoden

(65°C, 30sec), Synthese (72°C, 30sec). In allen Fällen erfolgte ein abschließender Syntheseschritt bei 72°C für 7 min und die Abkühlung auf 4°C.

Die PCR-Produkte wurden auf 2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und im ChemiDoc XRS mit der Software QuantityOne quantifiziert

2.2.6 Statistik

Eine statistische Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse wurde wegen geringer Fallzahlen und parallel durchgeführter Blots nicht durchgeführt.

Für MSP- und ChIP-Analysen wurde der systematische Fehler von 5% angegeben; dieser wurde zuvor in vergleichenden Experimenten in der Arbeitsgruppe ermittelt und lag bei <5%. Ein statistischer Vergleich der Proben war nicht möglich, da es bei Durchführung von DNA-Modifikation (MSP) oder Immunpräzipitation (ChIP) stets zu Variationen zwischen unterschiedlichen experimentellen Serien kommt, die auf die Zellqualität und auch die chemischen Modifizierungen zurückzuführen sind. Um die Unterschiede zwischen Analysen der Promotormethylierung bzw. der Chromatinmodifizierungen verschiedener Zelllinien und Klone zu minimieren, wurden daher stets Serien verschiedener Proben an einem Tag untersucht statt Mehrfachbestimmungen identischer Proben ein und derselben Zelllinie bzw. Klons durchzuführen.

Analog wurde bei der Durchflusszytometrie der systematische Fehler angegeben. Hierbei ist neben experimentellen Problemen, wie Dissoziieren, Zellaggregaten und Sphäroiden, das Probenaufkommen ein beschränkender Faktor; so waren pro Zelllinie oder Klon jeweils drei parallele Ansätze (I) Autofluoreszenz, (II) Isotypkontrolle und (III) anti-CD133-Antikörper nötig. Die Qualität von Zellen an verschiedenen Versuchstagen kann in Abhängigkeit von der Wachstumsform deutlich schwanken, sodass die Ansätze statistisch nicht vergleichbar sind.

Für SLGC-Mutterkulturen und deren Klone, für die mit verschiedenen Methoden Daten gewonnen wurden, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde das Statistik-Programm SPSS (Version 24) verwendet, um den Korrelationskoeffizienten nach Pearson zu ermitteln. Dieser kann Werte zwischen -1 (perfekte negative Korrelation) oder 1 (perfekte positive Korrelation) annehmen. Zum einen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient für die Ergebnisse des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 ermittelt, um die Frage zu klären, ob die Promotorregionen Sox2 als Einheit regulieren oder nicht. Zum anderen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Beurteilung der Korrelation von Sox2-Promotormethylierung und Anteil an CD133+ Zellen ermittelt. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die beiden *stemness*-assoziierten Faktoren Sox2 und CD133 hinsichtlich bestimmter Parameter miteinander korrelieren. Sofern die Ergebnisse in Klonen der selben Passage erhoben wurden, wurden diese korreliert. Bei unterschiedlichen Passagen erfolgten differenzierte Untersuchungen in früheren und späteren Passagen. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde mittels „*bootstrap*“-Verfahren die Probenzahl exponenziert (1.000 Stichproben) und das entsprechende Konfidenzintervall des Korrelationskoeffizienten mit einem Konfidenzintervallniveau von 95% ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Konzept und Vorarbeiten

3.1.1 Sox2-Proteinexpression in Mutterkulturen

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe belegten, dass SLGC für <50 Passagen in serumfreien (N-) Medium stabil kultiviert werden können, ohne dass es zu einer signifikanten Reduktion von Stammzell-assoziierten Markern (z.B. Nestin, FABP7, Musashi) kommt (Hirsland, 2017; Zechel, persönliche Mitteilung). Dagegen führte die Behandlung mit Serum (2%, 5% und 10% FCS) zu einer Abnahme der Expression dieser Marker und der Ausbildung komplexer Zellformen (Choschzick, 2015); Zechel, persönliche Mitteilung). Um zu prüfen, welche der in der Arbeitsgruppe vorhandenen SLGC-Linien für die Untersuchung der epigenetischen Regulation von Sox2 in Frage kommen, wurden Gesamtzellproteinextrakte (WCE) mittels Western Blot analysiert. Abb. 6 zeigt einen typischen Blot. Die Analyse wurde wiederholt und zusätzlich ein WCE aus T1371-Kulturen einbezogen (nicht gezeigt).

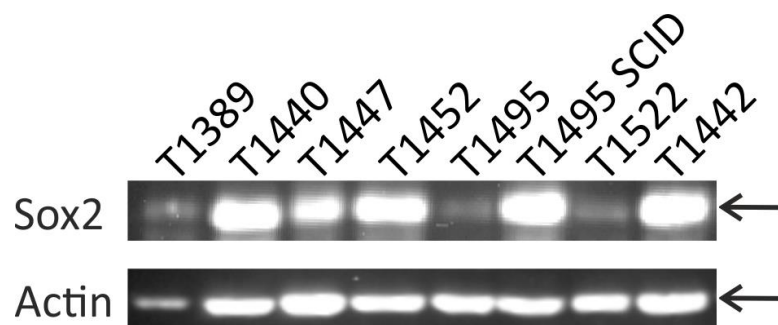


Abb. 6: Western-Blot-Analyse zur Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Sox2 in ausgewählten SLGC-Mutterkulturen von Glioblastomen und Gliosarkomen. Chemilumineszenz: Pfeil kennzeichnet die Position der Sox2-spezifischen Bande (~34 kDa) bzw. die Ladekontrolle Actin (~43kDa). T und Nummer bezeichnet die SLGC-Zelllinie, aus der die Proteine gewonnen wurden. SCID: „severe combined immunodeficiency“.

Der Western-Blot (Abb. 6) zeigt, dass der Sox2-Antikörper in allen untersuchten Zelllinien, außer T1389, T1495 und T1522 eine starke Bande detektierte. Damit bestätigt dieser Western-Blot die Analysen der Kollegen der Arbeitsgruppe, die eine hohe Sox2-Expression in den SLGC-Mutterkulturen nachwiesen.

3.1.2 Vorarbeiten für die Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die genomische DNA wurde aus Pellets der Zelllinien isoliert und mittels Gelelektrophorese überprüft (2.2.4). Dass es sich um hoch molekulare DNA handelte, die mit RNA kontaminiert war, wurde an einzelnen Aliquots mittels DNase- bzw. RNase-Behandlung überprüft (nicht gezeigt).

Die Bisulfitmodifikation erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

Für die methylierungsspezifische PCR (MSP) standen mehrere Sox2-Primer zur Verfügung, die auf unterschiedlichen Sox2-Promotorregionen binden. Diese wurden im Folgenden als Primerpaare 1 (U1, M1), 2 (U2, M2) und 3 (U3, M3) definiert. Die Sequenzabfolge der Sox2-Promotoren mit Angaben zur Hybridisierungsregion sind Tab. 9 zu entnehmen. Erste PCR-Versuche mit den Sox2-Primern ergaben in einigen Fällen multiple Banden statt eines definierten PCR-Produkts. Um die Ergebnisse zu optimieren, wurde der Parameter „MgCl₂“ modifiziert. Zusätzlich wurde eine Optimierung der Annealingtemperatur versucht, die jedoch keine maßgebliche Verbesserung der Ergebnisse erbrachte und daher nicht dargestellt wird.

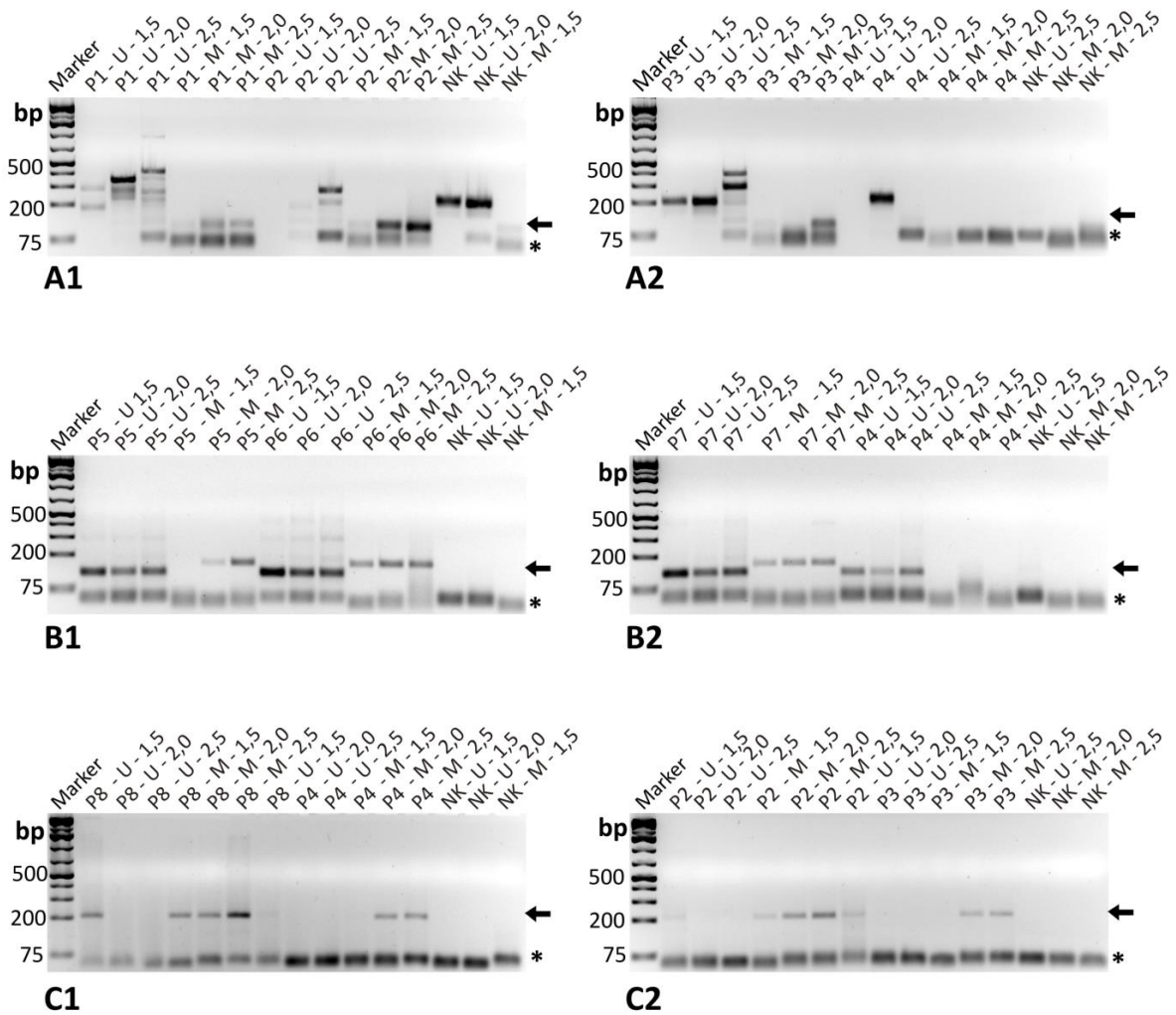


Abb. 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der MSP-Produkte, die bei MgCl₂-Konzentrationen von 1,5 bis 2,5 mM amplifiziert wurden. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(A)** Primerpaar Sox2 Promotorregion 1 [Länge: U=116 bp; M=102bp] **(B)** Primerpaar Sox2 Promotorregion 2 [Länge: U=120bp; M=110bp] **(C)** Primerpaar Sox2 Promotorregion 3 [Länge: U=210bp; M=207bp]. Es wurden die bisulfitbehandelten Kontroll-DNAs [P1-P8, Tab. 12] untersucht. [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [M] Primer für methylierte Promotorregion. [U] Primer für unmethylierte Promotorregion. Die Zahlen 1,5, 2,0 und 2,5 [Zahl] geben MgCl₂-Konzentrationen in mM an. [Stern] Oligonukleotidreste. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Es wurden MgCl₂-Konzentrationen von 1,5, 2,0 und 2,5 mM für alle drei Sox2-Primerpaare auf den Kontroll-DNA-Proben P1 – P8 getestet. Es zeigte sich (Abb. 7), dass die MSP mit dem Primerpaar 1 für den unmethylierten Sox2-Promotor bei allen 3 MgCl₂-Konzentrationen mehrere distinkte Banden ergab (Abb. 7, A). Die erwartete Größe des Amplifikats beträgt 116bp. Auf dieser Position waren in den Agarosegelen für das Primerpaar U1 keine Banden erkennbar, jedoch zeigten mehrere unspezifische Banden auf einer Position zwischen 200 und 500bp. Des Weiteren zeigten sich mit 1,5 und 2,0mM Banden in zwei der drei Negativkontrollen mit einer Größe von >200bp. Diese waren auch in den Spuren mit DNA-Template (P1-1,5mM, P1-2,5mM, P2-2,5mM, P3-1,5mM, P3-2,0mM,

Ergebnisse

P3-2,5mM und P4-2,0mM $MgCl_2$) erkennbar. Da die Banden bei einigen Template- $MgCl_2$ -Kombinationen fehlten, ist eine Kontamination des Mastermixes mit einem Template weitgehend auszuschließen und es liegt die Vermutung der Produktion eines unspezifischen Amplifikats bei reduzierter Stringenz nahe. Weitere Vorexperimente ohne $MgCl_2$ und mit verschiedenen Templates ergaben ebenfalls ein heterogenes Bandenmuster mit dem U-Primerpaar, wobei Amplifikate in weniger als 20% der Analysen auftraten (nicht gezeigt). Das Primerpaar für die methylierte Sox2-Promotorregion 1 erzeugte Produkte, die der erwarteten Produktgröße von 102bp entsprachen, jedoch nicht in den Ansätzen P4. Am eindeutigsten waren diese Banden bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 2,0mM und 2,5mM bei der Kontroll-DNA P1 und P2 sowie bei 2,5mM bei P3 zu beobachten (Abb. 7,A).

Die erwartete Produktgröße für die Primerpaare U2 und M3 entsprachen für die unmethylierte Sox2-Promotor-Sequenz 120bp und für die methylierte 110bp. Für das U (unmethylierte) Primerpaar waren in allen DNA-Proben Produkte der gewünschten Größe nachweisbar, wobei die stärkste Bande bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5mM beobachtet wurde; alle Negativkontrollen waren frei von amplifizierten Fragmenten (Abb. 7, B). Das Primerpaar M für die methylierte Sox2-Promotorregion 2 zeigte in den Proben P5, P6 und P7 amplifizierte DNA-Fragmente der erwarteten Größe von 110bp. In PCRs mit der DNA-Probe P4 wurden keine Produkte beobachtet. Auch hier waren die Negativkontrollen stets ohne erkennbare DNA-Amplifikation (Abb. 7, B). Anzumerken ist hierbei, dass die Produkte des Primerpaares M Sox2-Promotorregion 2 eine größere Produktgröße aufwiesen als mit Hilfe der genomischen Sequenz errechnet (beobachtet: ca. 190bp; errechnet: 110bp). Die Ursache hierfür ist unklar.

Die Analyse der Primerpaare für die Sox2-Promotorregion 3 ergaben für den M-Primer, nicht aber für den U-Primer deutliche bis starke Banden (Abb. 7, C). Bei den PCRs mit dem U Primerpaar waren lediglich in den Proben P2 und P8 bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5mM starke Banden im Bereich der errechneten Fragmentlänge von 210bp zu erkennen, wohingegen bei höheren $MgCl_2$ -Konzentrationen keine Banden nachweisbar waren. Für das M-Primerpaar wurden bei allen $MgCl_2$ -Konzentrationen für die Proben P2, P3, P4 und P8 Banden beobachtet. Die stärksten Banden waren bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 2,5mM nachweisbar. Die Negativkontrollen waren für beide Primerpaare M3 und U3 negativ.

Das Fazit der Tests mit den drei Primerpaaren für die Sox2-Promotorregionen ist, dass insbesondere die Promotorregion 2 reproduzierbare Ergebnisse mit den verschiedenen Test-DNAs lieferte. Für die Promotorregion 1 wurden mehrere unspezifische PCR-Produkte beobachtet. Für die Promotorregion 3 wurden mit dem M-Primerpaar, nicht aber dem U-Primerpaar, starke Banden erhalten.

3.1.3 Vorarbeiten zur Chromatinimmunpräzipitation

Bei der ChIP entscheiden mehrere Parameter über die Qualität des Chromatins. Dazu zählen insbesondere die Dauer des Nuklease-S7-Verdau und die Dauer der Sonifizierung. Hier wurde insbesondere der Parameter „Dauer des Nuklease-S7-Verdau“ variiert, wobei die Inkubationszeiten für die Mikrokokken-Nuklease zwischen 30 und 40min getestet wurden (Abb. 8). Nach Proteaseverdau des Chromatins wurden 10 μ l und 20 μ l Aliquot der freigesetzten DNA (siehe Kapitel 2.2.5) auf einem TBE-Agarosegel aufgetragen.

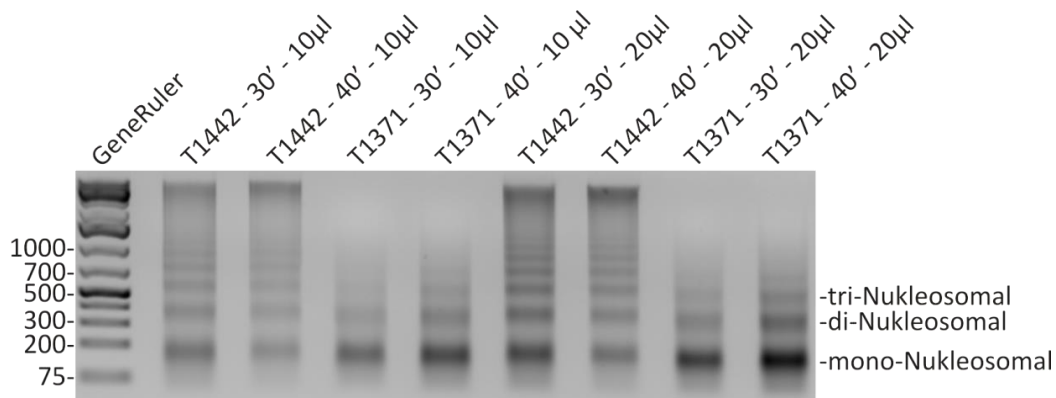


Abb. 8: Agarosegelelektrophorese des isolierten Chromatins nach Freisetzung und Reinigung der DNA. Exemplarisch ist die Analyse des Chromatins aus der GBM-Zelllinie T1442 und G5Sarc-Zelllinie T1371 gezeigt, wobei die Inkubationszeiten mit der Mikrokokken-Nuklease 30' und 40' (min) betragen. Als Marker diente „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“ (die Anzahl der Basenpaare ist für ausgewählte Banden angegeben). Es wurden 10 und 20 [μ l] der freigesetzten DNA aufgetragen.

Mittels des mitgeführten Längenstandards „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“ wurden die Bandengrößen der aus den Chromatinpräparationen freigesetzten DNAs ermittelt. Sowohl bei der Behandlung mit Mikrokokken Nuklease für 30 min und für 40 min wiesen die Chromatinpräparationen stets eine mononukleosomale Fraktion (146bp) auf. Die relative Häufigkeit von mononukleosomaler zu di-, tri- oder höher-nukleosomaler Fraktion variierte, was insbesondere in den Spuren mit 20 μ l Probe deutlich wurde. So war nach 30-minütiger Inkubation bei T1371 der relative Anteil mononukleosomaler Fraktion etwas höher als nach 40-minütiger Inkubation. Bei T1442 war der relative Anteil der mononukleosomalen Fraktion nach 40 min höher als nach 30 min. Entsprechend war der Anteil an di- und trinukleosomaler Fraktion nach 40 min im Vergleich zur 30-minütigen Behandlung reduziert.

Eine optimale Chromatinpräparation sollte neben einer mononukleosomalen Fraktion auch stets nachweisbare Anteile an di- und trinukleosomalen Fraktionen erhalten (laborinterne Erfahrungswerte). Das Fazit der Analyse der Mikrokokken-Nuklease-Verdauung ist somit, dass eine 30-minütige Inkubation mit der Nuklease ausreichend ist und eine 40-minütige Behandlung das Risiko einer zu starken Verdauung birgt.

3.2 Analyse des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen in GBM-Klonen

Durch die methylierungsspezifische PCR (MSP) sollte ermittelt werden, ob SLGC-Mutterkulturen (MC) und die davon abgeleiteten Klone (cl) einen hypo- oder hypermethylierten Sox2-Promotor haben und ob sich Klone und Mutterkultur hinsichtlich des Grads an Methylierung unterscheiden. Es wurden die T1338 MC und 10 Klone (cl-2, cl-3, cl-4, cl-5, cl-6, cl-7, cl-8, cl-9, cl-10, cl-11), die T1440 MC plus 4 Klone (cl-4, cl-5, cl-5-1, cl-8), die T1452 MC plus 8 Klone (cl-10, cl-14, cl-15, cl-16, cl-17, cl-20, cl-21, cl-155), die T1464 MC plus 8 Klone (cl-1, cl-6, cl-8, cl-11, cl-16, cl-18, cl-21, cl-27) sowie die T1495 MC plus 7 Klone (cl-4, cl-12, cl-13, cl-14, cl-16, cl-26, cl-37) untersucht. Dabei wurden von den T1452 Klonen cl-10, cl-15, cl-16, cl-20, cl-21 und cl-155 der Mutterkultur mehrere Passagen verglichen.

Die PCR-Produkte wurden auf TBE-Agarosegelen aufgetrennt und am ChemiDoc XRS unter UV-Licht detektiert. Es wurden jeweils nur die spezifischen Banden quantifiziert und die Signalintensität des U- plus des M-PCR-Produkts als 100% berechnet. Die relative Signalintensität für das U- und M-Produkt wurden graphisch dargestellt.

Da mit den Sox2-Primerpaaren U1/M1 in den Vorexperimenten und der Analyse von T1338 Mutterkultur und Klonen insbesondere mit dem unmethylierten Primerpaar variable Muster an unspezifischen Banden erhalten wurden, erfolgten die Analysen der Mutterkulturen und Klone für T1440, T1452, T1464 und T1495 primär mit den Primerpaaren U2/M2 und U3/M3. Lediglich für T1338 und T1464 wurde des U1-Primerpaar für weitere Analysen eingesetzt.

3.2.1 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1338

Die methylierungsspezifische PCR und somit der Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen wurden im Fall der SLGC-Linie T1338 und T1338-Klone mit Primern für alle drei Sox2-Promotorregionen durchgeführt, wobei jeweils die MgCl₂-Konzentration eingesetzt wurden, die die besten Ergebnisse in den Optimierungstests ergaben (Kapitel: 3.1.2).

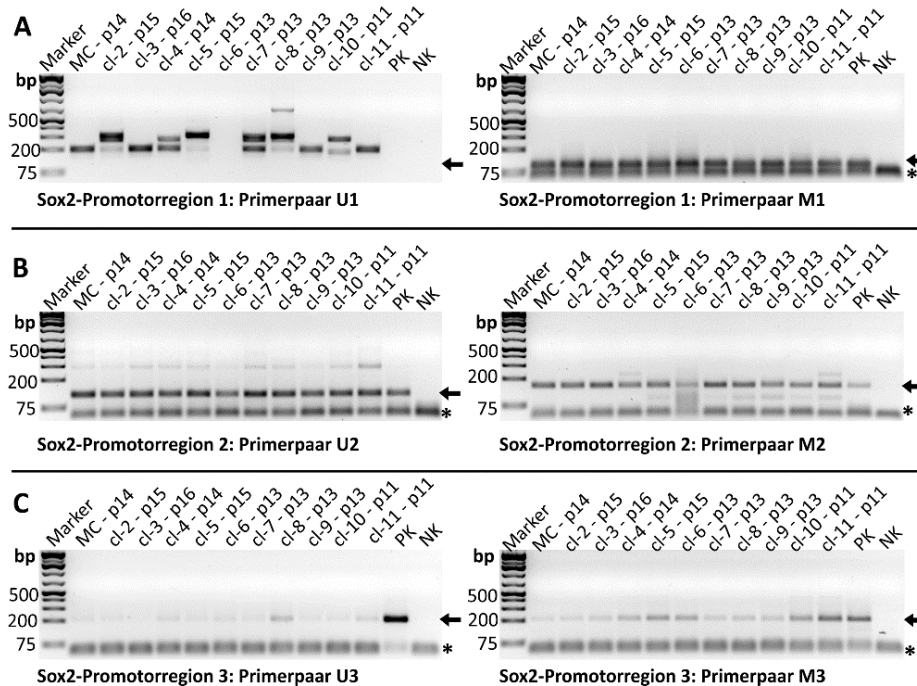


Abb. 9: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1338. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(Links)** Produkte der MSP für unmethylierte Promotorregionen. **(Rechts)** Produkte der MSP für methylierte Promotorregionen. **(A)** Primer für Sox2-Promotorregion 1 (U1: 116bp; M1: 102bp). **(B)** Primer für Sox2-Promotorregion 2 (U2: 120bp; M2: 110bp). **(C)** Primer für Sox2-Promotorregion 3 (U3: 210bp; M3: 207bp). [bp] Basenpaare. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage. [PK] Positivkontrolle [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [Stern] Anlagerung unspezifischer Oligonukleotide. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Mit dem Primerpaar Sox2-U1 wurden verschiedene PCR-Produkte einer Größe von 200bp, 300bp oder im Fall von Klon T1338 cl-8 ca. 550bp erhalten (Abb. 9, A links). Mit dem Primerpaar Sox2-M1 wurden für alle Templates die erwarteten Produkte von 102bp erhalten (Abb. 9, A rechts). Da das spezifische PCR-Produkt für den U1-Primer bei den Klonen T1338 cl-2, cl-5, cl-6 und cl-8 ganz oder fast fehlte, wurde das Verhältnis von U- zu M-Produkt für diese Analyse nicht berechnet. Für die Primerpaare M2 und U2 der Sox2-Promotorregion 2 wurden für die T1338 Mutterkultur und alle Klone die spezifischen Banden erhalten. Allerdings wies insbesondere der Klon T1338 cl-11 für U2 und M2 schwache zusätzliche Banden auf. Ein zusätzliches, kürzeres PCR-Produkt wurde in der Mehrheit der PCRs mit dem M2-Primer beobachtet. Die PCR für den Klon T1338 cl-6 ist nur bedingt

Ergebnisse

auswertbar (Schmier unterhalb der spezifischen Bande). Mit dem U2-Primerpaar wurde eine zusätzliche schwache Bande bei 300bps beobachtet. Hinsichtlich der relativen Intensität der spezifischen Produkte von M2 und U2 gab es nur geringe Unterschiede (Abb. 9, B). Für die Primerpaare U3 und M3 wurden spezifische Produkte in allen Spuren detektiert (Abb. 9, C). Dabei waren die Unterschiede in den Bandenintensitäten für die Klone T1338 cl-2, cl-7 und cl-8 sowie die Mutterkultur deutlich und der Anteil des U-Produkts überwog. Die T1338 Klone cl-10 und cl-11 wiesen ein Überwiegen des M-Produkts auf.

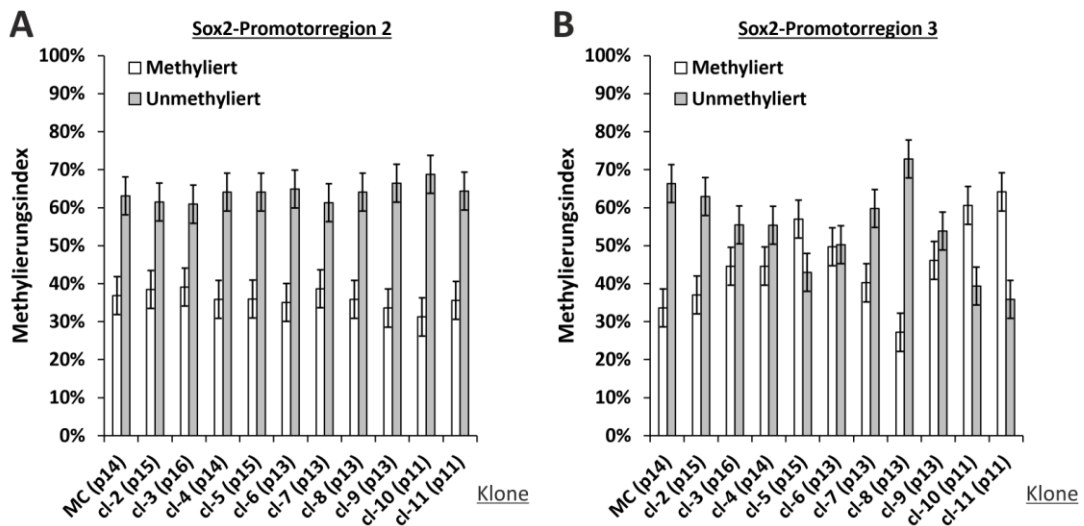


Abb. 10: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1338 Mutterkultur und abgeleiteter Klone. Die Bandenintensitäten von U- plus M-Produkt wurden als 100% definiert, die relative Häufigkeit der U- bzw. M-Banden ist in Prozent angegeben. Der systematische Fehler (5%) ist angegeben. **(A)** Sox2-Promotorregion 2. **(B)** Sox2-Promotorregion 3. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage.

Die Quantifizierung ergab, dass der relative Methylierungsanteil der T1338 Mutterkultur im Bereich der Sox2-Promotorregion 2 bei 35-40% lag. In allen Klonen war ein ähnliches Verhältnis von U- zu M-Bande zu beobachten (Abb. 10, A). Die relative Methylierung variierte zwischen 30% (cl-10) bis 40% (cl-3). Damit wiesen die Mutterkultur und die Klone einen sehr ähnlichen Grad an Sox2-Promotor-Methylierung in der von Primerpaar 2 amplifizierte Region auf. Es lag eine Hypomethylierung dieser Region vor.

Da die Signalstärken der mit den Primerpaaren Sox2-U3 und Sox2-M3 erhaltenen PCR-Produkte niedrig waren, war die Quantifizierung zum Teil schwierig (Abb. 10, B). Für die T1338 Mutterkultur wurde in der Sox2-Promotorregion 3 eine relative Methylierung von 30-35% ermittelt. Eine relative Methylierung von über 50% wurde für die T1338 Klone cl-10 (61%), cl-11 (64%) und cl-5 (57%) beobachtet. Eine relative Methylierung von unter 30% wurde für Klon cl-8 (27%) festgestellt. Alle übrigen Klone wiesen eine relative Methylierung von 35-45% auf. Bis auf den Klon cl-8 lagen die Methylierungen in allen Klonen geringfügig über dem der Mutterkultur lagen. Damit weist die MSP für die Sox2-Promotorregion 3 auf eine geringe bis mittlere Methylierung des Sox2-Promotors hin.

3.2.2 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1440

Analog zur SLGC-Linie T1338 erfolgte mit Proben der Mutterkultur und Klonen der Linie T1440 nach Abschluss der Bisulfitreaktion die methylierungsspezifische PCR mit den Sox2-Primerpaaren 2 und 3.

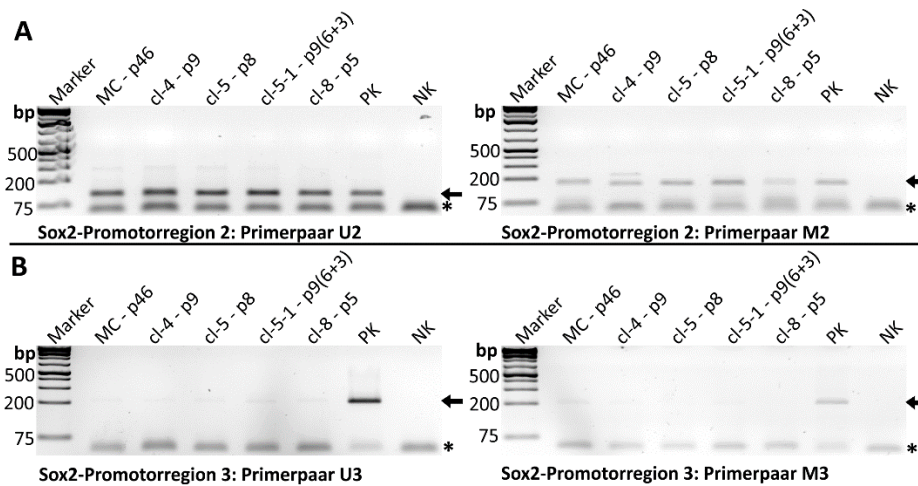


Abb. 11: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1440. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(Links)** Produkte der MSP für unmethylierte Promotorregionen. **(Rechts)** Produkte der MSP für methylierte Promotorregionen. **(A)** Primer für Sox2-Promotorregion 2 (U2: 120bp; M2: 110bp). **(B)** Primer für Sox2-Promotorregion 3 (U3: 210bp; M3: 207bp). [bp] Basenpaare. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage. [PK] Positivkontrolle [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [Stern] Anlagerung unspezifischer Oligonukleotide. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Für die SLGC-Mutterkultur T1440 konnten in allen MSP-Proben Produkte mit den Primerpaaren Sox2-U2 und Sox2-M2 erhalten werden, wobei in einigen Fällen die bereits beschriebenen schwachen zusätzlichen Banden auftraten (Abb. 11, A). Die spezifischen Banden wurden quantifiziert (Abb. 12, A). Die relative Methylierung der Sox2-Promotorregion 2 in der T1440-Mutterkultur lag hier bei 19%. In den Klonen konnte eine ähnliche oder noch niedrigere Methylierung nachgewiesen werden. Dabei war die Methylierung für die Klone T1440 cl-5 (18%) und cl-5-1 (20%) ähnlich der Mutterkultur. Die übrigen Klone wiesen mit 12% (Klon T1440 cl-8) und 14% (Klon T1440 cl-4) niedrigere Werte auf. Generell belegt die MSP eine deutliche Hypomethylierung der Sox2-Promotorregion 2 für T1440 Mutterkultur und Klone.

Mit den Primerpaaren Sox2-U3 und Sox2-M3 konnten ebenfalls in allen MSP-Proben Amplifikate der erwarteten Größen erhalten werden, wengleich die Intensität niedrig und deutlich geringer war als in den Proben der amplifizierten Sox2-Promotorregion 2 (Abb. 11, B). Nach Quantifizierung der spezifischen Banden (Abb. 12, B) wurde für die T1440 Mutterkultur ein Methylierungsgrad von 74% ermittelt.

Ergebnisse

Die Klone wiesen ein heterogenes Bild des Methylierungsgrads auf, wobei in allen Klonen eine Hypomethylierung der Sox2-Promotorregion 3 nachzuweisen war. Der Methylierungsgrad lag bei nahe 0% (Klon T1440 cl-8), 10% (Klon T1440 cl-5), 25% (Klon T1440 cl-4) und 31% (Klon T1440 cl-5-1). Auffallend ist hierbei, dass die Veränderung des Methylierungsgrad der Klone in keinem erkennbaren Zusammenhang der Passage stand und sich lediglich die hohe Passagenzahl der Mutterkultur im Methylierungsgrad der Promotorregion 3 (74%) widerspiegelte. Dagegen wiesen die Klone in den Passagen p8 (Klon T1440 cl-5 (10%)) bzw. p9 (Klon T1440 cl-4 (25%) und T1440 cl-5-1 (31%)) eine Hypomethylierung der Sox2-Promotorregion 2 auf.

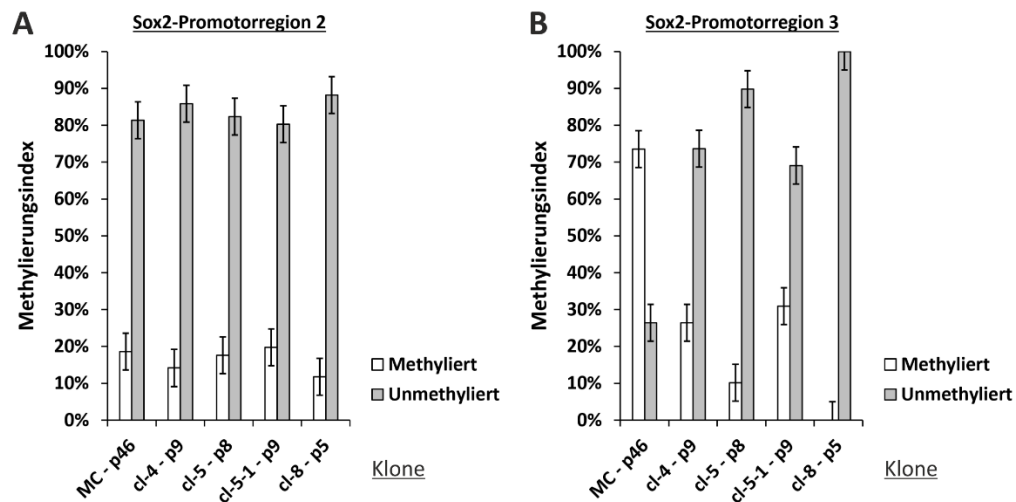


Abb. 12: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1440 Mutterkultur und abgeleiteter Klone. Die Bandenintensitäten von U- plus M-Produkt wurden als 100% definiert, die relative Häufigkeit der U- bzw. M-Banden ist in Prozent angegeben. Der systematische Fehler (5%) ist angegeben. **(A)** Sox2-Promotorregion 2. **(B)** Sox2-Promotorregion 3.

Die MSP-Analyse der SLGC-Linie T1440 ergab in der Summe eine homogene Methylierung der Sox2-Promotorregion 2 und eine heterogene Situation für die Sox2-Promotorregion 3 (Abb. 12). Dabei war die Promotorregion 2 in Mutterkultur und Klonen hypomethyliert, während die Sox2-Promotorregion 3 in der Mutterkultur hyper- und in den Klonen hypomethyliert war.

3.2.3 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1452

Für die SLGC-Linie T1452 erfolgte lediglich die MSP der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung und Quantifizierung.

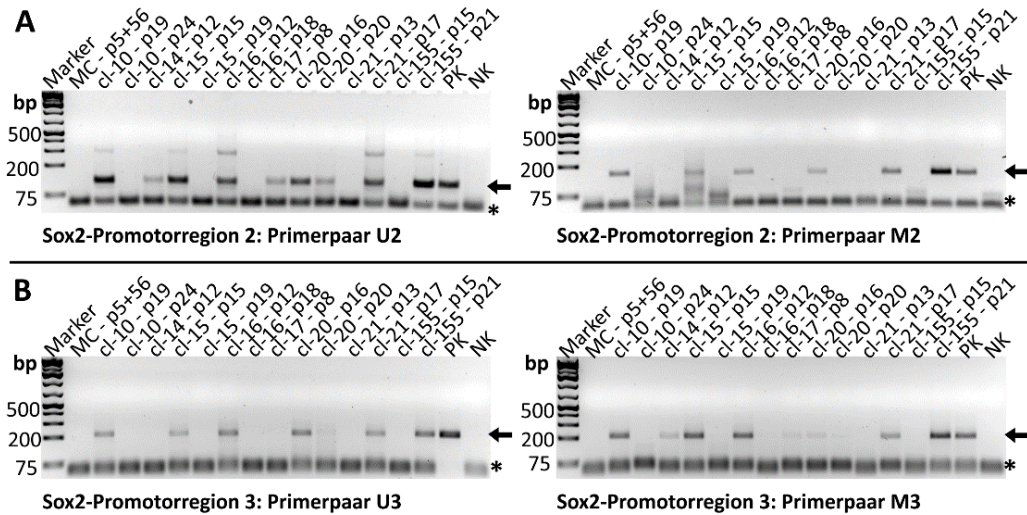


Abb. 13: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1452. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(Links)** Produkte der MSP für unmethylierte Promotorregionen. **(Rechts)** Produkte der MSP für methylierte Promotorregionen. **(A)** Primer für Sox2-Promotorregion 1 (U1: 116bp; M1: 102bp). **(B)** Primer für Sox2-Promotorregion 2 (U2: 120bp; M2: 110bp). **(C)** Primer für Sox2-Promotorregion 3 (U3: 210bp; M3: 207bp). [bp] Basenpaare. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage. [PK] Positivkontrolle [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [Stern] Anlagerung unspezifischer Oligonukleotide. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Mit der modifizierten DNA der T1452 Mutterkultur wurden weder für die M-Primer (M2 und M3) noch die U-Primer (U2 und U3) PCR-Produkte erhalten (Abb. 13). In den T1452 Klonen ergaben die Primerpaare U2 und M2 die zuvor beobachteten zusätzlichen Banden bei ca. 300bps für U2 und ca. 80 - 90 bps für M2, die für die verschiedenen Templates unterschiedlich stark ausfielen und in einigen Fällen fehlten (Abb. 13 A). Dabei trat die Zusatzbande von 80 - 90 bps im vorliegenden Ansatz sogar in der Wasserkontrolle auf, was die Vermutung erhärtet, dass es sich um ein von den Primern abgeleitetes Artefakt handelt. Weiterhin sind in der Spur für den Klon T1452 cl-15 (p15) eine Zusatzbande und ein Schmier im Hintergrund festzustellen (Abb. 13, A rechts), womit die Aussagekraft der betreffenden PCR eingeschränkt ist.

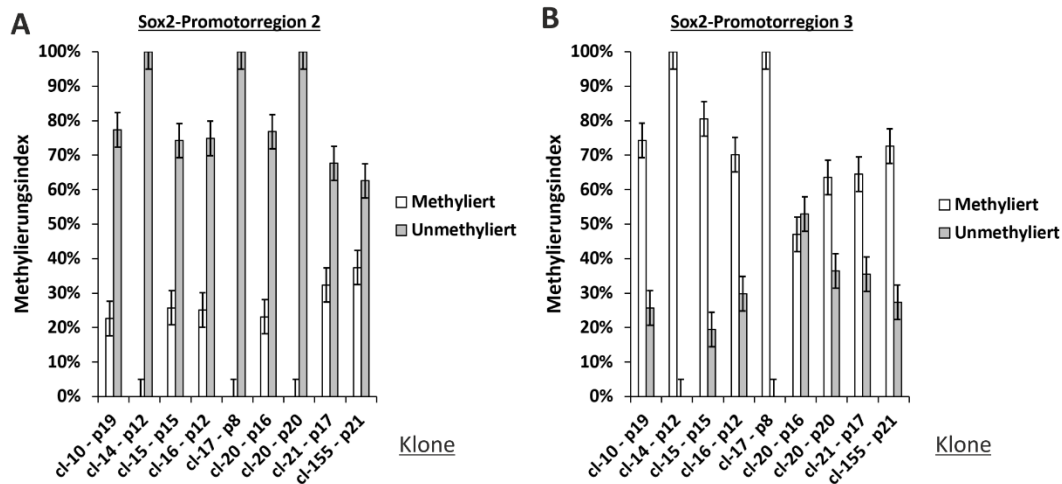


Abb. 14: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der von T1452 Mutterkultur abgeleiteter Klone. Die Bandenintensitäten von U- plus M-Produkt wurden als 100% definiert, die relative Häufigkeit der U- bzw. M-Banden ist in Prozent angegeben. Der systematische Fehler (5%) ist angegeben. **(A)** Sox2-Promotorregion 2. **(B)** Sox2-Promotorregion 3.

Die Quantifizierung ergab in der Sox2 -Promotorregion 2 (Abb. 14A) für den Klon T1452 cl-10 23% Methylierung und somit eine Hypomethylierung. Eine ähnlich geringe Methylierung wurde für die Klone T1452 cl-15 (26%), T1452 cl-16 (25%) und T1452 cl-20 (23%) ermittelt. Ein etwas höherer Methylierungsgrad wurde für die Klone T1452 cl-21 (32%) und T1452 cl-155 (37%) festgestellt. Für die Klone T1452 cl-4, T1452 cl-17 und T1452 cl20 wurden mit dem M2-Primerpaar keine Produkte erhalten. Da die Menge an verfügbarer DNA in diesen Fällen sehr klein war, konnte das Experiment nicht wiederholt werden. Somit kann nicht abschließend geklärt werden, ob die Sox2-Promotorregion 2 in die Klonen unmethyliert ist oder eine geringe Methylierung vorliegt.

Für die PCR mit den Primerpaaren U3 und M3 wurden bei einigen Proben (z.B. T1452 cl-16 p18) keine aussagekräftigen Daten erhalten und eine Wiederholung war aufgrund der geringen Materialmenge nicht möglich. Für die übrigen Proben ergab sich in der Mehrzahl der Klone eine Hypermethylierung der Sox2-Promotorregion 3 (Abb. 14B). Eine Hypermethylierung wurde insbesondere für T1452 cl-10 (74%), T1452 cl-14 (99%), T1452 cl-15 (81%), T1452 cl-16 (70%), T1452 cl-17 (99%) und T1452 cl-155 (73%) ermittelt. Eine etwas geringere Methylierung wurde für T1452 cl-20 (47% - 64%) und T1452 cl-21 (64%) festgestellt. Die Ergebnisse für den Klon T1452 cl-20 weisen zudem auf eine Zunahme der Methylierung über vier Passagen hin (p16: 47%; p20: 64%). In der Summe lässt sich für die T1452 Klone eine klare Hypomethylierung des Sox2-Promotors in der Region 2 und eine deutliche Hypermethylierung in der Region 3 feststellen.

Ergebnisse

3.2.4 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1464

Für die T1464 Mutterkulturen und die T1464 Klone wurden alle drei Sox2-Promotorregionen untersucht.

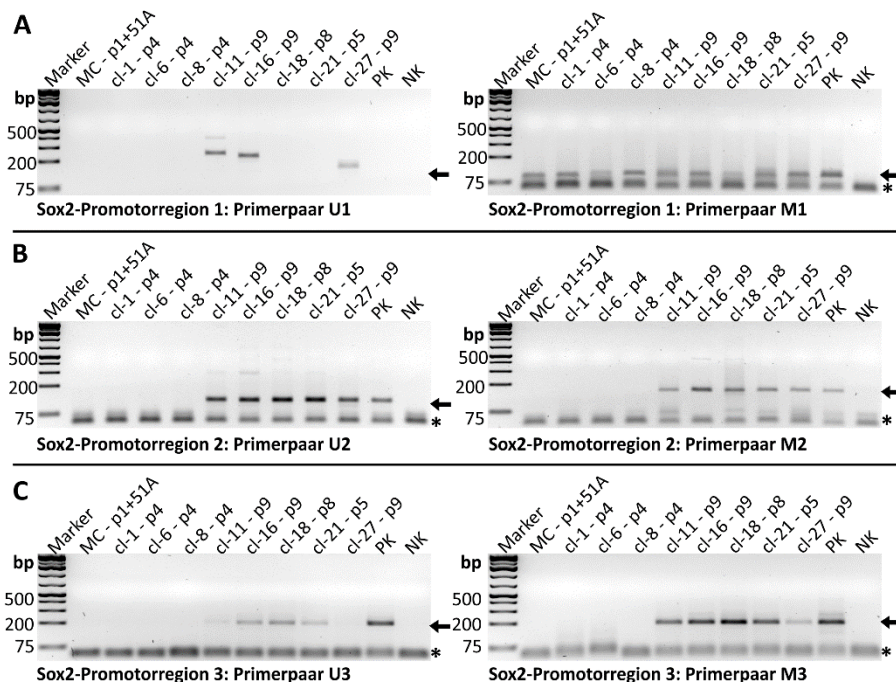


Abb. 15: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1464. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(Links)** Produkte der MSP für unmethylierte Promotorregionen. **(Rechts)** Produkte der MSP für methylierte Promotorregionen. **(A)** Primer für Sox2-Promotorregion 2 (U2: 120bp; M2: 110bp). **(B)** Primer für Sox2-Promotorregion 3 (U3: 210bp; M3: 207bp). [bp] Basenpaare. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage. [PK] Positivkontrolle [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [Stern] Anlagerung unspezifischer Oligonukleotide. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Wie schon zuvor beobachtet, waren die Ergebnisse der PCR mit dem Primerpaar U1 nicht auswertbar, da das spezifische PCR-Produkt nicht entstand. Weiterhin wurden mit den modifizierten DNAs der T1464 Mutterkultur sowie der Klone T1464 cl-1, cl-6 und cl-8 mit keiner Primerkombination auswertbare Daten erhalten (Abb. 15). Wegen limitierter Mengen an Proben war eine Wiederholung dieser Experimente nicht möglich.

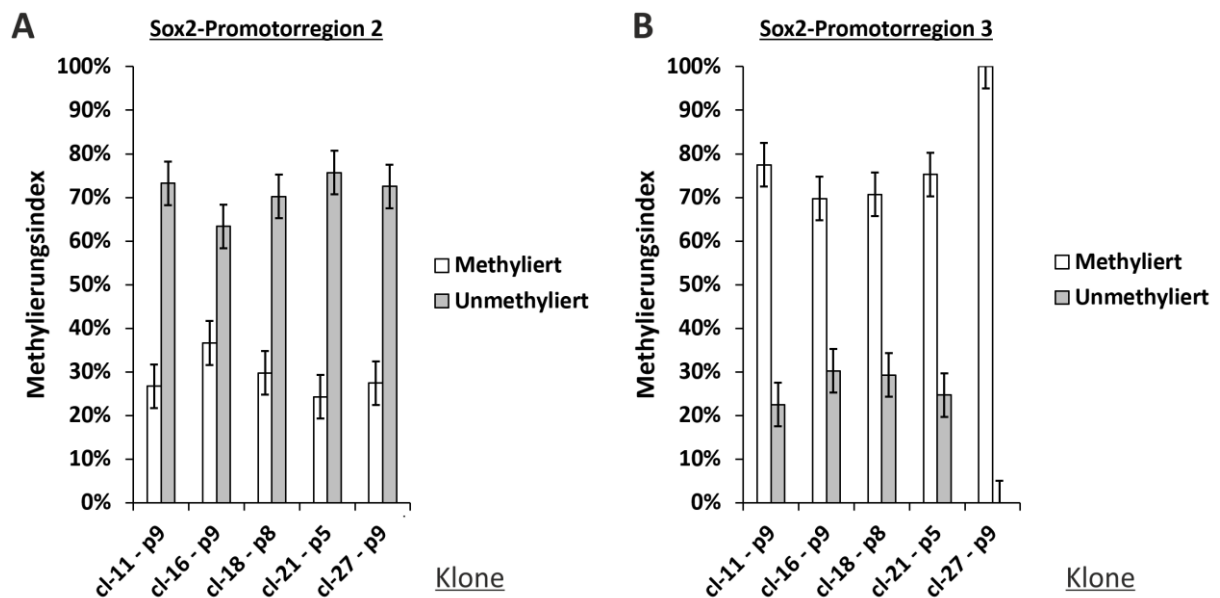


Abb. 16: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der von T1464 Mutterkultur abgeleiteter Klone. Die Bandenintensitäten von U- plus M-Produkt wurden als 100% definiert, die relative Häufigkeit der U- bzw. M-Banden ist in Prozent angegeben. Der systematische Fehler (5%) ist angegeben. **(A)** Sox2-Promotorregion 2. **(B)** Sox2-Promotorregion 3.

Die Quantifizierung der Methylierung in der Sox2-Promotorregion 2 ergab nur in einem von fünf Klonen eine relative Methylierung von über 30% (T1464 cl-16: 37%). Bei den anderen Proben wurde eine relative Methylierung von 24% (T1464 cl-21), 27% (T1464 cl-11, T1464 cl-27) und 30% (T1464 cl-18) ermittelt (Abb. 16A). Die genannten T1464 Klone waren somit in der Sox2-Promotorregion 2 hypomethyliert.

Im Gegensatz zu den Produkten der Primerpaare Sox2-U2 und -M2 wurde mit den Primerpaaren für die Promotorregion 3 in allen Proben ein Methylierungsgrad von mindestens 70% nachgewiesen (Abb. 16B). Während Klon T1464 cl-27 einen Methylierungsgrad von 100% aufwies, variierte der Methylierungsgrad der restlichen Proben zwischen 70% und 80%. Dabei wurden für die Klone T1464 cl-16 und T1464 cl-18 eine relative Methylierung von 70-71% ermittelt. Für Klon T1464 cl-21 wurden 74% und für Klon T1464 cl-11 77% relative Methylierung festgestellt. Damit war die Sox2-Promotorregion 3 im Gegensatz zu Region 2 hypermethyliert.

Ergebnisse

3.2.5 Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1495

Für die T1495 Mutterkultur und T1495 Klone wurde der Methylierungsstatus für die Sox2 Promotorregionen 2 und 3 untersucht.

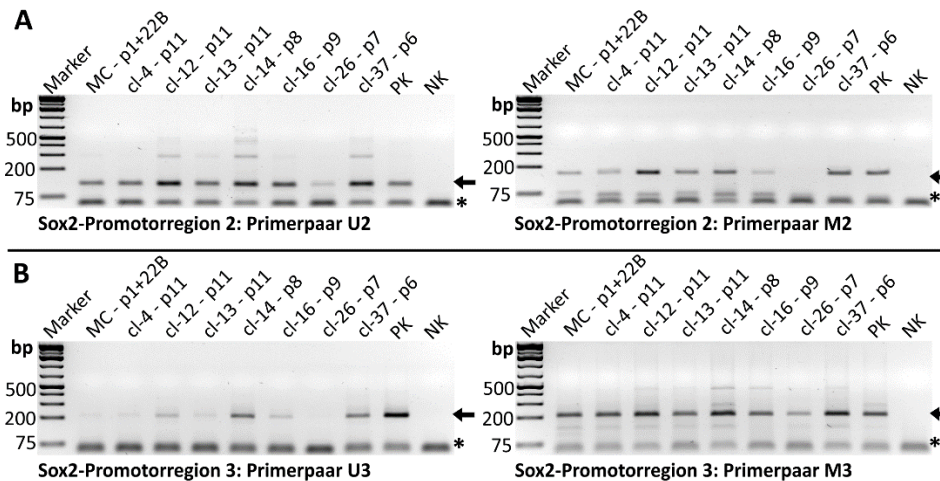


Abb. 17: Agarosegelelektrophorese der MSP-Produkte unterschiedlicher Sox2-Promotorregionen von Mutterkultur und Klonen der GBM-Linie T1495. Die Pfeile weisen auf die Position der spezifischen Produkte hin. Die errechnete Fragmentlänge [bp] der Produkte ist in Klammern angegeben. **(Links)** Produkte der MSP für unmethylierte Promotorregionen. **(Rechts)** Produkte der MSP für methylierte Promotorregionen. **(A)** Primer für Sox2-Promotorregion 2 (U2: 120bp; M2: 110bp). **(B)** Primer für Sox2-Promotorregion 3 (U3: 210bp; M3: 207bp). [bp] Basenpaare. [MC] Mutterkultur. [cl] Klon. [p] Passage. [PK] Positivkontrolle [NK] Negativkontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser. [Stern] Anlagerung unspezifischer Oligonukleotide. Marker: „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“.

Für die modifizierten DNA-Proben der T1495 Mutterkultur und Klone wurden, mit Ausnahme von Klon T1495 cl-26, in allen PCRs spezifische Banden für Sox2-Promotorregionen 2 und 3 nachgewiesen (Abb. 17). Dabei wurden mehrfach die im Kapitel (3.1.2) beschriebenen zusätzlichen Banden beobachtet.

Ergebnisse

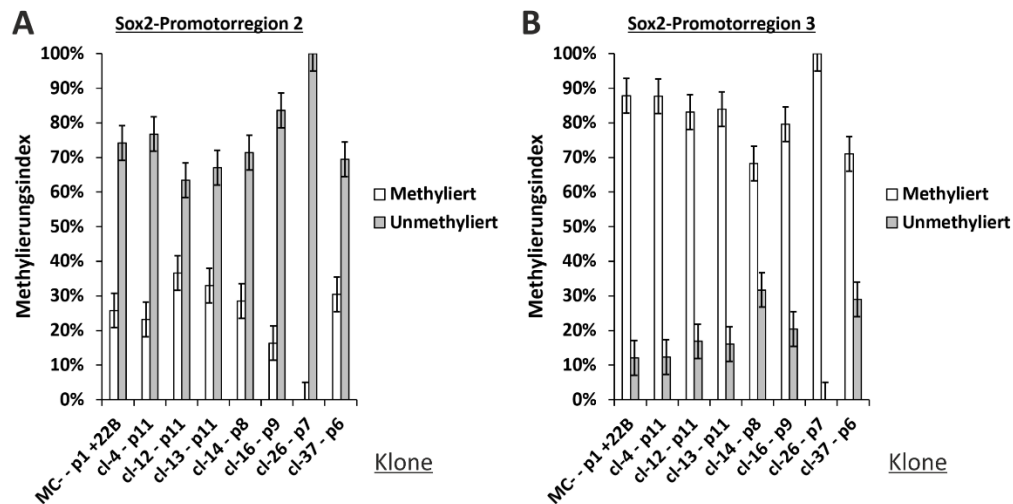


Abb. 18: Relative Methylierung der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 der T1495 Mutterkultur und abgeleiteter Klone. Die Bandenintensitäten von U- plus M-Produkt wurden als 100% definiert, die relative Häufigkeit der U- bzw. M-Banden ist in Prozent angegeben. Der systematische Fehler (5%) ist angegeben. **(A)** Sox2-Promotorregion 2. **(B)** Sox2-Promotorregion 3.

Die Quantifizierung ergab für die PCRs mit den Primerpaaren Sox2-U2 und -M2 in der T1495 Mutterkultur einen Methylierungsgrad von 26% (Abb. 18A). In den Klonen variierte der Methylierungsgrad. Die Klone T1495 cl-12 und cl-13 wiesen eine relative Methylierung von 37% (cl-12) und 33% (cl-13) auf. Eine ähnliche relative Methylierung wie die Mutterkultur zeigten die Klone T1495 cl-4 (23%), cl-14 (29%) und cl-37 (30%). Einen deutlich geringeren Methylierungsgrad als die Mutterkultur wiesen die Klone T1495 cl-16 (16%) und cl-26 (0%) auf. In der Summe war die Sox2-Promotorregion 2 in der T1495 Mutterkultur und allen Klonen deutlich hypomethyliert.

Im Gegensatz dazu wurde für die Sox2-Promotorregion 3 eine klare Hypermethylierung beobachtet. So lag die relative Methylierung der Sox2-Promotorregion 3 der Mutterkultur bei 88% (Abb. 18B). Für die Klone T1495 cl-14 (68%) und cl-37 (71%) wurde ein im Vergleich zur Mutterkultur deutlich geringerer Methylierungsgrad nachgewiesen. Die Klone T1495 cl-4 (88%), cl-12 (83%), cl-13 (84%) und cl-16 (80%) wiesen einen Methylierungsgrad über 80% auf und erreichten somit ähnliche Level wie die Mutterkultur. Deutlich darüber lag der Wert für den Klon T1495 cl-26 (96%), bei dem mit dem Primerpaar U3 nur eine sehr schwache Bande amplifiziert wurde.

3.3 Epigenetische Analysen ausgewählter SLGC-Kulturen mittels ChIP

Die SLGC-Linien T1371 (Gliosarkom), T1440 (GBM), T1442 (GBM) und T1495 (GBM) wurden auf epigenetische Veränderungen im Histon H3 im Bereich des Sox2-Promotors und Oct3/4-Promotors untersucht. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine der präzipitierten Chromatinfragmente proteolytisch entfernt und die DNA-Fragmente mittels PCR analysiert. Als Kontrolle für die PCR wurde das RPL30 Exon 3 gewählt, das in den meisten Zellen ein vorwiegend offenes Chromatin aufweist (Gross et al., 2014). Für die Untersuchung der Promotorregionen von Sox2 und Oct3/4 wurden zwei kommerzielle Primerpaare eingesetzt, die für die ChIP entwickelt wurden.

Es sollte auf die Anwesenheit sogenannter „*active marks*“ und „*repressive marks*“ getestet werden. Dies sind kovalente posttranslationale Veränderungen in den Histonschwänzen (engl.: „*histone tails*“), die zu einer Öffnung oder Kondensierung des Chromatins führen. Es wurden die Modifikationen H3K9/K14ac (Acetylierung des Lysins 9 des Histons 3; *active mark*), H3K27me2/3 (Methylierung des Lysins 27 des Histons 3; *repressive mark*) sowie H3K4me3 (Methylierung des Lysins 4 des Histons 3; *bivalent mark*) untersucht. Als Positivkontrolle für die Immunpräzipitation diente ein Antikörper gegen Histon 3, der unabhängig von der Modifizierung alle H3-Moleküle erkennt und damit in der nachfolgenden PCR die maximale Menge an Amplifikat ergeben sollte. Als Negativkontrolle wurde ein IgG-Antikörper eingesetzt, der nicht an Histone oder andere Chromatin-assoziierte Moleküle bindet und damit in der nachfolgenden PCR die minimale Menge an Amplifikat ergeben sollte.

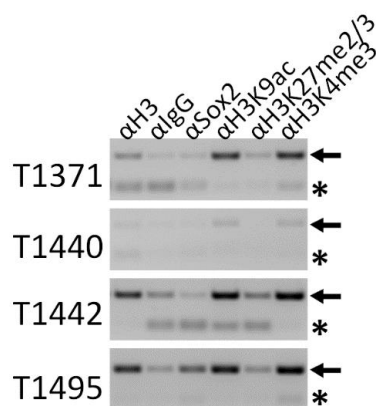


Abb. 20: Semi-quantitative PCR des RPL 30 Exon 3 nach Chromatinimmunpräzipitation. Für die SLGC-Linien T1371, T1440, T1442 und T1495 erfolgte die Immunopräzipitation mit den Antikörper αH3, αIgG, αSox2, αH3K9ac, αH3K27me2/3 und αH3K4me3. Nach proteolytischer Verdauung des präzipitierten Chromatins erfolgte die PCR mit dem Primerpaar, das spezifisch das Exon 3 des RPL30 Gens amplifiziert; die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug 171bp. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf 2%-Agarosegelen. Spezifische Banden sind mit einem Pfeil, unspezifische Banden (Oligonukleotidreste) mit einem Stern markiert.

Ergebnisse

Um zu prüfen, ob die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit den gewählten Antikörpern funktioniert, wurde zunächst das RPL30 Exon 3 untersucht (Abb. 20). Bei der Erarbeitung des ChIP-Protokolls wurde die Analyse stets durchgeführt, bevor die Analyse der Sox2- und Oct3/4-Promotor erfolgte. Ein Beispiel für eine solche ChIP-Kontrolle ist in Abb. 20 dargestellt. Es sei angemerkt, dass die ChIP-Kontrolle zur Überprüfung des Chromatins und der Arbeitsschritte dient, aber ansonsten in keinerlei Beziehung zur Sox2- und Oct3/4-ChiP steht. Eine Quantifizierung der Banden der Kontroll-ChIP wird daher nicht gezeigt.

Für die Positivkontrolle der Immunpräzipitation mit dem Antikörper α H3, der sämtliche H3-Histone nachweist, wurde für T1495 und T1442 eine starke Bande im Agarosegel beobachtet. Weniger deutlich war das PCR-Produkt der Positivkontrolle α H3 im Fall von T1371 zu erkennen und fehlte bei T1440 fast vollkommen. Die Negativkontrolle (α IgG) ergab in allen Fällen eine deutlich schwächere Bande als die Positivkontrolle, womit das Signal-Hintergrund-Verhältnis in allen Fällen akzeptabel war. Die Immunpräzipitation mit dem α H3K9ac (offenes Chromatin) ergab für die Zelllinien T1442 und T1495 ein ähnlich starkes Signal wie für α H3, was auf ein offenes Chromatin im RPL30 Exon 3 hinweist. Entsprechend lag bei diesen Zelllinien die Signalstärke für die *repressive mark* (α H3K27me_{2/3}) nahe dem Signal der Negativkontrolle. Die Immunpräzipitation mit α H3K4me₃, eine Modifizierung, die ebenfalls aktives Chromatin kennzeichnet, ergab ein ähnlich starkes Signal wie α H3K9ac. Weniger eindeutig waren die Ergebnisse für T1371 und T1440. Im Fall von T1371 waren wiederum die Bandenstärken für α H3K9ac und α H3K4me₃ ähnlich stark und die Signale für α H3K27me_{2/3} ähnlich der IgG-Negativkontrolle. Allerdings waren in beiden Fällen die Positivkontrollen mit α H3 deutlich schwächer als die Signale der α H3K9ac- und α H3K4me₃-Signale. Die Immunpräzipitation mit einem Sox2-Antikörper ergab im Fall von T1495, nicht aber T1442, eine deutliche Bande. Weiterhin wurden mit dem Sox2-Antikörper für T1371 und T1440 Signale erhalten, die ähnlich der Negativkontrolle waren. Dies spricht dafür, dass Sox2 in allen vier SLGC-Linien nicht an die RPL 30 Exon 3 –Region bindet.

Insgesamt wurde gezeigt, dass der Chromatinstatus einer offenen Region, wie er für das RPL30 Exon 3 Gen bekannt ist, in der ChIP bestätigt wurde. Damit ist davon auszugehen, dass die ChIP erfolgreich war und alle Reagenzien und Arbeitsschritte optimiert werden konnten.

In Fällen, in denen die PCR mit dem RPL30 Exon 3 – Primerpaar gezeigt hatte, dass die ChIP mit dem isolierten Chromatin und den eingesetzten Antikörpern zu den erwarteten Ergebnissen führte, wurden der Sox2- und der Oct3/4-Promotor untersucht. Dazu wurden die zuvor mit dem RPL30 Exon3-Primer analysierten Proben nun mit den Primerpaaren für Sox2 bzw. Oct3/4 analysiert. Es wurde eine semiquantitative PCR als Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei erfolgte der erste Ansatz mit 32 oder 33 Zyklen. Je nach Ergebnis des ersten PCR-Ansatzes wurde der zweite Ansatz bei zwei Zyklen mehr oder weniger durchgeführt. Wenn es die vorhandene Probenmenge erlaubte, wurden beide Ansätze wiederholt. Ein typisches Beispiel für eine Sox2 ChIP ist in Abb. 21 gezeigt.

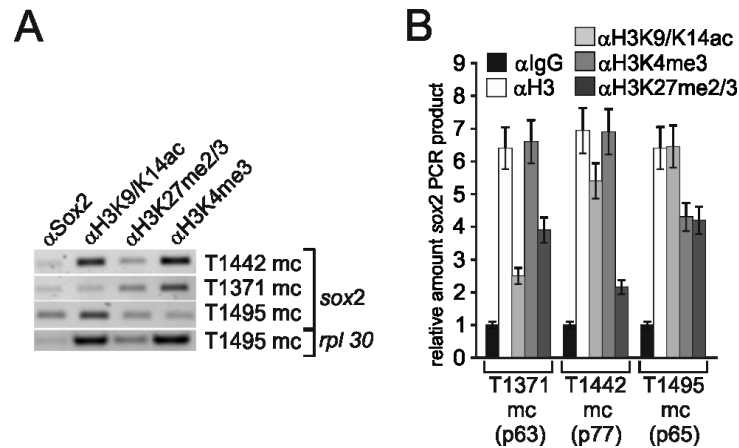


Abb. 21: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) des Sox2-Promotors. Die ChIP wurde mit den Antikörpern gegen Sox2, H3K9/K14ac (*active mark*), H3K27me2/3 (*repressive mark*) und H3K4me3 (*bivalent mark*) sowie den Kontrollen αIgG und αH3 durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte mit dem Primer für die Sox2-Promotorregion. Es wurden SLGC Mutterkulturen (mc) T1371, T1442 und T1495 untersucht. **(A)** Elektrophoretische Auftrennung der Produkte einer repräsentativen ChIP mit Primern des Sox2-Promotors sowie der korrespondierenden RPL30 Exon 3 Positivkontrolle. **(B)** Darstellung der relativen Menge an PCR-Produkten des ChIP-Assays für den Sox2-Promotor als Säulendiagramm. Die Menge an erhaltenen PCR-Produkten nach Immunpräzipitation mit αIgG als 1 definiert und alle anderen Werte relativ zu αIgG gesetzt. *ac*: acetyliert; *H3*: Histon 3; *IgG*: Immunglobulin G; *Sox2*: sex determining region Y-box 2; *rpl30*: Ribosomal Protein L30; *K4/9/14/27*: Lysylrest der Position 4/9/14/27 *me2/3*: Di- bzw. Trimethylierung; *me3*: Trimethylierung.

Für den Sox2-Promotor wurde in allen Zelllinien ein starkes Signal für die Positivkontrolle αH3 erhalten, welches deutlich stärker als das der Negativkontrolle αIgG war (Abb. 21, B). Für den Sox2-Antikörper wurden schwache Banden mit einer ähnlichen Signalstärke wie für die Negativkontrolle erhalten (nicht gezeigt).

Die Quantifizierung der Bande für die SLGC-Linie T1371 (Abb. 21, B) zeigte relativ zur Negativkontrolle αIgG für die Positivkontrolle αH3 eine 6,4-fach stärkere Bande. Die stärksten Banden wurden für die *bivalent mark* αH3K4me3 erhalten (6,6-fach über αIgG). Für die *active mark* αH3K9/K14ac lag die Bandenintensität deutlich niedriger und erreichte nur das 2,7-fache von αIgG. Die Bandenintensitäten für die *repressive mark* αH3K27me2/3 war im Vergleich zu *active mark* αH3K9ac deutlich stärker und erreichte das 3,9-fache der αIgG-Kontrolle. Die ChIP-PCR wurde mit einer modifizierten Zyklenzahl wiederholt. In der Summe zeigen beide Analysen, dass der Sox2-Promotor in T1371-Zellen der Passage 63 primär *bivalent* und *repressive marks* aufweist.

Die ChIP-PCR für die SLGC-Mutterkultur T1442 ergab eine nahezu 7-fach höhere Signalstärke für die Positiv- (αH3) relativ zur Negativkontrolle (αIgG). Eine nahezu ebenso hohe Bandenintensität wurde für die *bivalent mark* αH3K4me3 nachgewiesen. Die *active mark* αH3K9ac erreichte das 5,5-fache des Werts der Negativkontrolle und lag deutlich über dem Wert für die *repressive mark*

Ergebnisse

α H3K27me_{2/3} (2,05-fach α lgG). Die Ergebnisse wurden durch die modifizierte Zyklenzahl bestätigt (nicht gezeigt). In der Summe überwiegen in der T1442 Mutterkultur der Passage 77 die *active* und *bivalent marks*.

Die ChIP-PCR der Mutterkultur T1495 ergab für die Positivkontrolle (α H3) ein 6,4-faches der Bandenintensität der Negativkontrolle (α lgG). Für die *active mark* α H3K9K14ac wurde das 6,45-fache der Negativkontrolle ermittelt, womit die Acetylierung in zwei Lysylresten in allen Histonen des Sox2-Promotors vorliegen sollte. Für die *bivalent mark* α H3K4me₃ und die *repressive mark* α H3K27me_{2/3} wurden nahezu identische Werte ermittelt, die das 4,25- bzw. 4,2-fache der Negativkontrolle erreichten. Auch die Wiederholung der PCR mit um zwei Zyklen längerer PCR bestätigte, dass die *active mark* im Sox2-Promotor der Mutterkultur T1495 Passage 65 dominierte. Für die SLGC-Mutterkultur T1440 wurden analoge Untersuchungen durchgeführt. Wie Abb. 20 zeigt, waren für diese Zelllinie bereits die Banden der PCR mit dem RPL30 Exon 3-Primer sehr schwach. Für den Sox2-Primer konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse gewonnen werden (nicht gezeigt).

Ergebnisse

Analog zum Sox2-Promotor wurde der Promotor des Oct3/4-Gens untersucht. Dazu wurden dieselben durch Immunpräzipitation gewonnenen DNA-Fragmente eingesetzt wie für die Analyse des Sox2-Promotors.

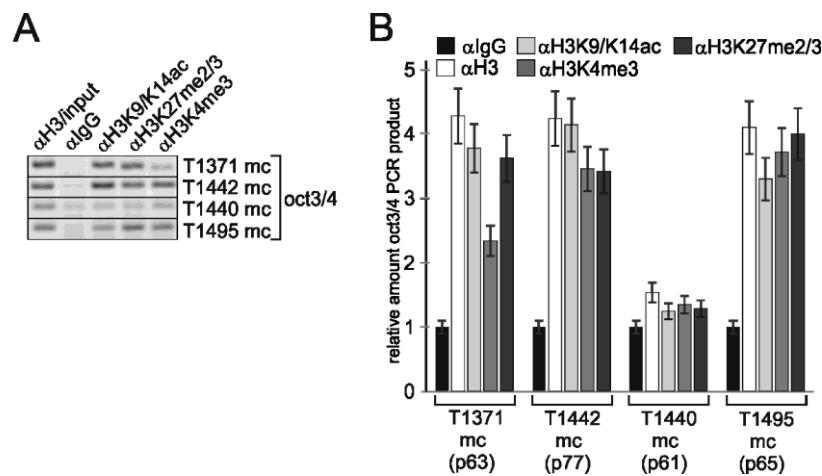


Abb. 22: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) des Oct3/4-Promotors. Die ChIP wurde mit den Antikörpern gegen H3K9/K14ac (*active mark*), H3K27me2/3 (*repressive mark*) und H3K4me3 (*bivalent mark*) sowie den Kontrollen α IgG und α H3 durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte mit dem Primer für die Oct3/4-Promotorregion. Es wurden SLGC Mutterkulturen (mc) T1371, T1442, T1440 und T1495 untersucht. **(A)** Elektrophoretische Auftrennung der Produkte einer repräsentativen ChIP mit Primern des Oct3/4-Promotors. **(B)** Darstellung der relativen Menge an PCR-Produkten des ChIP-Assays für den Oct3/4-Promotor als Säulendiagramm. Die Menge an erhaltenen PCR-Produkten nach Immunpräzipitation mit α IgG als 1 definiert und alle anderen Werte relativ zu α IgG gesetzt. *ac*: acetyliert; *H3*: Histon 3; *IgG*: Immunglobulin G; *Oct3/4*: octamer-binding-protein 3/4; *K4/9/14/27*: Lysylrest der Position 4/9/14/27 *me2/3*: Di- bzw. Trimethylierung; *me3*: Trimethylierung.

Abb. 22 A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung eines ChIP-PCR-Ergebnisses für den Oct3/4-Promotor. Es ist deutlich zu sehen, dass die Positivkontrolle (α H3) ein deutlich stärkeres Signal ergab als die Negativkontrolle (α IgG). Die Bandenintensitäten für die Antikörper gegen die modifizierten H3-Histone lagen meist zwischen denen der Negativ- und Positivkontrolle, für α H3K9/K14ac aber auch manchmal darüber. Die Quantifizierung in Graphen in Abb. 22B basiert auf zwei unterschiedlichen Experimenten, deren Ergebnisse zusammengefasst wurden.

Für die SLGC-Mutterkultur T1371 lag die Positivkontrolle (α H3) 4,3-fach über der Negativkontrolle (α IgG). Für die *active mark* α H3K9/K14 wurde das 3,8-fache von α IgG ermittelt. Allerdings erreicht auch der Wert für die *repressive mark* α H3K27me2/3 das 3,65-fache der Negativkontrolle. Dagegen lag der Wert für die *bivalent mark* α H3K4me3 bei 2,3-fach. Für die T1371 Mutterkultur in Passage 63 kann daher weder eine Dominanz von *active* oder *repressive marks* festgestellt werden.

Für die T1442 SLGC-Mutterkultur erreichten die Bandenstärken aller drei *marks* ähnliche Werte: α H3K9/K14ac die 4,1-fache sowie α H3K4me3 und α H3K27me2/3 die 3,4-fache Bandenintensität

Ergebnisse

der Negativkontrolle. Damit ist für die T1442 Mutterkultur in Passage 77 keine Dominanz von *active* oder *repressive marks* festzustellen.

Für die T1440 Mutterkultur konnten in der Oct3/4-Promotor CHIP-PCR auswertbare Ergebnisse gewonnen werden. Dabei lagen die Signale der Positivkontrolle (α H3) aber nur maximal 1,5-fach über denen der Negativkontrolle (α IgG). Die Bandenintensität für die *active mark* (α H3K9/K14ac), *repressive mark* (α H3K27me_{2/3}) und *bivalent mark* (α H3K4me₂) erreichten das 1,3 bis 1,4-fache der Negativkontrolle ohne klare Präferenz für eine der drei *marks*.

Für die Mutterkultur T1495 wurden für die Positivkontrolle das 4,2-fache der Bandenintensität der Negativkontrolle ermittelt. Die Bandenintensität für die *active mark* (α H3K9/K14ac) erreichten das 3,2-fache der Negativkontrolle. Geringfügig darüber lagen die Werte der *bivalent mark* (α H3K4me₃; 3,6-fach) und der *repressive mark* (α H3K27me_{2/3}; 3,95-fach). Damit ist für die T1495 Mutterkultur in Passage 65 keine Dominanz von *active* oder *repressive marks* festzustellen.

Fazit der CHIP

Die CHIP von vier SLGC-Mutterkulturen bestätigte die Anwesenheit von *active marks* in der Kontrolle RPL30 Exon 3. Weiterhin wurden deutliche Unterschiede zwischen *histone marks* des Sox2-Promotors der Mutterkulturen T1371, T1442 und T1495 festgestellt, obwohl alle in ähnlich späten Passagen untersucht wurden. Im Sox2-Promotor von T1442 und T1495 Zellen überwogen die *active mark* (α H3K4/K9ac) und *bivalent mark* (α H3K4me₃), während für T1371 das Verhältnis zu *repressive mark* (α H3K27me_{2/3}) und *bivalent mark* (α H3K4me₃) verschoben war. Die Analyse des Oct3/4-Promotors ergab in keinem Fall eine klare Präferenz für eine der genannten *active* oder *repressive marks*.

3.4 Durchflusszytometrische Analyse der CD133-Expression in GBM- und GSarc-Klonen

Im Folgenden sollte ermittelt werden, welchen Anteil an CD133+ Zellen die Mutterkulturen und die Klonkulturen enthalten. Dazu wurden die Zellen mit dem Phycoerythrin-gekoppeltem Antikörper gegen CD133 (Tab. 8) markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrollen dienten zwei parallel bearbeitete Aliquots der Zellsuspension, die entweder mit einem IgG des gleichen Isotyps (Isotypkontrolle, Tab. 8) inkubiert wurden oder nur zum Schein behandelt wurde (Autofluoreszenzkontrolle). Zusätzlich wurde stets als Positivkontrolle die CaCo2-Zelllinie mitgeführt, die 90-95% CD133+ Zellen enthält.

Es wurden Klone der SLGC-Linien T1338, T1371, T1447, T1452 und T1495 untersucht. Für die jeweiligen SLGC-Mutterkulturen liegen in der Arbeitsgruppe sehr detaillierte Analysen zum Anteil an CD133+ Zellen über ansteigende Passagen vor. Diese Daten wurden daher in dieser Arbeit nicht erneut erhoben. Stattdessen werden die Referenzwerte der Mutterkulturen in den Klonen vergleichbaren Passagenzahlen angegeben. Für die untersuchten Klone lagen ebenfalls einige Daten vor, die in frühen Passagen gewonnen wurden. Diese Werte sind für die Entwicklung des Anteils CD133+ Zellen während fortlaufender Passagierung relevant und wurden daher in die Ergebnistabellen aufgenommen und als Daten „anderer“ gekennzeichnet. Auf diese Daten wird in der Diskussion Bezug genommen.

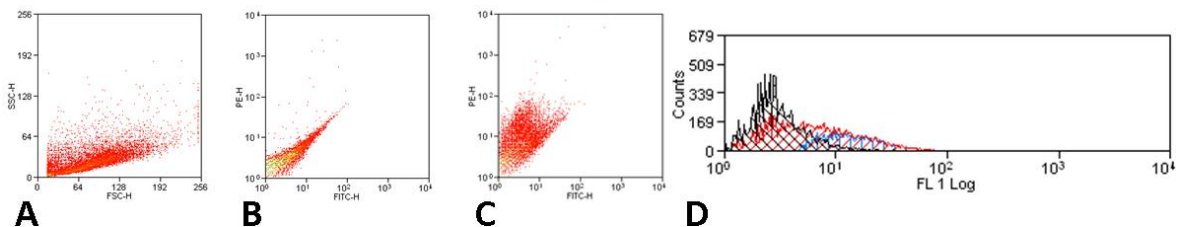


Abb. 23: Punktwolkendiagramm eines Isotyp-Antikörper (B) und CD133/2-PE (C) markierten Aliquots der SLGC-Linie T1452 cl-20 p18. (A) Zell-Volumetrie mittels Vorwärtstreulicht (FSC; engl.: *forward scatter*) sowie Bestimmung der Zell-Granularität mittels Seitstreulicht (SSC; engl.: *side scatter*). Detektierte Emissionen des Fluorochroms PE (Phycoerythrin) der IgG2-PE (B: Isotypkontrolle) und CD133/2-PE-Antikörper- (C) markierten Zellen sowie anschließende (D) rechnerische Normierung der Emissionen zur Ermittlung des Anteils CD133-positiver Zellen (36,2%).

Ergebnisse

3.4.1 Anteil an CD133+ Zellen – T1338-Klone

Es wurden 11 T1338-Klone, acht davon in kurz hintereinanderliegenden Passagen, durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil an CD133+ Zellen in den T1338-Klonkulturen wurde relativ zu den Kontrollen ermittelt.

Tab. 16: Anteil CD133+ Zellen in der T1338 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen

Zelllinie	Passage	CD 133 %	CaCo-Kontrolle	Referenzwert
T1338 MC				<1%
T1338 cl-1	p14	0,0	94,9	1,3 (p6)
	p18	0,9	95,0	
T1338 cl-2	p15	0,1	94,9	1,2 (p6)
	p19	0,0	95,0	
T1338 cl-3	p16	0,1	94,9	2,8 (p6)
	p18	0,8	89,8	
T1338 cl-4	p14	1,2	94,9	3,4 (p6)
	p16	0,7	89,8	
T1338 cl-5	p15	0,0	94,9	0,7 (p6)
	p16	0,5	96,4	
T1338 cl-6	p13	1,0	94,9	0,3 (p4)
	p14	1,3	96,4	
T1338 cl-7	p13	0,9	93,8	0,4 (p9)
T1338 cl-8	p13	0,1	93,8	0,0 (p10)
	p17	0,0	75,8	
T1338 cl-9	p13	0,1	93,8	0,1 (p10)
	p17	0,0	75,8	
T1338 cl-10	p11	0,3	93,8	0,2 (p8)
T1338 cl-11	p11	0,0	93,8	0,0 (p8)

cl, Klon; MC, Mutterkultur; p, Passage. Der Referenzwert bezieht sich auf Werte, die von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gewonnen wurden.

Die durchflusszytometrische Analyse der T1338-Klone ergab in allen Fällen nur sehr geringe Anteile an CD133+ Zellen, was zuvor auch für die Mutterkultur (<1%) in unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde. Die höchsten CD133-Anteile wurden mit 1,3% für Klon T1338 cl-6 und 1,2% in Klon T1338 cl-4 ermittelt. Alle anderen Klone wiesen weniger als 1% CD133+ Zellen auf. Eine Änderung des Anteils CD133+ Zellen im kurzen Zeitraum von fünf Passagen war nicht feststellbar.

3.4.2 Anteil an CD133+ Zellen – T1371-Klone

Es wurden zehn T1371-Klone, einer davon in kurz hintereinanderliegenden Passagen, durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil an CD133+ Zellen in den T1371-Klonkulturen wurde relativ zu den Kontrollen ermittelt.

Tab. 17: Anteil CD133+ Zellen in der T1371 Mutterkultur und abgeleiteten Klone

Zelllinie	Passage	CD 133 %	CaCo-Kontrolle	Referenzwert
T1371 MC				<5
T1371 cl-2	p9	0,1	96,4	0,6 (p6)
	p12	0,3	96,9	
T1371 cl-3	p9	9,4	94,4	4,3 (p5)
T1371 cl-4	p10	0,5	96,9	0,0 (p5)
T1371 cl-5	p13	0,2	94,4	0,5 (p4)
T1371 cl-6	p24	5,0	96,9	5,9 (p13)
T1371 cl-13	p11	0,3	94,4	0,0 (p6)
T1371 cl-15	p11	0,3	96,4	0,0 (p4)
T1371 cl-16	p14	0,1	97,2	3,0 (p5)
T1371 cl-18	p11	0,2	95,9	0,0 (p4)
T1371 cl-19	p11	0,2	94,4	0,2 (p4)

cl, Klon; MC, Mutterkultur; p, Passage; Der Referenzwert bezieht sich auf Werte, die von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gewonnen wurden.

Die Analyse des Anteils an CD133+ Zellen ergab für die Klone der Gliosarkomzelllinie T1371 nur geringe Anteile CD133+ Zellen. Diese änderten sich für den Klon T1371 cl-2 innerhalb von drei Passagen nicht. Die höchsten Anteile an CD133+ Zellen wurden für die Klone T1371 cl-3 (9,4%) und cl-6 (5,0%) ermittelt. Alle anderen Klone hatten einen CD133-Anteil von weniger als 1%.

Ergebnisse

3.4.3 Anteil an CD133+ Zellen – T1447-Klone

Es wurden zehn Klone, vier davon in kurz hintereinanderliegenden Passagen, durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil an CD133+ Zellen in den T1447-Klonkulturen wurde relativ zu den Kontrollen ermittelt.

Tab. 18: Anteil CD133+ Zellen in der T1447 Mutterkultur und abgeleiteten Klone

Zelllinie	Passage	CD 133 %	CaCo-Kontrolle	Referenzwert
T1447 MC				<10
T1447 cl-1	p25	0,1	95,9	0,0 (p18)
T1447 cl-2	p14	0,3	96,9	5,0 (p8)
T1447 cl-3	p22	1,0	96,9	3,8 (p17)
T1447 cl-4	p16	0,3	66,9	8,2 (p10)
	p20	0,4	96,3	
T1447 cl-5	p24	7,1	66,9	2,8 (p19)
	p26	0,4	96,3	
T1447 cl-8	p14	2,0	96,9	5,1 (p10)
T1447 cl-9	p11	1,0	97,1	6,5 (p6)
	p13	4,2	96,9	
T1447 cl-10	p20	0,3	66,9	2,1 (p15)
T1447 cl-11	p15	0,0	95,9	1,4 (p10)
T1447 cl-12	p16	0,6	66,9	10,2 (p10)
	p21	5,8	96,3	

cl, Klon; MC, Mutterkultur; p, Passage. Der Referenzwert bezieht sich auf Werte, die von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gewonnen wurden.

Der Anteil an CD133+ Zellen lag in sechs von zehn T1447-Klonen unter 1%. Für T1447-Klon cl-8 wurde ein Anteil CD133+ Zellen von 2,0% ermittelt. Ein Anteil von 7,1 % CD133+ Zellen wurde für die Kultur T1447 cl-5 in der Passage p24 ermittelt. In Passage p26 war der Anteil von CD133+ -Zellen auf 0,4% gesunken. Umgekehrt wurde für die Klone T1447 cl-9 und cl-12 ein Anstieg des Gehalts an CD133+ von 1% auf 4,2% (cl-9) bzw. 0,6% auf 5,8 % (cl-12) innerhalb von zwei bzw. fünf Passagen beobachtet.

3.4.4 Anteil an CD133+ Zellen – T1452 Klone

Es wurden neun T1452-Klone, sechs davon in kurz hintereinanderliegenden Passagen, durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil an CD133+ Zellen in den T1452 Klonkulturen wurde relativ zu den Kontrollen ermittelt.

Tab. 19: Anteil CD133+ Zellen in der T1452 Mutterkultur und abgeleiteten Klonen

Zelllinie	Passage	CD 133 %	CaCo-Kontrolle	Referenzwert
T1452 MC		<5%		60% (<p20)
T1452 cl-9	p17	3,3	97,1	2,2 (p11)
	p20	1,9	97,2	
T1452 cl-10	p14	2,8	95,9	4,4 (p8)
T1452 cl-14	p7	0,1	97,1	6,7 (p4)
	p8	0,2	95,9	
T1452 cl-15	p12	2,3	17,1	2,3 (p5)
	p16	1,9	97,2	
T1452 cl-16	p10	0,3	95,9	2,1 (p5)
T1452 cl-19	p11	9,0	94,4	45,1 (p7)
T1452 cl-20	p12	11,0	17,1	80,2 (p6)
	p16	4,9	97,2	
	p18	47,2	96,3	
T1452 cl-21	p9	0,5	17,1	3,5 (p9)
	p14	3,5	96,3	
T1452 cl-155	p10	1,2	17,1	-
	p12	49,2	97,2	

cl, Klon; MC, Mutterkultur; p, Passage. Der Referenzwert bezieht sich auf Werte, die von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gewonnen wurden.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die T1452 Mutterkultur in frühen (p<20) Passagen einen hohen Anteil an CD133+ Zellen (bis zu 60%) enthielt. Die T1452 Klone leiten sich allerdings von einer T1452 Kultur in einer späten Passage ab, die nur 2% CD133+ Zellen enthielt. Niedrige CD133-Werte wurden für die Klone T1452 cl-9 (3,3%), cl-10 (2,8%), cl-15 (2,3%) und cl-155 (1,2%) nachgewiesen. Im Fall der Klone T1452 cl-9 und cl-15 sank der geringe Anteil an CD133+ Zellen innerhalb von drei bzw. vier Passagen (cl-9: p17 3,3%, p20 1,9%; cl-15: p12 2,3%; p16: 1,9%). Kein eindeutiger Nachweis von CD133+ Zellen war für die Klonkulturen T1452 cl-14 (p7: 0,1%; p8: 0,2%) und cl-16 (0,3%) möglich. Hohe Anteile an CD133+ Zellen oder ein deutlicher Anstieg an CD133+ Zellen über die Passagen wurden für die Klone T1452 cl-20 und cl-155 beobachtet. Im Fall von T1452 cl-20 stieg der Anteil an CD133+ Zellen von Passage p12 zu Passage p18 von 11% auf 47,2%, wobei die Anteile in Passage p16 nur bei 4,9% lagen. Für den Klon T1452 cl-155 stieg der Anteil an CD133+ Zellen von 1,2% in Passage p10 auf 49,2% in Passage p12.

Ergebnisse

3.4.5 Anteil an CD133+ Zellen – T1495-Klone

Es wurden 12 T1495-Klone, zwei davon in kurz hintereinanderliegenden Passagen, durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil an CD133+ Zellen in den T1495-Klonkulturen wurde relativ zu den Kontrollen ermittelt.

Tab. 20: Anteil CD133+ Zellen in der T1495 Mutterkultur und abgeleiteten Klone

Zelllinie	Passage	CD 133 %	CaCo-Kontrolle	Referenzwert
T1495 MC				15-20
T1495 cl-4	p8	21,9	96,4	59,9 (p4)
	p10	30,9	95,9	
T1495 cl-10	p9	38,9	94,8	36,0 (p3)
T1495 cl-11	p8	19,9	95,9	37,7 (p3)
T1495 cl-13	p7	0,9	96,4	26,1 (p4)
T1495 cl-14	p6	2,2	66,9	
	p9	26,5	94,8	
T1495 cl-16	p9	40,0	94,8	37,3 (p3)
T1495 cl-17	p5	22,9	97,8	
T1495 cl-18	p6	48,2	97,8	
T1495 cl-19	p6	4,2	96,4	
T1495 cl-21	p7	44,6	97,8	
T1495 cl-26	p7	26,4	97,8	
T1495 cl-37	p6	36,2	95,9	

cl, Klon; MC, Mutterkultur; p, Passage. Der Referenzwert bezieht sich auf Werte, die von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gewonnen wurden.

Der Anteil an CD133+ Zellen der T1495 Mutterkultur, die für die Etablierung der Klone eingesetzt wurde, lag bei 18%. Ähnliche CD133-Anteile zeigten sich in frühen Passagen der Klone T1495 cl-4 (21,9%), cl-11 (19,9%), cl-17 (22,9%) und cl-26 (26,4%). Im Fall des Klons T1495 cl-4 nahm der Anteil an CD133+ Zellen über zwei Passagen von 21,9% auf 30,9% zu. Eine Zunahme des Anteils CD133+ Zellen wurde auch für den Klon T1495 cl-14 beobachtet, wobei hier der CD133-Wert von 2,2% in Passage p6 auf 26,5% in Passage p9 stieg. Ein hoher Gehalt an CD133+ Zellen wurde für die Klone T1495 cl-10 (p9: 38,9%), cl-16 (p9: 40%), cl-18 (p6: 48,2%), cl-21 (p7: 44,6%) und cl-37 (p6: 36,2%) ermittelt. Somit waren in allen T1495 Klonkulturen, außer T1495 cl-13, in den frühen Passagen ein Viertel bis die Hälfte Zellen CD133+.

3.4.6 Fazit der Durchflusszytometrie

Die CaCo2-Kontrolle belegte in allen durchflusszytometrischen Analysen, dass die Zellsortierung aussagekräftig ist.

Für die T1338, T1371 und T1447 Klone wurden nur geringe bis sehr geringe Anteile an CD133+ Zellen in den Kulturen nachgewiesen. Für die T1338 Klone lag der maximale Anteil an CD133+ Zellen bei 1,3% und die 1%-Marke konnte lediglich in zwei Klonen überschritten werden. Im Fall der T1371 Klone erreichte einer von zehn Klonen annähernd die 10%-Marke und ein Klon die 5%-Marke, wohingegen die anderen acht Klonkulturen nahezu keine (<0,5%) CD133+ Zellen aufwiesen. Auch im Fall von T1447 wurden maximale Anteile von 7,1% CD133+ Zellen ermittelt. Dabei wies nur einer von zehn Klonen 7,1% CD133+ Zellen auf, ein zweiter erreichte 5,8% und ein dritter 4,2%. Dabei wurde für die zuletzt genannten Klone ein Passageneffekt notiert, d.h. die Anteile an CD133+ Zellen lagen in den früheren Passagen unter 2%. Für alle übrigen Klone lag der ermittelte Anteil an CD133+ Zellen stets unter 2%.

Eine deutliche Heterogenität und insgesamt ein höherer Anteil an CD133+ Zellen wurde für die T1452 und T1495 Klone beobachtet. Im Falle von T1452 erreichten zwei Klone (T1452 cl-20 und cl-155) einen Anteil von 47% bis 49%. Allerdings wiesen auch sieben von neun Klonen (T1495 cl-9, cl-10, cl-14, cl-15, cl-16, cl-19 und cl-21) weniger als 10% CD133+ Zellen auf. Im Fall der T1495 Klone war die Heterogenität weniger stark ausgeprägt, da die Mehrheit der Klone (8 von 12) CD133-Anteile von 20-40% aufwiesen. Zwei Klone erreichten CD133-Werte von über 40% (cl-18: 48% und cl-21: 45%). Nur drei der 12 Klone wiesen weniger als 5% CD133+ Zellen auf, wobei für cl-14 ein Passageneffekt beobachtet wurde (p6: 2,2%; p9: 26,5%).

3.5 Korrelationsanalysen

3.5.1 Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3

Zur Analyse, ob die untersuchten Sox2-Promotorregionen 2 und 3 als Einheit reguliert werden, wurden die Methylierungsgrade anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten verglichen. Im Falle einer einheitlichen Methylierung sollten positive Korrelationen (Werte zwischen 0 und 1) erhalten werden. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ist die Aussagekraft der folgenden Berechnungen gering. Die Konfidenzintervalle (CI) sind mittels *bootstrap*-Verfahren ermittelt und für jede SLGC-Linie angegeben.

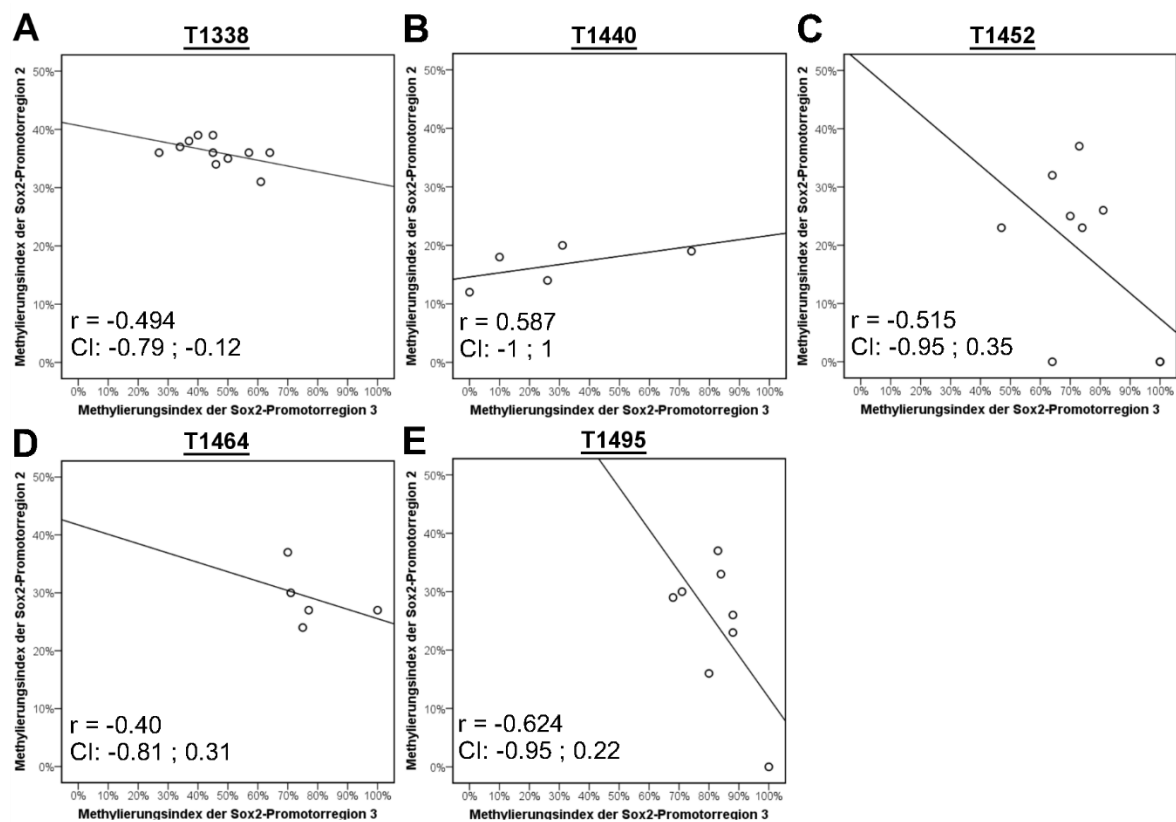


Abb. 24: Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 in SLGC-Linien. Darstellung des Methylierungsgrads [%] der Sox2-Promotorregionen 2 (Ordinate) und 3 (Abszisse) der SLGC-Linien (A) T1338, (B) T1440, (C) T1452, (D) T1464 und (E) T1495. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) sowie das Konfidenzintervall (CI) sind den einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Ergebnisse

Für die T1338-Mutterkultur und abgeleiteten Klone wurde ein homogener Methylierungsindex der Sox2-Promotorregion 2 zwischen 31-39% und ein variierender Methylierungsindex der Sox2-Promotorregion 3 zwischen 27 und 74% ermittelt. Beim Vergleich der Promotorregionen 2 und 3 wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,494$ (Konfidenzintervall CI: $-0,79$; $-0,12$) errechnet.

Die Untersuchung der T1440-Mutterkultur und abgeleiteten Klone ergab einen positiven Korrelationskoeffizienten von $r = 0,587$ (CI: -1 ; 1) der untersuchten Sox2-Promotorregionen. Auch hier waren ein einheitlicher Methylierungsgrad der Sox2-Promotorregion 2 zwischen 12 und 20%, jedoch unterschiedliche Methylierungsgrade der Sox2-Promotorregion 3 (0 bis 74%) ermittelt worden.

In der SLGC-Linie T1452 und den abgeleiteten Klonen war der Sox2-Promotor (Region 2) übereinstimmend in einem hypomethylierten Zustand (Methylierung 0-37%), wohingegen die Werte der Sox2-Promotorregion 3 variierten. Ein Klon wies hierbei einen Methylierungsgrad von unter 50% auf, während die restlichen Klone mit einem Methylierungsindex von über 60% bis 100% hypermethyliert vorlagen. Hieraus errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,515$ (CI: $-0,95$; $0,35$).

Die MSP-Analysen der SLGC-Linie T1464 zeigten eine homogene Hypomethylierung der Sox2-Promotorregion 2 (24-37%) und eine homogene Hypermethylierung der Sox2-Promotorregion 3 (70-100%). Daraus ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,400$ (CI: $-0,81$; $0,31$).

Für T1495 wurden ebenfalls einheitlich hypomethylierte (Region 2) und hypermethylierte Sox2-Promotorsequenzen (Region 3) nachgewiesen. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = -0,624$ (CI: $-0,95$; $0,22$).

Somit wurde für eine SLGC-Linie (T1440) eine positive Korrelation des Methylierungsgrads der untersuchten Sox2-Promotorregionen beobachtet und für vier SLGC-Linien (T1338, T1452, T1464 und T1495) negative Korrelationen. Anhand der ermittelten Konfidenzintervalle scheint lediglich für die SLGC-Linie T1338 eine negative Korrelation vorzuliegen, wohingegen für alle anderen SLGC-Linien die Konfidenzintervalle negative und positive Werte abdeckten. Daher sind die Ergebnisse nicht signifikant.

Ergebnisse

3.5.2 Korrelation des Anteils CD133+ Zellen und Sox2-Promotormethylierung

Darüber hinaus wurde untersucht, ob Änderungen im Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 mit Änderungen im Anteil an CD133+ Zellen korrelieren. Hierzu wurde ebenfalls der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt. Eingeschlossen wurden hierbei nur Klone, die mit beiden Methoden (Durchflusszytometrie und MSP) untersucht wurden. Als Signifikanzniveau wurde 5% ($p < 0,05$) gesetzt. Die Teststärke ist aufgrund der geringen Probenanzahl gering.

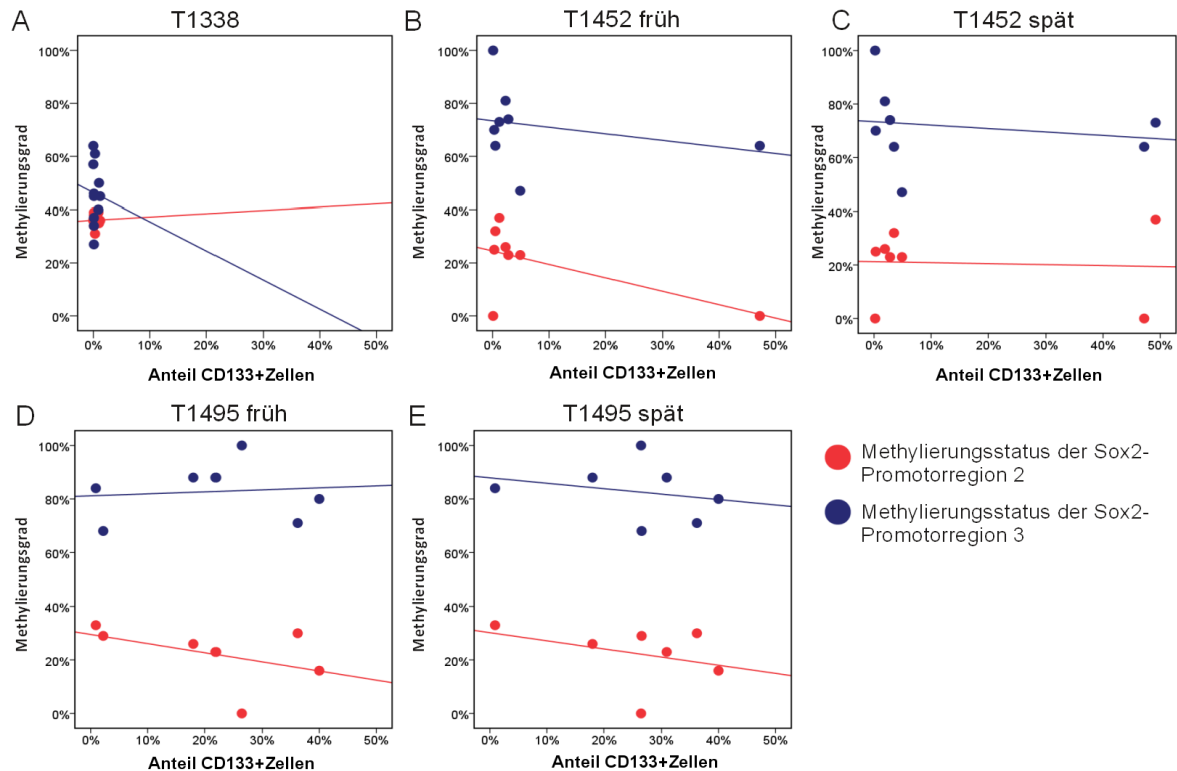


Abb. 25: Korrelation des Methylierungsstatus der Sox2-Promotorregionen 2 (rot) und 3 (blau) gegen den Anteil CD133+ Zellen. Darstellung des Methylierungsgrads [%] der Sox2-Promotorregionen 2 (rot) und 3 (blau) der SLGC-Linien (A) T1338, (B) T1452 (frühe Passagen), (C) T1452 (späte Passagen), (D) T1495 (frühe Passagen) und (E) T1495 (späte Passagen) als Streudiagramm.

Für die T1338 Mutterkultur und abgeleiteten Klone wurde für den Anteil CD133+ Zellen und die Sox2-Promotorregion 2 ein Pearson-Korrelationskoeffizient von $r = 0,024$ (CI: -0,59; 0,50) ermittelt, für die Sox-Promotorregion 3 von $r = -0,043$ (CI: -0,55; 0,48) (Abb. 25 A). Der Anteil CD133+ Zellen lag in allen untersuchten Klonekulturen unter 2%. Während für die Sox2-Promotorregion 2 ein homogener Grad an Methylierung (zwischen 30 und 40%) nachweisbar war, variierte der Methylierungsgrad der Sox2-Promotorregion 3 zwischen 27 und 64%.

Da die durchflusszytometrischen Analysen für T1452 Mutterkultur und deren Klone teilweise sowohl in früheren als auch in späteren Passage erfolgte (z.B. T1452 cl-15 p12 und p16 oder T1452

Ergebnisse

cl-21 p9 und p14; siehe Kap. 3.4.4 S.70) wurden die Berechnungen sowohl für frühere (Abb. 25B) als auch spätere (Abb. 25C) Passagen durchgeführt. Durchflusszytometrische Untersuchungen der T1452 Mutterkultur und abgeleiteter Klone, die in späteren Passagen erfolgten, waren in ähnlichen Passagen wie die der MSP-Untersuchungen. Der Anteil an CD133+ Zellen lag in frühen Passagen der SLGC-Linie T1452 mit zwei Ausnahmen (ca. 47%) bei unter 10%. Die Sox2-Promotormethylierung lag in der Region 2 unter 40% und in der Region 3 über 60% (mit einer Ausnahme: 47%). Es wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,599$ (CI: -0,99 ; 0,56) für die Sox2-Promotorregion 2 und $r = -0,262$ (CI: -0,89 ; 0,30) für die Sox2-Promotorregion 3 im Vergleich zu früheren Passagen der in der Durchflusszytometrie untersuchten Zellen ermittelt. Ein höherer Grad an Promotormethylierung der Sox2-Promotorregion 2 geht somit mit einem niedrigen Anteil CD133+ Zellen einher. Eine nicht so ausgeprägte negative Korrelation ließ sich ebenfalls für die Sox2-Promotorregion 3 und dem Anteil CD133+ Zellen ermitteln. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung späterer Passagen der SLGC-Linie T1452 wurde ein Pearson-Korrelationskoeffizient von $r = -0,057$ (CI: -0,98 ; 0,90; Sox2-Promotorregion 2) und $r = -0,18$ (CI: -0,98 ; 0,39; Sox2-Promotorregion 3) berechnet.

Für die T1495 Mutterkultur und abgeleiteten Klone wurde die durchflusszytometrische Untersuchung für die Klone T1495 cl-4 (Passagen p8 und p10) und cl-14 (Passagen p6 und p9) ebenfalls in unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Die späteren Passagen der Durchflusszytometrie waren näher an denen der MSP-Analyse. Es wurden analog zu T1452 Korrelationskoeffizienten für frühe (Abb. 25 D) und späte (Abb. 25C) Passagen ermittelt. Der Anteil an CD133+ Zellen in der SLGC-Linie T1495 betrug zwischen 0,9 und 40%, wobei frühere Passagen vergleichsweise geringe Anteile CD133+ Zellen aufwiesen. Für die Sox2-Promotorregionen wurde in allen Proben eine Hypermethylierung der Region 3 (über 70%) und eine Hypomethylierung der Region 2 (unter 40%) ermittelt. Für die frühen Passagen wurde im Vergleich zur Sox2-Promotorregion 2 ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,459$ (CI: -0,99 ; 0,22) und zur Sox2-Promotorregion 3 von $r = 0,104$ (CI: -0,78 ; 0,89) im Vergleich zum Anteil an CD133+ Zellen berechnet. Die Korrelationsanalyse in späten Passagen ergab für beide Sox2-Promotorregionen einen negativen Korrelationskoeffizienten (Sox2-Promotorregion 2 $r = -0,350$; CI: -0,94 ; 0,50 und Sox2-Promotorregion 3 $r = -0,242$; CI: -0,81; 0,40).

Zusammenfassend wurden sowohl negativ, positive als auch neutrale Korrelationskoeffizienten ermittelt. Da jedoch für jede Untersuchung Konfidenzintervalle mit Überschreitung des Nullpunktes ermittelt wurden, scheint keine Abhängigkeit der untersuchten Faktoren vorzuliegen.

4 Diskussion

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein primärer Gehirntumor mit einer hohen Morbidität und Mortalität (Alifieris und Trafalis, 2015). Trotz optimierter multimodaler Therapiestrategien hat das GBM eine schlechte Prognose und die mittlere Überlebensdauer beträgt weniger als zwei Jahre (Ohka et al., 2012; Stupp et al., 2005). Hierfür scheint u.a. die Existenz von Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften von entscheidender Bedeutung zu sein (Schonberg et al., 2014; van Meir et al., 2010). Diese Zellen werden als BTSCs (engl.: *brain tumor stem cell*), GSCs (engl.: *glioma stem cells*) oder SLGCs (engl.: *stem like glioma cells*) bezeichnet.

Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass es sich bei CD133/Prominin-1 um einen *bona fide* Marker der Gliomstammzelle handelt und dass Zellen mit einer hohen CD133-Expression in hohem Maße Stammzeleigenschaften aufweisen. Die publizierten Daten von Chen und Kollegen (Chen et al., 2010) zeigen, dass Gliomzellen mit Eigenschaften von Stammzellen hierarchisch organisiert sind, mit der sich selbst erneuernden CD133-/Sox2+ Gliomstammzelle (Typ-I-Zelle) an der Spitze. Von dieser leiten sich weiter differenzierte stammzellähnliche Gliomzellen (Typ-II- und Typ-III-Zellen) ab, die ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben, aber andere Marker exprimieren. Die Arbeiten von Chen et al. (2010) legen weiterhin die Vermutung nahe, dass CD133 lediglich von der weiter differenzierten Typ-II-Zelle exprimiert wird. Dieses Modell wurde bisher nicht bestätigt und zahlreiche Arbeitsgruppen nutzen mittels FACS (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) sortierte CD133+ Gliomzellen als Ausgangspunkt für die *in vitro* Analysen stammzellähnlicher Zellen aus GBM-Biopsien. Kapitel 4.1 beschreibt die von mir gewonnenen Ergebnisse und setzt diese zu weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe und Daten in der Literatur in Bezug.

Das Modell der zellulären Hierarchie von Chen et al. (2010) postuliert, dass der Pluripotenzfaktor Sox2 in Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Zellen exprimiert wird. Über die Regulation der Sox2-Expression ist nur wenig bekannt. In Kapitel 4.2 werden die Daten zur Methylierung des Sox2-Promotors besprochen und dann in Kapitel 4.3 darauf eingegangen, ob im Bereich des Sox2-Promotors offenes oder geschlossenes Chromatin vorliegt. Kapitel 4.3 wird zudem auf die Frage eingehen, welche Bedeutung der Pluripotenzfaktor Oct3/4 für die Gliomstammzelle haben könnte. In Kapitel 4.4 werden die Daten zur Untersuchung des Sox2-Promotors mit den durchflusszytometrischen Analysen in Bezug gesetzt. Ein Gesichtspunkt dabei ist, ob das Modell zur zellulären Hierarchie für die stammzellähnlichen Gliomzellen zutrifft, die aus verschiedenen malignen Gliomen, darunter GBMs und Gliosarkome, isoliert wurden. Zum Abschluss werden die wichtigsten Korrelationen in Kapitel 4.5 zusammengefasst und ein kritischer Ausblick auf zukünftige Arbeiten zum Thema erfasst.

4.1 Der Anteil CD133+ Zellen variiert zwischen den SLGC-Klonen und Mutterkulturen

In unserer Arbeitsgruppe wurden Klone stammzellähnlicher Zellen über „*limited dilution assay*“ gewonnen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung hinsichtlich des Anteils CD133+ Zellen und dessen Relation zur Expression weiterer potenzieller SLGC-Marker.

Die Aussagekraft der erhobenen Daten muss kritisch bewertet werden, da *in-vitro* Zellkulturen einige Limitierungen mit sich bringen. So können diese nur eingeschränkt einen Vergleich zur Tumorerheterogenität und -komplexität der *in-vivo*-Situation des Patienten ermöglichen. Darüber hinaus werden zwar durch die im serumfreien Kulturmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF die Stammzeleigenschaften erhalten, allerdings werden nicht alle im Tumor enthaltenen Zellen in der Kultur überleben, sodass hier bereits eine erste Selektion der Zellen erfolgt (Lee et al., 2006). Ein weiterer Nachteil der *in-vitro*-Kulturen ist die unterschiedliche Mikroumgebung und das Fehlen der Stammzellnischen. Somit entfallen tumorspezifische, molekulare Reaktionen auf das Mikromilieu. Weiterhin können durch Hypoxie induzierte Veränderungen nicht erfasst werden. So zeigen die meisten unserer SLGC-Linien ein semi-adhärentes Wachstum und bilden Aggregate und/oder Sphäroide, in deren Zentrum der Sauerstoffgehalt und das Nährstoffangebot reduziert ist. Die *in-vivo*-Bedingung einer Stammzellnische lässt sich damit aber nicht abbilden (Lathia et al., 2011).

Im Gegensatz zu vielen publizierten Arbeiten erfolgte in unserer Arbeitsgruppe keine Sortierung von Zellen anhand von FACS (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) für das Anlegen von *in-vitro*-Kulturen, sodass die Selektion auf stammzellähnliche Zellen allein über die Wachstumsanforderungen an das Medium erfolgte. Dieses Prinzip wird neben der Selektion über CD133 in der SLGC-Forschung realisiert (Dirks, 2010). Dieser Ansatz ist auch deshalb vorteilhaft, da die Daten von Chen et al. (2010) postulieren, dass Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften hierarchisch organisiert sind und lediglich die weiter differenzierte Typ-II-Zelle CD133+ ist. Anhand der von mir erhobenen Daten sollte nun abgeleitet werden, ob eine erkennbare hierarchische Organisation der Zellen vorlag und ob der Anteil CD133+ Zellen mit der Expression von Pluripotenzfaktoren korreliert. Auf den letzten Aspekt wird in Kapitel 4.4 genauer eingegangen. Hier sollen zunächst die verschiedenen Daten zur Ermittlung der CD133-Expression verglichen werden. Daten zur Expression des membranständigen CD133/Prominin-1 wurden mittels Western Blot Analyse (Hirseland, 2017), immunzytologischen Färbungen (Zechel, persönliche Mitteilung) und durchflusszytometrischen Analysen erhoben. In allen Fällen diente die Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo₂ als Positivkontrolle. Der Vergleich der Daten legt nahe, dass geringe Level an CD133 stets und von fast allen Zellen unserer SLGC-Kulturen exprimiert werden. Allerdings lassen sich diese Zellen erst ab einer gewissen Expressionsstärke in der Durchflusszytometrie als positiv identifizieren. Auch

Diskussion

im Western Blot sind nur dann Signale detektierbar, wenn eine große Anzahl der Zellen einer Kultur hohe CD133-Level aufweist (Wewer, Teege und Zechel, nicht publiziert).

In der Durchflusszytometrie (Anhang: Abb. 26) sowie in vorangegangenen Western-Blot-Analysen (Arbeiten der Arbeitsgruppe, Zechel, persönliche Mitteilung) wurde gezeigt, dass der Anteil an CD133+ Zellen sowie die CD133-Proteinexpression in den T1338-Klonen mit maximal 1,3% äußerst gering war. Nur die Mutterkultur wies hohe Anteile an CD133+ Zellen auf (bis 30%) und dies ausschließlich in den Passagen p8 – p10 (Zechel, persönliche Mitteilung). Dazu passen auch die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen (Hirseland, 2017). Alle übrigen vorangegangenen Analysen der Mutterkultur ergaben ebenfalls weniger als 1% CD133+ Zellen, sodass insgesamt nur kleine Veränderungen des Anteils CD133+ Zellen ermittelt wurden. Zudem konnten keine deutlichen Unterschiede im Anteil CD133+ Zellen in den acht Klonen festgestellt werden, wobei sich diese in maximal fünf Passagen unterschieden. Demgegenüber stehen die geringfügig höheren Anteile an CD133+ Zellen, die in frühen Passagen (p6) der T1338-Klone cl-3 und cl-4 ermittelt wurden und einen CD133+ Anteil von 2,8% (cl-3) und 3,4% (cl-4) aufwiesen. Somit wiesen lediglich zwei der elf untersuchten Klone einen geringen, aber messbaren Anteil CD133+ Zellen auf. Vorausgesetzt das Hierarchie-Modell von Chen et al. (2010) trifft zu, so spricht dies für das Vorliegen einer geringen Subpopulation an Typ-II-Zellen in früheren Passagen von T1338 Mutterkultur und Klonen. Ob es sich bei den CD133- Zellen um Typ I oder Typ III Zellen handelt, ist nur anhand weiterer Marker zu klären. Durch Nachweis von FABP7 (engl.: *fatty acid binding protein 7*) in weniger differenzierten Typ-I und Typ-II Zellen (Chen et al., 2010) wurde ein weiterer potentieller Marker für SLGCs identifiziert. Die Expressionslevel von FABP7 und die immunzytologischen Analysen unterstützen die Hypothese, dass die CD133- Zellen keineswegs differenziert sind (Hirseland, 2017).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Gliosarkomzelllinie T1371 erhalten, da in acht der zehn untersuchten Klone der Anteil an CD133+ Zellen bei unter 1% lag und somit im Vergleich zur Mutterkultur sehr ähnlich war. Innerhalb von drei Passagen des Klons T1371 cl-2 wurden keine Veränderungen des Anteils an CD133+ Zellen festgestellt. Diese Beobachtungen bestätigen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, welche in sieben Klonen ebenfalls Anteile an CD133+ Zellen von unter 1% ermittelten. Eine Ausnahme stellt hierbei Klon T1371 cl-16 dar, für welchen in früher Passage (p5) ein Anteil von 3,0% und in später Passage (p14) von 0,1% CD133+ Zellen ermittelt wurden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Klone T1371 cl-3 und cl-6, für welche sowohl in Vorarbeiten als auch in späteren Analysen höhere Anteile (cl-3: 4,3% (p5) - 9,4% (p9)) von CD133+ Zellen gemessen wurden. Wiederum vorausgesetzt, dass das Modell von Chen et al. (2010) zutrifft, scheint auch die SLGC-Linie T1371 hierarchisch organisiert zu sein, wobei zwei der untersuchten Klone höhere Anteile an Typ-II-Zellen enthalten. Die restlichen Klone sowie Mutterkultur sind entweder weiter differenzierte Typ-III-Zellen oder erhalten über einen Zeitraum von maximal 14

Diskussion

Passagen den Anteil an weniger differenzierten Typ-I-Zellen aufrecht. Die Level von FABP7 (Hirsland, 2017) und das hohe Sox2-Level (s. unten) lassen letzteres vermuten.

Im Gegensatz zu den vorab genannten Zelllinien lag der Anteil an CD133+ Zellen in der SLGC-Linie T1447 zwischen 5-10%. Dies korrespondiert gut mit den deutlichen, wenn auch schwachen CD133-Signalen in Western-Blot (Hirsland, 2017) der T1447-Mutterkultur. In sechs der zehn untersuchten T1447-Klone (cl-1, cl-2, cl-3, cl-4, cl-10 und cl-11) lag der Anteil der CD133+ Zellen in den untersuchten Passagen bei unter 1%. Im Vergleich zu den Referenzwerten früherer Passagen wurde in o.g. Klonen lediglich in Klon T1447 cl-1 ein konstant niedriger Anteil an CD133+ Zellen von 1% ermittelt, wohingegen bei allen anderen Klonen eine Abnahme des Anteils an CD133+ Zellen beobachtet wurde. Für die Klone T1447 cl-5, cl-9 und cl-11 wurden in den untersuchten Passagen ähnliche Werte wie in der Mutterkultur ermittelt. Im Vergleich zu den aktuell untersuchten Passagen und den Referenzwerten früherer Passagen kam es mit steigender Passagenzahl in der Mutterkultur zunächst zu einer Zu- und ab Passage 35 zu einer Abnahme des Anteils an CD133+ Zellen (Anhang: Abb. 26). Somit präsentierte sich die SLGC-Linie 1447 heterogener als T1338 und T1371 und der Anteil an CD133+ Zellen, sowohl im Vergleich der Klone/Mutterkultur untereinander als auch in Bezug auf die Passagen variierte deutlich. Es könnte geschlussfolgert werden, dass (I) Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien den Ausgangspunkt für die Klone gaben und (II) die Kultur über die Passagen eine messbare Differenzierung durchlief.

Die SLGC-Linie T1452 erfüllte in verschiedener Hinsicht die Kriterien publizierter Gliomstammzellen. Die Kulturen zeigten ein sphäroidales Wachstum und der Anteil an CD133+ Zellen betrug in der Mutterkultur in Passage 1 bis 25 ca. 60% (Choschick et al., 2014; Zechel, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie, Western-Blot und Immunzytochemie gewonnen. Ab Passage 30 nahm der Anteil CD133+ Zellen deutlich ab (Anhang: Abb. 26). Die abgeleiteten Klone entstammen einer späteren Passage mit nur 2% CD133+ Zellen. Ein eindeutiger Nachweis von CD133+ Zellen konnte in Klon T1452 cl-14 in den hier untersuchten Passagen nicht erfolgen, wohingegen in frühen Passagen (p4) ein Anteil von 6,7% CD133+ Zellen detektiert wurde. Frühe Passagen der Klone cl-10 (4,4%) und cl-21 (3,5%) zeigten höhere Ausgangswerte als die Mutterkultur, die in den hier untersuchten Passagen deutlich unter 1% lagen (MC unter 1%; cl-10 und cl-21 lagen über 1%). Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Klone cl-19, cl-20 und cl-155. Die Klone cl-19 und cl-20 wiesen im Vergleich zur Mutterkultur in Voruntersuchungen einen sehr hohen (cl-20: 80%) bzw. mittelhohen (cl-19: 45%) Anteil an CD133+ Zellen auf. In diesen Untersuchungen war bei Klon cl-19 von Passage p7 zur Passage p11 eine starke Abnahme der CD133+ Fraktion von 45% auf 9% zu beobachten. Bei Klon cl-20 war zunächst eine starke Abnahme von 80% (p6) auf 5% (p16) und danach ein neuerlicher Anstieg auf 47% (p18) zu beobachten. Ebenfalls einen deutlichen Anstieg des CD133-Anteils wurde in Klon cl-155 der SLGC-Linie T1452 von Passage p10 (1,2%) zu Passage p12 (49%) beobachtet. Somit wurde auch hier im weiteren

Diskussion

Verlauf der Passagierung eine starke Zunahme des Anteils an CD133+ Zellen beobachtet. Die hohen CD133+ Anteile in Kulturen der Klone cl-20 und cl-155 in späteren Passagen wurden ebenfalls mittels Western-Blot bestätigt (Hirseland, 2017). Somit wiesen die T1452 Mutterkultur und Klone eine deutliche Heterogenität an CD133+ Zellen auf, die mit zunehmender Passagierung zunächst zu- und dann wieder abnahm. Dabei waren die Anteile an CD133+ Zellen in den Klonen sehr verschieden. Zusammen unterstützen diese Befunde das hierarchische Modell von Chen et al. (2010) und legen die Vermutung nahe, dass erstens CD133- und CD133+ Zellen Klone bildeten und sich in Kultur selbst erneuerten. Zweitens zeigten Klone (und Mutterkultur) das Durchlaufen eines „CD133-Peak“, was als Ausdruck der Differenzierung von CD133- Typ-I-Zellen in CD133- Typ-III-Zellen über das Intermediat der CD133+ Typ-II-Zellen gewertet werden kann. Dazu passen die Western-Blot-Daten, die eine reduzierte Sox2-Expression in Klonen mit hohem CD133-Level aufwiesen (Hirseland, 2017; Zechel, persönliche Mitteilung).

Die durchflusszytometrischen Analysen der SLGC-Linie T1495 wiesen einige Parallelen zu denen von T1452 auf. So variierte auch hier der Anteil an CD133+ Zellen zwischen <1% und fast 50% (Tab. 20). Die zur Etablierung der Klone eingesetzte Mutterkultur wies einen Anteil an CD133+ Zellen von 18% auf. Deutlich niedrigere Anteile an CD133+ Zellen wurden für die Klone T1495 cl-13 und cl-19 nachgewiesen, wobei in der frühen Passage des Klons cl-13 (p4) der Anteil noch bei 26,1% lag und somit bis zur Passage p7 eine starke Abnahme (0,9%) stattgefunden hatte. Demgegenüber steht eine Zunahme des CD133+ Anteils bei Klon cl-14 von 2,2% in Passage p6 auf 26,5% zur Passage p9. In den Kulturen aller anderen untersuchten Klone waren in frühen Passagen ein Viertel bis die Hälfte der Zellen CD133-positiv. Aus der Mutterkultur mit 15-20% CD133+ Zellen leiteten sich somit Klone mit ebenfalls deutlichem Anteil an CD133+ Zellen ab. Die Veränderungen des Anteils an CD133+ Zellen über die Passagen könnte als Hinweis auf eine Differenzierung gewertet werden.

Zusammenfassend wurden in allen untersuchten SLGC-Linien CD133+ Zellen nachgewiesen, wobei der Anteil in einer unter 5% (T1338) lag, in zwei zwischen 0-10% (T1371 und T1447) und bei zwei weiteren zwischen 1-50% (T1452 und T1495) variierte. Dass sich die verschiedenen Klone in identischen Passagen im Anteil an CD133+ Zellen unterschieden, kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Zellen in den Kulturen hierarchisch organisiert sind. Allen SLGC-Linien war gemeinsam, dass sowohl Klone mit einem hohen Anteil an CD133+ Zellen als auch solche mit einem niedrigen Anteil an CD133- Zellen abgeleitet werden konnten. Das ist ein Hinweis darauf, dass in der Tat CD133- und CD133+ Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation aufwiesen. Dies spricht für das Modell von Chen et al (2010) und gegen das Modell von Singh und Kollegen (Singh et al., 2004b). Singh et al. (2004b) sahen in CD133 ein Oberflächenmolekül, das für eine Gliomstammzelle obligatorisch ist. Zusammen mit den Western-Blot-Analysen der Arbeitsgruppe (Hirseland, 2017) weisen die Durchflusszytometrieanalysen dieser Arbeit auch darauf hin, dass das Modell der zellulären Hierarchie von Chen und Kollegen (Chen et al., 2010) nicht immer die

Diskussion

Situation der Kulturen abbildet. So passen zwar die Daten von T1452 und T1495 Kulturen gut zum Hierarchie-Modell, die Daten für T1338, T1371 und T1447 aber weniger. So sind bei T1338 und T1371 niedrige CD133+ Anteile mit hohen und niedrigen Sox2-Leveln assoziiert. Für T1447 wurde in der Arbeitsgruppe ebenfalls keine eindeutige Korrelation zwischen Sox2 und CD133 festgestellt.

4.2 Die Sox2-Promotormethylierung variiert in Abhängigkeit von Region und SLGC-Linie

Die Bedeutung des Transkriptions- und Pluripotenzfaktors Sox2 für SLGCs wurde in der Einleitung dargelegt. Im vorherigen Abschnitt der Diskussion (siehe Kapitel 4.1) wurde erläutert, dass eine hohe Sox2-Expression möglicherweise nicht immer in allen SLGC-Kulturen mit einer niedrigen oder fehlenden CD133-Expression assoziiert ist und CD133+ Zellen in einigen SLGC-Linien ebenfalls hohe Sox2-Expression aufweisen können. Um zu untersuchen, wie die Sox2-Expression in SLGCs reguliert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit epigenetische Modifikationen der Sox2-Promotorregion auf DNA-Level untersucht.

Die epigenetischen Analysen mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) verglichen dabei drei verschiedene Sox2-Promotorregionen. Die Daten ergaben Hinweise darauf, dass unterschiedliche Methylierungsgrade zwischen den drei Promotorregionen vorliegen und sich die untersuchten SLGC-Linien hinsichtlich der Methylierung unterscheiden. In einer publizierten Analyse des Sox2-Promotors in GBMs wurden hypomethylierte Promotorsequenzen nachgewiesen und argumentiert, dass die Sox2-Expression für die Erhaltung des Stammzellstatus der SLGCs essentiell ist (Alonso et al., 2011). Eine Hypomethylierung einer Sox2-Promotorregion wurde zudem in gynäkologischen Tumoren beschrieben (Li et al., 2008; Wong et al., 2010). Ob diese Ergebnisse auf SLGC-Linien aus verschiedenen GBM-Patienten übertragbar sind, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurde eine MSP-Analyse drei verschiedener Sox2-Promotorregionen in den SLGC-Mutterkulturen T1338, T1440, T1452, T1464 und T1495 und davon abgeleiteten Klonen durchgeführt. Dabei sollte zudem überprüft werden, ob eine einheitliche Methylierung der verschiedenen Promotorsequenzen vorliegt. Für die Analyse wurden drei publizierte Sox2-Promotorsequenzen ausgewählt, die nachweislich der epigenetischen Regulation unterliegen.

Zunächst wurden die aus den Publikationen entnommenen Primersequenzen: U1/M1 (Alonso et al., 2011), U2/M2 (Alonso et al., 2011) und U3/M3 (Li et al., 2008; Wong et al., 2010) mit Sequenzen der Gendatenbank Ensembl³ verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass in den Primerpaaren U3 und M3 eine Base verändert werden muss, da diese nicht mit der Nukleotidabfolge des humanen Sox2-Promotors komplementär ist. Die Analysen in dieser Arbeit wurden daher mit der veränderten Primersequenz durchgeführt (U3/M3; Tab. 9). Das Primerpaar U3/M3 liegt 500 Basenpaare upstream der Initiationsstelle der Transkription. Für die Primerpaare U1/M1 und U2/M2 wies der Abgleich mit der Ensembl-Datenbank nach, dass diese Sequenzen innerhalb des Sox2-Gens und somit nicht upstream der Kernpromotorregion liegt. Obwohl bekannt ist, dass regulatorisch aktive Elemente, insbesondere methylierte CpG-Inseln, nicht nur in der Promotorregion von Genen,

³ <https://ensembl.org>

Diskussion

sondern auch upstream oder downstream davon vorkommen können (Bakshi et al., 2018; Mehra und Wells, 2015), bleibt die Frage offen, ob mit den Ergebnissen zu diesen Primerpaaren tatsächlich Rückschlüsse auf die epigenetische Regulation der Sox2-Expression getroffen werden können. Darüber hinaus ist die Spezifität des Sox2-Primerpaares M2/U2 nicht geklärt, da in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte für dieses Primerpaar größere Produkte entstanden, die nicht mit den errechneten Produktgrößen übereinstimmten (unmethyliert: ca. 120bp wie errechnet; methyliert: ca. 190bp statt 110bp).

Im Weiteren wurde die Funktionalität der drei Primerpaare im experimentellen Ansatz überprüft. Dazu wurden acht Bisulfit-behandelte genomische DNAs eingesetzt und der Parameter „Stringenz“ durch den Einsatz verschiedener Salzkonzentrationen (1,5 – 2,5mM MgCl₂) variiert. Insgesamt wurde durch die Variation der MgCl₂-Konzentration keine Optimierung der PCR-Ergebnisse erreicht, d.h. das Auftreten von zusätzlichen PCR-Produkten in einigen Ansätzen war unabhängig von der Salzkonzentration. Zudem fehlten in einigen Ansätzen Amplifikate vollständig. Hierbei könnte die Tatsache eine Rolle spielen, dass nur dann eine Amplifikation der Sequenz möglich ist, wenn diese komplett der angenommenen Modifizierung entspricht, da sonst keine spezifische Bindung der Oligonukleotide erfolgt. Eine teilweise Methylierung würde somit nicht erfasst (Wojdacz, 2012). Somit ist bei Genen, die sukzessive durch Methylierung mehrerer CpG-Inseln abgeschaltet werden, keine suffiziente Analyse durch die MSP-Analyse möglich. Ob eine partielle Methylierung von CpG-Inseln in einigen der untersuchten SLGC-Linien vorlag, könnte durch eine Kombination von Bisulfit-Modifizierung und nachfolgender Sequenzierung erfolgen. Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang erwähnt werden soll, ist die Anfälligkeit der Bisulfit-Modifizierung. Durch prolongierte Inkubation ist die Reaktion im alkalischen Milieu optimierbar, allerdings auf Kosten der DNA-Stabilität. Experimente zur Optimierung der Reaktionszeiten der Bisulfit-Modifizierung waren zu Beginn dieser Arbeit im Labor durchgeführt worden. Diese Bedingungen wurden in dieser Arbeit übernommen. Zudem wurden für die Testungen der drei Sox2-Primerpaare acht in der Arbeitsgruppe vorhandene, modifizierte genomische DNAs eingesetzt. Diese Kontroll-Proben waren zuvor mit anderen MSP-Primern mit gutem Ergebnis getestet worden. Somit kann vermutet werden, dass die Heterogenität der Ergebnisse der Primertests eine partielle Methylierung des Sox2-Promotors in den eingesetzten Proben anzeigen.

Für die Interpretation der Daten der MSP-Analyse bestehen weitere, zum Teil experimentelle Limitierungen. Neben oben genannten Problemen ist unklar, welcher Teil der Sox2-Promotorregion für die Regulation der Expression ausschlaggebend ist. So wäre denkbar, dass die Methylierung einer Region mit CpG-Inseln keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Transkription hat, während die Methylierung einer anderen Region die Transkription maßgeblich inhibiert. Um Hinweise auf die Bedeutung der verschiedenen Regionen zu erhalten, wurde einerseits der

Diskussion

Methylierungsstatus der Regionen verglichen. Andererseits wurde Bezug auf Sox2-mRNA-Level und/oder Sox2-Proteinexpression genommen, sofern Daten hierzu in der Arbeitsgruppe vorliegen. Aus den oben erwähnten Gründen (multiple oder fehlende Banden) wurde das Primerpaar U1/M1 nur probeweise für die Analyse der Linie T1338 und T1464 eingesetzt. Wie bereits in den Vorexperimenten wurden bei den Analysen der SLGC-Linien keine konklusiven Ergebnisse mit dem Sox2-Primerpaar U1/M1 gewonnen. Entweder wurden unspezifische Banden detektiert oder es kam um Ausbleiben einer Amplifikation. Daher wird im Weiteren nicht näher auf die Daten eingegangen.

Für die SLGC-Linie T1338 ergaben die Western-Blot-Analysen, dass die Mutterkultur eine relativ starke Sox2-Expression aufweist (Hirsland, 2017), die in den Klonen noch etwas höher war. Auf dem mRNA-Level variierte die Sox2-Expression deutlich. Die Klone T1338 cl-4, cl-8, cl-10 und cl-11 wiesen eine ähnliche Expression wie die Mutterkultur auf, wohingegen die Klone cl-1, cl-2, cl-3, cl-5, cl-6, cl-7 und cl-9 deutlich höhere Expressionen aufwiesen. Die Ergebnisse der MSP-Analyse zeigten eine homogene Methylierung der Sox2-Promotorregion 2 zwischen 30 und 40% in der T1338 Mutterkultur und davon abgeleiteten Klonen. Somit war die geringe Methylierung der Promotorregion 2 mit einer hohen Sox2-Expression assoziiert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Alonso et al. (2011), welche einen hypomethylierten Sox2-Promotor mit der aktiven Genexpression korrelierten. Dagegen wurde eine hohe Varianz der Methylierung der Sox2-Promotorregion 3 (zwischen 20% und 70%) festgestellt, welche nicht mit den Ergebnissen der Expressions-Analysen kongruent sind. Somit scheinen die epigenetischen Veränderungen in diesem Bereich keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Sox2-Expression der SLGC-Linie T1338 zu haben. In der Korrelationsanalyse der Promotorregionen 2 und 3 zeigte sich ein negativer Korrelationskoeffizient ($r = -0,494$; CI: $-0,79$; $-0,12$), was auf eine uneinheitliche und unabhängige Methylierung der beiden Regionen hinweisen könnte. Insgesamt sprechen die Methylierungsdaten für ein hohes Maß an Stammzeleigenschaften der SLGC-Linie T1338 und deren Klone durch Expression von Sox2.

In der SLGC-Linie T1440 ergaben die Untersuchungen des Sox2-Promotors mittels MSP für die Region 2 ähnliche Ergebnisse wie bei T1338. Es wurde ebenfalls eine Hypomethylierung (10-20%) sowohl in der Mutterkultur als auch in den Klonen nachgewiesen. Auffallend ist hierbei, dass es scheinbar keinen Unterschied im Methylierungsgrad im Laufe der Passagierung gab, da die Klone aus frühen Passagen (p5, p8 und p9) und die Mutterkultur in später Passage (p46) vorlagen. Im Gegensatz hierzu stehen wiederum die Ergebnisse der Promotorsequenz 3, in welcher das Methylierungsmuster weniger eindeutig war. Obwohl die Positivkontrolle gut funktionierte, wurden für Mutterkultur und Klone nur wenig Amplifikate erhalten, sodass die Quantifizierung problematisch war. In der Mutterkultur lag ein hoher Methylierungsgrad ($>70\%$) für die Region 3 vor, in den Klonen aber maximal eine 30%-ige Methylierung. Auffallend ist hierbei die Korrelation zwischen Passage und Methylierungsindex, da in frühen Passagen (z.B. Klon T1440 cl-8 p5) die

Diskussion

amplifizierte Sequenz weitgehend unmethyliert vorlag und mit steigender Passage zunehmend methyliert. Dies könnte für die sukzessive Methylierung und somit Deaktivierung des Sox2-Promotors in der Region 3 im Laufe der Passagierung sprechen. Wie bereits angesprochen, waren im Vergleich zu den amplifizierten Fragmenten der Sox2-Promotorregion 2 die Bandenintensitäten für die Region 3 deutlich geringer bei identischer Menge eingesetzter, bisulfitbehandelter DNA. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das Vorliegen von sowohl methylierten als auch unmethylierten CpG-Sequenzen in der Promotorregion 3 sein (partielle Methylierung), in deren Folge keine spezifische Bindung der Primerpaare möglich ist und nur ein Bruchteil der DNA amplifiziert werden kann. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Promotormethylierung sukzessive erfolgen könnte. Diese Ergebnisse der MSP mit dem Primerpaar U3/M3 korrelierten nicht mit den Expressionsanalysen der Kollegen, da hier sowohl in frühen Passagen der Klone als auch in der späten Passage der Mutterkultur eine hohe Sox2-Expression nachgewiesen wurde. Dies stützt die Vermutung, dass die Sox2-Promotorregion 2 auch im Fall von T1440 einen höheren Einfluss auf die Genexpression hat als die Region 3. Aufgrund der geringen Probenzahl kann der errechnete Korrelationskoeffizient ($r = 0,587$; CI: -1; +1) für die Methylierung der Regionen 2 und 3 keinen Zusammenhang aufweisen, wobei die geringe Signalstärke der Amplifikate der untersuchten U3/M3 -Primer problematisch ist.

Die Analyse der SLGC-Linie T1452 ergab nicht in allen Ansätzen Amplifikate mit den Primern der Sox2-Promotorregionen 2 und 3. Dass Amplifikate in den Ansätzen mit beiden Primerpaaren fehlten, könnte ein Hinweis auf eine geringe Stabilität der DNA nach der Bisulfitmodifizierung sein. Aufgrund ungenügender Mengen an isolierter DNA konnten die Modifizierung und PCR nicht erneut durchgeführt werden. Alternativ könnte auch das Vorliegen partiell methylierter Sequenzen oder Punktmutationen in den untersuchten Bereichen zum Fehlen der Produkte in einigen Ansätzen geführt haben. Im Gegensatz zu den Zelllinien T1338 und T1440 variierte der Methylierungsgrad der Sox2-Promotorregion 2 zwischen den T1452-Klonen erheblich. Die relative Methylierung lag zwischen 0% (z.B. Klon T1452 cl-14) und 35% (Klon T1452 cl-155), insgesamt dominierte aber die Hypomethylierung. Ein Vergleich mit der Mutterkultur war wegen fehlender Amplifikate nicht möglich. Die Ergebnisse der MSPs der Sox2-Promotorregion 3 wiesen sehr viel deutlichere Unterschiede zwischen den Klonen auf als die für die Region 2. Der überwiegende Anteil der Klone wies in der Region 3 hauptsächlich einen stark methylierten Zustand auf (T1452-Klone: cl-14 und cl-17: 99%; cl-10, cl-15 und cl-155 >70%; cl-20 p20 und cl-21: 64%), jedoch wurden auch Klone mit einer weniger methylierten Promotorregion 3 identifiziert (T1452 cl-20 p16: <50%). In allen Klonkulturen, mit Ausnahme von Klon T1452 cl-155 (Passage 15), wurde ähnlich der Mutterkultur eine Sox2-Expression beobachtet. Die MSP-Analysen des Klons T1452 cl-155 erfolgten allerdings sechs Passagen später als z.B. die Western-Blot- und mRNA-Analysen (Expressionsdaten der Arbeitsgruppe; Hirseland, 2017), sodass hier eine Änderung im Laufe der Passagierung nicht

Diskussion

auszuschließen ist. Bei überwiegend hypomethylierter Sox2-Promotorregion 2 und hypermethylierter Sox2-Promotorregion 3 scheint bei den T1452-Klonen eine inverse Regulation der beiden Regionen vorzuliegen. Diese Vermutung wird durch einen negativen Korrelationskoeffizienten von $r = -0,515$ (CI: -0,95 ; +0,35) unterstützt, wenngleich das ermittelte Konfidenzintervall keine signifikante Korrelation belegt. Da eine Sox2-mRNA und Proteinexpression in den T1452-Klonen nachweisbar war, kann geschlossen werden, dass die Promotorregion 3 an der Genregulation nicht beteiligt sein sollte.

Ähnlich der SLGC-Linie T1452 waren auch im Fall der T1464-Analysen in einigen Proben keine Amplifikate detektierbar. Auch hier waren die Mutterkultur sowie die T1464 Klone cl-1, cl-6 und cl-8 betroffen. Bei diesen DNA-Proben wurden jedoch mit dem Primerpaar M1 Amplifikate erhalten, was auf das Vorliegen intakter DNA-Matrizen hinweisen könnte. Wie bereits erwähnt, waren die PCRs mit den M1/U1 Primerpaaren meist nicht konklusiv, hier insbesondere wegen der Ergebnisse mit U1 (PCR-Produkte zu groß und unterschiedlicher Länge). Dennoch könnte das Auftreten der Amplifikate mit dem M1-Primerpaar andeuten, dass das Fehlen der PCR-Produkte für die Regionen 2 und 3 eher auf einer partiellen Methylierung und damit einer schrittweisen Geninaktivierung bzw. -aktivierung beruht, als auf einem experimentellen Problem. Im Fall der T1464-Klone, für die PCR-Produkte erhalten wurden, variierte der Methylierungsgrad zwischen den Klonen verhältnismäßig wenig. In der Sox2-Promotorregion 2 lagen die DNA-Sequenzen in allen Proben zwischen 20-30% methyliert vor, wohingegen die Methylierung in der Sox2-Promotorregion 3 zwischen 70 und 100% betrug. Dieses Ergebnis würde, wie im Fall der T1452-Klone, eine inverse Regulation der beiden Regionen bedeuten, was durch einen negativen Korrelationskoeffizienten $r = -0,40$ untermauert wird. Auch hier wurden Korrelationskoeffizienten mit Überschreitung des Nullpunktes ermittelt, womit keine klare Korrelation nachweisbar war. Die Expressionsanalysen der Kollegen im Labor zeigten deutliche Unterschiede in der Sox2-mRNA und -Proteinexpression. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung und der Sox2-Expression lässt sich daher nicht erkennen.

Die Ergebnisse der MSP-Analysen der SLGC-Linie T1495 wiesen für die Mutterkultur und die abgeleiteten Klone eine Hypomethylierung in der Sox2-Promotorregion 2 auf. Damit ergab sich eine ähnliche Situation wie im Fall von T1338, T1440 und T1464. Die Region 3 war dagegen durch eine klare Hypermethylierung gekennzeichnet (68% - 96% methyliert). Dabei waren im Fall des Klons T1495 cl-26 eine vollständig unmethylierte Region 2 und eine komplett methylierte Region 3 feststellbar. Auch bei der Mutterkultur und den übrigen Klonen war ein nahezu inverses Methylierungsmuster erkennbar. Entsprechend betrug der errechnete Korrelationskoeffizient $r = -0,624$ (CI: -0,95 ; 0,25). Überraschenderweise wurde sowohl auf dem mRNA- als auch auf dem Proteinlevel nur eine niedrige Sox2-Expression in der Mutterkultur im Vergleich zu den Klonen

Diskussion

nachgewiesen, womit der Methylierungsgrad der Sox2-Promotorregion 2 nicht eindeutig die Expressionsdaten widerspiegelt (Expressionsdaten der Arbeitsgruppe).

Zusammenfassend wurde für die fünf untersuchten SLGC-Linien ein heterogenes Methylierungsmuster der Sox2-Promotorregionen 2 und 3 nachgewiesen. Während die Promotorregion 2 in fast allen Fällen geringe Methylierung aufwies, war die Promotorregion 3 in T1338 und T1440 teilweise und in den übrigen Linien eher hypermethyliert. Damit scheint die Methylierung der beiden untersuchten Promotorregionen unabhängig voneinander zu erfolgen und die Sox2-Expression eher von der Methylierung der Region 2 abhängig zu sein. Obwohl die Sox2-mRNA und Proteinexpressionsdaten der Kollegen meist gut zur Hypomethylierung der Sox2-Promotorregion 2 passen, lassen sich Protein- und mRNA-Level nicht immer eindeutig auf die Hypomethylierung zurückführen. Effekte anderer Art, wie z.B. Chromatinmodifizierung, könnten eine zusätzliche Rolle spielen.

4.3 Offenes und geschlossenes Chromatin im Bereich von Sox2- und Oct3/4-Promotor

Neben epigenetischen Veränderungen auf DNA-Ebene könnten auch epigenetische Modifizierungen auf Chromatinlevel eine Bedeutung für die Expression des Transkriptionsfaktors Sox2 in GBMs haben. Insbesondere sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob der Verlust an Stammzeleigenschaften in späten Passagen mit dem Auftreten von geschlossenem Chromatin in den Promotoren der Pluripotenzgene Sox2 und Oct3/4 erklärbar ist. Der Pluripotenz- und Transkriptionsfaktor Oct3/4 wurde deshalb in die Analysen einbezogen, da widersprüchliche Daten hinsichtlich dessen Bedeutung für SLGCs vorliegen. So wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Hypermethylierung des Oct3/4-Promotors festgestellt (Choschick et al., 2014), während andere Arbeitsgruppen Oct3/4 als einen SLGC-Marker klassifizieren (Überblick in (Schonberg et al., 2014)). Die Analyse der Regulation der Sox2- und Oct3/4-Expression auf Chromatinebene wurde mittels Chromatinimmunpräzipitation und nachfolgender PCR (ChIP) durchgeführt. Dabei wurden Antikörper eingesetzt, die spezifisch epigenetische Modifizierungen im N-Terminus des Histons H3 erkennen. Wie jede experimentelle Methode unterliegt auch die ChIP gewissen Limitierungen und Fallstricken. In dieser mehrtägigen Analyse können z.B. Probleme während des Cross-links in Form von Überfixierung oder Proteinschäden auftreten. Darüber hinaus sind die Ergebnisse in hohem Maße von der Qualität der verwendeten Antikörper abhängig (Das et al., 2004). Sind zum Beispiel die K_D -Werte der eingesetzten Antikörper verschieden, lassen sich keine Rückschlüsse auf die relative Häufigkeit von Methylierung oder Acetylierung der Histonschwänze ziehen. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen das Histon H3 eingesetzt, die speziell für die ChIP-Analyse entwickelt wurden. Leider macht der Hersteller (CellSignaling, Danvers MA, USA) keine Angaben zu den K_D -Werten der Antikörper.

Zur Evaluation der Durchführung der ChIP wurden Primer für das RPL30-Exon3-Gen mitgeführt, bei dem es sich um ein ubiquitär vorkommendes Gen mit konstitutiver Expression handelt, das somit als Positivkontrolle für den Nachweis von offenem Chromatin durch ChIP dienen kann. Es ist bekannt, dass das Chromatin des RPL30-Exon3-Gens in offenem Zustand und somit für die Transkription zugänglich vorliegt. In allen Proben aus den SLGC-Linien sollte das RPL30-Exon3-Gen somit sogenannte „*active marks*“ im Histon H3 aufweisen. Dies konnte in der Tat für alle vier untersuchten SLGC-Linien bestätigt werden. So wurden für die „*active mark*“ H3K9ac (Histon H3 im Lysylrest 9 acetyliert) stets starke Signale erhalten. Diese lagen zum Teil sogar über der α H3-Kontrolle, was eventuell an einer höheren Affinität des Antikörpers α H3K9ac relativ zum α H3 liegen könnte. Für die IgG-Negativkontrolle wurde ein sehr viel geringeres Signal als für die Analyse mit dem α H3-Antikörper erhalten. Dass es hier zu Signalen kommt, könnte an einer unspezifischen Bindung von DNA, z.B. an die Agarose-Beads oder das daran gekoppelte Protein A/Protein G

Diskussion

kommen, die für Immunpräzipitation eingesetzt werden. Um dieses Risiko zu minimieren wurde ein sog. *Preclearing* durchgeführt, bei dem das isolierte Chromatin über Nacht mit Agarose-Beads inkubiert wird. Das Verhältnis der Signale für die *active mark* α H3K9ac und die *repressive mark* α H3K27me_{2/3} bestätigte den Zustand des offenen Chromatins im Bereich des RPL30-Exon3-Gens. Es zeigte sich zudem, dass das Signal für die „*bivalent mark*“ α H3K4me₃ nahezu identisch mit dem für α H3K9ac war. Diese „*bivalent mark*“ ist durchaus im Bereich offenen Chromatins zu finden (Bernstein et al., 2006). Mit der ChIP des RPL30-Exon3-Gens wurde somit gezeigt, dass die Methode gut etabliert worden war und dass die Antikörper geeignet waren.

Außer der Analyse der sogenannten „*active, bivalent und repressive marks*“ wurde die Bindung von Sox2 und Oct3/4 an den Sox2-Promotor überprüft. Für die Transkriptionsfaktoren Sox2 und Oct3/4 ist bekannt, dass sie sowohl sich selbst als auch gegenseitig aktiv regulieren und einen positiven transkriptionellen *feedback-loop* etablieren (Rizzino, 2009). Dabei kann das Oct3/4-Sox2-Heterodimer im Oct3/4-Promotor binden (Rizzino, 2009) Durch die ChIP mit dem Sox2- bzw. Oct3/4-Antikörper könnte getestet werden, ob Sox2 bzw. Oct3/4 in der untersuchten Region des Sox2-Promotors binden und ein positives transkriptionelles Feedback auch in SLGCs gilt.

Im Gegensatz zu der RPL30-Exon3-ChIP waren in der IgG-Negativkontrolle für die PCR mit den Sox2- und Oct3/4-Primern das „*signal noise*“-Verhältnis weniger optimal. Auch war die Reproduzierbarkeit der Daten weniger gut als bei der Kontrolle. Die Essenz mehrerer Versuche wird im Folgenden besprochen.

Für Sox2 wies die SLGC-Linie T1442 starke Signale für die *active mark* H3K9ac und die *bivalent mark* H3K4me₃ auf, was auf ein offenes Chromatin hinweist. Die *active mark* war ebenfalls für T1495 dominant bei reduzierter (30-40%) Signalstärke von H3K4me₃ und H3K27me_{2/3}. Dagegen dominierte im Fall von T1371 die *bivalent mark* H3K4me₃ und die *repressive mark* H3K27me_{2/3} gegenüber H3K9ac. T1440 lieferte hingegen keine konklusiven Ergebnisse. Generell schien das Chromatin im Bereich des Sox2-Gens in zwei von drei SLGC-Linien in hohen Passagen in offener Form vorzuliegen. Dies stimmt gut mit den Western-Blot-Analysen des Labors überein, die insbesondere für T1442 und T1495 eine Sox2-Proteinexpression in Mutterkulturen nach der Passage 60, mit einer höheren Expression in T1442, nachweisen konnten. Die immunzytochemischen Analysen der Kollegen belegten zudem, dass in T1442-, nicht aber T1495-Kulturen alle Zellen Sox2 im Zellkern exprimierten (Hirseland, 2017; Zechel, persönliche Mitteilung). Für Oct3/4 waren die Ergebnisse weniger klar als für Sox2. Auffallend war die Intensität des Signals der *repressive mark* H3K27me_{2/3}. Diese lag im Fall von T1495 über dem der *active* und *bivalent marks*. Für die Intensitäten der Signale im Fall von T1371 wurden ähnliche Werte für *active mark* H3K9ac und *repressive mark* H3K27me_{2/3} detektiert, welche beide über dem der *bivalent mark* H3K4me₃ lagen. Die gleichzeitige Anwesenheit ähnlich hoher Level von *active* und *repressive mark* könnte auf eine Heterogenität der Kultur hinweisen, d.h. neben Zellen mit offenem Chromatin

Diskussion

könnten auch solche mit geschlossenerem Chromatin in der Kultur vorkommen. Dies wäre mit dem Hierarchie-Modell von Chen et al. (2010) vereinbar (siehe oben). Für T1442 wurden die stärksten Signale in der *active mark* H3K9ac detektiert, wohingegen für die *bivalent* und *repressive marks* ähnliche, schwächere Signale beobachtet wurden. Da sich diese Kulturen immunzytochemisch stets durch eine hohe Homogenität auszeichnen (Choschzick, 2015; Hirseland, 2017), liegt die Vermutung nahe, dass das Chromatin im Oct3/4-Genbereich in T1442 nicht „geschlossen“ ist. In diesem Kontext ist es bedeutsam, dass in allen untersuchten SLGC-Linien zwar Oct3/4 Transkripte, aber nicht das Oct3/4-Protein, nachweisbar war und der Promotor zu über 90% methyliert ist (Choschzick et al., 2014).

Die ChIP-Daten wurden stets mit Kulturen, nicht aber mit einzelnen Zellen gewonnen. Abhängig von der Homogenität dieser Kulturen bzw. der Etablierung einer zellulären Hierarchie wird die Zusammensetzung an Typ-I, II und III-Zellen variieren und die Ergebnisse der ChIP beeinflussen. Während T1442-Kulturen stets ein sehr homogenes Erscheinungsbild hatten, war dies für T1371 und insbesondere T1495 nicht der Fall. So waren in T1442-Kulturen stets alle Zellen ähnlich stark positiv für Sox2. Im Fall von T1371 variierte die Expression von Sox2 zwischen Kulturen und T1495 etablierte stets eine starke Hierarchie mit einzelnen stark Sox2-positiven Zellen und einigen Sox2-negativen Zellen mit allen möglichen Zwischenstufen (Choschzick, 2015; Hirseland, 2017; Zechel, persönliche Mitteilung). Weiterhin kann vermutet werden, dass sich in den Promotorregionen mehrere Nukleosomen befinden, sodass unklar ist, ob tatsächlich die regulatorisch entscheidenden Nukleosomen in der Immunpräzipitation von den Antikörpern gebunden wurden. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Interpretation der ChIP nicht immer eindeutig. Dennoch kann geschlussfolgert werden, dass die epigenetischen Muster insgesamt ein *Silencing* des Oct3/4-Gens und eine transkriptionelle Aktivität des Sox2-Gens nahelegen.

4.4 Evaluation des Modells der zellulären Hierarchie anhand von CD133- und Sox2-Daten

In den Kapiteln 4.1 bis 4.3 wurde bereits mehrfach auf das Modell der zellulären Hierarchie hingewiesen. Dieses postuliert, dass in SLGC-Kulturen nur die Typ-II-Zelle CD133 exprimiert bei bereits sinkender Sox2-Expression (Chen et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierung des Sox2-Promotors, aber auch die Anwesenheit von CD133+ Zellen in SLGC-Mutterkulturen und davon abgeleiteten Klonen untersucht. Auf Basis dieser Daten soll abschließend eine Evaluation des Modells der zellulären Hierarchie erfolgen.

Würde das Hierarchie-Modell von Chen und Kollegen stimmen, dann wäre die höchste transkriptionelle Aktivität des Sox2-Promotors mit einem geringen Anteil an CD133+ Zellen korreliert (Situation der Typ-I-Zelle). Weiterhin würden intermediäre Sox2-Expression und hohe Anteile an CD133+ Zellen korrelieren (Situation der Typ-II-Zelle). Niedrige Sox2-Level und geringe bis fehlende Anteile an CD133+ Zellen wären für die Typ-III-Zelle charakteristisch. Bei den nachfolgenden Betrachtungen wird primär auf die Sox2-Promotorregion 2 Bezug genommen, da deren Methylierung, nicht aber die der Region 3, für die Regulation der Sox2-Expression relevant zu sein scheint (siehe oben).

Die Korrelationsanalysen von Sox2-Promotormethylierung und dem Anteil an CD133+ Zellen in Kulturen der SLGC-Linie T1338 (und deren Klone) ergab für die Region 2 einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,024$. Dabei lag die Sox2-Promotorregion 2 in hypomethyliertem und somit aktivem Zustand vor. Ein Nachweis von CD133+ Zellen war bei Werten unter 2% durch die Durchflusszytometrie nicht sicher erfolgt. Bei einem Korrelationskoeffizienten nahe dem Nullwert sowie Konfidenzintervall (CI: -0,59 ; +0,50), liegt die Vermutung nahe, dass in dieser SLGC-Linie die Expression von Sox2 und CD133 voneinander unabhängig reguliert sind. Unabhängig von dieser Berechnung unterstützen die Daten das Modell von Chen et al. (2010), in welchem stark Sox2-positiv Typ-I-Zellen CD133-negativ sind.

Die Analyse der Sox2-Promotorregionen der SLGC-Linie T1452 wies eine hypomethylierte Region 2 nach. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben Anteile an CD133+ Zellen zwischen wenigen Prozent bis knapp 50%. Die Korrelationsanalysen früherer Passagen ergaben eine negative Korrelation zwischen der Sox2-Promotormethylierung und dem Anteil an CD133+ Zellen. Anzumerken ist jedoch, dass nur einer der acht untersuchten Klone Anteile an CD133+ Zellen von knapp 50% aufwies und die Korrelation statistisch nicht signifikant war. Dies wird durch die Untersuchungen späterer Passagen bestätigt, die einen Korrelationskoeffizienten nahe Null ergaben. Auch hier wiesen nur zwei Klone knapp 50% CD133+ Zellen auf, wohingegen die anderen Klonkulturen nur unter 10% CD133+ Zellen enthielten. Bei einer einheitlichen Hypomethylierung

Diskussion

der untersuchten Sox2-Promotorregion in den betrachteten Klonen liegt die Vermutung nahe, dass CD133 und Sox2 unabhängige Variablen sind.

Im Fall der SLGC-Linie T1495 wurden ebenfalls die Anteile an CD133+ Zellen sowohl in frühen als auch in späten Passagen getrennt beobachtet. Diese lagen zwischen 0% und 40%, wobei spätere Passagen tendenziell einen höheren Anteil an CD133+ Zellen aufwiesen. Die Region 2 des Sox2-Promotors lag in hypomethyliertem Zustand vor. Die errechneten Korrelationskoeffizienten waren negativ. Somit würde ein hohes Maß an Promotormethylierung mit einem höheren Anteil CD133+ Zellen assoziiert sein. Bei nicht signifikanten Testergebnissen und ermittelten Korrelationskoeffizienten mit Überschreitung des Nullpunktes können diese Zusammenhänge jedoch nur als Tendenz gesehen werden. Allerdings würde das Ergebnis für T1452 das Modell von Chen et al. (2010) unterstützen.

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass die zunehmende Methylierung des Sox2-Promotors nur in einem von drei Fällen (T1495) eine Korrelation mit höherem Anteil an CD133+ Zellen vermuten lässt. In den beiden anderen SLGC-Linien (T1338, T1452) scheinen die beiden Variablen eher unabhängig. Dazu passen die immunzytochemischen Analysen des Labors, die hohe CD133-Expression nicht nur in Zellen mit mittlerer, sondern in geringem Ausmaß, auch in Zellen mit hoher oder niedriger bis fehlender Sox2-Expression nachwies (Zechel, persönliche Mitteilung). Dabei wurden diese Beobachtungen für T1338 und T1452 (und anderen hier nicht untersuchten SLGC-Linien) gemacht, die sich alle durch hohe Sox2-Level in der Mehrheit der Zellen auszeichnen. Die Vermutung von Chen et al. (2010), dass CD133 ein stringenter Marker für die Typ-II-Zelle ist, kann die vorliegende Arbeit nicht bestätigen.

4.5 Konklusion und kritischer Ausblick

Die vorliegende Arbeit belegt eine Hypomethylierung des Sox2-Promotors in der als „Region 2“ bezeichneten Sequenz und eine Variabilität der Methylierung in der als „Region 3“ bezeichneten Sequenz. Fraglich ist allerdings, ob die Region 2 die DNA-Sequenz upstream des Transkriptionsstarts erfasst, wie es von den Autoren (Alonso et al., 2011) beschrieben wird, oder ob es sich um einen Downstream-Promotor handelt. Weiterhin ist nicht klar, wie die divergenten Ergebnisse der Region 3 zu interpretieren sind, da diese in einigen SLGCs hypermethyliert und in anderen hypomethyliert war. Insgesamt scheint die Hypomethylierung der Promotorregion 2 gut mit den Daten zur Proteinexpression in den SLGC-Kulturen zu korrelieren, die sich auf Western-Blot- und immunzytochemische Analysen stützen.

Die Chromatinanalysen der untersuchten Zelllinien T1371, T1452 und T1495 weisen auf ein offenes bzw. partiell offenes Chromatin im Sox2-Gen in hohen Passagen hin. Dagegen scheint der Pluripotenzfaktor Oct3/4 von untergeordneter Bedeutung zu sein, da nach der bereits bekannten Promotorhypermethylierung in dieser Arbeit nun auch ein eher geschlossenes Chromatin nachgewiesen wurde. Unklar ist jedoch, wieso alle SLGC-Linien eine residuelle, geringe Menge an Oct3/4-Transkripten aufweisen und wozu diese nötig sein könnten.

Die Analysen des Oberflächenmoleküls CD133 zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Anteilen CD133+ Zellen in Klonkulturen. Einen Beleg für CD133 als Marker für Typ-II SLGCs wurde nicht erbracht und verstärkte die Zweifel an der Nützlichkeit dieses Markers. Allerdings ist unklar, welche Rolle CD133 in SLGCs zukommen könnte, da an der Expression des Proteins in SLGC-Kulturen kein Zweifel besteht. Da zwischen geringen und hohen Anteilen an CD133+ Zellen alle Optionen in den diversen SLGC-Kulturen unserer Arbeitsgruppe realisiert sind, erscheint es zumindest sehr problematisch Analysen an SLGCs auf CD133-sortierte Fraktionen zu beschränken. Möglicherweise könnte eine Inaktivierung des CD133-kodierenden Gens, z.B. durch die CRISPR-Cas9 Technologie (engl.: CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas9: *CRISPR-associated protein 9*), Aussage zur Bedeutung dieses Proteins erlauben.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste maligne hirneigene Tumor. Trotz Einsatz multimodaler Therapiekonzepte bleibt die Therapie palliativ. Ursächlich hierfür scheint das Vorhandensein stammzellähnlicher Gliomzellen (SLGCs: *stem-like glioma cells*) zu sein, welche zur Selbsterneuerung befähigt sind und vermutlich zur Rezidivbildung führen.

In dieser Arbeit wurde zum einen die epigenetische Regulation des Pluripotenzfaktors Sox2 auf DNA- und Chromatinlevel untersucht, da dieser für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von SLGCs essentiell scheint. Zum anderen erfolgten Analysen des Oberflächenmoleküls CD133/Prominin-1, dessen Bedeutung als Marker für SLGCs kontrovers diskutiert wird. Für die Analysen wurden aus humanen GBMs und Gliosarkomen angelegte SLGC-Primärtumoren/-Mutterkulturen (Western-Blot; WB, Durchflusszytometrie; DFZ, methylierungsspezifische PCR; MSP, Chromatinimmunpräzipitation; ChIP) und davon mittels „*limited dilution assay*“ abgeleitete Klone (MSP, DFZ) eingesetzt, die Charakteristika von Stammzellen aufwiesen.

Nach Etablierung der ChIP unter Mitführen einer Positivkontrolle (RPL30-Exon3) zeigten sich in der Analyse der Histonmodifizierungen deutliche Unterschiede der SLGC-Linien im Bereich des Sox2-Promotors. Während in den SLGC-Linien T1442 und T1495 überwiegend *active* (H3K9ac) und *bivalent* (H3K4me3) *marks* nachgewiesen wurden, waren die Anteile in T1371 eher zugunsten des *repressive mark* (H3K27me2/3) verschoben. Für T1440 waren die Signale zu schwach, um Aussagen zu treffen. Somit liegt das Chromatin im Sox2-Promotorbereich sowohl in offenem (T1442>T1495) als auch eher geschlossenem (T1371) Zustand vor. Ergänzend zu den Chromatinanalysen erfolgten epigenetische Untersuchungen zweier Sox2-Promotorregionen („2“ und „3“) mittels MSP. Mit den Primerpaaren Sox2-U2/M2 wurden für alle fünf SLGC-Mutterkulturen und -Klone eine niedrige relative Methylierung nachgewiesen, welche zwischen <20% (T1440), 20-30% (T1452, T1464, T1495) und 30-40% (T1338) variierte. Demgegenüber standen starke Variationen des Methylierungsgrads der Region 3, welche eher hypomethyliert vorlag. Im Abgleich mit den WB-Analysen scheint die Region 2 für die Regulation der Genexpression verantwortlich. Die durchflusszytometrischen Analysen des Oberflächenmoleküls CD133 erbrachte in drei von fünf Zelllinien nur sehr geringe bis fehlende Anteile CD133+ Zellen mit Variationen über die Passagen, wobei T1452 und T1495 bis zu 50% CD133+ Zellen aufwiesen. Eine evidente Korrelation zwischen Sox2-Promotormethylierung und CD133+ Zellen war nicht nachweisbar.

Aufgrund deutlicher Variationen des CD133+ Anteils scheint CD133 als Marker für SLGCs von untergeordneter Bedeutung und ein Marker der weiter differenzierten Zelle zu sein. Die epigenetischen Analysen des Pluripotenzfaktors Sox2 zeigten hingegen eine hypomethylierte Sox2-Promotorregion 2 sowie eher offenes Chromatin. Somit könnte Sox2 als Marker der Gliomstammzelle dienen. Dies bedarf weiterer Analysen.

6 Literaturverzeichnis

Aguzzi A, Glatzel M, Tolnay M, Hans V, Wiestler OD (2008): Zentrales Nervensystem. In: Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A und Moch H (Hrsg.): Pathologie. 4. Aufl., 317–321, Elsevier Urban & Fischer, München.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 100, 3983–3988.

Alifieris C, Trafalis DT (2015): Glioblastoma multiforme. Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 152, 63–82.

Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, Urquiza L, Jauregi P, Lopez de Munain A, Sampron N, Aramburu A, Tejada-Solis S, Vicente C, Odero MD, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Idoate MA, Lang FF, Fueyo J, Gomez-Manzano C (2011): Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* 6, e26740.

Angelastro JM, Lame MW (2010): Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol Cancer Res* 8, 1105–1115.

Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D (2011): SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 8, 139–147.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2012): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL Kurzversion 3.0.
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_KRK_2014-08-verlaengert.pdf
(Tag des Zugriffs: 09.02.2017).

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2014): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Version 1.1 – August 2014 AWMF-Registernummer: 021/007OL.
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_KRK_2014-08-verlaengert.pdf
(Tag des Zugriffs: 09.02.2017).

Arndt T (2009): Spezielle Klinisch-chemische Analytik: Durchflusszytometrie (FACS). In: Renz H (Hrsg.): Praktische Labordiagnostik. 1. Aufl., 522–523, de Gruyter, Berlin.

Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG (2006): Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8, 532–538.

Bailey P, Cushing H (1926): A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. J.B. Lippincott, Philadelphia.

Bakshi A, Bretz CL, Cain TL, Kim J (2018): Intergenic and intronic DNA hypomethylated regions as putative regulators of imprinted domains. *Epigenomics* 10, 445–461.

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

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007): CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67, 4010–4015.

Literaturverzeichnis

- Beier D**, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP (2008): Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 68, 5706–5715.
- Beier D**, Schulz JB, Beier CP (2011): Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol Cancer* 10, 128.
- Ben-Porath I**, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008): An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499–507.
- Berezovsky AD**, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW, Hong X, Hasselbach LA, Irtenkauf SM, Mikkelsen T, deCarvalho AC (2014): Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 16, 193-206, 206.e19-25.
- Bernstein BE**, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Bonnet D**, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730–737.
- 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, 69–82.
- Chen J**, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF (2012): A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522–526.
- Chen R**, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS (2010): A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362–375.
- Cheng T-L**, Qiu Z (2014): MeCP2: multifaceted roles in gene regulation and neural development. *Neurosci Bull* 30, 601–609.
- Choschzick I**, Hirseland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, Zechel C (2014): Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes alpha, beta and gamma. *Neuroscience* 279, 44–64.
- Choschzick I** (2015): Differenzierungskapazität von Stammzell-ähnlichen Zellen aus humanen Glioblastomen. Naturwissenschaftliche Dissertation Lübeck, 2015.
- Christensen K**, Schroder HD, Kristensen BW (2008): CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol* 90, 157–170.
- Collas P** (2010): The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol Biotechnol* 45, 87–100.
- Collins AT**, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005): Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946–10951.
- Das PM**, Ramachandran K, vanWert J, Singal R (2004): Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 37, 961–969.

Literaturverzeichnis

- Dirks PB** (2010): Brain tumor stem cells. The cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol* 4, 420–430.
- Dolecek TA**, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5, v1-49.
- Dong X**, Weng Z (2013): The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics* 5, 113–116.
- Eramo A**, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, Maria R de (2008): Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15, 504–514.
- Ferrari KJ**, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, Fischle W, Bonaldi T, Pasini D (2014): Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 53, 49–62.
- Fischer I**, Gagner J-P, Law M, Newcomb EW, Zagzag D (2005): Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15, 297–310.
- Fogh J**, Fogh JM, Orfeo T (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221–226.
- Fong H**, Hohenstein KA, Donovan PJ (2008): Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 1931–1938.
- Fullgrabe J**, Kavanagh E, Joseph B (2011): Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391–3403.
- Gade P**, Kalvakolanu DV (2012): Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. *Methods Mol Biol* 809, 85–104.
- Galli R**, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, Vitis S de, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004): Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011–7021.
- Gangemi RM**, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G (2009): SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27, 40–48.
- Giese A**, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M (2003): Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21, 1624–1636.
- Greaves M**, Maley CC (2012): Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
- Gross TJ**, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE, Philibert RA, Milhem MM, Monick MM (2014): Epigenetic silencing of the human NOS2 gene. Rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *J Immunol* 192, 2326–2338.
- Hardee ME**, Zagzag D (2012): Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* 181, 1126–1141.
- Hartmann B** (2007): Entwicklung einer Real-time-PCR-Nachweismethode für *Yersinia enterocolitica*. Tiermedizinische Dissertation München, 2007.
- Hashimoto H**, Zhang X, Vertino PM, Cheng X (2015): The Mechanisms of Generation, Recognition, and Erasure of DNA 5-Methylcytosine and Thymine Oxidations. *J Biol Chem* 290, 20723–20733.

- He H**, Li MW, Niu CS (2012): The pathological characteristics of glioma stem cell niches. *J Clin Neurosci* 19, 121–127.
- Heddleston JM**, Hitomi M, Venere M, Flavahan WA, Yang K, Kim Y, Minhas S, Rich JN, Hjelmeland AB (2011): Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment. *Curr Pharm Des* 17, 2386–2401.
- Hegi ME**, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997–1003.
- Herman JG**, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996): Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *PNAS* 93, 9821–9826.
- Hirseland E** (2017): Zelluläre und molekulare Heterogenität stammzellähnlicher Gliomzellen und Bedeutung für die Therapiesensibilität. Naturwissenschaftliche Dissertation Lübeck, 2017.
- Holash J**, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999): Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998.
- Huse JT**, Holland EC (2010): Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 10, 319–331.
- Ignatova TN**, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA (2002): Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.
- Ikushima H**, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K (2009): Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5, 504–514.
- Jacobs VL**, Valdes PA, Hickey WF, Leo JA de (2011): Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* 3, e00063.
- Jenuwein T**, Allis CD (2001): Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jones PA** (2012): Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484–492.
- Kouzarides T** (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kristensen LS**, Hansen LL (2009): PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem* 55, 1471–1483.
- Kulaeva OI**, Gaykalova DA, Studitsky VM (2007): Transcription through chromatin by RNA polymerase II. Histone displacement and exchange. *Mutat Res* 618, 116–129.
- Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lang G** (2006): Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 1. Aufl., 303, Springer-Verlag, Wien.
- Laperriere N**, Zuraw L, Cairncross G (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64, 259–273.

Literaturverzeichnis

- Lapidot T**, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.
- Lathia JD**, Gallagher J, Myers JT, Li M, VasANJI A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Huang AY, Rich JN (2011): Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* 6, e24807.
- Lee J**, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA (2006): Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391–403.
- Li AS**, Siu MKY, Zhang H, Wong ESY, Chan KYK, Ngan HYS, Cheung ANY (2008): Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Reprod Sci* 15, 735–744.
- Liang G**, Lin JCY, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, Weisenberger DJ, Egger G, Takai D, Gonzales FA, Jones PA (2004): Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *PNAS* 101, 7357–7362.
- Liu G**, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006): Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.
- Louis DN**, Deimling A von (1995): Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol* 5, 145–151.
- Louis DN**, Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131, 803–820.
- Luger K**, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Malmstrom A**, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 916–926.
- Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrook, J (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Martín V**, Sanchez-Sanchez AM, Herrera F, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Alvarez-Vega MA, Antolín I, Rodriguez C (2013): Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br J Cancer* 108, 2005–2012.
- Mehra P**, Wells AD (2015): Long-Range Transcriptional Control of the IL2 Gene by an Intergenic Enhancer. *Mol Cell Biol* 35, 3880–3891.
- Moore KA**, Lemischka IR (2006): Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880–1885.
- Morales V**, Richard-Foy H (2000): Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol Cell Biol* 20, 7230–7237.

- Müller M** (2010): Chirurgie für Studium und Praxis. 10. Aufl., 459 – 464, Medizinische Verl.- und Informationsdienste, Breisach am Rhein.
- Nakagawa M**, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008): Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101–106.
- Nowell PC** (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Ohgaki H**, Kleihues P (2005a): Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93–108.
- Ohgaki H**, Kleihues P (2005b): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 479–489.
- Ohka F**, Natsume A, Wakabayashi T (2012): Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int* 2012, 878425.
- Omuro A**, DeAngelis LM (2013): Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* 310, 1842–1850.
- Orlando V**, Paro R (1993): Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187–1198.
- Ostrom QT**, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS (2014): The epidemiology of glioma in adults. A "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16, 896–913.
- Ozerov SS**, Zakharov IV, Talygov SR, Konovalov DM, Kisliakov AN, Kachanov DI, Zheludkova OG, Varfolomeeva SR, Rachkov VE (2013): Turcot syndrome. Rare observation and literature review. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko* 77, 49-53; discussion 53.
- Parsons DW**, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, JR, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.
- Passarge E.** (2008): Taschenatlas Humangenetik. 3., vollst. überarb. Aufl., 160, Thieme, Stuttgart.
- Phillips HS**, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006): Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.
- Quelle DE**, Nteeba J, Darbro BW (2015): The INK4a/ARF Locus. In: Bradshaw RA und Stahl PD (Hrsg.): Encyclopedia of Cell Biology, Volume 3, 447–457. Academic Press, Waltham, MA.
- Reiser M**; Kuhn FP; Debus J (2006): Radiologie. 2. korrigierte Aufl., 566, Thieme (MLP Duale Reihe), Stuttgart.
- Reya T**, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Ricci-Vitiani L**, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, Maria R de (2010): Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.

Literaturverzeichnis

- Rizzino A** (2009): Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1, 228–236.
- Schiffer D**, Mellai M, Annovazzi L, Caldera V, Piazzini A, Denysenko T, Melcarne A (2014): Stem cell niches in glioblastoma: a neuropathological view. *Biomed Res Int* 2014, 725921.
- Schmitz M**, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, Wehner R, Schackert G, Schackert HK, Fussel M, Bachmann M, Rieber EP, Weigle B (2007): Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer* 96, 1293–1301.
- Schneider T**, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R (2010): Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107, 799-807.
- Schonberg DL**, Lubelski D, Miller TE, Rich JN (2014): Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med* 39, 82–101.
- Scott J**, Marusyk A (2017): Somatic clonal evolution. A selection-centric perspective. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1867, 139–150.
- Sharma S**, Kelly TK, Jones PA (2010): Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36.
- 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, 5821–5828.
- Singh SK**, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004a): Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267–7273.
- Singh SK**, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004b): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Solomon MJ**, Larsen PL, Varshavsky A (1988): Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53, 937–947.
- Stummer W**, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7, 392–401.
- Stummer W**, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T (2008): Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62, 564-76; discussion 564-76.
- Stupp R**, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A (2007): Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25, 4127–4136.
- Stupp R**, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R-O (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459–466.
- Stupp R**, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987–996.

Literaturverzeichnis

- Szalkowski AM**, Schmid CD (2011): Rapid innovation in ChIP-seq peak-calling algorithms is outdistancing benchmarking efforts. *Brief Bioinform* 12, 626–633.
- Takahashi K**, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- The Cancer Genome Atlas Research Network** (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.
- Thomas RP**, Recht L, Nagpal S (2013): Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. *Clin Pharmacol* 5, 1–9.
- Toms SA**, Ferson DZ, Sawaya R (1999): Basic surgical techniques in the resection of malignant gliomas. *J Neurooncol* 42, 215–226.
- Turner BM** (2005): Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* 12, 110–112.
- van Meir EG**, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H-K, Wen PY, Olson JJ (2010): Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60, 166–193.
- Verhaak RGW**, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Visvader JE**, Lindeman GJ (2012): Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728.
- Vuorinen V**, Hinkka S, Farkkila M, Jaaskelainen J (2003): Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)* 145, 5–10.
- Wang Y**, Leung FCC (2004): An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics* 20, 1170–1177.
- Weller M**, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G (2012): Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol* 14 Suppl 4, iv100-8.
- Weller M** (2014): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Gliome S2k. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
http://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2014/PDFs_Download/030099_DGN_LL_Gliome_final.pdf
(Tag des Zugriffs: 09.02.2017).
- Wick W**, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 707–715.
- Wojdacz TK** (2012): The limitations of locus specific methylation qualification and quantification in clinical material. *Front Genet* 3, 21.

Literaturverzeichnis

Wong OG-W, Huo Z, Siu MK-Y, Zhang H, Jiang L, Wong ES-Y, Cheung AN-Y (2010): Hypermethylation of SOX2 Promoter in Endometrial Carcinogenesis. *Obstet Gynecol Int* 2010.

Yue W-Y, Chen Z-P (2005): Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem* 53, 997–1002.

Zaidi SK, Young DW, Montecino M, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS (2010): Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Mol Cell Biol* 30, 4758–4766.

Zhang X, Kiang K, Zhang G, Leung G (2015): Long Non-Coding RNAs Dysregulation and Function in Glioblastoma Stem Cells. *Noncoding RNA* 1, 69–86.

Zhang Y, Reinberg D (2001): Transcription regulation by histone methylation. Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15, 2343–2360.

Zhao FQ (2013): Octamer-binding transcription factors: genomics and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18, 1051–1071.

7 Anhang

7.1 Ethik-Votum



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Zechel
Klinik für Neurochirurgie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 27.06.2008

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

Aktenzeichen: **08-070**
(immer angeben!)

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission 20. Mai 2008 – Ihr Schreiben vom 20. Juni 2008

Antragsteller: Frau Dr. Zechel / Herr Prof. Tronnier

Titel: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken mehr.


Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr


Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)
Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Ahrensburg)
Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein
(Medizinische Klinik I)
Frau Prof. Dr. M. Schröder
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Immer Fortschritt durch Leben
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau

PD Dr. C. Zechel

Klinik für Neurochirurgie

im Hause

Aktenzeichen: 08-070

Datum 18.03.2009

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Hier: Optimierte Aufklärung – Ihr Schreiben vom 12.03.2009

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

die optimierte Aufklärung habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

7.2 Abbildungen

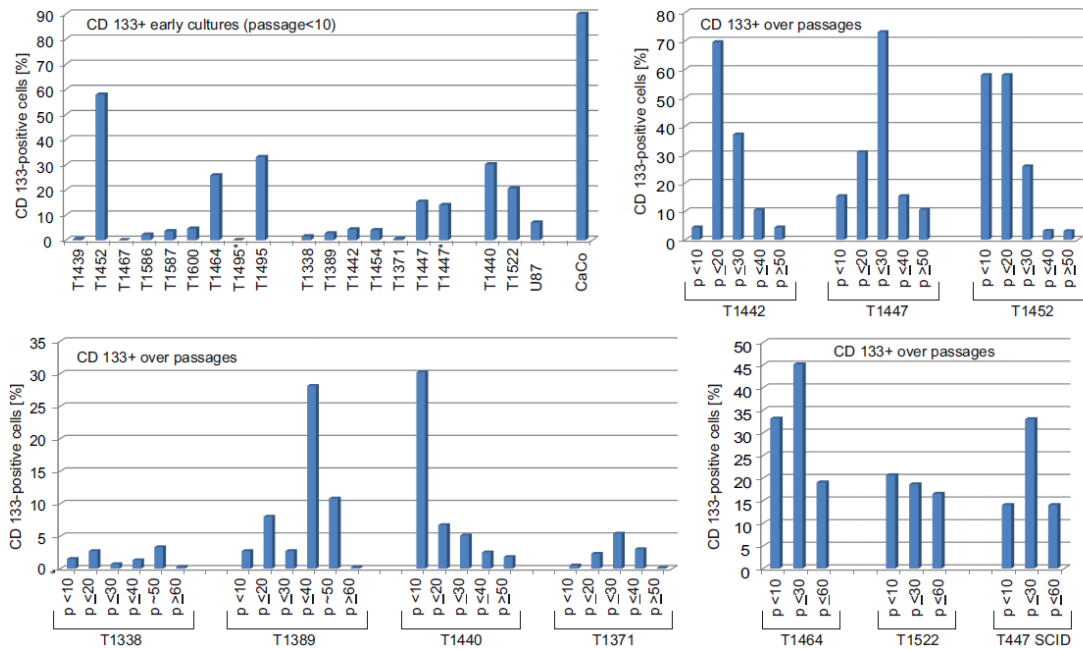


Abb. 26: Durchflusszytometrie der CD133-Expression verschiedener SLGC-Linien. Anteil CD133+ Zellen in frühen Kulturen (oben links). Alle anderen Abbildungen zeigen die Anteile CD133+ Zellen einzelner SLGC-Linien über die Passagen. [p] Passage.

8 Danksagungen

In erster Linie möchte ich meiner Betreuerin und „Doktormutter“ Frau PD Dr. rer. nat. Christina Zechel danken. Neben der Überlassung dieses interessanten Themas hat sie mich zum wissenschaftlichen Denken angeregt und ermutigt und mich tatkräftig in den praktischen und theoretischen Teilen dieser Arbeit unterstützt. Hierzu zählen insbesondere die – zahlreichen – Diskussionen zu den erhobenen Daten und die kritische Auseinandersetzung mit selbigen.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Volker Tronnier aus der Klinik für Neurochirurgie danken, dass ich meine Arbeiten im Labor für Neuroonkologie und Molekularbiologie durchführen durfte.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. Manfred Westphal für die Bereitstellung der U87MG-Gliomzelllinie sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Habermann für die Bereitstellung der CaCo2-Zelllinie. Des Weiteren bedanke ich mich beim Institut für systemische Entzündungsforschung (CAAnaCore) der Universität zu Lübeck, insbesondere bei Herrn Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt für die Einweisung in die Nutzung des Durchflusszytometers.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhard Vontheim aus dem Institut für Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck dafür bedanken, dass er mich – mit großem Engagement – bei der statistischen Auswertung unterstützt hat.

Nicht zu vergessen ist natürlich das Laborteam, mit dem ich zusammenarbeiten durfte. Herzlichen Dank für zahlreiche Diskussionen und die stets gute und erheiternde Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Isabel Choschick und Frau Dr. Eileen Hirsland für die tatkräftige Unterstützung beim Erlernen der Methoden. Zudem möchte ich mich bei Frau Edith Pawlak und Frau Susanne Behling bedanken, die mich in der Zellkultur und dem Western-Blot unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich natürlich bei meiner Frau, meinen Eltern, meiner Schwester mit Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets in meinen Vorhaben unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Christian Lichthardt
Geburtsdatum: 16.09.1987
Geburtsort: Fürth (Bay)



Schulbildung

Sep. 1993 bis Jul. 1997 Grundschule Fürth Unterfarnbach
Sep. 1997 bis Jun. 2006 Hardenberg-Gymnasium-Fürth
Abschluss: Abitur (2,0)

Studium

Nov. 2006 bis Sep. 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
Abschluss: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3,5)
Apr. 2009 bis Sep. 2013 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Abschluss: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,83) und
Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Seit Dez. 2013 Arzt in Weiterbildung
„Klinik & Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-,
Gefäß- und Kinderchirurgie“ des Universitätsklinikums Würzburg

Dissertation

September 2011 Beginn einer Dissertation unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat.
Christina Zechel im Labor für Neuroonkologie und
Molekularbiologie der Klinik für Neurochirurgie der Universität zu
Lübeck mit dem Titel:
*„Epigenetische Regulation der Sox2- (sex determining region Y
(SRY)- box 2) Expression in stammzellähnlichen Gliomzellen“*

Abstracts für wissenschaftliche Kongresse

1. Choschzick I, Schiefer L, Lichthardt S, Tronnier V, Zechel C. Regulation of Sox2 expression in glioma stem cells. - Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, Essen, 05.-07. Sep. 2012
2. Hirseland E, Leppert J, Alkanan Y, Lichthardt S, Choschzick I, Tronnier V, Zechel C. Lineages of glioblastoma stem cells with distinct phenotypes. - Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, Braunschweig, 23.-25. Sep. 2013.
3. Zechel C, Hirseland E, Roth S, Choschzick I, Leppert J, Alkanan Y, Lichthardt S, Tronnier V. HIERARCHICAL ORGANIZATION OF BRAIN TUMOR STEM CELLS. - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Rostock, 6.-7. Sep. 2013.
4. Hirseland E, Roth S, Choschzick I, Leppert J, Lichthardt S, Tronnier V, Zechel C. Hierarchical organization of glioblastoma-derived brain tumor stem cell lines. – Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, Luxemburg, 1.-3. Okt. 2014.

Publikation

Zechel C, Reclam J, Hirseland E, Rahlfs E, Lichthardt S, Loy M, Bähr L, Leppert J, Pawlak E, Tronnier V. Molecular and cellular heterogeneity of populations of stem-like glioma cells from human glioblastomas and gliosarcomas
American Journal of Pathology, wird eingereicht.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Weiterhin versichere ich, dass ich nicht vorher oder andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck, den