

Dissertation

Kathrin Hock

**Die Bedeutung des Mutationsstatus der Phosphatase mit Tensin-Homologie
für die Ausbildung des Brain Tumor Stem Cell Phänotyps in Korrelation mit
der Aldehyd-Dehydrogenase-1A1-Expression**



Technische Universität München



Aus dem Fachgebiet für Neuropathologie
(Leiter: Prof. Dr. J. Schlegel)
des
Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. Weichert)

**Die Bedeutung des Mutationsstatus der Phosphatase mit Tensin-Homologie für die
Ausbildung des *Brain Tumor Stem Cell* Phänotyps in Korrelation mit der Aldehyd-
Dehydrogenase-1A1-Expression**

Kathrin Anna Josepha Hock

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. J. Schlegel

2. Prof. Dr. W. Weichert

Die Dissertation wurde am 10.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 21.09.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Problemstellung	3
2.2	Glioblastoma multiforme	4
2.3	Genetische Profile	6
2.4	Tumorstammzell-Hypothese und Krebsstammzellen	9
2.5	Hirntumor Stammzellmarker	13
2.5.1	Hoechst 33324	13
2.5.2	Neurosphären	14
2.5.3	CD 133	14
2.5.4	ALDH1A1	15
2.6	PTEN – Ein Tumorsuppressorgen und primärer Inhibitor der Akt	17
2.6.1	Mutationen im PTEN-Gen	18
2.6.2	PTEN Status als Identifizierungshilfe von BTSC	19
3	Fragestellung	21
4	Material und Methoden	22
4.1	Material	22
4.1.1	Chemikalien, Medien, Kits und Geräte	22
4.1.2	Humane GBM-Zelllinien	24
4.1.3	Primäre Zelllinien	24
4.1.4	Antikörper	25
4.1.5	Puffer und Lösungen	25
4.2	Methoden	26
4.2.1	Zellkultur	26
4.2.2	Proteinextraktion	27
4.2.3	Bradford-Assay	27
4.2.4	SDS-PAGE	28
4.2.5	Westernblot	28
4.2.6	Ladekontrolle	29
4.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
4.2.8	Sequenzierung	33
5	Ergebnisse	34

5.1	PTEN- und Phospho-PTEN-Expression der etablierten Zell- und der Primärlinien.....	34
5.1.1	PTEN-Protein-Expression	34
5.1.2	Phospho-PTEN-Protein-Expression	34
5.2	PTEN-Mutationsstatus.....	35
5.2.1	Etablierte Zelllinien.....	35
5.2.2	Primäre Zelllinien.....	36
5.3	ALDH1A1-Expression und Neurosphärenbildung.....	37
5.3.1	ALDH1A1-Protein-Expression	37
5.3.2	Neurosphärenbildung.....	38
5.3.3	Korrelation der Neurosphärenbildung und des ALDH1A1-Levels.....	38
5.4	PTEN-Status in Korrelation mit Neurosphärenbildung und ALDH1A1-Expression.....	39
6	Diskussion	40
6.1	PTEN Status korreliert mit Neurosphärenbildung und mit ALDH1A1-Expression.....	41
6.2	ALDH1A1-Expression bei Hirntumorstammzell-Subpopulation in GBM	42
6.3	Neurosphären-Assay als funktionelle Methode, um BTSC zu charakterisieren	43
6.4	Die Rolle PTENs in der Tumorstammzell-Hypothese.....	44
6.5	Ausblick.....	48
7	Zusammenfassung	49
8	Literaturverzeichnis	50
9	Danksagung.....	56
10	Eidesstattliche Erklärung	57
11	Lebenslauf	58

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Produkt des c-Akt-Onkogens, benannt nach dem viralen Äquivalent des Retrovirus Akt18, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase-1
ALDH1A1	Aldehyd-Dehydrogenase-1A1
AS	Aminosäuren
BAAA	BODIPY-aminoacetaldehyd
BAA ⁻	BODIPY-aminoacetat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Rinderserumalbumin
BTSC	Brain Tumor Stem Cell, Hirntumorstammzelle
CSC	Cancer Stem Cell, Tumorstammzelle
DEAB	4-Diethylaminobenzaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	und andere
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBM	Glioblastoma multiforme
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HIF2 α	Hypoxia Inducible Factors-2 α
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
JAK	Januskinase

kDa	Kilodalton
LOH	Loss of heterogosity
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NSC	Neural Stem Cell, Neurale Stammzelle
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-gp	P-glykoprotein
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphat
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PTEN	Phosphatase mit Tensin-Homologie; auch MMAC1
Sox2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
Src	Tyrosinkinase Src, auch s-Src: Akronym aus cellular und sarcome
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TEP1	TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase
TGF α	Transforming Growth Factor α
TIC	Tumor-initiating cell, Tumor-initiierende Zelle
TMZ	Temozolomid
TSC	Tumor Stem Cell, Tumorstammzelle
WHO	World Health Organization

2 Einleitung

2.1 Problemstellung

Gliome astrozytären, oligodendrogialen und ependymalen Ursprungs machen etwa 28 Prozent aller Hirntumore beim Menschen aus und repräsentieren dabei 80 Prozent der malignen Hirntumore (Ostrom et al., 2014). Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist mit fast 50 Prozent der am häufigsten vorkommende maligne Tumor des menschlichen Gehirns (Ostrom et al., 2014) und zudem der bösartigste zentralnervöse Tumor des Menschen (Ohgaki & Kleihues, 2005a; Ostrom et al., 2014). Seine Inzidenz liegt in Europa und Nordamerika bei zwischen drei bis vier Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner (Ohgaki et al., 2004; Ostrom et al., 2014). Kennzeichnend für das Glioblastoma multiforme (GBM) sind seine ausgeprägte Therapieresistenz und die hohe Rezidivneigung. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten liegt in klinischen Studien bei etwa 14 Monaten (Stupp et al. 2005). Obwohl das Glioblastom von zahlreichen Forschungsgruppen intensiv wissenschaftlich untersucht wird und in den vergangenen Jahren die Therapie deutlich verbessert wurde, ist die Prognose immer noch sehr schlecht. Verantwortlich dafür scheint eine kleine Subpopulation von Tumorzellen zu sein, so genannte „Brain Tumor Stem Cells“ (BTSC). Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Pluripotenz und weisen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie auf (Reya et al., 2001). Daher sind sie aktuell ein vielversprechendes Ziel neuer therapeutischer Ansätze.

Um neue Behandlungsmethoden zu entwickeln, die die BTSCs adressieren, ist es von großer Bedeutung, diese Subpopulation von Zellen innerhalb des Tumors eindeutig identifizieren zu können. Weiterhin ist es erforderlich, die molekularen Mechanismen der Stammzellfunktion besser zu verstehen. Neben einer Vielzahl anderer Signalwege wurde der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg als essentieller Regulator in BTSC identifiziert (Hambardzumyan et al., 2008; Bleau et al., 2009; Chen et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bedeutung des Mutationsstatus der Phosphatase mit Tensin-Homologie (PTEN), einem wesentlichen Gegenspieler der PI3K in etablierten und primären Glioblastomzellen, für die Ausbildung des BTSC-Phänotyps untersucht. Dabei wurden die Ergebnisse insbesondere mit dem Aldehyd-Dehydrogenase-1A1 (ALDH1A1)-Status in Korrelation gebracht, einem kürzlich von unserem Labor identifizierten Biomarker für BTSC.

2.2 Glioblastoma multiforme

Bereits 1926 erarbeiteten Bailey und Cushing die erste systematische Klassifikation der Gliome, und der Begriff des Glioblastoms, basierend auf der Vorstellung, dass diese Tumore aus primitiven glialen Vorläuferzellen entstehen, wurde geprägt. Noch heute dient diese Klassifikation als Grundlage für die derzeit gültige World Health Organization (WHO)-Klassifikation der Astrozytome, in der die Tumore hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens wie Wachstum, Infiltration in gesundes Nachbargewebe sowie Proliferation eingeteilt werden. Die Beurteilung des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes (Grading) liefert bereits wichtige Informationen bezüglich der klinischen Prognose, da der Grad der Abweichung vom normalen Gewebe mit der Aggressivität des Tumors übereinstimmt. Das GBM wird als Grad IV eingestuft. Dieser Tumor zeichnet sich durch eine hohe Zellproliferation aus, eine frühzeitige diffuse Infiltration einzelner Gliomzellen in das gesunde umgebende Hirngewebe und durch eine hohe Strahlen- und Chemoresistenz aus (Louis et al., 2007).

Tabelle 1: Klassifikation der astrozytären Tumore nach WHO Kriterien (modifiziert nach Louis et al., 2007)

WHO-Grad	Tumor Art
Grad I WHO	Pilozytisches Astrozytom
	Subependymales Riesenzell-Astrozytom
Grad II WHO	Diffuse Astrozytome
	Pleomorphes Astrozytom
	Pilomyxoides Astrozytom (Variante: pilozytisches Astrozytom)
Grad III WHO	Anaplastisches Astrozytom
Grad IV WHO	Glioblastom
	Riesenzellglioblastom (Variante: Glioblastom)
	Gliosarkom (Variante: Glioblastom)

Glioblastome werden in primäre, de novo, und in sekundäre GBMs eingeteilt, die sich aus den WHO Grad II oder III Astrozytomen entwickeln (Ohgaki & Kleihues, 2011). Primäre GBM präsentieren sich bei der Diagnosestellung als solide Tumore, die innerhalb kürzester Zeit entstehen. Von der Feststellung erster Symptome bis hin zur histologischen Sicherung dieser Tumore vergehen im Durchschnitt sechs Monate (Ohgaki et al. 2004). Die Inzidenz steigt mit dem Alter, wobei die höchste Rate in der Gruppe zwischen 75 und 84 Jahren zu finden ist (Ostrom et al., 2014). Das Alter stellt dabei den größten Risikofaktor dar und ist ein signifikanter, prognostischer Faktor für ein geringeres Überleben (Ostrom et al., 2014; Ohgaki & Kleihues, 2005a)

Sekundäre GBM entwickeln sich aus niedrig gradigen diffusen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen im Sinne einer Tumorprogression. Dabei beträgt die mittlere Zeit von der Entwicklung aus den Vorstufen bis hin zum Glioblastom zwischen zwei und fünf Jahren. Die Patienten sind jünger und haben eine insgesamt bessere Diagnose. Histologisch sind primäre und sekundäre GBM nicht voneinander zu unterscheiden. Neuere Studien zeigen jedoch, dass uns die genetischen Eigenschaften der Tumorzellen bei dieser Unterscheidung Hinweise geben können (Ohgaki & Kleihues, 2011).

Neu gefundene molekulare Veränderungen machen es aktuell möglich, in den nach histologischen Eigenschaften eingeteilten Tumorentitäten der WHO Klassifikation klinisch relevante Untergruppen zu identifizieren. 2014 wurden die „Haarlem Consensus Richtlinien“ als ein Vorschlag dafür erarbeitet, wie man die histologische Einteilung in Zukunft mit den neu gewonnen molekularen Daten erweitern und in die zukünftige WHO-Klassifikation einarbeiten kann (Louis et al., 2014). Die Unterteilung führt dabei zu einer präziseren Tumorklassifikation mit besserem Einschätzen des Therapieerfolges sowie der individuellen Prognose für den einzelnen Patienten (Capper & Reifenberger, 2015). Hierbei gehören der Nachweis von Mutationen in den Genen der Isozitraddehydrogenase 1 (IDH1) und 2 (IDH2), „alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked“ (ATRX), Histon H3.3 (H3F3A), „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B“ (BRAF) sowie der Nachweis von Kodeletionen der Chromosomenarme 1p und 19q zu den wichtigsten molekularen Testungen mit differentialdiagnostischer Relevanz für die betroffenen Patienten (Capper & Reifenberger, 2015). Vor allem der Nachweis von Mutationen in der IDH hat entscheidende Bedeutung in der Diagnostik des GBM.

Tabelle 2: Häufige genetische Veränderungen bei Gliomen (modifiziert nach Capper & Reifenberger, 2015)

Typische genetische Veränderungen	Tumorentität	WHO-Grad
Keine IDH1- Mutation	Glioblastome	Grad IV
IDH1-Mutation - mit 1p/19q-Kodelektion	Anaplastische Oligodendrogliome Oligodendrogliome	Grad III Grad II
- ohne 1p/19q- Kodelektion - mit ATRX-Mutation	Diffuse Astrozytome	Grad II
Häufig B-RAF-Mutation	Pilozytische Astrozytome	Grad I
Häufig Histon H3.3 K27 M Mutationen	Pädiatrische hoch-maligne Gliome	

2.3 Genetische Profile

In Studien zur Unterscheidung der zwei molekularen Subtypen traten die sekundären GBM nur in fünf Prozent aller Fälle auf, die Mehrzahl der Fälle bildeten mit 95 Prozent die de novo Tumore (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki & Kleihues, 2011). Auch wurde in den vergangenen Jahren gezeigt, dass diese zwei unterschiedlichen Typen von GBM mit ihrem für sie charakteristischen Krankheitsverlauf nicht nur bei Patienten unterschiedlichen Alters auftauchen, sondern dass sie auch, wie bereits oben beschrieben, unterschiedliche molekulare Profile (Ohgaki et al., 2004, Ohgaki & Kleihues 2005b) und unterschiedliche Level von Proteinexpression aufweisen (Furuta et al., 2004). Kleihues und Ohgaki (1999) zeigten außerdem, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen genetischer Veränderung innerhalb der Tumore und klinischer Ausprägung gibt: Genetische Veränderungen spielen bei der malignen Entartung der astrozytären Zellen eine entscheidende Rolle.

Die häufigste genetische Aberration, die beide klinische Subtypen in gleichem Maße betrifft, ist ein Verlust der gesamten Heterozygotität des Chromosom 10 (LOH 10) (Bigner et al., 1988; James et al., 1988). Mutationen im TP53-Tumorsuppressorgen sind sehr selten in primären

GBMs nachweisbar, zeigen jedoch eine hohe Inzidenz in Sekundären (von Deimling et al., 1993).

Häufige genetische Veränderungen in primären GBM stellt die Amplifikation des „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR)-Genes dar. Der EGFR ist ein 170-kDa transmembran gelegener Rezeptor, welcher nach Ligandenbindung (EGF, TGF α , Amphiregulin, Epiregulin) durch Dimerisierung autophosphoryliert wird. Durch die Bindung weiterer Effektormoleküle an den Phosphatresten kommt es zur nachfolgenden Aktivierung verschiedener Signalwege. Unter anderem auch des Akt- und MAPK-Signalweges, der an der Regulation der Zellproliferation, -adhesion, -migration und auch an der Apoptose der Zelle beteiligt ist (Jorissen et al., 2003).

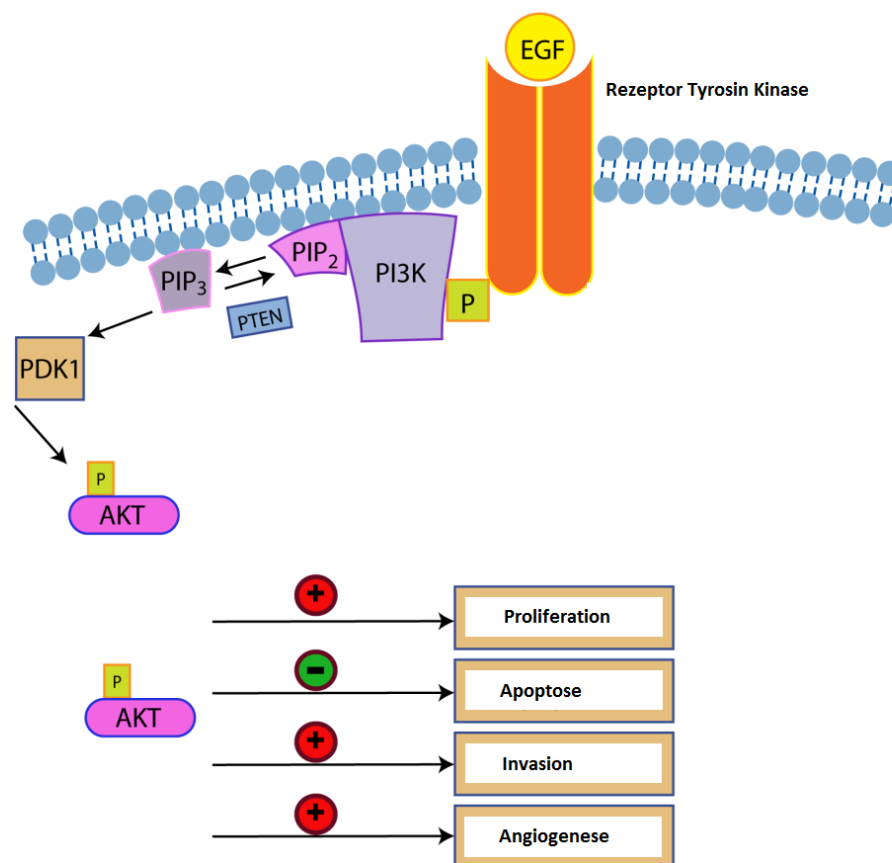


Abbildung 1: EGFR abhängige Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges (modifiziert nach Siegelin & Siegelin, 2011)

Mutationen der Isocitrat Dehydrogenase (IDH) 1 und 2 können in bis zu 90 Prozent der Fälle in Astrozytomen und Oligodendrogliomen, eingeteilt nach WHO-Grade II und III, und in sekundären GBMs gefunden werden, wobei IDH1 Mutationen vor allem bei jüngeren Patienten auftreten und mit einem signifikant besseren Outcome korrelieren (Yan et al., 2009; Nobusawa et al., 2009; Korshunov et al. 2015). Sturm et al (2012) lieferten in ihren Studien Beweise für eine Subklassifizierung anhand genetischer Fingerprints, insbesondere der IDH 1. GBM sind zwar nicht durch histologische Merkmale untereinander zu unterscheiden, jedoch lassen Korrelationen zwischen Mutationsstatus der IDH 1 und klinische Eckdaten wie Patientenalter und Tumorlokalisation eine Subklassifizierung der GBM zu (Sturm et al., 2012). Es hat sich gezeigt, dass der klinische Verlauf von Glioma-Patienten mit Mutationen der IDH im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp IDH und Tumoren der gleichen histologische Einteilung sehr viel günstiger ist (Parsons et al., 2008; Weller et al., 2009, Wick et al., 2009). Von erheblicher Bedeutung jedoch ist die Erkenntnis, dass die Mehrzahl der histologisch eingeteilten niedrig malignen Gliome sowie häufig auch die anaplastischen Gliome ohne IDH Mutation in molekularer und klinischer Betrachtung dem Glioblastom gleichen (Brat et al., 2015). Sie zeigen die typischen chromosomalen Veränderungen wie beispielsweise den oben beschriebenen Verlust des Chromosom 10 oder die Amplifikation des EGF-Rezeptors; zudem treten IDH-intakte anaplastische Gliome ebenso wie GBMs bei älteren Patienten auf und haben eine ähnlich ungünstige Prognose (Hartmann et al., 2010; Reuss et al., 2015). Mutationen der IDH werden als ein initiales genetisches Ereignis in der Entstehung der diffusen Gliome gesehen (Juratli et al., 2012). Die genetischen Veränderungen der IDH1 betreffen fast ausschließlich das Codon 132, wobei es in über 90 Prozent der Fälle zu einem Austausch von Arginin zu Histidin (R132H) kommt. Mutationen der IDH2 betreffen das Codon 172 oder 140 (Yang et al., 2012a; Capper & Reifenberger, 2015). IDH Mutationen können somit in der Diagnostik hilfreiche Zusatzinformationen für die Abgrenzung diffuser Gliome zu anderen Hirntumoren liefern – die alle keine Mutationen der IDH aufweisen - und darüber hinaus haben sie eine hohe prognostische Bedeutung.

Über die scheinbare Exklusivität von Mutationen in dem PTEN-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 10q23.3 in de novo Glioblastomen schrieben bereits Steck et al. im Jahr 1997 (Steck et al., 1997). Auch Rasheed et al. (1997) konnten im selben Jahr in ihrer Arbeit nachweisen, dass genetische Aberrationen des PTEN-Gens ausschließlich in den „high-grade“, und nicht in „low-grade“ Tumoren erwachsener Glioma-Patienten zu finden sind. Auch Duerr

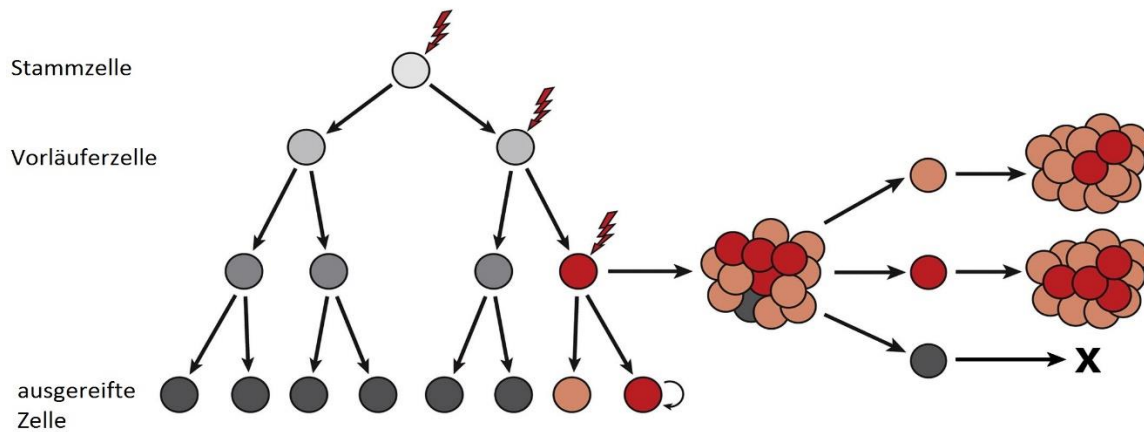
et al. (1998) sowie Tohma et al. (1998) bestätigten mit ihren Forschungsergebnissen diese Beobachtungen zum großen Teil. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnten bis heute in weiteren Studien der Zusammenhang zwischen dem PTEN Gen Funktionsverlust und der schlechten Prognose in GBMs gezeigt werden (Smith et al., 2001; Huse et al., 2009; Yang et al., 2010).

2.4 Tumorstammzell-Hypothese und Krebsstammzellen

Neben dem traditionell etablierten Modell der Klonalen Evolution und der Annahme, dass Tumore aus einer Reihe verschiedener somatischer Mutationen der Zellen entstehen, wurde die sogenannte Tumorstammzell-Hypothese (englisch: Cancer Stem Cell Hypothesis) aufgestellt. Da die ursprüngliche Hypothese davon ausgeht, dass die Zelle mit den meisten erworbenen Mutationen sich als die aggressivste Zelle durchsetzt, so zur Tumorprogression führt und durch ihre erworbenen Mutationen für die Tumor-Heterogenität verantwortlich ist, war bisher das Ziel der Krebstherapie, möglichst alle Tumorzellen zu vernichten. Die Tumorstammzell (TSZ)-Hypothese besagt jedoch, dass nicht alle Zellen innerhalb eines Tumors für das Tumorwachstum verantwortlich sind, und die Therapie daher auf die Eradikation weniger Zellen ausgerichtet werden muss. Dieses Modell beinhaltet zudem, dass es innerhalb des Tumors eine hierarchische Ordnung gibt und die Tumorentstehung, die Progression und die Heterogenität durch eine kleine therapieresistente zelluläre Subpopulation bedingt ist, die stammzellähnliche Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung hat und Tochterzellen mit eingeschränktem Teilungsvermögen dazu befähigt, sich weiter differenzieren zu können (Bonavia et al., 2011).

Bisher ist unklar, ob die Hirntumorstammzellen von entarteten neuralen Stammzellen oder von glialen Vorläuferzellen abstammen, die wieder die Fähigkeit zur Proliferation und zur pluripotenten Differenzierung, unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, erlangt haben.

Modell der Klonalen Evolution



Modell der Tumorstammzell-Hypothese

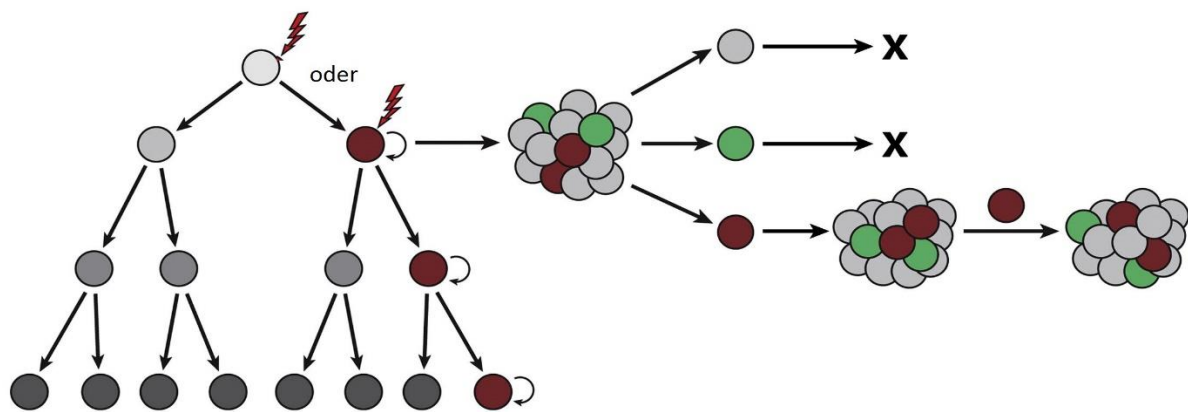


Abbildung 2: Traditionelles Modell der Klonalen Evolution und Modell der Tumorstammzell-Hypothese (modifiziert nach Visvader & Lindeman 2012)

Das Modell der Klonalen Evolution führt die Tumorentstehung auf eine Reihe von Mutationen zurück, die vereinzelt Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen. In der Abbildung hat die rote Zelle verschiedene Mutationen erworben und bildet nun einen dominanten Klon. Tumorzellen, die von diesem Klon abstammen (orange und rot), haben ähnliche tumorfördernde Eigenschaften. Andere Abkömmlinge (graue Zelle) haben diese Fähigkeit verloren. Die Tumorheterogenität resultiert aus der Zellvielfalt innerhalb des Tumors.

Das Tumorstammzell-Modell zeigt eine Vorläuferzelle (braun), die durch eine Mutation stammzellähnliche Eigenschaften erwirbt. Die Zelle kann Selbsterneuerung betreiben und ist in der Lage, das Wachstum weiterer Zellen zu fördern (grün, grau). Die Heterogenität basiert hierbei auf der Differenzierung der Tumorstammzellen. Dieses Modell basiert auf einer hierarchischen Organisation von Zellen innerhalb des Tumors, indem eine kleine Subpopulation die Fähigkeit zur Tumorprogression besitzt.

Stammzellen sind definiert als undifferenzierte somatische Zellen, die sich unendlich teilen können und die das Potential besitzen, Tochterzellen sowie auch weiter ausdifferenzierte, spezialisierte Zellen zu generieren. Die Tochterzellen besitzen dieselben Stammzeleigenschaften wie ihre Mutterzellen: Sie sind in der Lage, kontrollierte Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotente Differenzierung zu betreiben (Lobo et al., 2007). Selbsterneuerung, eines der entscheidenden Hauptmerkmale von Stammzellen, ist die Fähigkeit, mitotische Zellteilung zu durchlaufen und gleichzeitig in demselben undifferenzierten Zustand wie die ursprüngliche Mutterzelle zu bleiben (Weissman 2000).

Singh et al., (2003) waren die Ersten, die eine Tumorzelle innerhalb eines soliden Hirntumors identifizierten und isolierten, die Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Proliferation und die Fähigkeit zur Differenzierung in astrogliale und neuronale Tumorzellen besaß (Singh et al., 2003). Diese Zellen, die sie als BTSCs bezeichneten, repräsentierten dabei eine kleine Subpopulation der Gesamtzellpopulation des Tumors (Singh et al., 2003). Diese stammzellähnlichen Tumorzellen wurden durch die Expression des Oberflächenmarkers CD133 und durch ihre Fähigkeit, unter serumfreien Bedingungen Neurosphären zu bilden, identifiziert (Uchida et al., 2000). Neurosphären sind definiert als klonale nicht-adherente Kolonien, die von einer einzelnen neuralen Stammzelle abstammen (Singh et al., 2003). CD 133 wird auch heute noch am häufigsten für die Identifizierung von TSZ in Gliomen verwendet (Dimov et al., 2011; Kim et al., 2011). Krebsstammzellen oder tumorinitiierende Stammzellen, konnten bisher in vielen Tumorentitäten, darunter auch in glialen Tumoren, gefunden werden (Singh et al., 2003; Yuki et al., 2009). Insgesamt können TSZ durch fünf Hauptmerkmale charakterisiert werden: 1.) Fähigkeit zur Selbsterneuerung, 2.) Differenzierungspotential, 3.) hohes Tumor-initiiertes/-erzeugendes Potenzial, 4.) Chemoresistenz, 5.) Radioresistenz (Vescoci, Galli & Reynolds, 2006; Clevers, 2011; Yang et al., 2012b). Den Hirntumorstammzellen wird heute eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des GBM zugeordnet (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2004b). Sie werden für die Therapieresistenz der malignen GBMs (Bao et al., 2006; Liu et al., 2006) verantwortlich gemacht und daher als Ansatzpunkt neuer Therapien gehandelt.

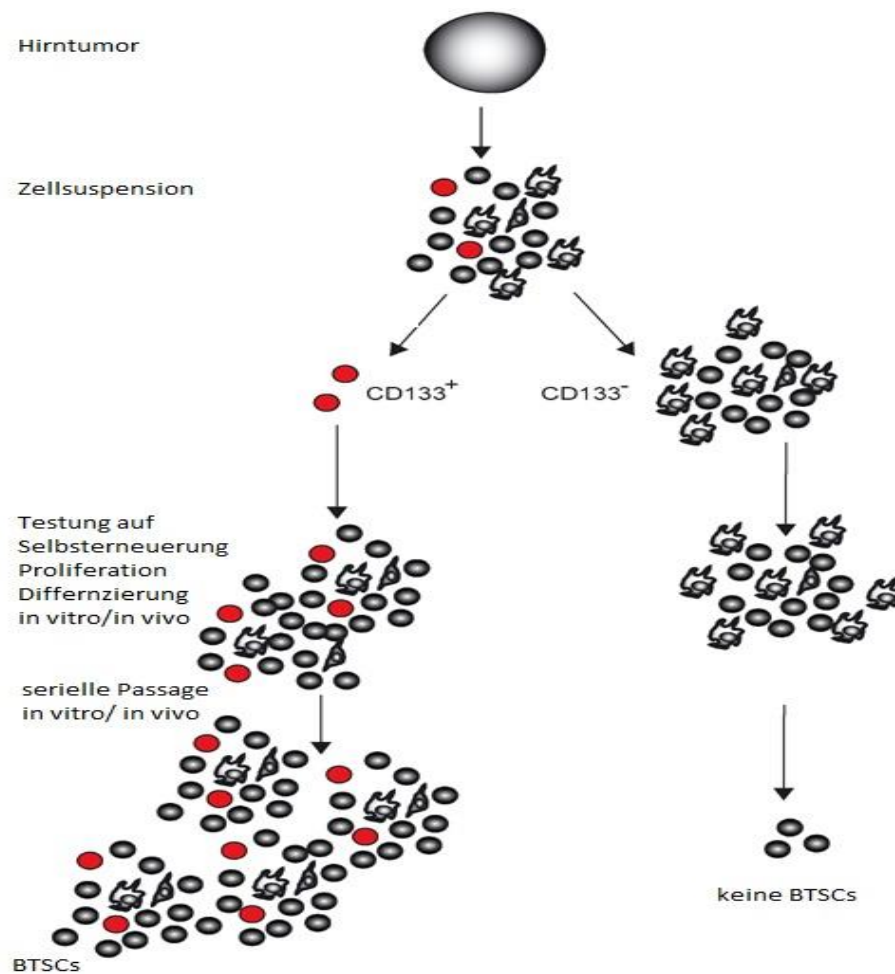


Abbildung 3: BTSCs sortiert anhand des Oberflächenmarkers CD133 (modifiziert nach Singh et al., 2004a)

Zellen, die den Oberflächenmarker CD133 exprimieren (BTSCs), sind exklusiv in der Lage, das Tumorstadium voranzutreiben, und zeichnen sich durch stammzellähnliche Eigenschaften aus. Zellen ohne CD133 sind nicht in der Lage, Tumorstadium zu fördern und Selbsterneuerung zu betreiben.

Aktuell erhofft man sich nun durch ein besseres Verständnis von Antigen Eigenschaften, ultrastrukturellen Merkmalen und (pathologischen) Signalwegen glialer Krebsstammzellen neue Erkenntnisse zu gewinnen, die als Ansätze in der Entwicklung von zielgerichteten Therapien von GBMs dienen können (Eramo et al., 2006; Kim et al., 2006, Yamamuro et al., 2015). Durch Untersuchungen und dem Vergleich der oben genannten Eigenschaften und Charakteristika wie Zellkern und Zellorganelle von aus Glioblastomen isolierten Stammzellähnlichen Zellen mit undifferenzierten neuronalen Stammzellen, wird versucht, Gemeinsamkeiten und Unterschiede von glialen TSZ und NSZ herauszufinden (Zhao et al., 2008; Yamamuro et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass es einige Beziehungen und Gemeinsamkeiten zu undifferenzierten neuronalen Stammzellen gibt, TSZ sich jedoch

grundsätzlich von undifferenzierten neuralen Stammzellen in den oben genannten Merkmalen unterscheiden.

2.5 Hirntumor Stammzellmarker

Um Subpopulationen, die sich innerhalb eines Tumors befinden, ausfindig machen zu können, benötigt man robuste Marker, mit denen sich diese Zellen identifizieren und isolieren lassen. Dabei ist es wichtig, dass diese Marker so spezifisch wie möglich für Krebsstammzellen sind und sich von physiologisch normalen Stammzellen unterscheiden. Die Suche nach geeigneten Markern, um Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften isolieren zu können, ist seit langem Gegenstand intensiver Forschung, und es wurden im Laufe der Zeit potenzielle Marker für BTSC wie beispielsweise Hoechst 33324, der Neurosphären-Assay, CD 133 und die ALDH1A1 gefunden.

2.5.1 Hoechst 33324

TSZ besitzen die Eigenschaft, zytotoxische Substanzen und Chemotherapeutika mit Hilfe bestimmter Carrierproteine aus der Zelle heraus zu schleusen. Sie exprimieren eine Efflux-Pumpe, ein P-Glykoprotein (P-gp), zugehörig einer großen Familie von Membranproteinen, der ABC-Transporter-Superfamilie, welches auch in praktisch allen hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden ist. Zellen mit einem hohen Level an P-gp weisen Charaktereigenschaften pluripotenter Stammzellen auf (Chaudhary & Roninson, 1991). Hoechst 33324 ist ein Vital-Farbstoff, mit dem man die in vitalen Zellen befindliche Desoxyribonukleinsäure (DNA) anfärben kann. Inkubiert man Zellen mit diesem fluoreszierenden Farbstoff, nehmen diese den Stoff auf und beginnen selbst zu fluoreszieren. Dass dabei unterschiedliche Zellen unterschiedlich stark fluoreszieren, hängt von der Expression des ABCG2-Transporters ab, ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, welches spezifisch für den Transport von Hoechst 33324 ist und ebenfalls die Fähigkeit wie das P-Glykoprotein besitzt, zytotoxische Substanzen aus Zellen heraus zu transportieren. Eine hohe Expression von ABCG2 lässt sich in den sogenannten Side-Populationen nachweisen (Scharenberg, Harkey & Torok-Storb, 2002). Diese Zellpopulationen, die nur wenig von dem Farbstoff enthalten, stellen sich in der Durchflusszytometrie im blauen und roten Wellenlängenbereich von Hoechst 3324 als eine Randgruppe dar, und werden daher als Side

Population bezeichnet. Für die oben erwähnte Durchflusszytometrie werden sogenannte FACS-Geräte (fluorescence-activated cell sorting) verwendet, die Fluoreszenzdetektoren besitzen, welche die Zellen je nach Farbe in verschiedene Reagenzgefäße sortieren.

Basierend auf der Tatsache, dass auch BTSC das oben erwähnte Carrierprotein zum Herausschleusen von Hoechst 33324 besitzt, kann nun mittels FACS Analyse die Auftrennung erfolgen und so der „Side Population Assay“ zur Identifizierung von „Side Populations“ in GBM-Zellen angewandt werden (Bleau et al., 2009).

2.5.2 Neurosphären

Eine weitere Eigenschaft von TSZ ist es, dass sie unter serumfreien Zellkulturbedingungen durch klonale Expansion freischwimmende Aggregate bilden. Dieses Merkmal von TSZ macht man sich heute zunutze, um auch Tumorzellen einer Zelllinie in vitro als Zellen mit begrenztem Teilungsvermögen identifizieren zu können oder sie als Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften zu charakterisieren. Das sogenannte Neurosphären Kultur System oder die Neurosphären Kultur Analyse wurde erstmals von Reynolds und Weiss (1992) zur Identifizierung von neuralen Stammzellen (NSZ) herangezogen und erlaubt eine retrospektive Beurteilung von Tumorzellen. Im Neurosphären-Assay bilden die Zellen, die Stammzeleigenschaften besitzen (NSZ), unter bestimmten Zellkulturbedingungen schwimmende Zellverbände, sogenannte Neurosphären, welche durch die klonale Vermehrung einer einzelnen NSZ gebildet werden. Voraussetzung für die Bildung von Neurosphären aus einer NSZ sind dabei serumfreie Zellkulturbedingungen und die Anwesenheit von Mitogenen wie EGF (Epidermal Growth Factor) und FGF (Fibroblast Growth Factor).

2.5.3 CD 133

CD 133 ist ein transmembranes Glykoprotein (Fargeas, Corbeil & Huttner, 2003) und ein etablierter Stammzellmarker für hämatopoetische Stammzellen (Yin et al., 1997) und neurale Vorläuferzellen (Kania et al., 2005). Zusammen mit Nestin, einem Intermediärfilamentprotein, das in undifferenzierten Zellen des zentralen Nervensystems gefunden wurde und einen charakteristischen neuralen Stammzellmarker darstellt (Lendahl, Zimmerman & McKay,

1990), ist CD 133 der bis heute wichtigste Marker für Zellen mit Stammzeleigenschaften. Mit Hilfe von FACS-Analysen (fluorescence-activated cell sorting), einer Art von Durchflusszytometrie, bei der Zellen anhand bestimmter Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt werden (siehe 2.5.1), isolierten Uchida et al. (2000) mit Hilfe eines CD133-Antikörpers, aus humanen fetalen Gehirnen eine Anzahl von CD 133+ Zellen. Diese CD133+ Zellen wiesen Stammzeleigenschaften auf und konnten sich in vitro in neuronale und makrogliale (oligodendrogliale und astrogliale) Zellen differenzieren, sowie Neurosphären bilden. Diese Ergebnisse untermauernd zeigten Singh et al. (2004b), dass nur die CD133+ Tumorfraction eines Hirntumors auch Zellen enthielt, die nach Injektion in NOD-SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficient)-Mäuse-Gehirne befähigt war, Tumorwachstum zu initiieren. Dabei zeigten die neu entstandenen Tumore dieselben morphologischen Eigenschaften wie die ursprünglichen Glioblastome und bildeten CD133+ sowie auch CD133- Zellen. Davon ausgehend, dass refraktäre Tumore durch die Resistenz der Tumorstammzellen gegenüber zytotoxischen Therapien bedingt sind, würde dies auch die Beobachtung erklären, dass CD133+ GBM-Stammzellen relativ resistent gegenüber zytotoxischen Wirkstoffen sind, wie sie in der Therapie maligner Gliome eingesetzt werden. Eine signifikante Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen wie Temozolamid, Carboplatin oder Paclitaxel (Liu et al., 2006) wie auch eine Strahlenresistenz der CD133-positiven Glioblastomzellen wurde bei verschiedenen Experimenten nachgewiesen (Bao et al., 2006). Zusammenfassend dient CD 133 somit nicht nur als etablierter Stammzellmarker neuraler Stammzellen, sondern es konnte gezeigt werden, dass CD133 in verschiedenen Krebsentitäten als Identifikator für Tumor initiiierende Zellen (TSZ) dient (Singh et al., 2003) und die CD133-Expression in Tumoren für ein geringeres Überleben sowie eine erhöhte Resistenzen gegenüber gängiger Therapien steht (Bao et al., 2006; Canis et al., 2012).

2.5.4 ALDH1A1

Die Aldehyd-Dehydrogenase1A1 (ALDH1A1), ist ein zytosolisches Enzym und eine von vielen Isoformen aus der Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen, deren allgemeine Aufgabe als sogenannte Oxidoreduktasen die Oxidation von Aldehyden darstellt. Neben der Oxidation intrazellulärer Aldehyde katalysiert ALDH1A1 auch die Umwandlung von Retinal zu Retinsäure (retinoic acid/RA) (Labrecque, Bhat & Lacroix, 1993), der unter anderem eine Aufgabe in der

Proliferation und Differenzierung von Zellen zugesprochen wird. Jones et al. (1995) entwickelten eine Methode zur Isolierung von Zellen in Abhängigkeit ihrer im Zytosol befindlichen ALDH-Menge mittels Durchflusszytometrie. Der sogenannte ALDH-Expressions-Assay beruht auf der Anfärbung einer Zellsuspension mit Aldefluor, welches ein Substrat für die ALDH darstellt. Die Umsetzung von Aldefluor resultiert in einer Fluoreszenzreaktion der zytosolisch gelegenen ALDH, bei dem das Substrat BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyd) durch ALDH in das fluoreszierende Produkt BAA⁻ (BODIPY-aminoacetat) umgewandelt wird. So können ALDH-positive Zellen mittels Durchflusszytometrie selektiert werden. Die Isoformen der ALDH spielen eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von Stammzellen in unterschiedlichen Geweben. ALDH1 gilt als Stammzellmarker in vielen malignen Tumoren. Ginestier et al. (2007) fanden auf ihrer Suche nach einer Unterscheidungs- und Identifizierungsmöglichkeit normaler und maligner Stammzellen bei Brustkrebs heraus, dass Zellen mit einer erhöhten ALDH1 Aktivität Stammzelleigenschaften aufwiesen und dass eine hohe ALDH1-Aktivität mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert war.

Mit Hilfe des Aldefluor Assays konnten Corti et al. (2006) primitive neurale Stammzellen aus murinen Neurosphären isolieren (Corti et al., 2006). Andere Forschungsgruppen konnten die Isoform ALDH1 als potenziellen Stammzellmarker in malignen soliden Tumoren wie Lungenkrebs (Jiang et al., 2009) oder dem kolorektalen Karzinom (Huang et al., 2009) ausfindig machen.

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation zwischen der Fähigkeit der malignen Gliomzellen, Neurosphären zu bilden, und deren ALDH1A1-Expressionslevel aufzeigen und schlägt ALDH1A1 als einen neuen Marker für die Identifikation von TSZ in GBM des Menschen vor. Da der oben erwähnte ALDH Expressions Assay nicht isoform spezifisch ist, wurde hierbei zur Quantifizierung der ALDH1A1 Expression ein Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch die Isoform ALDH1A1 bindet. Wir konnten zudem zeigen, dass eine Inhibition der Aldehyd-Dehydrogenase1A1 durch spezifische Inhibitoren wie Diethylaminobenzaldehyd und/oder Retinsäure zu einer signifikanten Abnahme der Neurosphären führt (Rasper et al., 2010) und die vermehrte Expression von ALDH1A1 mit einer erhöhten Therapieresistenz gegenüber dem gängigen Chemotherapeutikum Temozolamid sowie mit einer geringeren Prognose einhergeht (Schäfer et al., 2012).

2.6 PTEN – Ein Tumorsuppressorgen und primärer Inhibitor der Akt

Das PTEN Gen (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten) (Li et al., 1997b), auch bekannt unter dem Namen MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) (Steck et al., 1997) oder TEP1 (TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) (Li & Sun, 1997a), codiert für eine dual-spezifische Phosphatase (Lipid- und Proteinphosphatase), die ubiquitär im menschlichen Geweben exprimiert wird und der eine wichtige Tumorsuppressorfunktion zugesprochen wird. Akt, auch bezeichnet als RAC-PK (Protein kinase - Related to PKA and PKC) oder PKB (Protein Kinase B) ist eine Serin-/Threoninkinase, die eine bedeutende Komponente in dem anti-apoptotischen Signalweg von Zellen darstellt (Khwaja, 1999). Sie reguliert Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Zellüberleben und Zellinvasion.

Der Genabschnitt, der für das Enzym PTEN codiert, befindet sich auf dem langen Arm (q-Arm) des Chromosoms 10 (10q23.31). Das PTEN-Gen besteht aus neun Exons. Das dazugehörige Protein hat eine relative Molekülmasse von 55 kDa, besteht aus 403 Aminosäuren und ist als Monomer aufgebaut. In der Literatur stehen somatische Mutationen des PTEN-Gens und ein Verlust der gesamten Heterozygotie des Chromosoms im Zusammenhang mit einer Vielzahl verschiedenster Krebsarten: Prostata-Karzinome, Maligne Melanome, Mamma-Karzinome, Endometrium-Karzinome (Teng et al., 1997; Stemke-Hale et al., 2008; Carver et al., 2011, Aguisa & Li, 2012). Drei sehr seltene, autosomal dominant vererbte Krebs-Syndrome mit sich überlappenden klinischen Syndromen sind Folge von Keimbahnmutationen im PTEN-Gen: Cowden disease (Liaw et al., 1997), Bannayan-Zonana-Syndrom (Marsh et al., 1997) und Lhermitte-Duclos (Liaw et al., 1997). Im menschlichen Organismus fungiert PTEN als ein primärer Inhibitor der Akt. Dabei inhibiert PTEN als funktioneller Gegenspieler der PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) die PI3-Kinase-abhängige Aktivierung von Akt, indem es PIP₃ (Phosphoinositol-3) zu PIP₂ (Phosphoinositol-2) dephosphoryliert (Hopkin, 1998). Dies übernimmt die Phospholipid-Phosphatase des PTEN Enzyms, die spezifisch Phosphatreste von 3,4,5-Phosphaten an deren D3-Position abspaltet (Maehama & Dixon, 1998). Der PI3K/Akt Signalweg gilt als onkogenetischer Signalweg, da er maßgeblich an der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt ist, von PTEN negativ kontrolliert wird und ein Verlust von PTEN so zur unkontrollierten Aktivität dieses Signalweges führt (Georgescu, 2010).

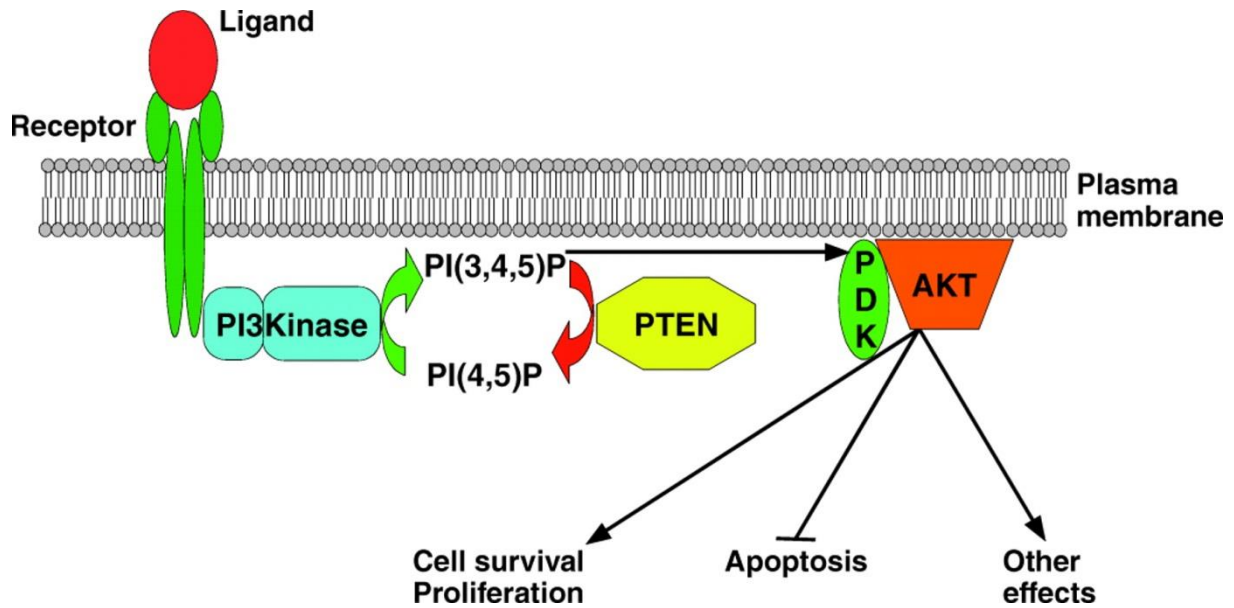


Abbildung 4: Die Rolle von PTEN (Planchon, Waite & Eng, 2008)

Während physiologisch die Aktivität von Akt in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren niedrig ist, führt ein PTEN-Funktionsverlust zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt über die PI3K-abhängige Phosphorylierung (Stambolic et al., 1998), was zu Tumorwachstum und Angiogenese führt. Auch konnte gezeigt werden, dass eine „Restauration“ von PTEN in PTEN-defizienten GBM-Zellen zu einer Abnahme des Zellwachstums führt (Furnari et al., 1997).

Somatische Mutationen des PTEN Gens wurden in einer Vielzahl von sporadisch auftretenden Tumoren gefunden, hauptsächlich jedoch neben Endometrium-Karzinomen in Glioblastomen (Bonneau and Longy 2000). In etwa 30 Prozent der unselektierten GBM unterliegt das PTEN Gen einer genetischen Aberration (Rasheed et al., 1997; Duerr et al., 1998, Tohma et al., 1998). Der Verlust von PTEN ist fast ausschließlich in de novo-GBM zu finden und selten in sekundären Glioblastomen, obwohl auch hier der PI3K/Akt Signalweg in mehr als 70 Prozent der Fälle anomal ist. Die aktuelle Studienlage liefert zudem direkte und deutliche Beweise dafür, dass PTEN Mutationen mit einer schlechten Prognose in Glioma-Patienten korrelieren. (Xiao et al., 2014).

2.6.1 Mutationen im PTEN-Gen

Bonneau et al. (2000) listeten in ihrem Artikel „Mutations of the Human PTEN Gene“ 332 in der Literatur beschriebene somatische Punktmutationen von PTEN auf, die in Tumorproben gefunden wurden. 110 wurden dabei in GBM entdeckt. Die Mehrzahl der somatischen PTEN

Mutationen (70 Prozent) bildeten Nonsense-, Frameshift- oder Splicing-Mutationen, die zu einer Verkürzung des Proteins führten. Dabei wurden etwa die Hälfte der 100 Missense Mutationen in dem Exon 5 gefunden, welches für das Core Motiv der Phosphatase codiert. In Glioblastomen wurde ein hoher Anteil der Mutationen im Exon 6 (27,6 Prozent) und wenige im Exon 7 (8,2 Prozent) und Exon 8 (12,7 Prozent) gefunden.

Neben den Glioblastoma-Gewebeproben wurden auch humane Glioma-Zelllinien auf genetische Veränderungen in den zellulären Signalwegen untersucht. Ishii et al. (1999) fanden bei 34 nach randomisierten Kriterien ausgewählten Zelllinien eine Veränderung des PTEN-Signalweges in 73,5 Prozent der Fälle. Häufige Co-Alterationen gab es in den Signalwegen, bei denen p53 und p16 involviert waren.

Tabelle 3: PTEN Mutationen etablierter Zelllinien (modifiziert nach Ishii et al., 1999)

Zelllinie	PTEN Status		Tumorinduktion (subkutan) bei immundefizienten Mäusen
	Codon	Mutation und Aminosäureveränderung	
LN 18	WT	-----	tumorigen
LN 229	WT	-----	tumorigen
T 98G	42	CTT(Leu)->CGT(Arg)	nicht tumorigen

2.6.2 PTEN Status als Identifizierungshilfe von BTSC

Auf der Suche nach weiteren geeigneten Stammzellmarkern untersuchten Chen et al. (2010) eine Serie von 29 neu diagnostizierter GBM, um bei diesen Tumoren charakteristische Merkmale von Zellen zu identifizieren, die unter neuralen Stammzellbedingungen in der Lage waren, Tumorwachstum zu initiieren. Untersucht wurden molekulare Eigenschaften wie beispielsweise der Prozentsatz an CD 133+ Zellen und an Side Populations, MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase)-Status, p53-Mutationen, p16-Deletionen, EGFR-Amplifikation und auch Patientenalter sowie -geschlecht. Dabei gab es im Vergleich dieser Merkmale bei den 16 Tumoren, die erfolgreich Neurosphären bildeten, mit den 13 Tumoren, die dazu nach mindestens 20 Passagen nicht in der Lage waren, keine Unterschiede. Alleine

der PTEN-Status der Zelllinien zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Neurosphärenwachstum.

Alle Neurosphärenlinien wurden von Tumoren abgeleitet, die einen Verlust eines PTEN-Alleles oder eine Mutation in einem der Allele oder in beiden Allelen des PTEN-Gens beinhalteten. Vor dem Hintergrund, dass es auch Berichte über CD 133-negative Zellen gibt, die stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen (Beier et al., 2007) und auch in ihren Versuchen die CD133-Expression nicht mit der Neurosphärenbildung korrelierte, suchten Chen et al. nach einer molekularen Determinante, die einige spezifische molekulare Subtypen von GBM dazu befähigt, unter neuralen Stammzellkultur-Bedingungen zu wachsen. Dabei fanden sie PTEN-Insuffizienz als eine mögliche Erklärung.

3 Fragestellung

Das Glioblastom ist ein hochmaligner Tumor mit einer ausgesprochen schlechten Prognose. Für die erhebliche Therapieresistenz wird eine kleine Subpopulation von Tumorzellen, sog. *Cancer Stem Cells* oder *Brain Tumor Stem Cells*, verantwortlich gemacht, die interessanterweise viele Eigenschaften nicht-neoplastischer Stammzellen aufweisen.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze steht diese Subpopulation im Interesse der aktuellen Forschung. Unter anderem konnte für den PI3K-Signalweg eine funktionelle Bedeutung bei der Regulation dieses zellulären Phänotyps nachgewiesen werden. Die PTEN-Phosphatase ist ein negativer Regulator der PI3K und ist häufig mutiert in Glioblastomen.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen dem PTEN-Mutationsstatus und der Ausprägung des BTSC-Phänotyps in Glioblastom-Zelllinien. Dazu wurde in etablierten GBM-Zelllinien und primären GBM der PTEN-Status auf DNA- und Proteinebene charakterisiert. Die Resultate wurden mit der Fähigkeit der Tumorzellen, Neurosphären zu bilden, als funktionelles BTSC-Assay verglichen und mit dem ALDH1A1-Status korreliert, der sich als robuster BTSC-Biomarker bewährt hat.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Die verwendeten Materialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Bei Firmensitz in der Bundesrepublik Deutschland ist nur der Ort angegeben. Die Chemikalien wurden – soweit unten nicht extra aufgeführt – von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, biomol GmbH, Hamburg, oder Sigma-Aldrich, Irvine, United Kingdom, bezogen. Die Plastikware wurde bei A .Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg, bestellt.

4.1.1 Chemikalien, Medien, Kits und Geräte

4.1.1.1 Zellkultur

Tabelle 4: Auflistung der eingesetzten Substanzen, Materialien sowie Geräte

Substanzen/Material/Geräte	Abkürzungen	Hersteller
Accutase		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DEMEM	applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, steril ohne Ca & Mg	DPBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum	FCS	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	L-Gln	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Minimum Essential Medium	MEM	applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	P/S	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturschale 100		TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte 6		TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Pipetten, Zellschaber, Zentrifugen Tubes		SARSTEDT AG & Co., Nürnberg
Sterikult 200 Inkubator: Heraeus cytoperm 2 incubator		Kendro and Heraeus Instruments, Hanau

4.1.1.2 Proteinextraktion und Westernblots

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Substanzen, Materialien sowie Geräte

Substanzen/Material/Geräte	Hersteller
Fuji Medical X-Ray Film	Fujifilm, Düsseldorf
Blottkammer: Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, Hercules, CA, USA
Blotting Papier	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories, GmbH, München
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore, Billerica, MA, USA
Immobilon Western	Millipore, Billerica, MA, USA
Photometer für Bradford-Assay: Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman, Fullerton, CA, USA
Protein-Gelelektrophoresekammer: Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad, Hercules, CA, USA
Röntgenfilm-Prozessor SRX-101a	Konica Minolta, Langenhagen
Spannungsquelle: Power Pac HC und Power Pac 300	BioRad, Hercules, CA, USA

4.1.1.3 PCR und Sequenzierung

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Substanzen, Materialien sowie Geräte

Substanzen/Material/Geräte	Abkürzungen	Hersteller
3130 Genetic Analyzer		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Big-Dye Terminator Kit		Qiagen GmbH, Hilden
GeneAmp® Deoxynukleotid Triphosphat	GeneAmp® dNTPs	applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dye Ex 2.0 Kit Spin		Qiagen GmbH, Hilden
Ethidium Bromide		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Genetic Analyzer Buffer (10x) w/EDTA		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Hexanucleotide Mix (10 x conc.)		Fermentas GmbH, St. Leon-Road

High deionized Formamide	Hi-Di™ Formamide	applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
PCR Tubes		Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Primer		Eurofin MWG Operon, Ebersberg
POP-7™		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
QIAquick PCR Purification Kit		Qiagen GmbH, Hilden
rTaq DNA Polymerase		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNeasy Mini Kit (50		Qiagen GmbH, Hilden
Super Script™ II Reverse Transcriptase		applied biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
WIDE Mini-SUB Cell GT		Bio-Rad Laboratories, GmbH, München

4.1.2 Humane GBM-Zelllinien

Die humanen GBM-Zelllinien LN18 (Ishii et al., 1999), G139 (Kraus et al., 1999) und LN229 (Ishii et al., 1999) wurden der Neuropathologie von Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz überlassen. Die Zellen der Linie T98G (Stein, 1979) wurden von Dr. Inge Tinhofer (Universitätskrankenhaus Charité Berlin) bereitgestellt. Die humane GBM-Zelllinie R28 wurde uns von Dr. Christoph Beier (Universitätskrankenhaus Aachen) zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Primäre Zelllinien

Die primären Zelllinien T16, T30, T39 und T40 wurden aus frisch resezierten GBM mit Zustimmung der Patienten des Universitätsklinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München gewonnen.

4.1.4 Antikörper

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Akt Rabbit pAb	1:5000/1:10000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
Anti-Mouse IgG HRP-linked pAb	1:10000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
Anti-Rabbit IgG HRP-linked pAb	1:10000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
GAPDH (clone GAPDH-71.1) Mouse mAb	1:50000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
PTEN Rabbit pAb	1:5000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-Akt (Ser473) Rabbit pAb	1:1000	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) Rabbit pAb	1:2500	Cell Signaling Technologie Inc., Danvers, MA, USA

4.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Herstellungsprotokolle/Endkonzentrationen von Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Herstellung/Endkonzentration
Agarose-Gel 2%	4g Agarose + 100ml 1x TBE-Puffer, 4µl Ethidiumbromid
Anodenpuffer I	0,3 M Tris, 20% Methanol, ad 500ml aq.bi.dest
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% Methanol, ad 500ml aq.bi.dest
Blocking Puffer	1xTTBS, 5% Magermilchpulver
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20% Methanol, 40 mM amino-n-caprioic-acid, ad 500ml aq.bi.dest
PBS Puffer	138 mM NaCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH7,4

PCR-Puffer/MgCl ₂ -Puffer (15mM)	20 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,3), 100 ml 1 M KCl, 200mg Gelatine, 80 ml H ₂ O; 750 µl 1 M MgCl ₂ dazupipettieren
Running Gel 10%	2,66 ml Acrylamid/Bisacrylamide 30%/0,8%, 2 ml 1 M Tris-Cl (pH 8,8), 3,32 ml aq.bi.dest., 50 µl 20% SDS, 50 µl 10 % APS, 25 µl TEMED
RLN-Puffer (1x)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0,5 % Nonidit P-40 (1,06 g/ml
SDS Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycine, 1% SDS; ad 500ml aq.bi.dest
SDS Sample Puffer (5x)	312,5 mM TrisCl (pH 6,8), 10% SDS, 50% Glycerol, 250 mM DTT, 0,05% Bromphenol-Blue; ad 10 ml aq.bi.dest
Stacking Gel 5 %	836 µl Acrylamid/Bisacrylamide 30%/0,8%, 626 µl 1 M Tris-Cl (pH 6.8), 3.5 ml aqua bidest., 50µl 20% SDS, 50µl 10% APS, 20µl TEMED
Stripping solution	80% aqua dest, 10 % Methanol, 10 % acetic acid
TBS (10x)	24,2g Tris, 80g NaCl, pH 7.6 mit Essigsäure; ad 1000 ml aq.bi.dest (pH 7,6)
TTBS	100 ml TBS (10x), 10 ml 10% Tween ad 1000 ml aq.bi.dest
Zell Lyse Puffer (10x)	20 mM Tris-Cl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM Na ₂ -EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM Natrium Phyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Natriumvanadat, 1µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die humanen Zelllinien LN18 und LN229 wurden als Monolayer-Kulturen in 10 cm Petrischalen in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % FCS (fetales Kälberserum), 2 mM Glutamin sowie 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Die T98G Zellen wurden in Minimum Essential Medium (MEM) mit 15% FCS sowie

Glutamin und Antibiotika gehalten. Die Zelllinie R28 wurde in serumfreiem DMEM mit 2 % B27, 20 ng/ml LIF, 20 ng/ml FGF und 50 ng/ml EGF kultiviert.

Die Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 92 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dabei wurden diese mit Hilfe von Accutase (3 ml, 2 min Inkubation) vom Boden der Zellschalen durch wiederholtes auf- und abpipettieren mechanisch gelöst und im Verhältnis 1:3 oder 1:5, je nach Zelltyp, auf frische Petrischalen ausgesät und mit 10 ml frischem Medium versorgt. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

4.2.2 Proteinextraktion

Zur Proteinisolierung wurden nach Absaugung des Mediums die am Boden der Petrischalen haftenden Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gespült. Danach folgte die Zugabe von 1x Zell Lyse Puffer (Cell Signaling Technologies) direkt auf die Zellen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Zelldebris abzentrifugiert (10.000 UpM, 4°C, 15 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Bradford-Assay

Zur Messung der Proteinkonzentration im Überstand wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) angewandt. Dazu wurde zunächst für die Kalibrationskurve eine Reihe von Standardlösungen aus 0,01% Triton X-100, Bradford Reagenz (1:4 Verdünnung in 1x PBS) und BSA (Rinderserumalbumin) in steigenden Konzentrationen hergestellt und deren Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Photometers gemessen. Die Herstellung der Probenlösungen erfolgte durch Zugabe von 2 µl des jeweiligen Überstandes zu 200 µl Triton, 198 µl PBS und 600 µl 1:4 verdünntem Bradford-Reagenz. Dann folgte die Messung der Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert ohne Probenmaterial. Da sich nun bei richtig gewählter Längenwelle die Absorption proportional zu der in der Probe vorhandenen Proteinkonzentration verhält (Bradford 1976), ist es möglich, mit Hilfe der Absorption des bekannten Standards die Konzentrationen aus den gemessenen Absorptionswerten zu berechnen.

4.2.4 SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurden zuvor 10 µg Gesamtprotein in fünffach konzentriertem SDS Sample Puffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Abzentrifugieren der Proben wurden diese dann auf ein 10-%iges denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel, zusammen mit einem Proteinstandard, geladen. Danach erfolgte die Elektrophorese bei 120 V für circa 90 min, jedoch mindestens so lange, bis die Bromphenolbande aus dem Running Gel herausgelaufen war. Für diese vertikale Auftrennung der Proteine wurde das Mini-PROTEAN Tetra System von BioRad verwendet.

4.2.5 Westernblot

Als Nächstes wurden die Proteine von den SDS-Gelen nach der Semy-Dry Methode auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Dabei werden die Gele zwischen Whatman-Paper, die zuvor mit spezifischen Puffern durchtränkt wurden, geschichtet. Durch das Anlegen einer Spannung wandern schließlich die Proteine auf die Nitrocellulosemembranen. Die Schichten wurden wie folgt von unten nach oben angeordnet:

5 Whatman-Membranen in Anode 1 – Puffer

2 Whatman-Membranen in Anode 2 – Puffer

2 Whatman-Membranen in Anode 2 – Puffer

SDS-Gel

7 Whatman-Membranen in Kathoden – Puffer

Geblottet wurde in der Semi-Dry Transfer Cell Blottkammer bei 225 mA für 90 Minuten. Nach dem Protein-Transfer wurden die Nitrocellulose-Membranen für 1 h im Blocking Puffer geblockt, dann einmalig mit TTBS gespült und im Anschluss über Nacht mit dem primären Antikörper (p-Akt, PTEN) bei 4 °C inkubiert

Anschließend wurden die Membranen 3 x 7 min mit TTBS gewaschen und 1 h mit dem sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (Anti-Rabbit IgG) bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundäre Antikörperbindung dient zum Nachweis der spezifischen Bindung des primären Antikörpers an die Epitope des gesuchten Antigens.

Durch eine Chemilumineszenz-Reaktion entsteht ein fluoreszierender Farbstoff und die Visualisierung dieser Reaktion kann nun durch die Exposition von Röntgenfilmen erfolgen. Alle Westernblotanalysen wurden mindestens dreimal wiederholt.

4.2.6 Ladekontrolle

Zur Kontrolle, ob alle Gel-Taschen mit gleicher Proteinmenge beladen wurden, wurden die Membranen mit p-Akt als primärem Antikörper für 30 min in der Stripping Lösung geschwenkt, danach 5 min in TTBS gewaschen und anschließend für 1 h in Magermilchlösung geblockt. Die Membranen mit PTEN Antikörper wurden für 1,5 h in TTBS gewaschen. Anschließend wurden die PTEN Membranen über Nacht bei 4 °C mit GAPDH (1:50000) inkubiert, die p-Akt Membranen mit einem Akt Antikörper (1:5000) unter gleichen Bedingungen. Als Nächstes wurden die Membranen wieder 3 x 7 min in TTBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 60 min mit dem Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit IgG (1:10000) und Anti-Mouse IgG (1:10000) inkubiert. Anschließend wurde mit den Membranen zur Detektion der Fluoreszenzreaktion, wie bei dem Westernblot oben beschrieben, weiterverfahren.

4.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR wurden definierte DNS-Abschnitte amplifiziert. Folgende Reaktionszyklen wurden dazu in einem Thermocycler mehrere Male wiederholt, um am Ende der Kettenreaktion eine exponentielle Vermehrung des DNS-Abschnittes zu gewährleisten:

Tabelle 8: Reaktionszyklen der Polymerase-Ketten-Reaktion

Schritt	Temperatur in [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	94	30 s	40
Primer Annealing	Primer spezifisch	30 s	
Elongation	72	30 s	
Elongation	72	7 min	1
Abkühlen	4	∞	1

4.2.7.1 RNA-Isolation

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 3 ml Accutase und kurzer Inkubation im Brutschrank gelöst und anschließend nach Zugabe von 1 ml DEMEM Medium in 15 ml Falcons pipettiert. Danach wurden die Falcons mit den gelösten Zellen bei 700 rcf für 3 min bei 19 °C zentrifugiert, der Überstand aus Medium und Accutase abgesaugt und das Pellet einmal mit PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Absaugen des zuvor zugeführten PBS wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltes PBS aufgenommen, dort gelöst und in 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert.

Die anschließende RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit, und die Arbeitsschritte wurden Schritt für Schritt dem beiliegendem Protokoll folgend durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Life Science UV/Vis Spectrophotometer gemessen. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C.

4.2.7.2 Reverse Transkriptase Reaktion

Um für die im Anschluss folgende PCR ein geeignetes Template zu bekommen, musste nun die im vorherigen Schritt isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies gelang mit der Super Script™ II Reverse Transcriptase, einer DNA Transcriptase, die zu einer Einzelstrang RNA das komplementäre DNA Stück synthetisieren kann. Gemäß Protokoll wurden dabei 1 µl eines Hexanucleotide Mixes, 1 µg RNA, 1 µl dNTP Mix und 12 µl steriles Wasser in ein Nuklease-freies Tube pipettiert und dieser Ansatz wurde bei 65 °C für 5 min erhitzt und nach abgelaufener Zeit auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden dann 4 µl des 5x First-Strand-Puffer und 2 µl 0.1 M DTT dem Ansatz hinzugefügt und dieser für 2 min bei 25 °C inkubiert. Im letzten Schritt wurde schließlich 1 µl der Super Script™ RT durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren beigefügt, und die anschließende Reaktion konnte bei 25 °C für 10 min, danach bei 42 °C für 50 min ablaufen. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 70 °C für 15 min wurde am Ende die Reaktion gestoppt und die neu synthetisierte cDNA konnte als Template eingesetzt werden.

4.2.7.3 PCR

Die für die PCR benötigten Primer wurden selbst designed:

Tabelle 9: Primersequenz, Annealing Temperatur und Primer-Produktgröße

Transkript	Typ	Sequenz (5'→3')	Annealing Temperatur	Produktgröße
PTEN Exon 6	vorwärts	TAAAGGCACAAGAGGCCCTA	55 °C	231
	rückwärts	TCACCTTTAGCTGGCAGACC	55 °C	
PTEN Exon 7	vorwärts	CGGAACTTGCAATCCTCAGT	55 °C	170
	rückwärts	GCATCTTGTTCTGTTTGTGGAA	55 °C	
PTEN Exon 8 Teil 1	vorwärts	TTCCACAAACAGAACAAGATGC	55 °C	158
	rückwärts	TCTGCACGCTCTATACTGCAA	55 °C	
PTEN Exon 8 Teil 2	vorwärts	GCGTGCAGATAATGACAAGG	55 °C	160
	rückwärts	GCTAGCCTCTGGATTTGACG	55 °C	
PTEN Exon 8 mut	vorwärts	CAGGACCAGAGGAAACCTCA	57 °C	239
	rückwärts	GCTAGCCTCTGGATTTGACG	57 °C	

Um die Polymerase-Ketten-Reaktion starten zu können wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt. Dieser enthielt:

Tabelle 10: Reaktionsansatz PCR

PCR Mix	
H₂O, steril	15.25µl
PCR Puffer	2.5µl
dNTP's	4µl
Vorwärtsprimer	0.5µl
Rückwärtsprimer	0.5µl
Taq Polymerase	0.25µl
cDNA	2.0µl

Nach dem Ablauf der in 4.2.7 beschriebenen Reaktionszyklen und der Kontrolle des PCR-Produktes, wurde dieses dann mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Aufreinigung diente zum Entfernen von Primer-, Polymerase- und dNTP-Resten. Die

erforderlichen Schritte erfolgten gemäß dem nachfolgend beschriebenen Protokoll: Im Verhältnis von 5xVolumen zu 1xVolumen wurde der mitgelieferte PB Puffer zu dem PCR Produkt gegeben und dann das Gemisch auf die im Kit enthaltenen Säulen pipettiert, bei 13000 UpM für 50 s zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Als nächstes wurden 750µl Waschpuffer PE auf die Säulen pipettiert, für 50 s zentrifugiert, der Durchlauf erneut entsorgt und die Säulen für 60 s trocken zentrifugiert. Danach wurden die Säulen mit dem PCR-Produkt auf neue Tubes (1,5 ml) aufgesteckt, mit 40 µl EB Puffer bedeckt und nach 60 s Ruhe erneut 60 s zentrifugiert.

4.2.7.4 Cycle Sequenzierung

Ähnlich dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion werden bei der Cycle Methode anhand eines Matrizenstranges (PCR-Produkt) in einer enzymatisch ablaufenden Reaktion in mehreren zyklischen Reaktionsschritten komplementäre DNA-Fragmente erzeugt. Anders als bei der Standard-PCR werden dem Reaktionsansatz geringe Mengen ddNTP's aller 4 Basen zugeführt. Da den ddNTP's die Funktion der OH-Gruppe an der 3'-Position fehlt, können dort von der Polymerase keine weiteren Nukleotide angehängt werden. Dies führt zu einem Abbruch der DNA-Synthese. Die so entstandenen Kettenabbruchprodukte werden durch eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Durch die Verknüpfung der ddNTP's mit nukleotidspezifischen Farbstoffen kann im Anschluss bei der automatisierten Sequenzierung, da die DNA-Stücke mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden, durch einen Detektor die DNA-Basensequenz ermittelt werden. Diese Methode beruht auf einer Modifizierung des Sanger-Verfahrens (Sanger, Nicklen et al. 1977).

Tabelle 11: Reaktionsansatz Cycle PCR

Cycle PCR Mix	
H₂O, steril	10.75µl
Premix	3µl
Big Dye Puffer	2µl
Primer	0.25µl
PCR Produkt	4µl

Tabelle 12: Ablauf und Einstellungen der Cycle-PCR

Schritt	Temperatur in [°C]	Dauer	Zyklen
Aufheizen	96	60 s	
Denaturierung	96	10 s	25
Primer Annealing	Primer spezifisch	30 s	
Elongation	60	240 s	

Eine erneute Aufreinigung zur Entfernung überschüssiger Reaktionsprodukte erfolgte mit Dye Ex 2.0 Kit Spin von Qiagen: Nach kurzer Zentrifugation der PCR Proben und Vortexen der im Kit enthaltenen Spin-Tubes wurde der Deckel der Tubes etwas gelockert und die Enden der Gefäße, wie im Protokoll erläutert, abgebrochen. Danach wurden die Spin Tubes in 2 ml Einsätze (im Kit enthalten) gestellt und 3 min bei 2700 UpM zentrifugiert. Als nächsten Schritt setzte man die Spin-Tubes in neue Eppendorf-Tubes um, und pipettierte nun die aufzureinigenden PCR-Produkte in die Mitte des in den Spin Tubes befindlichen Gels. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 2700 UpM konnte nun das aufgereinigte Produkt in den Eppendorf-Gefäßen zur weiteren Verwendung herangezogen werden.

4.2.8 Sequenzierung

Als Vorarbeit mussten 5 µl Proben in einer 96-Well-Platte mit jeweils 15 µl Formamid gemischt werden. Das Gerät 3130 Genetic Analyzer besitzt vier Kapillare, so dass vier Proben auf einmal sequenziert werden können. Ein Lauf dauert im Durchschnitt 50 min, bei dem pro Kapillare 10 µl POP-7 als Gel für die Elektrophorese dienen. Als Puffer dient der 10x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA. Das Chromatogramm kann am Ende des Laufes ausgedruckt werden. Um eine optimale Auswertung zu gewährleisten, wurden alle DNA-Basensequenzen manuell-visuell nachkontrolliert.

5 Ergebnisse

5.1 PTEN- und Phospho-PTEN-Expression der etablierten Zell- und der Primärlinien

Zur Bestimmung des PTEN-Status der einzelnen Zelllinien wurde mithilfe der in 4.2.5 beschriebenen Methode des Westernblots die PTEN-Proteinexpression der einzelnen Zelllinien bestimmt. Dafür wurden die Proteine der glialen Zelllinien wie unter 4.2.2 erklärt extrahiert, die Proteinkonzentration mittels der unter 4.2.3 beschriebenen Bradford-Methode gemessen und nach ihrer Größe mittels SDS-PAGE (siehe 4.2.4) aufgetrennt. Das Ergebnis des Westernblotes nach spezifischer Antikörperbindung wurde durch eine Fluoreszenzreaktion sichtbar gemacht, wobei – falls das PTEN Protein vorhanden ist – eine Bande nach Auftrennung bei 55 kDa sichtbar sein sollte. Dies entspricht der Größe des PTEN-Proteins.

5.1.1 PTEN-Protein-Expression

Vier der untersuchten neun Glioblastomzelllinien, LN18, LN229, T98G und T16, zeigten eine deutlich ausgeprägte immunreaktive Bande bei der erwarteten Proteingröße von 55 kDa. Die Zelllinie T30 zeigte im Vergleich eine deutlich schwächere Ausprägung bis gar keine Bande auf. Bei den Zelllinien G139, T39, T40 sowie R28 zeigte sich auch nach dreimaliger Westernblotanalyse keine spezifische Bande (siehe Abbildung 5).

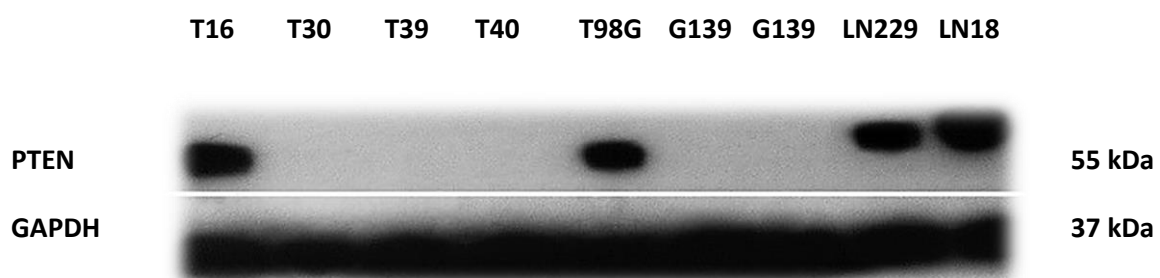


Abbildung 5: PTEN-Protein-Expression der Zelllinien T16, T30, T39, T40, T98G, G139 (zweimal aufgetragen) LN229, LN18; PTEN: immunreaktive Bande bei 55 kDa; positive Ladekontrolle mit GAPDH bei 37 kDa

5.1.2 Phospho-PTEN-Protein-Expression

Das phosphorylierte PTEN-Protein gilt als stabile, jedoch inaktive Form des PTEN (Ross and Gericke 2009) (Vazquez, Ramaswamy et al. 2000). Ein überdurchschnittlich großer Anteil an

phosphoryliertem PTEN würde daher einen Mangel oder Fehlen des Enzyms bedeuten und zu einer Aktivierung von Akt führen. Um dies bei der nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse mit einbeziehen zu können, wurde der phospho-PTEN-Status (p-PTEN) der Zelllinien bestimmt. Dabei wiesen die Zelllinien LN18, LN229 und T98G phosphorylierte PTEN-Proteine auf.

5.2 PTEN-Mutationsstatus

Zur Untersuchung der Zelllinien auf eventuell vorhandene DNA-Veränderungen wurden die Exons 5, 6, 7 und 8 des PTEN-Gens untersucht. Diese Exons entsprechen den Hot-Spot-Regionen, das heißt den Genabschnitten, in denen in der bisherigen Literatur die meisten Mutationen gefunden wurden und die für eine höhere Mutationsrate bei der Rekombination, unter anderem strukturbedingt prädispositioniert sind. Die Zelllinien, die im Westernblot keine PTEN-Protein-Expression aufwiesen, mussten aufgrund ihrer bereits damit bewiesenen PTEN-Insuffizienz nicht in die folgenden Untersuchungen mitaufgenommen werden. Dies galt für die Zelllinien G139, T39, T40 und R28. Eine PTEN-Protein-Expression wiesen, wie bereits unter 5.1.1 beschrieben, die Zellen der Linien LN 18, LN229, T98G, T16 und T30 auf.

Der Polymerasekettenreaktion wurden letztendlich die Zelllinien LN18, T16 und T30 unterzogen. Bei den humanen Glioblastomlinien T98G sowie LN 229 konnte der PTEN Mutationsstatus der gängigen Literatur entnommen werden (siehe unter Abschnitt 2.6.1). Durch die Aufschlüsselung der Basensequenzen der Exons der zu untersuchenden Zelllinien LN18, T16, T30 und dem Vergleich mit der aus der Literatur bekannten Wildtyp-Sequenz, konnte schließlich der Mutationsstatus bestimmt werden. Die Primersequenzen wurden selbstständig festgelegt. Alle Sequenzen wurden primär durch ein Sequenzierungsprogramm ermittelt und in einem zweiten Schritt nochmals manuell-visuell ausgelesen.

5.2.1 Etablierte Zelllinien

Die Zelllinie LN18 wurde bereits eingehend untersucht, und es ist bekannt, dass die Zellen die Wildtyp-Sequenz des PTEN-Gens aufweisen (Ishii et al., 1999). Die Sequenzanalyse der Zelllinie zeigte, so wie erwartet, keine Veränderung in der Basensequenz.

Die Zelllinie LN229 beherbergt ebenso wie die etablierte Glioblastomlinie LN18 Wildtyp-Allele des PTEN-Gens (Ishii et al., 1999). Es musste daher keine Mutationsanalyse durchgeführt werden.

5.2.2 Primäre Zelllinien

Die Zelllinie T16 zeigte bei der Westernblotanalyse eine immunreaktive Bande auf Höhe 55 kDa. Zur weiteren Untersuchung des Mutationsstatus wurde diese Primärlinie der Polymerase-Kettenreaktion unterzogen und anschließend sequenziert. Auch hier konnten erwartungsgemäß keine Veränderungen in der DNA-Sequenz der untersuchten Exons gefunden werden.

Die Primärlinie T30 wies bei den Western-Analysen im Vergleich eine deutlich schwächere Ausprägung der immunreaktiven Bande auf. Daher wurde die Zelllinie mit in die PCR- und Sequenzierungsanalysen aufgenommen. Bei der manuell-visuellen Auswertung der Analyse zeigten sich zwei Punktmutationen im Exon 8, an den Positionen 1995 und 2016. Da das Ergebnis für die Base 2016 aufgrund der randständigen Lage innerhalb der Primer nicht eindeutig war, wurden neue Primer designed (Primer 8 Mut), die exakt den Abschnitt mit den zwei vermuteten Mutationen umschlossen. Die Punktmutationen im Exon 8 befinden sich einmal auf dem Codon 321. Es zeigt sich hier eine Änderung der Basenabfolge von AAA zu GAA, was dazu führt, dass bei der Translation die Aminosäure Glutaminsäure anstelle von Lysin eingebaut wird. Die zweite Mutation befindet sich im Codon 328, mit der Veränderung von AAT zu GAT und dem Einbau von Asparaginsäure anstelle von Asparagin.

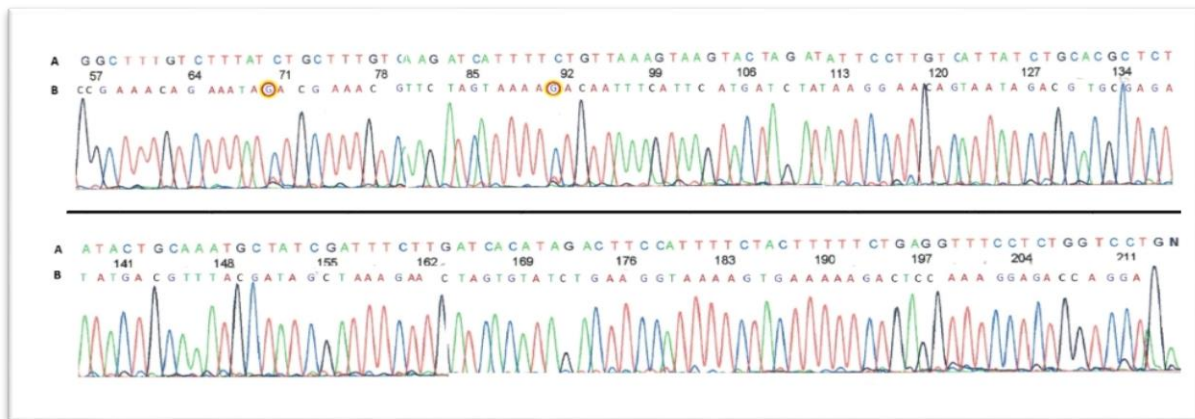


Abbildung 6: Mutationsanalyse: Gen: PTEN; Exon: 8; Sequenzierungsausschnitt Zelllinie T 30 / Primer Exon 8 Mut rückwärts mit detektierten Basenmutationen; A, Chromatogramm B, original DNA Sequenz; Legende: A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; Zeile B: 1. roter Kreis: Änderung der Basenabfolge durch Austausch von A zu G (Substitution)-> Einbau von Glutaminsäure anstelle Lysin; Zeile B: 2. roter Kreis: Änderung der Basenabfolge durch Austausch von A zu G (Substitution)-> Einbau von Asparaginsäure anstelle von Asparagin

5.3 ALDH1A1-Expression und Neurosphärenbildung

Zur Identifizierung von Zellen mit Stammzeleigenschaften wurden die Zelllinien auf die Expression der Aldehyd-Dehydrogenase-1A1 als möglicher neuer Stammzellmarker und auf die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung hin untersucht.

5.3.1 ALDH1A1-Protein-Expression

Die Bestimmung der ALDH1A1-Expression der humanen Glioblastomzelllinien wurde in unserer Neuropathologie-Arbeitsgruppe in Vorarbeit von Frau Dr. rer. nat. Andrea Schäfer geleistet. Dies geschah mittels Westernblot-Analyse. Eine hohe ALDH1A1-Expression konnte bei den aus frischem Tumorgewebe gewonnenen Zelllinien T30, T39 und T40 gefunden werden. Von den etablierten Zelllinien wiesen LN18, T98G sowie R28 ein stark ausgeprägtes ALDH1A1-Level auf. Die Linien LN229, G139 sowie T16 wiesen keine immunreaktive Bande bei der ALDH1A1-Westernblot-Analyse auf.

5.3.2 Neurosphärenbildung

Um die glialen Tumorzelllinien als Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften charakterisieren zu können, wurde untersucht, ob sie die Fähigkeit besitzen, Neurosphären zu bilden. Diese Analysen lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor. Die Daten stammen ebenfalls aus der eigenen Arbeitsgruppe, erhoben von Frau Dr. rer. nat. Andrea Schäfer. Die humanen Glioblastomzelllinien T30, T98G, T39, T40, R28 und LN18 formten nach zwölf Tagen Kultivierung in einem Neurobasalmedium, versetzt mit EGF und FGF, Neurosphären. Im Gegensatz dazu formten die Zellen der Linien LN229, T16 und G139 keine Neurosphären unter denselben Bedingungen.

Tabelle 13: Neurosphärenformation der Zelllinien LN18, LN229, G139, T98G, T16, T30, T39, T40, R28;
+ : Neurosphären, - : keine Neurosphären

Zelllinie	LN229	T16	T30	T98G	T39	T40	R28	LN18	G139
Neurosphären	-	-	+	+	+	+	+	+	-

5.3.3 Korrelation der Neurosphärenbildung und des ALDH1A1-Levels

Um einen Zusammenhang zwischen Neurosphärenbildung und dem ALDH1A1-Level der Zelllinien zu finden, wurde verglichen, ob die Zellen mit starker Expression der Aldehyddehydrogenase-1A1 auch dazu fähig waren, sich in Neurosphären zu formieren. Es zeigte sich hier, dass die Zelllinien T30, T98G, T39, T40, R28 und LN18 sowohl ALDH1A1 exprimierten als auch Neurosphären bildeten. Die Zellen der Linien LN229, T16 sowie G139 zeigten weder ALDH1A1-Expression noch eine Formation in Neurosphären.

Tabelle 14: Korrelation Neurosphärenformation und ALDH1A1-Expression
+ : Neurosphären, - : keine Neurosphären; + : ALDH1A1 Expression, - : keine ALDH1A1 Expression

Zelllinie	LN229	T16	T30	T98G	T39	T40	R28	LN18	G139
Neurosphären	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ALDH1A1	-	-	+	+	+	+	+	+	-

5.4 PTEN-Status in Korrelation mit Neurosphärenbildung und ALDH1A1-Expression

Zusammenfassend konnte eine Korrelation zwischen dem PTEN-Status, dem ALDH1A1-Level und der Neurosphären-Bildung gefunden werden. Die Zelllinien T98G, T30, T39, T40 und R28 die entweder ein mutiertes PTEN Gen beherbergten oder einen kompletten Verlust des Proteins aufwiesen, zeigten zugleich eine starke ALDH1A1 Expression und bildeten Neurosphären. Die Zelllinien LN229 und T16 mit dem Wildtyp-Gen und keiner ALDH1A1 Expression wuchsen auch nicht in Neurosphären. Eine Sonderposition nahmen die Zelllinien LN18 und G139 ein. LN18-Zellen beherbergen den Wildtyp von PTEN, zeigten jedoch hohe Level an ALDH1A1-Expression und formten Neurosphären. G139 zeigten weder eine PTEN- noch ALDH1A1-Expression oder Neurosphärenbildung.

Tabelle 15: PTEN-Status in Korrelation mit Neurosphärenbildung und ALDH1A1-Expression; PTEN Status + = PTEN Expression, PTEN Status - = keine PTEN Expression; PTEN Mutation: Wt = Wildtyp-Gen; mut¹ = T 30 mit 2 Punktmutationen: Exon 8, Codon 321 -> Änderung der Basensequenz von AAA -> GAA; dies führt zum Einbau der AS Glutaminsäure anstelle von Lysin; Exon 8, Codon 328 -> Änderung der Basensequenz von AAT -> GAT; dies führt zum Einbau der AS Asparaginsäure anstelle von Asparagin; mut² = T98G mit Punktmutation im Exon 2, Codon 24 -> Änderung der Basensequenz von CTT->CGT; dies führt zum Einbau der AS Arginin anstelle von Leucin; del = deletion; Neurosphären + =Neurosphären werden gebildet, Neurosphären - = keine Neurosphären werden gebildet; ALDH1A1 + = ALDH1A1 Expression, ALDH1A1 - = keine ALDH1A1 Expression; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin
gelb markiert/rote Schrift: Übereinstimmung PTEN Mutation, ALDH1A1-Level und Neurosphärenexpression

Zelllinie	PTEN Status	PTEN Mutation	Neurosphären	ALDH1A1
LN229	+	Wt	-	-
T16	+	Wt	-	-
T30	+	mut ¹	+	+
T98G	+	mut ²	+	+
T39	-	del	+	+
T40	-	del	+	+
R28	-	del	+	+
LN18	+	Wt	+	+
G139	-	del	-	-

6 Diskussion

Das GBM gilt als der bösartigste Hirntumor des Menschen. Vor allem primäre Glioblastome sind charakterisiert als sehr aggressive Tumore, die innerhalb kürzester Zeit nach Diagnosestellung zum Tode des Patienten führen. Das GBM ist gekennzeichnet durch eine große Therapieresistenz. Weder die chirurgische Behandlung noch Radio- und Chemotherapie führen bis heute zur Heilung der Patienten. Die Erforschung und Etablierung von neuen Therapiemöglichkeiten brachte bisher nur geringe Erfolge für das rezidivfreie Überleben der Patienten. Verantwortlich hierfür könnte eine kleine Subpopulation innerhalb der Tumore sein, die sich durch besondere Eigenschaften den bisher etablierten Therapien entzieht. Singh et al. (Singh et al., 2003) lieferten als Erste Hinweise für eine stammzellähnliche Subpopulation innerhalb von GBMs. Die gewonnenen Erkenntnisse über Hirntumorstammzellen bieten uns heute neue Grundlagen, um therapeutisch aktiv zu werden. Es ist daher von besonderem Interesse, spezielle Biomarker für die Identifikation dieser Zellen zu finden und die molekularen Mechanismen genauer zu erforschen. Rasheed et al. (1997) zeigten in ihrer Arbeit, dass Mutationen in dem PTEN-Tumorsuppressorgen ausschließlich in „high-grade“-Tumoren zu finden sind. PTEN fungiert als ein primärer Inhibitor der Akt im menschlichen Organismus und ist so an der Regulierung der Zellproliferation, dem Zellüberleben, der Zellinvasion und der Apoptose beteiligt. Mutationen im PTEN Gen führen zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt, zum Tumorwachstum und zur Angiogenese.

Die Exklusivität von PTEN-Mutationen in de novo GBM in Verbindung mit der infausten Prognose dieser glialen Tumore, bedingt durch die Therapieresistenz, legt die Vermutung nahe, dass es eine Verbindung zwischen PTEN-Funktionsverlust und der Bildung der Hirntumorstammzell-Subpopulation gibt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des PTEN-Mutationsstatus in Glioblastomzellen für die Ausbildung des BTSC-Phänotyps in Korrelation mit der ALDH1A1 Expression, einem Protein, das für Therapieresistenz und stammzellähnliche Eigenschaften von TSZ steht, zu untersuchen.

6.1 PTEN Status korreliert mit Neurosphärenbildung und mit ALDH1A1-Expression

Mutationen des PTEN-Tumorsuppressorgens und Veränderungen in dem EGFR/PTEN/PI3K/Akt-Signalweg stehen im Zusammenhang mit einer Vielzahl verschiedenster Krebsarten. Chen et al. (2010) fanden in ihrer Arbeit Mutationen des PTEN-Gens oder PTEN-Insuffizienz als mögliche molekulare Determinante, die Subtypen von GBM dazu befähigt, unter neuronalen Stammzellkultur-Bedingungen zu wachsen (Chen et al., 2010). Sie zeigten, dass exklusiv der PTEN Status mit der Fähigkeit der Zellen zur Neurosphärenbildung korreliert (Chen et al., 2010). Dabei gilt der Neurosphären-Assay als etablierte Methode, um Zellen mit Selbsterneuerungspotenzial und stammzellähnlichen Eigenschaften zu charakterisieren. Bei unseren Untersuchungen zum PTEN-Status in etablierten und primären Glioblastomzellen konnten auch wir eine Korrelation zwischen Mutationsstatus und Neurosphärenbildung aufweisen. Es zeigte sich, dass von sechs Zelllinien mit fehlender PTEN-Proteinexpression oder mutiertem PTEN-Status fünf in der Lage waren, Neurosphären zu bilden. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Vermutung, dass der PTEN-Status einen Einfluss auf die Ausbildung des Phänotyps von Hirntumorstammzellen haben könnte. Ausgehend davon, dass die schlechte Prognose der GBM-Patienten, die Therapieresistenz und die hohen Rezidivraten bedingt sind durch Zell-Subpopulationen, die Stammzeleigenschaften aufweisen, könnte der EGFR/PTEN/PI3k/Akt-Signalweg als Ziel neuer Therapien dienen. Als ein neuer Marker für GBM-Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften wird das zytosolische Enzym ALDH1A1 gehandelt. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen Neurosphärenbildung und ALDH1A1-Expressions-Level aufweisen. Nur ALDH1A1-positive Zellen waren in der Lage, unter neuronalen Stammzellkulturbedingungen Neurosphären zu generieren. (Rasper et al., 2010). ALDH1A1 scheint eine große Rolle bezüglich der Resistenz von GBM gegenüber der gängigen Therapie zu spielen. Unsere Daten zeigen, dass ALDH1A1 ein neuer Indikator für Chemoresistenz in GBM zu sein scheint und eine Inhibition von ALDH1A1 zur Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolomid in GBM-Zellen führt (Schäfer et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zum einen alle Zellen, die unter neuronalen Stammzellbedingungen in Neurosphären wuchsen, ein hohes Level an ALDH1A1 aufwiesen, und weiter, dass sechs Zelllinien von sieben mit mutiertem PTEN-Gen oder fehlendem PTEN-Protein mit einer hohen ALDH1A1-Protein-Expression korrelierten.

6.2 ALDH1A1-Expression bei Hirntumorstammzell-Subpopulation in GBM

Aldehyd-Dehydrogenasen werden seit geraumer Zeit als potenzielle Marker von Tumorstammzellen gehandelt. Mithilfe des Aldefluor-Assay, bei dem das Substrat BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyd) durch ALDH in das fluoreszierende Produkt BAA⁻ (BODIPY-aminoacetat) umgewandelt wird, können ALDH-positive Zellen durch Durchflusszytometrie selektiert werden. Dabei kann man unterschiedliche Aktivitätslevel der verschiedenen Isoformen in verschiedenen Tumorgeweben finden. Einige Isoformen wie beispielsweise ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH18A1 spielen eine bedeutende Rolle im Retinsäure-Zellzyklus, in welchem sie durch Oxidation von Retinal zur Retinsäure-Produktion beitragen (Marcato, Dean et al. 2011). Insbesondere diese Funktion ist mit den Stammzeleigenschaften von CSC gekoppelt (Ginestier et al., 2009). Auch die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Medikamenten kann mitunter durch die ALDH Aktivität innerhalb der Subpopulationen erklärt werden. Von hämatopoetischen Stammzellen weiß man, dass vor allem ALDH1A1 für die Metabolisierung und Neutralisierung von beispielsweise Cyclophosphamid mitverantwortlich ist (Magni et al., 1996).

Neuere Studien fechten die Rolle des bisher bekanntesten und wichtigsten Markers, CD 133, für TSZ an, da gezeigt wurde, dass auch CD 133 negative Zellen Stammzeleigenschaften aufwiesen (Beier et al., 2007) (Chen et al., 2010). Corti et al. demonstrierten in ihrer Arbeit die Isolierung von neuronalen Stammzellen aufgrund deren ALDH1-Aktivität. Diese Zellen wiesen Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung auf und waren in der Lage, Neurosphären zu generieren (Corti et al., 2006). Ein Jahr später isolierten Ginestier et al. (2007) Zellen mit tumorigenen Eigenschaften sowie mit Selbsterneuerungspotenzial aus Brustkrebszellen anhand deren positiver ALDH1-Expressionslevel.

Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ALDH1A1-Expressionslevel in Glioblastomzellen und deren Neurosphärenbildung besteht. ALDH1A1 spielt eine bedeutende Rolle in der Expansion und der Erhaltung eines undifferenzierten stammzellähnlichen Phänotyps in malignen GBM. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Stilllegen des für die ALDH1A1 zuständigen Genabschnittes mittels Transduktion von small-hairpin-RNA zur Änderung der Neurosphärenbildung führt. Die Inhibition von ALDH1A1 mit DEAB führte zu einer Abnahme der Neurosphären in Größe und Anzahl (Rasper et al., 2010). Unsere Arbeitsgruppe zeigte auch, dass ALDH1A1 ein neuer

Mediator von Resistenz gegenüber TMZ (Temozolomid), einem oralen Alkylanz, das zur Standardtherapie von neu diagnostizierten GBM gehört, ist (Schäfer et al., 2012). Hohe Level an ALDH1A1 vor allem in MGMT-positiven Zellen, waren mit TMZ-Resistenz in vitro assoziiert. MGMT gehört zu den DNA-Reparaturproteinen und antagonisiert die Wirkung von TMZ. Hegi et al. (2005) zeigten, dass Patienten mit einem epigenetisch stillgelegten MGMT-Promotor (MGMT negativ) ein verbessertes medianes Gesamtüberleben aufwiesen (Hegi et al., 2005). Umgekehrt konnte durch die Inhibition von ALDH1A1 durch DEAB die Sensitivität der Zellen gegenüber TMZ wiederhergestellt werden (Schäfer et al., 2012).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen dafür, dass die intrazelluläre ALDH-Aktivität als universeller TSZ-Marker herangezogen werden kann. Vor allem ALDH1A1 korrelierte in verschiedenen soliden Tumoren mit einem schlechteren klinischen Outcome und scheint, wie bereits oben beschrieben, einen Einfluss bei der Ausbildung eines stammzellähnlichen Phänotyps bei malignen Hirntumoren zu haben.

6.3 Neurosphären-Assay als funktionelle Methode, um BTSC zu charakterisieren

Reynolds und Weiss beschrieben im Jahr 1992 in ihrer Arbeit das Wachstum von neuronalen Stammzellen in Neurosphären unter serumfreien Zellkultur-Bedingungen und unter der Verwendung von EGF und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Reynolds and Weiss 1992). Tumorstammzellen anhand ihrer Expressionsmuster zu identifizieren, stellt eine große Herausforderung dar. Auch wenn die Cancer Stem Cells mit den „normalen“ Stammzellen viele Gemeinsamkeiten wie Marker-Expression oder Selbsterneuerungs-Potenzial teilen, weisen Glioblastome von Natur aus ein abweichendes Zellverhalten ebenso wie besondere Genprofile innerhalb ihrer heterogenen Subpopulationen auf (Heddleston et al., 2011). Die Expression von Markern ist dabei nicht nur innerhalb des Tumors eines einzelnen GBM Patienten sehr heterogen, sondern variiert auch stark zwischen den Patienten und den Stadien der Erkrankung. Dies macht es schwierig, CSC anhand allgemeiner normaler Stammzellmarker-Expression zu identifizieren. Der Neurosphären-Assay gilt als funktionelle Methode, um retrospektiv Hirntumorstammzellen aufgrund ihrer Stammzeleigenschaften zu identifizieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung bilden einzelne CSC nach serieller Passage dreidimensionale Zellverbände, so genannte Neurosphären. Studien über den Zusammenhang zwischen der Formation von Neurosphären, kanzerogenen Eigenschaften und

Patienten-Outcome zeigten eine Verbindung zwischen Neurosphärenbildung und Tumorausbreitung in Xenotransplantat Modellen sowie klinischem Outcome (Laks et al., 2009). Auch wenn es im Hinblick auf die Anwendung des Neurosphären-Assay Einschränkungen (Wan et al., 2010) oder Bedenken bezüglich der intrinsischen Signaländerungen aufgrund der Expansion der Zellen und damit einhergehenden Veränderungen von Diffusion, Sauerstoffgehalt und metabolischen Faktoren gibt, sprechen die bisherigen Daten für die Anwendung des Assays als geeignete Methode zur funktionellen Identifizierung von Hirntumorstammzellen. Obwohl über den Mechanismus der ALDH1A1-induzierten Neurosphärenbildung bisher wenig bekannt ist, lassen die Daten, die in unserer Arbeitsgruppe erarbeitet wurden, uns davon ausgehen, dass die ALDH1A1-Expression und die Aktivierung von Akt durch einen PTEN-Funktionsverlust oder durch abweichende EGFR-Signalwege eine bedeutende Rolle für das Neurosphären-Wachstum spielen. Der PTEN/PI3K/Akt-Signalweg scheint dabei von besonderer Bedeutung zu sein und die Ergebnisse lassen vermuten, dass ALDH1A1 ein nachgeschaltetes Ziel dieses Signalweges ist (Schäfer, 2012).

6.4 Die Rolle PTENs in der Tumorstammzell-Hypothese

Wie bereits weiter oben beschrieben, konnten wir in unserer Arbeit zum PTEN-Mutationsstatus und zu dessen Bedeutung für die Ausbildung eines BTSC-Phänotyps Hinweise dafür finden, dass Mutationen des PTEN-Gens mit der ALDH1A1-Expression korrelieren und zur Formation der Zellen in Neurosphären führen. Bis auf die Zelllinien G139 zeigten alle untersuchten Glioblastomlinien mit mutiertem PTEN-Gen oder fehlendem PTEN-Protein hohe ALDH1A1-Level und wuchsen in Neurosphären. Die Zellen der G139-Linie hingegen exprimierten weder PTEN noch ALDH1A1 oder zeigten eine Neurosphärenformation. Chen et al. (2010) zeigten, dass exklusiv der PTEN-Status mit der Neurosphärenbildung korreliert (Chen, Nishimura et al. 2010), und verschiedene weitere Arbeiten zeigten, dass eine Insuffizienz in dem EGFR/PTEN/PI3K/Akt-Signalweg zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt führt und so zur Erhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps. Die Ergebnisse bezüglich der G139-Zellen lassen vermuten, dass der Ausfall der PTEN-Tumorsuppressorfunktion durch andere Signalwege oder Mechanismen innerhalb der Zelle kompensiert wird. Obwohl kein PTEN-Protein vorhanden ist, zeigen die Zellen keine Stammzeleigenschaften. In der gängigen

Literatur wird unter diesem Gesichtspunkt der Einfluss von STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) auf das Zellüberleben, die Zellinvasion, Angiogenese sowie Immunsuppression und Evasion diskutiert. Im Jahr 2008 beschrieben de la Iglesia und Kollegen einen PTEN-abhängigen Signalweg, der über den Transkriptionsfaktor STAT3 zur Tumorsuppression in Hirntumoren führt (de la Iglesia et al., 2008). „Signal transducer and activator of transcription“ (STAT)-Proteine sind eine Familie von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, die durch Tyrosinkinase, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (z.B. EGFR), oder zytoplasmatische Enzyme, wie die der JAK (Januskinase) und Src-Kinase-Familien, aktiviert werden (Kim et al., 2014). Eine persistierende STAT3-Aktivierung aufgrund von intrinsischer Hyperaktivität, anomalen vorausgehenden Signalwegen oder ineffizienter Negativregulation kann zur Tumorgenese und zum nicht vorhergesehenen Überleben der Zellen (Buettner, Mora & Jove, 2002) und über verschiedene Mechanismen zur Förderung von Zellproliferation und Überleben, verstärkter Immunsuppression, Angiogenese und Invasion der Zellen (Kim et al., 2014) führen.

Neuere Studien zur Regulation und Pathogenese von GBM jedoch weisen darauf hin, dass STAT3 eine duale Rolle einnimmt und je nach Mutationsprofil des Tumors als pro-onkogenetische Determinante oder als Tumorsuppressor fungiert und STAT3-Aktivierung die maligne Transformation von glialen Zellen verhindern kann (de la Iglesia, Puram & Bonni, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivierung von STAT3 in GBM mit fehlerhaften PTEN zur Suppression eines invasiven Phänotyps führte, und de la Iglesia und Kollegen schlossen daraus, dass eine Aktivierung von STAT3 in PTEN-defizienten GBM Tumordinvasion und Tumorstadium verhindern könnte (de la Iglesia et al., 2008). Ein Einfluss des Transkriptionsfaktors STAT3 wäre eine mögliche Erklärung für das Verhalten der G139-Zellen. Hierbei wäre es sicher nötig, die tumorsuppressive Rolle von STAT3, basierend auf dem genetischen Hintergrund, in zukünftigen Studien genauer zu erforschen und die bisherigen In-Vitro-Ergebnisse in Zelllinien-Experimenten auf Modelle zu übertragen, bei denen eine Relevanz für die klinische Pathogenese von GBM gesichert werden kann.

Eine weitere Erklärung könnte uns die Arbeit von Hopkins et al. (2013) mit der Entdeckung einer neuen PTEN-Variante liefern, die durch alternative Translation entsteht (Hopkins et al., 2013). PTEN-Long ist eine membrangängige Lipidphosphatase, die von Zellen sezerniert wird und die wiederum von anderen Zellen aufgenommen werden kann. Dabei reguliert PTEN-Long, ebenso wie PTEN, negativ den PI3/Akt-Signalweg und führt in vitro sowie auch in vivo zur Apoptose. Es wäre denkbar, dass PTEN-Long als ein sezerniertes Produkt eines Tumorsuppressorgens, das sich zudem in andere Zellen einschleusen kann, in Zellen mit fehlender PTEN-Expression deren tumorsuppressive Funktion übernimmt. Sicherlich wäre es interessant, in weiteren Untersuchungen den Einfluss dieser PTEN-Variante auf den BTSC-Phänotyp zu untersuchen und den Zusammenhang zwischen ALDH1A1-Expression sowie Neurosphärenbildung näher zu betrachten. Im Gegensatz zu den G139-Zellen, die trotz fehlender PTEN-Protein-Expression keine Neurosphären bildeten und keine erhöhte ALDH1A1-Aktivität aufwiesen, wuchsen die Zellen der LN18-Linie in Neurosphären und zeigten eine hohe ALDH1A1-Expression, obwohl sie das Wildtyp-PTEN-Gen haben (Ishii et al., 1999). Diese Tatsache widersprach zu Beginn unserer Theorie, dass Mutationen im PTEN-Gen mit der Folge einer fehlenden negativen Downregulation zur Ausbildung von TSZ führen. Jedoch konnten wir zeigen, dass LN18-Zellen ein hohes Level an p-PTEN aufweisen. Eine Phosphorylierung des C-Terminus des PTEN-Proteins führt zu einer geschlossenen Formation und so zu einer inaktiven Phosphatase-Domäne (Ross & Gericke 2009). Die Phospholipid-Phosphatase des PTEN-Enzyms übernimmt die Aufgabe der Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2, was somit die PI3-Kinase-abhängige Aktivierung von Akt verhindert (Hopkin, 1998). Eine erhöhte Phosphorylierung würde so einer Inaktivierung von PTEN entsprechen, was in diesem Zusammenhang mit unseren Ergebnissen im Einklang steht und unsere Theorie des Zusammenhangs eines PTEN-Verlusts und der Ausbildung von Hirntumorstammzellen unterstützt. Außer dem Einfluss von PTEN gibt es zudem noch viele weitere Determinanten, die mit der Stammzelltheorie in malignen Hirntumoren in Verbindung gebracht werden. Wie bereits oben beschrieben spielt beispielsweise STAT3 eine wichtige Rolle in der Gliomagenese. Durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel einer „Gain of function“-Mutation, kann es zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 kommen, oder auch durch anomale Regulation in einer der vielen involvierten onkogenetischen Signalwege via Wachstumsfaktoren-Rezeptoren wie EGFR oder Interleukin-6-Rezeptoren, JAK, Abl-Familien-Kinasen und Kinasen der Src-Familie, an denen STAT3 scheinbar beteiligt ist (Kim et al., 2014).

Andere Studien zeigen, dass neben intrinsischen Faktoren auch externe Gegebenheiten wie die Mikroumgebung innerhalb eines Tumors eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung oder Erhaltung von Tumorstammzell-Subpopulationen spielen. Während akute hypoxische Bedingungen normalerweise zur Apoptose oder Nekrose der Zellen führen, können sich einige Subpopulationen innerhalb des Tumors an die veränderte Mikroumgebung anpassen. Glioma-Stammzellen reichern sich in funktionellen Nischen an, besonders in den perivaskulären und hypoxischen Räumen (Calabrese et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die perivaskulären Nischen und ihre enthaltenen Moleküle an sich sowie die Regulation weiterer Signalwege, ausgehend von den Nischen, maßgeblich zur Erhaltung eines Tumorstammzell-Phänotyps beitragen (Heddleston et al., 2011).

Auch die Auswirkung der hypoxischen Bedingungen innerhalb der Tumore spielt eine große Rolle in der Erhaltung stammzellähnlicher Zellpopulationen: Hypoxie steht nicht nur im Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten, der Resistenz gegenüber Therapien und der Tumoraggressivität innerhalb solider Tumore (Evans et al., 2010). Begrenzte Anwesenheit von Sauerstoff fördert nämlich auch das Zellwachstum in Neurosphären von Tumorstammzellen, sowie in Tumorzellen ohne Stammzeleigenschaften und führt zu einer Hochregulation von Stammzellgenen wie Sox2 (sex determining region Y (SRY)- box 2) und Oct4 (Octamer binding transcription factor 4) (Heddleston et al., 2011). Die im hypoxischen Signalweg eingebundenen Transkriptionsfaktoren HIF (hypoxia inducible factors) sind maßgeblich an der Regulation der typischen Eigenschaften von Hirntumorstammzellen beteiligt. Zu ihren spezifischen Zielen gehören Gene wie Oct4. Sie befähigen Zellen zum anaeroben Metabolismus und induzieren Angiogenese (Heddleston et al., 2011). Heddleston et al. zeigten 2009, dass die erzwungene Expression von nicht abbaubaren HIF2 α (hypoxia inducible factor-2 α) in Nicht-Stammzell-Gliomazellen zur Expression von Stammzellgenen wie Oct4, MYC und Nanog und außerdem zur morphologischen Veränderungen in Form von Neurosphärenwachstum der Nicht-Stammzellen führte (Heddleston et al. 2009). Da die HIF2 α -Expression zudem in normalen Zellen eingeschränkt sowie in neuralen Vorläuferzellen extrem gering ist, wird HIF2 α als vielversprechendes neues Ziel in der klinischen Glioma-Therapie gehandelt (Heddleston et al., 2011). Die Forschungsergebnisse bezüglich der Auswirkungen der Mikroumgebung auf Tumorzellen zeigen, dass auch Nicht-Stammzellen durch den Einfluss von Hypoxie und HIFs zu BTSC werden können und die Aufhebung des Einflusses der Nischen auf die Tumorzellen zu einem besseren Langzeitüberleben der Patienten beitragen könnte.

6.5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens PTEN und dessen Einfluss auf die Ausbildung von Hirntumorstammzellen in malignen Gliomen zu demonstrieren, sowie gleichzeitig eine Korrelation mit der ALDH1A1-Expression als einem robusten BTSC-Marker aufzuzeigen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass PTEN und dessen Mutationsstatus mit dem ALDH1A1 Status und der Neurosphärenbildung der untersuchten Zelllinien korreliert und so PTEN als Ziel neuer Therapien in der Behandlung von GBM und anderen lebensbedrohlichen Tumorerkrankungen dienen kann. Trotz allem bedarf es weiterer Forschungsarbeit, um die genaue Auswirkung eines PTEN-Funktionsverlusts auf Tumorgenese, Tumorprogression und Tumorregression zu verstehen. Dabei ist es auch wichtig, PTEN und dessen Funktion nicht als einzelne Komponente zu betrachten, sondern seine Rolle in Verbindung mit intrinsischen und extrinsischen Faktoren, von denen viele bereits in der vorliegenden Arbeit erläutert wurden, zu erforschen. Aus persönlichen Gründen war es mir ein großes Anliegen, einen kleinen Beitrag zum großen Feld der Hirntumorforschung zu leisten. Es ist zu hoffen, dass durch weitere Bemühungen und Forschungsarbeiten in diesem Feld, welche die regulatorischen Komponenten von PTEN in Tumorzellen wie auch in normalen Zellen betreffen, mehr Erkenntnisse über die Entstehung der GBM gewonnen werden können und so neue Ansätze für eine entsprechende Therapie entstehen, um in naher Zukunft den Patienten ein rezidiv-freies Überleben nach GBM Behandlung ermöglichen zu können.

7 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme ist ein hochmaligner, aggressiver Tumor mit einer infausten Prognose. Der nach den aktuellen WHO Kriterien eingeteilte Grad IV Tumor wird durch eine hohe Zellproliferation und eine frühzeitige diffuse Infiltration in gesundes umgebendes Hirngewebe charakterisiert. Weder die chirurgische Intervention, noch Chemo- oder Strahlentherapie zeigen große Therapieerfolge und trotz intensiver Forschung und neuer Erkenntnisse zeichnet sich das GBM weiterhin durch eine erhebliche Therapieresistenz aus. Für diese Unzugänglichkeit aktueller Therapien wird eine kleine Subpopulation von Tumorzellen, sog. *Cancer Stem Cells* oder *Brain Tumor Stem Cells*, verantwortlich gemacht. Bei der Regulation des zellulären Phänotyps der Hirntumorstammzellen scheint dabei vor allem dem PI3K-Signalweg eine funktionelle Bedeutung zuzukommen. Ein negativer Regulator dieses Signalweges und der PI3K ist die PTEN-Phosphatase, welche sich häufig in Glioblastomen als mutiert zeigt.

Ziel dieser Arbeit war es den Zusammenhang zwischen dem PTEN-Mutationsstatus und der Ausprägung des BTSC-Phänotyps in Glioblastom-Zelllinien zu erforschen. Dazu wurde in etablierten GBM-Zelllinien und primären GBM-Zellen mittels Westernblot Analyse der PTEN-Status auf Protein- und mittels PCR Analysen und anschließender Sequenzierung auf DNA-Ebene charakterisiert. Die Resultate wurden mit der Fähigkeit der Tumorzellen, Neurosphären zu bilden, als funktioneller BTSC-Assay, verglichen und mit dem ALDH1A1-Status korreliert, der sich als robuster BTSC-Biomarker bewährt hat. Es zeigte sich dabei eine Korrelation zwischen dem Mutationsstatus des PTEN Gens, dem ALDH1A1-Status und der Bildung von Neurosphären. Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass es eine Verbindung zwischen PTEN-Funktionsverlust und der Bildung der Hirntumorstammzell-Subpopulation gibt und somit PTEN als ein weiterer, neuer Ansatzpunkt in Bezug auf die schwierige Therapie des GBM dienen kann.

8 Literaturverzeichnis

- Aguissa-Toure, A. H., and G. Li. "Genetic Alterations of Pten in Human Melanoma." [In eng]. *Cell Mol Life Sci* 69, no. 9 (May 2012): 1475-1491.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. "Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response." [In eng]. *Nature* 444, (Dec 7 2006): 756-760.
- Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P. J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn, C. P. Beier. "Cd133(+) and Cd133(-) Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles." [In eng]. *Cancer Res* 67, (May 1 2007): 4010-4015.
- Bigner, S. H., J. Mark, P. C. Burger, M. S. Mahaley, Jr., D. E. Bullard, L. H. Muhlbaier, and D. D. Bigner. "Specific Chromosomal Abnormalities in Malignant Human Gliomas." [In eng]. *Cancer Res* 48, (Jan 15 1988): 405-411.
- Bleau, A. M., D. Hambardzumyan, T. Ozawa, E. I. Fomchenko, J. T. Huse, C. W. Brennan, and E. C. Holland. "Pten/Pi3k/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and Abcg2 Activity in Glioma Tumor Stem-Like Cells." [In eng]. *Cell Stem Cell* 4, (Mar 6 2009): 226-235.
- Bonavia, R., M. M. Inda, W. K. Cavenee, and F. B. Furnari. "Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: A Social Network." [In eng]. *Cancer Res* 71, (Jun 15 2011): 4055-4060.
- Bonneau, D., and M. Longy. "Mutations of the Human Pten Gene." [In eng]. *Hum Mutat* 16, no. 2 (2000): 109-22.
- Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." [In eng]. *Anal Biochem* 72 (May 7 1976): 248-254.
- Brat, D. J., R. G. Verhaak, K. D. Aldape, W. K. Yung, S. R. Salama, L. A. Cooper, E. Rheinbay, et al. *Cancer Genome Atlas Research Network*. "Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas." [In eng]. *N Engl J Med* 372, (Jun 25 2015): 2481-2498.
- Buettner, R., L. B. Mora, and R. Jove. "Activated Stat Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention." [In eng]. *Clin Cancer Res* 8, (Apr 2002): 945-954.
- Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff, R. J. Gilbertson. "A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells." [In eng]. *Cancer Cell* 11, (Jan 2007): 69-82.
- Canis, M., A. Lechner, B. Mack, P. Zengel, R. P. Laubender, U. Koehler, V. Heissmeyer, and O. Gires. "Cd133 Is a Predictor of Poor Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas." [In eng]. *Cancer Biomark* 12, (2012): 97-105.
- Capper, D., and G. Reifenberger. "[Classification of Gliomas. Current Progress and Perspectives]." [In ger]. *Nervenarzt* 86, (Jun 2015): 672, 74-76, 78-80, passim.
- Carver, B. S., C. Chapinski, J. Wongvipat, H. Hieronymus, Y. Chen, S. Chandralapaty, V. K. Arora, C. Le, J. Koutcher, H. Scher, P. T. Scardino, N. Rosen, C. Sawyers. "Reciprocal Feedback Regulation of Pi3k and Androgen Receptor Signaling in Pten-Deficient Prostate Cancer." [In eng]. *Cancer Cell* 19, (May 17 2011): 575-586.
- Chaudhary, P. M., and I. B. Roninson. "Expression and Activity of P-Glycoprotein, a Multidrug Efflux Pump, in Human Hematopoietic Stem Cells." [In eng]. *Cell* 66, (Jul 12 1991): 85-94.
- Chen, R., M. C. Nishimura, S. M. Bumbaca, S. Kharbanda, W. F. Forrest, I. M. Kasman, J. M. Greve, R. H. Soriano, L. L. Gilmour, C. S. Rivers, Z. Modrusan, S. Nacu, S. Guerrero, K. A. Edgar, J. J. Wallin, K. Lamszus, M. Westphal, S. Heim, C. D. James, S. R. VandenBerg, J. F. Costello, S. Moorefield, C. J. Cowdrey, M. Prados, H. S. Phillips. "A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma." [In eng]. *Cancer Cell* 17, (Apr 13 2010): 362-375.
- Clevers, H. "The Cancer Stem Cell: Premises, Promises and Challenges." [In eng]. *Nat Med* 17, (Mar 2011): 313-319.
- Corti, S., F. Locatelli, D. Papadimitriou, C. Donadoni, S. Salani, R. Del Bo, S. Strazzer, N. Bresolin, and G. P. Comi. "Identification of a Primitive Brain-Derived Neural Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity." [In eng]. *Stem Cells* 24, (Apr 2006): 975-985.
- de la Iglesia, N., G. Konopka, S. V. Puram, J. A. Chan, R. M. Bachoo, M. J. You, D. E. Levy, R. A. Depinho, and A. Bonni. "Identification of a Pten-Regulated Stat3 Brain Tumor Suppressor Pathway." [In eng]. *Genes Dev* 22, (Feb 15 2008): 449-462.
- de la Iglesia, N., S. V. Puram, and A. Bonni. "Stat3 Regulation of Glioblastoma Pathogenesis." [In eng]. *Curr Mol Med* 9, (Jun 2009): 580-590.
- von Deimling, A., K. von Ammon, D. Schoenfeld, O. D. Wiestler, B. R. Seizinger, and D. N. Louis. "Subsets of

- Glioblastoma Multiforme Defined by Molecular Genetic Analysis." [In eng]. *Brain Pathol* 3, (Jan 1993): 19-26.
- Dimov, I., D. Tasic-Dimov, I. Conic, and V. Stefanovic. "Glioblastoma Multiforme Stem Cells." [In eng]. *ScientificWorldJournal* 11 (2011): 930-958.
- Duerr, E. M., B. Rollbrocker, Y. Hayashi, N. Peters, B. Meyer-Puttlitz, D. N. Louis, J. Schramm, O. D. Wiestler, R. Parsons, C. Eng, A. von Deimling. "Pten Mutations in Gliomas and Glioneuronal Tumors." [In eng]. *Oncogene* 16, (Apr 30 1998): 2259-2264.
- Eramo, A., L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozi, L. M. Larocca, C. Peschle, R. De Maria. "Chemotherapy Resistance of Glioblastoma Stem Cells." [In eng]. *Cell Death Differ* 13, (Jul 2006): 1238-1241.
- Evans, S. M., K. W. Jenkins, H. I. Chen, W. T. Jenkins, K. D. Judy, W. T. Hwang, R. A. Lustig, A. R. Judkins, M. S. Grady, S. M. Hahn, C. J. Koch. "The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study." [In eng]. *Transl Oncol* 3, (2010): 160-169.
- Fargeas, C. A., D. Corbeil, and W. B. Huttner. "Ac133 Antigen, Cd133, Prominin-1, Prominin-2, Etc.: Prominin Family Gene Products in Need of a Rational Nomenclature." [In eng]. *Stem Cells* 21, (2003): 506-508.
- Furnari, F. B., H. Lin, H. S. Huang, and W. K. Cavenee. "Growth Suppression of Glioma Cells by Pten Requires a Functional Phosphatase Catalytic Domain." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, (Nov 11 1997): 12479-12484.
- Furuta, M., R. J. Weil, A. O. Vortmeyer, S. Huang, J. Lei, T. N. Huang, Y. S. Lee, D. A. Bhowmick, I. A. Lubensky, E. H. Oldfield, Z. Zhuang. "Protein Patterns and Proteins That Identify Subtypes of Glioblastoma Multiforme." [In eng]. *Oncogene* 23, (Sep 2 2004): 6806-6814.
- Georgescu, M. M. "Pten Tumor Suppressor Network in Pi3k-Akt Pathway Control." [In eng]. *Genes Cancer* 1, (Dec 2010): 1170-1177.
- Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha, G. Dontu. "Aldh1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome." [In eng]. *Cell Stem Cell* 1, (Nov 2007): 555-567.
- Ginestier, C., J. Wicinski, N. Cervera, F. Monville, P. Finetti, F. Bertucci, M.S. Wicha, D. Birnbaum, E. Charafe-Jauffret. "Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation." [In eng]. *Cell Cycle* 8, (Oct 2009): 3297-3302.
- Hambardzumyan, D., O. J. Becher, M. K. Rosenblum, P. P. Pandolfi, K. Manova-Todorova, and E. C. Holland. "Pi3k Pathway Regulates Survival of Cancer Stem Cells Residing in the Perivascular Niche Following Radiation in Medulloblastoma in Vivo." [In eng]. *Genes Dev* 22, (Feb 15 2008): 436-448.
- Hartmann, C., B. Hentschel, W. Wick, D. Capper, J. Felsberg, M. Simon, M. Westphal, G. Schackert, R. Meyermann, T. Pietsch, G. Reifenberger, M. Weller, M. Loeffler, A. von Deimling. "Patients with Idh1 Wild Type Anaplastic Astrocytomas Exhibit Worse Prognosis Than Idh1-Mutated Glioblastomas, and Idh1 Mutation Status Accounts for the Unfavorable Prognostic Effect of Higher Age: Implications for Classification of Gliomas." [In eng]. *Acta Neuropathol* 120, (Dec 2010): 707-718.
- Heddleston, J. M., M. Hitomi, M. Venere, W. A. Flavahan, K. Yang, Y. Kim, S. Minhas, J. N. Rich, and A. B. Hjelmeland. "Glioma Stem Cell Maintenance: The Role of the Microenvironment." [In eng]. *Curr Pharm Des* 17, (2011): 2386-2401.
- Heddleston, J. M., Z. Li, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland, and J. N. Rich. "The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming Towards a Cancer Stem Cell Phenotype." [In eng]. *Cell Cycle* 8, (Oct 15 2009): 3274-3284.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, R. Stupp. "Mgmt Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma." [In eng]. *N Engl J Med* 352, Mar 10 2005): 997-1003.
- Hopkin, K. "A Surprising Function for the Pten Tumor Suppressor." [In eng]. *Science* 282, (Nov 6 1998): 1027,1029-1030.
- Hopkins, B. D., B. Fine, N. Steinbach, M. Dendy, Z. Rapp, J. Shaw, K. Pappas, J. S. Yu, C. Hodakoski, S. Mense, J. Klein, S. Pegno, M. L. Sulis, H. Goldstein, B. Amendolara, L. Lei, M. Maurer, J. Bruce, P. Canoll, H. Hibshoosh, R. Parsons. "A Secreted Pten Phosphatase That Enters Cells to Alter Signaling and Survival." [In eng]. *Science* 341, (Jul 26 2013): 399-402.
- Huang, E. H., M. J. Hynes, T. Zhang, C. Ginestier, G. Dontu, H. Appelman, J. Z. Fields, M. S. Wicha, and B. M. Boman. "Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (Sc) and Tracks Sc Overpopulation During Colon Tumorigenesis." [In eng]. *Cancer Res* 69, (Apr 15 2009): 3382-3389.

- Huse, J. T., C. Brennan, D. Hambardzumyan, B. Wee, J. Pena, S. H. Rouhanifard, C. Sohn-Lee, R. Agami, T. Tuschl, E. C. Holland. "The Pten-Regulating MicroRNA Mir-26a Is Amplified in High-Grade Glioma and Facilitates Gliomagenesis in Vivo." [In eng]. *Genes Dev* 23, (Jun 1 2009): 1327-1337.
- Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. C. Diserens, and E. G. Van Meir. "Frequent Co-Alterations of Tp53, P16/Cdkn2a, P14arf, Pten Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines." [In eng]. *Brain Pathol* 9, (Jul 1999): 469-479.
- James, C. D., E. Carlbom, J. P. Dumanski, M. Hansen, M. Nordenskjold, V. P. Collins, and W. K. Cavenee. "Clonal Genomic Alterations in Glioma Malignancy Stages." [In eng]. *Cancer Res* 48, (Oct 1 1988): 5546-5551.
- Jiang, F., Q. Qiu, A. Khanna, N. W. Todd, J. Deepak, L. Xing, H. Wang, Z. Liu, Y. Su, S. A. Stass, R. L. Katz. "Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Tumor Stem Cell-Associated Marker in Lung Cancer." [In eng]. *Mol Cancer Res* 7, (Mar 2009): 330-338.
- Jones, R. J., J. P. Barber, M. S. Vala, M. I. Collector, S. H. Kaufmann, S. M. Ludeman, O. M. Colvin, and J. Hilton. "Assessment of Aldehyde Dehydrogenase in Viable Cells." [In eng]. *Blood* 85, (May 15 1995): 2742-2746.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward, and A. W. Burgess. "Epidermal Growth Factor Receptor: Mechanisms of Activation and Signalling." [In eng]. *Exp Cell Res* 284, (Mar 10 2003): 31-53.
- Juratli, T. A., M. Kirsch, K. Robel, S. Soucek, K. Geiger, R. von Kummer, G. Schackert, and D. Krex. "Idh Mutations as an Early and Consistent Marker in Low-Grade Astrocytomas WHO Grade II and Their Consecutive Secondary High-Grade Gliomas." [In eng]. *J Neurooncol* 108, (Jul 2012): 403-410.
- Kania, G., D. Corbeil, J. Fuchs, K. V. Tarasov, P. Blyszczuk, W. B. Huttner, K. R. Boheler, and A. M. Wobus. "Somatic Stem Cell Marker Prominin-1/Cd133 Is Expressed in Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors." [In eng]. *Stem Cells* 23, (Jun-Jul 2005): 791-804.
- Khwaja, A. "Akt Is More Than Just a Bad Kinase." [In eng]. *Nature* 401, (Sep 2 1999): 33-34.
- Kim, J. E., M. Patel, J. Ruzevick, C. M. Jackson, and M. Lim. "Stat3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications." [In eng]. *Cancers (Basel)* 6, (2014): 376-395.
- Kim, K. J., K. H. Lee, H. S. Kim, K. S. Moon, T. Y. Jung, S. Jung, and M. C. Lee. "The Presence of Stem Cell Marker-Expressing Cells Is Not Prognostically Significant in Glioblastomas." [In eng]. *Neuropathology* 31, (Oct 2011): 494-502.
- Kleihues, P., and H. Ohgaki. "Primary and Secondary Glioblastomas: From Concept to Clinical Diagnosis." [In eng]. *Neuro Oncol* 1, (Jan 1999): 44-51.
- Korshunov, A., M. Ryzhova, V. Hovestadt, S. Bender, D. Sturm, D. Capper, J. Meyer, D. Schrimpf, M. Kool, P. A. Northcott, O. Zheludkova, T. Milde, O. Witt, A. E. Kulozik, G. Reifenberger, N. Jabado, A. Perry, P. Lichter, A. von Deimling, S. M. Pfister, D. T. Jones. "Integrated Analysis of Pediatric Glioblastoma Reveals a Subset of Biologically Favorable Tumors with Associated Molecular Prognostic Markers." [In eng]. *Acta Neuropathol* 129, (May 2015): 669-678.
- Kraus, A., F. Neff, M. Behn, M. Schuermann, K. Muenkel, J. Schlegel. "Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells." [In eng]. *International Journal of Cancer* 80, (March 1999): 930-934.
- Labrecque, J., P. V. Bhat, and A. Lacroix. "Purification and Partial Characterization of a Rat Kidney Aldehyde Dehydrogenase That Oxidizes Retinal to Retinoic Acid." [In eng]. *Biochem Cell Biol* 71, (Jan-Feb 1993): 85-89.
- Laks, D. R., M. Masterman-Smith, K. Visnyei, B. Angenieux, N. M. Orozco, I. Foran, W. H. Yong, H. V. Vinters, L. M. Liau, J. A. Lazareff, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, S. Horvath, H. I. Kornblum. "Neurosphere Formation Is an Independent Predictor of Clinical Outcome in Malignant Glioma." [In eng]. *Stem Cells* 27, (Apr 2009): 980-987.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman, and R. D. McKay. "Cns Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein." [In eng]. *Cell* 60, (Feb 23 1990): 585-595.
- Li, D. M., and H. Sun. "Tep1, Encoded by a Candidate Tumor Suppressor Locus, Is a Novel Protein Tyrosine Phosphatase Regulated by Transforming Growth Factor Beta." [In eng]. *Cancer Res* 57, (Jun 1 1997a): 2124-2129.
- Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliareis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, R. Parsons. "Pten, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer." [In eng]. *Science* 275, (Mar 28 1997b): 1943-1947.
- Liaw, D., D. J. Marsh, J. Li, P. L. Dahia, S. I. Wang, Z. Zheng, S. Bose, K. M. Call, H. C. Tsou, M. Peacocke, C. Eng, R. Parsons. "Germline Mutations of the Pten Gene in Cowden Disease, an Inherited Breast and Thyroid Cancer Syndrome." [In eng]. *Nat Genet* 16, (May 1997): 64-67.
- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, J. S. Yu. "Analysis of Gene

- Expression and Chemoresistance of Cd133+ Cancer Stem Cells in Glioblastoma." [In eng]. *Mol Cancer* 5 (2006): 67.
- Lobo, N. A., Y. Shimono, D. Qian, and M. F. Clarke. "The Biology of Cancer Stem Cells." [In eng]. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23 (2007): 675-699.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." [In eng]. *Acta Neuropathol* 114, (Aug 2007): 97-109.
- Louis, D. N., A. Perry, P. Burger, D. W. Ellison, G. Reifenberger, A. von Deimling, K. Aldape, D. Brat, V. P. Collins, C. Eberhart, D. Figarella-Branger, G. N. Fuller, F. Giangaspero, C. Giannini, C. Hawkins, P. Kleihues, A. Korshunov, J. M. Kros, M. Beatriz Lopes, H. K. Ng, H. Ohgaki, W. Paulus, T. Pietsch, M. Rosenblum, E. Rushing, F. Soylemezoglu, O. Wiestler, P. Wesseling. "International Society of Neuropathology--Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading." [In eng]. *Brain Pathol* 24, (Sep 2014): 429-435.
- Maehama, T., and J. E. Dixon. "The Tumor Suppressor, Pten/Mmac1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate." [In eng]. *J Biol Chem* 273, (May 29 1998): 13375-13378.
- Magni, M., S. Shammah, R. Schiro, W. Mellado, R. Dalla-Favera, and A. M. Gianni. "Induction of Cyclophosphamide-Resistance by Aldehyde-Dehydrogenase Gene Transfer." [In eng]. *Blood* 87, (Feb 1 1996): 1097-1103.
- Marcato, P., C. A. Dean, C. A. Giacomantonio, and P. W. Lee. "Aldehyde Dehydrogenase: Its Role as a Cancer Stem Cell Marker Comes Down to the Specific Isoform." [In eng]. *Cell Cycle* 10, (May 1 2011): 1378-1384.
- Marsh, D. J., P. L. Dahia, Z. Zheng, D. Liaw, R. Parsons, R. J. Gorlin, and C. Eng. "Germline Mutations in Pten Are Present in Bannayan-Zonana Syndrome." [In eng]. *Nat Genet* 16, (Aug 1997): 333-334.
- Nobusawa, S., T. Watanabe, P. Kleihues, and H. Ohgaki. "Idh1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas." [In eng]. *Clin Cancer Res* 15, (Oct 1 2009): 6002-6007.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, *et al.* "Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study." [In eng]. *Cancer Res* 64, (Oct 1 2004): 6892-6899.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. "Epidemiology and Etiology of Gliomas." [In eng]. *Acta Neuropathol* 109, (Jan 2005a): 93-108.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. "Genetic Profile of Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas." [In eng]. *Brain Tumor Pathol* 28, (Jul 2011): 177-183.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. "Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas." [In eng]. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, (Jun 2005b): 479-489.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, Y. Wolinsky, C. Kruchko, and J. Barnholtz-Sloan. "Cbtrus Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011." [In eng]. *Neuro Oncol* 16 Suppl 4 (Oct 2014): iv1-63.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivari, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, J. Jr. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler. "An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme." [In eng]. *Science* 321, (Sep 26 2008): 1807-1812.
- Planchon, S. M., K. A. Waite, and C. Eng. "The Nuclear Affairs of Pten." [In eng]. *J Cell Sci* 121, (Feb 1 2008): 249-253.
- Rasheed, B. K., T. T. Stenzel, R. E. McLendon, R. Parsons, A. H. Friedman, H. S. Friedman, D. D. Bigner, and S. H. Bigner. "Pten Gene Mutations Are Seen in High-Grade but Not in Low-Grade Gliomas." [In eng]. *Cancer Res* 57, (Oct 1 1997): 4187-4190.
- Rasper, M., A. Schafer, G. Piontek, J. Teufel, G. Brockhoff, F. Ringel, S. Heindl, C. Zimmer, and J. Schlegel. "Aldehyde Dehydrogenase 1 Positive Glioblastoma Cells Show Brain Tumor Stem Cell Capacity." [In eng]. *Neuro Oncol* 12, (Oct 2010): 1024-1033.
- Reuss, D. E., F. Sahm, D. Schrimpf, B. Wiestler, D. Capper, C. Koelsche, L. Schweizer, A. Korshunov, D. T. Jones, V. Hovestadt, M. Mittelbronn, J. Schittenhelm, C. Herold-Mende, A. Unterberg, M. Platten, M. Weller, W. Wick, S. M. Pfister, A. von Deimling. "Atrx and Idh1-R132H Immunohistochemistry with Subsequent Copy Number Analysis and Idh Sequencing as a Basis for an "Integrated" Diagnostic Approach for Adult Astrocytoma, Oligodendroglioma and Glioblastoma." [In eng]. *Acta Neuropathol* 129, (Jan 2015): 133-146.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." [In eng]. *Nature* 414, (Nov 1 2001): 105-111.

- Reynolds, B. A., and S. Weiss. "Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System." [In eng]. *Science* 255, (Mar 27 1992): 1707-1710.
- Ross, A. H., and A. Gericke. "Phosphorylation Keeps Pten Phosphatase Closed for Business." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, (Feb 3 2009): 1297-1298.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, (Dec 1977): 5463-5467.
- Schäfer, A., J. Teufel, F. Ringel, M. Bettstetter, I. Hoepner, M. Rasper, J. Gempt, F. Schmidt-Graf, B. Meyer, C. P. Beier, J. Schlegel. "Aldehyde Dehydrogenase 1a1--a New Mediator of Resistance to Temozolomide in Glioblastoma." [In eng]. *Neuro Oncol* 14, (Dec 2012): 1452-1464.
- Scharenberg, C. W., M. A. Harkey, and B. Torok-Storb. "The Abcg2 Transporter Is an Efficient Hoechst 33342 Efflux Pump and Is Preferentially Expressed by Immature Human Hematopoietic Progenitors." [In eng]. *Blood* 99, (Jan 15 2002): 507-512.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, T. Hide, and P. B. Dirks. "Cancer Stem Cells in Nervous System Tumors." [In eng]. *Oncogene* 23, (Sep 20 2004a): 7267-7273.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P. B. Dirks. "Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors." [In eng]. *Cancer Res* 63, (Sep 15 2003): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks. "Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells." [In eng]. *Nature* 432, (Nov 18 2004b): 396-401.
- Smith, J. S., I. Tachibana, S. M. Passe, B. K. Huntley, T. J. Borell, N. Iturria, J. R. O'Fallon, P. L. Schaefer, B. W. Scheithauer, C. D. James, J. C. Buckner, R. B. Jenkins. "Pten Mutation, Egfr Amplification, and Outcome in Patients with Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme." [In eng]. *J Natl Cancer Inst* 93, (Aug 15 2001): 1246-1256.
- Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, G. M. Brothers, C. Mirtsos, T. Sasaki, J. Ruland, J. M. Penninger, D. P. Siderovski, T. W. Mak. "Negative Regulation of Pkb/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor Pten." [In eng]. *Cell* 95, (Oct 2 1998): 29-39.
- Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng, S. V. Tavtigian. "Identification of a Candidate Tumour Suppressor Gene, Mmac1, at Chromosome 10q23.3 That Is Mutated in Multiple Advanced Cancers." [In eng]. *Nat Genet* 15, (Apr 1997): 356-362.
- Stein, G. H. "T98g: An Anchorage-Independent Human Tumor Cell Line That Exhibits Stationary Phase G1 Arrest in Vitro." [In eng]. *J Cell Physiol* 99, (Apr 1979): 43-54.
- Stemke-Hale, K., A. M. Gonzalez-Angulo, A. Lluch, R. M. Neve, W. L. Kuo, M. Davies, M. Carey, Z. Hu, Y. Guan, A. Sahin, W. F. Symmans, L. Pusztai, L. K. Nolden, H. Horlings, K. Berns, M. C. Hung, M. J. van de Vijver, V. Valero, J. W. Gray, R. Bernardis, G. B. Mills, B. Hennessy. "An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of Pik3ca, Pten, and Akt Mutations in Breast Cancer." [In eng]. *Cancer Res* 68, (Aug 1 2008): 6084-6091.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff. "Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." [In eng]. *N Engl J Med* 352, (Mar 10 2005): 987-996.
- Sturm, D., H. Witt, V. Hovestadt, D. A. Khuong-Quang, D. T. Jones, C. Konermann, E. Pfaff, M. Tonjes, M. Sill, S. Bender, M. Kool, M. Zapatka, N. Becker, M. Zucknick, Z. Hielscher, X. Y. Liu, A. M. Fontebasso, M. Ryzhova, S. Albrecht, K. Jacob, M. Wolter, M. Ebinger, M. U. Schuhmann, T. van Meter, M. C. Fruhwald, H. Hauch, A. Pekrun, B. Radlwimmer, T. Niehues, G. von Komorowski, M. Durken, A. E. Kulozik, J. Madden, A. Donson, N. K. Foreman, R. Drissi, M. Fouladi, W. Scheurlen, A. von Deimling, C. Monoranu, W. Roggendorf, C. Herold-Mende, A. Unterberg, C. M. Kramm, J. Felsberg, C. Hartmann, B. Wiestler, W. Wick, T. Milde, O. Witt, A. M. Lindroth, J. Schwartzentruber, D. Faury, A. Fleming, M. Zakrzewska, P. P. Liberski, K. Zakrzewski, P. Hauser, M. Garami, A. Klekner, L. Bognar, S. Morrissy, F. Cavalli, M. D. Taylor, P. van Sluis, J. Koster, R. Versteeg, R. Volckmann, T. Mikkelsen, K. Aldape, G. Reifenberger, V. P. Collins, J. Majewski, A. Korshunov, P. Lichter, C. Plass, N. Jabado, S. M. Pfister. "Hotspot Mutations in H3f3a and Idh1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma." [In eng]. *Cancer Cell* 22, (Oct 16 2012): 425-437.
- Teng, D. H., R. Hu, H. Lin, T. Davis, D. Iliiev, C. Frye, B. Swedlund, K. L. Hansen, V. L. Vinson, K. L. Gumpfer, L. Ellis, A. El-Naggar, M. Frazier, S. Jasser, L. A. Langford, J. Lee, G. B. Mills, M. A. Pershouse, R. E. Pollack, C. Tornos, P. Troncoso, W. K. A. Yung, G. Fujii, A. Berson, R. Bookstein, J. B. Bolen, .V. Tavtigian, P. A. Steck. "Mmac1/Pten Mutations in Primary Tumor Specimens and Tumor Cell Lines." [In eng]. *Cancer Res* 57, (Dec 1 1997): 5221-5225.

- Tohma, Y., C. Gratas, W. Biernat, A. Peraud, M. Fukuda, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki. "Pten (Mmac1) Mutations Are Frequent in Primary Glioblastomas (De Novo) but Not in Secondary Glioblastomas." [In eng]. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, (Jul 1998): 684-689.
- Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage, and I. L. Weissman. "Direct Isolation of Human Central Nervous System Stem Cells." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, (Dec 19 2000): 14720-14725.
- Vazquez, F., S. Ramaswamy, N. Nakamura, and W. R. Sellers. "Phosphorylation of the Pten Tail Regulates Protein Stability and Function." [In eng]. *Mol Cell Biol* 20, (Jul 2000): 5010-5018.
- Vescovi, A. L., R. Galli, and B. A. Reynolds. "Brain Tumour Stem Cells." [In eng]. *Nat Rev Cancer* 6, (Jun 2006): 425-436.
- Visvader, J. E., and G. J. Lindeman. "Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities." [In eng]. *Cell Stem Cell* 10, (Jun 14 2012): 717-728.
- Wan, F., S. Zhang, R. Xie, B. Gao, B. Campos, C. Herold-Mende, and T. Lei. "The Utility and Limitations of Neurosphere Assay, Cd133 Immunophenotyping and Side Population Assay in Glioma Stem Cell Research." [In eng]. *Brain Pathol* 20, (Sep 2010): 877-889.
- Weissman, I. L. "Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution." [In eng]. *Cell* 100, (Jan 7 2000): 157-168.
- Weller, M., J. Felsberg, C. Hartmann, H. Berger, J. P. Steinbach, J. Schramm, M. Westphal, G. Schackert, M. Simon, J. C. Tonn, O. Heese, D. Krex, G. Nikkhah, T. Pietsch, O. Wiestler, G. Reifenberger, A. Deimling, M. Loeffler. "Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network." [In eng]. *J Clin Oncol* 27, (Dec 1 2009): 5743-5750.
- Wick, W., C. Hartmann, C. Engel, M. Stoffels, J. Felsberg, F. Stockhammer, M. C. Sabel, S. Koeppen, R. Ketter, R. Meyermann, M. Rapp, C. Meisner, R. D. Kortmann, T. Pietsch, O. D. Wiestler, U. Ernemann, M. Bamberg, G. Reifenberger, A. Deimling, M. Weller. "Noa-04 Randomized Phase Iii Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma with Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide." [In eng]. *J Clin Oncol* 27, (Dec 10 2009): 5874-5880.
- Xiao, W. Z., D. H. Han, F. Wang, Y. Q. Wang, Y. H. Zhu, Y. F. Wu, N. T. Liu, and J. Y. Sun. "Relationships between Pten Gene Mutations and Prognosis in Glioma: A Meta-Analysis." [In eng]. *Tumour Biol* 35, (Jul 2014): 6687-6693.
- Yamamuro, S., Y. Okamoto, E. Sano, Y. Ochiai, A. Ogino, T. Ohta, H. Hara, T. Ueda, T. Nakayama, A. Yoshino, Y. Katayama. "Characterization of Glioma Stem-Like Cells from Human Glioblastomas." [In eng]. *Int J Oncol* 47, (Jul 2015): 91-96.
- Yan, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, D. D. Bigner. "Idh1 and Idh2 Mutations in Gliomas." [In eng]. *N Engl J Med* 360, (Feb 19 2009): 765-773.
- Yang, B., Y. Wang, C. Yang, W. Ouyang, F. Zhou, Y. Zhou, and C. Xie. "The Ultrastructural Difference between Cd133-Positive U251 Glioma Stem Cells and Normal U251 Glioma Cells." [In eng]. *Ultrastruct Pathol* 36, (Dec 2012b): 404-408.
- Yang, H., D. Ye, K. L. Guan, and Y. Xiong. "Idh1 and Idh2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives." [In eng]. *Clin Cancer Res* 18, (Oct 15 2012a): 5562-5571.
- Yang, Y., N. Shao, G. Luo, L. Li, L. Zheng, P. Nilsson-Ehle, and N. Xu. "Mutations of Pten Gene in Gliomas Correlate to Tumor Differentiation and Short-Term Survival Rate." [In eng]. *Anticancer Res* 30, (Mar 2010): 981-985.
- Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D. W. Buck. "Ac133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." [In eng]. *Blood* 90, (Dec 15 1997): 5002-5012.
- Yuki, K., A. Natsume, H. Yokoyama, Y. Kondo, M. Ohno, T. Kato, P. Chansakul, *et al.* "Induction of Oligodendrogenesis in Glioblastoma-Initiating Cells by Ifn-Mediated Activation of Stat3 Signaling." [In eng]. *Cancer Lett* 284, (Oct 18 2009): 71-79.
- Zhao, Y., Q. Huang, T. Zhang, J. Dong, A. Wang, Q. Lan, X. Gu, and Z. Qin. "Ultrastructural Studies of Glioma Stem Cells/Progenitor Cells." [In eng]. *Ultrastruct Pathol* 32, (Nov-Dec 2008): 241-245.

9 Danksagung

Ich möchte allen von Herzen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein erster Dank geht an meine Schwester Alexandra Hock. Sie und ihre persönliche Geschichte veranlassten mich dazu, mich mit der Thematik auseinanderzusetzen. Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel für die Bereitstellung des Themas und für sein Vertrauen in mich bedanken. Als mein Doktorvater begleitete er mich während der Arbeit an meiner Dissertation und stand mir dabei mit Rat und Tat zur Seite.

Ich danke Ingrid Hoepner von ganzem Herzen für Ihre große Unterstützung und ihre motivierenden Worte. Ebenso danke ich Prof. Dr. rer. nat. Gisela Keller, mit deren Hilfe es mir gelang, durch eine schwere Phase zu kommen. Mein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen: Julia Köritzer für die Einarbeitung und die stetige Hilfe, Dr. rer. nat. Andrea Schäfer für die Unterstützung und Ratschläge, Velia Hülsmeier und Veronika Boxhammer für die gute Zusammenarbeit. Ich danke meinen ehemaligen Mitbewohnern, Dr. med. Erwin Henemann und Samuel Kopping, die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Außerdem danke ich Karina Eyrich, Alfred Hock und Dr. med. Christoph Jänig für das kritische Lesen dieser Arbeit und für ihre Hilfe bei der sprachlichen und grammatikalischen Korrektur.

Zuletzt möchte ich mit von ganzem Herzen bei meinen Eltern Claudia und Theo Hock bedanken und bei meinem Ehemann Markus Hock, ohne deren aufmunternde Worte und deren Glaube an mich, diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ich habe euch unendlich lieb.

Danke

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „**Die Bedeutung des Mutationsstatus der Phosphatase mit Tensin-Homologie für die Ausbildung des *Brain Tumor Stem Cell* Phänotyps in Korrelation mit der Aldehyd-Dehydrogenase-1A1-Expression**“ in der Fachabteilung Neuropathologie des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. med. J. Schlegel ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert. Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst. Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich nicht einverstanden.

Kobenz, den 01.12.2015



Unterschrift

11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name und Vorname: Hock, Kathrin Anna Josepha
Geburtsdatum und -ort: 09.07.1985, Wertheim
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet

BERUFLICHER WERDEGANG:

seit 04/2014 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin am Bundeswehrzentral Krankenhaus in Koblenz
10/2013 – 04/2014 Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
07/2010 – 09/2010 Allgemeine Grundausbildung in Feldkirchen
07/2007 Beginn der Laufbahn als Sanitätsoffizier der Deutschen Bundeswehr

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

08/2007 – 10/2013 Studium der Humanmedizin in München
10/2013 2. Staatsexamen
04/2013 – 08/2013 Klinikum Rechts der Isar, München
 Teil des Praktischen Jahres, Anästhesie
02/2013 – 04/2013 Jewish General Hospital, Montreal, Kanada
 Teil des Praktischen Jahres, General Surgery
12/2012 – 02/2013 Klinikum Rechts der Isar, München
 Teil des Praktischen Jahres, Plastische Chirurgie
08/2012 – 12/2012 Spital Davos, Schweiz
 Teil des Praktischen Jahres, Innere Medizin
WS 2009/10 – SS 2013 Klinischer Studienabschnitt an der TU München
09/2009 1. Staatsexamen
WS 2007/08 – SS 2009 Vorklinischer Studienabschnitt LMU/TU München