

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik – Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

CD133 positive „Cancer Stem Cells“ in Gliomen verschiedener Malignitätsgrade

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karin Damianoff

aus
München

Jahr
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. Goldbrunner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Kirsten Lauber Prof. Dr. Andreas Straube
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. N. Thon
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2011

*Gewidmet
meiner lieben Mutter
und in dankbarer Erinnerung
meinem geliebten Vater.*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
1.1	Gliome	3
1.2	Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV	3
1.3	Cancer Stem Cells in Gliomen	6
1.4	CD133	7
1.5	Fragestellung der Arbeit	11
2	MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Chemikalien, Medien und Geräte	12
2.1.2	Antikörper und Normalseren	15
2.1.3	Enzyme und Kits	16
2.1.4	Lösungen und Puffer	17
2.1.5	Humanes Gewebe	18
2.2	Immunhistochemie	18
2.2.1	Silanisierung der Objektträger	18
2.2.2	Immunhistochemie an Kryostatgewebe	19
2.2.3	Immunhistochemie an Paraffingewebe	20
2.2.4	Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung	21
2.3	Western-Blot	21
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.4.1	RNA-Isolation	22
2.4.2	Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	23
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.5	Isolation der Tumorzellen	24
2.5.1	Isolation über das MACS [®] -System	25
2.5.2	Isolation über das Dynal-Bead-System	27
2.6	Zellkultur	27
2.7	Sphäroidkonfrontation	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Charakteristika der Patientenpopulation und der Gliome	29

3.2	CD133 in niedrig- und hochgradigen Gliomen	30
3.3	Musashi-I in niedrig- und hochgradigen Gliomen	37
3.4	Charakterisierung von CD133 positiven Stammzellen <i>in-vitro</i>	40
4	DISKUSSION	46
4.1	Allgemeines	46
4.2	Methodische Überlegungen	46
4.3	CD133 positive Zellen im nicht-neoplastischem Hirngewebe	48
4.4	Nachweis von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen	49
4.5	Stammzeleigenschaften von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen	52
4.6	Herkunft von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen	53
4.7	Ausblick	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	58
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	60
8	TABELLENVERZEICHNIS	61
9	LITERATURVERZEICHNIS	62
10	DANKSAGUNG	75
11	LEBENS LAUF	76

1 EINLEITUNG

1.1 Gliome

Der Begriff „malignes Gliom“ wurde erstmals 1864 von Rudolf Virchow (1821-1902) von den Melanomen und Sarkomen abgegrenzt. Eine erste systematische Klassifikation der Gliome erfolgte durch Bailey und Cushing im Jahr 1926, was noch heute Grundlage für die derzeit gültige WHO-Klassifikation ist. Dabei sind Gliome intraaxial gelegene Tumoren, die von den Stützzellen des Hirnparenchyms ausgehen und eine astrozytäre, oligodendrogliale oder auch ependymale Zelldifferenzierung aufweisen können. Nach der WHO-Klassifikation werden die Gliome in vier Grade eingeteilt. Dabei spielen für die Einteilung die mikroskopischen Merkmale wie Zelldichte, Zell- und Kernpolymorphie, mitotische Aktivität, Differenzierungsgrad, Endothelproliferate und Tumorgewebsnekrosen eine wichtige Rolle (Kleihues *et al.*, 2002; Reifenberger *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2007).

1.2 Das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV

Maligne Gliome machen etwa 70% aller Hirntumoren aus und sind mit einer Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen/Jahr/100.000 Einwohner die häufigsten primären Tumoren des ZNS im Erwachsenenalter. Trotz multimodaler Behandlungsstrategie ist die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung eines Glioblastoms (GBM) mit 12-15 Monaten sehr ungünstig (Stupp *et al.*, 2005) und die 5 Jahres-Überlebenszeit liegt bei unter 3% der Patienten (Ohgaki & Kleihues, 2005). Als Ursache hierfür werden die hohe zelluläre Proliferationsrate, die frühzeitige diffuse Invasion einzelner Gliomzellen in das umgebende gesunde Hirngewebe, deren Strahlen- und Chemotherapieresistenz und die dadurch bedingte hohe Rezidivrate angesehen (Croteau & Mikkelsen, 2001).

Das sogenannte primäre Glioblastom tritt vor allem im höheren Lebensalter (60.-70. Lebensjahr) auf und ist gekennzeichnet durch einen häufig therapieresistenten, rapid progressiven Verlauf. Das sekundäre Glioblastom, mit Maximum der Altersverteilung zwischen dem 40.-60. Lebensjahr, hingegen ist Folge einer sekundären Malignisierung eines initial niedriggradigen Glioms (WHO-Grad II) oder des

anaplastischen Astrozytoms (WHO-Grad III). Die Mehrzahl der Patienten stellt sich mit unspezifischen Leitsymptomen wie Kopfschmerzen, Wesensveränderungen sowie einem allgemeinen Leistungsabfall vor. Darüber hinaus können in Abhängigkeit der primären Lokalisation z. B. spezifische motorische, sensorische oder visuelle Defizite auftreten. Die symptomatische Epilepsie führt häufig zu einer diagnostischen Abklärung. Diese basiert neben der kernspintomographischen Bildgebung (MRT) (Abb. 1) und ggf. metabolischen Diagnostik (FET-PET) (Popperl *et al.*, 2006; Popperl *et al.*, 2007) zwingend auf einer histologischen Gewebsuntersuchung, die über eine offene Tumoroperation oder durch eine stereotaktische Gewebsentnahme erfolgen kann. Die Therapie hat einen rein palliativen Charakter und basiert aktuell auf einer konkomitanten Radio-Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid gefolgt von einer Temozolomid-Dauertherapie entsprechend dem EORTC-Protokoll (Stupp *et al.*, 2005). Dabei ist die Prognose der Patienten bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Intervalls vom Methylierungsstatus des MGMT Promoters, dem derzeit wichtigsten molekulargenetischen Marker mit prognostischer Relevanz, abhängig (Hegi *et al.*, 2005). Demgegenüber wird der prognostische Stellenwert der offenen Tumor-resektion in der Literatur kontrovers diskutiert, ist aber nach allgemeiner Auffassung im Falle eines lokal raumfordernden Effekts empfohlen. In aktuellen Studien konnte zudem die prognostische Relevanz der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) Resektion belegt werden (Stummer *et al.*, 2006; Stummer & Kamp, 2009). Große Erwartungen werden derzeit auf neue, „target“-spezifische Therapieansätze gerichtet.

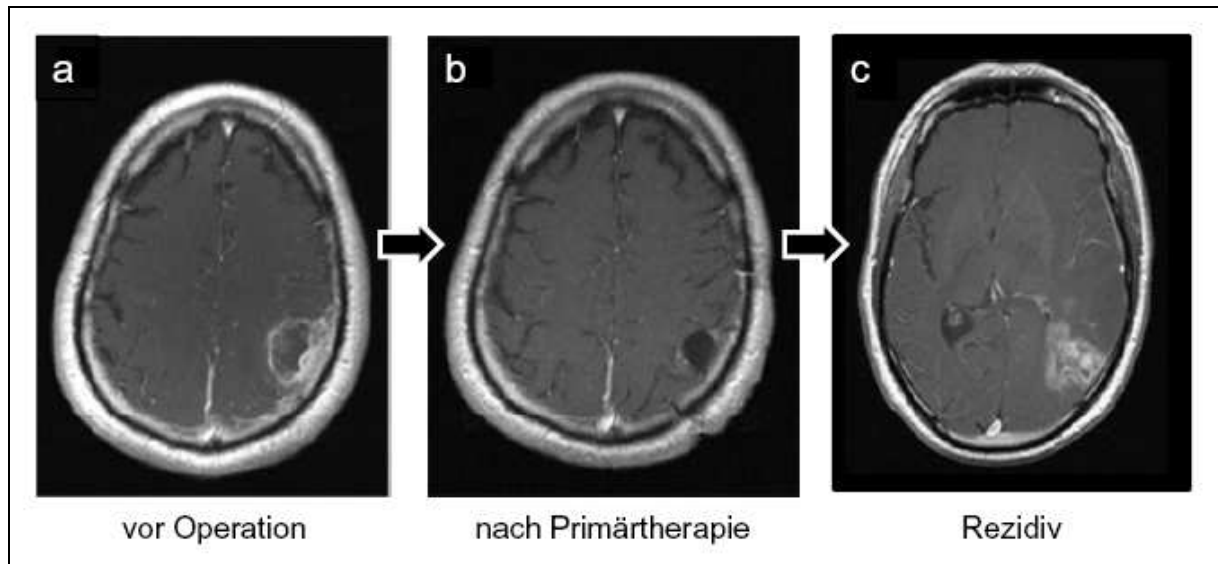


Abb. 1: T1-gewichtete Kernspintomographie mit links parietalem Glioblastom. a, Glioblastom vor Operation: bestehend aus einer zentralen hypodensen Zone (= Nekrose), dem solide-proliferierender Tumor, der Kontrastmittel aufnimmt und einem nicht abgrenzbaren Infiltrationsaum. c, Rezidiv des Glioblastoms nach erfolgter Primärtherapie.

Die primäre Entstehung sowie die Ursache der sekundären Malignisierung von Gliomen ist Gegenstand intensiver Forschung (Mischel & Cloughesy, 2003). Dabei zielte der wissenschaftliche Ansatz bisher auf die molekularen und zellulären Eigenschaften der soliden Tumormasse (Holland, 2001; Pardal *et al.*, 2003; Guha & Mukherjee, 2004; Humman & Helin, 2005). Histologisch zeichnet sich das Glioblastom durch eine ausgeprägte Kern- und Zellpolymorphie, eine erhöhte Mitoserate, diffuse Gefäßproliferate sowie durch Nekrosen aus (Abb. 2), wobei insbesondere letztere pathognomisch für die Malignität des Glioblastoms sind. Als Hinweis auf einen astrozytären Ursprung der entdifferenzierten Tumorzellen findet sich häufig eine positive GFAP-Expression (Pinsker *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 2004; Weingart *et al.*, 2006).

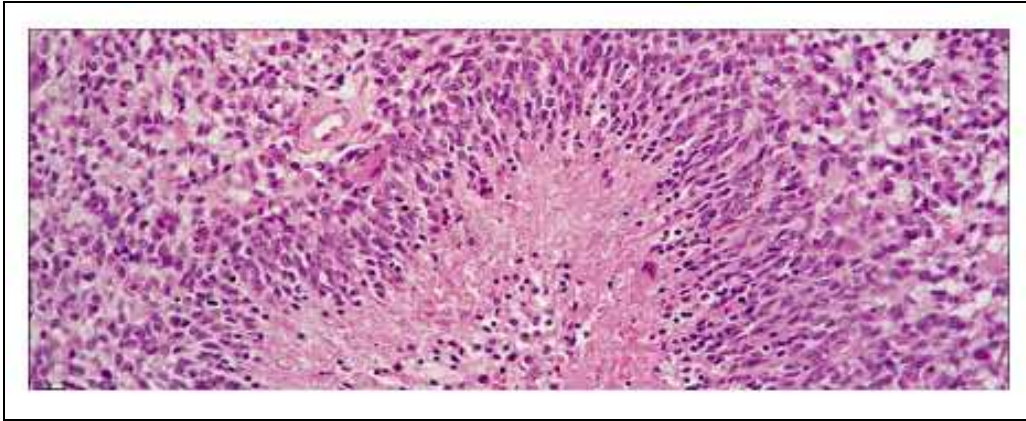


Abb. 2: Glioblastom WHO-Grad IV. HE-Färbung (Ellison *et al.*, 2004).

Bei der malignen Entdifferenzierung der Astrozyten spielen genetische Veränderungen, z. B. in Form einer Überregulation von bestimmten Tyrosin Rezeptor Kaskaden (z. B. PDGFR, EGFR und VEGFR) eine entscheidende Rolle (Weingart *et al.*, 2006). Beim primären Glioblastom wird der Verlust der Heterogenität (LOH) des gesamten Chromosoms 10, das Sitz verschiedener Tumorsuppressorgene ist, sowie eine EGFR-Amplifikation im Zusammenhang mit der Tumorentstehung diskutiert, während beim sekundären Glioblastom insbesondere eine p53-Mutation eine übergeordnete Rolle spielt (Ohgaki, 2005; Ohgaki & Kleihues, 2007). Dabei aktivieren irreparable Schäden an der DNA das p53-System, welches als „Wächter des Genoms“ die Apoptose einleitet.

1.3 Cancer Stem Cells in Gliomen

Während der embryonalen Entwicklung von Säugetieren spielen sogenannte Stammzellen eine entscheidende Rolle (Reya *et al.*, 2001; Pardal *et al.*, 2003). Sie zeichnen sich durch die kontrollierte Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotenten Differenzierung in verschiedenen Geweben aus (Reya *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2005). Zu diesen multipotenten Stammzellen zählt man auch die „neuralen Stammzellen“ (NSC), die die Fähigkeit besitzen, sich in neuronale, astro- und oligodendrogliale Zellen zu differenzieren (Lee *et al.*, 2005; Marzesco *et al.*, 2005). Im ausgereiften adulten zentralen Nervensystems sind NSC nur noch vereinzelt u. a. in der subventrikulären Zone des Großhirns und der glomerulären Zone des Kleinhirns

nachweisbar (Uchida *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Ihre funktionelle Rolle wird wissenschaftlich kontrovers u. a. im Zusammenhang mit möglichen regenerativen Prozessen des ZNS gesehen (Silani & Corbo, 2004; Riaz & Bradford, 2005). Interessanterweise ist die paraventriculäre Zone die häufigste Primärlokalisation von Gliomen im Erwachsenenalter (Sanai *et al.*, 2005) und das Kleinhirn Sitz des sogenannten Medulloblastoms im Kindesalter.

Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass innerhalb der Tumormasse von malignen Gliomen eine Subpopulation von Zellen existiert, die aufgrund ihrer Eigenschaften der unkontrollierten Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotenten Differenzierung analog zu den physiologischen Stammzellen als sogenannte „Cancer Stem Cells“ (CSC, auch „*Brain Tumor Stem Cells*“, BTSC) bezeichnet werden. Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des malignen Glioms (WHO-Grad IV) zuerkannt (Ignatova *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b). Dabei konnte gezeigt werden, dass selektiv diese Stammzellen ein ausgeprägtes tumorigenes Potential besitzen und bereits in geringer Anzahl (circa 100 Zellen) in der Lage sind, *in-vivo* Tumoren zu generieren. Unklar ist, ob diese CSC aus entarteten ortsständigen, ggf. eingewanderten physiologischen Stammzellen (Hudson *et al.*, 2004) oder aus bereits differenzierten Zellen durch wiederholte kanzerogene Transformation im Sinne einer Entdifferenzierung entstehen (Singh *et al.*, 2004a). Die Theorie der krebsinduzierenden Stammzelle ist bereits bei verschiedenen Formen der Leukämie (Bonnet & Dick, 1997; Auberger *et al.*, 2005), des Brustkrebses (Al-Hajj *et al.*, 2003), bei primären Tumoren der Niere (Florek *et al.*, 2005), der Prostata (Richardson *et al.*, 2004), beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Hilbe *et al.*, 2004) sowie beim hepatozellulärem (Yin *et al.*, 2007), kolorektalem (O'Brien *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007) und ovariellen Karzinom (Ferrandina *et al.*, 2008), etabliert.

1.4 CD133

CD133 (AC133) ist ein pentahelikales transmembranöses Glykoprotein (Abb. 3), das homolog zum Maus Prominin-1 ist, und sich an den Membranabschnitten der peripheren Zellausläufer lokalisiert (Fargeas *et al.*, 2003). Seine physiologische Funktion ist unbekannt (Piechaczek, 2001). Das Molekulargewicht von CD133

beträgt ca. 120 kDa (Miraglia *et al.*, 1997) und es ist auf dem Chromosom 4p16.2-p12 lokalisiert.

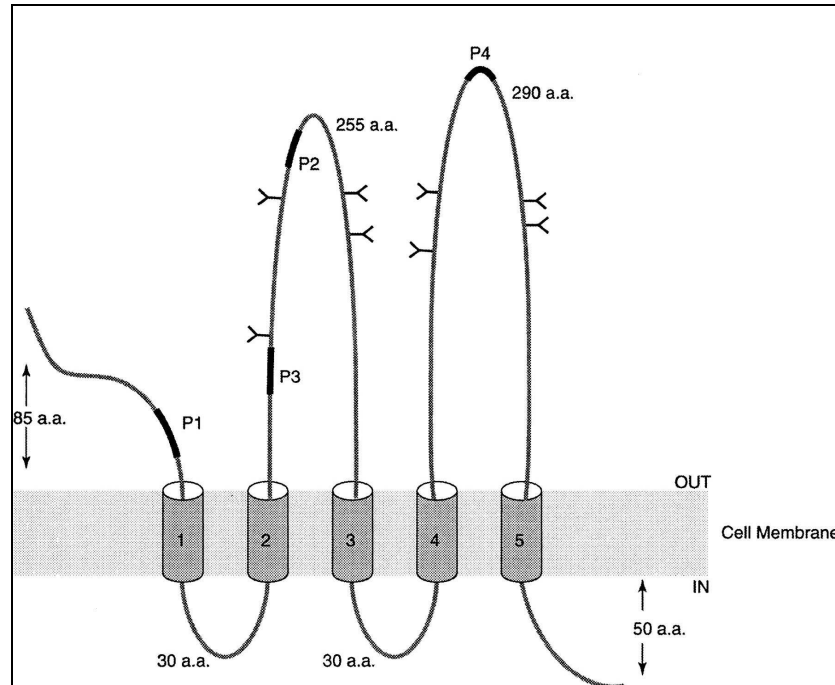


Abb. 3: Strukturmodell des CD133 Antigens. (Miraglia *et al.*, 1997)

CD133 ist ein etablierter Marker für hämatopoetische (Corbeil *et al.*, 1998; Jaatinen *et al.*, 2006) und neurale Vorläuferzellen (Kania *et al.*, 2005; Marzesco *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2005; Shmelkov *et al.*, 2005) sowie neuerdings für krebsinduzierende Stammzellen in verschiedenen Organsystemen (Horn *et al.*, 1999; Al-Hajj *et al.*, 2003; Hilbe *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2004; Auberger *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005; Florek *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Ferrandina *et al.*, 2008). In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass bis zu 20-30% der Zellen von humanen Glioblastomen ebenfalls positiv für CD133/Prominin sind (Singh *et al.*, 2003). Aus primären Operationsresektaten mittels magnetischer Zellseparation isolierte und in Kultur gebrachte CD133/Prominin positive Zellen zeigen *in-vitro* die bekannten Stammzeleigenschaften der Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotenten Differenzierung u. a. in neuronale, astrogliale und oligodendrogliale Zellen (Singh *et al.*, 2003). Singh *et al.* konnten 2004 erstmals nachweisen, dass

selektiv die aus humanen Glioblastomen isolierten CD133/Prominin positiven Zellen entgegen der restlichen Zellmasse in der Lage waren, auch nach serieller Implantation in immundefiziente Mäuse Glioblastome (WHO-Grad IV) zu bilden (Abb. 4). Diese besaßen die gleichen morphologischen Eigenschaften wie der ursprüngliche Tumor und bildeten sowohl CD133 positive als auch CD133 negative Gliomzellen. Die vom gleichen Gliompatienten isolierten CD133 negativen Zellen bildeten hingegen keine Sphäroide und waren in den NON-SCID Mäusen nicht tumorigen (Singh *et al.*, 2004b). Dies hat zur Theorie der CD133/Prominin positiven tumorigenen Stammzelle bei malignen Gliomen geführt (Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b). Offen bleibt zum derzeitigen Stand der Forschung welchen Ursprung die CD133 positiven Tumorstammzellen haben und welche Bedeutung sie in Bezug auf die Tumorentstehung, das Wachstumsverhalten, den infiltrativen Charakter sowie für die sekundären Malignisierung von Gliome haben.

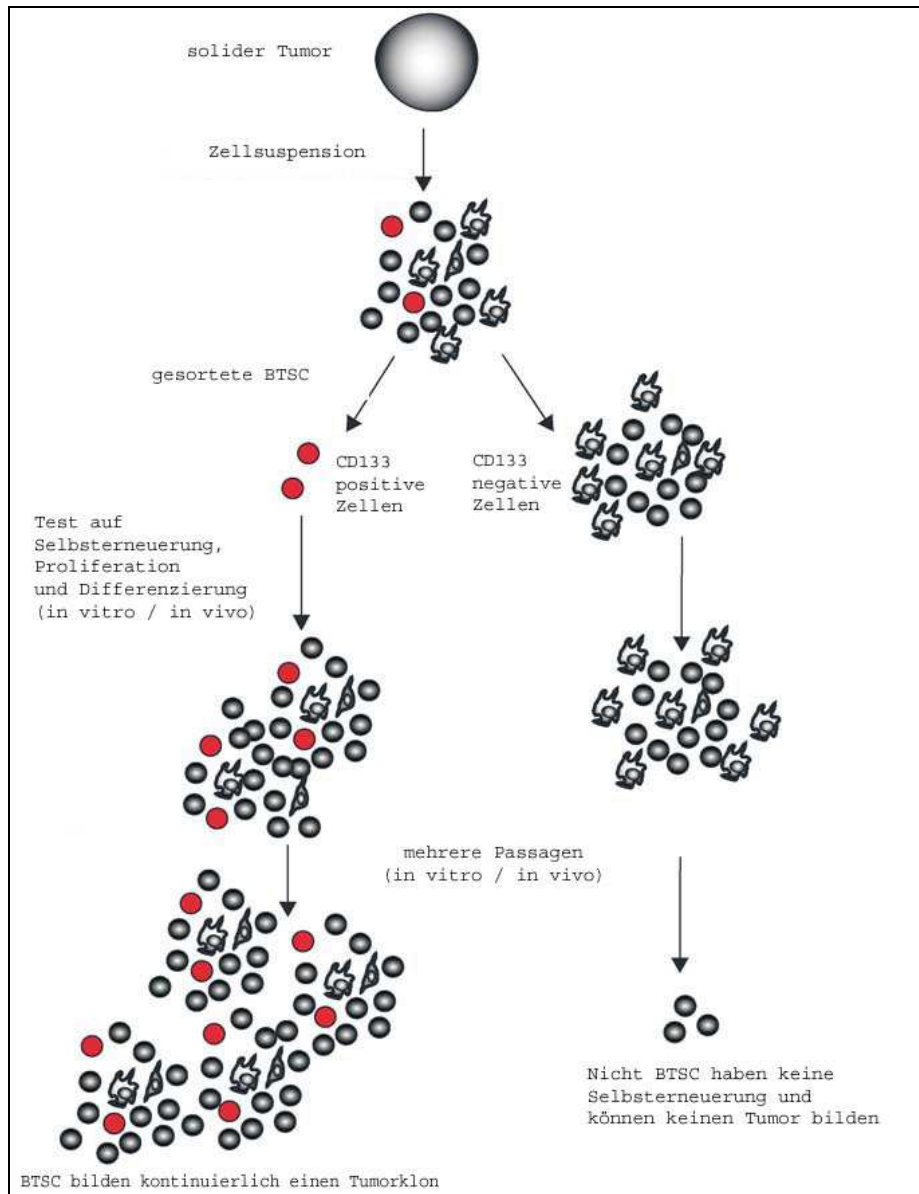


Abb. 4: Tumorigene Cancer Stem Cells. Erläuterungen siehe Text. (Modifiziert nach (Singh *et al.*, 2004b).

Neuere Untersuchungen an CD133 positiven Zellen haben ergeben, dass diese Zellen resistent gegenüber Chemotherapeutika wie Temozolamid, Carboplatin oder Paclitaxel, die häufig in der Therapie der malignen Gliome eingesetzt werden, sind und somit zur Entstehung eines Rezidiv beitragen können (Liu *et al.*, 2006). Desweiteren wurde zusätzlich eine Strahlenresistenz bei CD133 positiven Gliomzellen beobachtet, die den palliativen Einsatz der Strahlentherapie erklären könnte (Bao *et al.*, 2006a).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Lassen sich CD133 positive Zellen in humanem Gliomgewebe nachweisen?
2. Wie ist die Verteilung der CD133 positiven Zellen im Glioblastom im Hinblick auf den soliden versus den infiltrativen Tumoranteil bzw. der Bezug zum intratumoralen Gefäßsystem?
3. Sind CD133 positive neben dem Glioblastom auch im niedriggradigen Gliom WHO-Grad II sowie anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III *in-situ* nachweisbar?
4. Besitzen CD133 positive Zellen aus den WHO-Grad II und III Gliomen Stammzeleigenschaften *in-vitro*?
5. Gibt das Expressionsprofil der CD133 positiven Stammzellen Auskunft über die Herkunft dieser Stammzellpopulation in den Gliomen?

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

Die verwendeten Materialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Bei Firmensitz in der Bundesrepublik Deutschland ist nur der Ort angegeben.

2.1.1 Chemikalien, Medien und Geräte

Aceton	Fischer GmbH, Saarbrücken
Agarose	Sigma, Steinheim
Antibody Diluent with Background	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
BD Cell Strainer 40 µm und 100 µm	BD Biosciences, Bedford, USA
BD Falcon™	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Perfusion 50ml	BD Biosciences, Bedford, USA
Boric Acid	Sigma, Steinheim
CellLytic™ MT Mammalian Tissue Lysis, Extraction Reagent	Sigma, Steinheim
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Chloroform	Sigma, Steinheim
Chromogen AEC	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Criterion™ Cell	Bio-Rad, München
Criterion™ Precast Gel 4-20% Tris-HCl	Bio-Rad, München
Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Dako Cytomation Glycergel Mounting Medium	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Dako Cytomation Pen	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
DAPI dihydrochloride	Sigma, Steinheim
Deckgläser 24x50mm	Menzel Gläser, Braunschweig
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Steinheim

Dextran from <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sigma, Steinheim
Disposable Scalpel	pfm Produkte für die Medizin, Köln
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
DPBS mit Calcium, Magnesium, Sodium Pyruvat	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
DPX Mountant for histology	Fluka, Steinheim
Dynal Rotator	Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA
EDTA	Sigma, Steinheim
Endothelial Cell Basal-Medium	Promocell, Heidelberg
Ethanol absolut mit Petrolether vergällt	Apotheke Großhadern, München
Ethanol 96% mit Methylethylketon vergällt	Apotheke Großhadern, München
Ethanol 70% mit Methylethylketon vergällt	Apotheke Großhadern, München
Ethidiumbromid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fast Dil™	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Fast DiO™	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
FCS	Biochrom, Berlin
Filtereinheit 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Formaldehydlösung 4%	Fischer GmbH, Saarbrücken
Gelatine	Sigma, Steinheim
Glashomogenisator	Braun Biotech Int., Melsungen
Glycine	MP Biomedicals, Ohio, USA
Immun-Blot® PVDF / Filter Paper Sandwiches	Bio-Rad, München
Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad, München
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma, Steinheim
Kollagenase / Dispase	Roche Applied Science, Mannheim
Kryostat	Reichert-Jung, Nussloch
Loading Buffer 6x	Novagen, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München
MACS® MS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetic Separator VarioMACS®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

Methanol	Merck, Darmstadt
Mikrofotografie 35mm SLR-Kameras	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Minischüttler	IKA, Staufen
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,3M (NaCl)	Merck, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf
Nunclon™ Surface Zellkulturflasche	Nunc, Roskilde, Dänemark
Oligonukleotid-Primer	mwg Biotech, Ebersberg
PBS-Puffer, pH 7,4	Apotheke Großhadern, München
Penicillin-Streptomycin-Glutamine	Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA
Perfect DNA™ 50 bp Ladder	Novagen, Darmstadt
Petrischalen	BD Biosciences, Bedford, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, Plastik, 10, 100, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
PowerPAC™ 3000	Bio-Rad, München
Precision Plus Kaleidoscope™ Marker	Bio-Rad, München
Protein-Block	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Rotilabo® Mikrohomogenisatoren	Roth, Karlsruhe
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser, Braunschweig
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schlittenmikrotom	Microm GmbH, Heidelberg
Serum-free Differentiation Stem Cell Maintenance Media (dNSM)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Serum-free Neural Stem Cell Maintenance Media (mNSM)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Shandon Cryomatrix™	Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, USA
Sodium Dodecyl Sulfate Solution, 10%	Sigma, Steinheim
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München

3-(Triethoxysilyl)-propylamin	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
10x Tris Buffered Saline	Bio-Rad, München
10x Tris / Glycine Buffer	Bio-Rad, München
TRIZMA [®] Base	Sigma, Steinheim
TRIZMA [®] hydrochloride	Sigma, Steinheim
TRizol [®] Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypan Blue Solution	Sigma, Steinheim
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween [®] 20	Sigma, Steinheim
Wilovert 30 Standard Mikroskop	Leica, Wetzlar-Neuborn
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkultur Testplatte 96F	VWR International, Ismaning
Zentrifuge Sigma	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Universal 30 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Alle aufgeführten Chemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad von den Herstellern bezogen.

2.1.2 Antikörper und Normalseren

CD133 antibody (clone 32AT1672)	abcam, Cambridge, UK
CD133/1 Cell Isolation Kit (clone AC133)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FITC goat-anti-horseradish Mouse Ig	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Monoclonal mouse anti-human CD34 class II (clone QBEnd 10)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Mouse anti-human CD31 MAb (clone JC70A)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Mouse anti-human CD105 MAb (clone SM6h)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Mouse anti-human CD133/1-biotin MAb (clone AC133)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mouse anti-human CD133/2-biotin MAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

(clone 293C3)	
Mouse anti-human CD133/1 MAb (clone W6B3C1)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mouse anti-human GFAP MAb (clone 273807)	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse antineuron-specific beta-III tubulin Mab (clone TuJ-1)	R&D Systems, Wiesbaden
Rabbit anti-human Musashi-I PAb	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Rabbit anti-human VEGFR-3 Mab (clone ZMD 251)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Texas Red Anti-Rabbit IgG	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Ulex Europaeus I lectin (UEA-1)	Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA

2.1.3 Enzyme und Kits

CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAKO Cytomation, LSAB®+ System-HRP <i>Peroxidase Block, Biotinylated Link, Streptavidin-HRP, DAB+ Substrate Buffer, DAB+ Chromogen</i>	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Goat Anti-Mouse (GAM-)HRP Conjugate	Bio-Rad, München
Goat Anti-Rabbit (GAM-)HRP Conjugate	Bio-Rad, München
Immun-Star™ AP Substrate Pack <i>Luminol (enhancer), Peroxid-Puffer</i>	Bio-Rad, München
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad, München
1 st Strand cDNA Synthesis Kit (AMV)+	Roche Applied Sciences, Mannheim

2.1.4 Lösungen und Puffer

Agarose-Gel 2%	4g Agarose + 100ml 1x TBE-Puffer, dieses durch Erhitzen auflösen, 4µl Ethidiumbromid dazugeben, Gel gießen, polymerisieren lassen
Citratpuffer	Stammlösung A: 21,01g/l 0,1M Citronensäure-Monohydrat Stammlösung B: 29,41g/l 0,1M tri-Natriumcitrat-Dihydrat Citratpuffer: 9ml Lsg. A + 41ml Lsg. B, ad 450ml Aqua dest. (pH 6,0)
Dextran 15%	20ml Isolationsmedium, 3g Dextran, bei 37°C aufgelöst
Gelatinelösung 2%	0,2ml Gelatine, 9,8ml DPBS
Inkubationslösung	10ml Milchpulverlösung 5%, 190ml TTBS
Isolationsmedium (IM)	470ml DMEM, 25ml FCS, 5ml Pen/Strep/ Glut
MACS [®] -Puffer (PBS/ 0,5% FCS/ 2mM EDTA)	497,5ml PBS + 2,5ml FCS, davon 2ml PBS/ FCS entnehmen, dann Zugabe von 2ml steril filtriertem EDTA 0,5M
Milchpulverlösung 5%	3g Milchpulver, 60ml TTBS
Phosphate buffered Saline (PBS)	50ml PBS-Puffer, 450ml Aqua dest.
SDS (sodium dodecyl sulfat) - Laufpuffer	3,94 g Tris-HCl, 14,4g Glycine, 10ml einer 10%igen SDS-Lösung, auf 1l mit H ₂ O aufgefüllt und mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt
TBE-Puffer (5x)	54 g TRIZMA [®] Base, 27,5 g Boric Acid, 20 ml 0,5M EDTA, auf 1l mit Aqua dest. aufgefüllt (pH 8,0)
Transferpuffer	100ml 10x Tris / Glycine Buffer, 700ml H ₂ O, 200ml Methanol, auf pH 8,3 eingestellt

Tris-Puffer	6,06g TRIZMA [®] Base 50mM, 17,53g NaCl 0,3M, 1ml Tween [®] 20 0,1%, auf 1l mit H ₂ O aufgefüllt und mit HCl pH 7,6 eingestellt
TTBS mit 0,05% Tween [®] 20	100ml 10x Tris Buffered Saline, 900ml H ₂ O, 350µl Tween [®] 20

2.1.5 Humanes Gewebe

Das humane Gewebe zur Herstellung der Primärkulturen wurde im Rahmen des Gliomverbundes (Ethikantrag: Projektnummer 084-06) für die *in-vitro* Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten mit de novo Gliomen WHO-Grad II bis IV, bei denen bisher keine Radio- und/oder Chemotherapie durchgeführt wurde. Die histopathologische Diagnose erfolgte entsprechend den WHO Kriterien (Kleihues *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2007).

2.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen für die Anwendung an Paraffin- und Kryostatgewebe angepasst. Dabei erfolgte die Immunhistochemie auf silanisierten Objektträgern, um eine bessere Haftung der zu untersuchenden Tumorgewebsschnitte zu ermöglichen.

2.2.1 Silanisierung der Objektträger

Die Objektträger wurden zunächst 5 Minuten in Aceton entfettet, gereinigt und bei 60°C getrocknet bevor eine Beschichtung mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin als Haftungsgrundlage durchgeführt wurde. Daraufhin folgten wiederholte Waschschrte mit Aceton und Aqua dest., bevor die Objektträger über Nacht bei 60°C getrocknet wurden.

2.2.2 Immunhistochemie an Kryostatgewebe

Die operativ gewonnenen Gewebeproben wurden nach der Entnahme kryokonserviert, d.h. sofort (<10 min) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt, um eine optimale Gewebsqualität zu erhalten. Mit dem Kryostaten wurden bei -25°C 10 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Immunhistochemie erfolgte auf Basis der Avidin-Biotin-Methode (LSAB[®]+ Kit), bei der ein biotinylierter sekundärer Antikörper mit peroxidasekonjugierten Streptavidinmolekülen reagiert (Abb. 5). Das Protokoll für die CD133 Immunhistochemie (IHC) wurde erstmals im Rahmen des Forschungsvorhabens entwickelt und die IHC für Musashi-I wurde in Anlehnung an die Literatur ebenfalls für humanes Tumorgewebe adaptiert (Hemmati *et al.*, 2003).

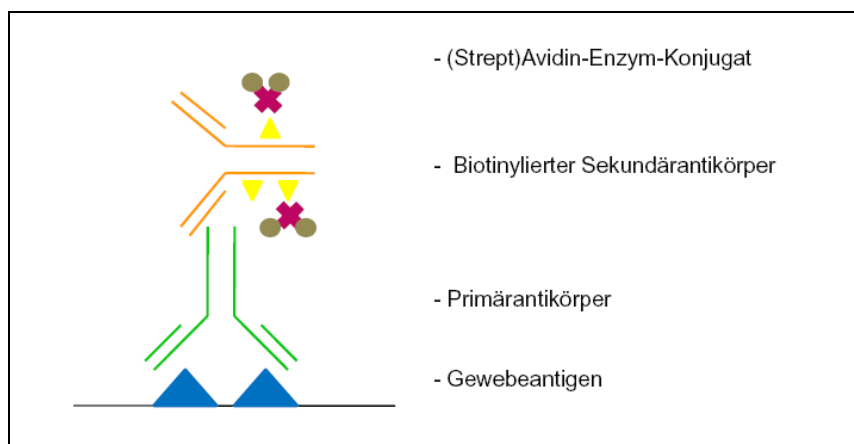


Abb. 5: Labeled (Strept)Avidin Biotin Technik (LSAB). (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Konjugate binden an biotinylierte Sekundärantikörper.

Um eine unspezifische Farbreaktion zu vermeiden, wurden die Kryoschnitte zunächst mit 3% Wasserstoffperoxid zur Blockade der endogenen Peroxidase sowie mit dem Proteinblock vorbehandelt. In einem nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern in einer feuchten Inkubationskammer entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei +4°C über Nacht. Die primären Antikörper CD133/1-Biotin und CD133/2-Biotin wurden im Antibody Diluent im Verhältnis 1:50 verdünnt. Den Gewebsschnitten, die mit Musashi-I in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert wurden, musste zusätzlich für 30 Minuten ein biotinylierter Sekundärantikörper

(Biotinylated Link) hinzugegeben werden. Darauf folgend konnte die Streptavidin Peroxidase, die bei Raumtemperatur für weitere 20 Minuten hinzugefügt wurde, an den biotinylierten Sekundärantikörper binden und den Farbumschlag der Chromogenlösung (3,3-Diaminobenzidin bzw. Aminoethylcarbazol) nach einer variable Inkubationszeit (4-8min) induzieren. Nach jeder Inkubation erfolgte der obligatorische Waschschrift mit Tris-Puffer. Für die Hämatoxilin–Gegenfärbung wurde das in Aqua dest. gewaschene Gewebe 15 Sekunden in Mayers Hämalaun-Lösung inkubiert und weitere 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Proben wurden mit Dako Cytomation Glycergel Mounting Medium eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Für die Negativkontrollen wurde dasselbe Protokoll jedoch ohne Verwendung des primären Antikörpers angewendet. Die semiquantitative Auswertung sowie Fotodokumentation wurde mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25 durchgeführt. Dafür wurden jeweils fünf aufeinander folgende Kryostatgewebe betrachtet und die für den primären Antikörper positiven Zellanhäufungen und Einzelzellen ausgezählt.

2.2.3 Immunhistochemie an Paraffingewebe

Das in paraffineingebettete Tumormaterial wurde mit dem Mikrotom in 8µm dicke Gewebsschichten geschnitten, auf silanisierte Objektträger übertragen und bei +60°C über Nacht getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte mittels Xylol, die Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe, beginnend bei 100% Ethanol, über 96% Ethanol und 70% Ethanol bis hin zu Aqua dest. Nach wiederholter Spülung in Tris-Puffer wurden die Gewebeschnitte für die Epitop-Demaskierung in eine Citratpufferlösung gegeben und diese, vorzugsweise bei 600 Watt in der Mikrowelle, aufgekocht. Die Immundetektion erfolgte ebenfalls über den Einsatz des LSAB[®]+ Kits und wurde unter 2.2.2 bereits ausführlich beschrieben. Im Anschluss an die Farbreaktionen mit DAB und Hämatoxilin wurden die Schnitte erneut in aufsteigender Ethanolreihe entwässert, in Xylol entalkoholisiert und anschließend in DPX Mountant[®] eingebettet.

2.2.4 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunzytochemie erfolgte an Zellkulturen, die in einer gelatinierten 96-Well Platte ausplattiert und mit einer Mischung aus 50% Aceton/ 50% Methanol fixiert wurden. Für die Färbung wurden anti-mouse (FITC-green) und anti-rabbit (Texas red) fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper benutzt, die in einer Verdünnung von 1:25 verwendet wurden. Die Gegenfärbung wurde mit DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol) durchgeführt. Als Eindeckmedium wurde das Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium gebraucht. Für die Immundoppelfärbungen wurde das Standardprotokoll entsprechend abgeändert. Die Auswertung sowie Fotodokumentation erfolgte mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25.

2.3 Western-Blot

Neben der Immunhistochemie wurden die Expressionen von CD133 und Musashi-I mittels eines eigens entwickelten Western-Blots untersucht. Hierzu wurden Tumorgewebestücke mechanisch homogenisiert und mit CellLytic^{MT} lysiert. Der Proteingehalt der jeweiligen Tumorlysate wurde photometrisch bestimmt. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden äquivalente Mengen der Tumorlysate im Laufpuffer, bestehend aus dem Laemmli Sample Buffer und 5% 2-Mercaptoethanol, das eine vollständige Denaturierung der Proteine bewirkt, gelöst und zur Elektrophorese in die Geltaschen aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend im 4-20% Tris-HCl Gel bei 220 Volt über 45 Minuten entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Das Auftragsschemata erfolgte standardisiert, d.h. neben dem Precision Plus KaleidoscopeTM Marker wurde jeweils eine Probe des Proteingemisches von WHO-Grad IV, III, II und Normalhirn sowie eine Positivkontrolle aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine auf eine Methanol benetzte Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran transferiert (Semi-Dry-Blot, 25 Volt, 300 mA, 1 Stunde). Dabei blieb das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran zur Minimierung unspezifischer Signale blockiert. Dafür eignete sich eine 5% Milchpulverlösung, die für 50 Minuten den Blot überschichtete. Es folgten wiederholte 5-minütige Waschschrte in TTBS. Danach kam für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über

Nacht bei +4°C der 1. Antikörper mouse anti-human CD133/1 MAb (clone W6B3C1) bzw. rabbit anti-human Musashi-I PAb jeweils in einer Verdünnung von 1:100 zum Einsatz. Nach dem Waschen in TTBS zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, goat-anti-mouse bzw. goat-anti-rabbit HRP- (horseradish peroxidase) gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:20000 und der 1:10000 verdünnte StrepTactin-HRP konjugierte Antikörper. Dieser Spezies-spezifische sekundäre Antikörper diente zum Nachweis der spezifischen Bindung des primären Antikörpers an die Epitope des Antigens. Durch den 5-minütigen Einsatz des Immun-Star™ AP Chemiluminescent Kits, bei dem 1ml Luminol (enhancer) mit 1ml Peroxid-Puffer gemischt wurden, konnte HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysieren, bei der eine Lumineszenz detektiert werden konnte. Der Nachweis erfolgte durch Radiographie auf Röntgenfilmen.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Neben der Proteinexpression wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit die Transkription der mRNA von CD133 und Musashi-I im Gliomgewebe untersucht. Hierzu wurde zunächst die gesamte RNA aus den Gewebeproben isoliert, mittels der Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels der Standard PCR entsprechend eines Amplifikationsprotokolls vervielfältigt.

2.4.1 RNA-Isolation

Für die Isolation der gesamten RNA aus einem Tumorgewebsstück wurde folgendes Protokoll verwendet: Je 100 mg homogenisiertes Gewebe wurde in 1 ml TRIzol® gelöst, 5 Minuten im Thermomixer bei 30°C inkubiert und anschließend mit Chloroform in der Zentrifuge versetzt (15 Minuten, 4°C, 12000 rpm). Die nun entstandene obere wässrige Phase enthielt die gesamte RNA. Diese wurde vorsichtig abpipettiert, mit 0,5 ml Isopropanol inkubiert (10 Minuten, 30°C) und anschließend ebenfalls zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 12000 rpm). Das dabei

gewonnene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, und nach neuerlicher Zentrifugation (5 Minuten, 4°C, 7500 rpm) in 0,1%DEPC /0,2% SDS in Aqua dest. resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und zum Ausschluss einer möglichen DNA-Kontamination ein 1,0%iges Agarose-Gel gefahren.

2.4.2 Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient zum Synthetisieren von cDNA aus RNA, um diese anschließend als Template für eine PCR zu verwenden. Je 1 µg der Gesamt-RNA einer Probe wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (AMV)+ nach Firmenangaben gemischt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit Hilfe des RoboCyclers[®] Gradient 96, der das Programm mit folgenden Zyklen durchlief: 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und 5 Minuten bei 4°C. Die synthetisierte cDNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR, die zur Amplifikation eines spezifischen Bereichs der DNA dient, benötigte man speziell maßgeschneiderte Oligonukleotidprimer (vgl. Tab. 1), die zu der gewünschten DNA-Sequenz komplementär waren.

Transkript	Typ	Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur	Zyklen	Produkt Größe (pb)	Acc. Number
CD133	Vorwärts	CCTGAAGAGCTTGCACCAAC	59	30	183	MIM604365
	Rückwärts	GTGGAAGCTGCCTCAGTTCA				
Musashi-I	Vorwärts	AGCTTCCCTCTCCCTCATTC	59	30	181	NM 002442
	Rückwärts	GAGACACCGGAGGATGGTAA				

Tab. 1: Oligonukleotidprimer.

Der Reaktionsansatz mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 10 µl Hot start Taq, 7µl steriles Wasser, 1µl des Vorwärtsprimers, 1µl des Rückwärtsprimers und 1 µl cDNA. Die PCR-Reaktion erfolgte mit 30 Reaktionszyklen bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt (30 Sekunden, 94°C), einem Hybridisierungsschritt („annealing“) (30 Sekunden, 59°C) und einem Elongationsschritt (1 Minuten, 72°C). Durch die Erhöhung der Temperatur auf 94°C wurde zunächst der DNA-Doppelstrang getrennt, so dass es danach durch die Abkühlung des Gemisches auf 59°C zur Hybridisierung der vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommen konnte. Durch den Zusatz von Desoxyribonucleotiden und der Taq-Polymerase wurden die beiden Einzelstränge wieder zu einem Doppelstrang komplementiert.

Um den Erfolg der PCR auswerten zu können, wurden jeweils 9 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Loading Buffer gemischt, sowie zur DNA-Fragmentgrößenbestimmung in eine benachbarte Geltasche 10 µl des DNA Molekulargewichtsmarkers Perfect DNA Ladder, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Größe im elektrischen Feld. Nach dem Anfärben der Banden mit Ethidiumbromid wird die Anzahl, Abgrenzbarkeit und Größe der Banden unter einer UV-Lampe beurteilt und dokumentiert.

Das oben beschriebene Protokoll wurde für einige Versuche variiert, indem die Anzahl der Reaktionszyklen verändert wurde. Die PCR-Reaktion lief somit zusätzlich zu den 30 mit 19, 21, 23, 25 und 27 Zyklen.

2.5 Isolation der Tumorzellen

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden primäre humane Tumorsektate verwendet. Die histopathologische Beurteilung des intraoperativ entnommenen Gewebes erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik durch die Kollegen der Neuropathologie entsprechend der WHO Graduierung (Deimling *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2007). Die Isolation erfolgte entsprechend dem im Labor etablierten Protokoll zur Gewinnung von humanen Endothelzellen (Miebach *et al.*, 2006) und wurde für die Anwendung für die Stammzellen adaptiert:

Das humane Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in 4°C kaltes Isolationsmedium (IM) gegeben und innerhalb von 10 Minuten aus dem Operationssaal ins Labor gebracht. Die Isolation und anschließende Kultivierung der Tumorzellen erforderte sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Deshalb wurden alle Arbeiten mit den Zellkulturen an aseptischen Sterilbänken durchgeführt. Das Tumorgewebe wurde in IM aufgenommen, in eine Petrischale überführt und sichtbare große Gefäße sowie Meningen mit einem Skalpell vorsichtig entfernt. Ein Teil des Gewebes wurde für die Immunhistochemie, den Protein- und RNA-Nachweis abgetrennt und separat asserviert. Das restliche Tumorgewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und anschließend homogenisiert, bis eine milchige Suspension ohne sichtbare Gewebereste entstand. Diese Zellsuspension wurde in ein Falcon übertragen und für 10 Minuten bei 4°C und 2200 U/min zentrifugiert. Die Myelinseparation erfolgte durch die Wiederaufnahme des Pellet in 15% Dextran und der anschließenden Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 4900 U/min). Die oberste weiße Schicht, die das abzentrifugierte Myelin enthielt, wurde abpipettiert, das Zellpellet in IM vom Falcon gelöst, resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 4900 U/min). Dieser letzte Schritt wurde nochmals wiederholt, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Für den enzymatischen Verdau diente eine steril filtrierte Mischung aus 400 µg Kollagenase / Dispase auf 40 ml IM. Die darin gelöste Zellsuspension wurde in einer Kulturflasche bei 37°C für 2-3 Stunden mit ca. 150 U/min auf einem Minischüttler inkubiert. Die Einzelzellsuspension wurde filtriert und für die Kollagenaseabtrennung zweimal in IM für 10 Minuten bei 2200 U/min bei Raumtemperatur gewaschen.

2.5.1 Isolation über das MACS[®]-System

Die weitere Isolation der Zielpopulation erfolgte über das MACS[®]-System. Hierzu wurden auf je 100 µl Zellsuspension 20 µl magnetisch gekoppelte CD133 (AC133) Antikörper (CD133 MicroBeads[®]) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Zellsuspension zum Waschen in MACS[®]-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (10 Minuten, 20°C, 2000 U/min). Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und das Zellpellet erneut in 500 µl Puffer gelöst. Die MACS[®]-Column

wurde in das magnetische Feld des VarioMACS[®] eingesetzt und mit MACS[®]-Puffer befeuchtet. Die positive Selektion über das MACS-System[®] wurde folgendermaßen durchgeführt:

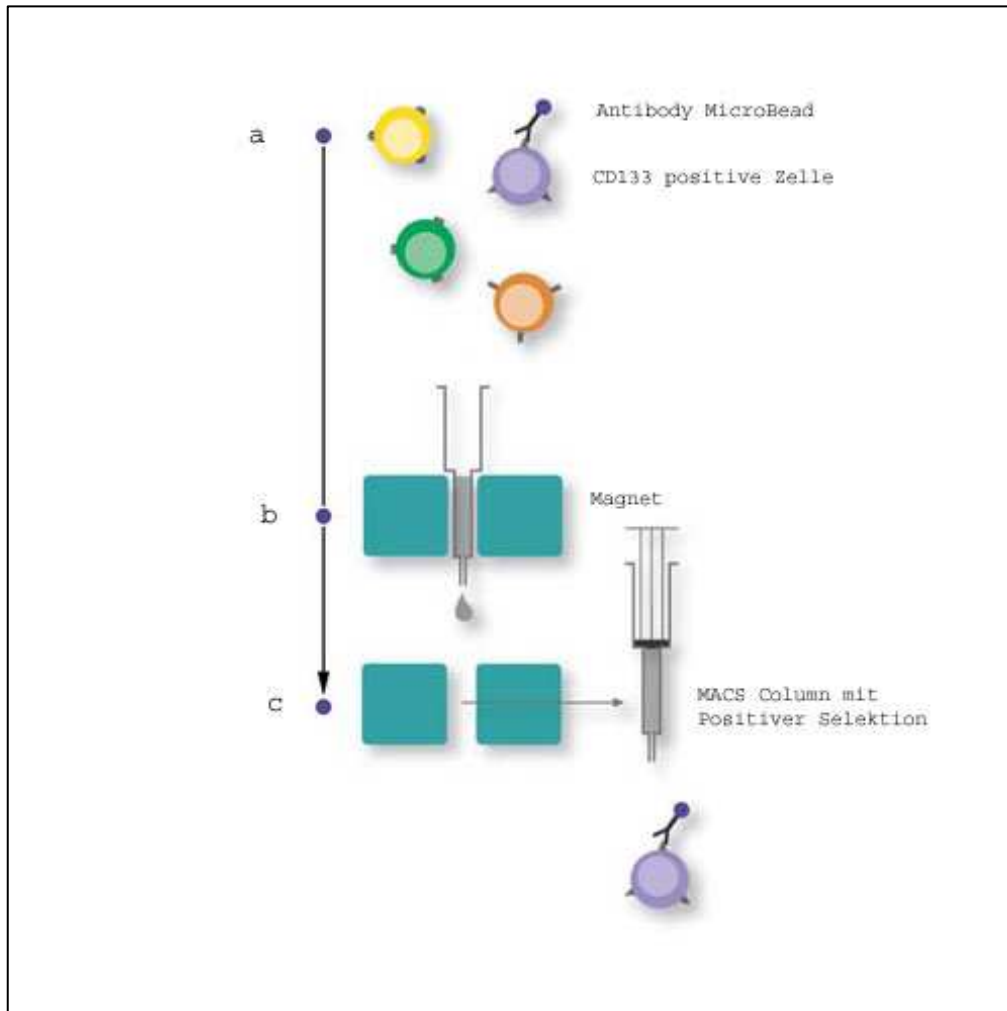


Abb. 6: Positive Selektion über das MACS[®]-System. Erläuterungen siehe Text

Die gesuchten CD133 positiven Zellen, die nun mit MACS[®] MicroBeads verbunden waren (Abb. 6a), blieben aufgrund der magnetischen Wirkung des VarioMACS[®] Systems im MACS[®]-Column (Abb. 6b) hängen. Nach Spülung dieser Säule mit MACS[®]-Puffer, wurde sie aus dem Magneten entnommen und durch Zugabe des Puffers wurden die gelabelten Zellen mit dem Stempel aus ihr ausgewaschen (Abb. 6c). Für eine höchstmögliche Ausbeute sowie Reinheit der Zielpopulation wurde dieser Isolationsschritt sowohl mit dem Überstand („negative sorting“) als auch mit der Zielpopulation („positive sorting“) wiederholt durchgeführt. Die nun endgültig

aufgereinigte Zielpopulation („positiv sorting“) wurde zentrifugiert (10 Minuten, 2200 U/min), in Medium aufgenommen, ausgezählt und in mit Gelatine beschichtete Kulturflaschen übertragen.

2.5.2 Isolation über das Dynal-Bead-System

Die Isolation wurde auch alternierend mit dem CELlection™ Pan Mouse IgG Kit durchgeführt. Dabei erfolgten die Antikörper-CD133-Kopplung und die Zellseparation analog zum MACS®-System über Beads und deren magnetischen Wirkung.

Für die Antikörperpräparation wurden 25µl Bead-Flüssigkeit in 0,1% BSA-PBS-Puffer gewaschen und daraufhin mit 1µl mouse anti-human CD133/1-biotin MAb bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dynal-Rotator gemischt. Zu der anschließend im Magneten mit PBS / 1% BSA gewaschenen Antikörper-Bead-Flüssigkeit wurde die Pellet-Suspension hinzugegeben und für 30 Minuten auf einem Rotator bei +4°C inkubiert. Die gesuchten Zellen, die nun mit dem Antikörper und dem daran hängenden Bead verbunden waren, wurden im Magnetsorter von den negativen, nicht magnetisch markierten Zellen getrennt. Der Überstand, der das Neaktiv-Sorting enthielt, wurde entfernt und das Eppendorf mit der Zielpopulation aus dem Magneten entnommen. Das Bead-Pellet wurde mit 200µl warmen Endothelzellmedium (ECM) resuspendiert und für die Abtrennung der Bead-Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Dynal-Rotator mit 8µl DNase inkubiert. Es folgten neuerliche Waschschrte im Endothelzellmedium. Der Überstand mit der Zielpopulation wurde abpipettiert, im Medium resuspendiert und in einer mit Gelatine beschichteten Kulturflasche ausplattiert.

2.6 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen wurden in Brutschränken bei 5% CO₂, 37°C und wassergedämpfter Atmosphäre kultiviert. Für die Kultivierung der isolierten CD133 positiven Zellen standen spezielle, kommerziell erhältliche Medien, wie das serum-free neural stem cell maintenance (mNSM) and differentiation media (dNSM) und das Endothelial Cell Differentiation Media (ECM), zur Verfügung. Die Zellen

wurden innerhalb der ersten Woche täglich und dann im dreitägigen Abstand mit frischem Medium versorgt und regelmäßig unter dem Mikroskop hinsichtlich der Ausdehnung des Zellrasens und einer eventuellen Kontamination begutachtet.

2.7 Sphäroidkonfrontation

Die CD133 positiv selektierten Zellen wurden für 2 Minuten bei 37°C aus der Zellkulturfalsche mit Trypsin abgelöst, dann im Medium abgestoppt, in ein neues Falcon Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Medium aufgenommen, die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und danach eine Verdünnung hergestellt, die 3000 Zellen pro 40µl Medium entspricht. Als Medium wurde das Endothelzellmedium verwendet. Anschließend wurden 40µl dieser Zellsuspension in den Petrischalen Deckel aufpipettiert, die untere Petrischale mit Medium befüllt und der Deckel vorsichtig aufgesetzt. Nach 3 Tagen hatten sich runde Sphäroide im hängenden Tropfen gebildet. Analog wurde dies mit U373-GFP transfizierten Zellen durchgeführt.

Die CD133 positive Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit Fast DiITM Stocksolution in einer Konzentration von 75 µg/ml rot und die U373-GFP transfizierten Zellen mit Fast DiOTM grün angefärbt. Um eine Überführung des Farbstoffs in den Konzentrationsversuch zu vermeiden, wurden die stark rot gefärbten Sphäroide in einen Tropfen mit PBS gegeben und dann auf eine 96-well agarbeschichtete Platte gesetzt. Die grünen U373-GFP transfizierten Zellen wurden unter einem Mikroskop zu den CD133 positive Zellen in die Agarplatte gegeben und mittels einer Nadel wurden diese beiden Sphäroide aneinander geschoben. Eine Fotodokumentation erfolgte sogleich, nach 4, 8, 24 und 48 Stunden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakteristika der Patientenpopulation und der Gliome

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Tumore von Patienten mit gutem Karnofsky Index (KPS>70) ausgewählt, bei denen ein Gehirntumor neu diagnostiziert wurde und die weder mit Radio- noch mit Chemotherapie vorbehandelt wurden. Die Tumorgewebeproben wurden von Patienten, die in der Neurochirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München operiert worden sind, gewonnen. Darunter befanden sich histologisch gesicherte Proben von zehn WHO-Grad II Gliomen (sechs vom diffusen Astrozytom, zwei vom Oligoastrozytom und jeweils eins vom gemistozytischen bzw. protoplasmatischen Astrozytom), von insgesamt zwölf WHO-Grad III Gliomen (neun vom anaplastischen Astrozytom und drei vom anaplastischen Oligoastrozytom) und von 22 Glioblastomen WHO-Grad IV (siehe Tab. 2).

Desweiteren wurden sechs nicht-neoplastische Hirngewebe für die Kontrollgruppe verwendet (siehe Tab. 2). Dafür wurde nur Zugangsgewebe von Epilepsiepatienten eingeschlossen, welches keine morphologische Veränderung, wie z. B. eine Ammonshornsklerose, aufgewiesen hat.

Das mittlere Alter der Patienten betrug bei Diagnosestellung bei WHO-Grad IV Gliomen 57,8 Jahre (von 28 bis 87 Jahre), bei WHO-Grad III Gliomen 45,8 Jahre (von 25 bis 74 Jahre), bei WHO-Grad II Gliomen 37,3 Jahre (von 18 bis 64 Jahre) und in der Kontrollgruppe 38,3 Jahre (von 21 bis 64 Jahre). Dabei war das Verhältnis der weiblichen und männlichen Studienteilnehmer in allen Subpopulationen ausgeglichen. Bezüglich der Lokalisation der Tumore gab es keine Präferenz (siehe Tab. 2). Patienten mit einem malignen Hirntumor wurden insbesondere durch Kopfschmerzen, Wesensveränderungen sowie fokalneurologischen Ausfällen auffällig, während Patienten mit einem WHO-Grad II Gliom häufig epileptische Anfälle hatten. Es bestanden keine signifikanten Co-Morbiditäten.

	Nicht-neoplastisches Hirngewebe	WHO-Grad II Gliome	WHO-Grad III Gliome	WHO-Grad IV Gliome
Histopathologische Diagnose (WHO)	5x Epilepsie 1x Trauma	6x diffuses Astrozytom 2x Oligoastrozytom 1x gemistozytisches Astrozytom 1x protoplasmatisches Astrozytom	9x anaplastisches Astrozytom 3x anaplastisches Oligoastrozytom	
Anzahl	n = 6	n = 10	n = 12	n = 22
Alter (Jahre)	38 ± 20	37 ± 26	47 ± 24	57 ± 32
Geschlecht (weiblich / männlich)	2 / 4	5 / 5	6 / 6	12 / 10
Lokalisation des Tumors (links / rechts)	2x frontal 4x temporal (2 / 3)	8x frontal 2x temporal (6 / 4)	9x frontal 2x temporal 2x parietal 2x Insula (5 / 7)	11x frontal 9x temporal 2x parietal (10 / 12)
Vorbehandlung	4/6 AED Langzeitbehandlung mit Antiepileptika	keine	keine	Keine
Symptome	83% Epilepsie	50% Krämpfe 40% psychoorgan. Syndrom 20% Nausea	64% Krämpfe 43% Kopfschmerzen 35% psychoorgan. Syndrom 28% Aphasie 4% (Hemi-) Parese	50% Kopfschmerzen 30% psychoorgan. Syndrom 25% Aphasie 13% Krämpfe 13% Parese

Tab. 2: Charakteristika der Patientenpopulation und der Gliome.

3.2 CD133 in niedrig- und hochgradigen Gliomen

Zunächst wurde in einem ersten experimentellen Versuchsaufbau untersucht, ob sich in humanem Gliomgewebe CD133 positive Zellen nachweisen lassen. Hierzu wurde die *in-situ* Expression des Oberflächenproteins CD133 im primären Tumorgewebe mittels Immunhistochemie untersucht. Es wurden zwei kommerziell erhältliche Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope von CD133 gerichtet sind (AC133/1 und AC133/2, Miltenyi-Biotech) verwendet, wobei sich eine höhere Färbintensität für AC133/1 an den Kryoschnitten zeigte. Entsprechend der Herstellerangaben konnte keine spezifische reproduzierbare Färbung für CD133 an Paraffingewebe etabliert werden. Die Auswertung sowie die Dokumentation der immunhistochemischen Daten

bezüglich der Anzahl und der Verteilung der CD133 positiven Zellen innerhalb des Tumorgewebes erfolgte mittels der Durchlichtmikroskopie.

Zwölf der 16 Glioblastome (75%) zeigten eine positive Färbung für das Oberflächenmolekül CD133. Dabei lokalisierte sich der überwiegende Teil der CD133 positiven, braun gefärbten Zellen in Zellhaufen (sogenannte „Zellcluster“) im vitalen Tumorgewebe, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von bis zu fünf Millimetern. Diese intensiv gefärbten Anhäufungen ließen sich scharf zu dem umliegenden Tumorgewebe abgrenzen und waren häufig in enger Lagebeziehung zu stark vaskularisierten Tumorarealen (Abb. 7c). Darüber hinaus waren vereinzelte CD133 positive Zellen diffus im Tumorparenchym verstreut nachweisbar (Abb. 7b). Keine Expression konnte in nekrotischen Tumorarealen festgestellt werden. Eine semi-quantitative Auswertung der CD133 Expression erbrachte eine starke intratumorale Heterogenität mit einzelnen, „Cluster“-artigen Anhäufungen von bis zu 15-20% CD133 positiver Tumorzellen. Anzumerken ist, dass auch in stereotaktischen Gewebeproben mit einem Volumen von circa 1mm³ vereinzelt „Cluster“ von CD133 positiven Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 7f). Negativkontrollen bestätigten jeweils die Spezifität der Untersuchungsergebnisses (Abb. 7d). Die immunhistochemischen Daten der DAB-Färbungen wurden mittels der Immunfluoreszenz unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

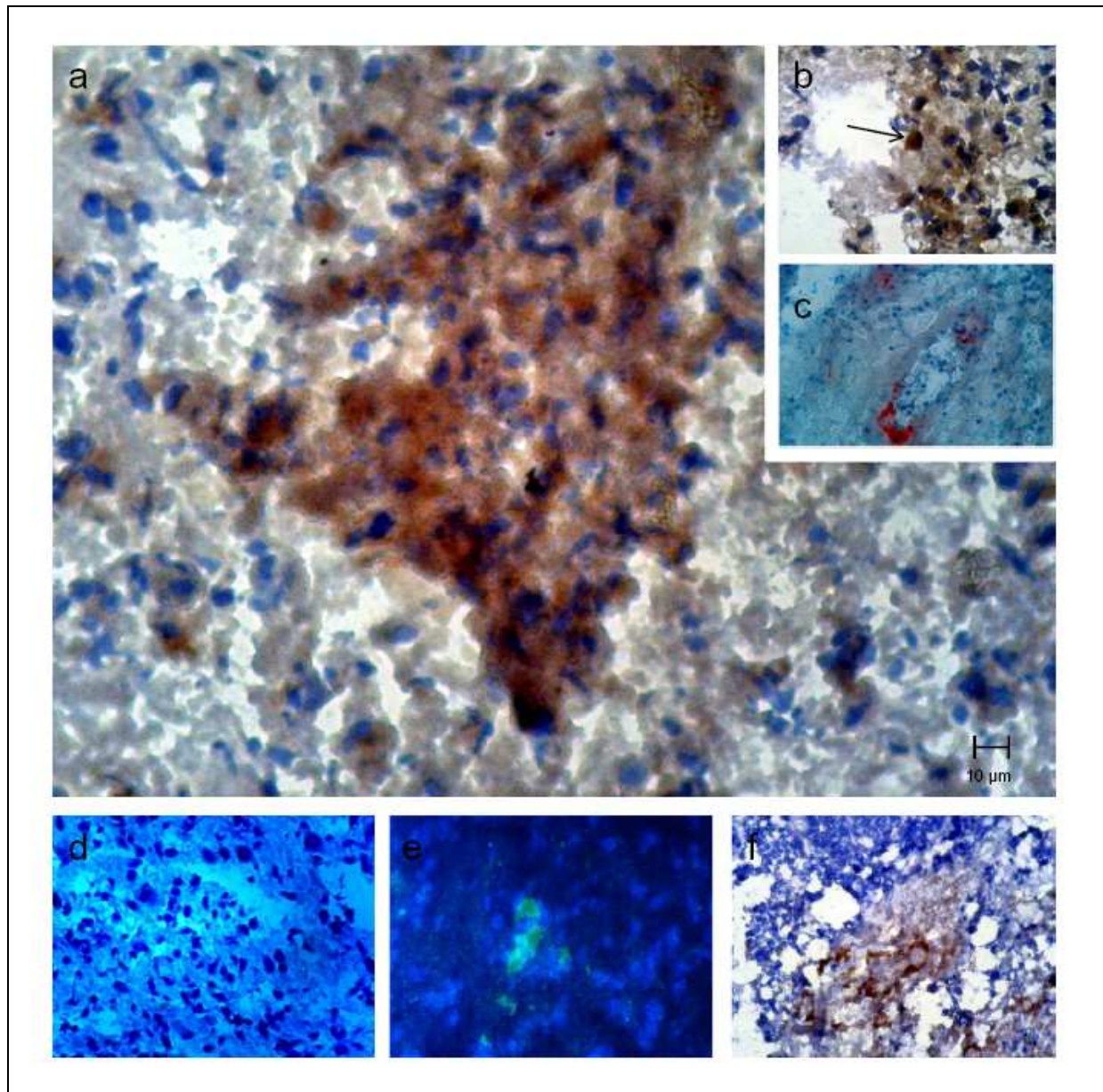


Abb. 7: Immunhistochemische Darstellung CD133 positiver Zellen in WHO-Grad IV Gliomen. *a-b*, DAB-Immunfärbung von Kryostatgeweben. Der Oberflächenmarker CD133 markiert Cluster von Zellen, die sich scharf vom umliegenden Tumorgewebe abgrenzen lassen (*a*). Darüber hinaus sind vereinzelte CD133 positive Zellen diffus im Tumorparenchym nachweisbar (*b*). Bei höherer Vergrößerung zeigt sich die oberflächengebundene Lokalisation der braunen DAB-Komplexe auf den individuellen intratumoralen Zellen (*b*). *c*, AEC-Immunfärbung von Kryostatgeweben. Die CD133 positiven Zellen befanden sich häufig in enger Lagebeziehung zu stark vaskularisierten Tumorarealen. *d*, Negativkontrolle. *e*, Immunfluoreszenz von Kryostatgewebe: Es bestätigen sich einzelne FITC-green markierte, CD133 positive Zellkonglomerate im Tumorgewebe. *f*, DAB-Immunfärbung von stereotaktischen Gewebeproben: Auch in kleinen Tumolvolumina von stereotaktischen Gewebeproben lassen sich vereinzelt positiv markierte Zellhaufen nachweisen.

In einem nächsten Ansatz wurde das neu etablierte Protokoll der CD133 Immunhistochemie auf niedriggradige Gliome WHO°II sowie anaplastische Gliome WHO°III übertragen. In sieben der zehn WHO°II Gliome (70%) ließen sich erstmals eine zellspezifische CD133 Expression sowohl in der DAB- als auch in der Fluoreszenz-Immunhistochemie nachweisen. Insbesondere alle diffusen Astrozytome WHO-Grad II (sechs von sechs Proben; 100%) enthielten CD133 positive Zellen. Dabei lokalisierte sich das an CD133 gebundene, braune DAB-Signal auf die Oberfläche der Tumorzellen. Diese CD133 positiven Zellen waren überwiegend diffus innerhalb des Tumorgewebes verteilt (Abb. 8 c-d). Darüber hinaus ließen sich vereinzelt CD133 positive Zellen in Kontaktzonen zwischen nicht-vaskularisiertem Tumorgewebe und physiologischen Gefäßen des Hirnparenchyms nachweisen (Abb. 8 a-d). Eine semiquantitative Auswertung der CD133 Expression bestätigte wiederum eine heterogene intratumorale Verteilung mit maximal bis zu 5% CD133 positiver Tumorzellareale.

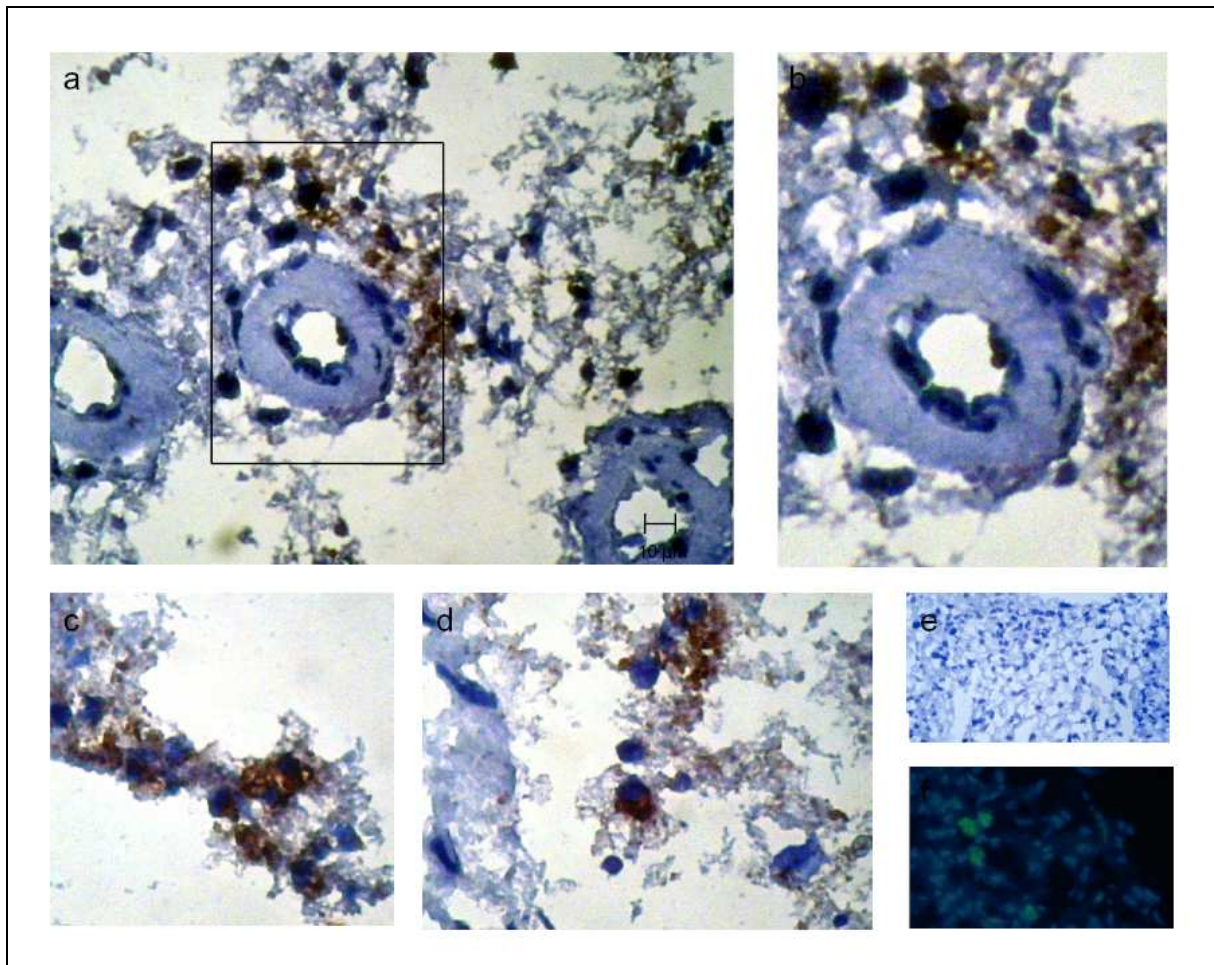


Abb. 8: Immunhistochemische Darstellung CD133 positiver Zellen in WHO-Grad II Gliomen. *a-d*, DAB-Immunfärbung von Kryostatgeweben mit einem positiven Nachweis von CD133 positiven Zellen in niedermalignen WHO-Grad II Gliomen. In WHO-Grad II Gliomen findet man charakteristischerweise physiologische Gefäße des Hirnparenchyms. In *a* ist dabei eine deutliche perivaskuläre Anhäufung von CD133 positiver Zellen sichtbar. *b* stellt einen vergrößerten Ausschnitt der in *a* gezeigten Ergebnisse dar. *c-d*, CD133 positive Zellen in verschiedenen Tumorgewebsabschnitten. *e*, In der Kontrolle finden sich keine CD133 positiven Zellen. *f*, Nachweis von FITC-green markierten CD133 positiven Zellen auf Fluoreszenzebene.

Auch in den anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III konnten CD133 positive Zellen gefunden werden: Von den zwölf untersuchten Geweben hatten neun (75%) ein positives Ergebnis. Dabei ließen sich sowohl Zellcluster als auch vereinzelte CD133 positive Zellen im Tumorgewebe nachweisen. Wiederum konnte vereinzelt eine enge Lagebeziehung zu intratumoralen Gefäßen nachgewiesen werden (Abb. 9). Die quantitative Auswertung erbrachten ein heterogenes Bild mit eher niedriggradigen (vergleichbar mit WHO-Grad II Gliomen; n=4) versus höhergradigen (Glioblastom-artigen; n=5) Verteilungsmustern. Der maximale Anteil von CD133 positiven Zellen in einzelnen Cluster-reichen Arealen in WHO-Grad III Gliomen lag bei circa 5-10%.

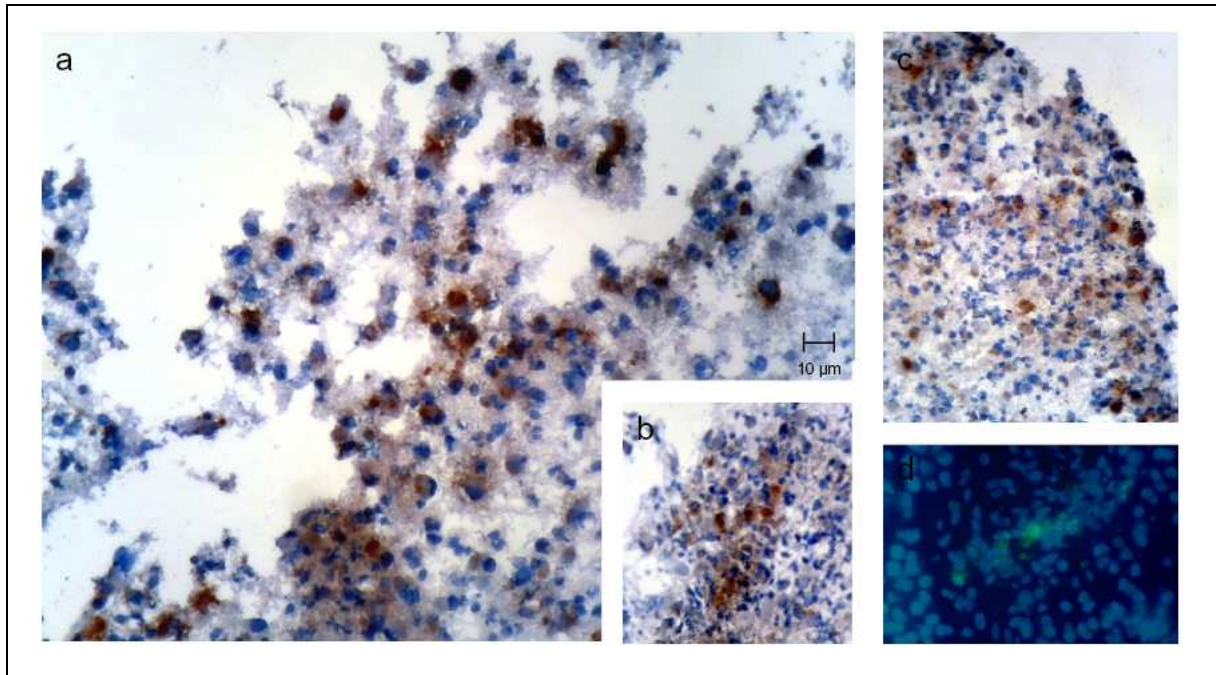
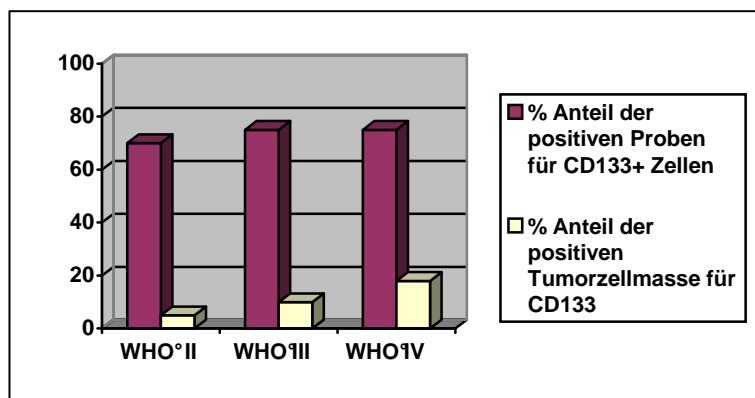


Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung CD133 positiver Zellen in WHO-Grad III Gliomen. a-c, DAB-Immunfärbung von Kryostatgeweben mit einem positiven Nachweis von CD133 positiven Zellen in höher malignen WHO-Grad III Gliomen. In a ist ein den WHO-Grad II Gliomen entsprechendes Verteilungsmuster sichtbar. b-c, Die Lokalisation der CD133 positive Zellen entspricht dem der Glioblastome. d, Nachweis von CD133 positiven Zellen auf Fluoresezenzebene.

Die semiquantitative Auswertung der CD133 Expression in WHO-Grade II-IV Gliomen erbrachte eine positive Korrelation zwischen CD133 und dem WHO-Grad von Gliomen (siehe Tab. 3). Im nicht-neoplastischem Hirngewebe wurden in keiner der sechs durchgeführten immunhistochemischen Analysen CD133 positive Zellen gefunden.



Tab. 3: Verteilung des prozentualen Anteils positiver Proben und der positiven Tumorzellmasse für CD133

Neben der Immunhistochemie wurde ein Western Blot zur Untersuchung der *in-situ* CD133 Proteinexpression etabliert. Als Positivkontrolle und zum Qualitätsnachweis der Proteinaufreinigung wurde zunächst ein Western-Blot für GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), einem spezifischen Marker für Astrozyten und glialen Tumoren durchgeführt. Das 50 kDa schwere Protein wurde in allen drei Tumorentitäten in unterschiedlicher Expressionsstärke gefunden. Als zusätzliche Expressionskontrolle wurde der Western-Blot für β -Actin etabliert (Abb. 10). Zum Proteinnachweis von CD133 wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt (siehe Material und Methoden). Beide Antikörper führten zu den gleichen Resultaten. Insgesamt wurden 22 Tumorgewebsstücke, jeweils sechs der drei verschiedenen Tumorentitäten und vier des nicht-neoplastische Hirngewebes, untersucht. Der Western Blot bestätigte die Expression von CD133 (charakteristische 110kDa-Bande; (Miraglia *et al.*, 1997; Piechaczek, 2001) in allen untersuchten Tumorproben (Abb. 10). Entsprechend der immunhistochemischen Analysen bestätigte der semiquantitative Western-Blot wiederum eine positive Korrelation zwischen der CD133 Proteinexpression und dem WHO-Grad der Gliome (Abb. 10). Zudem ließ sich im nicht-neoplastischen Hirngewebe eine geringe Expression von CD133 nachweisen.

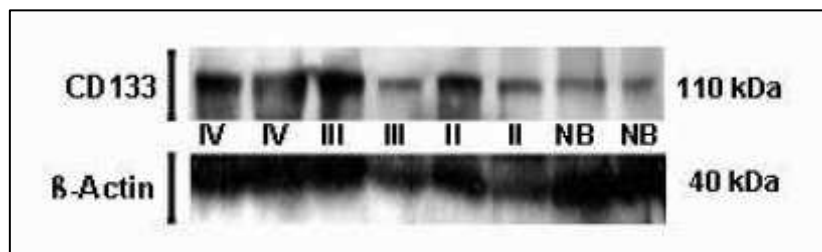


Abb. 10: Ergebnis des Western-Blots mit dem Antikörper gegen CD133: Darstellung der Proteinextraktionen aus den Hirntumoren mit dem Antikörper gegen CD133 und der Expressionsreferenz β -Actin.

Neben der Proteinexpression wurde mittels der RT-PCR die Genexpression von CD133 untersucht. Als Positivkontrolle diente GAPDH. Die positiven 183bp großen CD133 Transkripte ließen sich in 5/5 WHO-Grad IV Gliomen, in 5/5 WHO-Grad III und in 4/5 WHO-Grad II Gliomen nachweisen (Abb. 11a). In einem niedriggradigem Gliom WHO-Grad II ließ sich bei positiver GAPDH-Kontrolle kein Signal für CD133 detektieren (Abb. 11a). Zwei von fünf Proben aus nicht-neoplastischem Hirngewebe

waren ebenfalls positiv für CD133. Um die relative Genexpression von CD133 in den unterschiedlichen Tumorgraden zu untersuchen, wurde ein zyklusabhängiges Amplifikationsprotokoll durchgeführt. Dabei wurden in Abhängigkeit des relativen Anteils der CD133 cDNA an der Gesamt-DNA die relative Signalintensität nach unterschiedlicher Zykluszahl verglichen (Abb. 11b). Bei WHO-Grad IV Gliomen waren ab dem 21. Amplifikationszyklus positive Banden sichtbar. Bei WHO-Grad III Gliomen wurden erstmals mit dem 23. und bei WHO-Grad II Gliomen ab dem 25. Reaktionszyklus Banden nachweisbar. Dies deutet auf eine semiquantitative Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der CD133 Genexpression in Gliomen hin.

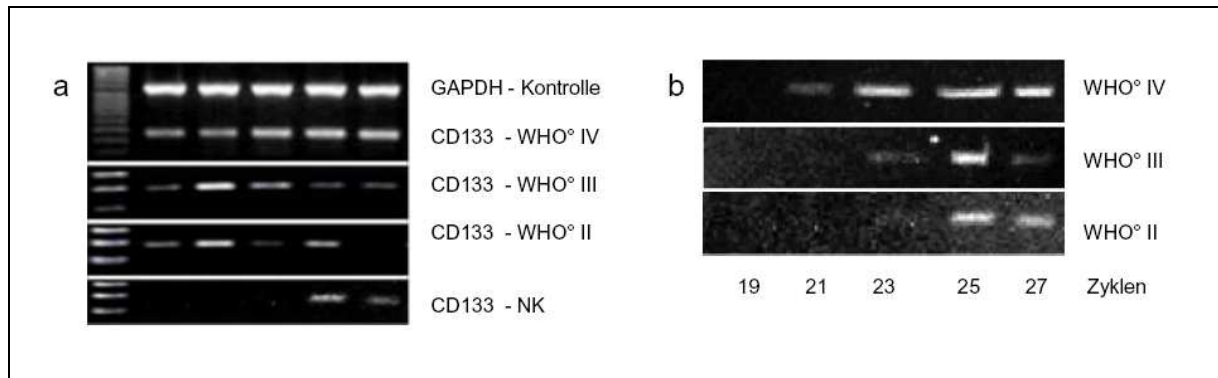


Abb. 11: Ergebnisse der PCR für CD133. a, Positive Banden, die dem CD133 Transkript entsprechen, wurden bei 183bp detektiert. b, Korrelation zwischen der Menge von mRNA von CD133 in den Tumorentitäten mit einer ansteigenden RT-PCR Amplifikation (19, 21, 23, 25 und 27 Zyklen).

3.3 Musashi-I in niedrig- und hochgradigen Gliomen

Ein typischer Marker für neurale Stammzellen während der embryonalen Entwicklung des ZNS ist Musashi-I (Sakakibara *et al.*, 1996; Sakakibara & Okano, 1997; Kaneko *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2001). Die Expression sowie die funktionelle Bedeutung von Musashi-I in Gliomen sind weitestgehend unbekannt. Zunächst wurde die Proteinexpression von Musashi-I in Tumorproben aus WHO-Grad II-IV Gliomen untersucht. Hierfür wurde die Immunhistochemie sowohl für Paraffin- als auch Kryostatgewebe etabliert, wobei das Paraffingewebe aufgrund der besser erhaltenen Ultrastruktur die intratumorale Lokalisation der Musashi-I positiven Zellen ermöglichte. In allen drei Tumorentitäten (jeweils n=6) konnten erstmals Musashi-I positive Zellen detektiert werden (Abb. 12). Nicht-neoplastisches Hirngewebe war zu

jeder Zeit negativ. Das Verteilungsmuster der Musashi-I Expression in WHO-Grad II-IV Gliomen ähnelte dem Muster der CD133 Expression: Im Glioblastom zeigte sich eine starke zytoplasmatische Anfärbung Musashi-I positiver Zellen, die sich häufig in Zellhaufen sowie vereinzelt im Tumorgewebe verteilt lokalisierten (Abb. 12a-c). Die Musashi-I-positiven „Zellcluster“ waren häufig in enger Lagebeziehung zu intratumoralen Gefäßen (Abb.12b). Demgegenüber waren intratumorale Nekrosezonen frei von Musashi-I positiven Zellen (Abb. 12a-c). In den niedermalignen Gliomen fanden sich ebenfalls einzelne Musashi-I positive Zellen (Abb. 12g-i), die wiederum insbesondere perivaskulär lokalisiert waren (Abb. 12g). Die semi-quantitative Auswertung bestätigte eine positive Korrelation zwischen der Musashi-I Expression und dem Tumorgrad von Gliomen.

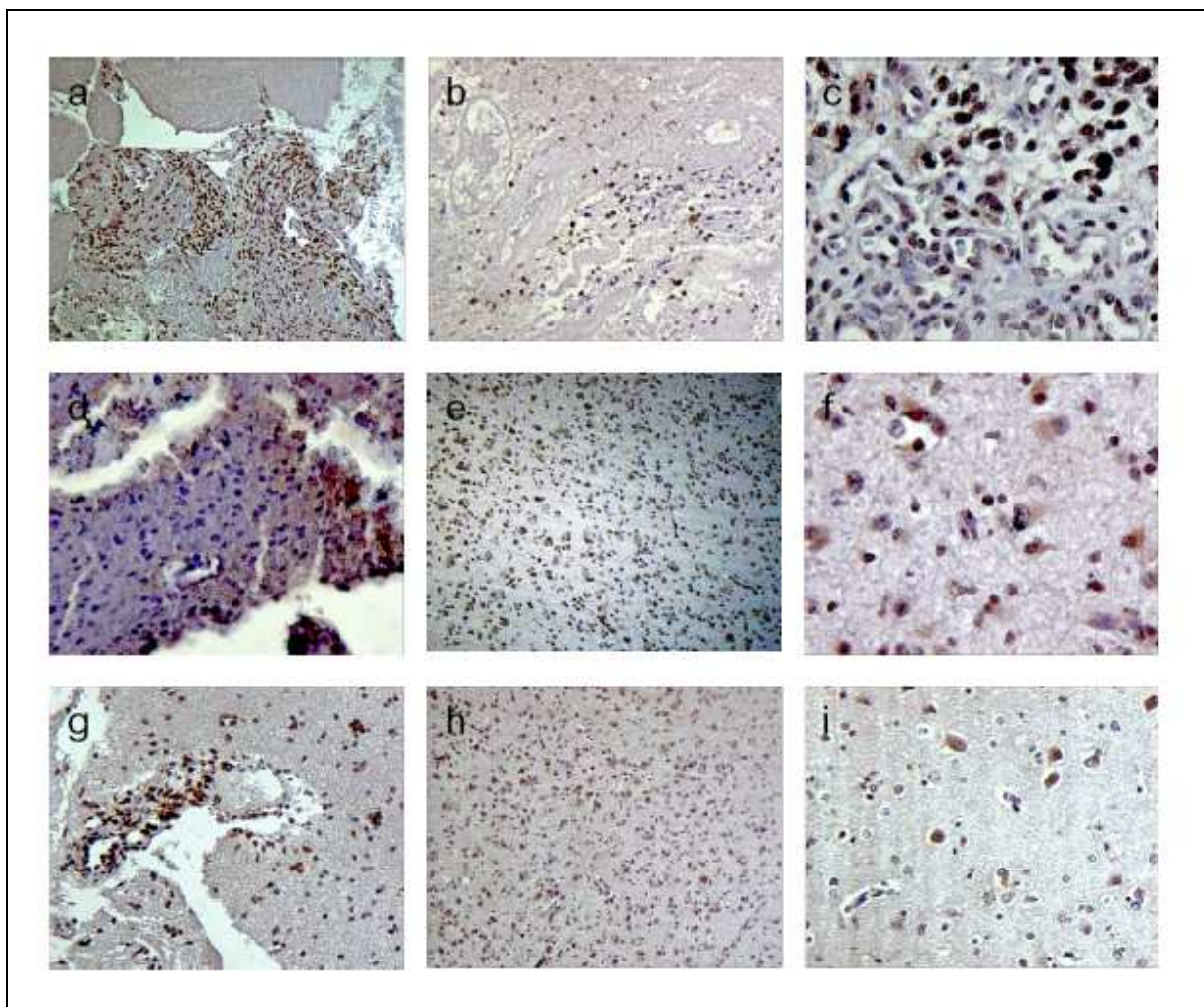


Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung Musashi-I positiver Zellen in WHO-Grad II-IV Gliomen. *a-i*, DAB-Immunfärbung von paraffineingebettetem Gewebe; Musashi-I positive Zellen in, *a-c*, WHO-Grad IV Gliomen, *d-f*, WHO-Grad III Gliomen und, *g-i*, WHO-Grad II Gliomen. *c, f, i*, In allen drei Tumorarten färbte sich das Zytoplasma der Tumorzellen deutlich an.

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Proteinexpression von Musashi-I mittels Western Blot untersucht. Wiederum bestätigte sich eine positive Korrelation mit dem Tumorgrad (Abb. 13b). Die Untersuchung der Genexpression von Musashi-I wurde mittels der RT-PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Genexpression von Musashi-I war in allen Tumorproben nachweisbar und korrelierte in der Intensität mit dem Tumorgrad (Abb. 13a; Amplifikationsprotokolle nicht abgebildet).

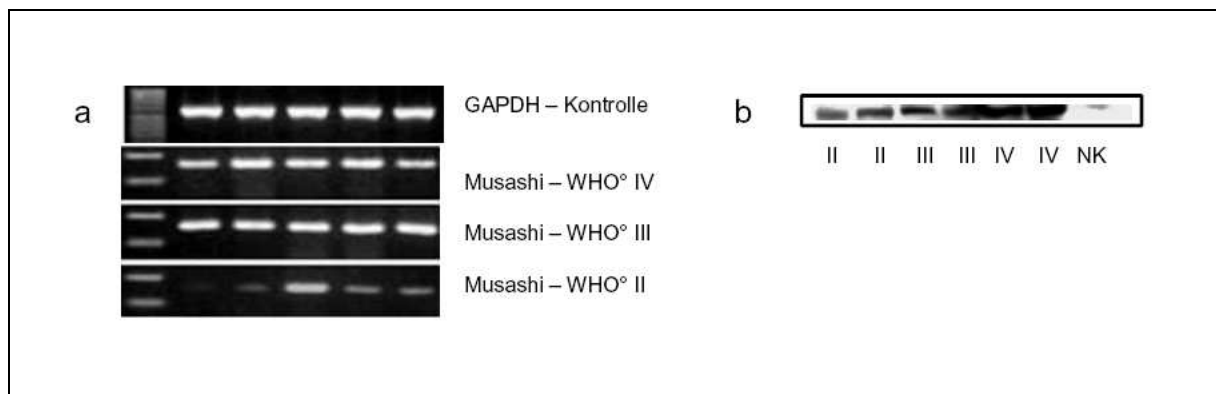


Abb. 13: Ergebnisse des Western-Blots und der PCR für Musashi-I. a, Es wurden in WHO-Grad II-IV bei 181 bp positive Banden, die Musashi-I zugeordnet werden können, detektiert. b, Der Western-Blot zeigt in allen drei WHO-Graduierungen, dass Musashi-I auf Protein-Ebene vorhanden ist.

Aufgrund der ähnlichen intratumoralen Verteilung der beiden Stammzellmarker CD133 und Musashi-I wurden Co-Expressionsanalysen an Kryoschnitten von WHO-Grad II-IV Gliomen durchgeführt. Die Analyse der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte, dass das grün fluoreszierende Signal für CD133 und die rote Fluoreszenz von Musashi-I in über 95% der positiven Zellen co-lokalisierten waren (Abb. 14).

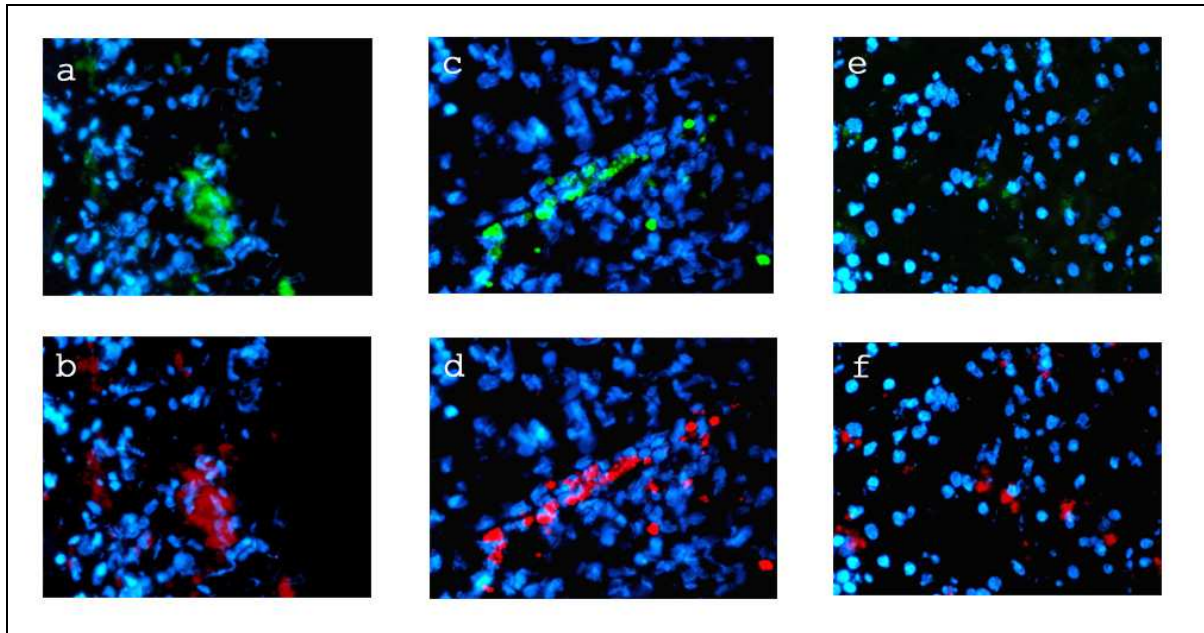


Abb. 14: Fluoreszenz-Doppelfärbung von CD133 und Musashi-I. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte für die CD133 positiven Zellen mit FITC-green, so dass diese unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, die Musashi-I positiven Zellen aufgrund der Färbung mit Texas-red rot aufleuchteten. *a-b*, CD133 (*a*) und Musashi-I (*b*) positive Zellen in WHO-Grad IV Gliomen. *c-d*, CD133 (*c*) und Musashi-I (*d*) positive Zellen in WHO-Grad III Gliomen. *e-f*, CD133 (*e*) und Musashi-I (*f*) positive Zellen in WHO-Grad II Gliomen.

Entgegen dem embryonalen Stammzellmarker Musashi-I zeigten immunhistochemische Untersuchungen über die Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 (Baum *et al.*, 1992; Udani *et al.*, 2005) eine rein Tumorendothel-assoziierte Färbung ohne zelluläre Co-expression mit CD133 oder Musashi-I in WHO-Grad II-IV Gliomen.

3.4 Charakterisierung von CD133 positiven Stammzellen *in-vitro*

Für die vergleichende Charakterisierung der CD133 positiven Zellen aus WHO-Grad II-IV Gliomen wurde erstmals ein modifiziertes Isolationsprotokoll (mittels des MACS[®] bzw. Dynal-Bead Systems) etabliert, dass in 6/9 WHO-Grad II, 7/12 WHO-Grad III und 12/16 WHO-Grad IV Gliomen für mehrere Wochen stabile Zellkulturen *in-vitro* erzielen ließ. Als Isolationskontrolle wurde standardmäßig eine immunzytochemische Untersuchung angewendet, die aufzeigte, dass entsprechend der Herstellerangaben (Miltenyi-Biotech) spezifisch CD133 Zellen separiert und kultiviert wurden (Abb. 15b). Eine Fluoreszenzdoppelfärbung bestätigte zudem neuerlich die unter dem Punkt 3.3

analysierte hochgradige Co-Expression von CD133 und Musashi-I. Zudem waren die Zellen überwiegend positiv für VEGFR-3 (Abb. 16e). Die isolierten CD133 positiven Zellkulturen zeigten ein heterogenes Wachstumsverhalten (Proliferationsbeginn 1-4 Woche nach Isolation; Abb. 15), welches unter Standardkulturbedingungen (siehe Material und Methoden, Punkt 2.6) bis zur vierten Passage unverändert blieb. Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Wachstumsverhalten sowie der Morphologie und dem Tumorgrad ließ sich nicht nachweisen.

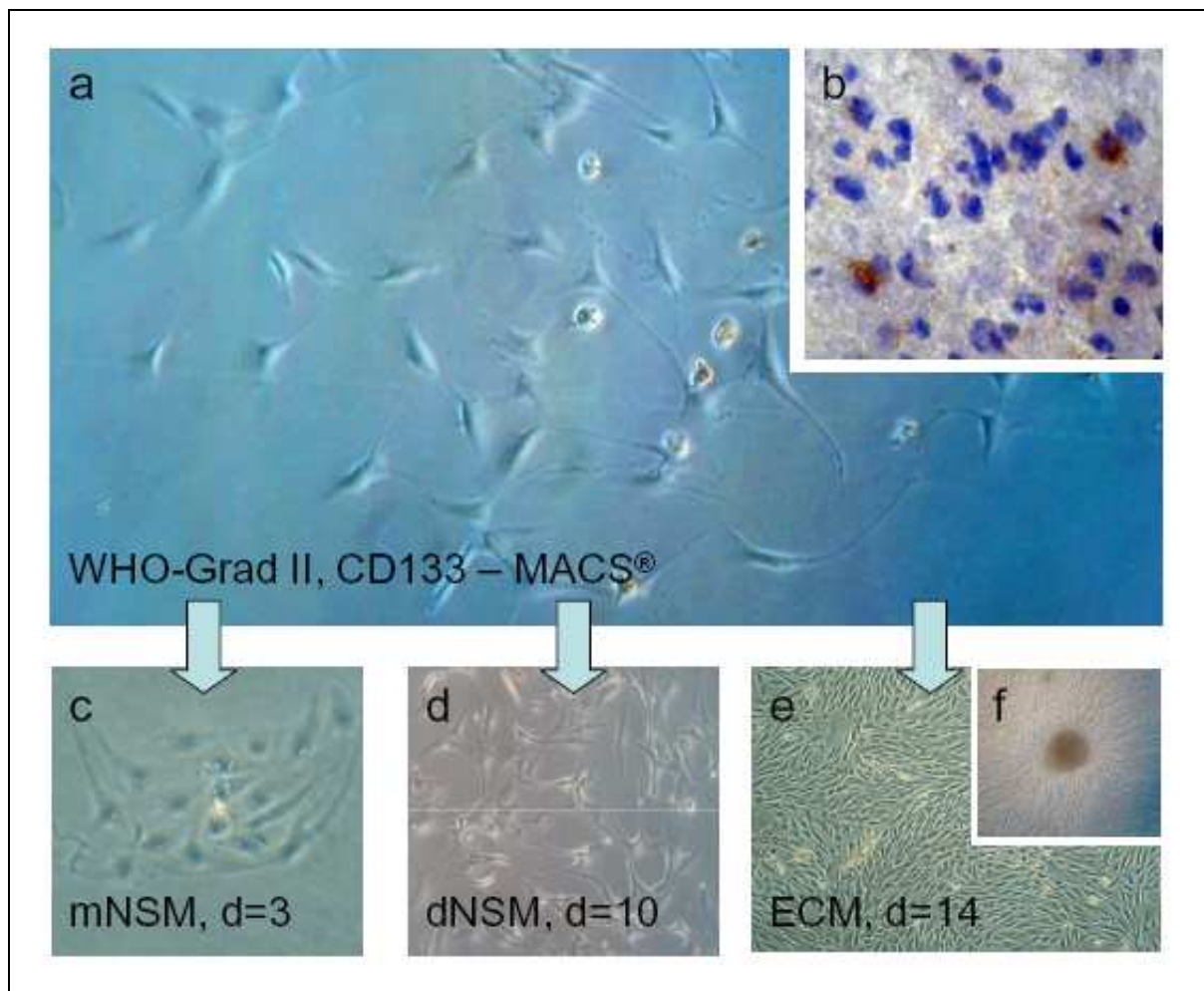


Abb. 15: Kultivierung von CD133 positiven Zellen *in-vitro*. a, Kultivierung von isolierten CD133 positiven Zellen am Beispiel eines WHO-Grad II Astrozytoms. b, Eine Immunhistochemische Untersuchung als Isolationskontrolle bestätigte die spezifische Separation von CD133 positiven Zellen. In Abhängigkeit der Zellbedingungen zeigten CD133 positive Zellen unterschiedliche morphologische Ausprägungen: c, eine längliche, wenig verzweigte (mNSM), d, eine polymorphe, z.T. miteinander vernetzte, Astrozyten-ähnliche (dNSM), e, eine pflastersteinartige, endotheliale (ECM) Morphologie. f, Zudem konnte in ECM eine spontane Sphäroidausbildung beobachtet werden, hier am Beispiel eines WHO-Grad III Astrozytoms dargestellt.

Die CD133 positiven Zellen wurden *in-vitro* auf die stammzelldefinierenden Eigenschaften der Selbsterneuerung (Klonalität), Proliferation und pluripotenten Differenzierung untersucht (Reya *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen erfolgten ausschließlich an „frischen“ Zellkulturen (≤ 2 . Passage). In Abhängigkeit der Zellkulturbedingungen zeigten die CD133 positiven Zellen eine längliche, wenig verzweigte (mNSM; Abb. 15c), eine polymorphe, z. T. miteinander vernetzte (Astrozyten-ähnliche) (dNSM; Abb. 15d) bzw. eine pflastersteinartige (endotheliale) Morphologie (ECM; Abb. 15e). Zudem wurden in ECM spontane Sphäroidausbildungen beobachtet (Abb. 15f).

In Abhängigkeit der Zellkulturbedingungen veränderte sich das Expressionsprofil von Oberflächenmarkern auf den Stammzellen. Immunzytochemische Analysen (Tab. 4) ergaben, dass die isolierten Zellen nach etwa zwei Wochen in ECM negativ für CD133 (Abb. 16a) und Musashi-I wurden und erstmals die Endothelzellmarker CD34 (Abb. 16b), CD31 (Abb. 16c) und CD105 (Abb. 16d) exprimierten. Zudem wurden die Zellen positiv für die Ulex-Färbung (Marker für Endothelzellen (Hormia *et al.*, 1983); Abb. 16f). Parallel isolierte Tumorendothelzellen (Miebach *et al.*, 2006) waren zu keiner Zeit positiv für CD133 (Daten nicht gezeigt). Unter neuronalen Differenzierungsbedingungen entwickelten die Zellen einen neuronalen/glialen Phänotyp (s.o.), verloren die Stammzellmarker CD133 und Musashi-I und wurden positiv für GFAP (glialer Marker; Abb. 17i) sowie β III-Tubulin (neuraler Marker; Abb. 17k).

Tabelle 4 zeigt zusammenfassend eine Gegenüberstellung der positiv getesteten Marker, die bei der Kultivierung der isolierten CD133 positiven Zellen in den verschiedenen Medien exprimiert wurden.

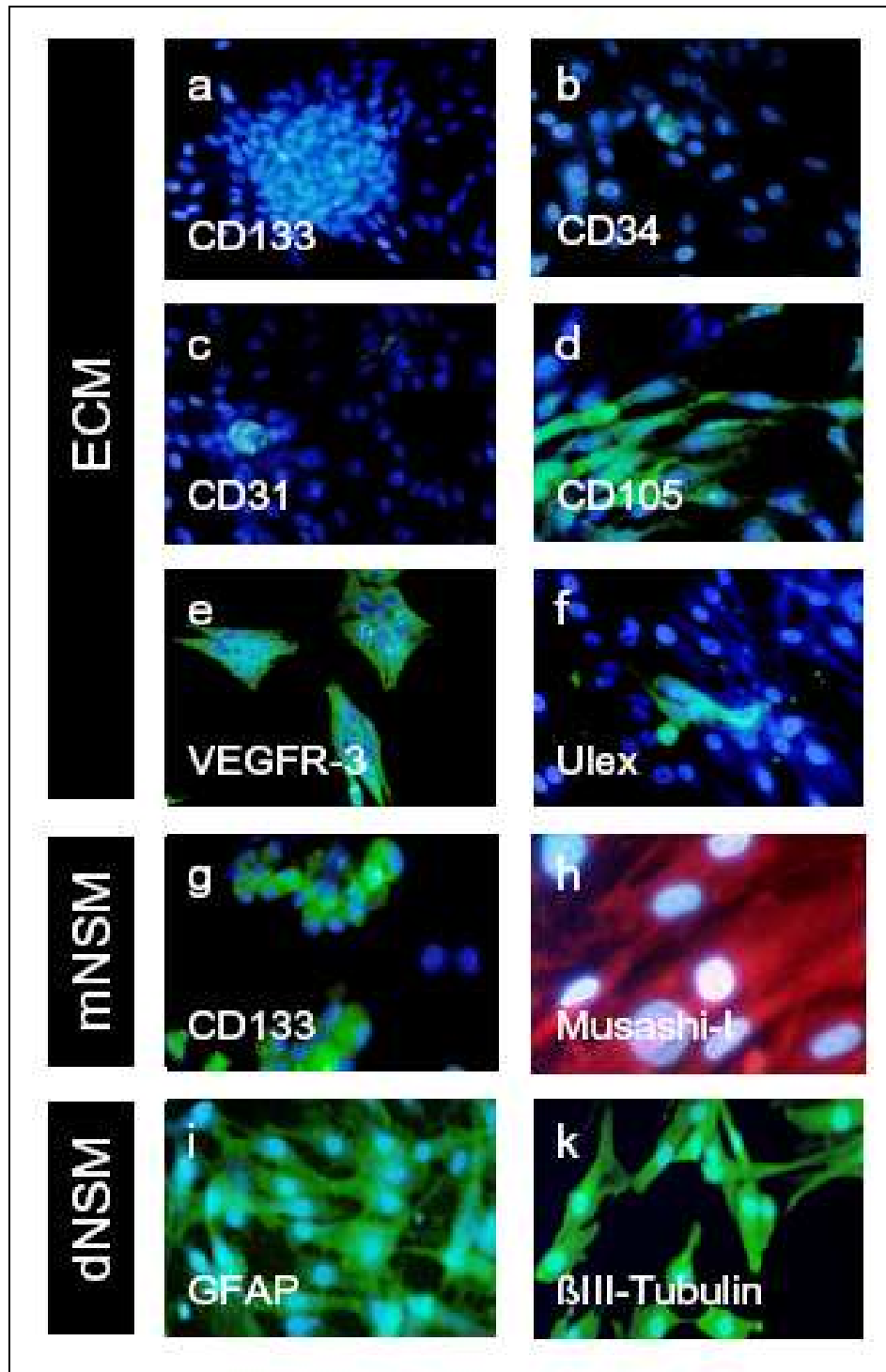


Abb. 16: Differenzierung von CD133 positiven Zellen *in-vitro*. Differenzierung von CD133 positiven Zellen am Beispiel eines WHO-Grades III Astrozytoms nach 16 Tagen in endotheliale Differenzierungsmedium (ECM) sowie eines WHO-Grad II Glioms in Differenzierungsmedium (mNSM) bzw. neuronalem Stammzellmedium (dNSM). Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einer FITC-Färbung (grün) bzw. für Musashi-I mit Texas-red (rot) und einer DAPI-Kernfärbung (blau) durchgeführt. Die einzelnen Antikörper wurden jeweils mit einer Verdünnung 1:50 bis 1:100 verwendet. a, CD133 positive Zellen lassen sich nach 16 Tagen in ECM nicht mehr nachweisen. Folgende Marker wurden positiv exprimiert: unter b, CD34, c, CD31, d, CD105, e, VEGFR-3 und f, Ulex, unter mNSM g, CD133 und h, Musashi-I, unter dNSM i, GFAP und k, βIII-Tubulin.

Marker	Isolierte Zellen, d0	WHO°II			WHO°III			WHO°IV		
		mNSM	dNSM	ECM	mNSM	dNSM	ECM	mNSM	dNSM	ECM
CD133	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Musashi-I	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
CD34	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-	+
β-Tubulin	-	-	+	(-)	-	+	(-)	-	+	(-)
GFAP	-	-	+	(+/-)	-	+	(+)	-	+	(+)
CD31	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
CD105	-	-	(+)	+	-	n.d.	+	-	n.d.	+
VEGFR-3	+	(+)	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	+

Tab. 4: *In-vitro* Differenzierung von CD133 positiven Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der Oberflächenmarker, die bei der Kultivierung der isolierten CD133 positiven Zellen sowohl am Tag 0 als auch nach zwei Wochen in den verschiedenen Medien (mNSM, dNSM und ECM) exprimiert wurden („+“ = >50% positive Zellen, „(+)“ = 10<x<49% positive Zellen, „-“ = <9% positive Zellen).

Die Ausbildung von Sphäroiden *in-vitro* zeigt die stammzelldefinierende Eigenschaft der Selbsterneuerung (Deleyrolle & Reynolds, 2009). CD133 positive Zellen bildeten *in-vitro* spontan Sphäroide aus. Diese Sphäroide wurden für erste Untersuchungen über den Tumorzelltropismus der CD133 positiven Zellen verwendet. In Konfrontation mit U373 Sphäroiden (Referenz-Gliomzelllinie, CD133 negativ; Daten nicht gezeigt) zeigte sich bereits nach wenigen Stunden eine zunehmende Attraktion der Dilgefärbten roten CD133 positiven Stammzellen (rot) und der GFP-exprimierenden U373-Zellen (grün) (Abb. 17).

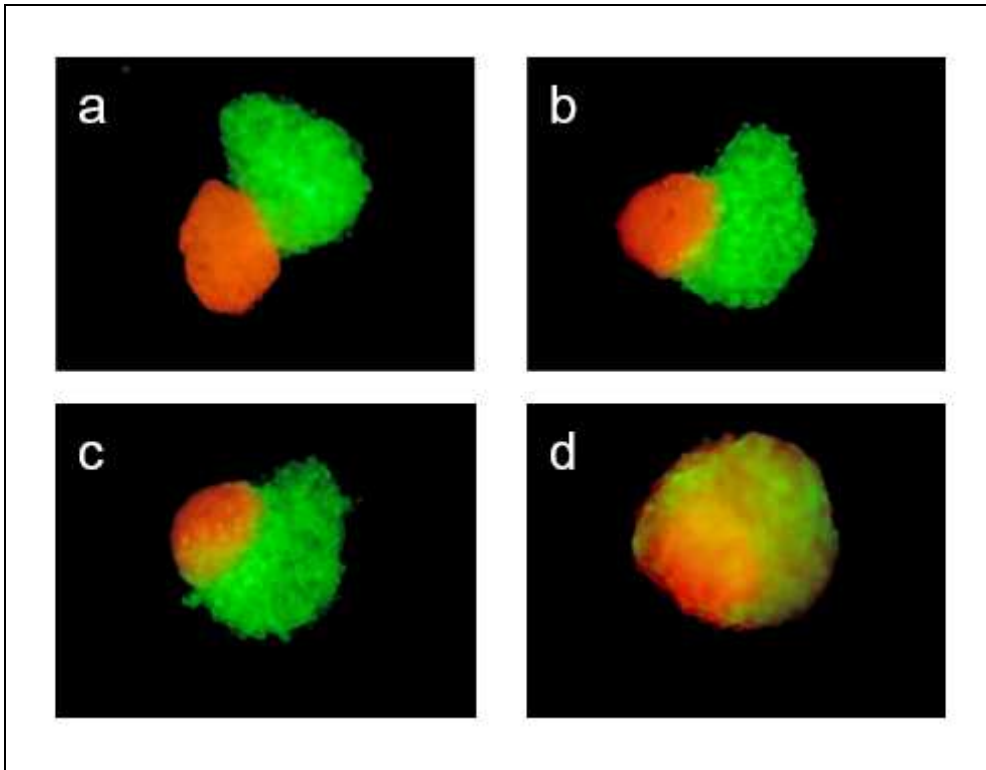


Abb. 17: Ergebnisse des Sphäroid-Konfrontationsassay. Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchteten die mit Fast DiI™ Stocksolution angefärbten CD133 positiven Sphäroiden rot, die mit Fast DiO™ Stocksolution angefärbten U373-GFP-Sphäroide grün auf. Die CD133 positiven Sphäroide stammten aus einem WHO-Grad III Gliom. Das langsame Ineinander wachsen der beiden Sphäroide wurde nach *a*, 8 Stunden, *b*, 24 Stunden *c*, 48 Stunden und abschließend nach *d*, 10 Tagen fotodokumentiert.

4 DISKUSSION

4.1 Allgemeines

CD133 positive Zellen zeigen Stammzeleigenschaften und stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Glioblastomen. Die Hypothese einer stammzellvermittelten Tumorentstehung basiert auf den experimentellen Untersuchungen von Singh et al., der es im Mausmodell gelang, aus humanen CD133 positiven Glioblastomzellen *in-vivo* neuerlich Glioblastome zu generieren (Singh et al., 2004b). Die funktionelle Relevanz von Stammzellen für die Entstehung von bösartigen Tumoren konnte zeitgleich in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden. In der Neuroonkologie beschränkte sich der Nachweis und die Isolation von CD133 positiven Zellen bisher auf das maligne Gliom (Reya et al., 2001; Hemmati et al., 2003; Galli et al., 2004; Singh et al., 2004b; Yuan et al., 2004). Offen war bisher, i) ob der Oberflächenmarker CD133 auch in niedriggradigen Gliomen exprimiert wird, ii) ob CD133 positive Zellen aus WHO-Grad II und III Gliomen *in-vitro* Stammzeleigenschaften zeigen, und iii) ob sich Unterschiede im Vergleich zu den bekannten Stammzellen aus dem Glioblastom nachweisen lassen. Basierend auf einem positiven Nachweis von CD133 positiven Stammzellen in WHO-Grad II-IV Gliomen eröffnen sich weiterführende Fragestellungen nach einer möglichen tumorigenen Relevanz dieser zellulären Subpopulation für iv) die Entstehung niedergradiger Gliome und v) deren sekundäre Malignisierung hin zum malignen Gliom. In der vorliegenden Dissertation standen diese Fragestellungen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

4.2 Methodische Überlegungen

Die experimentellen Untersuchungen erfolgten an humanem Gewebe, welches im Rahmen von offenen Tumorsektionen in der Neurochirurgischen Klinik gewonnen wurde. Das Patientenkollektiv entsprach bezüglich des Alters, dem klinischen Allgemeinzustand, der Tumor-assoziierten Beschwerden, der Lokalisation und der

Größe der Tumoren, sowie der Komorbiditäten den Literaturangaben (Peraud *et al.*, 2004; Pinsker *et al.*, 2004; Reifenberger *et al.*, 2006).

In der Studie wurden ausschließlich unvorbehandelte Patienten eingeschlossen, um den Einfluss einer stattgehabten Strahlen- und/ oder Chemotherapie auf die Eigenschaften der Tumorzellen auszuschließen. Demgegenüber ist eine mögliche medikamentöse Beeinflussung z. B. durch die Einnahme von Antikonvulsiva sowie die regelhaft bestehende Corticosteroidbehandlung nicht sicher auszuschließen. So konnte für die Behandlung mit Dexamethason neben der erwünschten Reduktion des perifokalen Tumorödems eine SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) vermittelte Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden (Nakamizo *et al.*, 2005; Birnbaum *et al.*, 2007). Somit müssen Corticosteroide als eine mögliche Störgröße bei Untersuchungen über die pathophysiologische Relevanz von CD133 positiven Zellen beim Gliom berücksichtigt werden. Der Einfluss der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die bei fluoreszenzgestützten Resektionen des malignen Gliom oral 3 Stunden vor dem operativen Eingriff eingenommen wird (Stummer *et al.*, 2006), auf Tumorstammzellen ist unbekannt.

Der Nachweis von CD133 wurde sowohl auf *in-situ* als auch auf *in-vitro* Ebene geführt. Es wurde ausschließlich frisch entnommenes humanes Gliomgewebe für die experimentellen Untersuchungen verwendet. Die Operationsresektate wurden direkt nach Entnahme eiskühlt und anschließend binnen circa 10 Minuten ins Labor zur weiterführenden Untersuchung verbracht, u. a. um den Einfluss der Hypoxie und damit verbundene z. B. apoptotische Prozesse zu minimieren. Das Gliomgewebe wurde zum einen für die *in-situ* Untersuchungen kryokonserviert und zum anderen für die Isolation selektiver Gliomzellen verwendet. Für die Isolation der CD133 positiven Stammzellen wurde das 2006 von Miebach *et al.* im Labor etablierte und publizierte Protokoll zur Isolation von humanen Endothelzellen aus primären Operationsresektaten (Miebach *et al.*, 2006) in Anlehnung an die Daten von Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2003) adaptiert.

Für eine aussagekräftige methodische Validierung wurden verschiedene Nachweismethoden etabliert: Erstmals konnte ein Protokoll für die Immunhistochemie von CD133 selektiv an Kryostatgewebe humaner Gliomresektate etabliert werden. Entgegen der Beschreibung von Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2004b), konnte in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben keine valide Immunhistochemie für die beiden CD133 Antikörper (Mouse anti-human CD133/1-biotin MAb und CD133/2-

biotin MAb) an Paraffingewebe erzielt werden. Bei der Auswertung der Expressionsanalyse wurde ein besonderes Augenmerk auf die parenchymatöse Verteilung der CD133 positiven Zellen innerhalb des Gliomgewebes gerichtet. Die CD133 Expression wurde zusätzlich mittels Western-Blot überprüft. Hierzu wurde ebenfalls im Rahmen der Dissertation ein entsprechendes Protokoll (adaptiert nach (Krebs *et al.*, 2006) für den Antikörper mouse anti-human CD133/1 MAb etabliert. Mittels des Western-Blots wurde die CD133-Expression auf Proteinebene semiquantitativ ermittelt. Die Untersuchung der Musashi-I Expression erfolgte sowohl an Kryostat- als auch Paraffingewebe. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden verschiedene Antiseren sowie Normalhirngewebe als Negativkontrolle verwendet. Um posttranslationale Veränderungen detektieren zu können, wurde zusätzlich der mRNA-Nachweis mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt (Thon *et al.*; Schnell *et al.*, 2008).

Für die *in-vitro* Untersuchungen wurden CD133 positive Zellen mittels des MACS®-Systems sowie in Anlehnung an die Arbeit von Miebach und Kollegen über das Dynal-Bead-System isoliert (Miebach *et al.*, 2006). Beide Verfahren konnten gleichwertig eingesetzt werden, da es keine quantitativen Unterschiede bezüglich Menge und Charakterisierung der isolierten Zellen gab. Die Qualität der Isolation wurde durch eine immunhistochemische Doppelfärbung mit CD133 und Musashi-I getestet. Die standardisierte Kultivierung in den speziellen und kommerziell erhältlichen Stammzellmedien (dNSM, mNSM, ECM) diente zur Beurteilung der Stammzeleigenschaften der isolierten CD133 positiven Zellen und schließlich, um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Singh *et al.* zu erhalten.

4.3 CD133 positive Zellen im nicht-neoplastischem Hirngewebe

CD133 wurde erstmals im Jahr 2000 als neuronaler Stammzellmarker vorgestellt (Uchida *et al.*, 2000). Die funktionelle Bedeutung von CD133 ist unbekannt. Im humanen zentralen Nervensystem lassen sich während der embryonalen Entwicklung CD133 positive Zellen vereinzelt in der subventrikulären Zone sowie in der glomerulären Zone des Kleinhirns nachweisen (Hockfield & McKay, 1985; Uchida *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2005; Aimone *et al.*, 2006). Eine physiologische Expression von CD133 positive Zellen im adulten Gehirn ist nicht beschrieben (Pfenninger *et al.*,

2007). Bei krankhaften Prozessen des adulten ZNS konnten erstmals CD133 positive Zellen beim malignen Gliom nachgewiesen werden. Deren tumorigenen Eigenschaften führten *in-vivo* zur CD133 vermittelten „Cancer Stem Cell“ Theorie über die Entstehung des bösartigen Glioms (Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b). Im Rahmen der Dissertation wurde die Expression von CD133 über den neu etablierten Proteinnachweis auch im nicht-neoplastischen Hirngewebe untersucht. Das entsprechende humane Gewebe wurde als Zugangsgewebe im Rahmen von epilepsiechirurgischen Eingriffen gewonnen. Entsprechend der Literatur ließ sich immunhistochemisch keine Expression von CD133 in den Gewebeproben (n = 4) nachweisen. Auch im Western-Blot war keine signifikante Expression festzustellen. Dies bestätigt die Annahme, dass im adulten Gehirn keine CD133 positiven Zellen zu finden sind. Nicht-neoplastisches Gewebe wurde fortan als Negativkontrolle eingesetzt. Anzumerken ist, dass in der RT-PCR vereinzelt CD133 positive Banden im nicht-neoplastischem Hirngewebe nachweisbar waren. Offen bleibt, ob es sich hierbei um eine positive Genexpression mit posttranslationaler Herunterregulation handelt oder CD133 mRNA aus Blutzellen nachgewiesen wurde. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass sogenannte Ballonzellen im nicht-neoplastischem Epilepsiegewebe insbesondere im Rahmen der kortikalen Dysplasie durchaus positiv für eine CD133 Expression sein können (Ying *et al.*, 2005). Im Rahmen der Dissertation wurde nur Zugangsgewebe aus epilepsiechirurgischen Resektaten eingeschlossen, das keine morphologischen Zeichen einer Ammonshornsklerose oder fokalen Dysplasie aufwies und in räumlicher Distanz zum epileptogenen Fokus lag. Letztlich bleibt die Bedeutung der CD133 mRNA Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe offen, u. a. da eine Verfälschung der Ergebnisse durch die krankhafte Veränderung des Zugangsgewebes bei langjährigem Anfallsleiden nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4 Nachweis von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen

Die Bedeutung von CD133 als Stammzelle in Gliomen beschränkte sich in der Literatur auf die Untersuchung von Glioblastomgewebe (Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b). Ein ausführlicher *in-situ* Nachweis einer Expression von diesen Zellen sowohl in nieder- als auch in hochmalignen Gliomen wurde bisher noch nicht

beschrieben. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene molekularbiologische Techniken, wie Immunhistochemie, RT-PCR und Western-Blot, eingesetzt, um eine möglichst vollständige Beobachtung auf verschiedenen Ebenen zu erhalten. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass CD133 positive Zellen *in-situ* sowohl in nieder- als auch in hochmalignen Gliomen zu finden sind. Dadurch wurden auch die Aussagen von Singh et al. eingehend bestätigt, dass in Glioblastomen CD133 positive Zellen vorhanden seien (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2004b). Die Auswertung der immunhistochemischen Daten ergab, dass bei WHO-Grad II 70%, bei WHO-Grad III und IV Gliomen jeweils 75% der untersuchten Patientenproben positiv für CD133 waren. Eine semiquantitative Auswertung der CD133 Expression zeigte, dass beim WHO Grad II Gliom circa 1-5% der Tumorzellmasse positiv für CD133 war. Beim anaplastischen Gliom exprimierten circa 15% sowie beim Glioblastoma multiforme circa 20% der Tumorzellen das Oberflächenprotein CD133. Somit korrelierte der prozentuale Anteil der CD133 positiven Zellen an der Gesamttumorzellmasse mit dem WHO-Grad der Gliome. Insbesondere der hohe Anteil der CD133 positiven Zellen im diffusen Astrozytom ist bemerkenswert, da gerade diese WHO-Grad II Tumoren ein hohes intrinsisches Potential zu sekundären Entartung aufweisen (Duffau & Capelle, 2004). Diese Ergebnisse wurden mittlerweile u. a. von Zeppernick und Kollegen bestätigt, die zum einen ebenfalls eine Korrelation der CD133 Expression mit dem WHO-Grad zeigen konnten und darüber hinaus eine statistische Korrelation mit dem Gesamtüberleben nachweisen konnten. Die Autoren schlossen, dass der semiquantitative Nachweis der CD133 Expression als möglicher prognostischer Marker für das Outcome von Gliompatienten verwendet werden könnte (Zeppernick et al., 2008). Eigene Daten zeigen, dass eine prognostische Relevanz der CD133 Expression zurückhaltend zu bewerten ist, da sich immunhistochemisch eine ausgeprägte Heterogenität der intra-tumoralen CD133 Expression in den einzelnen Gliomzellen nachweisen ließ. Darüber hinaus birgt eine semiquantitative Auswertung basierend auf immunhistochemischen Untersuchungen eine hohe diagnostische Unsicherheit aufgrund „inter- und intraobserver“ Variabilität. Eine Korrelation der CD133 Expression mittels Western-Blot Untersuchung wurde von den Autoren nicht durchgeführt. Eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik von Gliomen haben auch stereotaktische Gewebeproben (Mennel, 1999) mit einem Volumen von circa 1mm³. Wir konnten erstmals zeigen, dass in diesen vereinzelt „Cluster“ von CD133 positiven Zellen

nachweisbar sind. Jedoch sind diese Proben für Expressionsanalysen nicht gut geeignet, da sowohl die clusterartige Verteilung von CD133 positiven Zellen als auch ein potentieller Einfluss von intratumoralen nekrotischen Arealen eine hohe Unsicherheit im Nachweis hat. Zusammengefasst konnte die Expression des Oberflächenmoleküls CD133 nicht nur im Glioblastom (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b), sondern erstmals auch im WHO-Grad II und III Gliomen nachgewiesen werden.

Die Morphologie und das Verteilungsmuster der CD133 positiven Zellen war unabhängig vom Tumorgrad. Die CD133 positiven Zellen waren charakteristischerweise in Zellhaufen (sogenannte „Cluster“) sowie teilweise diffus im Tumorgewebe verteilt. Diese clusterartige Verteilung ähnelt dabei der sogenannten „niche“, die eine spezielle Mikroumgebung für Stammzellen darstellt und Ausgangspunkt für die embryonale Entwicklung ganzer Hirnregionen ist (Costa *et al.*, 2007; Ninkovic & Gotz, 2007). In Übereinstimmung mit der embryonalen Entwicklung könnten darüber hinaus die vereinzelt im Tumorparenchym verteilten CD133 positive Zellen migratorisch aktive Zellen darstellen. Die CD133 positiven Zellcluster waren insbesondere in den stark vaskularisierten malignen Gliomen in enger Lagebeziehung zu intratumoralen Gefäßen aufzufinden. Diese strategisch günstige Lage könnte sowohl aufgrund der bevorzugten nutritiven Situation einen selektiven Überlebensvorteil besonders im Vergleich zu Tumorzellen in weniger gut durchbluteten Arealen bedeuten. Co-Expressionsanalysen zeigten, dass CD133 positive Zellen ebenfalls positiv für das VEGF-Rezeptorsystem (insbesondere VEGFR3) sind. Somit könnte die endothelzellartige Anordnung der CD133 positiven Zellen von funktioneller Relevanz für die intratumorale Neoangiogenese insbesondere auch während der sekundären Malignisierung sein. Die enge Lagebeziehung der CD133 positiven Stammzellnester zu den intratumoralen Gefäßen ist strategisch besonders gut für Invasion und Migration geeignet (Vajkoczy *et al.*, 1999) und vereinzelt verstreute CD133 positive Zellen können das Ergebnis einer Migration entlang dieser intratumoralen „Wanderwege“ sein. Demgegenüber findet man das Glioblastom häufig in der Nähe der Ventrikelsysteme. Die in der subventrikulären Zone im adulten Gehirn noch vereinzelt vorkommenden Stammzellen (Hockfield & McKay, 1985; Uchida *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2005; Aimone *et al.*, 2006) könnten dafür als Ursache angesehen werden.

4.5 Stammzeleigenschaften von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen

Bisherige *in-vitro* Untersuchungen an CD133 positiven Zellen im Glioblastom dienten ausschließlich der Isolation, Amplifikation und Reimplantation in ein Maus-Modell, um eine tumorigene Potenz *in-vivo* beweisen zu können (Singh *et al.*, 2004b). In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk bei *in-vitro* Untersuchungen vorrangig auf eine vergleichende Charakterisierung der isolierten CD133 positiven Zellen aus WHO-Grad II bis IV Gliomen gerichtet. Nachdem CD133 positive Zellen *in-situ* in allen drei Tumorentitäten nachgewiesen werden konnten, folgte nun für die *in-vitro* Charakterisierung die Etablierung eines Isolationsprotokolls. Durch Einsatz verschiedener kommerziell erhältlicher Kulturmedien (mNSM, dNSM und ECM) wurde untersucht, ob CD133 positive Zellen *in-vitro* Stammzeleigenschaften, wie Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotente Differenzierung (Reya *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2005), besitzen. Dabei war auffällig, dass es keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens der CD133 positiven Zellen aus den verschiedenen Tumoren gab. In Abhängigkeit der Zellkulturbedingungen veränderte sich jedoch sowohl die Morphologie als auch das Expressionsprofil der Oberflächenmarker auf den CD133 positiven Zellen. Beispielsweise konnte im Endothelzellmedium eine Neuexpression von Endothelzellmarkern, wie CD34, und unter neuronalen Differenzierungsbedingungen ein neuronaler / glialer Phänotyp detektiert werden. Allerdings wurde die Differenzierung der Zellen in diesem Ansatz nur bis zur vierten Passage beobachtet. Neue Studienergebnisse zeigten, dass beispielsweise mesenchymale Stammzellen erst ab der vierten bis fünften Passage ihre Morphologie verändern (Rosland *et al.*, 2009). Eine Entartung der isolierten CD133 positiven Zellen könnte somit auch erst zu einer späteren Passage stattfinden. Jedoch kommt es unter neuronalen Differenzierungsbedingungen bereits in den ersten Passagen zu einer Entwicklung eines neuronalen / glialen Phänotyps. Das legt die Hypothese nahe, dass die CD133 positiven Zellen als gliale Vorläuferzellen fungieren und somit Gliome glialen Ursprungs sein könnten. Zu diskutieren ist aber auch, ob möglicherweise das Tumorendothel als Ursprung für CD133 positive Zellen angesehen werden könnte. Ein Zusammenhang zwischen Stammzellen und Neovaskularisation wurde bereits in einigen Tumorarten gezeigt (Bao *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2006). Interessanterweise waren in den Untersuchungen

die CD133 positiven Zellen überwiegend auch positiv für VEGFR-3. Der Rezeptor VEGFR-3 spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Vaskularisation und Lymphangiogenese und lässt sich im Endothel des adulten Gehirns nicht mehr nachweisen (Grau *et al.*, 2007). Die Koexpression von CD133 und VEGFR-3 im Differenzierungsprotokoll lässt auf eine mögliche Rolle bei der Lymphangiogenese schließen. Dies ist vor allem interessant, da die Expressionsmenge von VEGFR-3 ebenfalls mit dem Tumorgrad korreliert (Watanabe *et al.*, 1996; Bhowmick *et al.*, 2004; Traxler *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006). Auch die Frage nach einer möglichen Gefäßassoziation hat eine zentrale Bedeutung. Zu diskutieren ist, ob die Gefäße eine Leitstruktur für eine Migration (Goldbrunner *et al.*, 2000), ein Zeichen für eine ektopie Einwanderung oder einen Tropismus (Aboody *et al.*, 2000) darstellen. Bekannt ist, dass Stammzellen aus dem Knochenmark eine starke migratorische Aktivität zu Gliomen zeigen (Schichor *et al.*, 2006). In einem Konfrontationsversuch von CD133 positiven Zellen und der Gliomzelllinie U373 wurde das Migrationsverhalten dieser Stammzellen beobachtet. In einem ersten Ansatz konnte eine Attraktion der beiden Sphäroide detektiert werden. Das legt die These nahe, dass CD133 positiven Zellen migratorisches Verhalten zeigen. Zu diskutieren ist demnach, ob CD133 als eine Ausgangszelle für die intratumorale Neoangiogenese angesehen werden kann. Inwieweit jedoch CD133 letztendlich in Zusammenhang mit Angio- und Vaskulogenese gesehen werden kann, konnte in diesem Ansatz nicht abschließend ermittelt werden.

Als ein weiteres stammzelldefinierendes Kriterium (Klonalität) konnte die Ausbildung von Sphäroiden im Endothelzellmedium gesehen werden. Eine Kontrolle auf Genebene wurde jedoch nicht durchgeführt.

4.6 Herkunft von CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II bis IV Gliomen

Um genauere Erkenntnisse über die Stammzeleigenschaften und den Ursprung von Hirntumoren zu erfahren, wurde zusätzlich das RNA-bindende Protein Musashi-I untersucht. Musashi-I wird in der Literatur als ein neuronaler Stammzellmarker, der eine wichtige Rolle in der frühen kortikalen Entwicklung spielt, beschrieben (Sakakibara *et al.*, 1996; Sakakibara & Okano, 1997; Kaneko *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2001). Bisher veröffentlichte Ergebnisse zeigten, dass es eine

hohe Expression von Musashi-I in hochgradigen Tumoren, im Gegensatz zu nicht-neoplastischen Gewebe, gibt und diese mit dem Grad der Malignität und der proliferativen Aktivität korreliert (Toda *et al.*, 2001). Das tumorigene Potential von Musashi-I positiven Zellen ist bisher noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine Expressionsanalyse von Musashi-I in WHO-Grad II bis IV Gliomen erhoben werden. Die Verteilung und das Verteilungsmuster von Musashi-I ähnelten dem von CD133. Die *in-situ* Auswertung ergab eine über 95%-ige Co-Expression der beiden Stammzellmarker sowohl in nieder- als auch in hochmalignen Gliomen. Auffallend war auch hier die vor allem perivaskuläre Lokalisation der beiden Marker. Bekannt ist, dass CD133 ein Marker für hämatopoetische Stammzellen ist (Corbeil *et al.*, 1998; Jaatinen *et al.*, 2006). Daher wäre die Hypothese nahe liegend, dass die ins perivaskuläre Gefäßbett einwandernden CD133 positiven Zellen eine Tumorfornation mit sekundärer Malignisierung induzieren würden. Jedoch zeigte die Co-Expression von CD133 und Musashi-I, dass diese Zellen eher einen lokalen, neuronalen Ursprung haben müssten. Gestützt wird die These zusätzlich, dass die CD133 / Musashi-I positiven Zellen CD34 negativ waren. CD34 ist ein hämatologischer Stamm- und Endothelzellmarker (Baum *et al.*, 1992; Udani *et al.*, 2005). Daraus konnte geschlossen werden, dass die CD133 positiven Zellen einen ortsgebundenen Ursprung haben müssten. Was jedoch eine maligne Entartung triggert, ist unbekannt.

4.7 Ausblick

In Zusammenschau der erhobenen Daten ergibt sich eine Korrelation von CD133 positiven Zellen und dem Tumorgrad. Es kann davon ausgegangen werden, dass CD133 positive Zellen lokalen und glialen Ursprungs sind. Zusätzlich zeigt CD133 im Differenzierungsprotokoll sowohl in niedrig- als auch in höher- und hochmalignen Gliomen Stammzeleigenschaften, wie Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotente Differenzierung (Reya *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2005). Das Isolationsprotokoll ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung der CD133 positiven Zellen und bildet auch eine Grundlage für weitere Folgeprojekte, wie z.B. Untersuchungen mittels Microarray.

Interessant ist außerdem, dass die CD133 positive Zellen sowohl chemo- (Liu *et al.*, 2006; Kang & Kang, 2007) als auch strahlenresistent (Bao *et al.*, 2006a) sind. Ursache könnte nach Meinung der Autoren ein verbesserter Reparaturmechanismus sein, der verhindert, dass die CD133 positiven Zellen in die Apoptose gehen. Somit könnten trotz Therapie CD133 positive Zellen überleben und eventuell als stammzellinduzierende Zellen zu einer Progression führen. Die Fragestellung, ob die CD133 positiven Zellen in WHO-Grad II und III Gliomen auch wirklich tumorigen sind, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. Dafür wären weitere Untersuchungen, wie ein Tumorigenitäts- und ein *in-vivo* Modell notwendig. Ziel weiterer Studien sollte auch die Entwicklung von geeigneten Therapien gegen diese Cancer Stem Cells, wie z.B. spezifische Antikörper basierte Therapieformen, sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

CD133 positive Zellen zeigen Stammzeleigenschaften und stehen im Zusammenhang mit der Entstehung eines Glioblastoms, dem malignesten Phänotyp der Gliome (WHO-Grad IV). Es wurde gezeigt, dass die selektiv aus humanen Glioblastomen isolierten CD133 positiven Zellen entgegen der restlichen Zellmasse in der Lage waren, auch nach serieller Implantation in immundefiziente Mäuse den ursprünglichen Tumor zu bilden. Bisherige Untersuchungen an CD133 in Gliomen wurden vorrangig am Glioblastom durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression, Verteilung und Charakterisierung von CD133 positiven Zellen sowohl in niedrig- als auch in höher- und hochmalignen Gliomen untersucht. Mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren und mittels Western-Blot und PCR Analysen konnte eine klare quantitative Korrelation zwischen der prozentualen Verteilung der CD133 positiven Zellen und dem Tumorgrad der Gliome gezeigt werden. So lag der Anteil der positiven Tumorzellmasse für CD133 bei WHO-Grad II bei 1-5%, WHO-Grad III bei 5-10% und bei WHO-Grad IV Gliomen bei ca. 20%. Die CD133 positiven Zellen zeigten *in-situ* eine typische endotheliale Anordnung in „Zell-Clustern“, die sich häufig in enger Lagebeziehung zu Gefäßen befanden. Auch in stereotaktischen Gewebeproben mit einem Volumen von circa 1mm³ konnten vereinzelt „Cluster“ von CD133 positiven Zellen detektiert werden. Darüber hinaus wurde eine hohe zelluläre Co-Expression von CD133 positiven Zellen mit dem neuronalen Stammzellmarker Musashi-I ermittelt. Da die CD133 / Musashi-I positiven Zellen zu keiner Zeit positiv für den hämatologischen Marker CD34 waren, legt es die These nahe, dass die CD133 positiven Zellen eher einen lokalen, neuronalen Ursprung haben müssten. Mittels Isolation und anschließender Kultivierung der CD133 positiven Zellen konnten die *in-vitro* Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Proliferation, pluripotente Differenzierung und Klonalität in den WHO-Grad II bis IV Gliomen bestätigt werden. Die Differenzierungseigenschaften in den Zellkulturen in Richtung endothelialer Zellmorphologie mit positiver Expression von CD34 deuten zudem erstmalig auf eine funktionelle Relevanz der CD133 positiven Stammzellen bei der Neovaskularisierung von Gliomen hin. Die Analysen unterstützen den Zusammenhang zwischen CD133 positiven Stammzellen und der Gliomgenese.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass es eine quantitative Korrelation zwischen dem Vorhandensein von CD133 positiven Zellen und dem WHO-Grad der Gliome gibt. CD133 positive Zellen sind lokalen und neuronalen Ursprungs und zeigen Stammzeleigenschaften in allen Tumorentitäten.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarabazol
AED	Antiepileptic Drugs
BTSC	Brain Tumor Stem Cells
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CD133+	CD133 positiv
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CSC	Cancer Stem Cells
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phylinodol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNSM	Differentiation Stem Cell Maintenance Media
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECM	Endothelial Cell Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
FCS	Fetal calf serum
FET-PET	[¹⁸ F]-Fluorethyltyrosin-Positronen-Emissions-Tomographie
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IM	Isolationsmedium
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin

MACS [®]	Magnetism-activated Cell Sorter
µg	Mikrogramm
MGMT	O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mNSM	Neural Stem Cell Maintenance Media
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NOD-SCID	Non-Obese Diabetic, Severe Combined Immunodeficient
NSC	Neuronale Stammzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PE	Probeentnahme
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: T1-gewichtete Kernspintomographie mit links temporalen Glioblastom
- Abb. 2: Glioblastom WHO-Grad IV
- Abb. 3: Strukturmodell des CD133 Antigens
- Abb. 4: Tumorigene Cancer Stem Cells
- Abb. 5: Labeled (Strept)Avidin Biotin Technik (LSAB)
- Abb. 6: Positive Selektion über das MACS[®]-System
- Abb. 7: Immunhistochemische Darstellung CD133+ Zellen in WHO-Grad IV Gliomen
- Abb. 8: Immunhistochemische Darstellung CD133+ Zellen in WHO-Grad II Gliomen
- Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung CD133+ Zellen in WHO-Grad III Gliomen
- Abb. 10: Ergebnis des Western-Blot mit dem Antikörper gegen CD133
- Abb. 11: Ergebnisse der PCR für CD133
- Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung Musashi-I positiver Zellen in WHO-Grad II-IV Gliomen
- Abb. 13: Ergebnisse des Western-Blots und der PCR für Musashi-I
- Abb. 14: Fluoreszenz-Doppelfärbung von CD133 und Musashi-I
- Abb. 15: Kultivierung von CD133 positiven Zellen *in-vitro*
- Abb. 16: Differenzierung von CD133 positiven Zellen *in-vitro*
- Abb. 17: Ergebnisse des Sphäroid-Konfrontationsassay

8 TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Oligonukleotidprimer
- Tab. 2: Charakteristika der Patientenpopulation und der Gliome
- Tab. 3: Verteilung des prozentualen Anteils positiver Proben und der positiven Tumorzellmasse für CD133
- Tab. 4: *In-vitro* Differenzierung von CD133 positiven Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Aboudy, K.S., Brown, A., Rainov, N.G., Bower, K.A., Liu, S., Yang, W., Small, J.E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P.M., Breakefield, X.O. & Snyder, E.Y. (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12846-12851.
- Aimone, J.B., Wiles, J. & Gage, F.H. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci*, **9**, 723-727.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3983-3988.
- Auberger, J., Dlaska, M., Auberger, T., Gunsilius, E., Woll, E. & Hilbe, W. (2005) Increased CD133 expression in bone marrow of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, **29**, 995-1001.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. & Rich, J.N. (2006a) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**, 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D. & Rich, J.N. (2006b) Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, **66**, 7843-7848.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M. & Peault, B. (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2804-2808.
- Bhowmick, D.A., Zhuang, Z., Wait, S.D. & Weil, R.J. (2004) A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in

- glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer Res*, **64**, 1220-1223.
- Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C.J., Padovan, C.S., Schichor, C., Goldbrunner, R. & Straube, A. (2007) Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol*, **83**, 241-247.
- Bonnet, D. & Dick, J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3**, 730-737.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J. & Maitland, N.J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, **65**, 10946-10951.
- Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A. & Huttner, W.B. (1998) AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood*, **91**, 2625-2626.
- Costa, M.R., Kessar, N., Richardson, W.D., Gotz, M. & Hedin-Pereira, C. (2007) The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J Neurosci*, **27**, 11376-11388.
- Croteau, D. & Mikkelsen, T. (2001) Adults with newly diagnosed high-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol*, **2**, 507-515.
- Deimling, A., Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N. & Collins, V.P. (2007) Anaplastic oligoastrocytoma. In Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, pp. 66-67.

- Deleyrolle, L.P. & Reynolds, B.A. (2009) Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol*, **549**, 91-101.
- Duffau, H. & Capelle, L. (2004) Preferential brain locations of low-grade gliomas. *Cancer*, **100**, 2622-2626.
- Ellison, D., Love, S., Chimelli, L., Harding, B.N., Lowe, J. & Vinters, H.V. (2004) *Neuropathology - A reference text of CNS pathology*. Mosby Verlag.
- Fargeas, C.A., Corbeil, D. & Huttner, W.B. (2003) AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells*, **21**, 506-508.
- Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuso, S. & Scambia, G. (2008) Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, **18**, 506-514.
- Florek, M., Haase, M., Marzesco, A.M., Freund, D., Ehninger, G., Huttner, W.B. & Corbeil, D. (2005) Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res*, **319**, 15-26.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. & Vescovi, A. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, **64**, 7011-7021.
- Goldbrunner, R.H., Bendszus, M., Sasaki, M., Kraemer, T., Plate, K.H., Roosen, K. & Tonn, J.C. (2000) Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*, **47**, 921-929; discussion 929-930.

- Grau, S.J., Trillsch, F., Herms, J., Thon, N., Nelson, P.J., Tonn, J.C. & Goldbrunner, R. (2007) Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J Neurooncol*, **82**, 141-150.
- Guha, A. & Mukherjee, J. (2004) Advances in the biology of astrocytomas. *Curr Opin Neurol*, **17**, 655-662.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C. & Stupp, R. (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**, 997-1003.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M. & Kornblum, H.I. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15178-15183.
- Hilbe, W., Dirnhofer, S., Oberwasserlechner, F., Schmid, T., Gunsilius, E., Hilbe, G., Woll, E. & Kahler, C.M. (2004) CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, **57**, 965-969.
- Hockfield, S. & McKay, R.D. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*, **5**, 3310-3328.
- Holland, E.C. (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*, **2**, 120-129.
- Hormia, M., Lehto, V.P. & Virtanen, I. (1983) Identification of UEA I-binding surface glycoproteins of cultured human endothelial cells. *Cell Biol Int Rep*, **7**, 467-475.

- Horn, P.A., Tesch, H., Staib, P., Kube, D., Diehl, V. & Voliotis, D. (1999) Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood*, **93**, 1435-1437.
- Hudson, J.E., Chen, N., Song, S., Walczak, P., Jendelova, P., Sykova, E., Willing, A.E., Saporta, S., Bickford, P., Sanchez-Ramos, J. & Zigova, T. (2004) Green fluorescent protein bone marrow cells express hematopoietic and neural antigens in culture and migrate within the neonatal rat brain. *J Neurosci Res*, **76**, 255-264.
- Humman, E. & Helin, K. (2005) Molecular mechanisms in gliomgenesis. *Adv Cancer Res*, **94**, 1-27.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D. & Steindler, D.A. (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, **39**, 193-206.
- Jaatinen, T., Hemmoranta, H., Hautaniemi, S., Niemi, J., Nicorici, D., Laine, J., Yli-Harja, O. & Partanen, J. (2006) Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. *Stem Cells*, **24**, 631-641.
- Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T. & Okano, H. (2000) Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*, **22**, 139-153.
- Kang, M.K. & Kang, S.K. (2007) Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev*, **16**, 837-847.
- Kania, G., Corbeil, D., Fuchs, J., Tarasov, K.V., Blyszczuk, P., Huttner, W.B., Boheler, K.R. & Wobus, A.M. (2005) Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*, **23**, 791-804.

- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. & Cavenee, W.K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 215-225; discussion 226-219.
- Krebs, B., Kohlmansperger, V., Nolting, S., Schmalzbauer, R. & Kretzschmar, H.A. (2006) A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. *J Histochem Cytochem*, **54**, 559-565.
- Lee, A., Kessler, J.D., Read, T.A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W.B., Johnson, J.E. & Wechsler-Reya, R.J. (2005) Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci*, **8**, 723-729.
- Li, Q., Ford, M.C., Lavik, E.B. & Madri, J.A. (2006) Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res*, **84**, 1656-1668.
- Lie, D.C., Colamarino, S.A., Song, H.J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R. & Gage, F.H. (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, **437**, 1370-1375.
- Lin, V.K., Wang, S.Y., Vazquez, D.V., C, C.X., Zhang, S. & Tang, L. (2007) Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stem cell like property. *Prostate*, **67**, 1265-1276.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L. & Yu, J.S. (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, **5**, 67.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, **114**, 97-109.
- Marzesco, A.M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D. & Huttner, W.B. (2005) Release of extracellular membrane

- particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*, **118**, 2849-2858.
- Mennel, H.D. (1999) Diagnostik und Therapie supratentorieller Gliome des Erwachsenenalters. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften. *Der Onkologe*, **5**, 831-837.
- Miebach, S., Grau, S., Hummel, V., Rieckmann, P., Tonn, J.C. & Goldbrunner, R.H. (2006) Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades. *J Neurooncol*, **76**, 39-48.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K. & Buck, D.W. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, **90**, 5013-5021.
- Mischel, P.S. & Cloughesy, T.F. (2003) Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*, **13**, 52-61.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M. & Lang, F.F. (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*, **65**, 3307-3318.
- Ninkovic, J. & Gotz, M. (2007) Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 338-344.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J.E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, **445**, 106-110.
- Ohgaki, H. (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, **25**, 1-7.

- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, **109**, 93-108.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, **170**, 1445-1453.
- Pardal, R., Clarke, M.F. & Morrison, S.J. (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 895-902.
- Peraud, A., Kreth, F.W., Siefert, A., Winkler, P.A. & Tonn, J.C. (2004) Niedermaligne Gliome. In Tonn, J.C., Kreth, F.W. (eds) *Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks*. Zuckschwerdt Verlag, München, pp. 67-76.
- Pfenninger, C.V., Roschupkina, T., Hertwig, F., Kottwitz, D., Englund, E., Bengzon, J., Jacobsen, S.E. & Nuber, U.A. (2007) CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res*, **67**, 5727-5736.
- Piechaczek, C. (2001) Cd133. *J Biol Regul Homeost Agents*, **15**, 101-102.
- Pinsker, M.O., Goetz, C., Walther, E.U., Dudel, C., Grosu, A.L., Reich, P., Schalhorn, A. & Elbel, G.K. (2004) Höhergradige Gliome und Gliomatosis cerebri. In Tonn, J.C., Kreth, F.W. (eds) *Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, pp. 77-88.
- Popperl, G., Kreth, F.W., Herms, J., Koch, W., Mehrkens, J.H., Gildehaus, F.J., Kretschmar, H.A., Tonn, J.C. & Tatsch, K. (2006) Analysis of 18F-FET PET for grading of recurrent gliomas: is evaluation of uptake kinetics superior to standard methods? *J Nucl Med*, **47**, 393-403.
- Popperl, G., Kreth, F.W., Mehrkens, J.H., Herms, J., Seelos, K., Koch, W., Gildehaus, F.J., Kretschmar, H.A., Tonn, J.C. & Tatsch, K. (2007) FET PET for the evaluation of untreated gliomas: correlation of FET uptake and uptake kinetics with tumour grading. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **34**, 1933-1942.

- Reifenberger, G., Blümcke, I., Pietsch, T. & Paulus, W. (2006) Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System. In Tonn, J.C., Westphal, M., Rutka, J.T., Grossman, S.A. (eds) *Neuro-Oncology of CNS Tumors*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 5-72.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414**, 105-111.
- Riaz, S.S. & Bradford, H.F. (2005) Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, **76**, 257-278.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. & De Maria, R. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**, 111-115.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. & Collins, A.T. (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, **117**, 3539-3545.
- Rosland, G.V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., Mysliwicz, J., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., Lonning, P.E., Bjerkvig, R. & Schichor, C. (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*, **69**, 5331-5339.
- Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. & Okano, H. (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol*, **176**, 230-242.

- Sakakibara, S., Nakamura, Y., Satoh, H. & Okano, H. (2001) Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci*, **21**, 8091-8107.
- Sakakibara, S. & Okano, H. (1997) Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *J Neurosci*, **17**, 8300-8312.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M.S. (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*, **353**, 811-822.
- Schichor, C., Birnbaum, T., Etminan, N., Schnell, O., Grau, S., Miebach, S., Aboody, K., Padovan, C., Straube, A., Tonn, J.C. & Goldbrunner, R. (2006) Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol*, **199**, 301-310.
- Schlegel, J., Peraud, A. & Herms, J. (2004) WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In Tonn, J.C., Kreth, F.W. (eds) *Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, pp. 3-21.
- Schnell, O., Krebs, B., Wagner, E., Romagna, A., Beer, A.J., Grau, S.J., Thon, N., Goetz, C., Kretzschmar, H.A., Tonn, J.C. & Goldbrunner, R.H. (2008) Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol*, **18**, 378-386.
- Schwartz, P.H., Bryant, P.J., Fuja, T.J., Su, H., O'Dowd, D.K. & Klassen, H. (2003) Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*, **74**, 838-851.
- Schwartz, P.H., Nethercott, H., Kirov, II, Ziaieian, B., Young, M.J. & Klassen, H. (2005) Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. *Stem Cells*, **23**, 1286-1294.

- Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D. & Rafii, S. (2005) AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 715-719.
- Silani, V. & Corbo, M. (2004) Cell-replacement therapy with stem cells in neurodegenerative diseases. *Curr Neurovasc Res*, **1**, 283-289.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T. & Dirks, P.B. (2004a) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, **23**, 7267-7273.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, **63**, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. & Dirks, P.B. (2004b) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.
- Stummer, W. & Kamp, M.A. (2009) The importance of surgical resection in malignant glioma. *Curr Opin Neurol*.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F. & Reulen, H.J. (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, **7**, 392-401.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E. & Mirimanoff, R.O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**, 987-996.
- Sun, L., Hui, A.M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., Menon, J., Walling, J., Bailey, R., Rosenblum, M., Mikkelsen, T. & Fine, H.A.

- (2006) Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*, **9**, 287-300.
- Tang, D.G., Patrawala, L., Calhoun, T., Bhatia, B., Choy, G., Schneider-Broussard, R. & Jeter, C. (2007) Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog*, **46**, 1-14.
- Thon, N., Damianoff, K., Hegermann, J., Grau, S., Krebs, B., Schnell, O., Tonn, J.C. & Goldbrunner, R. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci*, **43**, 51-59.
- Toda, M., Iizuka, Y., Yu, W., Imai, T., Ikeda, E., Yoshida, K., Kawase, T., Kawakami, Y., Okano, H. & Uyemura, K. (2001) Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia*, **34**, 1-7.
- Traxler, P., Allegrini, P.R., Brandt, R., Brueggen, J., Cozens, R., Fabbro, D., Grosios, K., Lane, H.A., McSheehy, P., Mestan, J., Meyer, T., Tang, C., Wartmann, M., Wood, J. & Caravatti, G. (2004) AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res*, **64**, 4931-4941.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. & Weissman, I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14720-14725.
- Udani, V.M., Santarelli, J.G., Yung, Y.C., Wagers, A.J., Cheshier, S.H., Weissman, I.L. & Tse, V. (2005) Hematopoietic stem cells give rise to perivascular endothelial-like cells during brain tumor angiogenesis. *Stem Cells Dev*, **14**, 478-486.
- Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schilling, L., Tonn, J.C., Schmiedek, P. & Menger, M.D. (1999) Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo. *Int J Dev Neurosci*, **17**, 557-563.

- Vats, A., Bielby, R.C., Tolley, N.S., Nerem, R. & Polak, J.M. (2005) Stem cells. *Lancet*, **366**, 592-602.
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, **6**, 217-223; discussion 223-214.
- Weingart, J.D., McGirt, M.J. & Brem, H. (2006) High-Grade Astrozytoma / Glioblastoma. In Tonn J. C., W., M., Rutka, J. T., Grossman, S. A. (ed) *Neuro-Oncology of CNS Tumors*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 128-138.
- Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S. & Gu, J. (2007) CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, **120**, 1444-1450.
- Ying, Z., Gonzalez-Martinez, J., Tilelli, C., Bingaman, W. & Najm, I. (2005) Expression of neural stem cell surface marker CD133 in balloon cells of human focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, **46**, 1716-1723.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L. & Yu, J.S. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, **23**, 9392-9400.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. & Herold-Mende, C.C. (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*, **14**, 123-129.
- Zhou, L., Wei, X., Cheng, L., Tian, J. & Jiang, J.J. (2007) CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*, **117**, 455-460.

10 DANKSAGUNG

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an der Neurochirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner für die Bereitstellung des Themas. Durch die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe ermöglichte er mir die Erkrankung meines Vaters weiter zu erforschen. Seine Kompetenz, persönliche Ausstrahlung und Engagement haben mich, nach dem Tod meines Vaters, für die experimentelle Medizin sehr motiviert und maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Besonders danke ich Herrn Dr. med. Niklas Thon für die hervorragende Betreuung. Unter seiner Anleitung und konstruktiven Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation. Er war mir jederzeit ein souveräner Ansprechpartner, zudem stets gut gelaunt und motivierend. Ganz besonderen Dank schulde ich ihm für das Korrekturlesen meiner Arbeit, die in dieser Form ohne ihn undenkbar gewesen wäre.

Mein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter des Tumorbologischen Labors der Neurochirurgie für deren Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorheben möchte ich Frau Stefanie Lange, die mich in die gängigen Labormethoden einwies, bei der Etablierung neuer Verfahren unterstützte und bei allen Problemen des Laboralltags mit Rat und Tat zur Seite stand.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter bedanken, ohne deren Unterstützung und Rückhalt weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären. Vielen Dank!

11 CURRICULUM VITAE

Name: Karin Damianoff
Geburtsdatum: 23.07.1982
Geburtsort: München
Eltern: Dipl.-Ing. Wanjo Damianoff und Brigitte Baumer-Damianoff
Familienstand: ledig

Hochschulausbildung:

04/2003-06/2010 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Bayern

Examina:

06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2005 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

Praktisches Jahr:

10/2009-01/2010 Chirurgie im Krankenhaus Martha-Maria München
(Prof. Dr. Dr. med. H. Fürst)
06-10/2009 Dermatologie in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München (Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka)
02-06/2009 Innere Medizin im städtischen Klinikum München Neuperlach
3. Medizinische Abteilung (Prof. Dr. med. K.-D. Palitzsch) und
2. Medizinische Abteilung (Prof. Dr. med. Mudra)

Famulaturen:

08-09/2008 Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Deggendorf
(Dr. med. H. Stuth)
02-03/2008 Diagnostische und interventionelle Radiologie im Klinikum Deggendorf (Dr. med. C. Rock)
09/2007 Diagnostische und interventionelle Radiologie im Klinikum Deggendorf (Dr. med. C. Rock)

08-10/2006 Allgemeinmedizin in Deggendorf (Praxisfamulatur,
Dr. med. I. Baierl)

Pflegepraktika:

11/2002, 01/2003 Abteilung Innere Medizin im Klinikum Deggendorf
10/2002 Pädiatrie im Klinikum Deggendorf
08-09/2002 Neurochirurgie im Klinikum Deggendorf

Schulbildung:

2002 Allgemeine Hochschulreife
(Leistungskurse: Mathematik, Biologie)
1993 – 2002 Comenius-Gymnasium, Deggendorf
1989 – 1993 Theodor-Eckert-Grundschule, Deggendorf

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Seit 10/2005 Doktorarbeit im Tumorbologischen Labor, Klinik und Poliklinik für
Neurochirurgie, LMU München Großhadern, „CD133 positive
„Cancer Stem Cells“ in Gliomen verschiedener Malignitätsgrade“

Originalarbeiten:

2008: Thon, N., **Damianoff, K.**, Hegermann, J., Grau, S., Krebs, B.,
Schnell, O., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2010). Presence of
pluripotent CD133(+) cells correlates with malignancy of gliomas.
Mol Cell Neurosci, 2010 Jan 43(1):51-59. Epub 2008 Aug 7.

Publizierte Abstracts:

2006: Thon, N., Grau, S., **Damianoff, K.**, Schnell, O., Tonn, J.C.,
Goldbrunner, R., (2006). CD133 positive „Cancer stem cells“ in
gliomas of different grades. *European Journal of Cancer,
Supplements*, Volume 4, Issue 6, June 2006

Kongressbeiträge:

- 2006: Thon, N., **Damianoff, K.**, Hegermann, J., Duy, M., Grau, S., Schnell, O., Noessner, E., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). Identification of brain tumour stem cells in high and low-grade gliomas of the central nervous system. NOA Annual Meeting, Regensburg, Germany
- 2006: Thon, N., **Damianoff, K.**, Hegermann, J., Duy, M., Grau, S., Schnell, O., Noessner, E., Kreth, F.W., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). Identification of brain tumour derived stem cells in high and low-grade gliomas of the central nervous system. Congress of the German Society for Stem Cell Research, Köln, Germany (Poster)
- 2006: Thon, N., **Damianoff, K.**, Grau, S., Krebs, B., Kretschmar, H., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). CD133+/Musashi-I+/CD34- Cancer Stem Cells in Gliomas of Different Grades. EANO 2006, Vienna, Austria
- 2006: Thon, N., **Damianoff, K.**, Grau, S., Krebs, B., Kretschmar, H., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). CD133+/Musashi-I+/CD34- Cancer Stem Cells in Gliomas of Different Grades. GIF Meeting 2006 Luxembourg
- 2006: Thon, N., Grau, S., **Damianoff, K.**, Schnell, O., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). CD133 positive „Cancer stem cells“ in gliomas of different grades. Congress “Molecular Staging of Cancer”, Heidelberg, Germany (Poster)
- 2006: Thon, N., Grau, S., **Damianoff, K.**, Schnell, O., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., (2006). CD133 positive „Cancer stem cells“ in gliomas of different grades. DGNC Annual Meeting, Essen 2006.