

**Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Tumorstammzellen und Strahlenresistenz des
hepatozellulären Karzinoms**

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

Vorgelegt von

Maurice Pradella

aus

Frankfurt am Main

Jahr

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: **Prof. Dr. Markus Guba**

Mitberichterstatter: **Priv. Doz. Dr. Gerald Denk**
Prof. Dr. Florian Löhe

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** **Dr. med. Stephan Huber**
Dekan: **Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel**
Tag der mündlichen Prüfung: **09.06.2016**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Das hepatzelluläre Karzinom	3
1.1.1. Epidemiologie	3
1.1.2. Ätiologie	4
1.2. Klassifikationssysteme und gegenwärtige Therapieoptionen des HCC	5
1.2.1. Klinische Klassifikationssysteme	5
1.2.2. Klassifikationssysteme mit Therapieempfehlungen.....	5
1.2.2.1. Schema nach den Barcelona Clinic Liver Cancer Kriterien.....	5
1.2.2.2. Münchener HCC-Algorithmus.....	6
1.3. Tumorstammzellen	7
1.3.1. Definition und Überblick der Literatur	7
1.3.2. Marker zur Identifikation von Tumorstammzellpopulationen	8
1.3.3. Rolle von Sphäroid-Zellen im Tumorstammzellmodell	8
1.3.4. Charakterisierung von Tumorstammzellen des HCC	9
1.4. Medizinische Beeinflussung von Tumorstammzellen des HCC.....	11
1.4.1. Chemotherapeutika.....	11
1.4.2. Strahlentherapie.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Zellkultur	13
2.2. Rapamycin- und 5-Fluorouracil-Versuche	15
2.3. Strahlentherapie	16
2.4. FACS - Analyse	17
2.5. Statistische Auswertung.....	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Rapamycin - und 5-Fluorouracil - Versuche	20
3.2. Entwicklung der Populationen ohne Einfluss exogener Noxen.....	23
3.2.1. Innerhalb einer Passage (Monolayer).....	23
3.2.2. Über mehrere Passagierungen (Monolayer)	24
3.3. Fotografische Dokumentation der Sphäroid-Kultur.....	26
3.4. Entwicklung der Spheres-Populationen ohne exogene Einflüsse innerhalb einer Passage	27
3.5. Bestrahlung der Huh-7 – Zellen	29
3.5.1. Vorversuche.....	29
3.5.2. Monolayerkultur	30
3.5.3. Sphäroidkultur	31

3.6. Untersuchung des Apoptoseverhaltens	34
3.6.1. Apoptoseverhalten in Monolayer-Kultur.....	35
3.6.2. Apoptoseverhalten in Spheres-Kultur	36
3.7. Untersuchung des Proliferationsverhaltens.....	38
3.7.1. Proliferation in Monolayer-Kultur	38
3.7.2. Proliferation in Spheres-Kultur	38
4. Diskussion.....	40
4.1. Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente	40
4.1.1. Strahlenresistenz des hepatzellulären Karzinoms durch CD44-pos-Zellen	40
4.1.2. Veränderung des apoptotischen Verhaltens der CD44-positiven Population unter Bestrahlung.....	41
4.1.3. Wirkung von Bestrahlung auf Huh-7-Zellen in Relation zur Zeit	42
4.2. Bedeutung der Ergebnisse	44
4.2.1. Bedeutung für die Onkologie	44
4.2.2. Bedeutung für die Transplantationsmedizin	45
4.2.3. Ein Blick in die Zukunft.....	46
5. Zusammenfassung	49
6. Danksagung	50
7. Eidesstattliche Versicherung	51
8. Abkürzungen	52
9. Abbildungsverzeichnis	54
10. Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1. Epidemiologie

Karzinome der Leber stellen, mit einer Inzidenz von circa 650.000 Neuerkrankungen weltweit sowie knapp 700.000 Todesfällen im Jahr 2008, die dritthäufigste malignombedingte Todesursache dar [2]. Auf die USA bezogen handelt es sich bei mehr als 75% aller malignen Neoplasien der Leber um ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Dieses stellt somit die häufigste Ursache primärer Neoplasien der menschlichen Leber dar, vor dem cholangiozellulären Karzinom [3]. Weltweit liegt der Anteil des HCC, gemessen an allen Lebertumoren, bei ca. 90%, Männer sind weltweit etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen [4].

Es lassen sich große geographische Unterschiede in der Inzidenz feststellen: In den Staaten Mitteleuropas und anderen entwickelten Ländern liegt die Inzidenz des Hepatozellulären Karzinoms bei ca. 2,5/100.000 Einwohnern. In anderen Teilen der Welt, wie etwa in Südostasien, bei bis zu 22/100.000 Einwohner. Die Inzidenz variiert somit, je nach geographischer Lage, um den Faktor zehn [2]. Ein eindeutiger Trend, im Sinne einer ansteigenden Inzidenz, lässt sich in den Industrienationen nicht signifikant belegen, jedoch stieg die Zahl der Neuerkrankungen in den USA in den letzten zwei Jahrzehnten um den Faktor zwei an. Eine solche Entwicklung ist in Europa nicht erkennbar, lediglich die Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung nahm bei Frauen und jungen Erwachsenen zu [5, 6].

1.1.2. Ätiologie

Bei mehr als 80% aller Patienten mit einem hepatzellulären Karzinom liegt eine Leberzirrhose, also eine chronische Schädigung der Leber, vor. Hierbei handelt es sich um einen bindegewebigen Umbau der Leber, der im Verlauf zu einer Einschränkung der Leberfunktion führt. Ursächlich hierfür können eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren sein: virale Hepatitiden (besonders chronische Hepatitis B und C), alkohol-toxische Leberschädigung, metabolische Lebererkrankungen (wie zum Beispiel die Glykogenose Typ I), eine Hämochromatose oder primär biliäre Cholangitis [7-14]. Anhand einer großen Studie mit über 22.000 Patienten in Taiwan konnte etwa der Zusammenhang zwischen HBV-Infektion und hepatzellulären Karzinom belegt werden. Die sich aufgrund einer Infektion mit dem Hepatitis B Virus entwickelnde Zirrhose gilt als Präkanzerose [15]. In der Literatur findet man dazu übereinstimmend die Hypothese, dass eine Erhöhung der Zellproliferation im Rahmen der Zirrhose ein Faktor für die Entstehung eines hepatzellulären Karzinoms ist [16, 17].

Es ist darüber hinaus auch bekannt, dass ein hepatzelluläres Karzinom in einer nicht zirrhotisch-veränderten Leber entstehen kann. So sind Aflatoxine (insbesondere „Aflatoxin B1“), produziert durch Arten des Aspergillus-Pilzes, als (HCC-bedingende) Karzinogene bekannt [18]. In der EU gelten Nüsse als potentielle Quellen, die reale wie auch kritische Exposition ist allerdings schwierig zu bestimmen [19, 20].

Des Weiteren ist noch das fibrolamelläre hepatzelluläre Karzinom (FHCC oder FLHCC) zu nennen. Betroffen sind typischerweise jüngere Patienten, meist vor dem

Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC

	Hepatitis C Virus	Hepatitis B Virus ¹	Alkohol	Andere
Europa	60-70%	10-15%	20%	10%
Nordamerika	50-60%	20%	20%	10%
Asien & Afrika ²	20%	70%	10%	<10%

¹ geschätzt durch HbsAg Träger

² außer Japan (Hepatitis C Virus 70%, Hepatitis B Virus 10-20%, Alkohol 10%, andere <10%)

30. Lebensjahr, bei denen sich weder eine Leberzirrhose noch eine viral bedingte Hepatitis findet [21, 22].

Abbildung 1: Nach Llovet et al. [1]

Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines hepatzellulären Karzinoms und Diabetes mellitus beschrieben. Anhand einer großen Kohorte in den USA konnte gezeigt werden, dass der Diabetes mellitus das Risiko, an einem hepatzellulären Karzinom zu erkranken, erhöht und zwar unabhängig vom Vorliegen einer alkoholtoxischen Leberschädigung, viralen Hepatitiden oder demographischen Faktoren [23].

Mittlerweile wird auch ein

1.2. Klassifikationssysteme und gegenwärtige Therapieoptionen des HCC

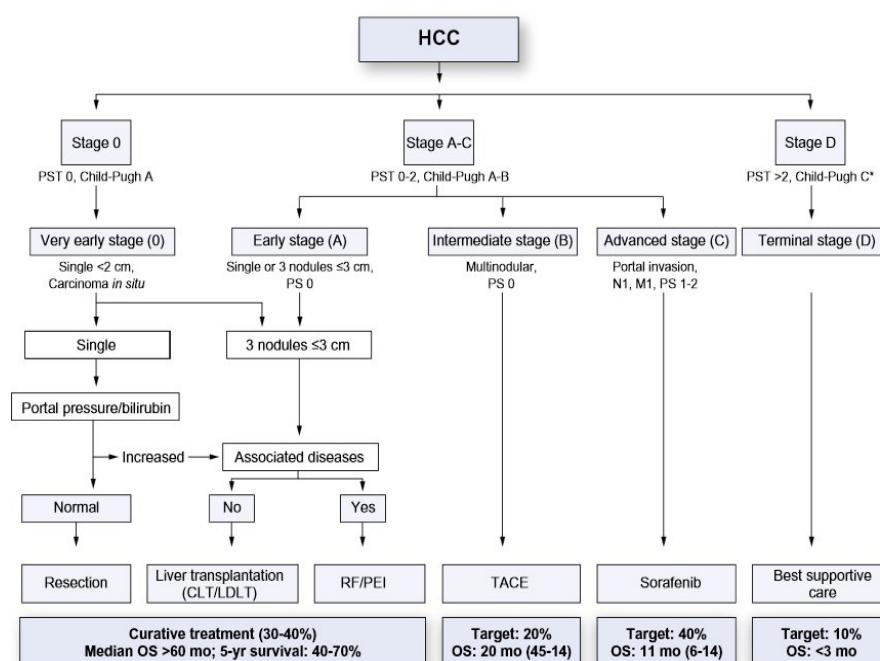
1.2.1. Klinische Klassifikationssysteme

Hier gibt es verschiedene Unterscheidungen: Zu nennen ist hier zum einen das TNM-System, das die Größe des Primärtumors, eventuelle Lymphknoten- oder Fernmetastasen beschreibt. Als weiteres System die Child-Pugh-Klassifikation, die eine Einschätzung der Leberfunktion beschreibt [24, 25]. Zur Evaluation einer eventuellen Lebertransplantation werden die MILAN-Kriterien bzw. deren Weiterentwicklung, die „up-to-seven“-Kriterien verwendet [26-29].

1.2.2. Klassifikationssysteme mit Therapieempfehlungen

1.2.2.1. Schema nach den Barcelona Clinic Liver Cancer Kriterien

Die Behandlung sollte grundlegend in einem Zentrum für diese Erkrankung erfolgen, interdisziplinär besprochen und individuell gewählt werden. Wichtigste Kriterien hierfür sind das Stadium der Erkrankung und die Leberfunktion. Man muss hierbei zu-



dem vorab unterscheiden, ob es sich um ein HCC auf dem Boden einer Zirrhose handelt oder um ein HCC ohne zirrhotisch-veränderte Leber [30-48].

Abbildung 2: Updated Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification and treatment schedule. [1]

1.2.2.2. Münchener HCC-Algorithmus

Dieses Therapie-Schema orientiert sich primär an der Leberfunktion. Nach erstem Staging, bei guter Funktion (CHILD A), das nur einen Herd ≤ 5 cm ergab, steht die Resektion im Fokus, sofern der portalvenöse Blutdruck noch im Normbereich liegt. In allen anderen Szenarien steht die TACE als erste Option, unabhängig ob das HCC noch innerhalb der MILAN-Kriterien liegt. Je nach Ergebnis eines Restagings nach drei Monaten wird dann wie folgt entschieden:

Kommt es zu einem Ansprechen (stationärer Befund innerhalb der MILAN-Kriterien oder „Response-to-Therapy“ (Therapieansprechen) plus sechs monatige Beobachtungszeit) wird die Indikation zur Lebertransplantation gestellt. Bei Progress erfolgt dann die Umstellung hin zu einem palliativen Therapiekonzept.

Anzumerken ist, dass der Ansatz für HCC außerhalb der MILAN-Kriterien hinsichtlich Transplantation bzw. palliativer Therapie unter Studienbedingungen erfolgt [49].

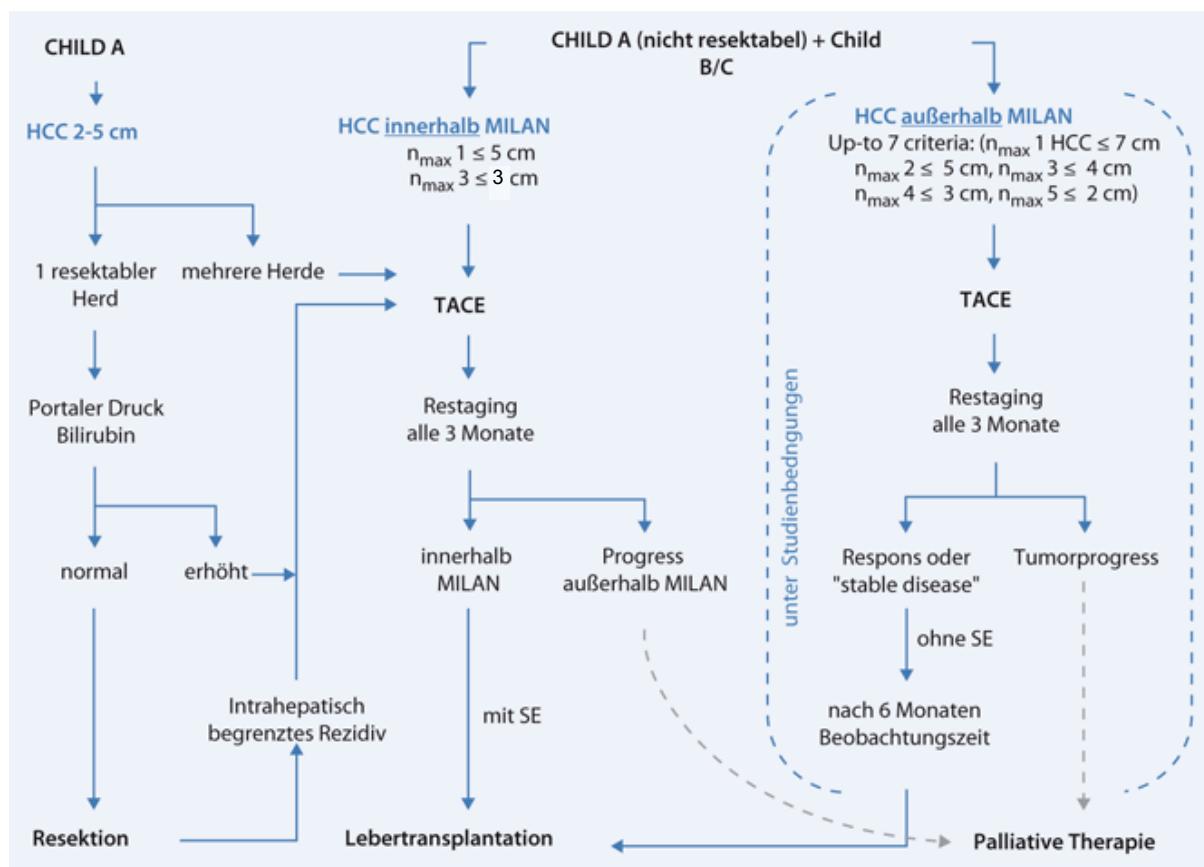


Abbildung 3: Münchener HCC-Algorithmus [49]

1.3. Tumorstammzellen

1.3.1. Definition und Überblick der Literatur

Grundlegend gibt es zwei verschiedene Theorien, entwickelt am Beispiel der Leukämie, die die Heterogenität von Tumoren zu erklären versuchen: auf der einen Seite das stochastische Modell, in dem gilt, dass alle Tumorzellen prinzipiell in der Lage sind, verschiedene Eigenschaften anzunehmen. Dies hängt von Vorgängen in den Zellen selbst ab, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren oder von äußeren Faktoren, beispielsweise der Immunantwort. Welche Zelle schließlich bestimmte Funktionen annimmt, unterliegt lediglich einem stochastischen / zufälligen Effekt und prinzipiell sind Einflüsse auf eine Zelle sowie die damit einhergehenden Veränderungen / Fähigkeiten wieder vollständig reversibel [50, 51].

Dem stochastischen Modell entgegen steht das hierarchische Modell. Dieses Modell beschreibt Stammzellen im Tumorgewebe. Diese Stammzell-(Sub-)Population kann sich weiter differenzieren, besitzt aber insbesondere die Fähigkeit sich selbst zu erneuern (englisch: *self-renewal*); dadurch sorgen sie für den Erhalt des Tumors. Auf der Grundlage des hierarchischen Modells sollte es auch möglich sein, die gesamte Tumorzellpopulation in unterschiedliche (Sub-)Populationen zu unterteilen bzw. zu klassifizieren [50].

Die ersten Hinweise auf eine solche Stammzellpopulation bei Tumoren wurden vor über 40 Jahren für die Leukämie und das Multiples Myelom beschrieben [52]. Wenige Jahre später konnte gezeigt werden, dass es auch bei soliden Tumoren eine Gruppe von Zellen gibt, die Stammzelfähigkeiten besitzt [53]. Im Laufe der Zeit wurden bei mehr und mehr Tumoren Zellen identifiziert, die *self-renewal*-Fähigkeiten besitzen, so zum Beispiel für das Bronchialkarzinom, das Mammakarzinom oder das Glioblastom [54-56].

Zum Thema Tumorstammzellen (engl. cancer stem cells, CSC) möchte ich an dieser Stelle R.Y. Tsai aus „The International Journal of Biochemistry & Cell Biology“ zitieren: „Stammzellen und Tumorstammzellen repräsentieren unterschiedliche biologische Merkmale, die einen für das Leben und die anderen für den Tod“ [57].

1.3.2. Marker zur Identifikation von Tumorstammzellpopulationen

In den 1970er Jahren wurden erstmals Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine beschrieben [58, 59]. In der Praxis wurden die ersten Hypothesen wenig später aufgestellt, weshalb Oberflächenproteine eine wichtige Rolle spielen könnten. Zu erwähnen sei hierbei die These, dass die Modulation des Immunsystems eine signifikante Rolle bei der Kontrolle eines Tumors spielt, wie etwa beim Kolonkarzinom: Organspezifische bzw. organbezogene (Oberflächen-)Antigene werden von den malignen Tumorzellen exprimiert, auf die das Immunsystem dann reagiert [60, 61].

Zu den identifizierten Tumorstammzellmarkern gehören CD133, das u.a. im Rahmen von Karzinomen des Colons, des Pankreas, der Mamma oder der Lunge beschrieben wurde [62-65]. Ebenso zu nennen ist der Marker CD44 bei Karzinomen von Kopf- und Hals oder der Prostata [66, 67]. Weitere Marker, die zur Identifikation von Tumorstammzellen beschrieben wurden, sind beispielsweise EpCAM (Kolorektales Karzinom [68]) oder CD90 (Bronchialkarzinom [69]).

1.3.3. Rolle von Sphäroid-Zellen im Tumorstammzellmodell

Tumorstammzellen spielen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft eine entscheidende Rolle in der Tumorbiologie (siehe 1.3.1). Um diese besser untersuchen zu können, ist es zum einen wichtig, diese Zellen (korrekt) zu identifizieren, aber auch deren Anzahl zwecks besserer Forschungsbedingungen für Laborversuche zu maximieren. Beides ist mit gewissen Schwierigkeiten verbunden, u.a. da diese Zellgruppe lediglich eine Subpopulation aller Tumorzellen darstellt. Es handelt sich hierbei um einen kleinen Prozentsatz von Zellen, gemessen an der Gesamtpopulation. Anfang dieses Jahrhunderts gab es erste Arbeiten, die zeigen konnten, dass das sogenannte Sphäroid-Modell (engl. „spheres“) besonders gut für die Kultivierung von Stammzellen geeignet ist [70, 71]. Diese Publikationen beschreiben die Produktion von neuronalen Stammzellen mit Hilfe der Sphäroidzellkultur und beziehen sich dabei auch auf die grundlegenden Arbeiten in der Erforschung neuronaler Stammzellen von Samuel Weiss [72, 73]. Dass das Sphäroid-Modell auch auf andere Tumoren

übertragbar zu sein scheint, konnte bisher u.a. für das Pankreaskarzinom gezeigt werden, aber auch beim Prostatakarzinom (hier in Zusammenhang mit der Oberflächenmarker CD44), dem kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie oralem Plattenepithelkarzinom [63, 74-76].

Beschrieben wurde dafür bisher die Möglichkeit, Tumorstammzellen als Sphäroide mittels serumfreien Mediums wachsen zu lassen. Es wird vermutet, dass Zellen ohne Stammzelleigenschaften nicht in einer serumfreien Umgebung überleben können oder zumindest, dass Tumorstammzellen mit den anspruchsvolleren Kulturbedingungen, u.a. durch das Fehlen des Serums, besser zureckkommen. Es wird also versucht, das Wachstum von ‚Zellen mit Überlebensvorteilen‘, wie es auch für Tumorstammzellen vermutet wird, durch Selektion zu fördern [77, 78].

1.3.4. Charakterisierung von Tumorstammzellen des HCC

Beim HCC kann es nach Lebertransplantation zu Tumorrezidiven in der transplantierten Leber kommen [79, 80]. Als mögliche Ursache wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumorstammzellen die Ursache dieser Rezidive darstellen könnten [81]. Allein im Ausblick auf zielgerichtete Therapien ist es wichtig diese Zellsubpopulation zu identifizieren bzw. auch zu charakterisieren [82].

Erste Hinweise auf eine Tumorstammzellpopulation beim hepatzellulären Karzinom gab es schon in den 1980er Jahren, doch die ersten erfolgsversprechenden Identifizierungsversuche gelangen erst 25 Jahre später [83].

Der erste Marker, für welchen Stammzelleigenschaften für das hepatzelluläre Karzinom beschrieben wurde, war das Oberflächenprotein CD133. Bei CD133-positiven Zellen konnte eine höhere Proliferation, besseres „self-renewal“ sowie höhere Differenzierungskapazität im Gegensatz zu CD133-negativen Zellen, festgestellt werden [84-86]. Bekannt wurde dieser Marker ursprünglich durch die Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen [87]. Weitere Marker wurden für die Stammzellen des hepatzellulären Karzinoms beschrieben, darunter EpCAM, CD90 und CD44 [88-90]. Auf Grund der Anzahl an unterschiedlichen Stammzellmarkern wurde schnell klar, dass die Betrachtung von Co-Expressionen verschiedener Marker interessant sein

könnte. Es kristallisierte sich die Kombination der Marker CD133 und CD44 heraus, um besonders präzise eine Subpopulation mit Stammzelleigenschaften zu charakterisieren. So wurde gezeigt, dass die Co-Expression von CD133 und CD44 zu schnellerem Tumorwachstum sowie ausgeprägter hämatogener Metastasierung des hepatzellulären Karzinoms führt [91, 92]; besonders die Fähigkeit zur Metastasierung definiert CD133^{pos}-CD44^{pos}-HCC-Zellen als eine hochaggressive Subpopulation des hepatzellulären Karzinoms, die man anhand ihrer Eigenschaften als Tumorstammzellen betrachtet .

1.4. Medizinische Beeinflussung von Tumorstammzellen des HCC

1.4.1. Chemotherapeutika

In den aktuellen Therapieleitlinien spielt Chemotherapie keine primäre Rolle (siehe 1.2.2 Klassifikationssysteme mit Therapieempfehlungen). Nur im fortgeschrittenen Stadium wird Sorafenib eingesetzt.

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor, der unter anderem die Tumorproliferation über die Hemmung der Raf-Kinase (rapidly accelerated fibrosarcoma) sowie die Angiogenese über die Hemmung von VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) und PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor) stört [93]. Daher wird Sorafenib zur Therapie des fortgeschrittenen HCC oder von Nierenzellkarzinomen eingesetzt, beim HCC konnte ein längeres Gesamtüberleben gezeigt werden [45, 94, 95].

Zur Wirkung von Sorafenib auf Tumorstammzellen gibt es bisher nur wenig Literatur. Eine Forschungsgruppe aus den USA konnte unter anderem zeigen, dass die Proliferation von Tumorstammzellen des HCC ($CD133^{pos}$, $CD44^{pos}$ und $CD24^{pos}$) gehemmt werden konnte [96]. Eine weitere Arbeit beschreibt die Wirkung von Sorafenib auf CSC des Pankreaskarzinoms [97].

1.4.2. Strahlentherapie

Als lokales Verfahren wird die selektive interne Radiotherapie (SIRT) eingesetzt, die, ähnlich der TACE, die starke arterielle Vaskularisierung der HCC nutzt. Microspheres mit radioaktiv-markierten Substanzen wie etwa Yttrium-90 werden über einen arteriellen Katheter in die den Tumor versorgenden Arterien eingebracht [98, 99]. Es gelten hohe Anforderungen an die Infrastruktur, unter anderem muss das nuklearmedizinische als auch interventionell-radiologische Know-how vorhanden sein. Die Bestrahlung mittels einer extrakorporalen Strahlungsquelle ist besonders bei Leberzirrhose durch das Risiko der Entwicklung eines strahleninduzierten Leberversagens beschränkt. Aber auch die Strahlensensitivität von gesundem Leberparenchym (sowie

anderer, sich im Strahlenfeld befindlicher Organe) schränkt die Einsatzmöglichkeiten ein [100, 101].

Inwieweit Strahlentherapie bei der Tumor(-stammzell-)Therapie des HCC von Nutzen sein kann, ist nicht eindeutig geklärt, da die Radiosensitivität als Stammzelleigenschaft schwierig zu untersuchen ist [102].

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Für die Versuche wurde die Huh-7-Zelllinie (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

Monolayer-Kultur: Kultiviert wurden die Zellen in DMEM/F12 Medium (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit einem 10-prozentigen Anteil von fetalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) in 75 cm³ Zellkulturflaschen (Thermo/NUNC, Schwerte, Deutschland). Die Zellkulturen wurden in einem 5:1-Verhältnis dreimal pro Woche gesplittet, dafür wurde Trypsin/EDTA (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) sowie DPBS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) verwendet, die Zellkulturflaschen wurden bei jeder Passagierung durch neue ersetzt. Regelmäßig wurden Mykoplasmentests durchgeführt. Für die Experimente wurden frühe Passagen verwendet (3-10).

Sphäroid-Kultur: Zur Herstellung der Sphäroidkulturen wurden Monolayer Huh-7 Zellen aus frühen Passagen (3-10) separiert. Diese wurden, in speziell niedrig adhären-ten, „Six Well Plates“ (M&B Stricker, Tutzing, Deutschland) in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Milliliter Medium, in Kultur genommen. Das Kulturmedium besteht zu 98% DMEM/F12 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und 2% B-27 (*serum free supplement*, Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Alle zwei Tage wurde ca. 1 Milliliter Medium hinzugefügt und nach einer Woche wurden sämtliche, jetzt nicht adharent gewachsene Zellen in spezielle, nicht-adhäsive 75 cm³ Zellkulturflaschen (M&B Stricker, Tutzing, Deutschland) überführt. Als Kulturmedium wurde hier ebenfalls das oben beschriebene, serumfreie Medium B-27 verwendet. Diese Sphäroid-kulturen wurden einmal pro Woche, im Verhältnis 20:1 gesplittet. Nach Zentrifugation wurde Trypsin/EDTA (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) sowie DPBS verwendet. Für die Experimente wurden Sphäroide der frühen Passagen 10-20 verwendet.

Vor der Durchführung von Versuchen wurden die Zellen jedes Mal mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt, um eine möglichst gleiche Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Sowohl für die Monolayer-Kultur, als auch bei den Spheres, wurden regelmäßige Mykoplasmentests durchgeführt, um eine Kontamination, im Sinne einer daraus resultierenden Verfälschung der Ergebnisse, zu detektieren.

2.2. Rapamycin- und 5-Fluorouracil-Versuche

Um die vermutete Zellpopulation besser zu charakterisieren, wurden zu Beginn Versuche mit den gängigen Chemotherapeutika Rapamycin (Pfizer (früher Wyeth), Münster, Deutschland) und 5-Fluorouracil (Pfizer, Münster, Deutschland) begonnen. Dafür wurden jeweils eine Million Zellen mit zwölf Milliliter Medium (90% DMEM/F12 plus 10% fetales Kälberserum, siehe Punkt 2.1. *Zellkultur*) für zwei Tage in Kultur genommen. Nach 48 Stunden begann die Therapie mit den Chemotherapeutika.

5-Fluorouracil: Verwendet wurden die Dosen 10 μ g und 25 μ g. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA (siehe Punkt 2.1. *Zellkultur*) abgelöst und dann für die FACS-Analyse vorbereitet.

Rapamycin: Der Aufbau gleicht prinzipiell dem der 5-Fluorouracil-Versuche. Die verwendeten Dosen waren 9 μ l, 18 μ l und 27 μ l. Da Rapamycin in DMSO (Applichem, Darmstadt, Deutschland) gelöst werden muss, bevor man es verwenden kann und DMSO per se zelltoxisch ist, wurde neben einer *null*-Kontrolle auch eine DMSO-Kontrolle angelegt. Die Auswertung fand nach 48 Stunden statt. Nach Trypsinierung der Zellen wurde die FACS Analyse vorbereitet.

2.3. Strahlentherapie

Die kultivierten Zellen wurden mit Photonen (6 MeV) und mit einer Dosisrate von 3 Gray pro Minute bestrahlt. Verwendet wurde hierfür ein Linearbeschleuniger (Siemens Mevatron M, München, Deutschland). Nicht bestrahlte Zellen wurden außerhalb des Bestrahlungsraumes während der Bestrahlung aufbewahrt und konnten somit als Kontrollen verwendet werden.

Monolayer-Kultur: Die Zellen befanden sich in Kultur. Zwei Tage vor Bestrahlung wurden Zellen, wie oben beschrieben, trypsiniert und eine Million Zellen in eine neue 75 cm³ Zellkulturflasche überführt. Am Tag der Bestrahlung erfolgte ein Medienwechsel, im Anschluss wurden die Zellen bestrahlt und umgehend wieder für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Kontrollen wurden ebenfalls mittransportiert und außerhalb des Bestrahlungsraumes gelagert.

Sphäroid-Kultur: Wie auch in der Monolayer-Reihe befanden sich die Sphäroide bereits in Kultur. Fünf Tage vor den Bestrahlungsexperimenten wurden die Zellen trypsiniert und jeweils eine Million Zellen in neue, nicht-adhäsive 75 cm³ Zellkulturflaschen überführt. Alle zwei Tage sowie am Tag der Bestrahlung (vor der eigentlichen Bestrahlung) wurden 3,5 Milliliter Medium hinzugefügt. Nach Bestrahlung erfolgt die weitere, 48-stündige Inkubation im Brutschrank.

Die Auswertung der Bestrahlungsversuche fand nach weiteren 48 Stunden statt, Testläufe wurden nach 12 beziehungsweise 24 Stunden durchgeführt, es konnte allerdings kein grundlegender Unterschied der untersuchten Kriterien detektiert werden.

2.4. FACS - Analyse

Die Analyse der Zellen geschah mittels FACS (Durchflusszytometrie). Durch die Verwendung spezieller Antikörper gegen Oberflächenmoleküle, die wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wurden unterschiedliche Zellen bzw. Zellpopulationen detektiert.

Färbung der Oberflächenmoleküle der Zellen: Alle FACS-Analysen, in denen die Oberflächenmoleküle der Zellen betrachtet wurden, begannen mit der Trypsinierung der Zellen (siehe Punkt 2.1. Zellkultur). Als FACS-Puffer wurde DPBS verwendet, dem noch zehn Gramm BSA (*Albumin Fraktion V, biotinfrei*, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt wurde. Es wurden ca. 500.000 Zellen je Probe verwendet, die dann in 400 µl der DPBS-Lösung aufgenommen wurden. Die verwendeten Antikörper waren „CD133-APC“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und „CD44-PE“ (BD, Heidelberg, Deutschland) sowie entsprechende ISO-Antikörper „Mouse IgG1-APC“ und „Mouse IgG1-PE“ (beide BD, Heidelberg, Deutschland). Um eine Aussage bezüglich der Vitalität bzw. der Apoptoseinduktion treffen zu können, wurde 7AAD (BD, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Intrazelluläre Färbung zur Bestimmung der Proliferation: Bei einigen Versuchen wurde das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Dies geschah mittels BrdU (Bromodesoxyuridin), das von proliferierenden Zellen als Substrat für die DNA-Synthese verwendet wird und mittels spezifischer Antikörper angefärbt werden kann. Für die Versuche wurde das „FITC BrdU Flow Kit“ (BD, Heidelberg, Deutschland) anhand der beiliegenden Beschreibung verwendet.

Datenakquisition und -analyse: Es wurde *FACSCalibur™* (BD, Heidelberg, Deutschland) für die Akquisition verwendet. Zum Auswerten der Daten wurden neben *FACSCalibur™* auch *Flowing Software* (Perttu Terhu, Turku, Finnland) sowie die Software *WinMDI* (Joseph Trotter, San Diego, USA) zur Analyse der Daten verwendet.

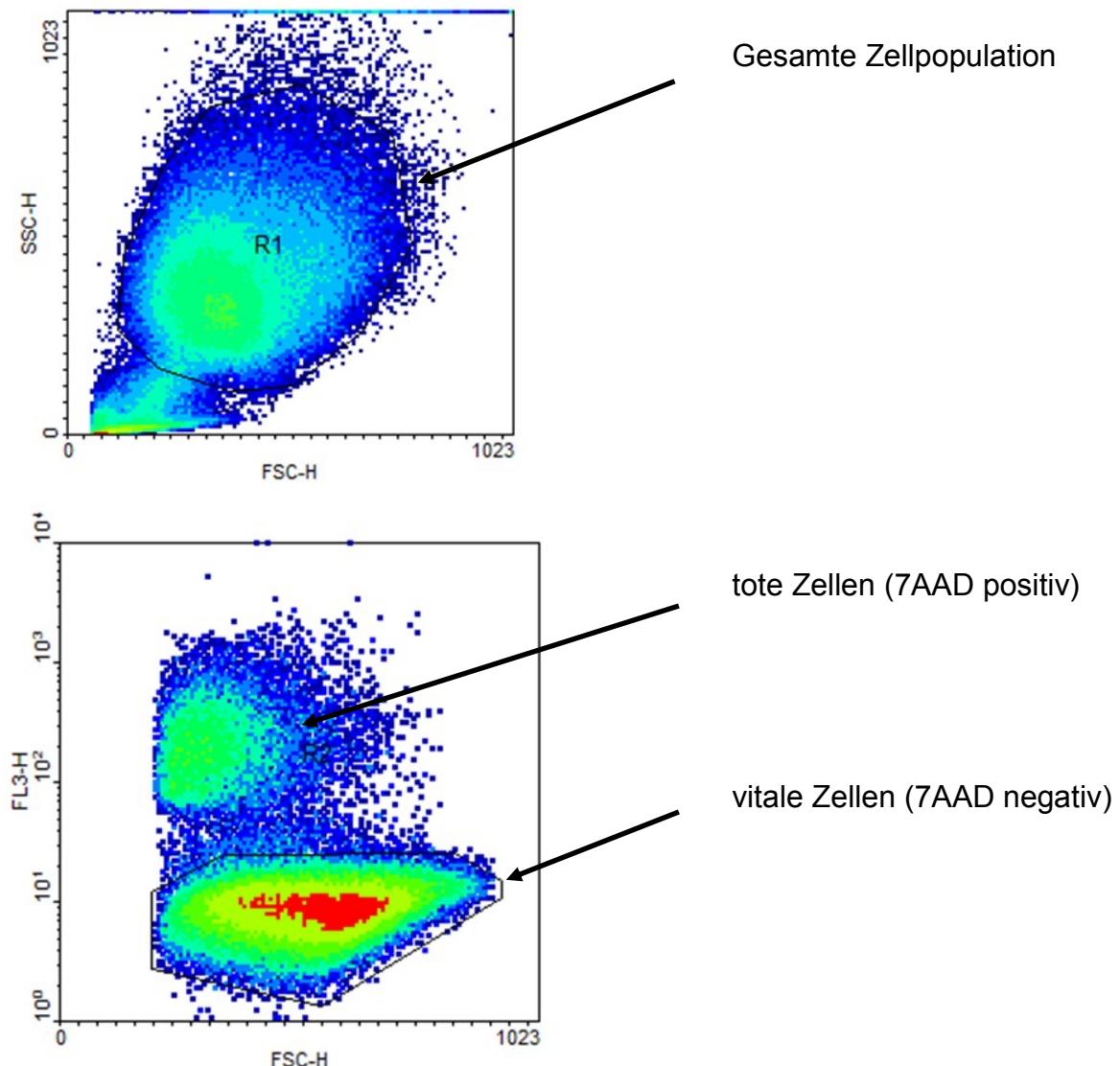


Abbildung 4: FACS Plot, Bestimmung der Vitalität (eigene Daten)

2.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgt größtenteils mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) und zudem auch mittels SPSS (IBM, Armonk, USA). Bei allen Auswertungen wurde von einer ‚nicht-Gaußschen Verteilung‘ ausgegangen und dementsprechend die Tests nach Kruskal-Wallis bzw. Friedman verwendet. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant angenommen. Die abgebildeten Diagramme wurden mittels GraphPad Prism erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Rapamycin - und 5-Fluorouracil - Versuche

Ziel dieser Versuche war es, in Monolayer-Kultur zu untersuchen, wie sich die Behandlung mittels Rapamycin bzw. 5-Fluorouracil auf die Zelllinie Huh-7 auswirkt und speziell auf die Marker CD133 und CD44 auswirkt.

Unter Therapie mit 5-FU sieht man, dass die Zellen, die CD133 und CD44 als Oberflächenmoleküle exprimieren, zunehmen.

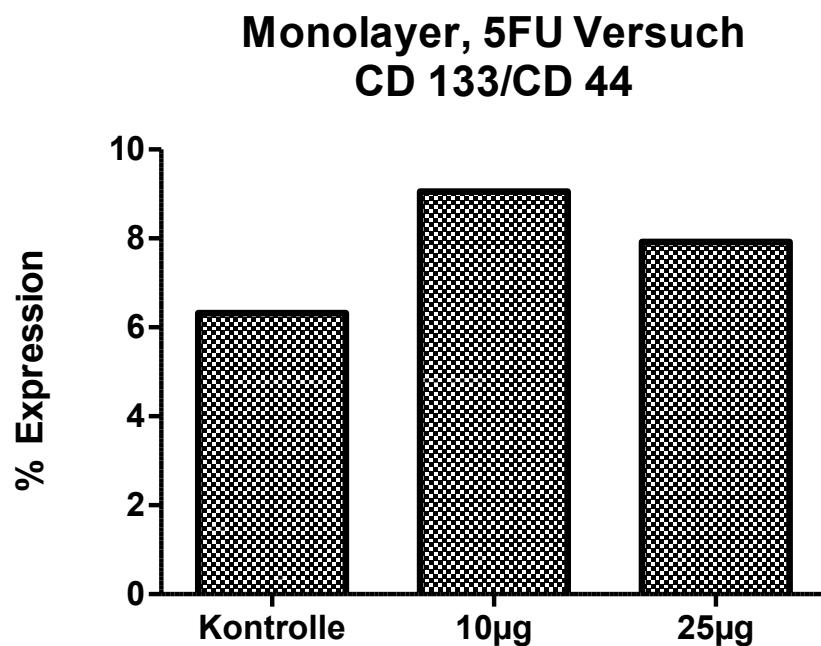


Abbildung 5: Monolayer 5FU Versuch CD133/CD44

Im Detail verglichen zeigt sich, dass die Zunahme dieser Zellen, vermutlich mit der Expression von CD44 zusammenhängt und weniger mit CD133.

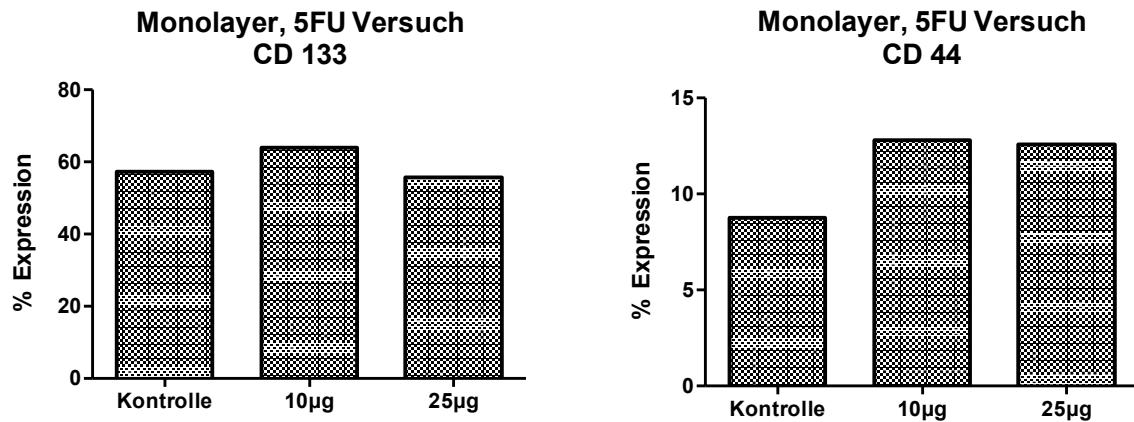


Abbildung 6: Monolayer 5FU Versuch CD133 vs. CD44

Dieser Effekt lässt sich auch bei den Versuchen mit Rapamycin beobachten:

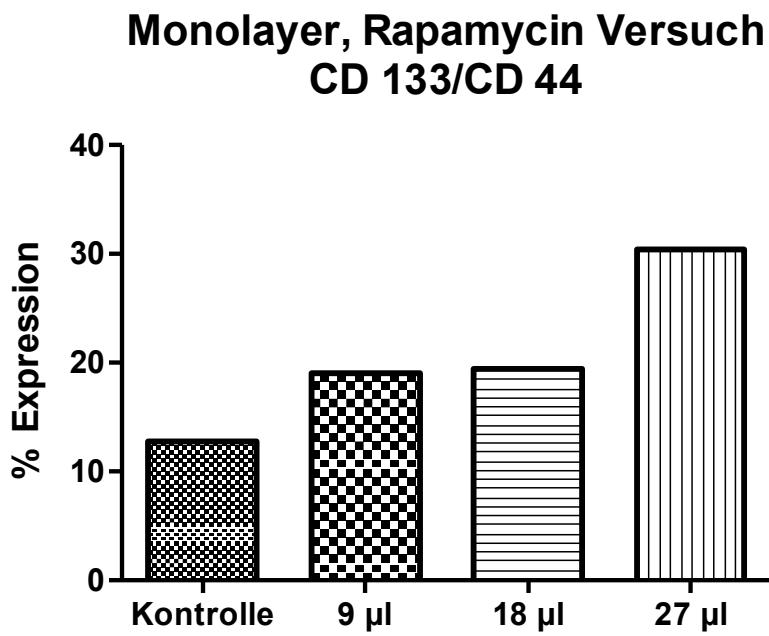


Abbildung 7: Monolayer Rapamycin Versuch CD133/CD44

Schaut man sich hier vergleichsweise die Expression von CD133 und CD44 separat an, ist der Effekt hier vermutlich auch auf die CD44-Expression zurückzuführen.

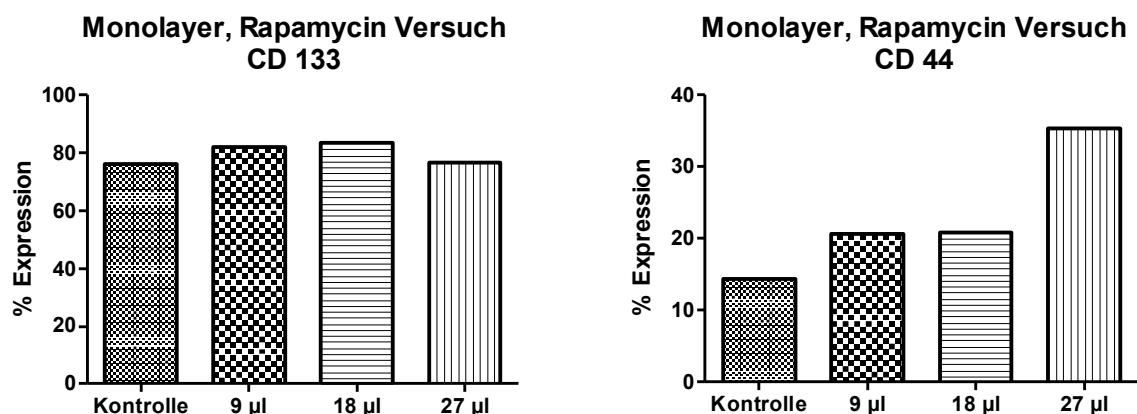


Abbildung 8: Monolayer Rapamycin Versuch CD133 vs. CD44

Dieser Effekt könnte bedeuten, dass die CD44^{pos}-Population einen Überlebensvorteil, z.B. durch Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika besitzt.

Anhand der DMSO-Kontrollen konnte gezeigt werden, dass es keine Unterschiede zwischen den Dosierungen gab. Somit kann man annehmen, dass es zur Selektion der Population durch Rapamycin kommt und nicht durch das zelltoxische Lösungsmittel DMSO.

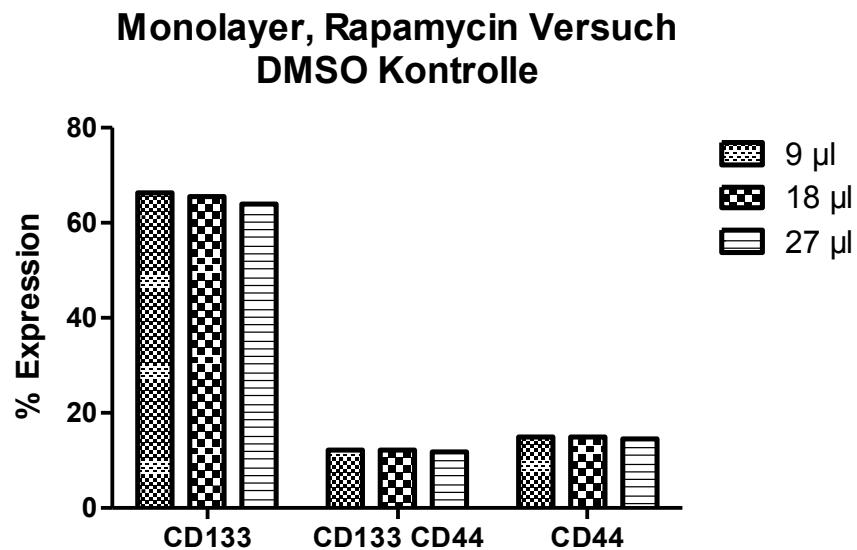


Abbildung 9: Monolayer Rapamycin Versuch, DMSO Kontrolle

3.2. Entwicklung der Populationen ohne Einfluss exogener Noxen

Um auszuschließen, dass es sich bei dem unter 3.1. gezeigten Expressionsverhalten nicht um eine Beobachtung handelt, die normalem Wachstumsverhalten entspricht, wurde das Expressionsverhalten genauer analysiert: Zum einen durch FACS-Analysen innerhalb einer Passage, zum anderen durch Expressionsanalysen zu Beginn jeder neuen Passage.

3.2.1. Innerhalb einer Passage (Monolayer)

Zu den Zeitpunkten Tag 0 (T0), Tag 2 (T2), Tag 4 (T4) und Tag 8 (T8) wurden die Zellen via FACS Analyse betrachtet ($p=0,39$):

**Monolayer, Expression innerhalb einer Passage
CD 133/CD 44**

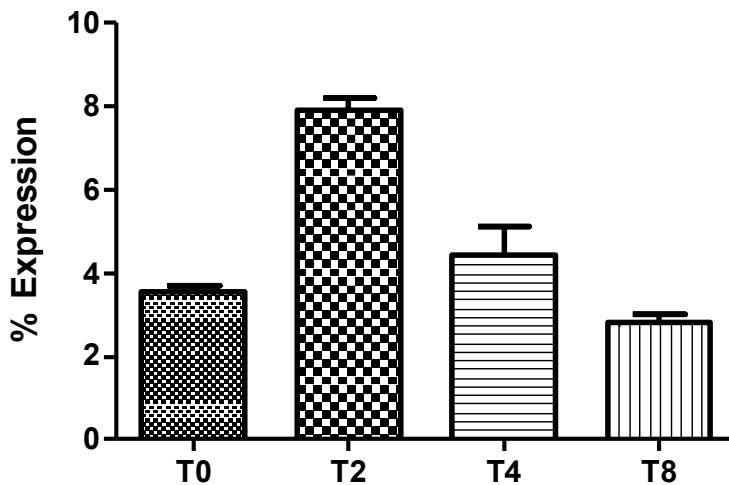


Abbildung 10: Monolayer, Expression innerhalb einer Passage CD133/CD44

Man erkennt, dass es zwar zu einem vermeintlichen Anstieg zwischen T0 und T2 kommt, dieser relativiert sich aber im Verlauf. Dies könnte hypothetisch mit einer Stammzellaktivierung zu tun haben, die die Folge des „Ausdünnens“ der Zellen ist.

Im Vergleich der Expressionen von CD133 und CD44 ergab sich keine Signifikanz ($p=0,64$).

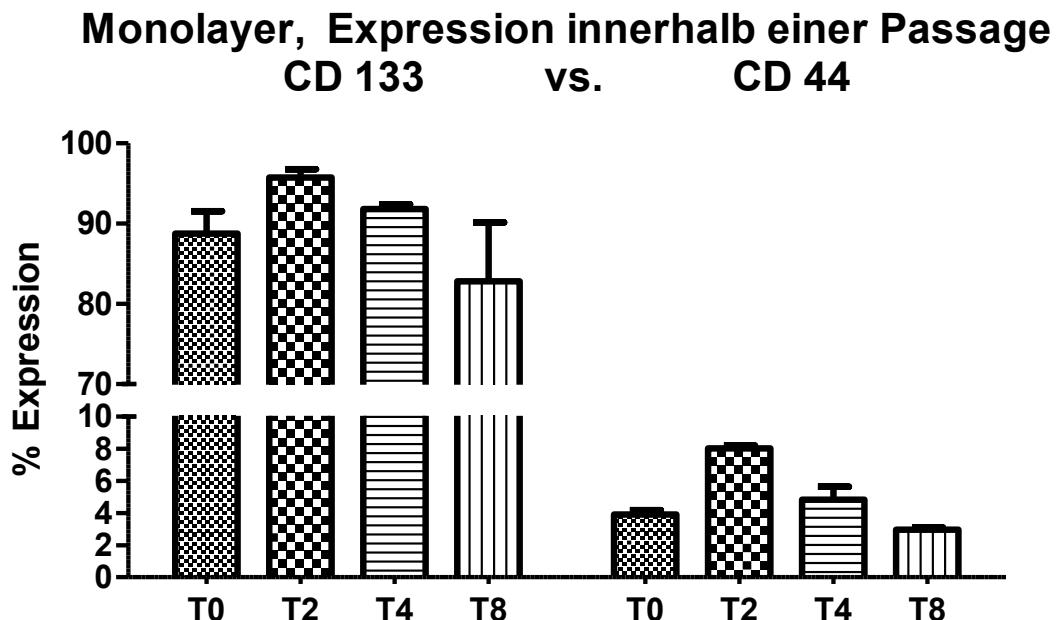


Abbildung 11: Monolayer, Expression innerhalb einer Passage CD133 vs. CD44

3.2.2. Über mehrere Passagierungen (Monolayer)

Über einen Zeitraum von zehn Passagierungen wurde bei jeder Passagierung eine FACS-Analyse mit Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD133 und CD44 durchgeführt, um festzustellen, ob zu einer Veränderung der Populationen kommt. Dabei konnte keine signifikante Veränderung der Populationen festgestellt werden. Die doppelpositive Population zeigt hierbei keine signifikante Entwicklung ($p=0,44$).

Monolayer Passagierung CD 133/CD 44

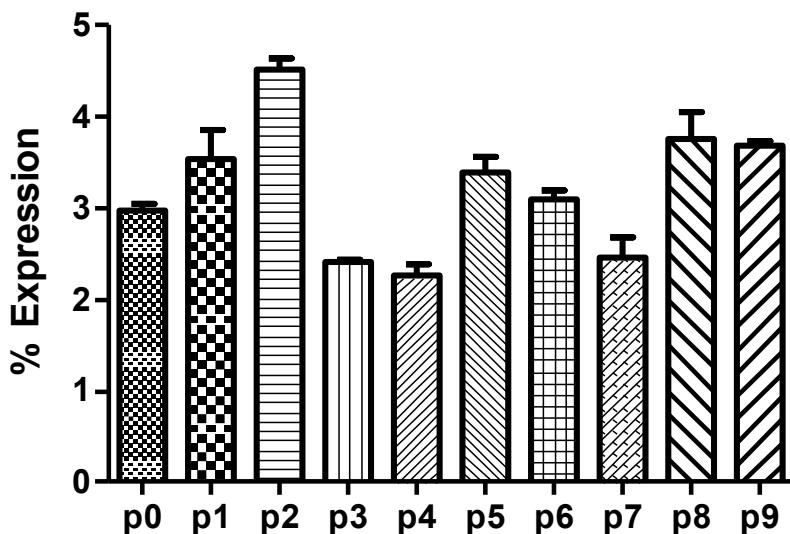


Abbildung 12: Monolayer Passagierung CD133/CD44

Vergleicht man hier zusätzlich noch jeweils die Populationen von CD133 und CD44 miteinander, ist ebenso wenig ein signifikanter Effekt zu erkennen ($p=0,95$).

Monolayer Passagierung CD 133 vs. CD 44

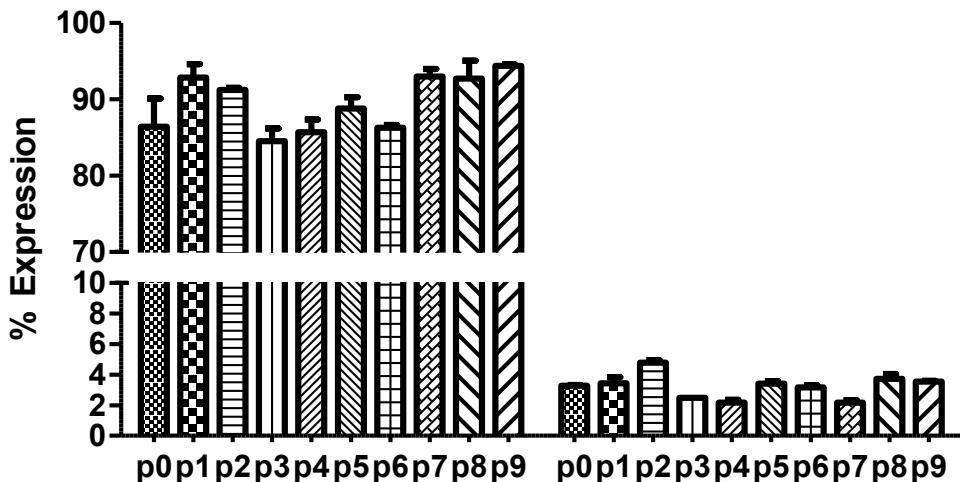
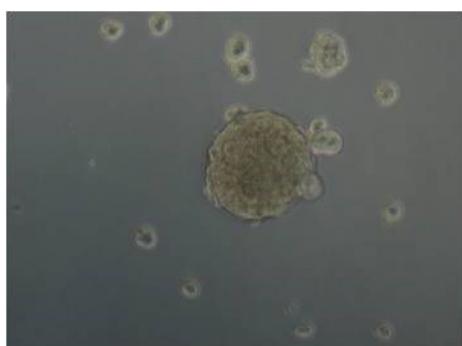


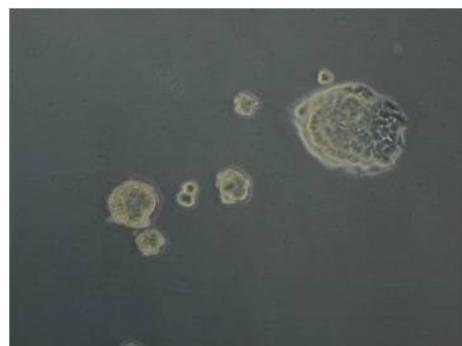
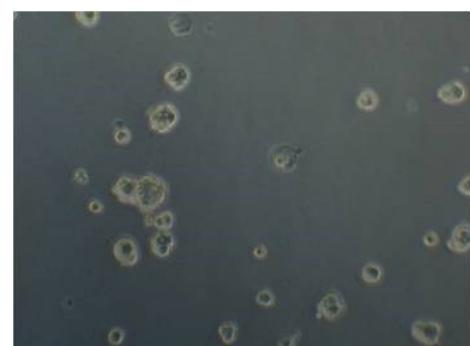
Abbildung 13: Monolayer Passagierung CD133 vs. CD44

3.3. Fotografische Dokumentation der Sphäroid-Kultur

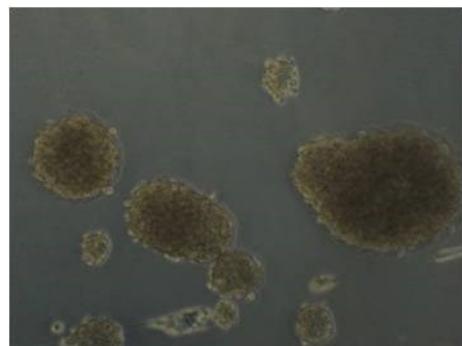
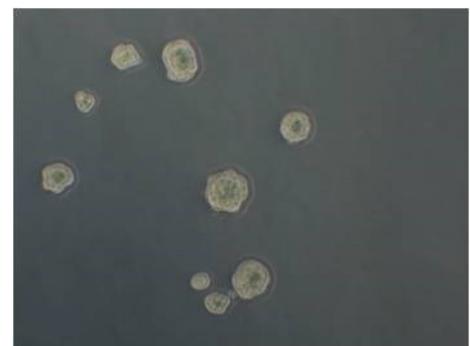
Anhand der folgenden Fotografien kann man einen Eindruck des dreidimensionalen Wachstums der Huh7-Zellen in der Sphäroid-Kultur gewinnen. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung nach zwei, vier und acht Tagen Inkubation fotografiert.



Tag 2



Tag 4



Tag 8

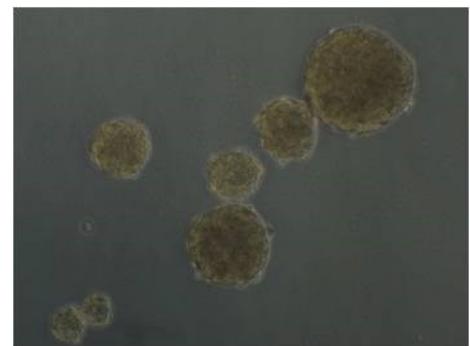


Abbildung 14: Wachstum der Spheres nach 2, 4 und 8 Tagen (eigene Daten)

3.4. Entwicklung der Spheres-Populationen ohne exogene Einflüsse innerhalb einer Passage

Untersucht wurde hier, analog zum Versuch bei den Monolayer-Zellen, ob es zu einer Veränderung des Expressionsverhaltens innerhalb einer Passage kommt. Ebenso wurden die Zeitpunkte Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 8 verglichen (T0, T2, T4 und T8).

**Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage
CD 133/CD 44**

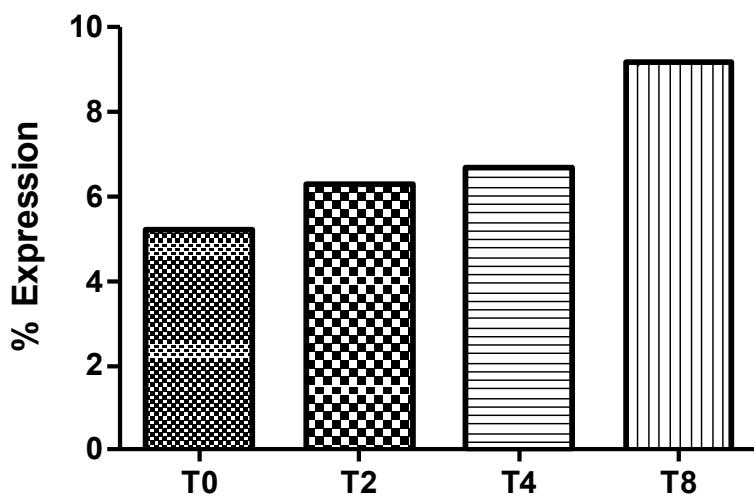


Abbildung 15: Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage CD133/CD44

Man kann einen Trend erkennen, der eine beinahe Verdopplung der CD133^{pos}-CD44^{pos}-Zellen innerhalb einer Passage zeigt (wenn auch nicht statistisch signifikant, $p=0,39$).

Die Gegenüberstellung von CD133 und CD44 bestätigt den Zusammenhang: Der Marker CD44 wird vermehrt nachgewiesen, wobei es tendenziell eher zu einem Abfall der CD133^{pos}-Population kommt. Hier zeigt sich aber keine Signifikanz ($p=0,13$).

Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage CD 133 vs. CD 44

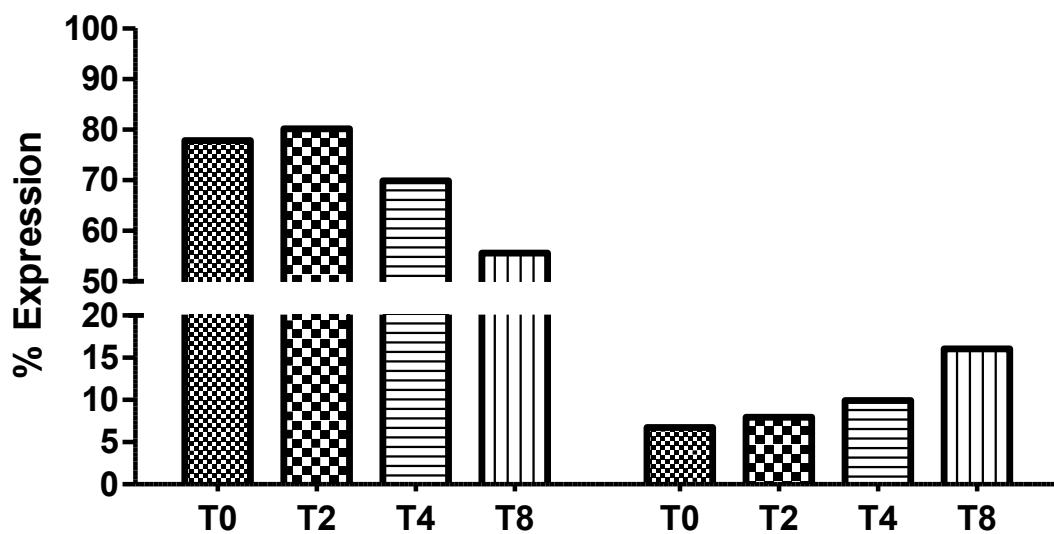


Abbildung 16: Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage CD133 vs. CD44

3.5. Bestrahlung der Huh-7 – Zellen

3.5.1. Vorversuche

Für den ersten Vorversuch wurden, neben der obligatorischen Kontrolle, die Bestrahlungsdosen 2 Gray und 8 Gray gewählt und die gleichzeitige Expression der Marker CD133 und CD44 untersucht.

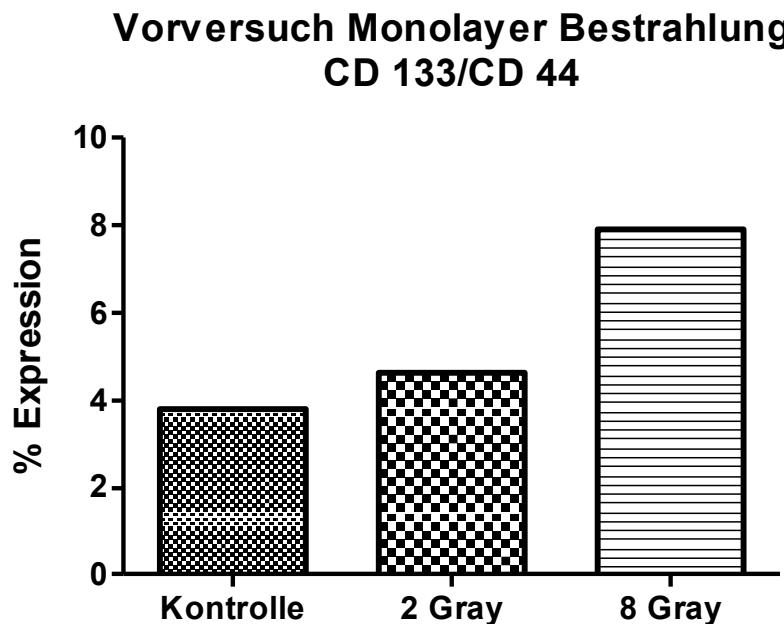


Abbildung 17: Monolayer, Vorversuch Bestrahlung CD133/CD44

Deutlich zeigt sich eine Anreicherung der CD133^{pos}-CD44^{pos}-Population. Geht man ins Detail und schaut sich vergleichend die einzelne Expression der Marker CD133 und CD44 an, so kann man feststellen, dass der Marker CD133 keine signifikanten Veränderungen aufweist. Die CD44-Expression hingegen nimmt, relativ zur Kontrolle, zu.

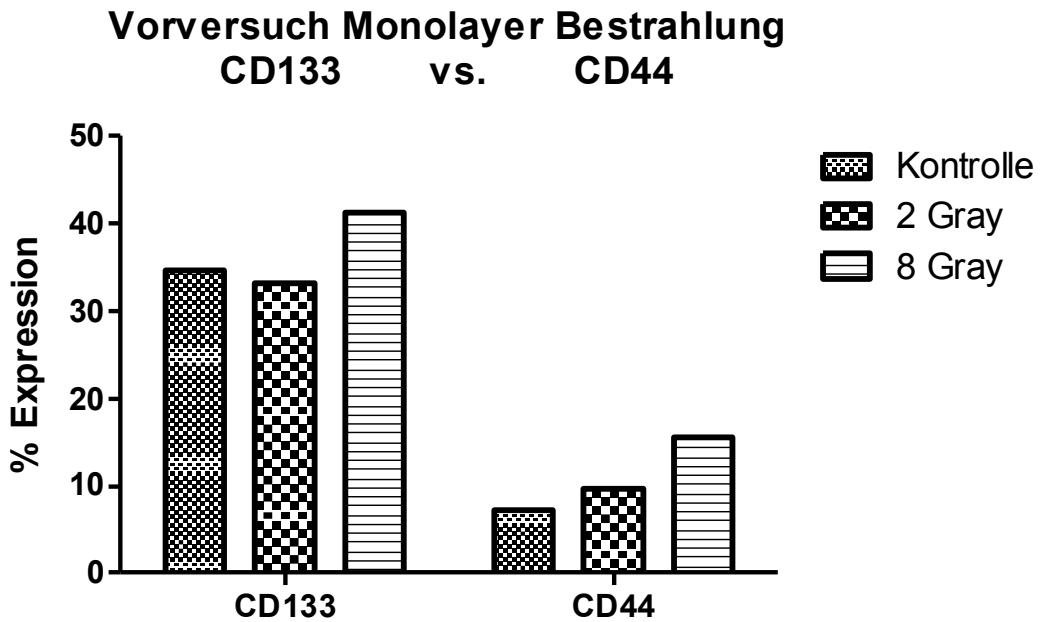


Abbildung 18: Monolayer, Vorversuch Bestrahlung CD133 vs. CD44

3.5.2. Monolayerkultur

Nach Betrachtung der Ergebnisse der Vorversuche (3.5.1. Vorversuche) wurden die Dosen 2 Gray, 4 Gray, 8 Gray und 12 Gray gewählt. Die Ergebnisse aus den Vorversuchen konnten bestätigt werden; es konnte vielmehr gezeigt werden, dass die CD133^{pos}-CD44^{pos}-Population, relativ zur Kontrolle, dosisbezogen anreichert.

Monolayer, 48h nach Bestrahlung CD 133/CD 44

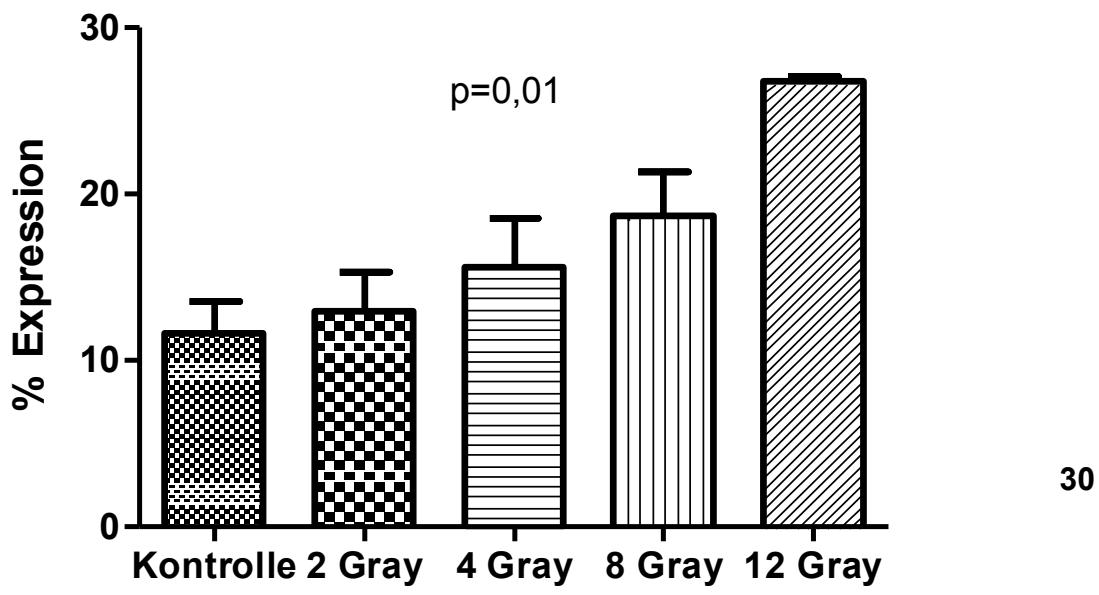


Abbildung 19: Monolayer, Bestrahlung CD133/CD44

Dies hängt hier, wie auf Grund der Vorversuche vermutet, mit der Erhöhung des Anteils der CD44^{pos}-Zellen zusammen.

Statistisch signifikant ($p=0,003$) zeigte sich, dass mit Intensivierung der Bestrahlung der Anteil an CD44^{pos}-Zellen steigt. Dem entgegen verändert sich der Anteil an CD133^{pos}-Zellen nicht signifikant.

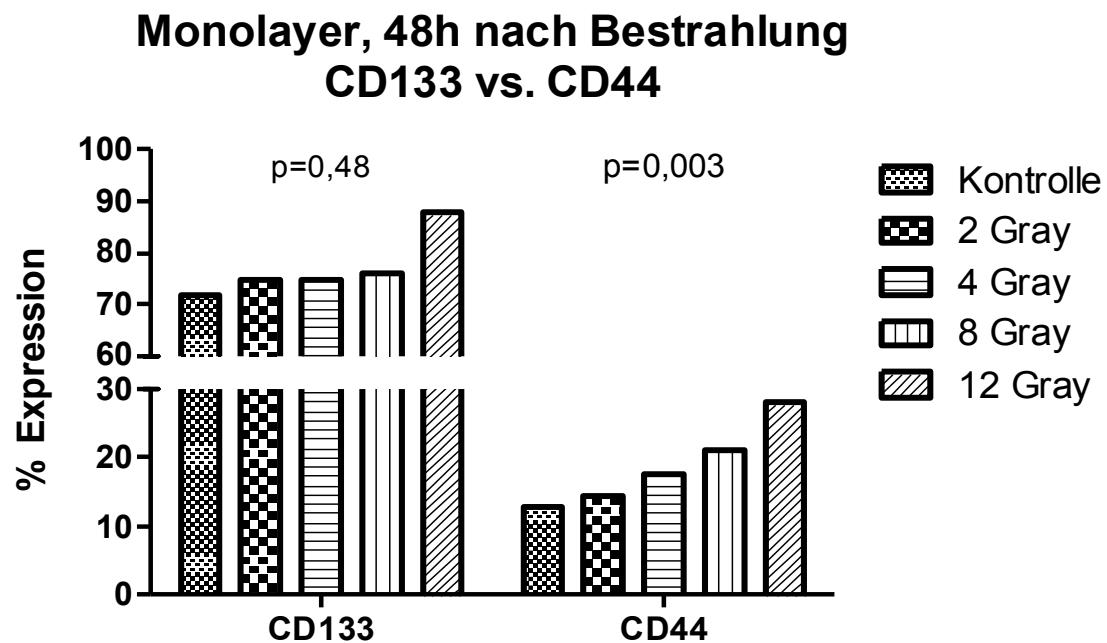


Abbildung 20: Monolayer, Bestrahlung CD133 vs. CD44

3.5.3. Sphäroidkultur

Entsprechend der Monolayer-Versuche wurden auch hier die Bestrahlungsdosen 2 Gray, 4 Gray, 8 Gray und 12 Gray untersucht. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte auch hier gezeigt werden, es kam zu einer relativen Erhöhung der CD133^{pos}-CD44^{pos}-Population ($p=0,02$).

Spheres, 48h nach Bestrahlung CD 133/CD 44

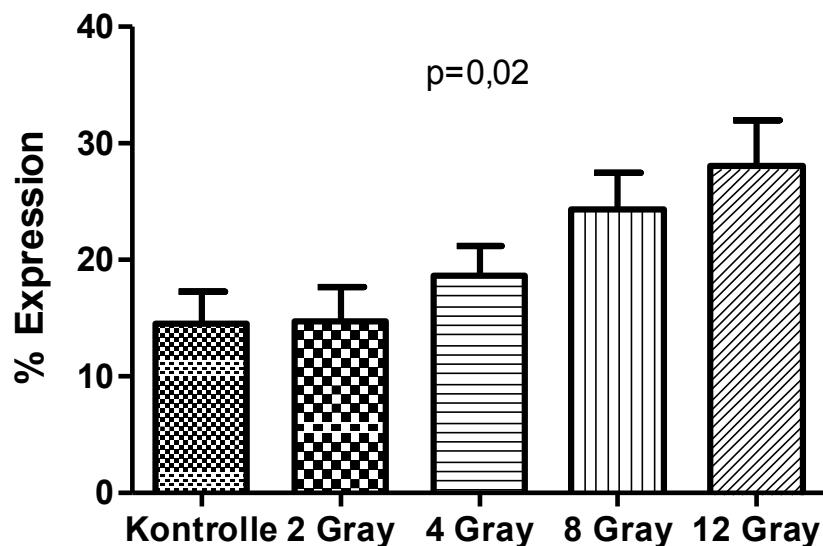


Abbildung 21: Spheres, Bestrahlung CD133/CD44

Auch für die Spheres gilt: Es kommt zu einer Anreicherung der CD44^{pos}-Zellen unter Intensivierung der Bestrahlung. Dies unterstreicht die These, dass diese Population eine Resistenz gegenüber Bestrahlung besitzt.

Spheres, 48h nach Bestrahlung CD133 vs. CD44

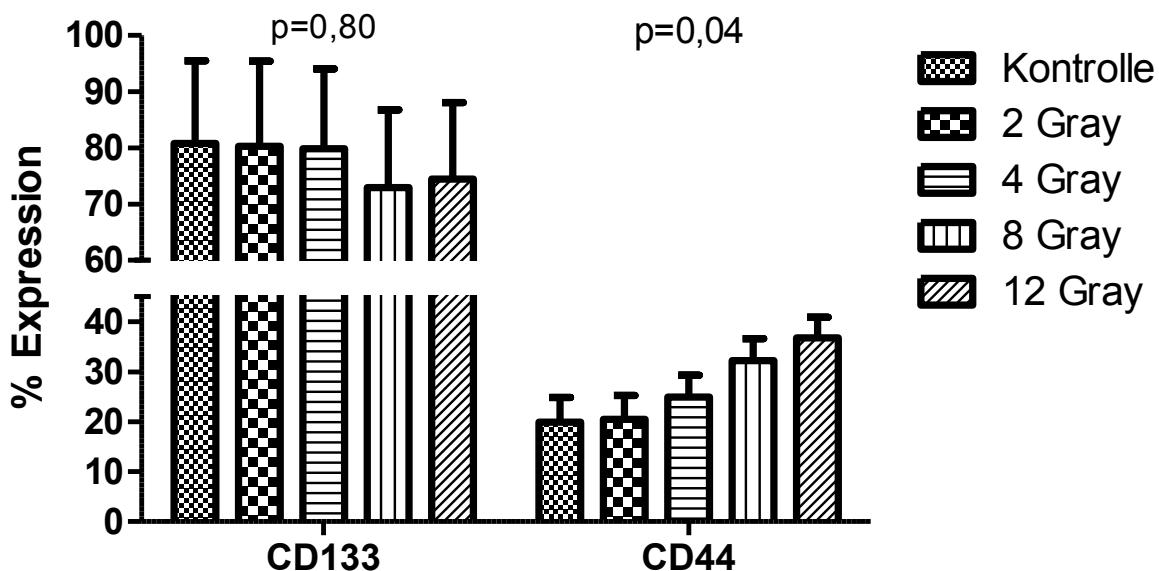


Abbildung 22: Monolayer, Bestrahlung CD133 vs. CD44

Wie auch schon in der Monolayer-Kultur steigt der Anteil an CD44^{pos}-Zellen statistisch signifikant an ($p=0,04$). Die CD133^{pos}-Zellen verändern sich, im Gegensatz dazu, in ihrem Anteil nicht signifikant.

3.6. Untersuchung des Apoptoseverhaltens

Um eine Aussage über die Vitalität der Zellen machen zu können, wurde das Apoptoseverhalten genauer analysiert. Wie im Methodenteil unter Punkt 2.4 FACS-Analyse erwähnt, wurde 7AAD verwendet, um vitale Zellen zu selektieren und nur diese weiter zu analysieren. In diesen Dotplots zeigte sich nach Bestrahlung, dass neben der 7AAD^{pos}- und der 7AAD^{neg}-Population eine weitere Population auftrat. Diese war nicht 7AAD-negativ, aber deren Signal zeigt auch nicht die Intensität der avitalen, 7AAD-positiven Zellen. Diese Zellen befinden sich in Apoptose.

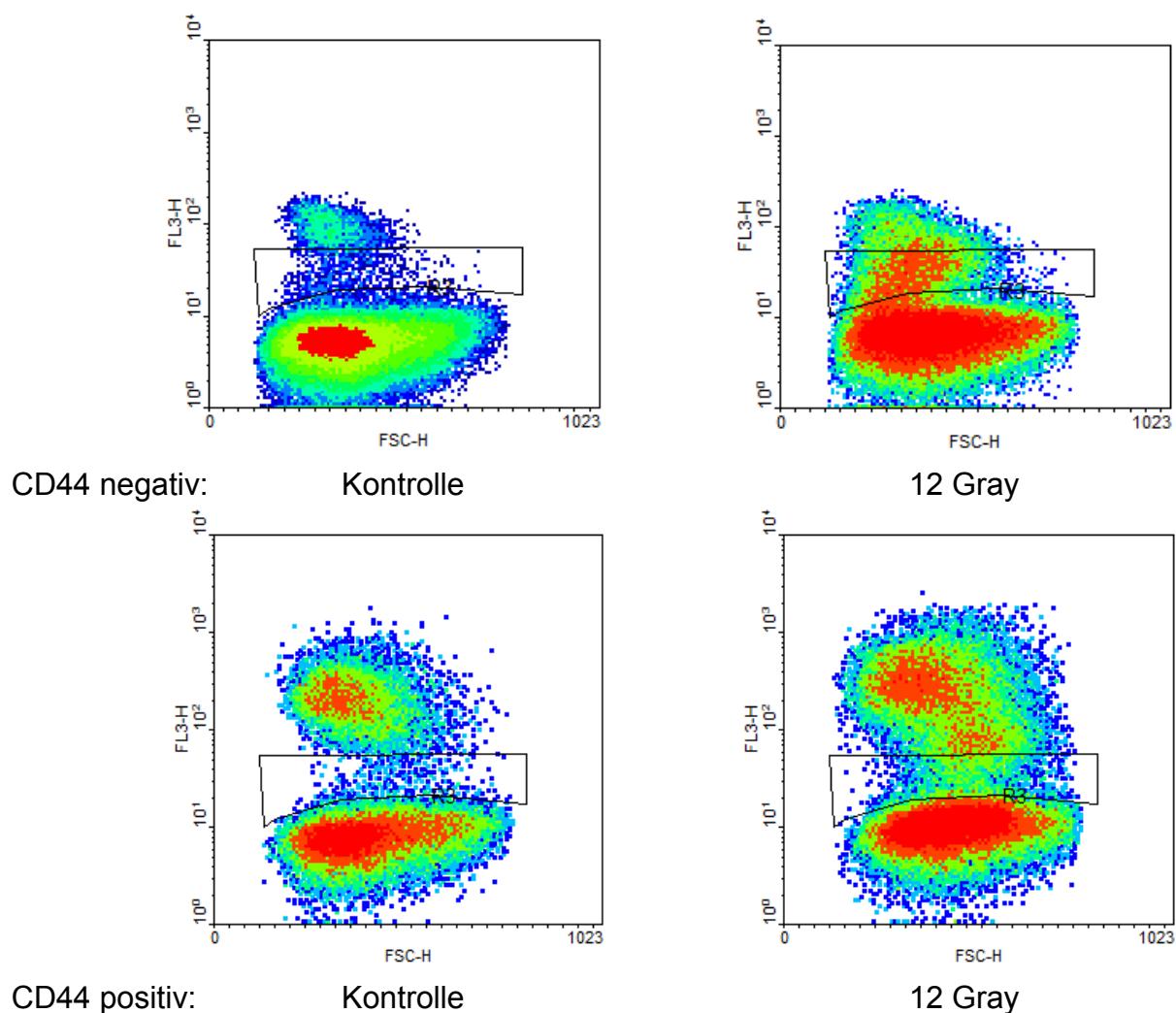


Abbildung 23: CD44^{neg} und CD44^{pos} Kontrolle vs. 12 Gray, apoptotische Zellen

3.6.1. Apoptoseverhalten in Monolayer-Kultur

Verglichen wurden dafür CD44^{pos}- mit CD44^{neg}-Zellen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Populationen ($p=0,62$) in Bezug auf deren Apoptoseverhalten.

Apoptoserate Monolayer 48h nach Bestrahlung

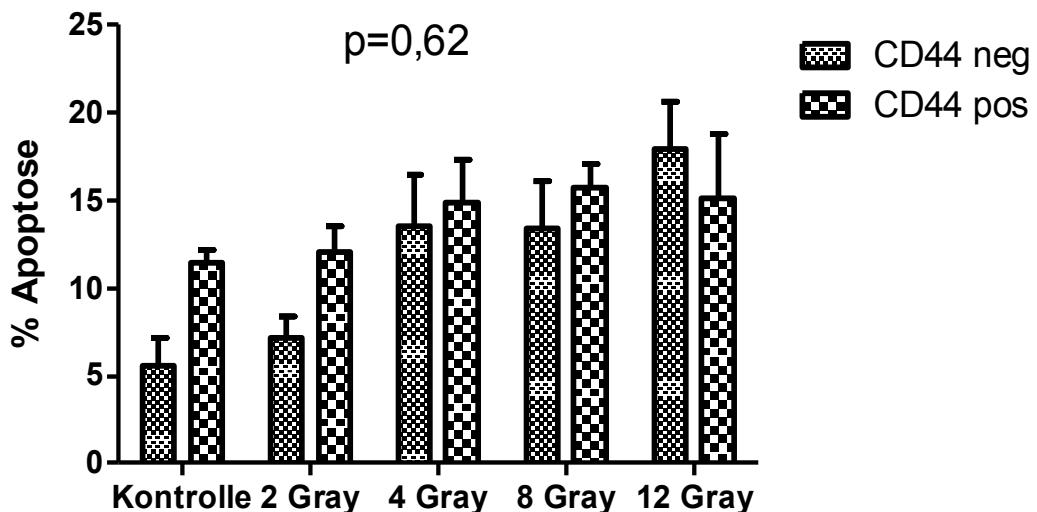


Abbildung 24: Apoptoserate Monolayer 48h nach Bestrahlung

Bei genauerer Betrachtung der beiden CD44-Populationen konnte allerdings festgestellt werden, dass der Anteil an apoptotischen CD44^{pos}-Zellen sich nicht signifikant, mit der Erhöhung der Bestrahlungsdosis, veränderte ($p=0,31$). Dem entgegen stieg der Anteil der apoptotischen CD44^{neg}-Zellen jedoch signifikant an ($p=0,04$).

Apoptoserate CD44^{pos}-Zellen (Monolayer), Apoptoserate CD44^{neg}-Zellen (Monolayer), 48h nach Bestrahlung

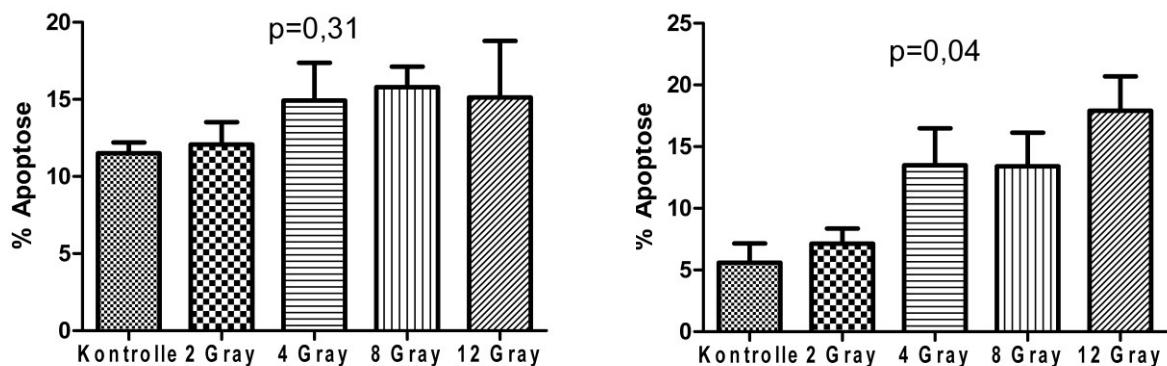


Abbildung 25: Vergleich der Apoptoseraten (Monolayer) zwischen den CD44^{pos}- und CD44^{neg}-Populationen, 48h nach Bestrahlung

In der Monolayer-Kultur zeigten CD44^{pos}-Zellen eine, im Vergleich zu den CD44^{neg}-Zellen, erhöhte ‚Ausgangsapoptoserate‘. Da der Ausgangsanteil apoptotischer CD44^{pos}-Zellen sich in der Monolayer-Kultur nicht signifikant veränderte, kann man davon ausgehen, dass die CD44^{pos}-Population nicht maßgeblich durch die Bestrahlung beeinflusst wird.

3.6.2. Apoptoseverhalten in Spheres-Kultur

Entsprechend der Untersuchung in Monolayer-Kultur wurde auch das Apoptoseverhalten der Spheres in Bezug auf den CD44-Status untersucht. Bei CD44^{neg}-Zellen zeigte sich, in Relation zur Bestrahlungsintensität, eine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen im Gegensatz zu CD44^{pos}-Zellen ($p=0,03$).

Apoptoserate Spheres 48h nach Bestrahlung

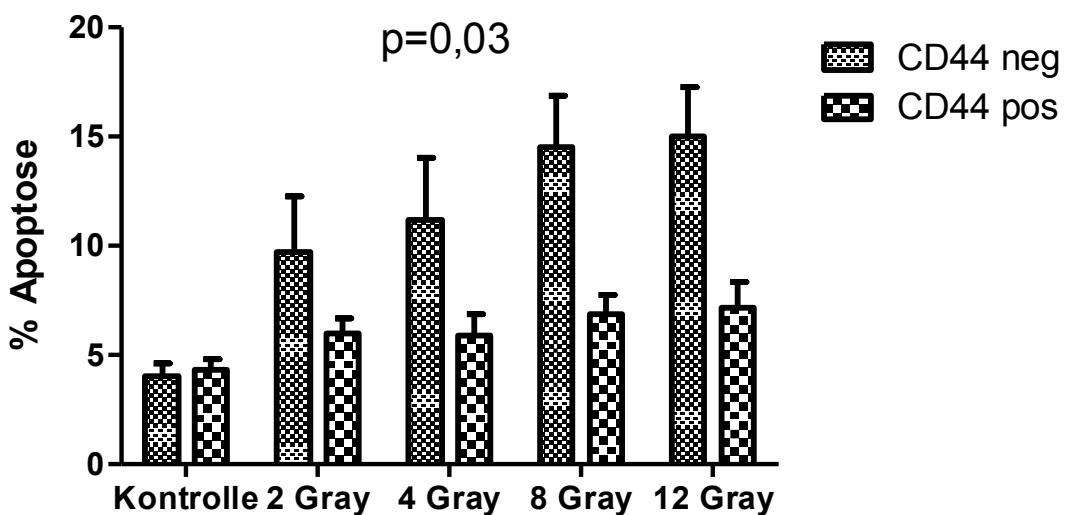
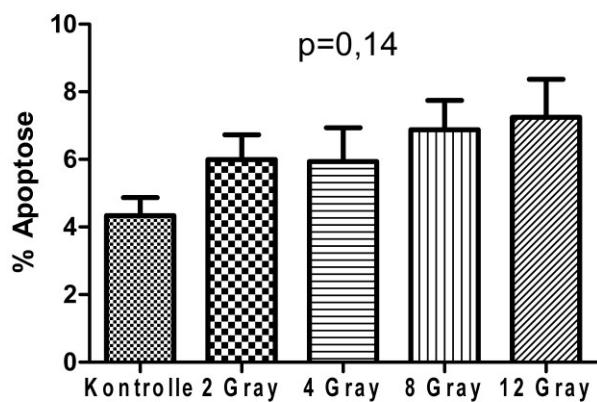


Abbildung 26: Apoptoserate Spheres 48h nach Bestrahlung

Wie auch in der Monolayer-Kultur zeigte sich für die Spheres, dass, mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis, der Anteil an CD44^{neg}-Zellen anstieg ($p=0,007$). Der Anteil der CD44^{pos}-Population steigt im Gegensatz dazu nicht signifikant an ($p=0,14$). Dies deutet daraufhin, dass sich das Apoptoseverhalten der CD44^{pos}-Zellen in der Spheres-Kultur nach Bestrahlung nicht verändert.

**Apoptoserate CD44^{pos}-Zellen (Spheres),
48h nach Bestrahlung**



**Apoptoserate CD44^{neg}-Zellen (Spheres),
48h nach Bestrahlung**

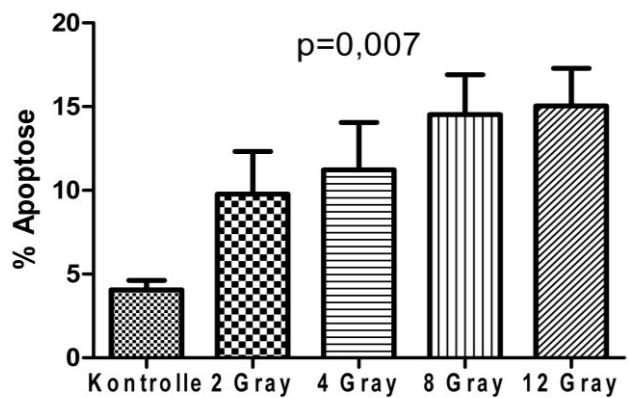


Abbildung 27: Vergleich der Apoptoseraten (Spheres) zwischen den CD44^{pos}- und CD44^{-neg}-Populationen, 48h nach Bestrahlung

3.7. Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Zur Untersuchung des Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation wurde, nach Bestrahlung der Zellen, ein BrdU Assay durchgeführt und die Zellen mittels FACS untersucht. Betrachtet wurden hierfür die Intervalle sechs, zwölf und 24 Stunden nach Bestrahlung.

3.7.1. Proliferation in Monolayer-Kultur

Es zeigte sich, dass die gemessene Zellproliferation nach sechs und zwölf Stunden nicht wesentlich von den Kontrollen abweicht, jedoch nach 24 Stunden um ca. 66% im Vergleich zur Kontrolle abfällt.

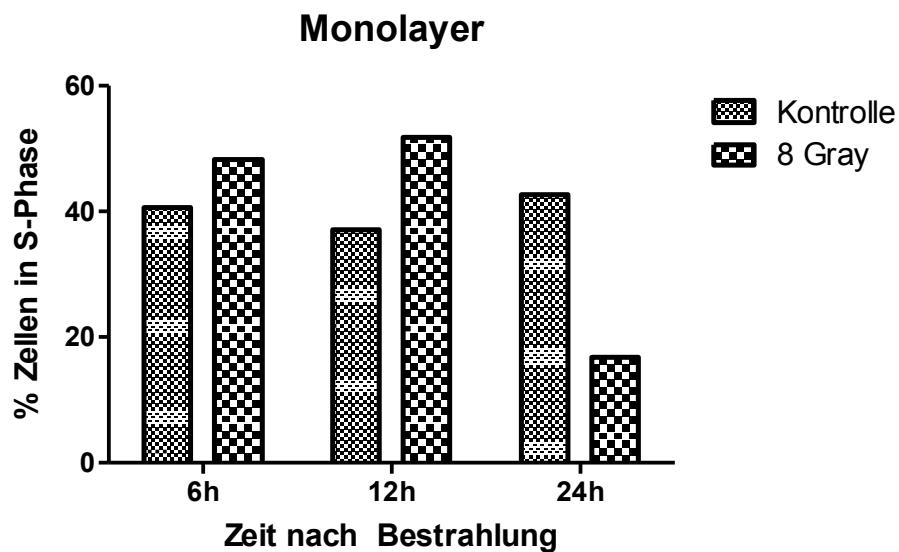


Abbildung 28: Proliferation Monolayer 6h, 12h und 24h nach Bestrahlung

3.7.2. Proliferation in Spheres-Kultur

Die Ergebnisse stellen sich sehr ähnlich derer der Monolayer-Kultur dar: wenig Veränderung zu den Zeitpunkten nach sechs bzw. zwölf Stunden; nach 24 Stunden

kommt es aber wieder zu einem deutlichen Abfall des Anteils an proliferierenden Zellen, in diesem Fall um ca. 50%.

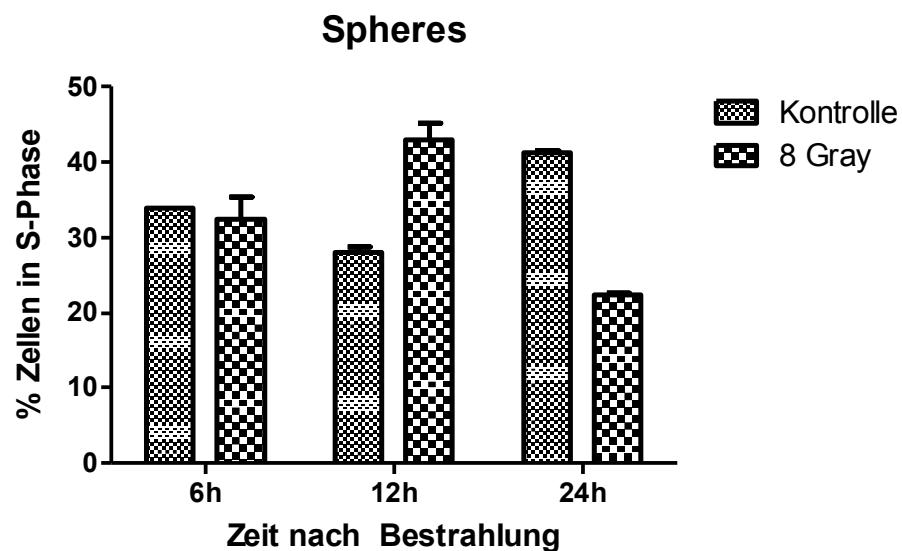


Abbildung 29: Proliferation Spheres, 6h, 12h und 24h nach Bestrahlung

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente

4.1.1. Strahlenresistenz des hepatzellulären Karzinoms durch CD44-positiven Zellen

Die Vorversuche mit den Substanzen Rapamycin und 5-Fluouracil ließen bereits vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression des Oberflächenmarkers CD44 und der *Belastbarkeit* der HCC-Zellen geben könnte. Erste Bestrahlungsversuche schienen diesen Trend zu bestätigen, woraufhin Bestrahlungsreihenversuche mit den Dosen 2 Gray, 4 Gray, 8 Gray und 12 Gray durchgeführt wurden.

Diese Versuche zeigten, in Bezug auf die Expression des Markers CD44, dass es zu einem Anstieg der CD44^{pos}-Zellpopulation mit Erhöhung der Bestrahlungsintensität kommt. Dieser Effekt ließ sich sowohl für die Monolayer-Kultur als auch für die Sphères-Kultur zeigen. Einen Zusammenhang zwischen Bestrahlungsintensität und Expression von CD133 konnte nicht festgestellt werden.

Die Bestimmungen der Expression erfolgten mittels FACS und jeweils immer bezogen auf einen Nullwert als Kontrolle (durch die Verwendung eines ISO-Antikörpers). Dadurch ist beschriebener Effekt gut zu charakterisieren und die Reproduzierbarkeit gewährleistet.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Zellen, die CD44^{pos}-Zellen, eine Form der Resistenz gegen die zellschädigende Wirkung der Bestrahlung besitzen. Dies wird in der Literatur als Eigenschaft der Tumorstammzellpopulation beschrieben [50].

Der Marker CD133 diente dabei lediglich zur Identifikation der Tumorzellpopulation, er ist, wie bereits erwähnt, nicht signifikant mit beobachteten Effekten verbunden. Dies widerspricht den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, welche die Strahlenresistenz von CSC, identifiziert durch den Marker CD133, vermittelt sehen [103].

Eine Erklärung für diese Schlussfolgerung könnte darin liegen, dass in der zitierten Arbeit nur der Marker CD133 untersucht wurde. So kann nicht verglichen werden ob der beschriebene Effekt eigentlich auf den – nicht untersuchten – Marker CD44 zurückzuführen ist. Zudem verwenden Piao et al. ausschließlich Bestrahlungsdosen \geq 10 Gray [103]. Die damit verbundenen und als schwerwiegender einzuschätzenden Zellschäden sind ein weiterer Faktor, der die unterschiedlichen Resultate erklären und zu der anderen Schlussfolgerung führen könnte. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden geringere Dosen verwendet, sodass dieser Effekt nicht bzw. in geringem Ausmaß auftreten sollte.

Dass man von der Ansicht „CD133 ist ein Tumorstammzellmarker“ abkommt, zeigt auch das Beispiel des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Bis zur Veröffentlichung der Arbeit von Meng et al. ging man von dieser Hypothese aus. Meng et al. zeigten, dass sowohl die CD133^{pos}-Population als auch die CD133^{neg}-Population die Fähigkeit zur Tumorneubildung aufwiesen – eine Fähigkeit die, wie auch die Strahlenresistenz, als Tumorstammzelleigenschaft angesehen wird [104].

In Zusammenschau der Ergebnisse kann somit gefolgert werden, dass die Expression des Oberflächenmarkers CD44, bei Zellen des hepatzellulären Karzinoms, in Zusammenhang mit der Strahlenresistenz steht. Die Expression des Markers CD133 hat, meinen Beobachtungen nach, keinen Einfluss auf dieses Ergebnis.

4.1.2. Veränderung des apoptotischen Verhaltens der CD44-positiven Population unter Bestrahlung

Bei der Betrachtung des apoptotischen Verhaltens der Zellpopulationen zeigte sich, dass sich die Strahlentoxizität nicht in gleichem Maße auf die Gesamtpopulation auswirkt. Beim Vergleich von CD44^{pos}- mit CD44^{neg}-Zellen, unter gesteigerten Bestrahlungsdosen, stellte sich für die Monolayer-Kultur per se kein signifikanter Unterschied dar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Anteil an apoptotischen CD44^{neg}-Zellen mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis signifikant zunimmt; für CD44^{pos}-Zellen hingegen nicht. Dies lässt vermuten, dass bei Tumorzellen, die den Marker CD44 exprimieren, unter Bestrahlung zu keiner bzw. in signifikant geringerem

Maße zur Induktion von Apoptose kommt; bei Tumorzellen, die CD44 nicht exprimieren, dagegen schon.

Bei genauerer Betrachtung der Monolayer-Teilpopulationen fiel auf, dass der Anteil apoptotischer CD44^{pos}-Zellen für die Kontrolle deutlich über dem Anteil der Kontrolle bei CD44^{neg}-Zellen lag. Jedoch veränderte sich der Anteil apoptotischer CD44^{pos}-Zellen auch durch Erhöhung der Bestrahlungsintensität nicht. Im Gegensatz dazu stieg der die Apoptoserate für CD44^{neg}-Zellen dosisbezogen an. Weshalb CD44^{pos}-Zellen eine höhere Ausgangsapoptoserate zeigen, ist nicht klar. Eine Erklärung für die hohe Apoptoserate der CD44^{pos}-Kontrolle in Monolayer-Kultur könnte sein, dass die Wachstumsbedingungen für CSC in Monolayer-Kultur schlechter sind im Vergleich zu den Bedingungen in serumfreien Medien.

Die Tatsache, dass der Anteil an CD44^{pos}-Zellen konstant bleibt, lässt vermuten, dass die schädigende Wirkung ionisierender Strahlen sich in keinem bzw. in geringerem Maße auf die CD44^{pos}-Zellen in Monolayer-Kultur auswirkt. Der Mechanismus wie eine Induktion der Apoptose verhindert wird ist aktuell unklar.

In der Spheres-Kultur ist das Ergebnis eindeutig: Die CD44^{pos}-Teilpopulation zeigt keine signifikante Änderung der Apoptoserate unter Bestrahlung. Bei CD44^{neg}-Spheres dagegen wurde vermehrt Apoptose induziert. Die dosisbezogene, signifikante Zunahme der Apoptoserate ließ sich klar zeigen.

4.1.3. Wirkung von Bestrahlung auf Huh-7-Zellen in Relation zur Zeit

Gemessen wurde die Proliferation mittels BrdU-Assay sechs, zwölf und 24 Stunden nach Bestrahlung. Diese Bestimmung wurde durchgeführt, um festzustellen, wie sich allgemein die Proliferation über diesen Zeitraum verändert.

Die Kontrollen zeigen über diesen Zeitraum keine signifikante Änderung der Rate an proliferierenden Zellen. Dies gilt sowohl für Monolayer- als auch Spheres-Kultur. Für die bestrahlten Zellen gilt, dass in beiden Kulturen der Anteil an proliferierenden Zellen nach sechs Stunden über dem der Kontrolle liegt und sich der Anteil nach zwölf Stunden nochmal erhöht. Eine Erklärung dafür liegt am ehesten darin, dass viele Zel-

len bis zu diesem Zeitpunkt abgestorben sind, und sich daher die Relationen zugunsten der proliferierenden Zellen verschieben.

Allerdings zeigt sich nach 24 Stunden, dass sich der Anteil der bestrahlten, proliferierenden Zellen um mehr als 50% im Vergleich zum Wert nach zwölf Stunden vermindert. Eine mögliche Erklärung könnte darin zu finden sein, dass sich die Relationen wieder verschoben haben: Neugebildete Zellen, die folglich BrdU-negativ sind, sorgen für diesen Effekt. Diese neugebildeten Zellen könnten größtenteils durch CSC entstanden sind. Es sind aber weitere Arbeiten notwendig um diesen Effekt zu untersuchen.

4.2. Bedeutung der Ergebnisse

4.2.1. Bedeutung für die Onkologie

In den letzten Jahren gab es einige Veröffentlichungen, die die zentrale Rolle von CD133^{pos}-CD44^{pos}-Zellen beschrieben – und das nicht nur in Bezug auf das hepatozelluläre Karzinom: Schon 2008 wurde in Bezug auf das Kolonkarzinom eine solche Population beschrieben, die Fähigkeiten besitzen solle, Kolonkarzinome zu initiieren [105]. Eine weitere Arbeit beschreibt einen Zusammenhang des krankheitsfreien Überlebens bei CRC mit dem Vorhandensein von CD133^{pos}-CD44^{pos}-Zellen [106]. Ebenso gibt es eine Beschreibung beim Gallenblasenkarzinom, dass CD133^{pos}-CD44^{pos}-Zellen dort ein schnelleres Tumorwachstum bedingen sowie auch die Neubildung von Gallenblasenkarzinomen fördern können [107]. Beim Magenkarzinom scheint zwar die CD133^{pos}-CD44^{pos}-Subpopulation keine Rolle zu spielen, zumindest laut einer italienischen Arbeit [108]. Jedoch beschreibt eine andere Studie, dass gerade die Expression von CD133 und CD44 (sowie des Markers ALDH1) bei Patienten mit einem Magenkarzinom, einer schlechteren Prognose zugeordnet werden können [109].

Zusammenfassend gibt es dafür somit zahlreiche Hinweise bei einer Vielzahl von Tumoren, dass das Tumorstammzellkonzept eine wichtige Rolle bei Tumorgenese und -wachstum zu spielen scheint. Mehrere wissenschaftliche Arbeiten stimmen darin überein, dass die Co-Expression von CD133 und CD44 eine Tumorstammzellpopulation identifizieren könnte [64, 66, 68, 91].

Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang von Chemotherapieresistenz, eine der größten Hürden der Onkologie, und der Expression von eben diesen Oberflächenproteinen [110, 111].

Für das Kolonkarzinom zeigt eine Publikation aus dem Jahr 2014 von einer schwedischen Arbeitsgruppe, dass die Kombination der Marker CD133 und CD44 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Strahlentherapie führt [112].

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die Strahlenresistenz als (Stammzell-)Eigenschaft der HCC-Subpopulation den CD133^{pos}-CD44^{pos}-Zellen zugeschrieben werden kann.

Gegenwärtige (Standard-)Therapieverfahren zielen nicht direkt auf Tumorstammzellpopulationen ab. Dies gilt für alle Tumore inklusive des hepatzellulären Karzinoms. Im Fall des HCC liegt zudem für keine, zum Einsatz kommende Therapie der Nachweis vor, dass Tumorstammzellen wirkungsvoll und nachhaltig geschädigt werden. Das könnte eine Erklärung für das niedrige Gesamtüberleben (bei fortgeschrittenen HCC) sein und ebenfalls eine Theorie für die Entstehung von Rezidiven darstellen. Individualisierte Tumortherapie bedarf primär einer erfolgreichen Identifikation und Isolation der CSC-Populationen [82, 113]. Diese könnten in Folge gezielt therapeutisch angegriffen werden und so die Situation (Krankheitsfreies Überleben, Gesamtüberlegen) für die Patienten entscheidend verbessern. Vlashi et al. gehen sogar so weit zu behaupten, dass die ordinären Bulk-Tumorzellen keine wesentliche Bedeutung im Sinne der Therapie haben – im Vergleich zu den CSC, die in das Fadenkreuz der Therapie rücken sollten [114].

4.2.2. Bedeutung für die Transplantationsmedizin

Einer erfolgreichen (Leber-) Transplantation folgt immer eine Immunsuppression, um eine Immunreaktion gegen das körperfremde Transplantat zu unterdrücken [115]. Ein supprimiertes Immunsystem dagegen kann das Risiko für die Entstehung von Tumoren erhöhen (weshalb auch eine möglichst geringe Immunsuppression erfolgen sollte) [116].

Die Neubildung von Tumoren kann unterschiedliche Ursprünge haben, unter anderem kann dies durch bereits vorhandene (zirkulierende) CSC bedingt sein.

Patienten, auf der Warteliste zur Lebertransplantation, müssen heute unter Umständen mehrere Jahre auf ein Organ warten. Um diese Zeit zu überbrücken bzw. weiter innerhalb der Transplantationskriterien (MILAN- bzw. „up-to-seven“-Kriterien) zu bleiben, erhalten Patienten oftmals sogenannte Bridging-Therapieverfahren, zum Beispiel Resektion, TACE, RFA oder SIRT [27, 117]. Daraus ergeben sich zwei Aspekte: Zum einen erhöht sich mit fortschreitender Zeit auch das Risiko, dass mehr Tumorstammzellen gebildet werden könnten und ggf. ausgeschwemmt werden könnten. Dies könnte dann, nach einer erfolgreichen Transplantation zu einer Erhöhung des Rezidivrisikos führen.

Zwar ist die Rezidivrate nach Lebertransplantation (bei Indikation HCC) nicht sonderlich hoch, so liegt sie bei ca. 20%, wie eine Übersichtsarbeit zeigen konnte [118]. Jedoch könnte dies mit einer hohen Anzahl an Patienten in einem frühen Stadium der Erkrankung (zum Zeitpunkt der Transplantation) zusammenhängen, in dem es noch nicht oder nur in geringem Maße zu einer hämatogenen Ausschwemmung von CSC gekommen war.

Die MILAN-Kriterien sind heute nicht mehr das Maß aller Dinge in Bezug auf die Einsschlußkriterien vor Lebertransplantation, hingegen finden die „up-to-seven“-Kriterien vermehrt Anwendung. Patienten innerhalb der „up-to-seven“-Kriterien profitieren ebenfalls von einer Lebertransplantation [119]. Man muss allerdings festhalten, dass das Risiko für das Vorliegen von im Blut zirkulierenden Tumorstammzellen in diesem Kollektiv zunehmen könnte. Dies ist bisher nicht untersucht worden, könnte allerdings zu höheren Rezidivraten führen und sich auch auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirken. Gerade in Bezug auf die weitere Lockerung der Kriterien, zum Einschluss von Patienten in Transplantationsprogramme, sollte dies nicht außer Acht gelassen werden.

Zum anderen wäre es möglich, wie schon in Bezug auf die Bedeutung für die Onkologie angesprochen, die Bridging-Therapie durch gezieltes Angreifen der Tumorstammzellen effizienter zu gestalten. Hier könnte gerade die Strahlentherapie, nach erfolgreicher Zerstörung der Stammzellpopulation mittels „targeted-therapy“, eingesetzt werden. Es wurde in der Vergangenheit versucht, die Strahlentherapie als bridging-Verfahren zu nutzen [120]. Das Potential, die Zeit bis zum Vorhandensein eines Spenderorgans zu verlängern, wurde in einer Arbeit von O'Connor et al. gezeigt [121]. Dennoch ist man momentan davon abgekommen, Strahlentherapie flächendeckend im Rahmen der Therapieschemata zu verwenden (1.2.2 Klassifikationssysteme mit Therapieempfehlungen).

4.2.3. Ein Blick in die Zukunft

Es gibt Hoffnungen, dass sich in den nächsten Jahren die Zahl der Transplantationen in der Bundesrepublik Deutschland erhöhen wird. Die geänderte Regelung zur Organspende war vielleicht etwas moderat im Vergleich dazu, was sich viele (Trans-

plantations-) Mediziner gewünscht hatten – gerade im Vergleich zu Österreich. Bei der dort geltenden ‚Widerspruchsregelung‘ müssen sowohl österreichische Staatsbürger als auch Ausländer, selbst wenn sich letztere nur zur Durchreise in Österreich aufhalten, einer Verwendung ihrer Organe nach der Feststellung des Hirntodes explizit widersprechen.

Aber, nicht zuletzt durch den Transplantationsskandal im Sommer 2012, ist die tatsächliche Entwicklung nicht abzuschätzen. Die Resektion von HCCs wird also weiterhin wichtigster Bestandteil der Therapie bleiben. Die Frage nach dem Outcome einer Hepatektomie bei HCC, in Abhängigkeit von potentiellen Tumorstammzellen, wurde von einer chinesischen Arbeitsgruppe untersucht. Sie haben den Patienten am ersten postoperativen Tag Blut entnommen und versucht HCC-Tumorstammzellen zu isolieren, sie suchten nach Zellen mit einem CD45^{neg}CD90^{pos}CD44^{pos}-Expressionsprofil. Zwar gab es kein eindeutig signifikantes Ergebnis, jedoch konnte gezeigt werden, dass, bei einem Anteil von über 0,01% dieser Zellen im peripheren Blut (gemessen an allen HCC-Zellen), die Wahrscheinlichkeit für den Patienten ein Rezidiv zu erleiden doppelt so hoch war. Dies im Vergleich zu Patienten mit einem, im peripheren Blut zirkulierenden Anteil von unter 0,01%. Diese Arbeit weckt die Hoffnung, dass man anhand einer simplen Blutentnahme gepaart mit zugegebenermaßen aufwendigen Aufarbeitungen, eine prädiktive Aussage bezüglich des Krankheitsverlaufes treffen kann [122]. Aber nur Hoffnung in geringem Maße, denn es bedarf sicherlich einer Reihe von wissenschaftlichen Neuerungen, speziell was die Detektion der Zellen im peripheren Blut angeht, um zu einem nicht näher definierbaren Zeitpunkt eine valide Aussage treffen zu können. Die FACS-Analyse ist hierfür zwar ein weltweit etabliertes und zuverlässiges Verfahren, jedoch ist gerade in Hinsicht auf die notwenigen Markierung der Zellen (und gerade bei dermaßen kleinen Prozentsätzen der Subpopulationen) eine sichere Reproduzierbarkeit (noch) nicht gewährleistet. In Zukunft würde es dann auch nötig werden Oberflächenmarker zur genaueren Klassifizierung mit in die Klassifikationssysteme und Therapieempfehlungen aufzunehmen. Als ein teilweise vergleichbares Beispiel könnte man das Mammakarzinom mit dem Status des Human Epidermal Growth Factor Receptors nennen oder auch die Gruppe der Lymphome mit diversen CD-Oberflächenmarkern (z.B. CD30 beim Hodgkin-Lymphom). Dort werden die Oberflä-

chenmarker teilweise zwar immunhistochemisch bestimmt wird, haben aber einen Einfluss auf Prognose und Therapie [123, 124].

Ich möchte an dieser Stelle nochmal betonen, dass die Lebertransplantation nach wie vor den Goldstandard der Therapie bei den nicht primär resektablen HCC-Erkrankungen darstellt. Sie eröffnet sowohl den behandelnden Ärzten, aber in erster Linie dem Patienten die bestmögliche Heilungschance. Eine gewisse Kooperation von Seiten des Patienten vorausgesetzt, kann sich die Lebenserwartung eines Patienten um viele Jahre bis Jahrzehnte erhöhen, auch wenn es später zu einer Re-Transplantation kommen könnte.

Gerade auch in Bezug auf diese therapeutischen Möglichkeiten der Transplantation ist es als wichtig zu erachten, dass Tumorstammzellforschung weiter betrieben wird, um dadurch das krankheitsfreie Überleben zu maximieren.

5. Zusammenfassung

Das hepatzelluläre Karzinom ist eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen weltweit. Getriggert durch virale Hepatitiden (insbesondere der Typen B und C), Alkoholabusus und andere Faktoren nimmt die Inzidenz sowohl in Industrienationen als auch in anderen Staaten des Globus zu.

Ziel dieser Arbeit war es, die bekannte Strahlenresistenz des hepatzellulären Karzinoms genauer zu untersuchen. Es wurden verschiedene Subpopulationen, zu unterscheiden anhand ihrer Oberflächenmarker, mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt. Dabei konnte eine Subpopulation identifiziert werden, die CD133^{pos}-CD44^{pos}-Subpopulation, die resistent gegenüber Bestrahlung ist; die ihr gegenüberstehenden CD133^{pos}-CD44^{neg}-Population war dagegen strahlensensibel. Dieser Effekt ist sowohl in normaler, zweidimensionaler (= Monolayer-) Zellkultur als auch bei der dreidimensionalen Spheres-Zellkultur nachgewiesen worden; letztere ist dabei als näher an in-vivo-Bedingungen anzusehen.

Des Weiteren wurde die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung untersucht. Hier wird gezeigt, dass die CD44^{neg}-HCC-Zellen im Gegensatz zur deren CD44^{pos}-Gegenpart, unter Bestrahlung eine erhöhte Apoptoserate aufweisen.

Interessanterweise zeigen die Kontrollen CD44^{pos}-Zellen in Monolayer-Kultur eine erhöhte Apoptoserate, in Spheres-Kultur hingegen nicht. Dies unterstützt die Vermutung, die besagt, dass Tumorstammzellen in Spheres-Kultur bessere Wachstumsbedingungen vorfinden [76, 125].

In Zusammenschau mit anderen Arbeiten, die belegen, dass CD44^{pos}-Zellen auch die Neubildung von Tumoren initiieren können, erhärtet sich der Verdacht, dass es sich bei CD44^{pos}-Zellen des HCC um einen Stammzellsubpopulation des hepatzellulären Karzinoms handelt.

6. Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Markus Guba, für seine stets unterstützende und fördernde Art bedanken, die mir sowohl den Einstieg, die gesamte Arbeitsphase als auch den Abschluss dieser Dissertation möglich gemacht haben. Durch sein Verhalten, sowohl in seiner klinischen als auch wissenschaftlichen Tätigkeiten, ist er zu einem Vorbild geworden und hat mich von Beginn bis Ende motiviert sowie inspiriert.

Als nächstes danke ich Dr. Stephan Huber, der mich an dieses Thema herangeführt hat und mich durch den größten Teil der Arbeit geführt hat. Er war als primärer Ansprechpartner immer erreichbar und wir konnten, in guten Diskussionen, neue Ansätze erarbeiten und umsetzen.

Nina Schupp und besonders Anne Wagner (geb. Tischer) sind hervorzuheben, da ich nicht nur von ihrer immensen Erfahrung profitieren konnte sondern, in beiden, auch höchst kompetente Ansprechpartnerinnen zur Seite hatte. Die Einarbeitung in die Grundlagen der Laborarbeit durch Anne Wagner war essentiell für das Gelingen dieser Arbeit.

Die uneingeschränkte Unterstützung meiner gesamten Familie, besonders meiner Eltern Schakila und Bernhard sowie meiner Schwester Ramona, machten es mir erst möglich diese Arbeit zu beginnen. Ohne die Erziehung zur Neugier, ohne die Vorbildfunktion und ohne die mir mitgegebene Arbeitsmoral hätte ich diese Herausforderung wahrscheinlich initial nicht angetreten geschweige denn beendet.

Meiner Freundin Charlotte danke ich für konstruktive fachliche sowie persönliche Unterstützung und Geduld.

7. Eidestattliche Versicherung

Eidestattliche Versicherung

Pradella, Maurice

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tumorstammzellen und Strahlenresistenz des Hepatozellulären Karzinoms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Basel, 25.10.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

8. Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin
APC	Allophycocyanin
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of Differentiation
CLT	Cadaveric Liver Transplantation
CRC	Colorektal Carcinoma = Kolorektales Karzinom
CSC	Cancer stem cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EU	Europäische Union
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FHCC	Fibrolamelläres hepatzelluläres Karzinom
FLHCC	Fibrolamelläres hepatzelluläres Karzinom
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IgG1	Immunglobulin G 1
INR	International Normalized Ratio
LDLT	Living Donor Liver Transplantation
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Receptor
PE	Phycoerythrin
PEI	perkutane Ethanolinjektion
RFA / RF(I)	Radiofrequenzablation
SIRT	Selektive interne Strahlentherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAE	Transarterielle Embolisation

UICC	Union for International Cancer Control
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organisation
WPRO	Western Pacific Region (WHO Definition)

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2: Nach Llovet et al. [1]	4
Abbildung 3: Updated Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification and treatment schedule. [1]	5
Abbildung 4: Münchener HCC-Algorithmus [49].....	6
Abbildung 5: FACS Plot, Bestimmung der Vitalität (eigene Daten).....	18
Abbildung 6: Monolayer 5FU Versuch CD133/CD44	20
Abbildung 7: Monolayer 5FU Versuch CD133 vs. CD44	21
Abbildung 8: Monolayer Rapamycin Versuch CD133/CD44	21
Abbildung 9: Monolayer Rapamycin Versuch CD133 vs. CD44	22
Abbildung 10: Monolayer Rapamycin Versuch, DMSO Kontrolle.....	22
Abbildung 11: Monolayer, Expression innerhalb einer Passage CD133/CD44	23
Abbildung 12: Monolayer, Expression innerhalb einer Passage CD133 vs. CD44	24
Abbildung 13: Monolayer Passagierung CD133/CD44	25
Abbildung 14: Monolayer Passagierung CD133 vs. CD44	25
Abbildung 15: Wachstum der Spheres nach 2, 4 und 8 Tagen (eigene Daten).....	26
Abbildung 16: Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage CD133/CD44	27
Abbildung 17: Sphäroide, Expression innerhalb einer Passage CD133 vs. CD44	28
Abbildung 18: Monolayer, Vorversuch Bestrahlung CD133/CD44	29
Abbildung 19: Monolayer, Vorversuch Bestrahlung CD133 vs. CD44	30
Abbildung 20: Monolayer, Bestrahlung CD133/CD44.....	30
Abbildung 21: Monolayer, Bestrahlung CD133 vs. CD44	31
Abbildung 22: Spheres, Bestrahlung CD133/CD44	32
Abbildung 23: Monolayer, Bestrahlung CD133 vs. CD44	32
Abbildung 24: CD44 ^{neg} und CD44 ^{pos} Kontrolle vs. 12 Gray, apoptotische Zellen.....	34
Abbildung 25: Apoptoserate Monolayer 48h nach Bestrahlung	35
Abbildung 26: Vergleich der Apoptoseraten (Monolayer) zwischen den CD44 ^{pos} - und CD44- ^{neg} -Populationen, 48h nach Bestrahlung.....	35
Abbildung 27: Apoptoserate Spheres 48h nach Bestrahlung.....	36
Abbildung 28: Vergleich der Apoptoseraten (Spheres) zwischen den CD44 ^{pos} - und CD44- ^{neg} - Populationen, 48h nach Bestrahlung	37
Abbildung 29: Proliferation Monolayer 6h, 12h und 24h nach Bestrahlung	38
Abbildung 30: Proliferation Spheres, 6h, 12h und 24h nach Bestrahlung	39

10. Literaturverzeichnis

1. European Association for the Study of The, L., R. European Organisation For, and C. Treatment Of, *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(4): p. 908-43.
2. WHO, *Causes of death 2008 summary tables*. 2008.
3. National Institutes of Health, U., *Surveillance Epidemiology and End Result*. 2009.
4. IARC. 2012; Available from: www-dep.iarc.fr.
5. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S27-34.
6. Meng, X.X., et al., *Comparison of lung lesion biopsies between low-dose CT-guided and conventional CT-guided techniques*. Acta Radiol, 2013.
7. Lin, X., et al., *Chronic hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region and Africa: review of disease progression*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(6): p. 833-43.
8. Okuda, K., et al., *Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients*. Cancer, 1985. **56**(4): p. 918-28.
9. Calvet, X., et al., *Natural history of hepatocellular carcinoma in Spain. Five year's experience in 249 cases*. J Hepatol, 1990. **10**(3): p. 311-7.
10. Morgan, T.R., S. Mandayam, and M.M. Jamal, *Alcohol and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S87-96.
11. Zangeneh, F., et al., *Hepatorenal glycogenosis (type I glycogenosis) and carcinoma of the liver*. J Pediatr, 1969. **74**(1): p. 73-83.
12. Beaton, M.D. and P.C. Adams, *Prognostic factors and survival in patients with hereditary hemochromatosis and cirrhosis*. Can J Gastroenterol, 2006. **20**(4): p. 257-60.
13. Elmberg, M., et al., *Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1733-41.
14. Caballeria, L., et al., *Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(4): p. 1160-3.
15. Beasley, R.P., et al., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
16. Johnson, P.J. and R. Williams, *Cirrhosis and the aetiology of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 1987. **4**(1): p. 140-7.
17. Donato, M.F., et al., *High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity*. Hepatology, 2001. **34**(3): p. 523-8.
18. Lopez, C., et al., *Aflatoxin B1 content in patients with hepatic diseases*. Medicina (B Aires), 2002. **62**(4): p. 313-6.
19. *Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products*. The EFSA Journal, 2007: p. 1 - 127.
20. Villa, E., et al., *Hepatocellular carcinoma: risk factors other than HBV*. Ital J Gastroenterol, 1991. **23**(7): p. 457-60.

21. Edmondson, H.A., *Differential diagnosis of tumors and tumor-like lesions of liver in infancy and childhood*. AMA J Dis Child, 1956. **91**(2): p. 168-86.
22. Craig, J.R., et al., *Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinctive clinico-pathologic features*. Cancer, 1980. **46**(2): p. 372-9.
23. El-Serag, H.B., T. Tran, and J.E. Everhart, *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 460-8.
24. Child, C.G. and J.G. Turcotte, *Surgery and portal hypertension*. Major Probl Clin Surg, 1964. **1**: p. 1-85.
25. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. Br J Surg, 1973. **60**(8): p. 646-9.
26. Schwartz, M.E., *Primary hepatocellular carcinoma: transplant versus resection*. Semin Liver Dis, 1994. **14**(2): p. 135-9.
27. Mazzaferro, V., et al., *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. N Engl J Med, 1996. **334**(11): p. 693-9.
28. Mazzaferro, V., et al., *Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience*. Liver Transpl, 2011. **17 Suppl 2**: p. S44-57.
29. Mazzaferro, V., et al., *Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis*. Lancet Oncol, 2009. **10**(1): p. 35-43.
30. Pichlmayr, R., et al., *Experiences with liver transplantation in Hannover*. Hepatology, 1984. **4**(1 Suppl): p. 56S-60S.
31. Otto, G., et al., *Primary hepatic malignancies: resection or liver transplantation?* Eur J Surg Oncol, 1990. **16**(4): p. 346-51.
32. Vauthey, J.N., et al., *Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma*. Am J Surg, 1995. **169**(1): p. 28-34; discussion 34-5.
33. Lau, W.Y., et al., *Selective internal radiation therapy for nonresectable hepatocellular carcinoma with intraarterial infusion of 90yttrium microspheres*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(3): p. 583-92.
34. Popperl, G., et al., *Selective internal radiation therapy with SIR-Spheres in patients with nonresectable liver tumors*. Cancer Biother Radiopharm, 2005. **20**(2): p. 200-8.
35. Kennedy, A.S., et al., *Pathologic response and microdosimetry of (90)Y microspheres in man: review of four explanted whole livers*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **60**(5): p. 1552-63.
36. Sangro, B., et al., *Radioembolization using 90Y-resin microspheres for patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **66**(3): p. 792-800.
37. Jakobs, T.F., et al., *Mid-term results in otherwise treatment refractory primary or secondary liver confined tumours treated with selective internal radiation therapy (SIRT) using (90)Yttrium resin-microspheres*. Eur Radiol, 2007. **17**(5): p. 1320-30.
38. Lin, D.Y., et al., *Hepatic arterial embolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma--a randomized controlled trial*. Gastroenterology, 1988. **94**(2): p. 453-6.

39. Pelletier, G., et al., *A randomized trial of hepatic arterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 1990. **11**(2): p. 181-4.
40. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival*. Hepatology, 2003. **37**(2): p. 429-42.
41. Higgins, H. and D.L. Berger, *RFA for liver tumors: does it really work?* Oncologist, 2006. **11**(7): p. 801-8.
42. Netto, G.J., et al., *Radio-frequency ablation of hepatocellular carcinoma before liver transplantation: a histologic and 'TUNEL' study*. Liver Int, 2006. **26**(6): p. 746-51.
43. Kulik, L.M., et al., *Yttrium-90 microspheres (TheraSphere) treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: downstaging to resection, RFA and bridge to transplantation*. J Surg Oncol, 2006. **94**(7): p. 572-86.
44. Dubay, D.A., et al., *Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation*. HPB (Oxford), 2011. **13**(1): p. 24-32.
45. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(4): p. 378-90.
46. Doffoel, M., et al., *Multicentre randomised phase III trial comparing Tamoxifen alone or with Transarterial Lipiodol Chemoembolisation for unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients (Federation Francophone de Cancerologie Digestive 9402)*. Eur J Cancer, 2008. **44**(4): p. 528-38.
47. Kim, J.M., et al., *Patients with unresectable hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria: should we perform transarterial chemoembolization or liver transplantation?* Transplant Proc, 2010. **42**(3): p. 821-4.
48. Sarpel, U. and M. Schwartz, *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2007. **37 Suppl 2**: p. S264-6.
49. Guba, M., et al., *[Therapy of hepatocellular carcinoma before liver transplantation]*. Chirurg, 2013. **84**(5): p. 385-90.
50. Dick, J.E., *Stem cell concepts renew cancer research*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4793-807.
51. Wang, J.C. and J.E. Dick, *Cancer stem cells: lessons from leukemia*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(9): p. 494-501.
52. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
53. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. Science, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
54. Carney, D.N., et al., *Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients*. Stem Cells, 1982. **1**(3): p. 149-64.
55. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
56. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
57. Tsai, R.Y., *A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 684-94.
58. Froland, S.S. and J.B. Natvig, *Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers*. Transplant Rev, 1973. **16**: p. 114-62.

59. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro*. J Exp Med, 1974. **139**(2): p. 380-97.
60. Aurelian, L. and B.C. Strnad, *Herpesvirus type 2-related antigens and their relevance to humoral and cell-mediated immunity in patients with cervical cancer*. Cancer Res, 1976. **36**(2 pt 2): p. 810-20.
61. Goldenberg, D.M., K.D. Pant, and H.L. Dahlman, *Antigens associated with normal and malignant gastrointestinal tissues*. Cancer Res, 1976. **36**(9 PT 2): p. 3455-63.
62. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
63. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.
64. Wright, M.H., et al., *Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R10.
65. Eramo, A., et al., *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.
66. Janisiewicz, A.M., et al., *CD44(+) cells have cancer stem cell-like properties in nasopharyngeal carcinoma*. Int Forum Allergy Rhinol, 2012. **2**(6): p. 465-70.
67. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
68. Liu, D., et al., *Expression and clinical significance of colorectal cancer stem cell marker EpCAM/CD44 in colorectal cancer*. Oncol Lett, 2014. **7**(5): p. 1544-1548.
69. Yan, X., et al., *Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines*. Oncol Rep, 2013. **30**(6): p. 2733-40.
70. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
71. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
72. Weiss, S., et al., *Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?* Trends Neurosci, 1996. **19**(9): p. 387-93.
73. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell*. Dev Biol, 1996. **175**(1): p. 1-13.
74. Rybak, A.P., et al., *Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 683-94.
75. Qiu, X., et al., *Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446*. Cancer Lett, 2012. **323**(2): p. 161-70.
76. Chen, S.F., et al., *Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31864.
77. Cariati, M., et al., *Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line*. Int J Cancer, 2008. **122**(2): p. 298-304.

78. Zhong, L., et al., *Optoelectronic implementation of a compression-attraction-sphere associative memory using an optical spatial pattern-encoding method*. Appl Opt, 1993. **32**(8): p. 1473-6.
79. Perez De Luque, D., et al., *Survival of patients receiving a liver transplant for hepatocellular carcinoma, and risk of tumor recurrence*. Rev Esp Enferm Dig, 2006. **98**(12): p. 899-906.
80. Kim, H.R., et al., *Treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation*. Asia Pac J Clin Oncol, 2011. **7**(3): p. 258-69.
81. Sell, S., *The role of determined stem-cells in the cellular lineage of hepatocellular carcinoma*. Int J Dev Biol, 1993. **37**(1): p. 189-201.
82. Greaves, M., *Cancer stem cells renew their impact*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1046-8.
83. Barsky, S.H., et al., *Hepatocellular carcinoma with carcinoid features*. Hum Pathol, 1984. **15**(9): p. 892-4.
84. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2542-56.
85. Alison, M.R., S. Islam, and S. Lim, *Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 282-98.
86. Oliva, J., et al., *The identification of stem cells in human liver diseases and hepatocellular carcinoma*. Exp Mol Pathol, 2010. **88**(3): p. 331-40.
87. Kobari, L., et al., *CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(2): p. 273-81.
88. Yamashita, T., et al., *EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1451-61.
89. Xie, Z., et al., *Inhibition of CD44 expression in hepatocellular carcinoma cells enhances apoptosis, chemosensitivity, and reduces tumorigenesis and invasion*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(6): p. 949-57.
90. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
91. Zhu, Z., et al., *Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **126**(9): p. 2067-78.
92. Hou, Y., et al., *The critical role of CD133(+)CD44(+/high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers*. Cell Res, 2011.
93. Murphy, D.A., et al., *Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006)*. Am J Pathol, 2006. **169**(5): p. 1875-85.
94. Afify, S., U.R. Rapp, and P. Hogger, *Validation of a liquid chromatography assay for the quantification of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in small volumes of mouse serum*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **809**(1): p. 99-103.
95. Escudier, B., et al., *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 125-34.
96. Gedaly, R., et al., *PKI-587 and sorafenib alone and in combination on inhibition of liver cancer stem cell proliferation*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 225-30.

97. Rausch, V., et al., *Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics*. Cancer Res, 2010. **70**(12): p. 5004-13.
98. Salem, R., et al., *Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes*. Gastroenterology, 2010. **138**(1): p. 52-64.
99. Raoul, J.L., et al., *Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of 131I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1997. **26**(5): p. 1156-61.
100. Cheng, J.C., et al., *Radiation-induced liver disease after radiotherapy for hepatocellular carcinoma: clinical manifestation and dosimetric description*. Radiother Oncol, 2002. **63**(1): p. 41-5.
101. Rubin, P. and G.W. Casarett, *Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy*. Cancer, 1968. **22**(4): p. 767-78.
102. Baumann, M., et al., *Cancer stem cells and radiotherapy*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(5): p. 391-402.
103. Piao, L.S., et al., *CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2012. **315**(2): p. 129-37.
104. Meng, X., et al., *Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1040-6.
105. Haraguchi, N., et al., *CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(10): p. 2927-33.
106. Galizia, G., et al., *Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer*. Arch Surg, 2012. **147**(1): p. 18-24.
107. Shi, C., et al., *CD44+ CD133+ population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(11): p. 1182-90.
108. Rocco, A., et al., *CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors*. J Cell Physiol, 2012. **227**(6): p. 2686-93.
109. Wakamatsu, Y., et al., *Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer*. Pathol Int, 2012. **62**(2): p. 112-9.
110. Ohashi, R., et al., *Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell*. Cancer Lett, 2007. **252**(2): p. 225-34.
111. Toole, B.P. and M.G. Slomiany, *Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance*. Drug Resist Updat, 2008. **11**(3): p. 110-21.
112. Sahlberg, S.H., et al., *Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94621.
113. Muqbil, I., et al., *Systems and Network Pharmacology Approaches to Cancer Stem Cells Research and Therapy*. J Stem Cell Res Ther, 2012. **Suppl 7**(5).
114. Vlashi, E. and F. Pajonk, *Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy*. Semin Cancer Biol, 2014.
115. Menon, K.V., A.R. Hakeem, and N.D. Heaton, *Meta-analysis: recurrence and survival following the use of sirolimus in liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **37**(4): p. 411-9.

116. Decaens, T., et al., *Role of immunosuppression and tumor differentiation in predicting recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a multicenter study of 412 patients*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(45): p. 7319-25.
117. Johnson, E.W., et al., *The role of tumor ablation in bridging patients to liver transplantation*. Arch Surg, 2004. **139**(8): p. 825-9; discussion 829-30.
118. Zimmerman, M.A., et al., *Recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation: a review of preoperative and postoperative prognostic indicators*. Arch Surg, 2008. **143**(2): p. 182-8; discussion 188.
119. D'amico, F., et al., *Predicting recurrence after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma exceeding the up-to-seven criteria*. Liver Transpl, 2009. **15**(10): p. 1278-87.
120. Sandroussi, C., et al., *Radiotherapy as a bridge to liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Transpl Int, 2010. **23**(3): p. 299-306.
121. O'connor, J.K., et al., *Long-term outcomes of stereotactic body radiation therapy in the treatment of hepatocellular cancer as a bridge to transplantation*. Liver Transpl, 2012. **18**(8): p. 949-54.
122. Fan, S.T., et al., *Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study*. Ann Surg, 2011. **254**(4): p. 569-76.
123. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(1): p. 118-45.
124. Watanabe, M., et al., *Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma*. Lab Invest, 2008. **88**(1): p. 48-57.
125. Morrison, B.J., J.C. Steel, and J.C. Morris, *Sphere culture of murine lung cancer cell lines are enriched with cancer initiating cells*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49752.