

Aus der Abteilung Gastroenteropathologie
(Komm. Leiter: Prof. Dr. med. J. Rüschoff)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Zytogenetische Charakterisierung der Glioblastomzelllinie G112 in
Bezug auf tumorstammzellähnliche Eigenschaften und
Strahlentherapie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marina Rippl

aus

Witzenhausen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. B. Gunawan

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Haase

III. Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Januar 2013

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung

7

I.1 Glioblastoma multiforme: Definition, Inzidenz, Risikofaktoren

7

I.2 Tumorlokalisation und klinische Symptomatik

8

I.3 Histopathologie, Ätiologie und Prognose

9

I.4 Derzeit angewendete Therapiemöglichkeiten

10

- I.4.1 Radio-/ und Chemoresistenz als Grund für das Rezidiv-GBM

10

- I.4.2 Angiogenese-Hemmer (Avastin, Cilengitide), nanopartikel-
vermittelte Hyperthermie

13

I.5 Genetische Merkmale

14

- I.5.1 Potenziell diagnostische, genomische Alterationen in primären und
sekundären GBM

14

- I.5.2 Potenziell prognostische und prädiktive genomische Alterationen

16

- I.5.3 Häufige Mutationen und Aberrationen

17

- I.5.4 Genetische GBM-Subtypen und Strahlentherapie

18

I.6 GBM-Ursprung und maligne Progression -

Die GBM-Stammzellhypothese und das Klonale Evolutionsmodell

19

- I.6.1 Klonales Evolutionsmodell

19

- I.6.2 GBM-Stammzellhypothese

21

- I.6.3 Klinische Folgen der GBM-Stammzellhypothese

25

I.7 Experimentelle Modelle zur Isolierung und Charakterisierung von GBM-Zellen

26

- I.7.1 Tumorbiopsie

26

- I.7.2 Zellkultur

27

- I.7.3 Serumhaltige Kulturbedingungen im Vergleich zu serumfreien
Kulturbedingungen

29

<u>I. 8 Fragestellung und Ziel der Arbeit</u>	<u>31</u>
<u>II. Material und Methode</u>	<u>33</u>
<u>II.1 Zellkultur</u>	<u>33</u>
<u>II.2 Zytogenetik</u>	<u>37</u>
<u>II.3 Tierexperimente</u>	<u>38</u>
<u>II.4 Übersicht der bearbeiteten Zelllinien</u>	<u>39</u>
<u>III. Ergebnisse</u>	<u>43</u>
<u>III.1 Zytogenetische Charakterisierung von G112</u>	<u>43</u>
<u>III.2 Zytogenetische Charakterisierung von G112-NB</u>	<u>46</u>
<u>III.3 Tumorigenität von G112-Subklonen und zytogenetische Charakterisierung</u>	<u>49</u>
- III.3.1 Zytogenetische Untersuchung tumorigener Zellen	49
<u>III.4 Effekt der Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB</u>	<u>50</u>
- III.4.1 Zytogenetischer Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten G112-NB-Zellen <i>in vitro</i>	50
- III.4.2 Zytogenetischer Vergleich von G112-NB- und G112-NB/IR-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	51
<u>III.5 Abbildung 15. Übersicht der Zelllinien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></u>	<u>54</u>

<u>IV. Diskussion</u>	<u>55</u>
<u>IV.1 Zytogenetische Charakterisierung von G112 - P9 vs. P187 und Heterogenität</u>	<u>56</u>
<u>IV.2 Zytogenetische Charakterisierung von G112-NB - Serumfreie Bedingungen sind selektiv für zur Neurosphärenbildung befähigte Klon-I-Tumorzellen</u>	<u>57</u>
<u>IV.3 Tumorigenität von G112-Subklonen und zytogenetische Charakterisierung - BTIC, Vorläuferzelle, differenzierte Tumorzelle</u>	<u>58</u>
<u>IV.4 Effekte der Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB - BTIC, Vorläuferzelle, differenzierte Tumorzelle</u>	<u>59</u>
<u>IV.5 Schlussfolgerung</u>	<u>61</u>
<u>V. Zusammenfassung</u>	<u>64</u>
<u>VI. Anhang</u>	<u>66</u>
<u>VI.1 Tabelle 4. Karyotypen</u>	<u>66</u>
<u>VI.2 Karyogramme</u>	<u>68</u>
<u>VII. Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>79</u>
<u>VIII. Literaturverzeichnis</u>	<u>81</u>

I. Einleitung

I.1 Glioblastoma multiforme: Definition, Inzidenz, Risikofaktoren

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der bösartigste und häufigste Gehirntumor mit dem höchsten Anaplasiegrad (WHO Grad IV) (Riede und Schaefer 2001b; Louis et al. 2007). Mit einer Inzidenz von ca. 3,32 Erkrankten bei Männern und 2,24 Erkrankten bei Frauen pro 100000 Einwohner pro Jahr gehört das GBM zu den weniger häufigen Krebserkrankungen (Ohgaki et al. 2004). Dabei sind die Inzidenzraten der Hirntumoren in den Industrieländern höher als beispielsweise in Entwicklungsländern. Dies hängt mit sozioökonomischen Faktoren, wie präziseren Diagnostikmethoden sowie einer sorgfältigeren Dokumentation der Krankheitsfälle zusammen, wobei ätiologische Veranlagungen nicht sicher ausgeschlossen werden können. Aufgrund dieser Umstände wird das GBM bei Kaukasiern häufiger beobachtet als bei Afrikanern oder Asiaten (Ohgaki und Kleihues 2005a). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 61,3 +/- 14 Jahren (Ohgaki und Kleihues 2005b). GBM ist mit 65% aller Hirntumoren das häufigste maligne Gliom. Weniger als 3% der Patienten sind 5 Jahre nach Diagnose noch am Leben. Hohes Alter ist ein wichtiger Risikofaktor für eine geringere Überlebenszeit (Ohgaki und Kleihues 2005a).

Abhängig von der Art der Gliomentstehung unterscheidet man zwischen primären (95%) und sekundären (5%) GBM (Ohgaki und Kleihues 2007; Dropcho und Soong 1996; Ohgaki et al. 2004). Als sekundäre GBM bezeichnet man solche Tumoren, welche sich als Folge einer Progression aus geringgradigen Astrozytomen (WHO II, III) entwickelt haben. Als primäre GBM bezeichnet man solche Tumoren, welche de novo, ohne einen nachweisbaren Vorläufertumor entstanden sind (Ohgaki und Kleihues 2007). Ob alle „primären“ GBM tatsächlich de novo entstanden sind oder nur ihren Vorläufer überwachsen haben, bleibt im Einzelfall ungeklärt. Es gibt jedoch zwischen primären und sekundären GBM klinisch-pathologische Unterschiede im Manifestationsalter und der Geschlechtsverteilung. Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei primären GBM beträgt 62 Jahre, mit einer medianen Überlebensrate von 4,7 Monaten (**Tabelle 1**). Im Gegensatz dazu liegt das mediane Manifestationsalter des sekundären GBM bei 45 Jahren und die mediane Überlebensrate bei 7,8 Monaten. Des Weiteren erkranken Männer häufiger an primären GBM sowie geringgradigen Astrozytomen, Frauen hingegen erkranken

zwar seltener als Männer an geringgradigen Astrozytomen, erleiden dafür aber häufiger eine Tumorprogression zum sekundären GBM (Ohgaki und Kleihues 2005b).

Trotz der Tatsache, dass GBM eher seltener sind, stellen sie große therapeutische Herausforderungen dar, welches durch die noch immer geringen Therapieerfolge sowie die hiermit zusammenhängenden kurzen Überlebensraten reflektiert wird (TCGA 2008). Aufgrund dieser Tatsache wurde das GBM neben weiteren bedeutenden Malignomerkrankungen für die erste TCGA-Studie ausgewählt (TCGA 2008).

	WHO-Grad	Mittleres Alter bei Diagnose	Medianes Überleben (Monate)	Mittleres Überleben (Monate)	5-Jahres-Überleben
Diffuses Astrozytom	II	41-47 Jahre	67	77	45-58%
Anaplastisches Astrozytom	III	44-50 Jahre	20	30	11-28%
GBM	IV	61-62 Jahre	4,9	7,3	1,2-2,9%

Tabelle 1. Gliom-Stadien und deren Überlebenszeiten (nach Ohgaki und Kleihues 2005a, S. 96)

I.2 Tumorlokalisierung und klinische Symptomatik

Aufgrund der meist supratentoriellen Tumorlokalisierung äußert sich das GBM klinisch mit einer Herdsymptomatik. Dies kann je nach Lokalisation zum Beispiel mit Kopfschmerzen, Hemiparesen, Krampfanfällen, Bewusstseinsstörungen, Wesensveränderungen und Visuseinschränkungen verbunden sein. Ebenfalls ist durch das Tumorwachstum eine Hirndrucksymptomatik möglich. Im Allgemeinen treten die Beschwerden aufgrund des schnellen Tumorwachstums relativ kurzfristig innerhalb von Wochen bis Monaten auf (Müller 2006).

Häufige Tumorlokalisationen sind neben den periventrikulären Bereichen, die subventrikulären Zonen, das Marklager (evtl. auch beidseits vom Corpus callosum ausgehend als sog. Schmetterlingsform) sowie die temporalen, frontalen und

parietalen Großhirnhemisphären. Seltener Lokalisationen sind Stammganglien und Hirnstamm (Riede und Schaefer 2001b; Sanai et al. 2005; Louis et al. 2007).

I.3 Histopathologie, Ätiologie und Prognose

Histologisch entspricht das GBM einem Astrozytom WHO-Grad IV (Louis et al. 2007), innerhalb des WHO-Grading-Systems zentralnervöser Tumoren im Allgemeinen und astrozytärer Tumoren im Speziellen, basierend auf histologischen Kriterien wie infiltrativem Wachstum, Kernatypien, Mitoseaktivität, erhöhter Zellularität, Nekrosen und mikrovaskulärer Proliferation (Pilkington 2005; Louis et al. 2007; Tonn et al. 2010a).

Entsprechend seiner hohen Malignität besitzt der Tumor die Neigung zu schnellem, invasivem Wachstum, zur Bildung neuer Blutgefäße und zur Entwicklung perifokaler Hirnödeme, welche einen erhöhten Hirndruck sowie Massenverschiebungen zur Folge haben (Riede und Schaefer 2001b).

Lichtmikroskopisch bietet das GBM ein buntes, sehr vielgestaltiges, heterogenes Bild mit hoher Zellularität, Zellpolymorphien, mehrkernigen Riesenzellen, glomerulären Gefäßproliferaten und/oder Nekrosen mit Einblutungen sowie zystischen Zerfallshöhlen (Riede und Schaefer 2001b; Tonn et al. 2010a). Durch die strichförmigen Nekrosen erhalten die histologischen Gewebeschnitte ihre charakteristische Leopardenfellstruktur (Riede und Schaefer 2001b). Die Nekrosen sind von pseudopalisadenartig angeordneten Tumorzellen umgeben (Riede und Schaefer 2001b; Tonn et al. 2010a). Da der Tumor sowohl neuronale als auch gliale Merkmale zeigt, ist eine definitive Zuordnung des Tumors zu einer Ausgangspopulation noch nicht möglich. Die Ätiologie des GBM ist bisher unklar. Entwicklungsgeschichtlich wird der Tumor zu den neuroepithelialen Tumoren gezählt (Riede und Schaefer 2001b). Näheres über die Entstehungshypothese des GBM folgt in Kapitel I.6.

I.4 Derzeit angewendete Therapiemöglichkeiten

Die heute angewendeten Therapien dieses Tumors umfassen operative Interventionen, Strahlentherapie sowie chemotherapeutische Verfahren (Omay und Vogelbaum 2009), meist in multimodalen Konzepten, wie zum Beispiel einer operativen Tumorentfernung, welche zusätzlich eine Einlage von Chemotherapeutika (BCNU= 1,3-bis(chloro-ethyl)-1-nitrosourea) ins Tumorbett ermöglicht und einer anschließenden adjuvanten Strahlentherapie (Müller 2006; Weller 2008).

Leider kann das GBM bisher nur unter palliativen Gesichtspunkten behandelt werden, da es selbst bei radikaler Entfernung des Tumors fast ausnahmslos zu einem Rezidiv kommt. Aus diesem Grund ist die Prognose für Patienten mit einem GBM äußerst schlecht (Müller 2006).

I.4.1 Radio-/ und Chemoresistenz als Grund für das Rezidiv-GBM

Aufgrund des schnellen infiltrativen Wachstums und des begrenzten intrakraniellen Volumens führt der Tumor früher oder später zu neurologischen Ausfallerscheinungen und Hirndrucksymptomatik. Durch Reduktion des Tumorumfanges können diese Beschwerden therapiert werden. Ist der Tumor operativ zugänglich, wird mittels offener Kraniotomie eine weitestgehende Tumorreduktion angestrebt. Dabei bestimmen Tumorlokalisierung, Tumorausdehnung und Tumorkonfiguration die Möglichkeiten einer Resektion (Hofer und Merlo 2002). Aber selbst bei ausgedehnten Resektionen ist eine komplette Entfernung aller Tumorzellen nicht möglich, denn einige Tumorzellen infiltrieren entlang der neuronalen Faserbahnen und der Blutgefäße weit in das umgebende Hirngewebe und können dort zum Ausgangspunkt eines Rezidivs werden (Panagiotakos und Tabar 2007).

Aufgrund der Infiltration einzelner Tumorzellen in gesundes, umliegendes Hirngewebe mit fehlender Darstellbarkeit im MRT oder PET können die absoluten Tumorgrenzen nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund ist eine kurative operative Therapie derzeit leider nicht möglich (Hofer und Merlo 2002).

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit des GBM bietet die Strahlentherapie (Kauffmann et al. 2006b). Immer wird die Therapie des GBM nach der Operation durch eine Strahlentherapie fortgesetzt, wodurch eine Lebenszeitverlängerung erreicht werden kann. Dabei erfolgt an mehreren Behandlungstagen eine lokale

Bestrahlung der ursprünglichen Tumorregion sowie dessen Randsaums mit einer Gesamtstrahlendosis von 55-60 Gray, bei einer täglichen Einzelfraktion von 2-2,5 Gray. Im Falle einer Inoperabilität des Tumors kann eine alleinige Strahlentherapie zur Reduktion der Tumormasse erfolgen (Hofer und Merlo 2002). Obwohl die Strahlentherapie nach der Chirurgie eine der effizientesten Behandlungsmethoden ist und das Leben von GBM-Patienten verlängern kann, sprechen leider nicht alle GBM auf eine Radiotherapie an, da diese Tumoren die Fähigkeit besitzen Resistenzmechanismen gegenüber der Bestrahlung zu entwickeln (Huhn et al. 1999; Kauffmann et al. 2006a, b). Die Ursachen dieser Radioresistenz werden zurzeit noch erforscht (Huhn et al. 1999; Kauffmann et al. 2006a) (siehe auch Kapitel 1.5.2, 1.5.3, 1.6.2, 1.6.3). Um diese Radioresistenz der GBM zu überwinden, werden unter anderem sog. Radiosensitizer (halogenierte Pyrimidine wie z. B. Brom- und Jod-Desoxyuridin= BdUR, IUdR) erforscht (Hofer und Merlo 2002).

Die Chemotherapie spielt im Vergleich zur Operation oder der Strahlentherapie bei der Behandlung des GBM eine untergeordnete Rolle (Hofer und Merlo 2002; Nieder et al. 2004), da die Tumore u. a. aufgrund der wenig durchlässigen Bluthirnschranke sowie Tumorresistenzmechanismen (z. B. DNA-Reparatur) der Tumorzellen selbst wenig sensitiv auf Chemotherapeutika reagieren (Hofer und Merlo 2002). Bei den bluthirnschrankengängigen Zytostatika, die zurzeit bei GBM eine Anwendung finden, handelt es sich um Nitrosoharnstoffe (z. B. BCNU) oder Temozolomid (Hofer und Merlo 2002; Weller 2008; Fukushima et al. 2009).

Das Prinzip alkylierender Substanzen wie z. B. dem Temozolomid beruht auf einer Zufügung irreparabler DNA-Schäden durch Alkylierung von Guaninbasen, welche letztendlich über Apoptose der Tumorzellen zu einer Eliminierung des Tumors führen sollen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Temozolomid zur postoperativen Strahlentherapie das Überleben bei diesen GBM-Patienten verlängert (Weller 2008; Fukushima et al. 2009). Im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie mit einer medianen Überlebensrate von 12,1 Monaten ist das Überleben bei einer Kombinationstherapie aus Strahlentherapie und Temozolomid mit einer medianen Überlebensrate von 14,6 Monaten um 2,6 Monate verlängert (Stupp et al. 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse ist Temozolomid bei GBM Teil der Standardtherapie. Dabei wirkt Temozolomid als alkylierende Substanz (DNA-Methylierer) (Weller 2008; Fukushima et al. 2009).

Durch den Methylgruppentransfer auf die O⁶-Position der Guaninbasen kommt es zu DNA-Replikationsstörungen, da statt Cytosin Thymin an die methylierte Guaninbase angelagert wird. Die daraufhin entstehenden DNA-Schäden, wie z. B. Doppelstrangbrüche, können bei Übersteigen der Kapazität der *MGMT*-Aktivität (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) nicht repariert werden und es kommt zur Apoptose der Tumorzelle (Fukushima et al. 2009).

Leider sprechen nicht alle GBM auf eine Therapie mit Temozolomid an. Und auch bei Temozolomid-sensiblen Tumoren kann nur eine Überlebenszeitverlängerung von Wochen bis Monaten, jedoch keine Heilung erzielt werden (Weller 2008; Fukushima et al. 2009).

Ein wesentlicher Faktor für die Ansprechbarkeit ist der Aktivitätszustand der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*), einem DNA-Reparaturprotein, welches unter normalen Umständen in der Lage ist, an die O⁶-Position von Guanin angelagerte Alkylgruppen zu entfernen und somit einer chemotherapie-induzierten Alkylierung entgegenzuwirken (Fukushima et al. 2009). Patienten mit GBM, bei denen das *MGMT*-Gen auf Chromosom 10q26 durch aberrante Methylierung seiner Promotorregion inaktiviert ist, sprechen besser auf Chemotherapie an. (Hegi et al. 2005; Weller 2008; Fukushima et al. 2009). Somit ist der *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus ein prädiktiver Marker für die Ansprechbarkeit auf alkylierende Chemotherapie (Hegi et al. 2005). Ob ein GBM sensibel für eine Temozolomid-Therapie ist, wird mit Hilfe einer methylierungsspezifischen PCR aus einer Tumor-DNA-Probe ermittelt (Weller 2008; Fukushima et al. 2009).

Bei einer Therapieresistenz gegen Temozolomid können andere Chemotherapeutika, wie z. B. Procarbazine oder Vincristin, angewendet werden, welche bereits seit Mitte der 80er zum Einsatz kommen (Hofer und Merlo 2002; Weller 2008). Leider wird die Wirkung durch die speziellen Resistenzmechanismen einiger GBM-Zellen gestört (Hofer und Merlo 2002). Bei diesen Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber den alkylierenden Substanzen handelt es sich um mehrere unabhängige Mechanismen, welche noch Gegenstand der Forschung sind (Hofer und Merlo 2002; Fukushima et al. 2009). Des Weiteren tragen genetische Veränderungen zur Entstehung solcher Resistenzmechanismen bei, wie z. B. inaktivierende Mutationen in den Tumorsuppressorgenen (*PTEN*, *p53*) oder aktivierende genetische Veränderungen in anti-apoptotischen Genen (*Bcl2*) oder proliferationsfördernden Genen (*EGFR*) (Hofer und Merlo 2002).

I.4.2 Angiogenese-Hemmer (Avastin, Cilengitide), nanopartikelvermittelte Hyperthermie

Eine weitere noch in der Erforschung befindliche Therapieoption ist die Anwendung von Angiogenese-Hemmern, wie z. B. Bevacizumab (Avastin), ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen *VEGF* oder Cediranib (Recentin), ein Multi-Tyrosin-Kinase-Hemmer, welcher *VEGF* intrazellulär bindet oder Cilengitide, ein Integrin-Inhibitor, der zur Endothelzellproliferationshemmung führt. Diese Wirkstoffe sollen die ausgeprägte Gefäßproliferation bei GBM verhindern. Diese Tumorgefäßproliferate sind aufgrund von starken Endothelzellproliferationen und mehrlagigen Endothelzellschichten nicht zur effizienten Gewebepfusion fähig, wodurch es zu ischämisch-hypoxischen Tumorarealen kommt. Angiogenese-Hemmer inhibieren die Bildung solcher ineffizienten Tumorgefäßproliferate, dies führt zu einer Normalisierung der Gefäßproliferation und verbessert die Perfusion sowie die Oxygenierung des Tumors. Durch die normalisierte Perfusion können Chemotherapeutika besser in den Tumor gelangen (Tabatabai und Stupp 2010).

Die verbesserte Oxygenierung des Tumors hat zur Folge, dass das GBM strahlensensibler wird, da die strahlentherapeutisch induzierten DNA-Schäden durch das synergistische Zusammenspiel von radioaktiver Bestrahlung mit Sauerstoff induziert werden. Aufgrund dieser strahlentherapeutisch induzierten, irreversiblen DNA-Schäden wird in den Tumorzellen die Apoptose eingeleitet (Kauffmann et al. 2006a).

Ein weiteres Ziel der Angiogenese-Hemmer ist die Zerstörung der perivaskulären Nische, welche in Verdacht steht an der GBM-Generierung beteiligt zu sein (Gilbertson und Rich 2007; Tabatabai und Stupp 2010).

So bieten Angiogenese-Hemmer die Möglichkeit GBM für konventionelle Therapieverfahren (Radio-/ Chemotherapie) angreifbarer zu machen (die Ansprechrate auf RT/CT zu erhöhen) und so zu einer Lebensverlängerung zu führen (Tabatabai und Stupp 2010; Tonn et al. 2010b).

Unbestritten ist die Reduzierung der vaskulären Permeabilität sowie des peritumoralen Ödems. Erste Studienergebnisse zeigen, dass Angiogenese-Hemmer in Kombination mit einer konventionellen zytotoxischen Therapie (RT/CT) am effektivsten sind. Leider kommt es auch unter der Verwendung von Angiogenese-Hemmern zu Resistenzentwicklungen seitens der Tumorzellen und damit zu einem

Rezidiv des Tumors. Um diese Mechanismen besser zu verstehen, sind weitere experimentelle Untersuchungen nötig (Tabatabai und Stupp 2010).

Ein weiterer viel versprechender Therapieansatz ist die Hyperthermie-Behandlung mit Hilfe von intratumoral eingebrachten magnetischen Nanopartikeln. Mit Hilfe der lokalen Hyperthermie-Behandlung können Tumorzellen zerstört sowie für andere Therapien, wie z. B. für die Radiotherapie oder für eine Temozolomid-Behandlung sensibilisiert werden, so dass zur Erzielung des gleichen Effektes geringere Dosen an Bestrahlung bzw. Temozolomid eingesetzt werden können und so auch deren Nebenwirkungen reduziert werden können. Bezüglich der Nebenwirkungen ist die Hyperthermie-Therapie im Vergleich zur Radio-/ und Chemotherapie eine nebenwirkungsarme Behandlungsmodalität. Die Anwendung einer Kombination aus nanopartikelvermittelter Hyperthermie-Therapie und Radiotherapie bei GBM-Rezidiven führte zu einer medianen Gesamtüberlebenszeit von 23,2 Monaten (Maier-Hauff et al. 2010).

Im Vergleich dazu betrug die mediane Überlebenszeit unter alleiniger adjuvanter Radiotherapie 12,1 Monate und unter der Kombination von Radiotherapie und Temozolomid 14,6 Monate (Stupp et al. 2005).

I.5 Genetische Merkmale

I.5.1 Potenziell diagnostische, genomische Alterationen in primären und sekundären GBM

Die Tatsache, dass GBM ohne Anzeichen auf Vorläufertumoren de novo (primäre GBM) oder aber sekundär durch Progression geringgradiger Astrozytomen Grad II und III (sekundäre GBM) entstehen können, ist sowohl für die Therapie, als auch für die Prognose der Überlebenszeit äußerst relevant (Ohgaki und Kleihues 2005b). Denn genetische Analysen haben gezeigt, dass primäre und sekundäre GBM zwei unterschiedliche Tumorsubtypen des GBM darstellen, die in unterschiedlichen Altersgruppen auftreten und sich aufgrund separater genetischer Veränderungen entwickeln (Ohgaki et al. 2004).

Häufige genetische Veränderungen **primärer** GBM sind eine Deletion am langen Arm von Chromosom 10 (10q) (Prediktor für verkürzte Überlebenszeit und mit 69%

die häufigste genetische Veränderung in GBM überhaupt), des Weiteren eine Amplifikation des *EGFR*-Gens an 7p12.3-7p12.1, eine Deletion am kurzen Arm von Chromosom 16 (16p) sowie Mutationen im *PTEN*-Gen an 10q23.3 und *TP53*-Gen an 17p13.1 (Ohgaki et al. 2004). Eine chromosomale Aberration, welche ausschließlich in primären GBM nachgewiesen wurde, ist die Deletion am kurzen Arm von Chromosom 10. Seltener zeigen sich Deletionen an 13q, oder 1p (Ohgaki und Kleihues 2007).

Eine charakteristische genetische Veränderung in **sekundären** GBM ist das frühe Auftreten der Mutation im *TP53*-Gen, welche bereits in geringgradigen Astrozytomen nachgewiesen werden kann. Weitere auftretende Mutationen in sekundären GBM sind Veränderungen im *RB1*-Gen, eine Deletion an 22q sowie eine Deletion an 19q (Ohgaki und Kleihues 2007).

Des Weiteren zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen der GBM-Subtypen und der histopathologischen Tumormorphologie. So ist ein kleinzelliger Phänotyp oft mit einer Amplifikation von 7p12.3-7p12.1 (*EGFR*-Gen), einem typischen Merkmal primärer GBM assoziiert (Ohgaki und Kleihues 2007). Außer für die Deletion an 10q, welche mit einer verkürzten Überlebenszeit bei GBM-Patienten assoziiert ist, konnte für die weiteren genetischen Veränderungen kein Zusammenhang mit einer Prognose oder Überlebenszeit gefunden werden (Ohgaki und Kleihues 2005b). Die unterschiedlichen genetischen Veränderungen in primären und sekundären GBM verdeutlichen die unterschiedliche Ätiologie und Pathologie der einzelnen GBM-Subtypen und könnten das Ansprechen der GBM auf eine Radio-/und Chemotherapie beeinflussen (Ohgaki und Kleihues 2007).

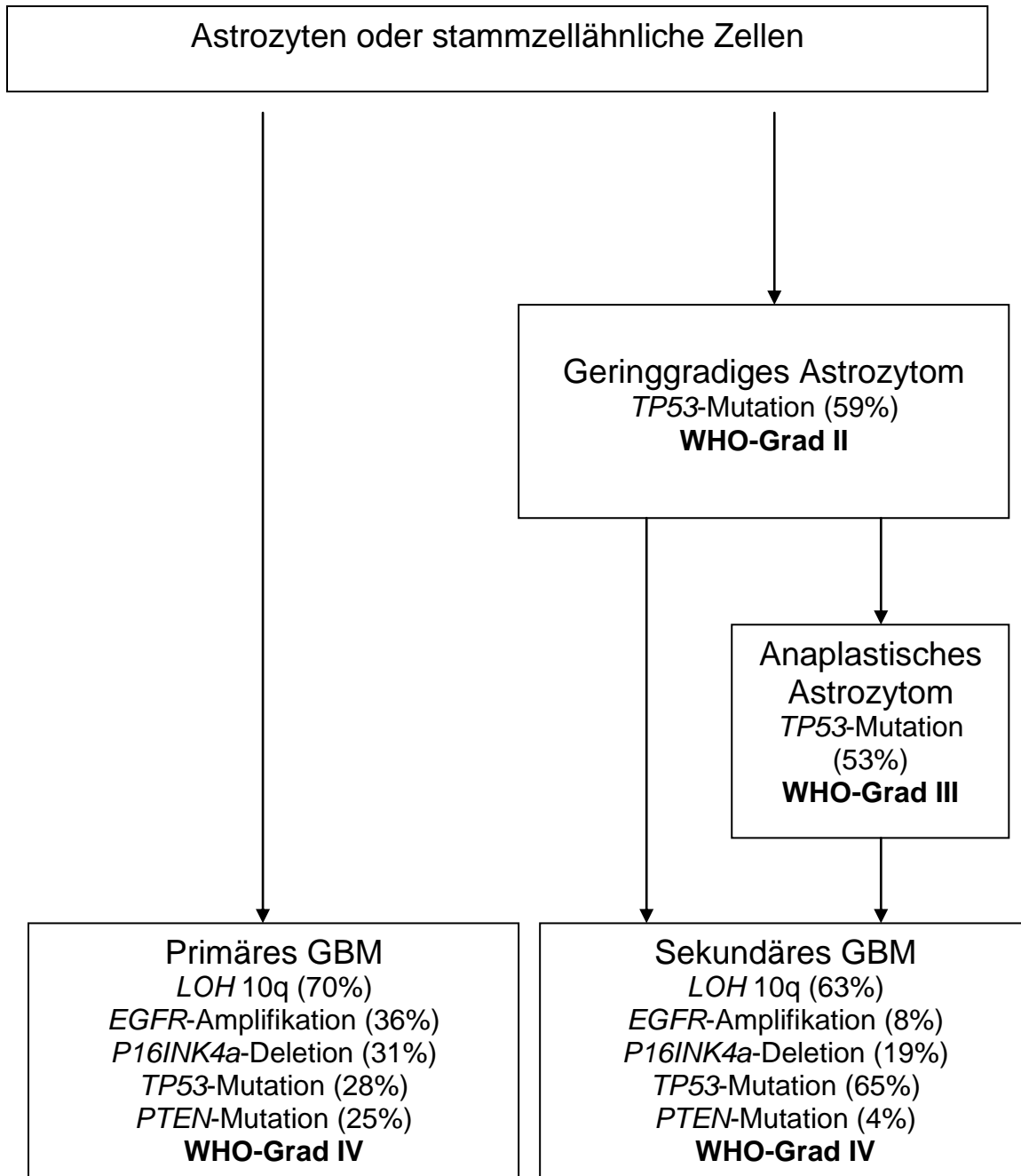


Abbildung 1. Übersicht der genetischen Pathophysiologie primärer und sekundärer GBM (Ohgaki und Kleihues, 2005b, S. 484)

I.5.2 Potenziell prognostische und prädiktive genomische Alterationen

Mit Hilfe genetischer Analysen ist jedoch nicht nur eine Differenzierung zwischen primären und sekundären GBM möglich, sondern es können an Hand chromosomaler Aberrationen auch hochgradige Gliome von geringgradigen Gliomen unterschieden werden. Anhand genetischer/ chromosomaler Profile können

Rückschlüsse auf die genetische Tumorprogression gezogen werden, sowie Surrogatmarker für Tumorgrad und Tumoraggressivität für die Ansprechbarkeit auf unterschiedliche Therapien identifiziert werden. Hinsichtlich der Einteilung des Tumorgrades und der Tumoraggressivität waren laut Mohan et al. (2004) genetische Kriterien den histologischen Kriterien überlegen. Des Weiteren lässt sich mit genetischen Analysen die Dynamik des Tumors bezüglich einer möglichen Progression besser erkennen. Laut Mohan et al. ist eine Deletion an 1p von prädiktivem Wert für ein Therapieansprechen auf zytotoxische Substanzen wie Procarbazin und mit einer günstigeren Prognose assoziiert, während zusätzliche Aberrationen an 3p, 5q, 9p, 10q, 17p mit Eigenschaften eines aggressiven anaplastischen Tumors assoziiert sind (Mohan et al. 2004).

I.5.3 Häufige Mutationen und Aberrationen

Neben der Erkenntnis, dass GBM-Typen existieren, die sich in ihren genetischen Merkmalen, ihrer Ätiologie und ihrer Reaktion auf zytotoxische Therapeutika unterscheiden, gelang unter der Führung des Cancer Genome Atlas Research Network erstmalig eine umfassende genetische Charakterisierung der in GBM vorliegenden Genveränderungen und eine Identifizierung involvierter Signaltransduktionswege (*RTK/PIK*-, *p53*-, *RB*-Signaltransduktionswege) (Ohgaki und Kleihues 2005b; Furnari et al. 2007). Durch statistische Analysen konnten acht mutierte Gene ermittelt werden, welche signifikant häufig in GBM auftreten und hierfür charakteristisch sein könnten (TCGA 2008). Bei den veränderten Genen handelt es sich um *TP53*, *PTEN*, *NF1*, *EGFR*, *ERBB2*, *RB1*, *PIK3R1*, *PIK3CA* (TCGA 2008; Wiedemeyer et al. 2008; Maher et al. 2006; Lee JC et al. 2006; Gallia et al. 2006; Samuels et al. 2004; Kleihues und Ohgaki 1999; Thiel et al. 1995; Ekstrand et al. 1992).

Chromosomale Veränderungen zeigen sich in einer häufigen Amplifikation von Regionen an Chromosom 7 und Chromosom 19. Seltener, jedoch ebenfalls signifikant traten Amplifikationen an 1q32.1, 4q12, 12q14.1, 12q15 auf. Deletionen wurden an Chromosomen 1, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, und 22 beobachtet, wobei die Deletionen an Chromosom 9 (9p21.3) sowie an Chromosom 10 (10q21.3-q22.1, 10q23.2-q23.31) und an den Chromosomen 13 und 22 besonders häufig vertreten waren. Des Weiteren konnte auch ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen

im Genom sowie der Signaltransduktionswege und der Wirkfähigkeit/ Effektivität möglicher Therapeutika aufgezeigt werden (TCGA 2008).

Denn zwischen behandelten GBM und unbehandelten GBM zeigten sich bezüglich der genetischen Mutationsrate deutliche Unterschiede (TCGA 2008), wobei Rezidiv-GBM eine höhere Mutationsrate aufwies und zunehmend unempfindlich gegenüber Chemotherapeutika wie Temozolomid waren (Riemenschneider und Reifenberger 2009).

I.5.4 Genetische GBM-Subtypen und Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist heutzutage ein wesentlicher Bestandteil der GBM-Therapie (Hofer und Merlo 2002).

Im klinischen Alltag wird jedoch immer wieder beobachtet, dass das Ansprechen der GBM auf Strahlentherapie zwischen den einzelnen Tumoren und Patienten unterschiedlich ist. Es wird vermutet, dass Genmutationen nicht nur die Tumorzellempfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Substanzen, sondern auch gegenüber der Strahlentherapie beeinflussen. Die Studie von Huhn et al. verglich mittels CGH 20 strahlenresistente GBM-Tumorproben mit 10 strahlensensitiven GBM-Tumorproben mit Hilfe von Primärkulturen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich strahlenresistente Tumorzellen von strahlensensiblen Tumorzellen in der CGH unterscheiden und dass das unterschiedliche Ansprechen auf eine Strahlentherapie mit charakteristischen chromosomalen Veränderungen im Tumor assoziiert ist. Die strahlentherapieresistenten GBM und die strahlensensiblen Tumore unterschieden sich in chromosomalen Aberrationen, welche häufig die Chromosomen 7, 9, 10, 13 und 19 betrafen. Der größte Unterschied lag im Zugewinn von Chromosom 7, welcher in 70% der strahlentherapieresistenten Tumore auftrat, jedoch nur in 30% der strahlensensiblen Tumore. Ein weiterer Unterschied bezüglich chromosomaler Aberrationen ist die Kombination von Zugewinnen an Chromosom 7 mit Zugewinnen an Chromosom 19 in 30% der strahlenresistenten GBM sowie die Kombination der Deletionen 9p23-24 mit 13q14. In strahlensensiblen GBM konnten diese Kombinationen nicht nachgewiesen werden (Huhn et al. 1999).

Diese Ergebnisse geben somit Hinweise für eine Weiterentwicklung diagnostischer Tests sowie für zielgerichtete Therapien (TCGA 2008; Bao et al. 2006).

I.6 GBM-Ursprung und maligne Progression -

Die GBM-Stammzellhypothese und das Klonale Evolutionsmodell

In diversen Studien wurde gezeigt, dass einige bestimmte chromosomale Aberrationen in GBM signifikant häufig nachgewiesen werden und somit charakteristisch für das GBM sein könnten (Debiec-Rychter et al. 1995; Schröck et al. 1994; TCGA 2008). Nichtsdestotrotz zeigt jedes GBM sein individuelles genetisches Muster (Debiec-Rychter et al. 1995; Galli et al. 2004). Diese genetische Heterogenität findet sich nicht nur zwischen den einzelnen GBM, sondern auch zwischen einzelnen Tumorzellen innerhalb eines Tumors, z. B. in einer Mischung aus Populationen mit unterschiedlichen Ploidiegraden oder aus verschiedenen Klonen, welche sich durch chromosomale Aberrationen unterscheiden (Debiec-Rychter et al. 1995; Pollard et al. 2009). Verschiedene Ansätze/ Hypothesen versuchen diese genetische Heterogenität innerhalb des GBM sowie dessen Ursprung zu erklären. In den folgenden Unterpunkten I.6.1 und I.6.2 soll auf zwei dieser Modelle näher eingegangen werden.

I.6.1 Klonales Evolutionsmodell

Die etabliertere Hypothese ist das Klonale Evolutionsmodell, auch stochastisches Modell genannt (Reya et al. 2001). Danach erwerben Malignomzellen zufällig verschiedene Mutationen, welche sie in ihren Eigenschaften/ Fähigkeiten, wie z. B. Morphologie oder Proliferationsverhalten, verändern und bei einem Überlebens- bzw. Proliferationsvorteil gegenüber normalen Zellen zur Expansion dieses veränderten Klons führen (Riede und Schaefer 2001a; Knudson 1985; Nowell 1976). Durch die Mutationen können die Tumorzellen so verändert sein, dass sie nicht mehr den normalen Regulationsmechanismen unterstehen (Riede und Schaefer 2001a). Infolgedessen entwickelt sich unter einer weiteren Zunahme von Mutationen und der unkontrollierten Proliferation eine zunehmende genetische Instabilität, welche zur zunehmenden zellulären Heterogenität und einer beschleunigten Rate von Verlust oder Neuerwerbung zellulärer Eigenschaften führt (Nowell 1976). Demnach beruht die genetische Heterogenität auf einer fortlaufenden Selektionierung und klonalen Expansion von Tumorzellklonen mit neu erworbenen vorteilhaften Eigenschaften. So ist nach dem Klonalen Evolutionsmodell (u. a. auch stochastisches Modell genannt) die maligne Progression eines Tumors hauptsächlich auf die genetische Instabilität

und auf die klonale Selektionierung der Tumorzellen mit dem höchsten Proliferationspotential und der besten Umgebungsanpassung zurückzuführen (Nowell 1976; Seidel et al. 2010) **(Abbildung 2)**

Man kann sagen, dass nach dem Klonalen Evolutionsmodell die Heterogenität ein darwinistisches Konkurrenz-Phänomen der Tumorzellen untereinander beschreibt (Riede und Schaefer 2001a; Nowell 1976). Dabei besteht bei dieser Hypothese keine hierarchische Ordnung zwischen den einzelnen Tumorzellpopulationen (Reya et al. 2001). Im Gegenteil, jede Tumorzelle kann aufgrund ihrer stochastisch erworbenen Mutationen individuelle Fähigkeiten, wie z. B. unbegrenzte Proliferationsfähigkeit oder Migrationsfähigkeit, besitzen, unabhängig davon, aus welchem ursprünglichen Zelltyp sie stammt und welche Eigenschaften sie vor Erwerb der Mutationen hatte (Riede und Schaefer 2001a; Nowell 1976).

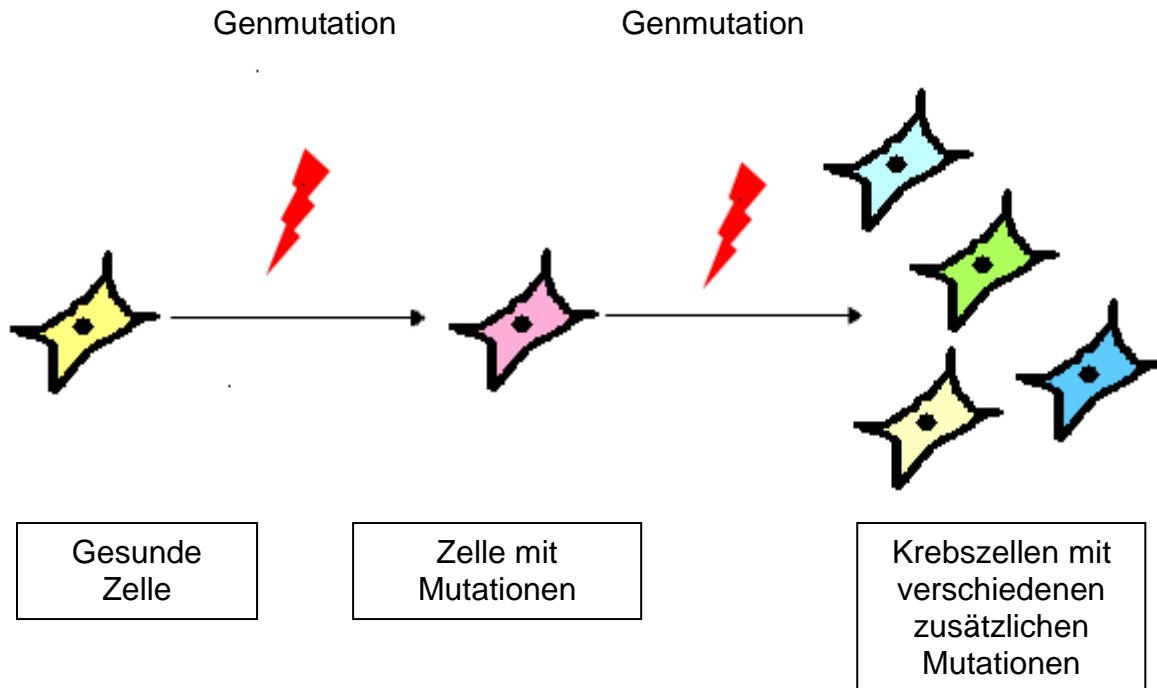


Abbildung 2. Klonales Evolutionsmodell

Nach dem Klonalen Evolutionsmodell entsteht eine Tumorzelle aufgrund zufällig, zum Beispiel durch äußere Reize, induzierte Genmutationen. Durch Proliferation entstehen weitere Tumorzellen, die wiederum aufgrund des Erwerbs zusätzlicher Genmutationen ihre Eigenschaften ändern. Alle Tumorzellen haben das gleiche Proliferationspotential.

Tumorheterogenität und Progression sind Folge des Selektionsdruckes unter den einzelnen Zellen. Der durch zufällige genetische Mutationen einzelner Tumorzellen erzeugte Selektionsdruck führt dazu, dass nur die am besten angepassten Tumorzellen überleben (Seidel et al. 2010).

I.6.2 GBM-Stammzellhypothese

Im Gegensatz zum Klonalen Evolutionsmodell erklärt die GBM-Stammzellhypothese die maligne Progression mit hierarchischen Strukturen zwischen den einzelnen Tumorzellpopulationen, wobei nur eine besondere Tumorzellpopulation und nicht alle Tumorzellen das Potenzial zur malignen Entartung und Tumorprogression besitzen (Reya et al. 2001; Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004; Seidel et al. 2010). Laut GBM-Stammzellhypothese besitzen maligne Gehirntumoren eine hierarchische Ordnung, welche durch die phänotypische und molekulare Heterogenität der GBM zum Ausdruck kommt und in Kapitel 1.3 und 1.5 beschrieben wird. Dieses Konzept liefert neue Ansätze bezüglich der GBM-Entstehung und der GBM-Progression (Kang et al. 2006). Vor allem die Identifizierung eines besonderen Zelltyps mit

stammzellähnlichen Eigenschaften in GBM, allgemein bezeichnet als Brain Tumor Initiating Cell (BTIC) (Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004), welcher sich in seinen biologischen Eigenschaften von dem Großteil der Tumormasse unterscheidet, führt zu einem Wandel bisheriger Hypothesen im Verständnis über das Phänomen des Wiederauftretens des GBM (Seidel et al. 2010). Die Kernaussage der GBM-Stammzellhypothese ist, dass GBM aus einer Hierarchie unterschiedlicher Zellen bestehen:

Dabei handelt es sich erstens um hoch-tumorigene Zellen (BTIC) mit biologischen Hauptmerkmalen neuronaler Stammzellen (NSC) und geringer Proliferationsrate, zweitens um Vorläuferzellen (Progenitors), eine Zwischenstufe zwischen BTICs und differenzierten Tumorzellen, mit hohem Proliferationspotential und teilweise noch vorhandenen BTIC-Eigenschaften, wie z. B. Neurosphärenbildung, eingeschränkter multipotenter Differenzierung und drittens um differenzierte Tumorzellen mit einem mehr differenzierteren Phänotyp, begrenztem tumorigen Potential und geringer Proliferationsrate (Potten 1997a, b; Reya et al. 2001; Galderisi et al. 2006; Kang et al. 2006; Panagiotakos und Tabar 2007).

Gemäß der hierarchischen Ordnung sind BTICs die einzige Zellpopulation, welche die Eigenschaften der unbegrenzten Proliferationsfähigkeit und des Tumorinduktionspotentials besitzen, während die Tumorzellen ohne Stammzell-Eigenschaften mit zunehmender Differenzierung eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit und ein geringeres Tumorinduktionspotential aufweisen (Reya et al. 2001; Galderisi et al. 2006; Kang et al. 2006; Panagiotakos und Tabar 2007). Obwohl der Ursprung der BTICs unklar bleibt, teilen sie einige bemerkenswerte Gemeinsamkeiten mit neuronalen Stammzellen (NSC), wie z. B. die Fähigkeiten der unbegrenzten Selbsterneuerung, der Multipotenz (Generierung von morphologisch heterogenen Zellpopulationen) und der Migrationsfähigkeit (Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004; Oliver und Wechsler-Reya 2004). Des Weiteren unterstreicht die Überlappung der Genexpressionsmuster zwischen BTICs und neuronalen Stammzellen deren Ähnlichkeit zueinander (Phillips et al. 2006).

Laut der GBM-Stammzellhypothese führt die Multipotenz der BTICs zur molekularen und phänotypischen Heterogenität des GBM, wobei die verhältnismäßig kleine Population der BTICs das Reservoir für die Aufrechterhaltung aller Tumorzellpopulationen darstellt (Reya et al. 2001).

Dennoch gibt es zwischen BTICs und neuronalen Stammzellen auch Unterschiede. Dies wird durch das abnormale Muster der Zellmarker deutlich (Galli et al. 2004). Denn während differenzierte Tochterzellen normaler neuronaler Stammzellen entweder neuronale oder gliale Marker exprimieren, können die aus den BTICs entstandenen differenzierten Tumorzellen auch eine gleichzeitigen Expression von neuronalen und glialen Markern exprimieren. Generell zeichnen sich BTICs durch eine Expression von Stammzellmarkern, multipotente Differenzierungsfähigkeit und eine Fähigkeit zur in-vivo-Tumorinduktion aus (Ignatova et al. 2002; Galli et al. 2004). Auch eine zytotoxische und strahlentherapeutische Resistenz kann in BTICs nachgewiesen werden (Bao et al. 2006; Fukushima et al. 2009).

Trotz der Identifizierung von GBM-Zellen mit BTIC-Eigenschaften kann deren eindeutige Herkunft aus Stammzellen noch nicht sicher bestätigt werden, da Vorläuferzellen (Progenitors) aufgrund ihrer teilweise erhaltenen BTIC-Eigenschaften ebenso im Verdacht stehen, der Ursprung von GBM zu sein (Panagiotakos und Tabar 2007). BTICs von Vorläuferzellen zu unterscheiden ist aufgrund fehlender spezifischer BTIC-Marker und der teilweise auch in Vorläuferzellen vorhandenen BTIC-Eigenschaften schwierig (Potten 1997a, b)

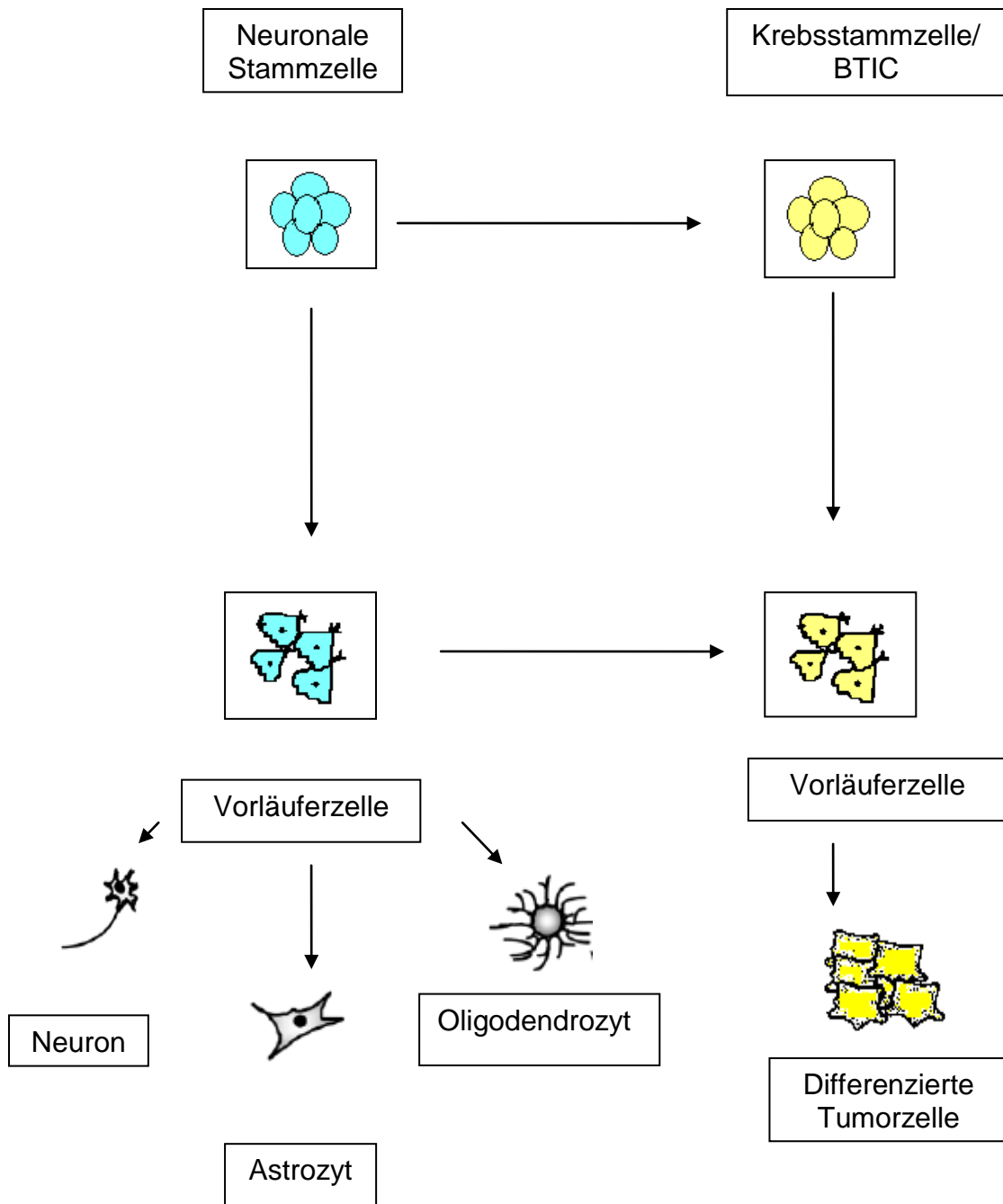


Abbildung 3. GBM-Stammzellhypothese

Nach dem Stammzellmodell existiert innerhalb des Tumors eine Hierarchie.

Tumorzellen mit Stammeigenschaften sorgen für die Tumorentwicklung/ Propagierung. Ähnlich wie normale Stammzellen besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung in verschiedenartige Zellen. Die Tumorerheterogenität wird durch die Differenzierungsfähigkeit und die Hierarchie erklärt (Galli et al. 2004; Galderisi et al. 2006, S. 6; Kondo 2006, S. 1238).

Aus dem kleinen Pool der omnipotenziellen BTICs rekrutiert sich über multipotenzielle Vorläuferzellen, welche noch teilweise BTIC-Eigenschaften besitzen, letztendlich die Masse der determinierten differenzierten Tumorzellen, welche keine BTIC-Eigenschaften mehr besitzen (Potten 1997a, b).

Diese einzigartigen Merkmale unterscheiden BTICs von anderen Tumorzellpopulationen und deuten darauf hin, dass verbliebene BTICs hauptverantwortlich für die Rezidiventstehung nach zytotoxischer Therapie und Bestrahlung sein könnten (Bao et al. 2006; Fukushima et al. 2009).

I.6.3 Klinische Folgen der GBM-Stammzellhypothese

Diese Erkenntnisse über die GBM-Stammzellpopulationen und deren Eigenschaften sind für die Entwicklung neuer effizienterer Therapien von Bedeutung (Reya et al. 2001). Das Standard-GBM-Therapieschema bestehend aus einer operativen Tumorentfernung kombiniert mit einer Strahlentherapie ist mit hohen Rezidivraten verbunden, welche u. a. wahrscheinlich auch teilweise auf die Strahlenresistenz der stammzellähnlichen BTICs zurückzuführen sind (Bao et al. 2006; Rich 2007; Omay und Vogelbaum 2009).

Auch bei der Chemoresistenz (auf z. B. Temozolomid) spielen stammzellähnliche BTICs eine besondere Rolle, während Non-BTICs empfindlicher auf zytotoxische Behandlungen reagieren sollen (Fukushima et al. 2009; Riemenschneider und Reifenberger 2009). Die Mechanismen, welche der Radio- und Chemotherapieresistenz der BTICs zugrunde liegen, sind größtenteils immer noch unbekannt (Bao et al. 2006; Fukushima et al. 2009). Jedoch besteht der Verdacht, dass DNA-Reparaturmechanismen eine entscheidende Rolle spielen könnten. So wird vermutet, dass in stammzellähnlichen BTICs die Effizienz, mit der erworbene DNA-Schäden repariert werden können, höher ist als in den übrigen Tumorzellen (Bao et al. 2006). Die klinische Konsequenz dieser Hypothese besteht darin, dass die BTICs den zentralen Angriffspunkt in der GBM-Therapie darstellen sollten (Bao et al. 2006; Fukushima et al. 2009).

Für die Entwicklung einer effizienten Therapie ist es wichtig, die stammzellähnlichen BTICs von differenzierten GBM-Zellen zu unterscheiden. Seit einiger Zeit steht der Zellmarker CD133 als BTIC-Marker zur Diskussion, da er in Tumorzellen mit stammzellähnlichen BTIC-Eigenschaften nachgewiesen wurde (Singh et al. 2004).

Allerdings zeigen neuere Ergebnisse, dass auch CD133-negative Tumorzellen stammzellähnliche Eigenschaften haben können (Beier et al. 2007; Wang et al. 2008).

I.7 Experimentelle Modelle zur Isolierung und Charakterisierung von GBM-Zellen

Neben den funktionellen und morphologischen Unterschieden zwischen BTICs, Vorläuferzellen und differenzierten Tumorzellen bleibt die Frage offen, ob sich diese Tumorzellpopulationen auch zytogenetisch unterscheiden und ob diese Unterschiede in Rezidivtumoren oder nach Strahlentherapie fortbestehen oder sich verändern. Um diese Frage beantworten zu können, spielt die Wahl des experimentellen Modells/ Materials eine wichtige Rolle. Im Rahmen von Forschungsarbeiten können GBM-Zellen, z. B. aus Primärkulturen oder aber aus standardisierten GBM-Zelllinien als experimentelles Modell/ Material verwendet werden (Lee J et al. 2006). Jede dieser Möglichkeiten hat Vor- und Nachteile (Lee J et al. 2006; Kondo 2006).

I.7.1 Tumorbiopsie

Die Tumorbiopsie nativ oder nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung eignet sich zur phänotypischen und genotypischen Charakterisierung mittels konventioneller histologischer, immunhistologischer und molekulargenetischer Techniken. Der Vorteil der unmittelbaren und direkten Untersuchung des Tumormaterials ist die Möglichkeit, den Tumor in seiner ursprünglichsten Form zu untersuchen. Die paraffinierten Tumorblöcke sind des Weiteren unbegrenzt lagerbar und jederzeit wieder verfügbar. Die Tumorbiopsie gehört zum bevorzugten Material in der histopathologischen Diagnostik. Zum Nachteil der Tumorbiopsie gehört, dass Untersuchungen nur zu einem Querschnitt in der Tumorentwicklung und nur sehr eingeschränkt funktionelle Längsschnittuntersuchungen möglich sind, da Verlaufsbiopsien oder Material aus Rezidivtumoren nach Therapie nur selten zur Verfügung stehen. Dieses Problem wird besonders in der multizentrischen TCGA-Studie (The Cancer Genome Atlas Research Network) deutlich, der größten Studie, die bisher zum GBM durchgeführt wurde. Bei einer Fallzahl von 206 GBM stand nur in 21 Fällen eine zweite Biopsie

nach den Therapiemaßnahmen zur Verfügung. Das heißt, dass lediglich in 10 % der Fälle eine Längsschnittuntersuchung von Tumoren möglich war (TCGA 2008).

I.7.2 Zellkultur

Tumorzellen können auch aus nativen Gewebeproben nach Herauslösung aus ihrem Gewebsverbund unter *in-vitro*-Bedingungen in Kulturflaschen mit speziellen Nährlösungen kultiviert werden. So sind die Tumorzellen in der Lage sich *in vitro* zu vermehren. Je nachdem über wie viele Generationen die Zellkulturen sich passagieren lassen, handelt es sich um Primärkulturen oder um immortalisierte Zelllinien (Schmitz 2009).

Die Zellkultur bietet die Möglichkeit unter experimentellen Bedingungen die weiteren Entwicklungen und Reaktionen der Tumorzellen, z.B. in Bezug auf Therapieverfahren zu untersuchen (Bao et al. 2006). Ebenfalls erlaubt die Zellkultur, durch Klonierung Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb eines heterogenen Tumors zu isolieren und zu untersuchen (Singh et al. 2004; Galli et al. 2004). Dieser Vorteil ist besonders für die Analyse von kleinen Subpopulationen innerhalb eines Tumors wichtig, wie z.B. den BTICs, deren Anteil in unterschiedlichen Studien auf zwischen 3 bis 5 % der Tumormasse geschätzt wird (Yuan et al. 2004). Mit Hilfe der Zellkultur besteht die Möglichkeit tumorigene Populationen zu isolieren und ihre Eigenschaften gezielt weiter zu untersuchen (Singh et al. 2004; Galli et al. 2004). Deshalb sind Zellkulturen ein wichtiges experimentelles Modell zur Erforschung von GBM-Subpopulationen.

Des Weiteren können an Zellkulturen mögliche Therapien und ihre zellulären Auswirkungen getestet werden. Welche Relevanz die Erforschung dieses Bereiches hat verdeutlicht die TCGA-Studie. Dort zeigten sich nämlich zwischen erstdiagnostizierten GBM und den Rezidiven deutliche Unterschiede in Bezug auf genetische Mutationsraten (TCGA 2008). Ein Nachteil von kultivierten Zellen ist, dass unter Zellkulturbedingungen selbst Veränderungen induziert werden können (Li et al. 2008).

Primärkultur

Bei der Anzucht einer Primärkultur erfolgt die Kultivierung der Zellen wie oben beschrieben direkt aus einem OP-Präparat (Präve et al. 1994; Schmitz 2009). Bis zur ersten Subkultivierung (d. h. Kultivierung von Tochterzellen) wird die Kultur als

Primärkultur bezeichnet. Alle Nachfolgenergenerationen sind Subkulturen (Schmitz 2009).

Kultivierungsinduzierte phänotypische oder genotypische Veränderungen sind aufgrund der kürzeren *in-vitro*-Kultivierungsdauer weniger häufig in Primärkulturen anzutreffen als in Zelllinien (Li et al. 2008). Allerdings haben Primärkulturen den Nachteil, dass sie sich nur zeitlich begrenzt *in vitro* halten lassen und aus einer Mischung unterschiedlicher Zellpopulationen bestehen (Präve et al. 1994). Eine eindeutige Isolierung und längerfristige Untersuchung bestimmter Zelltypen (BTICs, Non-BTICs, Gliazellen, endotheliale Zellen) ist nur schwer möglich.

Zelllinien

Zelllinien sind immortalisierte, klonal expandierte Zellpopulationen monoklonalen Ursprungs, die theoretisch unbegrenzt verfügbar, und unter *in-vitro*-Bedingungen länger standardisiert haltbar sind, als Primärkulturen und sich somit für Experimente, welche über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, gut eignen (Präve et al. 1994). Alle Zelllinien sind aus anfänglichen Primärkulturen hervorgegangen (Schmitz 2009). Mit Hilfe spezieller, auf die Bedürfnisse der Tumorzellen angepasster Nährmedien erfolgt eine selektionierte Anzucht (Subkultivierung) von Zelllinien, die aufgrund ihrer Eigenschaften unbegrenzt kultivierbar sind. Zelllinien bieten die Möglichkeit Analysen an standardisierten, genetisch homogenen Zellpopulationen mit definierten Eigenschaften durchzuführen (Präve et al. 1994). Die unbegrenzte Verfügbarkeit und *in-vitro*-Kultivierung der Zelllinien sind für Analysen, welche sich über einen längeren Zeitraum erstrecken ebenfalls vorteilhaft.

Zelllinien als experimentelles Modell haben den Nachteil, dass sie sich unter längerer Passagezeit bei *in-vitro*-Kulturbedingungen in gewissen Eigenschaften verändern können. Zytogenetisch äußert sich das z.B. in komplexen Karyotypen, in denen tumortypspezifische zytogenetische Aberrationen vollends maskiert sein können. So waren einige genetische Aberrationen, wie z. B. Deletionen an Chromosomen 13 und 21 sowie eine Amplifikation an Chromosom 20, welche in Primärkulturen noch nachweisbar waren, nach Langzeitkultivierung nicht mehr identifizierbar (Li et al. 2008). Auch können neue Veränderungen auftreten, wie z.B. eine Amplifikation von Chromosom 5 oder eine Deletion von Chromosom 18, welche nur in Langzeitkulturen von GBM beobachtet worden sind, und eine *in-vitro*-Erscheinung sein sollen

(Li et al. 2008). Ein Großteil genetischer Aberrationen konnte jedoch sowohl in der Primärkultur wie auch in Zelllinien nachgewiesen werden (Li et al. 2008).

I.7.3 Serumhaltige Kulturbedingungen im Vergleich zu serumfreien Kulturbedingungen

Neben diesen allgemeinen Zellkulturaspekten, wird speziell bei GBM intensiv diskutiert, ob konventionelle, serumhaltige Kulturbedingungen für die Kultivierung von BTICs geeignet sind.

Bei der konventionellen Tumorzellkultivierung besteht das Nährmedium der Tumorzellen aus einem basischen Medium z.B. MEM, supplementiert mit fetalem Kälberserum (FCS). Das serumhaltige Medium ist unselektiv und für die Kultivierung von tumorigenen und auch nicht-tumorigenen Zellen geeignet. Im Gegensatz hierzu nutzt die serumfreie Kultivierung ein basisches Medium, z.B. Neurobasal, welches mit Wachstumsfaktoren wie bFGF und EGF supplementiert ist. Diese Wachstumsfaktoren sind für die Selbsterneuerung der NSCs, wie auch für die der BTICs notwendig. Es wurde gefunden, dass die Kulturbedingungen einen maßgeblichen Einfluss auf die Erhaltung von GBM-Zellen haben. Der von Lee J et al. (2006) durchgeführte Vergleich von serumhaltigen und serumfreien Primärkulturen, welche beide aus derselben Tumorprobe generiert worden waren zeigte, dass eine Selektion von Tumorzellen mit charakteristischen BTIC-Eigenschaften nur unter serumfreien Bedingungen, nicht aber unter serumhaltigen Bedingungen möglich ist.

Über die gesamte Passagedauer zeigten die unter serumfreien Bedingungen kultivierten Tumorzellen eine konstante Repräsentation typischer GBM-Charakteristika sowie einen stabilen Karyotyp, mit diploidem Chromosomensatz und Deletionen an 10p und 9 und eine Trisomie 7 mit einer Amplifikation des *EGFR*-Gens.

Des Weiteren waren die serumfreien Primärkulturen (so genannte Neurosphärenkulturen= freischwimmende, rundliche Zellkonglomerate) in der Lage in Mäusen Tumoren zu erzeugen, welche phänotypisch und genotypisch dem Ausgangstumor entsprachen und die pathognomonischen Charakteristika für GBM (wie z. B. infiltratives Wachstum, Migration entlang der weißen Substanz) aufwiesen. Dieses Tumorinduktionspotential, GBM-typischer Tumoren behielten die serumfreien Primärkulturen auch nach der *ex-vivo*-Explantation und erneuter serumfreier Kultivierung bei. Überführte man nun diese aus serumfreien Primärkulturen

stammenden Tumorzellen in serumhaltige Kulturbedingungen, zeigte sich eine Differenzierungsfähigkeit in multiple Zelltypen (glial, neuronal).

Im Gegensatz dazu wurde bei Lee J et al. (2006) in den serumhaltigen Primärkulturen eine heterogene Morphologie, eine mit der Passagenummer abnehmende Proliferationsrate sowie eine Expression von Oberflächenmarkern differenzierter, glialer und neuronaler Zellen beobachtet. Sie waren weder in der Lage in Mäusen Tumoren zu induzieren noch sich in andere Zellen zu differenzieren. Außerdem wiesen diese Zellen einen instabilen Karyotyp mit einem triploiden oder tetraploiden Chromosomensatz auf. Weiter wurde bei Lee J et al. (2006) gezeigt, dass serumhaltige Primärkulturen in einer anschließenden Überführung in serumfreie Kulturbedingungen nicht in der Lage waren zu überleben und zu proliferieren (Lee J et al. 2006). Ähnliche Versuche wurden auch mit etablierten GBM-Zelllinien (U87, U251) durchgeführt (Galli et al 2004; Lee J et al. 2006). Die dabei verwendeten GBM-Zelllinien U87 und U251 zeigten ähnliche Eigenschaften wie die unter serumhaltigen Bedingungen kultivierte Primärkultur. Aufgrund dieser Ergebnisse wird generell angenommen, dass serumhaltige Kulturbedingungen zu einem Wandel innerhalb der Tumorzellpopulation (von BTICs zu differenzierten Tumorzellen) führen, welcher später durch serumfreie Kultivierung nicht rückgängig gemacht werden könne (Lee J et al. 2006). Daher wird die Relevanz experimenteller Modelle, welche konventionell etablierte GBM-Zelllinien verwenden in Frage gestellt (Galli et al 2004; Lee J et al. 2006). Einer der Hauptkritikpunkte ist, dass viele unter serumhaltigen Bedingungen etablierte GBM-Zelllinien entweder keine Tumorinduktionsfähigkeit besitzen oder Tumoren generieren, die kaum dem menschlichen GBM ähneln (Lee J et al. 2006; Li et al. 2008). Ein weiterer Kritikpunkt ist der Mangel an, mittels CGH nachgewiesenen, gliomcharakteristischen, chromosomalen Aberrationen (wie z. B. Amplifikationen an Chromosom 7, 20 und 21) in einigen unter serumhaltigen Bedingungen gehaltene GBM-Zelllinien, welche jedoch atypische genetische Veränderungen zeigen (Li et al. 2008).

In Gegensatz zu dieser weit verbreiteten Meinung, haben andere Studien gezeigt, dass stammzellähnliche GBM-Zellen sehr wohl auch aus konventionellen, unter serumhaltigen Bedingungen etablierten GBM-Zelllinien gewonnen werden können (Kondo et al. 2004) und sie in serumfreien Medien kultiviert werden können (Kondo et al. 2004; Phillips et al. 2006; Tso et al. 2006) und, dass Tumorzellen mit stammzellähnlichen BTIC-Eigenschaften, welche initial aus serumfreien

Primärkulturen gewonnen wurden ihre stammzellähnlichen Eigenschaften auch nach dem Transfer in serumhaltige Kulturbedingungen beibehalten (deCarvalho et al. 2010). Der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen, dass manche konventionellen Zelllinien ihre GBM-typischen, tumorstammzellähnlichen Eigenschaften behalten während andere Zelllinien sie unter konventionellen Kulturbedingungen verlieren bleibt unbekannt. Ein Problem ist, dass verschiedene Studien unterschiedliche Zelllinien verwendet haben oder, dass die in diversen Studien verwendeten individuellen Primärkulturen einen Vergleich der unterschiedlichen Studienergebnisse erschweren. Eine mögliche Erklärung für den, in einigen GBM-Zelllinien beobachteten fehlenden Nachweis an BTIC-Eigenschaften, könnte die Vermutung sein, dass es sich dabei um die individuellen Eigenschaften der jeweiligen Zelllinien handelt und kein generelles Phänomen aller Zelllinien darstellt.

Generell gilt jedoch die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung unter serumfreien, stammzellähnlichen Bedingungen als ein Surrogatparameter für BTICs, und Vorläuferzellen (Potten 1997a, b; Yuan et al. 2004; Kondo et al. 2004; Panagiotakos und Tabar 2007; Azari et al. 2011).

I.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen gelang, ähnlich wie Kondo et al. 2004 der Nachweis tumorstammzellähnlicher Eigenschaften in einer konventionell kultivierten GBM-Zelllinie, ein weiterer Hinweis, dass Tumorzellen mit BTIC-Eigenschaften auch unter serumhaltigen Bedingungen persistieren können. In dieser GBM-Zelllinie, genannt G112, konnte die Arbeitsgruppe Neuroonkologie unter Prof. Dr. med A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim verschiedene Tumorzellpopulationen beobachten, welche sich funktionell und auch morphologisch voneinander unterschieden. Während eine Population BTIC-Eigenschaften besaß, konnten diese Eigenschaften in einer anderen Population nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob sich die unterschiedlichen Populationen neben den funktionellen und morphologischen

Unterschieden, wie sie in der GBM-Stammzellhypothese dargestellt werden, auch zytogenetisch voneinander unterscheiden.

Folgende Fragen werden in der vorliegenden Arbeit behandelt:

- **Ist die konventionell kultivierte GBM-Zelllinie G112 zytogenetisch heterogen und kann mit der Identifizierung von verschiedenen Klonen, das Konzept der GBM-Stammzellhypothese (Nebeneinander von BTICs, Vorläuferzellen und differenzierten Tumorzellen) bestätigt werden?**
- **Sind serumfreie, stammzellähnliche Bedingungen selektiv für einen bestimmten Klon?**
- **Unterscheiden sich die eventuell identifizierten verschiedenen Klone in ihrer Tumorinduktionsfähigkeit?**
- **Welchen Effekt hat Bestrahlung auf eventuell identifizierbare Klone in G112?**

II. Material und Methode

II.1 Zellkultur

GBM-Zelllinie G112 als experimentelles Modell für BTICs.

Für die Untersuchung wurde die GBM-Zelllinie G112 verwendet. Es handelt sich hier um eine, aus einem GBM eines 57 jährigen Mannes etablierte und unter serumhaltigen Bedingungen kultivierte Zelllinie (Westphal et al. 1994). Neben den in G112 beobachteten morphologisch typischen GBM-Charakteristika gibt es auch Hinweise, dass die Zelllinie G112 auch Zellen mit tumorstammzellähnlichen Eigenschaften enthalten könnte (Phillips et al. 2006). Eine charakteristische Eigenschaft der BTICs, aber auch der Vorläuferzellen ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung unter serumfreien, stammzellähnlichen Kulturbedingungen als Neurosphären (Potten 1997a, b; Ignatova et al. 2002; Panagiotakos und Tabar 2007). Die Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen unter Prof. Dr. med. A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim generierte unter serumfreien Bedingungen aus **G112** eine Neurosphärenkultur, genannt **G112-NB (siehe Abbildung 4 und 6)** und untersuchte diese auf Tumorigenität und Bestrahlungseffekte *in vitro*, *in vivo* in Mäusen und *ex vivo* (**siehe Tabelle 2, Abbildung 6**).

Im weiteren Verlauf wurde G112-NB nach 20 Passagen zurück in konventionelle, serumhaltige Kulturbedingungen überführt, genannt **G112-NB_{back-to-FCS}**. Es konnten in G112-NB weitere stammzellähnliche BTIC-Eigenschaften beobachtet werden. So zeigte sich, dass G112-NB-Kulturen, welche in Passage 8 intrakraniell implantiert worden waren, die Fähigkeit besaßen, unter experimentellen *in-vivo*-Bedingungen, im orthotopic-glioma-mouse-model (Nu/Nu NMRI, Charles River) GBM-typische Tumore zu generieren. Diese explantierten Tumore wurden als *ex-vivo*-Kultur, **G112-NB/KE52** benannt. Nach 30 Passagen von G112-NB/KE52 unter konventionellen, serumhaltigen Bedingungen erfolgte die Überführung in stammzellähnliche, serumfreie Bedingungen. Es zeigte sich so, dass die *ex-vivo*-Kultur die BTIC-Eigenschaft der Neurosphärogenierung beibehalten hat. Die auf diesem Wege entstandene Neurosphärenkultur wurde **G112-NB/KE52_{back-to-NB}** genannt.

Aufgrund der Tatsache, dass GBM-Rezidive häufig strahlenresistent sind, und aufgrund der Vermutung, dass Tumorzellen mit BTIC-Eigenschaften für diese Radioresistenz verantwortlich sein könnten (Bao et al. 2006), untersuchte die

Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen in Zusammenarbeit mit der Abteilung Strahlentherapie der Universitätsklinik Göttingen unter Prof. Dr. Dr. C. F. Hess und Dipl. biolog. M. Rave-Fränk die Radioresistenz von G112-NB. Dafür wurden G112-NB-Kulturen unter *in-vitro*-Bedingungen ab Passage 8 mit jeweils 2,5 Gray pro folgende Passage über 7 Passagen bestrahlt. Diese Zellen wurden **G112-NB/IR** genannt, die unbestrahlten Passagen wurden mit den bestrahlten Passagen addiert (also Passage 15). Aufgrund dieser Zusammenarbeit konnten radioresistente Populationen isoliert werden (**siehe Abbildung 5**).

Um die Radioresistenz dieser G112-NB-Zellen unter realitätsnäheren Bedingungen zu untersuchen erfolgte durch die Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen unter Prof. Dr. med. A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim eine intrakranielle Implantation von G112-NB-Kulturen von Passage 8 in Mäusehirnen und nach deren Tumorgenerierung unter Prof. Dr. Dr. C. F. Hess und Dipl. biolog. M. Rave-Fränk eine intrakranielle *in-vivo*-Bestrahlung der Tumoren (6 Wochen nach der Implantation *in vivo* mit 2,5 Gray pro Tag an 6 aufeinander folgenden Tagen bestrahlt). Anschließend wurden die Tumore explantiert und unter konventionellen, serumhaltigen Bedingungen über 11 Passagen kultiviert. Diese Kulturen wurden als **G112-NB/IR/KE63** bezeichnet.

Nach der *in-vitro*-Bestrahlung von G112-NB/IR stellte sich die Frage, ob diese Zellen immer noch in der Lage sind Tumore in Mäusen zu induzieren. Um dieser Frage nachzugehen wurden die *in vitro* bestrahlten Zellen (G112-NB/IR) ebenfalls in Mäuse implantiert. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Mäuse in die G112-NB/IR oder in die nichtbestrahlte G112-NB implantiert wurden (n=4 in jeder Gruppe) intrakranielle Tumore entwickelten, bei einer Tumorinduktionsrate von 100%. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass eine repetitive Bestrahlung nicht das tumorigene Potenzial in G112-NB/IR Zellen mindert bzw. zerstört.

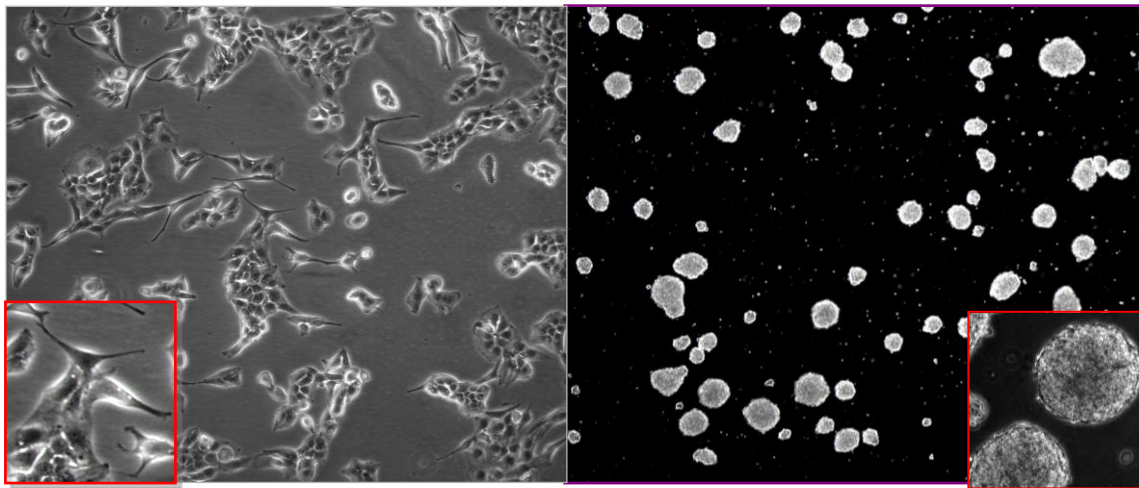
Anschließend wurde wie bei G112-NB/IR/KE63 eine intrakranielle, *in-vivo*-Bestrahlung der Tumore durchgeführt (6 Wochen nach der Implantation *in vivo* mit 2,5 Gray pro Tag an 6 aufeinander folgenden Tagen bestrahlt). Danach erfolgte wieder die Explantation der Tumoren sowie deren Kultivierung unter konventionellen, serumhaltigen Bedingungen über 10 Passagen. Die so entstandene Population wurde als **G112-NB/IR_{in-vitro+in-vivo}/KE62** bezeichnet.

In Kooperation mit der Neuroonkologischen Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. A. Giese, Dr. rer. nat. habil. E. Kim) der Abteilung Neurochirurgie des Universitätsklinikums Göttingen wurden G112 selbst sowie mehrere, unter verschiedenen Bedingungen kultivierte Subklone von G112 zytogenetisch untersucht (**siehe Tabelle 2, Abbildung 6**).

Die für die vorliegenden Arbeit durchgeführten zytogenetischen Untersuchungen der Zelllinie G112 und der G112-Subklone (**Tabelle 2, Abbildung 6**) erfolgten im Rahmen des Kooperationsprojektes in der Abteilung Gastroenteropathologie, des Zentrums Pathologie und Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Göttingen. Die intrakraniellen Implantationen, Explantation und anschließenden Kultivierungen der Tumorzellen aus den experimentellen Tumoren wurden in der Neuroonkologischen Arbeitsgruppe der Abteilung Neurochirurgie des Universitätsklinikums Göttingen durchgeführt. Die Bestrahlung der experimentellen Tumoren oblag der Abteilung Strahlentherapie des Universitätsklinikums Göttingen unter Prof. Dr. Dr. C. F. Hess und Dipl. biolog. M. Rave-Fränk.

Die folgenden Nährmedien wurden für die Zellkultivierung verwendet:

- (D-MEM) Dulbeccos Modified Eagle Medium (GIBCO BRL; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mit zusätzlicher Gabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, GIBCO BRL; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) als serumhaltiges Medium.
- Neurobasal Medium mit B27-Supplement (GIBCO BRL; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und zusätzlicher Gabe von Zytokinen EGF (20ng/ml) und FGF (10ng/ml) und 0,1 % BSA (Biochrom KG Seromed, Berlin, Deutschland) als serumfreies Medium.



**Serumhaltige Zelllinie G112
Passage 187**

**Serumfreie Neurosphärenzeilenlinie
G112-NB, Passage 14**

Abbildung 4. Neurosphäregenerierung aus der konventionell, serumhaltig kultivierten G112-Zelllinie nach Überführung in stammzellähnliche, serumfreie Bedingungen (Neuroonkologische Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. A. Giese, Dr. rer. nat. habil. E. Kim) der Abteilung Neurochirurgie des Universitätsklinikums Göttingen).

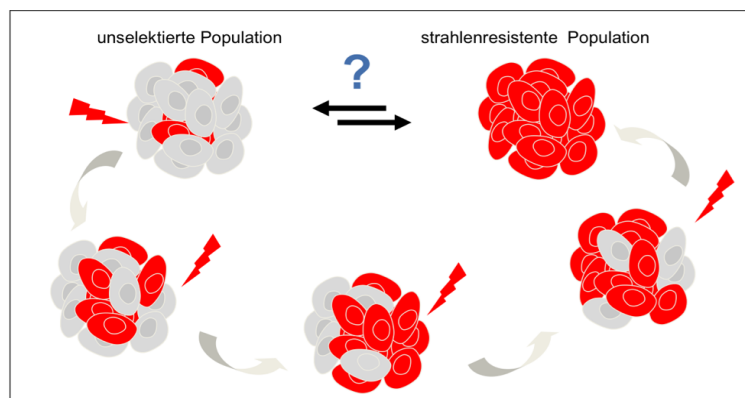


Abbildung 5. Isolierung radioresistenter Populationen aus G112-NB-Neurosphären (Neuroonkologische Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. A. Giese, Dr. rer. nat. habil. E. Kim) der Abteilung Neurochirurgie des Universitätsklinikums Göttingen).

II.2 Zytogenetik

Metaphasenpräparation der Zelllinien.

Nach der Aussetzzeit (Zeit zwischen dem Aussetzen der abgezählten Zellen in 25 cm² Flaschen und der Colchizinzugabe) wurden 3 Tropfen 0,1 µg/ml Colchizin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben und die Zellen anschließend für 5 h- 18 h im Brutschrank inkubiert, um die Zellproliferation zu stoppen. Die als Monolayer am Zellkulturflaschenboden gewachsenen Zellen wurden durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lsg (1:250), (GIBCO BRL., Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und zweiminütiger Inkubation im Brutschrank gelöst, mit dem Überstand im Zentrifugenröhrchen (10 ml Fassungsvermögen) ab gespült, suspendiert und die Zellsuspension in das Röhrchen rücküberführt. Im Anschluss an eine 8 minütige Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge bei 1000 Umdrehungen/Minute wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet kräftig aufgelockert und die Zellen mittels Zugabe von 10 ml KCl-Lösung (0,075 M) (Merck, Darmstadt, Deutschland) hypotonisiert (Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur). Nach Ablauf der Hypotonisation wurde erneut zentrifugiert, für 8 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Min (r.p.m.) und der Überstand abpipettiert. Um Chromosomenversprengungen zu vermeiden wurde das Pellet möglichst schonend aufgelockert und in Methanol/Essigsäure (Verhältnis 3:1) (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Nach einer Aufbewahrung für ca. 24 h bei +4°C wurde die fixierte Zellsuspension zentrifugiert (8 min bei 1.000 rpm), der Überstand abpipettiert, das Pellet in 1-2 ml Fixierlösung resuspendiert, und die Zellsuspension auf in Alkohol entfettete und mit Aqua dest. benetzte Objektträger ausgetropft. Nach einer Trocknung der Objektträger bei ca. 60°C für 45 Minuten auf einer Heizplatte wurden die Metaphasenpräparate mit Hilfe von DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol)(2,5 µg/ml) und Actinomycin-D-Mannitol (12,5 µg/ml) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)(1 ml) angefärbt. Die Fotodokumentation geeigneter repräsentativer Metaphasen erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axio Imager M1 von Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit installierter CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) bei 882 facher Vergrößerung. Die anschließende Karyotypisierung erfolgte unter Verwendung einer Karyotypisierungs-Software (Metasystems, Altusheim, Deutschland). Dabei wurden pro Untersuchung um die 10 Metaphasen ausgewertet und vollständig karyotypisiert, entsprechend der aktuellen

Internationalen Nomenklatur (ISCN 2005) (Shaffer und Tommerup 2005).

II.3 Tierexperimente

Bezüglich der Tierexperimente der Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie des Universitätsklinikums Göttingen unter Prof. Dr. med. A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim wurden alle Verfahren gemäß den Richtlinien des Tierschutzes angewendet. Für die intrakranielle Implantation wurden Zellsuspensionen aus Neurosphärenkulturen verwendet. Vorher wurden die Zellen mittels Trypsin vereinzelt, gewaschen und in sterilen PBS-Puffer ($0,5 \times 10^5$ Zellen / Mikroliter) resuspendiert. Die Zellvitalität wurde mit einer Trypanblau-Anfärbung überprüft. Des Weiteren wurden die Mäuse vor der Implantation der Zellen narkotisiert (durch intraperitoneale Injektion von Avertin (0,1 ml/10g Gewicht) und in ein stereotaktisches System eingespannt. Die Zellen wurden in die rechte Hemisphäre, im Caudato- und Putamen-Bereich injiziert. Für die lokale Bestrahlung wurden die Mäuse ebenfalls narkotisiert (0,05 ml/10g Gewicht) Die *in-vivo*-Bestrahlung der Tumore erfolgte 6 Wochen nach der Implantation *in vivo* mit 2,5 Gray pro Tag, über 6 Tage in Kooperation mit der Abteilung Strahlentherapie des Universitätsklinikums Göttingen unter Prof. Dr. Dr. C. F. Hess und Dipl. biolog. M. Rave-Fränk. Die Tiere wurden täglich beobachtet. Bei Anzeichen von neurologischen Symptomen wurden sie durch eine letale Dosis des Anästhetikums Avertin (als intraperitoneale Injektion) getötet. Die Tumorzellen wurden aus tumorhaltigen Gehirnen explantiert und unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert.

II.4 Übersicht der bearbeiteten Zelllinien

	Zelllinie	Ursprung	Abbildung	Referenz
1.	G112	Primärkultur aus OP-Präparat (57 Jahre alter Mann, GBM im rechten Temporallappen) und über 187 Passagen konventionell kultiviert	6	Westphal et al. 1994 Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
2.	G112-NB*	Aus Zelllinie G112 nach Passage 187 überführt in serumfreie Stammzellbedingungen (in Neurobasalmedium) und Kultivierung über 23 Passagen	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
3.	G112-NB/IR*	Aus G112-NB Passage 8, in den nachfolgenden 7 Passagen je 1x pro Passage mit je 2,5 Gray bestrahlt (insgesamt 7x2,5 Gray). Alter dieser Kultur: Passage 15	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
4.	G112-NB _{back-to-FCS}	Aus G112-NB Passage 20, wurde unter Serum-Bedingungen (mit FCS) über 16 Passagen als Monolayer weiterkultiviert	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
5.	G112-NB/KE52	Kulturen, isoliert aus G112-NB-induzierten Tumoren, die in (NMRI strain) orthotopic-glioma-mouse-model induziert worden sind (durch Implantation von G112-NB-Zellen) und anschließender serumhaltiger <i>ex-vivo</i> -Kultivierung über 30 Passagen	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
7.	G112-NB/KE52 _{back-to-NB}	Kulturen, isoliert aus G112-NB-Tumoren, die in (NMRI strain) orthotopic-glioma-mouse-model induziert worden sind (durch Implantation von G112-NB-Zellen) und anschließender serumhaltiger <i>ex-vivo</i> -Kultivierung über 30 Passagen und folgender serumfreier Kultivierung für 4 Passagen	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen

8.	G112-NB/IR _{in-vitro+in-vivo} /KE62	Kulturen, isoliert aus G112-NB/IR-Tumore, die in (NMRI strain) orthotopic-glioma-mouse-model induziert worden sind (durch Implantation von G112-NB/IR-Zellen), zusätzlich <i>in vivo</i> 6x mit je 2,5 Gray bestrahlt wurden und anschließender serumhaltiger <i>ex-vivo</i> -Kultivierung über 10 Passagen	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen
9.	G112-NB/IR/KE63	Kulturen, isoliert aus G112-NB-Tumoren, die in (NMRI strain) orthotopic-glioma-mouse-model induziert worden sind (durch Implantation von G112-NB-Zellen), zusätzlich <i>in vivo</i> 6x mit je 2,5 Gray bestrahlt wurden und anschließender serumhaltiger <i>ex-vivo</i> -Kultivierung über 11 Passagen	6	Arbeitsgruppe Neuroonkologie Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen

Tabelle 2. Übersicht der bearbeiteten Zelllinien

***NB**= Neurobasal > Zelllinie G112 kultiviert in Neurobasalmedium

***IR**= irradiate > Zelllinie G112-NB 6-7x mit je 2,5 Gray bestrahlt

#KE= *ex-vivo* > *ex-vivo*-G112-Kulturen, isoliert aus G112-Tumoren, die in (NMRI strain) orthotopic-glioma-mouse-model induziert worden sind (durch Implantation von G112- Zellen oder G112-NB-Zellen)

Back-to-FCS= Zellen aus Neurobasalmediumkultur (G112-NB_P20), wurden unter Serum-Bedingungen (mit FCS) über 4 Passagen als Monolayer weiterkultiviert

Back-to-NB= Zellen aus serumhaltigem Medium (G112-NB/KE52_P30), wurden unter Stammzell-Bedingungen über 4 Passagen weiterkultiviert

Zeichenerklärung für Abbildung 6



In vitro: konventionelle, serumhaltige Monolayerkultur



In vitro: stammzellähnliche, serumfreie Neurosphärenkultur

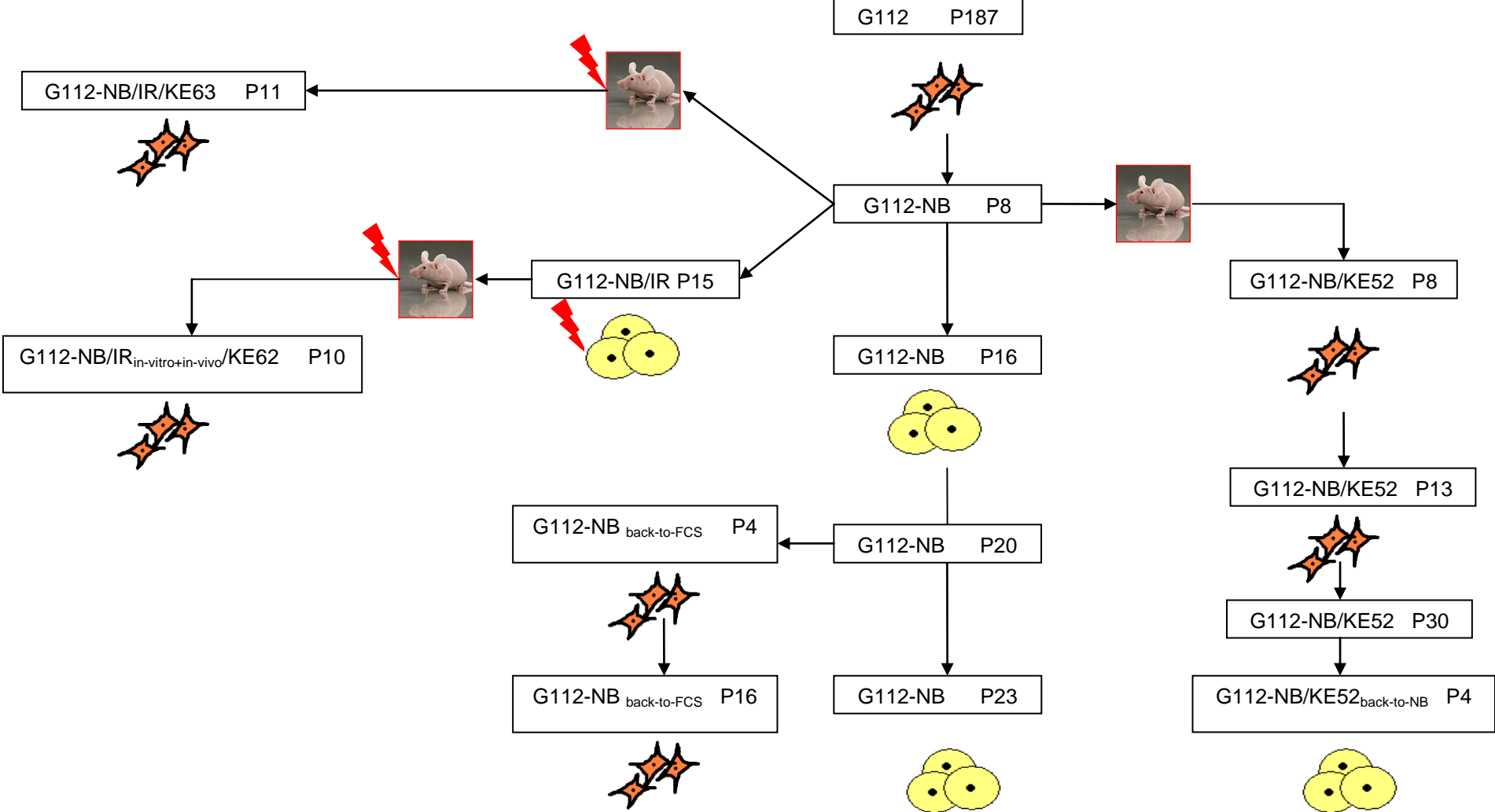


In-vivo-Tumorinduktion in Mäusen und anschließende *ex-vivo*-Kultivierung der explantierten Tumorzellen



Radioaktive Bestrahlung

Abbildung 6. Übersicht der Zelllinien in vitro und in vivo



III. Ergebnisse

III.1 Zytogenetische Charakterisierung von G112

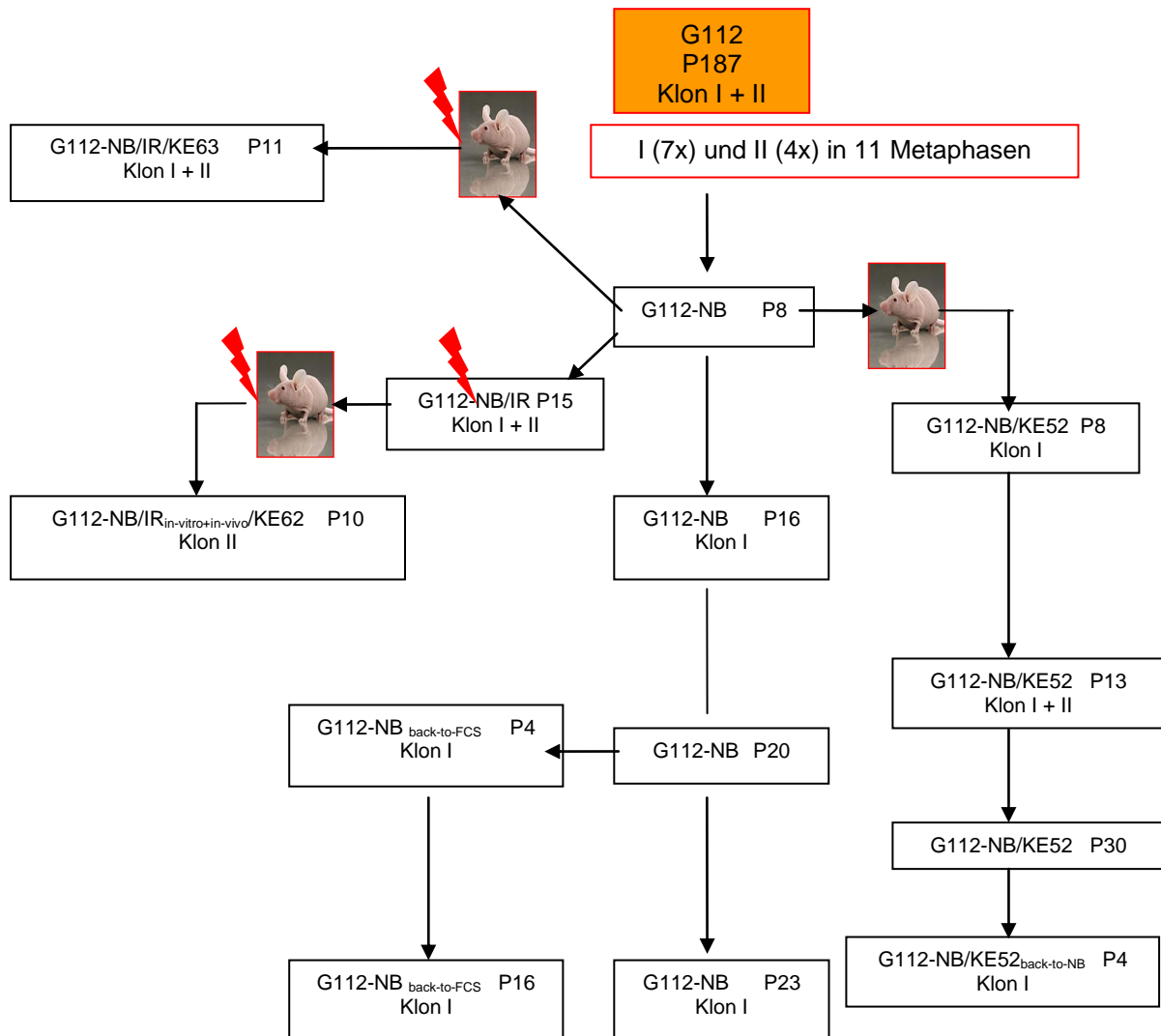


Abbildung 7. Karyotypisierung von G112

Zunächst wurde als Ausgangspunkt die unter serumhaltigen Bedingungen langzeitkultivierte G112-Zelllinie in Passage 187 untersucht. Das Karyogramm der Zelllinie G112 von Westphal et al. (1994) aus der frühen Passage 9 diente der vorliegenden Arbeit als zusätzlicher Abgleich. Der Karyotyp zeigt zwei Klone (Klon I und Klon II), welche in vergleichbaren Proportionen präsent waren (**siehe Tabelle 4 und Abbildung 7 und 8**):

Klon I:

61-63,XX,-X,del(1)(p34),+del(1)(p34),-2,-3,-4,+7,-8,-10,del(10)(p12),-11,-12,-14,-16,add(17)(q25),-18,+21,-22,+mar1,+mar2[cp7]/

Karyotyp von Klon I = idem

Klon II:

59,idem,del(3)(p13),add(7)(q11),-8,-9,-15,-21,+mar3[cp4]

Beide Klone teilen sich viele strukturelle Chromosomenaberrationen, wie z. B. del(1)(p34), del(10)(p12), add(17)(q25) sowie mar1 und mar2, woraus eine enge Verwandtschaftsbeziehung zueinander abgeleitet werden kann. Klon I ist aufgrund der charakteristischen Aberrationen wie die Deletion (1)(p34), die Deletion (10)(p12), der Zugewinn bei (17)(q25) sowie mar1 und mar2 in dieser Arbeit nach zytogenetischen Gesichtspunkten als Stammlinie definiert. Klon II wird als eine verwandte Seitenlinie von Klon I identifiziert. Denn im Gegensatz zu Klon I zeigt Klon II neben den gemeinsamen Aberrationen mit Klon I darüber hinaus zusätzliche Veränderungen, wie unter anderem del(3)(p13), add(7)(q11) sowie einen mar3. Durch diese zusätzlichen Aberrationen kann Klon II als eine verwandte Seitenlinie von Klon I identifiziert werden (**Abbildung 8**). Die leicht zu identifizierenden Klon-II-spezifischen Aberrationen del(3)(p13) und add(7)(q11) wurden in folgenden Untersuchungen zur zweifelsfreien Identifizierung einer Klon-II-Abstammung herangezogen.

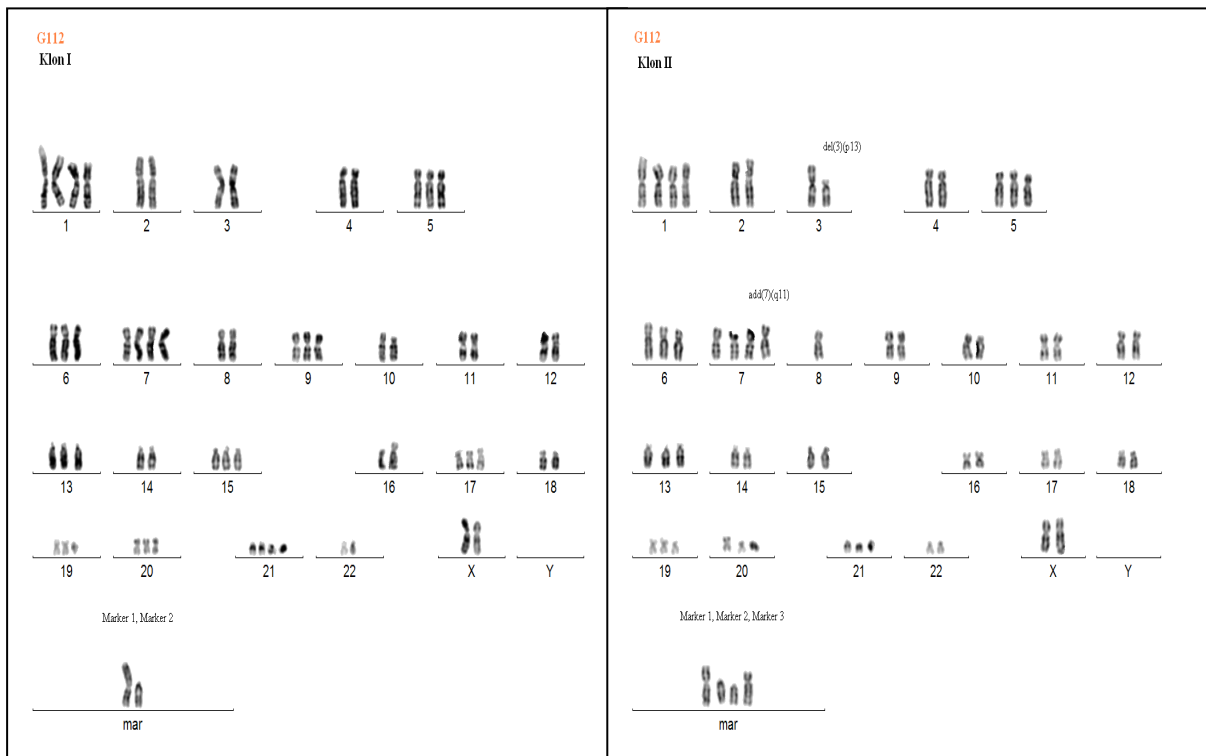


Abbildung 8. Repräsentative Karyogramme von Klon I (links) und Klon II (rechts) identifiziert in G112 Passage 187. Siehe auch Kapitel VI. Anhang VI.2 Karyogramme.

III.2 Zytogenetische Charakterisierung von G112-NB

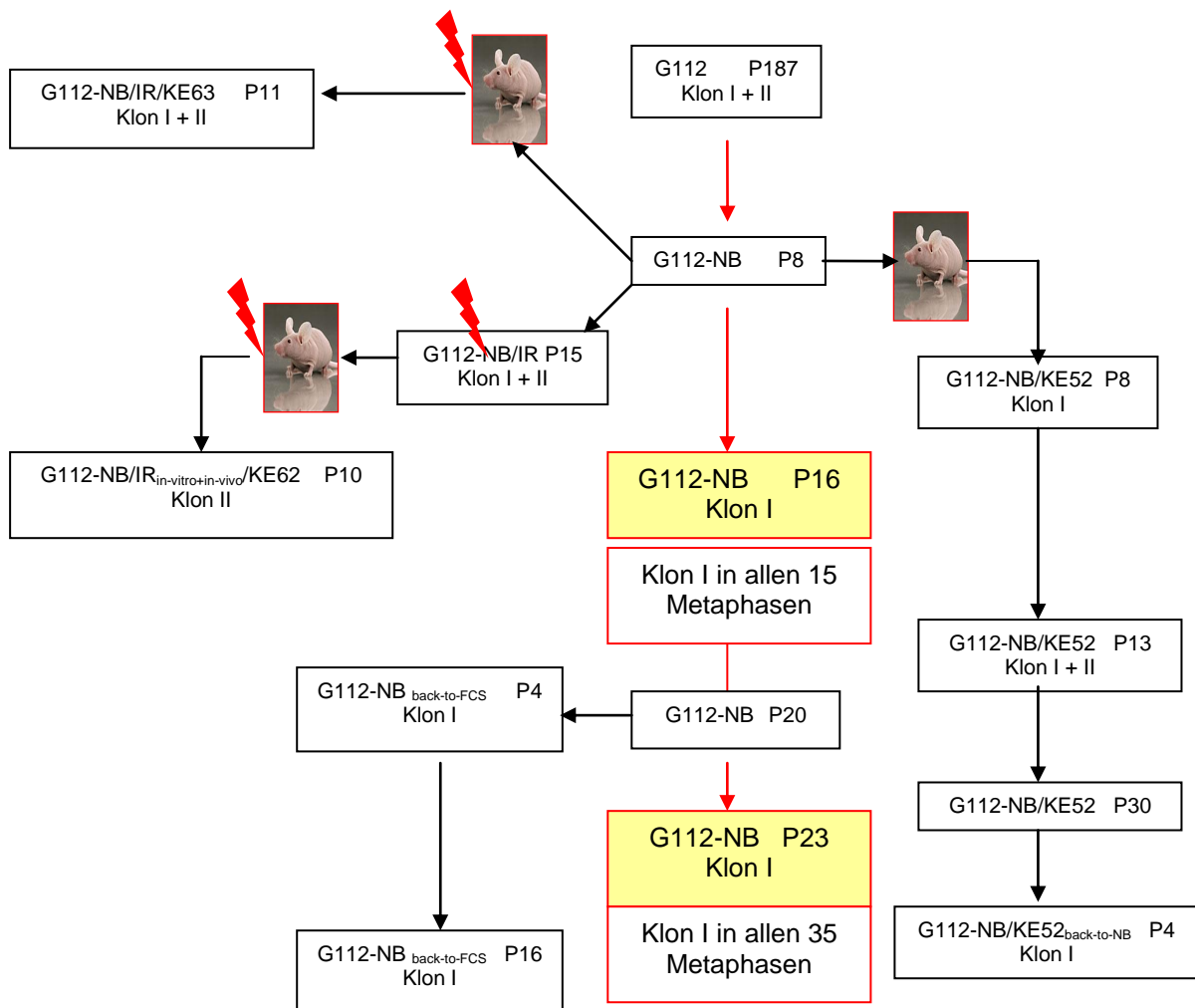


Abbildung 9. Karyotypisierung von G112-NB

Der vorliegende Abschnitt stellt die zytogenetische Analyse der sog. G112-NB-Kultur dar. Hier konnten lediglich die zytogenetisch für Klon I charakteristischen Aberrationen wie die Deletion (1)(p34), die Deletion (10)(p12), der Zugewinn bei (17)(q25) sowie mar1 und mar2 in G112-NB nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Klon-II-charakteristischen Aberrationen wie z. B. die Deletion (3)(p13), der Zugewinn an (7)(q11) sowie mar3 wurden in der Neurosphärenkultur nicht nachgewiesen. Somit besteht in der Neurosphärenkultur eine Dominanz von Zellen mit direkter Abstammung von Klon I. Anhand des Karyotyps ist die Neurosphärenkultur G112-NB in Passage 16 auf die Ausgangszelllinie G112 zurückzuführen. Der im Karyotyp erstmalig sichtbare mar8 stellt eine auf Klon-I-basierende zytogenetische Aberration dar.

Auch in der späteren Passage 23 von G112-NB ließ sich lediglich ein Klon-I-basierter Karyotyp ohne Klon-II-typische Aberrationen nachweisen. Die Anzahl der Passagen sowie die Dauer einer einzelnen Passage (4-6 Wochen) und der damit verbundenen Persistenz der Aberrationen über diese viele Passagen hinweg verdeutlicht die zytogenetische Stabilität der Zelllinie G112. Bezüglich des genetischen Profils zeigten sich in G112-NB zytogenetische Charakteristika, welche ausschließlich Klon I als klonalen Ursprung haben (**Abbildung 9 und Kapitel VI, Karyogramm G112-NB**).

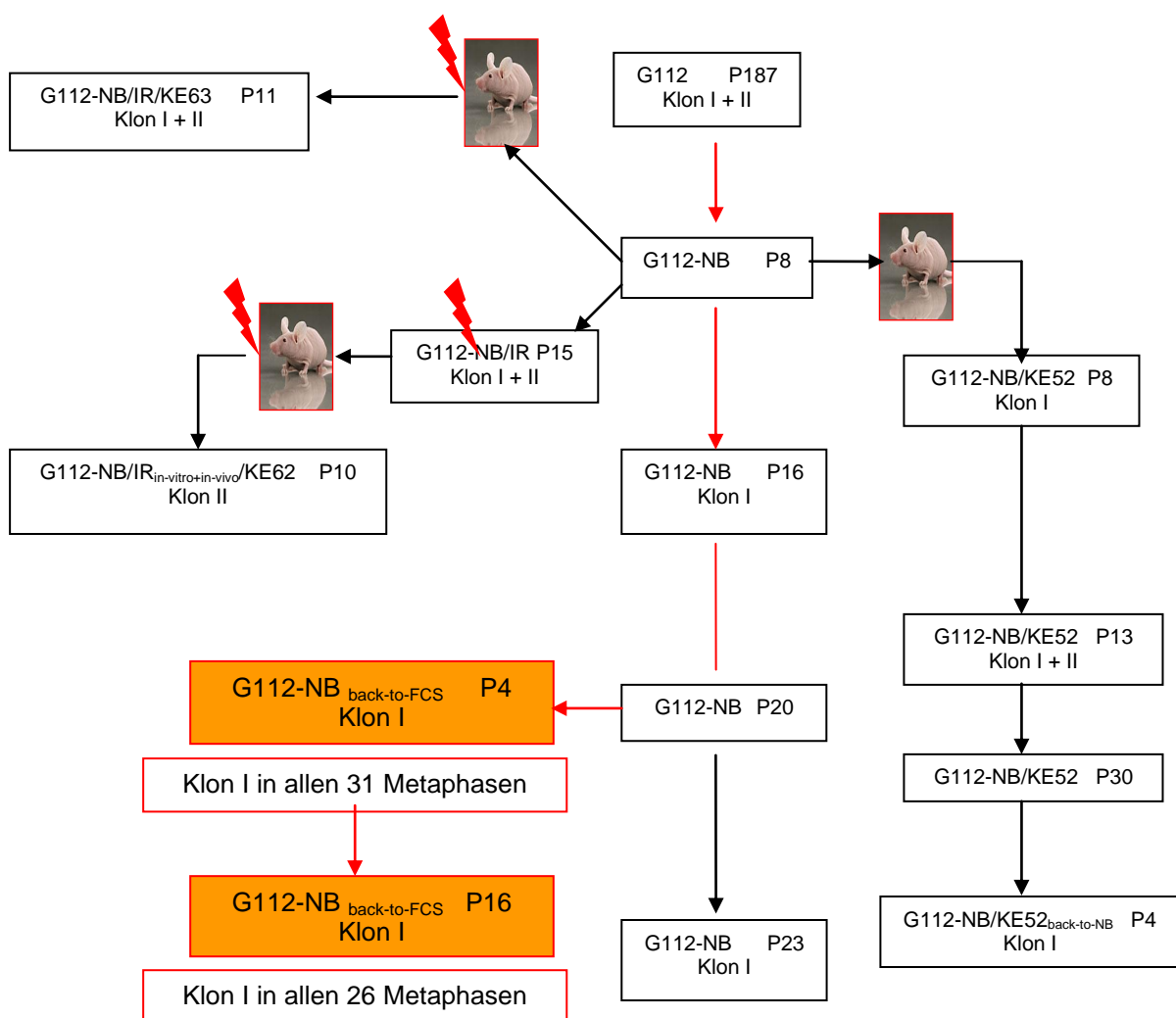


Abbildung 10. Karyotypisierung von G112-NB_{back-to-FCS}

Im folgenden Abschnitt beschreibt die vorliegende Arbeit, ob und inwieweit sich der Karyotyp von G112-NB durch Rekultivierung in serumhaltigem Medium verändert.

Somit wurde G112-NB zurück in serumhaltige Monolayerkulturbedingungen überführt (Seitenlinie G112-NB_{back-to-FCS}). Nach 4 Passagen erfolgte die Karyotypisierung. Auch in diesem Fall waren aufgrund der zytogenetischen Aberrationen wie die Deletion (1)(p34), die Deletion (10)(p12), der Zugewinn bei (17)(q25) sowie mar1 und mar2 ausschließlich Klon-I-typische Aberrationen nachweisbar (**Abbildung 10 und Kapitel VI, Karyogramm G112-NB_{back-to-FCS}**). Eine weitere zytogenetische Analyse in einer fortgeschritteneren Passage (Passage 16) zeigte weiterhin eine isolierte Nachweisbarkeit für Klon-I-charakteristische Aberrationen in G112-NB_{back-to-FCS}, trotz der längeren Rekultivierung (16 Passagen) unter serumhaltigen Bedingungen (**Abbildung 10**). Klon-II-charakteristische Aberrationen wie z. B. die Deletion (3)(p13), der Zugewinn an (7)(q11) sowie mar3 wurden in keiner Passage beobachtet.

III.3 Tumorigenität von G112-Subklonen und zytogenetische Charakterisierung

Neben der Fähigkeit zur Neurosphärenbildung konnte die Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen eine weitere BTIC-Eigenschaft in G112 beobachten. Wie bereits im Kapitel II erwähnt sind G112-NB Kulturen in der Lage unter *in-vivo*-Bedingungen Tumoren zu induzieren.

III.3.1 Zytogenetische Untersuchung tumorigener Zellen

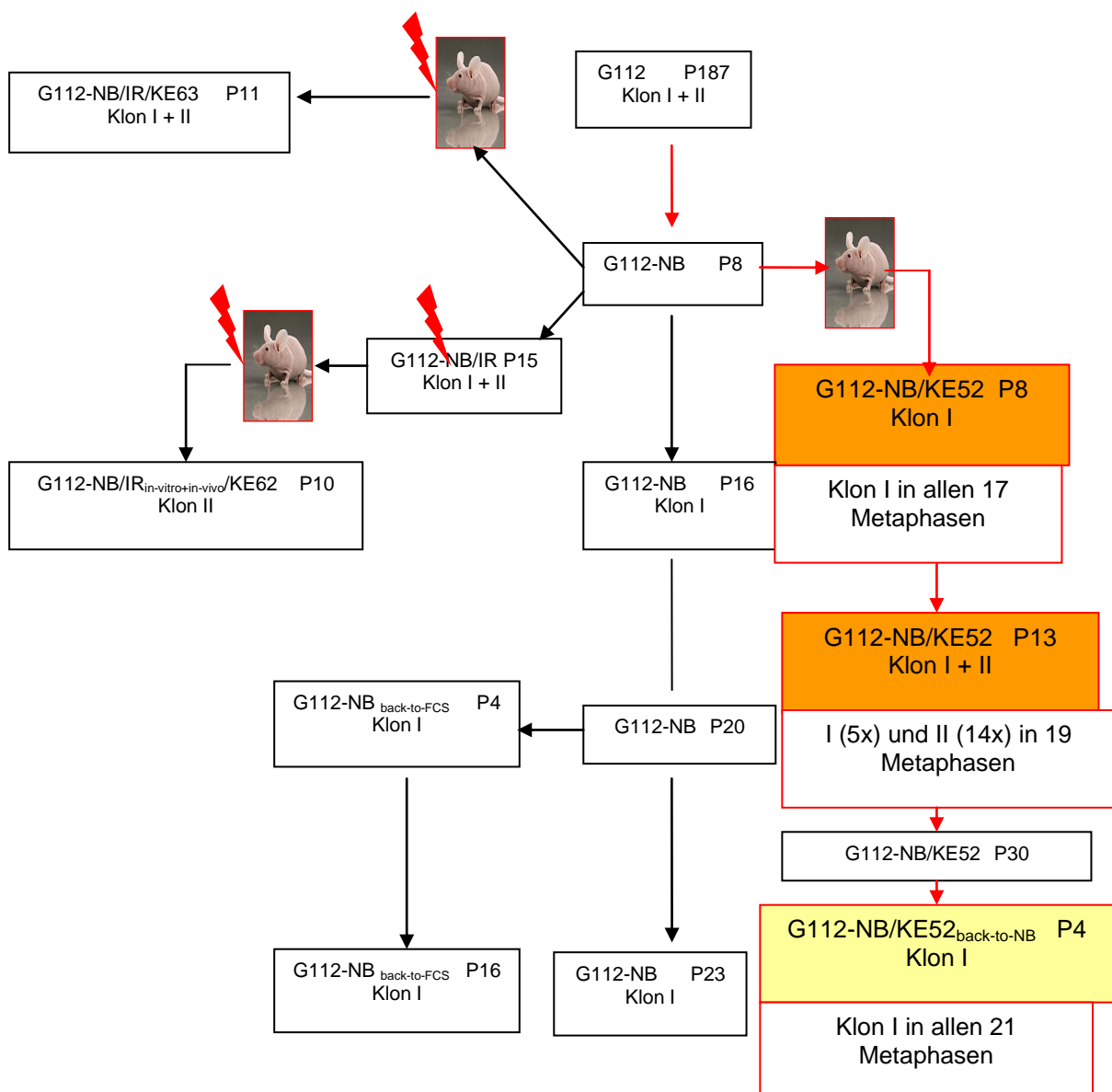


Abbildung 11. Karyotypisierung von G112-NB/KE52 und G112-NB/KE52_{back-to-NB}

Die zytogenetische Charakterisierung der *ex-vivo*-Kultur zeigte in allen untersuchten Metaphasen der Passage 8 keine Klon-II-charakteristischen Aberrationen, wie die Deletion (3)(p13), der Zugewinn an (7)(q11) oder mar3. Es wurden lediglich, mit der Deletion (1)(p34), der Deletion (10)(p12), dem Zugewinn bei (17)(q25) sowie dem mar1 und dem mar2 typische Klon-I-assoziierte Aberrationen nachgewiesen (**Abbildung 11 und Kapitel VI, Karyogramm G112-NB/KE52 p8**). Somit können die explantierten Tumorzellen von G112-NB/KE52 in Passage 8 zytogenetisch auf die implantierten G112-NB Kulturen zurückgeführt werden. In einer späteren Passage (Passage 13) zeigte die G112-NB/KE52-Population eine Rekurrenz und Dominanz einer Zellpopulation mit einem Klon-II-Karyotyp, repräsentiert durch 14 von 19 untersuchten Metaphasen mit Klon-II-typischen Aberrationen wie Deletion (3)(p13), add(7)(q11) und mar3 (**Abbildung 11 und Kapitel VI, Karyogramm G112-NB/KE52 p13**).

Um der Beobachtung nachzugehen wurde G112-NB/KE52 in Passage 30 unter serumhaltiger Kultivierung in serumfreie Neurosphärenbedingungen überführt. Diese Population, genannt G112-NB/KE52_{back-to-NB} zeigte schon nach 4 Passagen in serumfreien Bedingungen erneut eine klare Dominanz einer Zellpopulation mit Klon-I-Karyotyp repräsentiert durch 21 von 21 untersuchten Metaphasen ohne Klon-II-typische Aberrationen (**Abbildung 11 und Kapitel VI, Karyogramm G112-NB/KE52_{back-to-NB}**).

III.4 Effekt der Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB

III.4.1 Zytogenetischer Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten G112-NB-Zellen *in vitro*

Der folgende Abschnitt untersucht, inwieweit radioaktive Bestrahlung eine Auswirkung auf die zytogenetisch nachgewiesenen Klone hat.

Im Gegensatz zu G112-NB, zeigte G112-NB nach Bestrahlung (G112-NB/IR) zytogenetisch neben überwiegend Zellen mit Klon-I-typischem Karyotyp teils mit zusätzlichen, potenziell strahleninduzierten, klonalen Aberrationen (del(1)(p13), t(3;11)(q13;p15), mar9, mar10, sowie Verlusten von Chromosom 9, 19, 21) (**siehe Tabelle 4**), in 2 Metaphasen auch einen Klon-II-typischen Karyotyp (mit add(7)(q11), Verlusten von Chromosom 8, 9, 15, 21) (**Abbildung 12 und Kapitel VI,**

Karyogramm G112-NB/IR Klon II). Dieser enthielt ebenfalls zusätzliche, potenziell strahleninduzierten, klonalen Aberrationen (mar4, add(1)(p36), add(7)(q22), mar11). Während in unbestrahlten G112-NB-Zellen keine Klon-II-typischen Aberrationen beobachtet wurden trat in einigen der bestrahlten G112-NB/IR-Zellen ein Klon-II-Karyotyp auf.

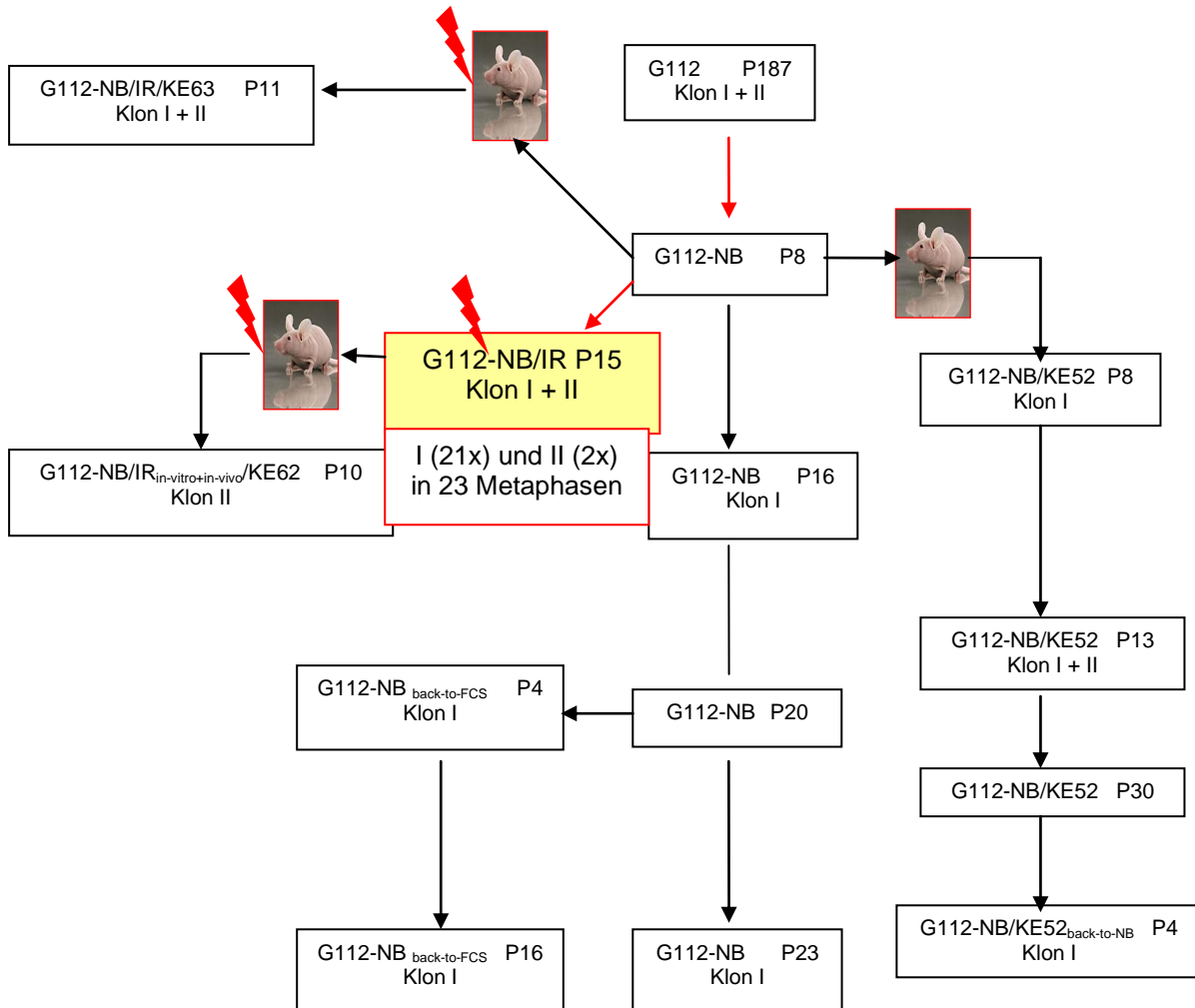


Abbildung 12. Karyotypisierung von G112-NB/IR

III.4.2 Zytogenetischer Vergleich von G112-NB- und G112-NB/IR-Zellen *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund der Beobachtung, dass eine *in-vitro*-Bestrahlung nicht das tumorigene Potential von G112-NB mindert und zu einer erhöhten Repräsentation der serumabhängigen Population mit Klon-II-typischem Karyotyp führt (**Abbildung 12**), wurde untersucht, welche Effekte eine *in-vivo*-Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB hat. Um diese Frage zu beantworten, folgte die zytogenetische Untersuchung von Tumorzellexplantaten (G112-NB/IR/KE63). Die

Ergebnisse an der bestrahlten *ex-vivo*-Kultur G112-NB/IR/KE63 in Passage 11 zeigten einen deutlich höheren Anteil von Klon-II-typischen Aberrationen, speziell $\text{del}(3)(p13)$, $\text{add}(7)(q11)$ und $\text{mar}3$ sowie der Klon-II- assoziierten Aberrationen $\text{mar}4$ und $\text{mar}5$ (**Abbildung 13** und **Kapitel VI, Karyogramm G112-NB/IR/KE63**), im Vergleich zu der nicht bestrahlten *ex-vivo*-Kultur (G112-NB/IR/KE52) (**Abbildung 11**).

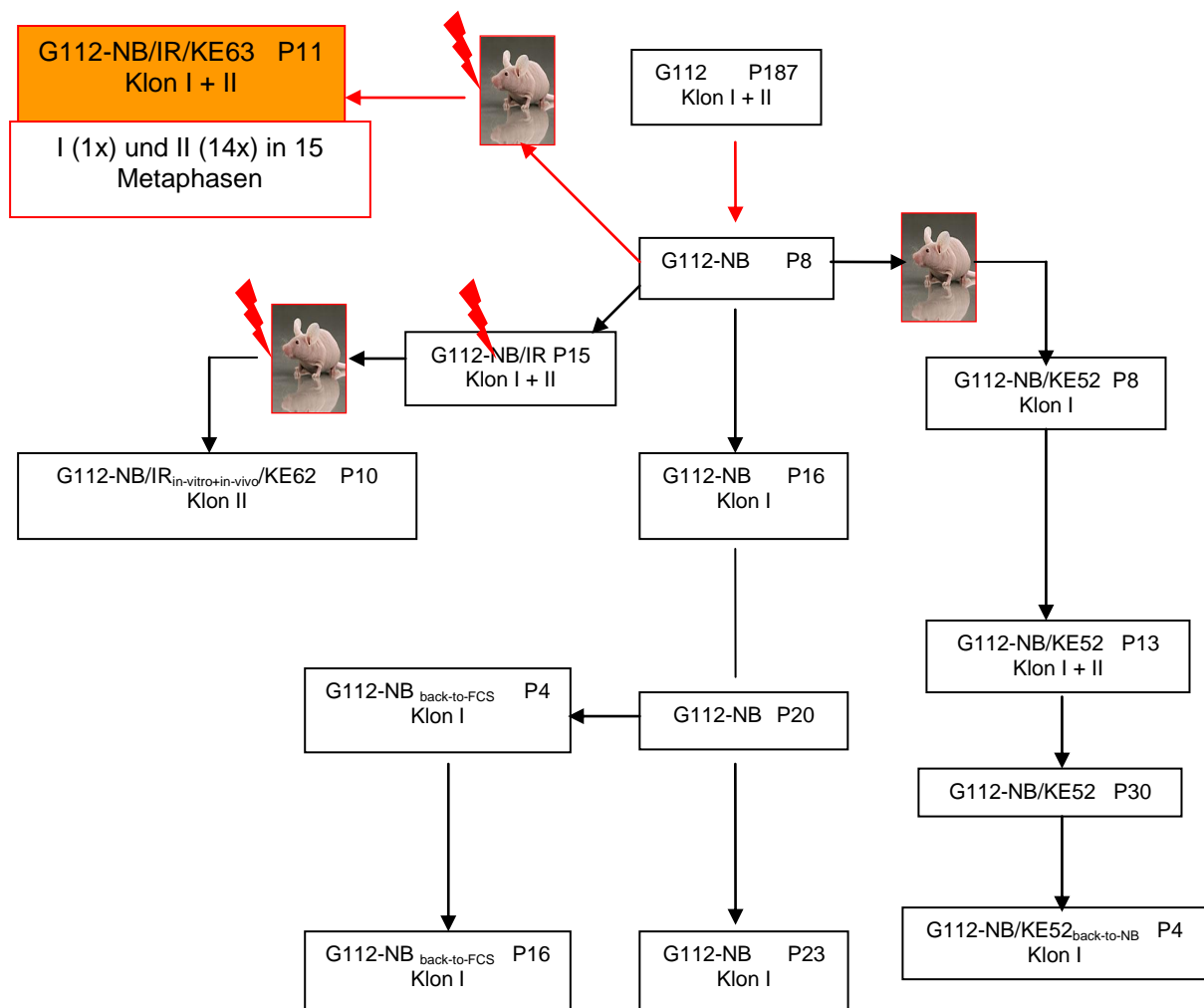


Abbildung 13. Karyotypisierung von G112-NB/IR/KE63

Weiter erfolgte die zytogenetische Charakterisierung der *ex-vivo*-Kultur G112-NB/IR_{in-vitro+in-vivo}/KE62 die von *in vitro* vorbestrahlten G112-NB/IR Zellen stammte und zusätzlich auch *in vivo* bestrahlt worden war (**Abbildung 14**). Es zeigte sich eine alleinige Repräsentation einer Zellpopulation mit Klon-II-charakteristischem Karyotyp, mit dem Nachweis von $\text{del}(3)(p13)$, $\text{add}(7)(q11)$ und $\text{mar}3$ sowie der im Verlauf neu aufgetretenen ebenfalls Klon-II-assozierten Aberrationen $\text{add}(11)(p36)$, $\text{mar}4$, $\text{mar}5$

und mar11 in allen untersuchten Metaphasen von G112-NB/IR_{in-vitro+in-vivo}/KE62. Zusammenfassend bewirkte die Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB offensichtlich einen Wechsel von einem dominierenden Klon-I-typischem Karyotyp zu einem überwiegend Klon-II-typischem Karyotyp.

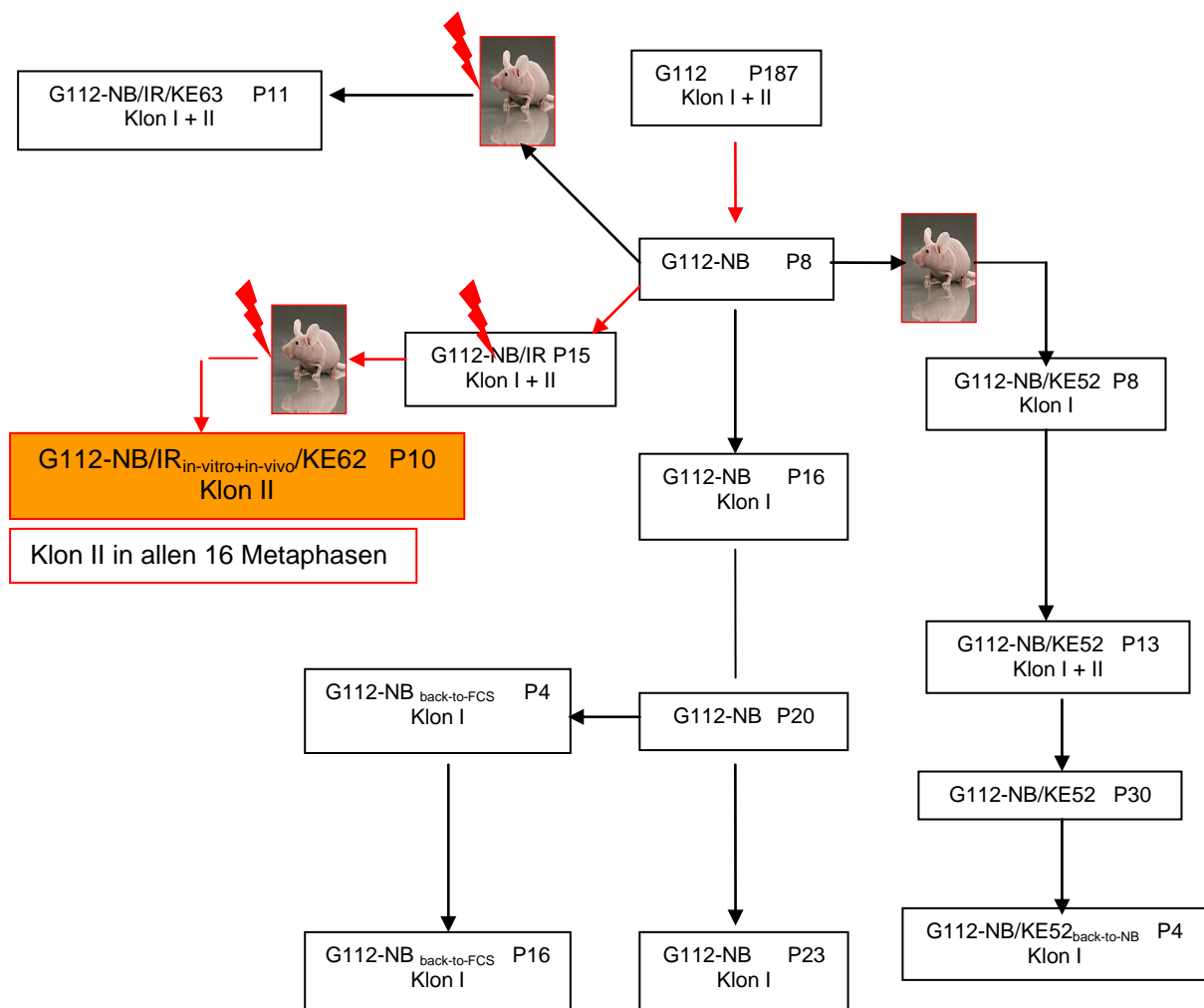
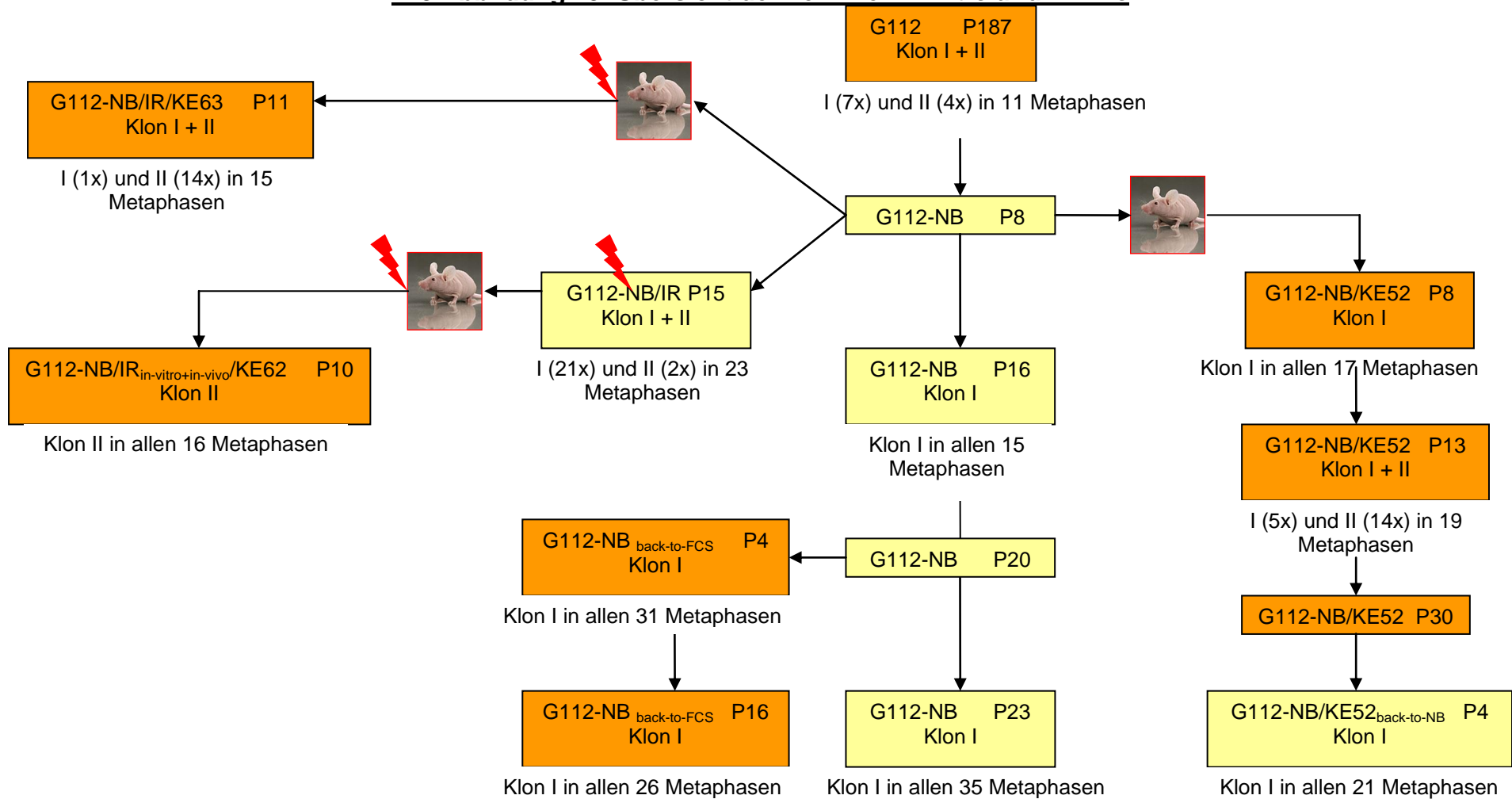


Abbildung 14. Karyotypisierung von G112-NB/IR_{in-vitro+in-vivo}/KE62

III.5 Abbildung 15. Übersicht der Zelllinien *in vitro* und *in vivo*



IV. Diskussion

GBM ist einer der aggressivsten menschlichen Tumoren (Omay und Vogelbaum 2009). Mit den in der heutigen Zeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen ist eine absolute/ völlige Heilung leider noch nicht möglich (Müller 2006). Eine Studie in den USA zeigt, dass innerhalb der letzten Jahrzehnte keine signifikante Verbesserung der Überlebensrate bei GBM erreicht werden konnte (Deorah et al. 2006). Das Problem der Heilung liegt in der hohen Rezidivneigung des GBM (Müller 2006). Die Schwierigkeit in der Entwicklung einer effektiven Therapie gegen das GBM liegt in dem fehlenden Wissen über dessen Ätiologie sowie über dessen Pathophysiologie (Kang et al. 2006). Für die Erklärung der GBM-Entwicklung stehen sich zwei Hypothesen gegenüber, welche bereits im Kapitel I.6 der Einleitung ausführlich erklärt wurden.

Zum einen handelt es sich dabei um das Klonale Evolutionsmodell und zum anderen um die GBM-Stammzellhypothese. Diese Hypothesen sind entscheidend für die Entwicklung eines Therapiekonzeptes. Die bisher angewandten Therapiemaßnahmen gründeten auf dem Klonalen Evolutionsmodell (Reya et al. 2001).

Aufgrund der neueren Erkenntnisse, dass GBM eine besondere Zellpopulation (BTICs), ähnlich den neuronalen Stammzellen, besitzt, tritt die GBM-Stammzellhypothese immer mehr in den Fokus der Experimentellen Neuroonkologie (Ignatova et al. 2002; Galli et al. 2004). Ein Marker für BTICs existiert bisher noch nicht. Als ein wichtiges Surrogatkriterium für die Isolierung von BTICs und somit auch als ein Surrogatkriterium für das Tumorinduktionspotenzial der Zellen wird die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung angesehen (Yuan et al. 2004; Kondo et al. 2004; Azari et al. 2011). Allerdings kann auch die zur BTIC-Isolierung verwendete serumfreie Neurosphärenkultur nicht garantieren, dass ausschließlich BTICs unter diesen Bedingungen überleben. Potten diskutierte, dass auch in Zellen, welche eine Zwischenstufe (sog. Vorläuferzellen/ Progenitors) in der Entwicklung von BTICs zu differenzierten Tumorzellen darstellen, partielle BTIC-Eigenschaften, wie z. B. die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung, beobachtet werden können (Potten 1997a, b; Reya et al. 2001).

IV.1 Zytogenetische Charakterisierung von G112 - P9 vs. P187 und Heterogenität

Die Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Universitätsklinik Göttingen unter Prof. Dr. med. A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim identifizierte in der GBM-Zelllinie G112 Zellpopulationen mit tumorstammzellähnlichen Eigenschaften. In den für diese Arbeit zugrunde liegenden hohen Passagen (P187 und aufwärts) von G112 konnte anhand des Nachweises gemeinsamer struktureller Aberrationen, wie z. B. $\text{del}(1)(p34)$, in dem von Westphal publizierten Karyogramm in P9 (**Abbildung 16**) und den aktuellen Passagen, zunächst die gemeinsame zytogenetische Identität bestätigt werden. Darüber hinaus konnten in Passage 187 (P187) zwei zytogenetische Klone identifiziert werden, wobei der Karyotyp von Klon I zu dem ursprünglichen Karyogramm in Passage 9 größere Ähnlichkeiten aufweist als der Karyotyp von Klon II. Klon II zeigt gegenüber Klon I zusätzliche Chromosomenaberrationen, wie z. B. eine Deletion von Chromosom 3 ($\text{del}(3)(p13)$), einen Zugewinn auf Chromosom 7 ($\text{add}(7)(q11)$) und ein neu aufgetretenes Markerchromosom ($\text{mar}3$) sowie Verluste der Chromosomen 8, 9, 15 und 21. Es ist daher davon auszugehen, dass Klon I eine näher verwandte Seitenlinie des ursprünglichen Klons aus P9 darstellt als Klon II. Infolgedessen kann in den hier untersuchten hohen Passagen ($>P187$) Klon I als Stammlinie angesehen werden und Klon II als eine von Klon I abstammende Seitenlinie. Inwieweit Klon I und Klon II bereits in Passage 9 als Seitenlinien koexistierten oder ob sie sich erst später synchron oder sequenziell im Verlauf der *in-vitro*-Kultivierung der Zelllinie entwickelt haben, bleibt aufgrund der fehlenden vollständigen Karyotypisierung in P9 und fehlender Untersuchungen in Passagen zwischen P9 und P187 unbekannt.

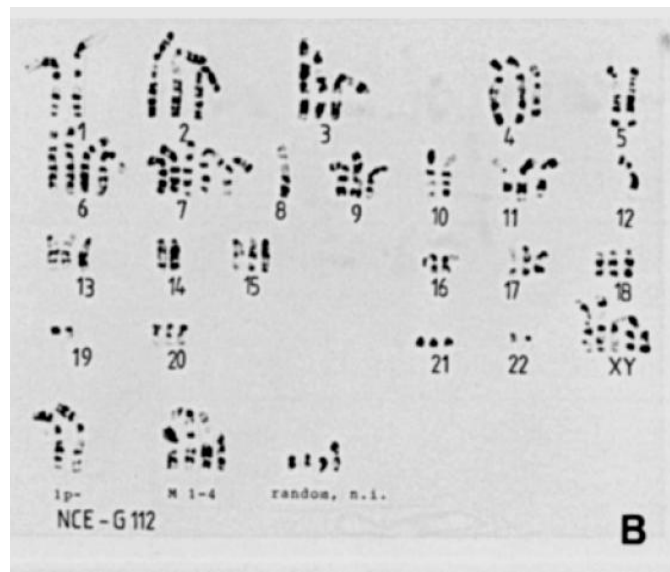


Abbildung 16. Karyogramm von G112 Passage 9 (aus Westphal et al. 1994, S. 20).

IV.2 Zytogenetische Charakterisierung von G112-NB - Serumfreie Bedingungen sind selektiv für zur Neurosphärenbildung befähigte Klon-I-Tumorzellen

Anhand der hier durchgeführten zytogenetischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass der unter serumfreien Kulturbedingungen expandierte Subklon G112-NB mit Neurosphärenphänotyp sich auch zytogenetisch verändert hat. So zeigte G112-NB eher eine Dominanz eines Klon-I-Karyotyps, während die unter serumhaltigen Bedingungen gewachsene G112-Population ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden Klone aufwies. Innerhalb des G112-Modells scheinen somit serumfreie, stammzellähnliche Bedingungen ein eher ungünstigeres Milieu für Klon II als für Klon I darzustellen und begünstigen somit eher die Selektion und klonale Expansion des an serumfreie Bedingungen besser angepassten Klon I gegenüber Klon II. Die Beobachtung, dass Klon-II-typische Aberrationen auch nach Rekultivierung in serumhaltigem Medium nicht wieder auftreten, unterstützt die Hypothese, dass diese Aberrationen nicht auf einer beliebig reproduzierbaren *de-novo*-Evolution basieren und eine sichtbare Änderung der zytogenetischen Konstitution auf Selektion und klonaler Expansion einer der beiden koexistenten verwandten, aber distinkten Zellklone Klon I und Klon II mit jeweils eigenem

Phänotyp beruhen (**Abbildung 10**). Anhand der BTIC-Eigenschaften liegt es nahe, dass es sich bei Klon-I-Tumorzellen entweder um BTICs oder zumindest um Vorläuferzellen handelt, welche gemäß Potten die Fähigkeit der Neurosphärenbildung noch besitzen können (Potten 1997a, b). Demgegenüber handelt es sich bei Klon-II-Tumorzellen um differenziertere Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung verloren haben (**vergleiche Abbildung 7 mit 9**).

IV.3 Tumorigenität von G112-Subklonen und zytogenetische Charakterisierung - BTIC, Vorläuferzelle, differenzierte Tumorzelle

Wie bereits im Kapitel I.6 der Einleitung erwähnt, sollen BTICs eine geringe Proliferationsrate, Vorläuferzellen (Progenitors) eine höhere Proliferationsrate und differenzierte Tumorzellen eine geringe bis gar keine Proliferationsrate besitzen (Reya et al. 2001; Panagiotakos und Tabar 2007). Ähnlich wie bei der Proliferationsrate verändern sich während des Differenzierungsprozesses von der BTIC zur differenzierten Tumorzelle auch weitere Zelleigenschaften (Reya et al. 2001). Während BTICs und partiell auch Vorläuferzellen die Fähigkeit zur Tumorinduktion besitzen sollen (Galderisi et al. 2006; Panagiotakos und Tabar 2007), soll diese Fähigkeit mit zunehmender Differenzierung der Tumorzelle abnehmen (Kang et al. 2006). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass auch Zellen mit Klon-II-charakteristischem Karyotyp ohne offensichtliche Neurosphärenbildungsfähigkeit in der Lage sind, *in vivo* Tumoren zu generieren (**Abbildung 11, 13 und 14**), sie unterstützt damit das Konzept der Vorläuferzellen mit partiellen BTIC Eigenschaften in Analogie zur Hypothese von Potten, dass auch Zwischenstufen auf ihrem Weg zu differenzierten Tumorzellen teilweise BTIC-Eigenschaften, wie z. B. Neurosphärenbildungsfähigkeit, aufweisen können (Potten 1997a, b).

Da eine von Klon II unabhängige *de-novo*-Entstehung von Klon-II-typischen Aberrationen äußerst unwahrscheinlich ist, kann angenommen werden, dass Klon-II-Zellen jenseits der zytogenetischen Nachweisbarkeit (ca. <5%) in G112-NB und G112-NB/KE52 vorhanden gewesen sind (**Abbildung 11**). Die Beobachtung, dass Klon II in einer späteren Passage von G112-NB/KE52 unter serumhaltigen Kulturbedingungen noch stärker dominierte (**Abbildung 11**), spricht dafür, dass

serumhaltige Bedingungen günstiger für Klon II sind und zu dessen Selektion und klonaler Expansion führen.

IV.4 Effekte der Bestrahlung auf die zytogenetische Konstitution von G112-NB - BTIC, Vorläuferzelle, differenzierte Tumorzelle

Neben der Schwierigkeit, einen geeigneten BTIC-Marker zu finden, ist noch nicht bewiesen, ob BTICs die einzige Zellpopulation darstellen, die für ein GBM-Rezidiv nach kombinierter Radio- und Chemotherapie verantwortlich sein könnte.

Die genauen Umstände, die der Radioresistenz zu Grunde liegen, sind noch nicht völlig geklärt. Bao et al. (2006) zeigten, dass GBM-Zellen mit BTIC-Eigenschaften eine Strahlentherapie überleben können und trotz einer *in-vitro*-Bestrahlung ihre stammzellähnlichen Eigenschaften wie z. B die Neurosphärenbildung und die multipotente Differenzierungsfähigkeit behalten (Bao et al. 2006). Auch die Kooperationsarbeit der Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen zusammen mit der Abteilung Strahlentherapie der Universitätsklinik Göttingen beobachtete, dass die GBM-Zelllinie G112 mehrfache *in-vitro*-Bestrahlungen überleben kann und ihre tumorinduzierenden Fähigkeiten beibehält (**vergleiche Abbildung 12 und 14**). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die *in vitro* bestrahlte Population G112-NB/IR immer noch eine Klon-I-Dominanz aufweist. Jedoch wird nach Bestrahlung von G112-NB/IR auch eine erneute Nachweisbarkeit von Klon-II-typischen Aberrationen beobachtet, welche in unbestrahlten G112-NB-Kulturen nicht nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 9, 10 und 12**). Außerdem wurde in den bestrahlten *ex-vivo*-Kulturen eine raschere Progression von einem Klon-I-Karyotyp hin zu einem Klon-II-Karyotyp dokumentiert, als in der unbestrahlten *ex-vivo*-Kultur. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass Veränderungen der äußeren Bedingungen, wie z. B. serumfreie Zellkulturbedingungen oder eine Bestrahlung, einen unterschiedlichen Selektionsdruck auf die verschiedenen Klone der Tumorphilpopulation ausüben (Kondo et al. 2004; deCarvalho et al. 2010). Gemäß der hier vorgelegten Ergebnisse kann man zu der Schlussfolgerung kommen, dass eine Bestrahlung zu einer stärkeren Elimination der Klon-I-Population führt, zugunsten der unter serumfreien Bedingungen initial nicht nachweisbaren, da weniger proliferationsaktiven, aber daher vermutlich auch weniger strahlensensiblen Klon-II-Population (**vergleiche**

Abbildung 9 mit 12). Aufgrund der Beobachtung, dass Tumorzellen mit Klon-I-Karyotyp strahlensensibler sind, jedoch im Vergleich mit Klon-II-Tumorzellen partielle BTIC-Eigenschaften aufweisen (wie z. B. die Neurosphärenbildungsfähigkeit), ist davon auszugehen, dass es sich bei den als Klon I charakterisierten Tumorzellen um sog. Vorläuferzellen (Progenitors) handelt, da Vorläuferzellen eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit besitzen (Reya et al. 2001; Panagiotakos und Tabar 2007) und somit durch die Strahlentherapie angreifbar sein könnten. Sie entstehen aufgrund einer asymmetrischen Zellteilung der BTICs in eine BTIC und in eine Vorläuferzelle (Panagiotakos und Tabar 2007). Diese Vorläuferzellen können wie bereits erwähnt noch einige BTIC-Eigenschaften besitzen, sind jedoch in der Hierarchie den BTICs untergeordnet. Sie zeigen im Vergleich zu den BTICs und auch zu den weiter differenzierten Tumorzellen eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und der multipotenten Differenzierungsfähigkeit sollen aber im Gegensatz zu denen der BTICs zeitlich begrenzt sein (Reya et al. 2001; Panagiotakos und Tabar 2007).

So deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Klon-I-Tumorzellen vermutlich strahlensensible Vorläuferzellen sind, welche durch eine Bestrahlung reduziert werden können. Im Gegensatz dazu lassen die bisherigen Ergebnisse vermuten, dass Klon-II-Tumorzellen, aufgrund geringerer BTIC-Eigenschaften, weiter differenzierte Tumorzellen mit geringer Proliferationsfähigkeit (unter serumfreien Bedingungen) darstellen, im Vergleich zu Klon I. Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei Klon-II-Tumorzellen um weiter differenzierte Tumorzellen mit geringer Proliferationsfähigkeit handeln könnte, zeigt deren Radioresistenz, da sich eine Bestrahlung vornehmlich auf proliferierende Zellen auswirkt (unter serumfreien Bedingungen). Proliferierende Zellen reagieren dementsprechend, im Gegensatz zu ruhenden Zellen, empfindlicher auf eine Strahlentherapie, da es während der Zellteilung leichter zu DNA-Schäden kommen kann. Sind bei einer Zelle irreparable DNA-Schäden aufgetreten, wird unter normalen Bedingungen der an der Proliferationsregulation beteiligte Zellzyklus gestoppt und die Apoptose eingeleitet (Kauffmann et al. 2006a). Dieses höhere Proliferationspotential könnte so die Erklärung der Radiosensitivität von Klon-I-Populationen sowie die Erklärung der Radioresistenz von Klon-II-Populationen sein.

IV.5 Schlussfolgerung

1) Aufgrund der gemachten Beobachtungen kann die zytogenetische Identität von G112 anhand der Passagen 9 und 187 bestätigt werden. Des Weiteren kann gesagt werden, dass auch zytogenetisch eine Heterogenität innerhalb der Tumorphilpopulation nachgewiesen werden kann. Dabei handelt es sich um die zytogenetisch als Klon I und Klon II definierten Populationen, bei denen es sich um zwei eigenständige Tumorsubpopulationen handelt. Denn sie legen unterschiedliche Eigenschaften an den Tag.

2) Klon I könnte mit seiner hohen Proliferationsrate unter serumfreien Bedingungen und seiner Neurosphärenbildungsfähigkeit sowie der damit assoziierten Strahlensensibilität einer Vorläuferzelle entsprechen. Während Klon II mit der eher geringeren Neurosphärenbildungsfähigkeit und der im Vergleich zu Klon I relativ höheren Strahlenresistenz eher den differenzierteren Zellen gleichen könnte.

3) Erstaunlicherweise besitzen beide Klone die Fähigkeit zur Tumorinduktion. Auch weiter differenzierte Tumorzellen, welche die BTIC-typischen Fähigkeiten wie die Neurosphärenbildung bereits verloren haben, können noch tumorigen sein.

Man könnte aufgrund der Tatsache, dass die *ex-vivo*-Kultivierung unter serumhaltigen Bedingungen erfolgte, anführen, dass die in *ex-vivo*-Kulturen beobachtete Klon-II-Dominanz seruminduziert sei. Dass serumhaltige Bedingungen die Proliferation von Klon II fördern, wurde in der vorliegenden Arbeit bereits dargestellt und es ist zu vermuten, dass die serumhaltigen Bedingungen auch einen Anteil an der in den *ex-vivo*-Kulturen beobachteten Klon-II-Dominanz haben.

4) Neben den serumhaltigen Kulturbedingungen scheint aber auch die Bestrahlung einen fördernden Einfluss auf Klon II zu besitzen, das zeigen neben der *in vitro* bestrahlten G112-NB/IR-Kultur auch die postradiären *ex-vivo*-Kulturen. Obwohl in allen *ex-vivo*-Kulturen, bestrahlt und unbestrahlt, früher oder später eine Klon-II-Dominanz auftritt, gibt es hinsichtlich des Zeitraums, wann (ab welcher Passage) die Klon-II-Dominanz auftritt zwischen bestrahlten und unbestrahlten *ex-vivo*-Kulturen Unterschiede. Während in der unbestrahlten *ex-vivo*-Kultur G112-NB/KE52 erst in Passage 13 eine Klon-II-Dominanz (14 von 19 Metaphasen Klon II) aufgebaut wird,

ist diese Klon-II-Dominanz in der *in vivo* bestrahlten *ex-vivo*-Kultur G112-NB/IR/KE63 (14 von 15 Metaphasen Klon II) bereits deutlich in Passage 11 zusehen und in der *in vitro* und *in vivo* bestrahlten *ex-vivo*-Kultur G112-NB/IR_{in-vitro+in-vivo}/KE62 zeigt sich ausschließlich Klon II (alle untersuchten Metaphasen Klon II) und das bereits in Passage 10. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass neben der serumhaltigen Kultivierung auch die Bestrahlung einen fördernden Einfluss auf Klon II besitzt oder zumindest Tumorzellen mit Klon-II-Karyotyp radioresistenter als Klon-I-Tumorzellen sind.

Aufgrund der Ergebnisse kann man zu dem Schluss kommen, dass es sich bei den Klon-I-Tumorzellen um proliferative, strahlensensible Vorläuferzellen und bei den Klon-II-Tumorzellen um gering proliferative, darum auch radioresistente, aber auch weiter differenzierte und somit weniger maligne Tumorzellen handelt.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt sich die Schlussfolgerung,

- dass in der konventionell kultivierten GBM-Zelllinie G112 zytogenetisch zwei unterschiedliche Klone nachgewiesen werden:
 - neurosphärenbildungsfähige, schnell proliferierende, Klon-I-Tumorzellen (vermutlich Vorläuferzellen)
 - sowie nicht-neurosphärenbildungsfähige, geringer proliferierende, Klon-II-Tumorzellen (vermutlich weiter differenzierte Tumorzellen)und so die GBM-Stammzellhypothese bestätigt werden kann.
- dass serumfreie, stammzellähnliche Kulturbedingungen selektiv für einen Klon mit stammzellähnlichen Eigenschaften sind (Klon-I-Tumorzellen), nicht aber selektiv für BTICs zu sein scheinen.
- dass neben BTICs und Vorläuferzellen auch weiter-differenzierte Tumorzellen noch die Tumorinduktionsfähigkeit besitzen können.
- dass eine Bestrahlung die schnell proliferierenden, Klon-I-Vorläuferzellen eliminiert, während die gering proliferativen, Klon-II-weiter-differenzierten Tumorzellen radioresistenter zu sein scheinen.

Die Beobachtung, dass neben BTICs auch Vorläuferzellen und weiter differenzierte Tumorzellen BTIC-Eigenschaften wie die Neurosphärenbildung und die Tumorinduktion besitzen können, lässt die Frage aufkommen, ob ein Rezidiv allein

einer Tumorzellpopulation, wie z. B. den BTICs, zugeschrieben werden kann. Eine weitere Charakterisierung der einzelnen Zellgruppen/Populationen und ihrer Fähigkeiten ist daher dringend nötig.

	NSC	BTIC	Vorläuferzelle	differenzierte Tumorzelle
Unbegrenzte Selbsterneuerung	+	+	-	-
Proliferationsfähigkeit	langsam	langsam	schnell	langsam
Pluripotenz (Differenzierung in neuronale/gliale (Tumorzellen))	+	+	eingeschränkt	-
Differenzierungsfähigkeit	unidirektional	bidirektional	eingeschränkt	-
Migrationsfähigkeit	+	+	+/-	-
Simultane Expression von Stammzellmarkern und Markern differenzierter Zellen	-	+	+/-	-

Tabelle 3. Vergleich zwischen neuronalen Stammzellen (NSCs), Brain Tumor Initiating Cells (BTICs), Vorläuferzellen und differenzierten Tumorzellen (nach Reya et al. 2001; Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004; Galli et al. 2004; Bao et al. 2006).

V. Zusammenfassung

Das GBM ist der bösartigste und häufigste Gehirntumor mit dem höchsten Anaplasiegrad (WHO-Grad IV) (Riede und Schaefer 2001b).

Die therapeutischen Möglichkeiten umfassen neben der operativen Tumorentfernung die Strahlentherapie sowie Chemotherapeutika (Temozolomid) und Angiogenesehemmer (Omay und Vogelbaum 2009; Müller 2006; Weller 2008; Fukushima et al. 2009; Tabatabai und Stupp 2010). Trotzdem ist die Prognose schlecht (Müller 2006).

Zur Entstehung des GBM werden mehrere Hypothesen als Erklärungsansätze diskutiert (Reya et al. 2001). Das GBM-Stammzellmodell ist eine dieser Hypothesen. Gemäß dieser GBM-Stammzellhypothese herrsche innerhalb des Tumors eine hierarchische Ordnung der Tumorzellen (Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004). Dabei stellen sog. Brain Tumor Initiating Cells (BTICs) mit stammzellähnlichen Eigenschaften, die Aufrechterhaltung des Tumors sicher (Reya et al. 2001; Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2004). Um das GBM unter dem Aspekt dieser Hypothese weiter zu erforschen, ist die Isolierung der einzelnen Tumorphyspopulationen, wie der sog. BTICs, von großer Bedeutung (Lee J et al. 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsklinik Göttingen die GBM-Zelllinie G112 zytogenetisch untersucht. Die zytogenetischen Analysen erfolgten an verschiedenen Passagen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen und mit oder ohne Zustand nach *in-vitro*- und/oder *in-vivo*-Bestrahlung nach konventionellen Methoden mittels DAPI-Chromosomenbänderung.

Die Ergebnisse zeigen, dass G112 zytogenetisch aus zwei koexistenten Zellklonen Klon I und Klon II besteht. In der (für Tumorzellen mit BTIC-Eigenschaften typischen) Neurosphärenkultur G112-NB können ausschließlich Klon-I-Tumorzellen gefunden werden. Die aus G112-NB unter *in-vivo*-Bedingungen generierten Tumoren zeigen, dass sowohl Klon-I-Tumorzellen als auch die nicht zur Neurosphärenbildung fähigen Klon-II-Tumorzellen zur Tumorinduktion fähig sind. Die Arbeitsgruppe Neuroonkologie der Abteilung Neurochirurgie der Universitätsmedizin Göttingen konnte aus der G112-Zelllinie Tumorzellen mit BTIC-Eigenschaften isolieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen:

1) G112 P9 (Westphal et al. 1994), G112 >P187 (Klon I und Klon II), G112-NB haben einen gemeinsamen zytogenetischen Hintergrund

2a) Serumfreie Bedingungen sind selektiv für zur Neurosphärenbildung befähigte Klon-I-Tumorzellpopulationen (G112-NB)

2b) Serumhaltige Kulturbedingungen sowie eine *in-vitro*- oder *in-vivo*-Bestrahlung sind selektiv für Klon-II-Tumorzellpopulationen

3) Das Tumorinduktionspotential ist nicht exklusiv an BTICs gebunden und kann auch in Klon-I-Zellen bzw. Vorläuferzellen und Klon-II-Zellen bzw. weiter differenzierten Tumorzellen gefunden werden.

4) Klon-I-Zellen (Vorläuferzellen) sind radiosensibler, wohingegen Klon-II-Zellen (weiter differenzierte Tumorzellen) aufgrund ihrer geringeren Proliferationsaktivität radioresistenter zu sein scheinen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Tumorstammzellhypothese.

VI. Anhang

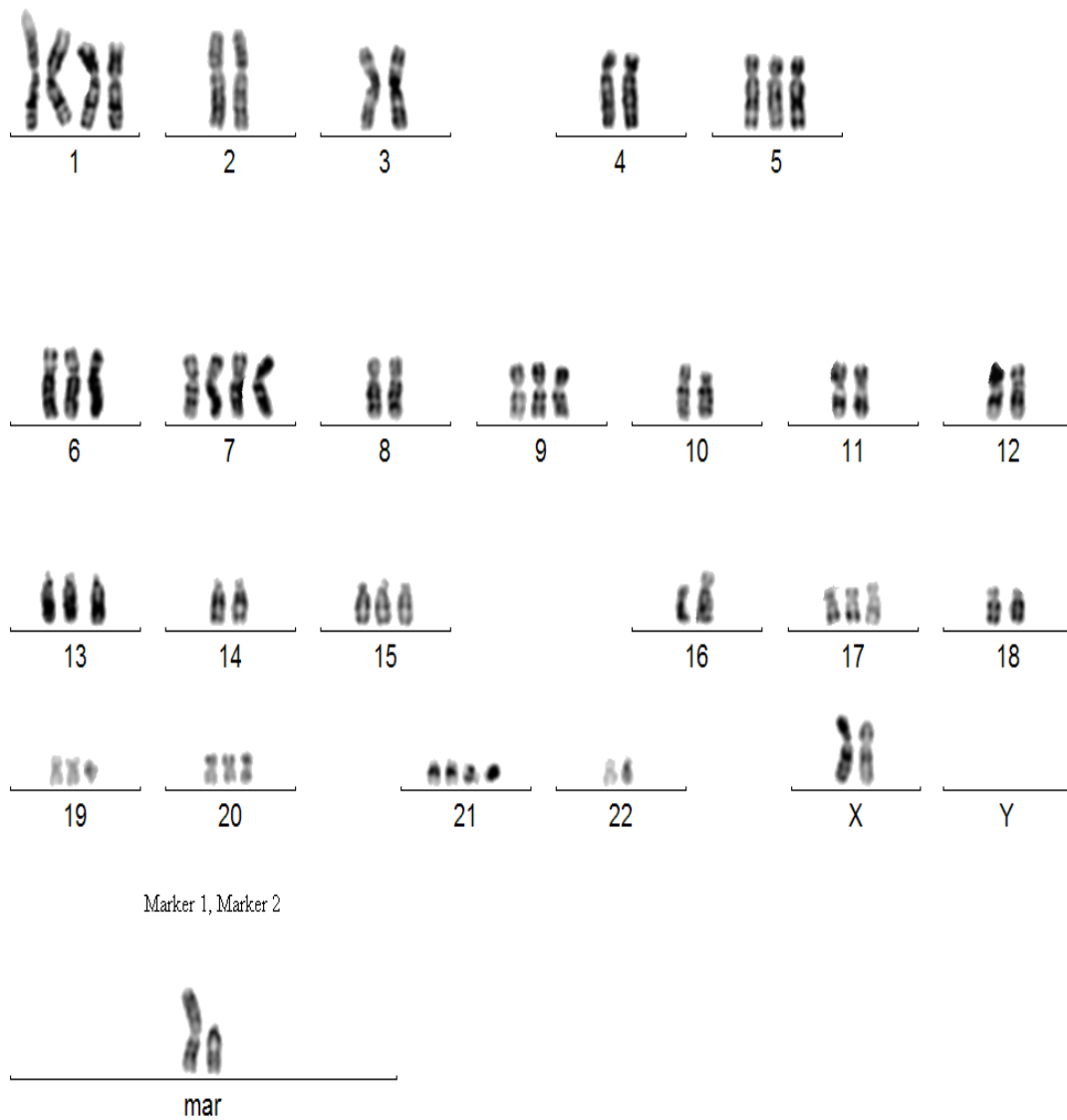
VI.1 Tabelle 4. Karyotypen

	Karyotyp
G112	61-63,XX,-X,del(1)(p34),+del(1)(p34),-2,-3,-4,+7,-8,-10,del(10)(p12),-11,-12,-14,-16,add(17)(q25),-18,+21,-22,+mar1,+mar2[cp7]/ 59,idem,del(3)(p13),add(7)q11,-8,-9,-15,-21,+mar3[cp4]
G112-NB	56-59,idem,-6,-8,-19,-21,2-3dmin[cp7]/ 55-60,idem,i(1)(q10),-6,-del(19)(q13),-21,+mar7[cp3]/ 60,idem,del(4)(q31),-6,-9,+13,-19,-20,-21,-mar1,-mar2,+mar6,+mar[cp3]/ 58-59,idem,-6,-9,-del(19)(q13),-21,+mar8,1-2dmin[cp2]
G112-NB/IR	56-61,idem,del(1)(p13),-9,-19,-21[cp11]/ 58,idem,del(1)(p13),del(1)(q31),-9,-19,-21[cp2]/ 57-59,idem,del(1)(p13),-9,-15,-19,-21,+mar10[cp3]/ 55-57,idem,del(1)(p13),t(3;11)(q13;p15),t(5;7)(p11,p12),-6,-9,-17,-19,-21,+mar9[cp3]/ 54-58,idem,del(1)(p13),t(3;11)(q13;p15),t(5;7)(p11,p12),-6,inv(6)(p25q21),-9,-17,-19,-21,+mar9[cp2]/ 54-57,idem,-del(1)(p34),add(1)(p36),-3,add(5)(q2?),add(6)(q25),add(7)(q11),add(7)(q22),-8,-9,add(12)(q22),-14,-15,add(16)(q24),del(16)(q21),-17,-21,add(21)(p11),+mar4,+mar11[cp2]
G112-NB back-to-FCS	Siehe Karyogramm
G112-NB/KE52 Passage8	57-60,idem,-6,-9,-21,+1-3mar,0-1dmin[cp3]/ 58-60,idem,-6,-9,-21,+mar8,+0-1mar,0-1dmin[cp3]/ 53-59,idem,-6,-8,-21,+0-1mar,0-2dmin[cp3]/ 54-59,idem,-6,-8,-19,-21,+0-2mar,0-2dmin[cp4]/ 55-58,idem,-6,-8,add(15)(p11),-17,-19,-21,+1-4mar,0-1dmin[cp4]/
G112-NB/KE52 back-to-NB	Siehe Karyogramm
G112-NB/IR_{in-vitro}+in-vivo/KE62	56-61,idem,-del(1)(p34),del(3)(p13),add(3)(p12),add(7)(q11),add(7)(q32),-8,-9,t(9;14)(q22;q11),del(13)(q12q14),-15,-15,-20,-21,+mar3,+mar4,+mar5,+mar10,+0-2mar[cp9]/ 58-60,idem,-del(1)(p34),del(3)(p13),der(3)add(3)(p12)t(3;10)(q21;q26),add(7)(q11),der(7)add(7)(q32)t(7;14)(p13;q13),-8,-9,t(9;14)(q22;q11),der(10)del(10)(p12)t(3;10)(q21;q26),del(13)(q12q14),der(14)t(7;14)(p13;q13),-15,-15,-20,-20,-21,+mar3,+mar4,+mar5,+mar10,+0-2mar[cp5]/ 57,idem,-del(1)(p34),del(3)(p13),add(7)(q11),-8,-9,del(10)(p12),del(13)(q12q14),-14,-15,del(16)(q21),del(20)(q11),-21,-21,add(21)(p11),+mar3,+mar4,+mar5,+mar11[cp2]

G112- NB/IR/ KE63	<p>58-59, idem, -del(1)(p34), -3, -5, -6, +add(7)(q11), -8, -9, der(11)t(3;11)(q21;p15), -15, -20, -21, +mar3, +mar4, +mar5, +mar12, +0-1mar[cp3]/</p> <p>55-59, idem, del(1)(q41), -del(1)(p34), der(3)del(3)(p13)t(1;3)(q41;q29), t(4;5)(q31;q13), add(7)(q11), -8, -9, add(9)(p24), -11, -13, -15, -20, -21, -21, +mar3, +mar4, +mar5, +0-3mar, 0-1dmin[cp8]/</p> <p>55-59, idem, del(1)(q41), -del(1)(p34), der(3)del(3)(p13)t(1;3)(q41;q29), der(4)t(4;5)(q31;q13), -5, add(7)(q11), -8, -9, add(9)(p24), -11, -13, -15, -19, -20, -21, +mar3, +mar4, +mar5, +0-1mar[cp3]</p> <p>nicht klonal: 59, idem, -6, -9, -19, -21, +mar8[1]</p>
----------------------------------	--

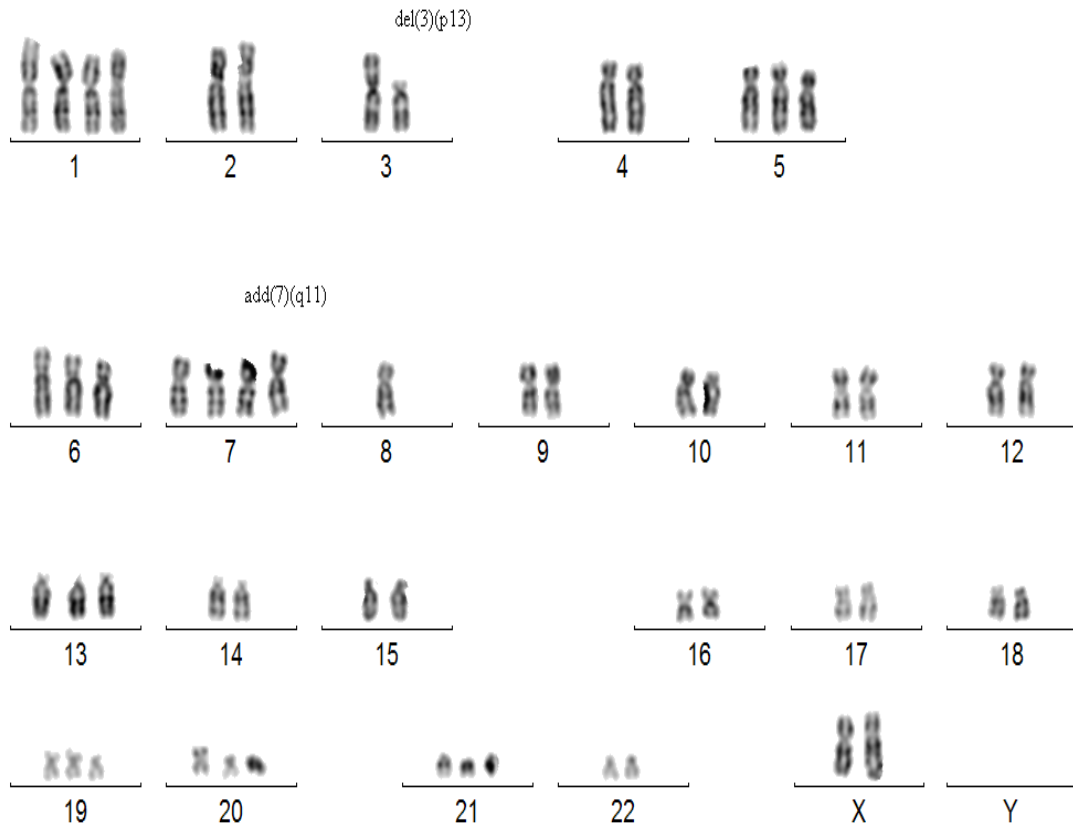
VI.2 Karyogramme

G112
Klon I

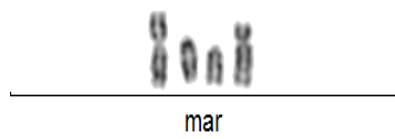


G112

Klon II

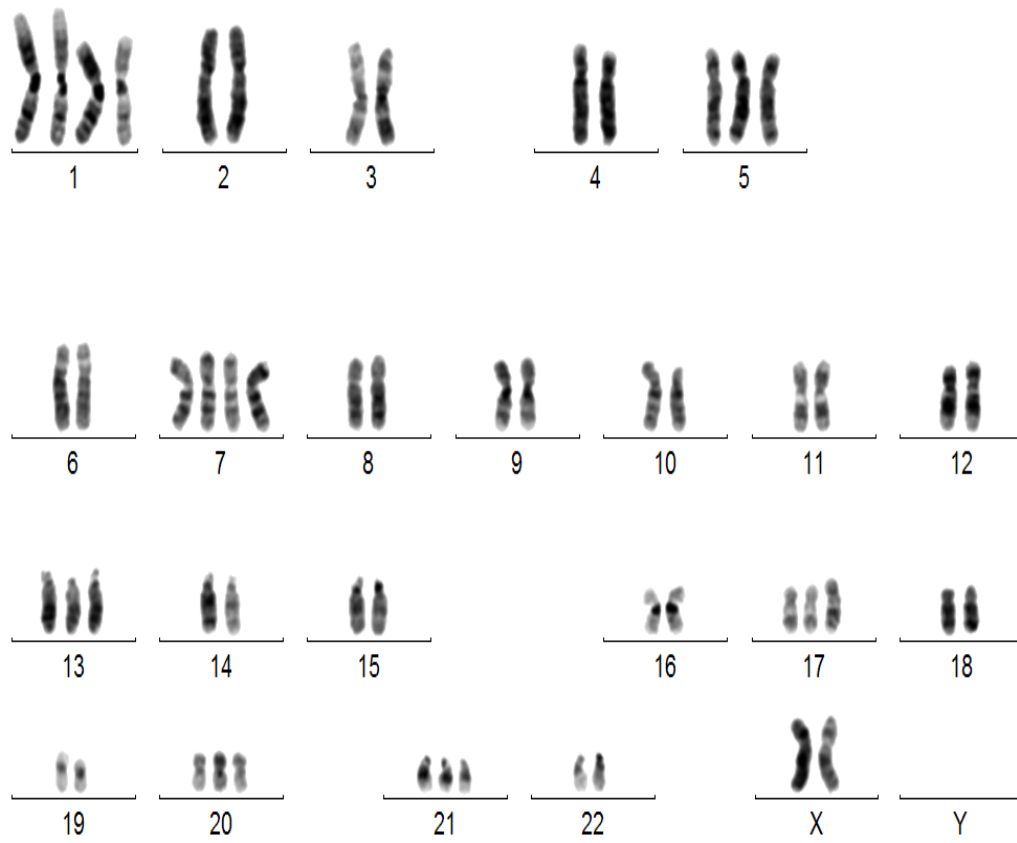


Marker 1, Marker 2, Marker 3

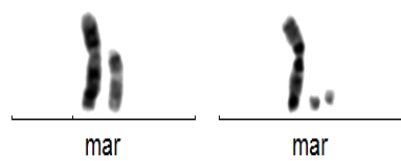


G112-NB

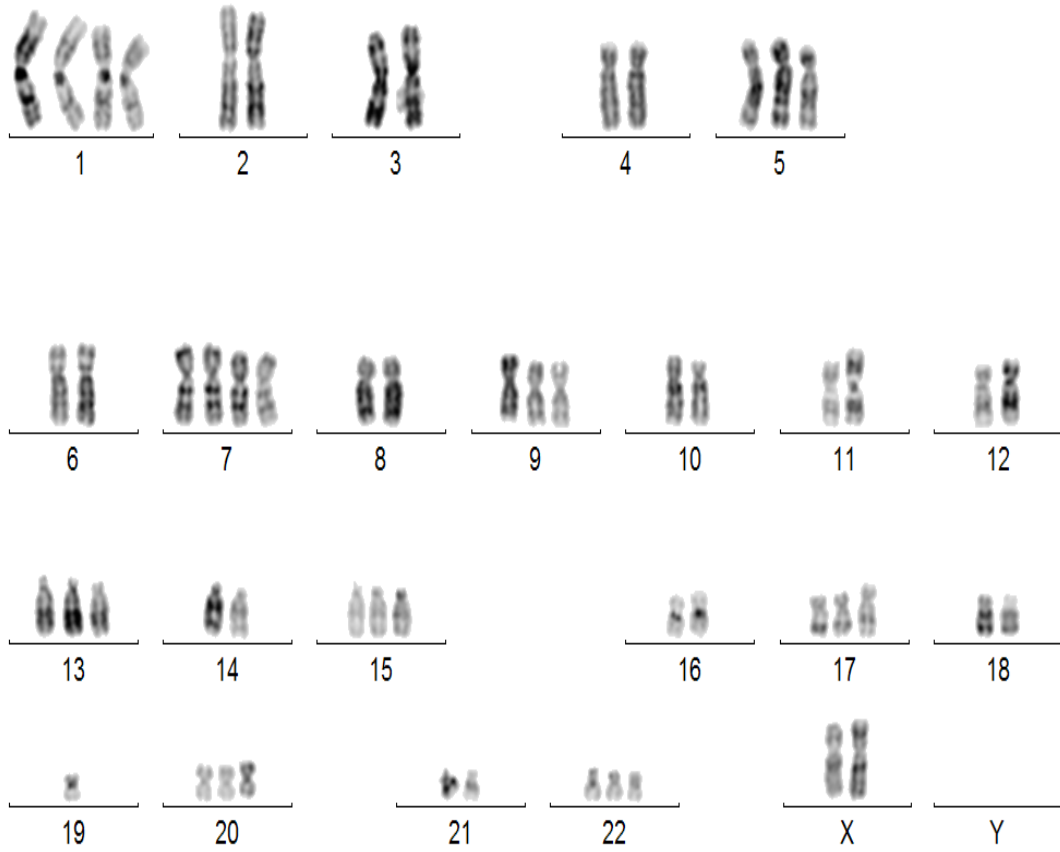
Klon I



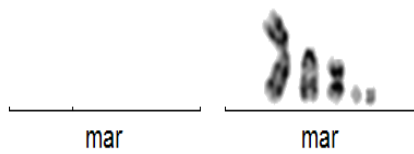
Marker 8



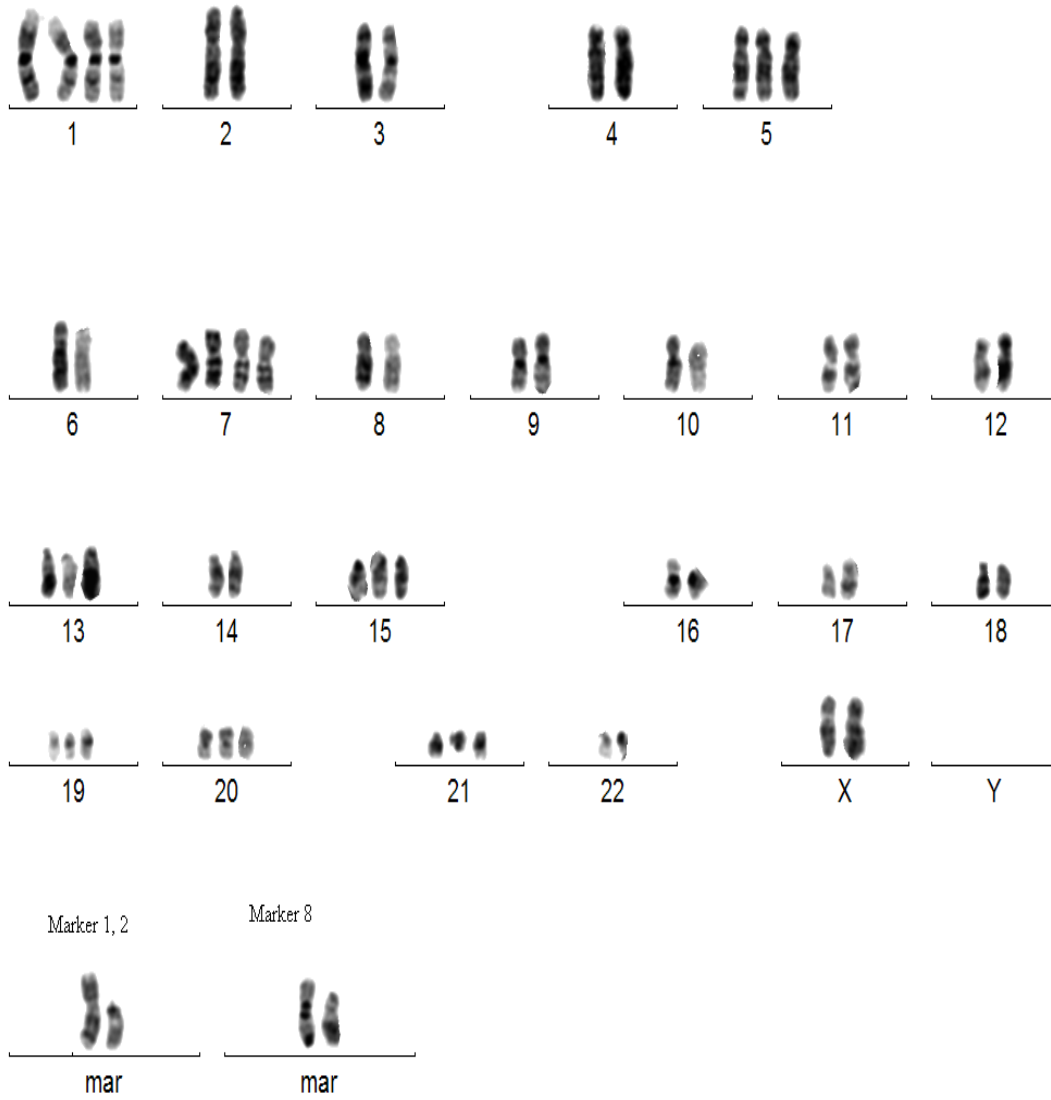
G112-NB back to FCS p4
Klon I



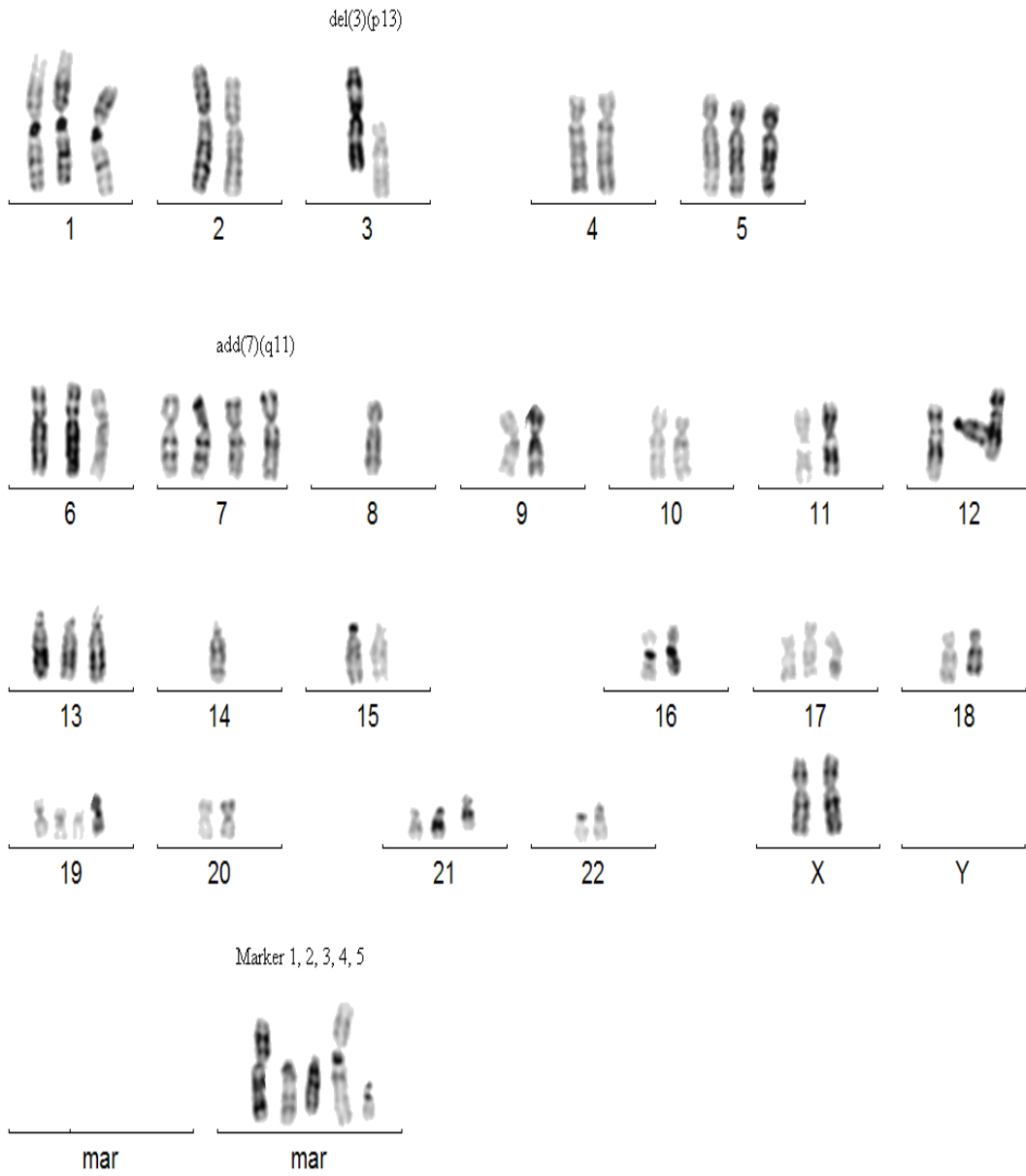
Marker 1, 2



G112-NB/KE52 p8
Klon I

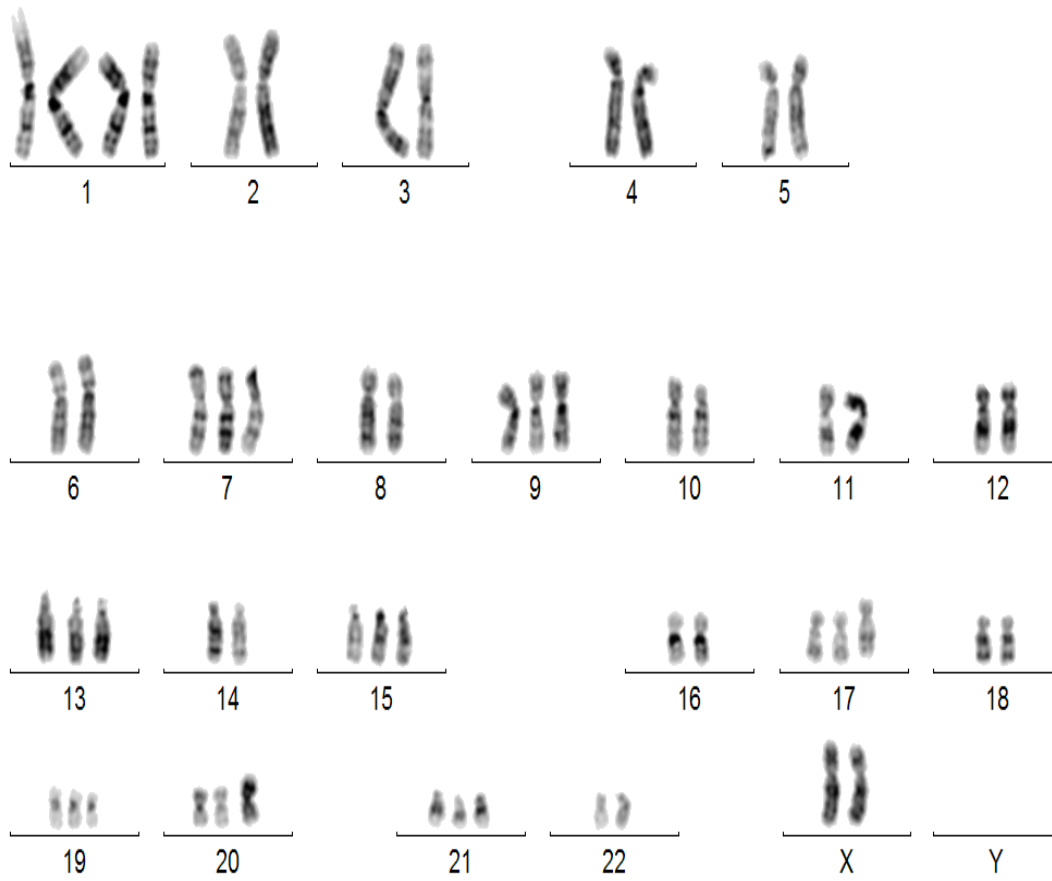


G112-NB/KE52 p13
Klon II

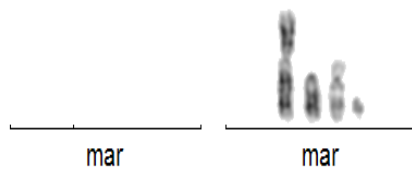


G112-NB/KE52 back to NB
Klon I

p4

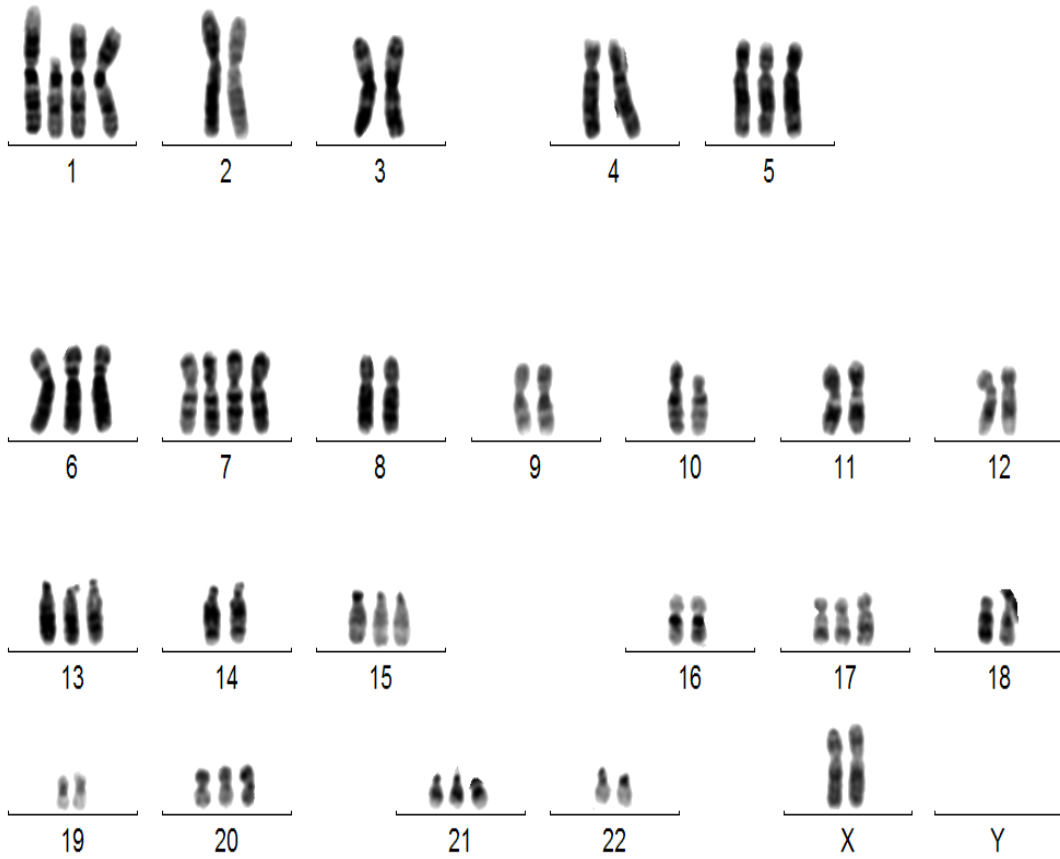


Marker 1, 2

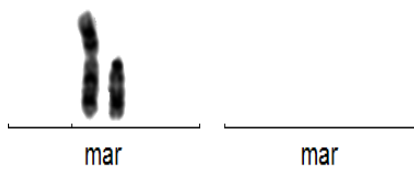


G112-NB/IR

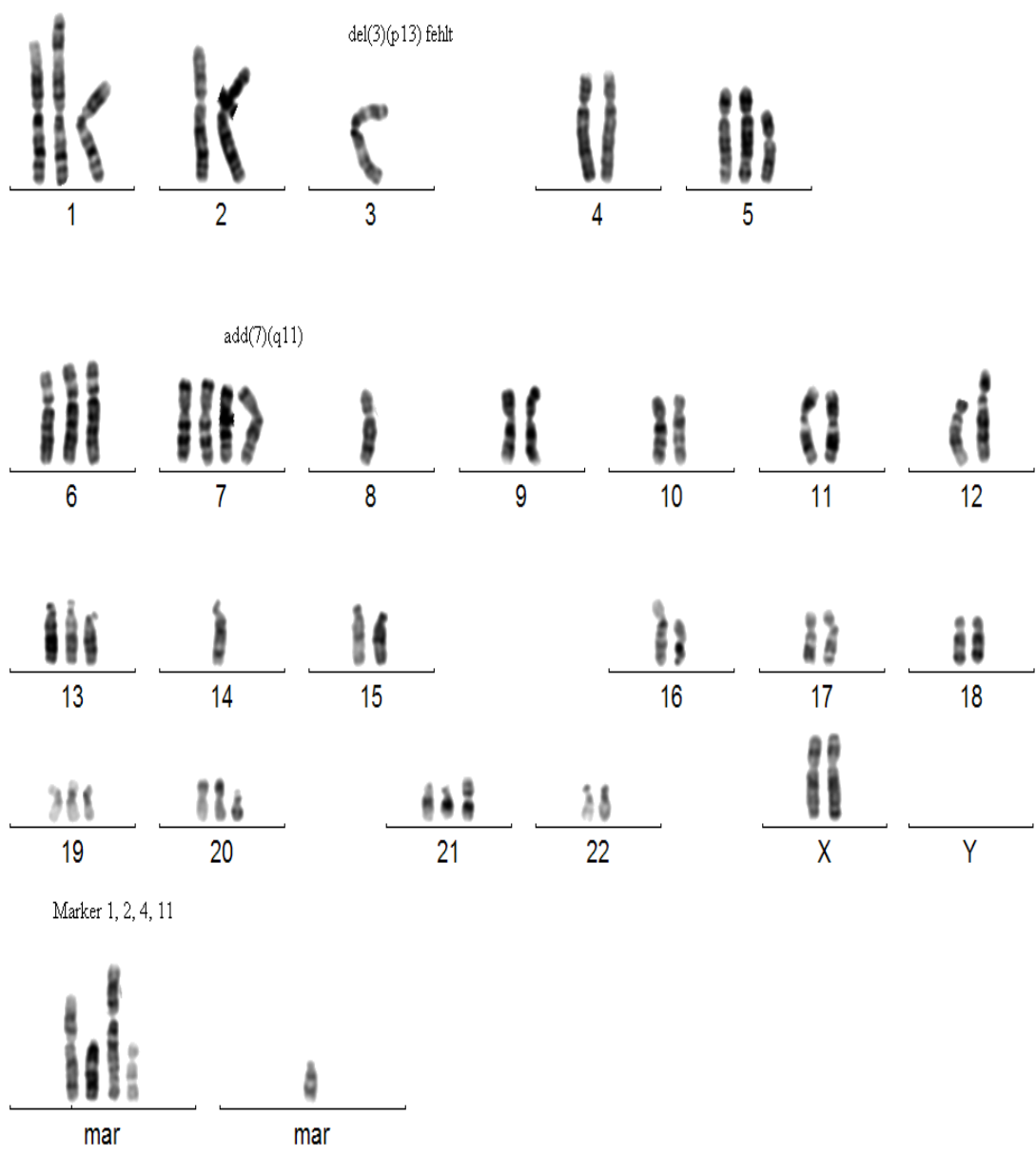
Klon I



Marker 1, 2

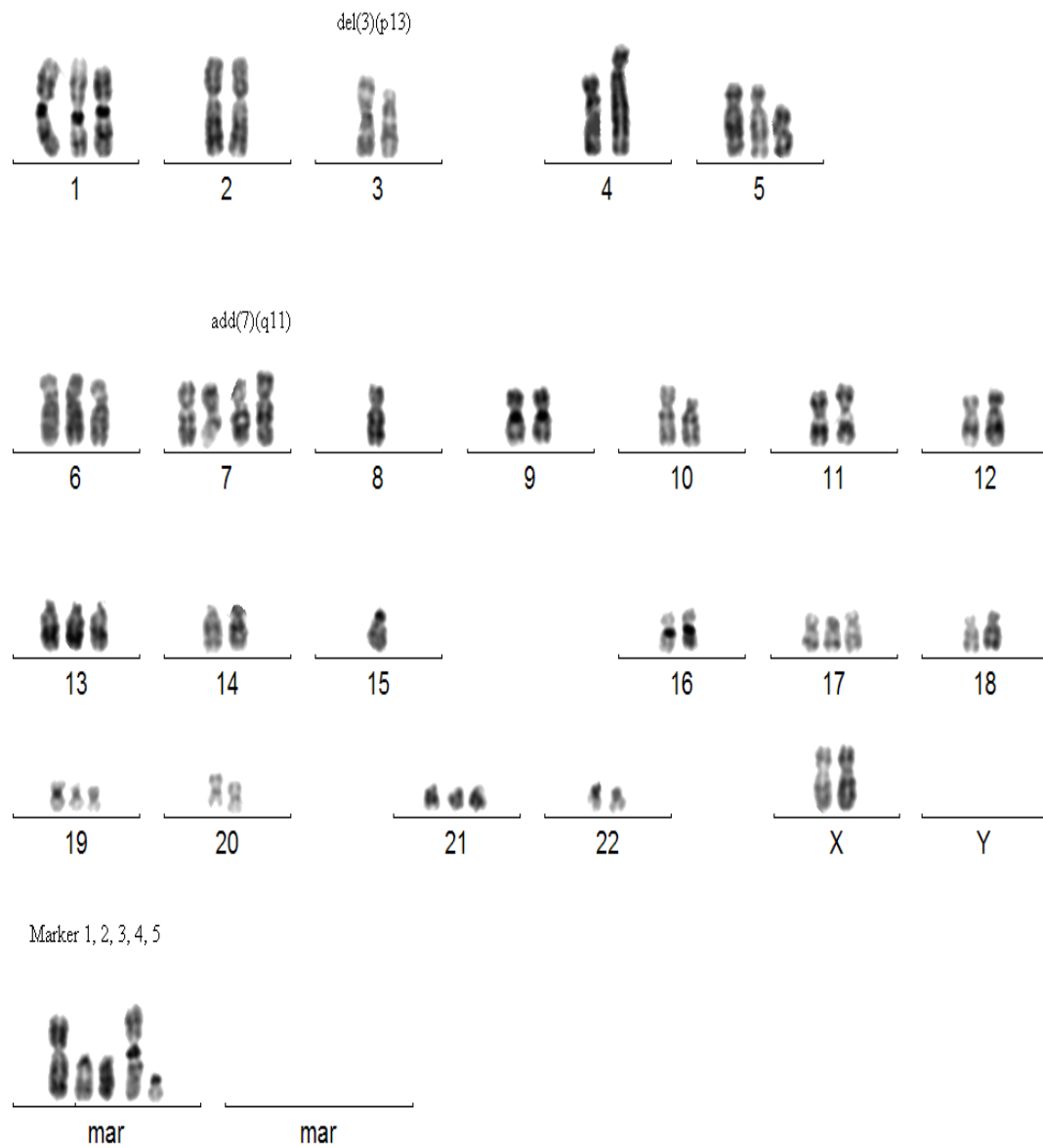


G112-NB/IR
Klon II



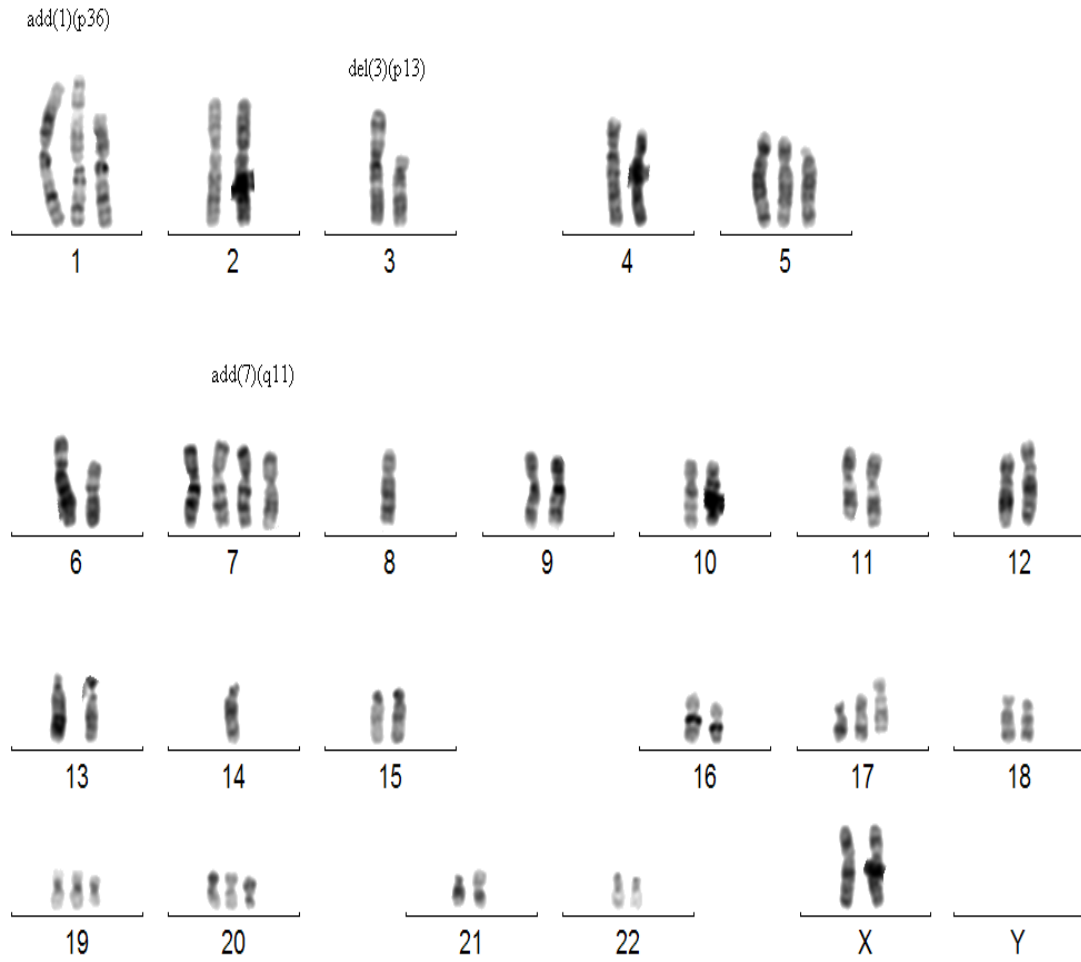
G112-NB/IR/KE63

Klon II

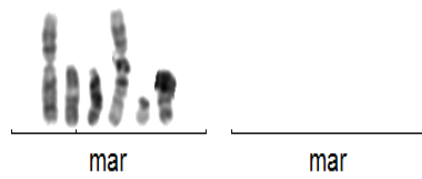


G112-NB/IR/KE62

Klon II



Marker 1, 2, 3, 4, 5, 11



VII. Abkürzungsverzeichnis

add	Additio= chromosomale Zugewinne unbekannter Herkunft
Back-to-FCS	Überführung stammzellähnlicher Neurosphärenkulturen in konventionelle, serumhaltige (FCS) Bedingungen
Back-to-NB	Überführung konventioneller serumhaltiger (FCS) Monolayerkulturen in stammzellähnliche Neurosphären-Bedingungen in Neurobasalmedium
Bcl2	B-Cell-Lymphomagen2 (Apoptosegen)
BCNU	1,3-bis(chloro-ethyl)-1-nitrosourea
BdUR	Brom-Desoxyuridin
bFGF	Fibroblast Growth Factor basis (Fibroblastenwachstumsfaktor)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BTIC	Brain Tumor Initiating Cell
CCD	Charge-coupled Device (spezieller Digitalkamerasensor), CCD-Kameras erkennen Signale, die für das menschliche Auge unsichtbar sind, Probengrößen von 2 Kilobasen können mit der CCD-Kamera noch untersucht werden
CGH	Comparative genomic hybridization
cp	Composite Karyotype
CT	Chemotherapie
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol
D-MEM	Siehe MEM
del	Deletion= chromosomale Verluste
der	Derivative Chromosome: Strukturelle Chromosomenveränderung, verursacht durch einen Stückaustausch zwischen mehreren Chromosomen oder durch multiple Umstellungen einzelner Chromosomenabschnitte innerhalb eines Chromosoms
dmin	Double minute: azentrische, chromosomale Strukturen
EDTA	Ethylendiamintetraacid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ERBB2	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene homolog2 (Protoonkogen der EGFR-Familie)

FCS	Fetal Calfserum (Fetales Kälberserum)
FGF	Siehe bFGF
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray (Energiedosis J/kg)
i	Isochromosome
idem	Stammlinienkaryotyp in einem Subklon
IR	Irradiate (radioaktiv bestrahlt)
IUdR	Jod-Desoxyuridin
KE	ex-vivo-Kulturen
KCl	Kaliumchlorid
LOH	Loss of Heterozygosity (Heterozygotie-Verlust)
mar	Markerchromosom= strukturell abnormales Chromosom, dessen Herkunft nicht ermittelt werden kann
MEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Minus-Zeichen (-)	Chromosomale Verluste
NB	Neurobasal (Medium für stammzellähnliche Neurosphärenkultur)
NF1	Neurofibromatose-Typ-1-Gen (hemmt Zellproliferation)
NMRI strain orthotopic mouse model	Naval Medical Research Institut
Non-BTIC	Non-Brain Tumor Initiating Cell
NSC	Neural Stem Cell
P/ p	Passage
P16INK4a	Cyclin dependent Kinase Inhibitor (Zellzyklusarrest, Proliferationshemmung)
p-Arm	Kurzer, oberer Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte NaCl-Lösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIK3CA	Phosphoinositol-3-Kinase CA (fördert Zellproliferation)
PIK3R1	Phosphoinositol-3-Kinase R1 (fördert Zellproliferation)
Plus-Zeichen (+)	Chromosomale Zugewinne
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog (Apoptoseeinleitung)
q-Arm	Langer, unterer Arm eines Chromosoms
RB1	Retinoblastomgen1 (Tumorsuppressorgen)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungszahl pro Minute)
RT	Radiotherapie
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Membranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität)
t	Translocation
TP53	Tumorsuppressorgen p53

VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

VIII. Literaturverzeichnis

Azari H, Millette S, Ansari S, Rahman M, Deleyrolle LP, Reynolds BA (2011): Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp* 56, pii:3633, doi: 10.3791/3633

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

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007): CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Res* 67, 4010-4015

Debiec-Rychter M, Alwasiak J, Liberski PP, Nedoszytko B, Babinska M, Mrozek K, Imielinski B, Borowska-Lehman J, Limon J (1995): Accumulation of Chromosomal Changes in Human Glioma Progression, A Cytogenetic Study of 50 Cases. *Cancer Genet Cytogenet* 85, 61-67

deCarvalho AC, Nelson K, Lemke N, Lehman NL, Arbab AS, Kalkanis S, Mikkelsen T (2010): Gliosarcoma stem cells undergo glial and mesenchymal differentiation in vivo. *Stem Cells* 28, 181-190

Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC (2006): Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20, E1

Dropcho EJ, Soong SJ (1996): The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 1996, 47:684–90.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992): Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4309–4313

Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H (2009): Anti-glioma Therapy with Temozolomide and Status of the DNA-Repair Gene MGMT. *Anticancer Res* 29, 4845-4854

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK (2007): Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710

Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A (2006): Stem cells and brain cancer. *Cell Death Differ* 13, 5-11

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, DeVitis 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

Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SKN, Oba-Shinjo SM, Carlotti CG, Caballero OL, Simpson AJG, Brock MV, Massion PP, Carson BS, Riggins GJ (2006): PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res* 4, 709–714

Gilbertson RJ, Rich JN (2007): Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7, 733-736

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, deTribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross G, Janzer RC, Stupp R (2005): *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003

Hofer S, Merlo A (2002): Therapeutische Optionen für maligne Gliome WHO-Grad III und IV. Schweiz Med Forum Nr. 32/33, 748-755

Huhn SL, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn K, Prados MD, Feuerstein BG (1999): Chromosomal Abnormalities in Glioblastoma Multiforme by Comparative Genomic Hybridization: Correlation with Radiation Treatment Outcome. Clin Cancer Res 5, 1435-1443

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA (2002): Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-Like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers In Vitro. Glia 39, 193-206

Kang SK, Park JB, Cha SH (2006): In Focus: Neural Stem Cells, Multipotent, Dedifferentiated Cancer Stem-like Cells from Brain Gliomas. Stem Cells Dev 15, 423-435

Kauffmann GW, Moser E, Sauer R: Radiologie, 3. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München 2006a, 35-61

Kauffmann GW, Moser E, Sauer R: Radiologie, 3. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München 2006b, 477-479

Kleihues P, Ohgaki H (1999): Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol 1, 44-51

Knudson AG, Jr (1985): Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes. Cancer Res 45, 1437-1443

Kondo T (2006): Brain cancer stem-like cells. Eur J Cancer 42, 1237-1242

Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004): Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 101, 781-786

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA (2006): Tumor stem cells derived from glioblastoma cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391-403

Lee JC, Vivanco I, Beroukhi R, Huang JHY, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, Yuza Y, Xu Q, Greulich H, Thomas RK, Paez JG, Peck TC, Linhart DJ, Glatt KA, Getz G, Onofrino R, Ziaugra L, Levine RL, Gabriel S, Kawaguchi T, O'Neil K, Khan H, Liao LM, Nelson SF, Rao PN, Mischel P, Pieper RO, Cloughesy T, Leahy DJ, Sellers WR, Sawyers CL, Meyerson M, Mellinghoff IK (2006): Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 3, 2264-2273

Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, Rosenblum M, Mikkelsen T, Zenklusen JC, Fine HA (2008): Genomic Changes and Gene Expression Profiles Reveal That Established Glioma Cell Lines Are Poorly Representative of Primary Human Gliomas. *Mol Cancer Res* 6, 21-30

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4. Auflage; International Agency for Research on Cancer, Lyon 2007, 33-53

Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khattry D, Feng B, Sinha R, Louis DN, Quackenbush J, Black PM, Chin L, DePinho RA (2006): Marked Genomic Differences Characterize Primary and Secondary Glioblastoma Subtypes and Identify Two Distinct Molecular and Clinical Secondary Glioblastoma Entities. *Cancer Res* 66, 11502–11513

Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A (2010): Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 103, 317-324

Mohan D, Finkelstein SD, Swalsky PA, Sasatomi E, Wiley C, Hamilton RL, Lieberman F, Couce ME (2004): Microdissection genotyping of gliomas: therapeutic and prognostic considerations. *Mod Pathol* 17, 1346-1358

Müller M: Chirurgie für Studium und Praxis 2006/07, 8. Auflage; Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach 2006, 444-475

Nieder C, Andratschke N, Wiedenmann N, Busch R, Grosu AL, Molls M (2004): Radiotherapy for High-Grade Gliomas, Does Altered Fractionation Improve the Outcome? *Strahlenther Onkol* 7, 401-407

Nowell PC (1976): The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations, Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science* 194, 23-28

Ohgaki H, Kleihues P (2005a): Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108

Ohgaki H, Kleihues P (2005b): Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* Vol. 64, No.6, 479-498

Ohgaki H, Kleihues P (2007): Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, DiPatre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Gensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004): Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Res* 64, 6892-6899

Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2004): Getting at the Root and Stem of Brain Tumors. *Neuron* 42, 885-888

Omay SB, Vogelbaum MA (2009): Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian J Cancer* 46, 88-95

Panagiotakos G, Tabar V (2007): Brain Tumor Stem Cells. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 215-220

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006): Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173

Pilkington GJ (2005): Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Prolif* 38, 423-433

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P (2009): Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* 4, 568-580

Potten CS: *Stem Cells*, 1. Auflage; Academic Press, London 1997a, 1-27

Potten CS: *Stem Cells*, 1. Auflage; Academic Press, London 1997b, 363-399

Präve P, Faust U, Sittig W, Sukatsch DA: *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage; R Oldenbourg Verlag, München 1994, 179-205

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111

Rich JN (2007): Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Cancer Res* 67, 8980-8984

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001a, 346-366

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001b, 1075-1083

Riemenschneider MJ, Reifenberger G (2009): Novel insights into the pathogenesis of gliomas based on large-scale molecular profiling approaches. *Curr Opin Neurol* 22, 619-624

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Wilson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005): Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822

Schmitz S: Der Experimentator: Zellkultur, 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009, 9-11

Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nürnberg P, Vogel S, Jänisch W, Donis-Keller H, Ried T, Witkowski R, Cremer T (1994): Comparative Genomic Hybridization of Human Malignant Gliomas Reveals Multiple Amplification Sites and Nonrandom Chromosomal Gains and Losses. *Am J Pathol* 144, 1203-1218

Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nister M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisen J, Acker T (2010): A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* 133, 983–995

Shaffer LG, Tommerup N: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005; S. Karger AG, Basel 2005, 6-95

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks P (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005): Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996

Tabatabai G, Stupp R (2010): Angiogenesehemmung in der Neuroonkologie, Eine vielversprechende Therapiestrategie gegen maligne Gliome. *Nervenarzt* 81, 936-939

TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network) (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068

Thiel G, Marczinek K, Neumann R, Wittkowski R, Marchuk DA, Nurnberg P (1995): Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in gliomas and primitive neuroectodermal tumours. *Anticancer Res* 15, 2495–2499

Tonn JC, Westphal M, Rutka JT: *Oncology of CNS Tumors*, 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2010a, 4-14

Tonn JC, Westphal M, Rutka JT: *Oncology of CNS Tumors*, 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2010b, 77-85

Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, Chen Z, Yoshimoto K, Mischel PS, Cloughesy TF, Liau LM, Nelson SF (2006): Primary Glioblastomas Express Mesenchymal Stem-Like Properties. *Mol Cancer Res* 4, 607- 619

Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PO (2008): CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768

Weller M (2008): Chemotherapie von Hirntumoren bei Erwachsenen. *Nervenarzt* 79, 231-241

Westphal M, Hänsel M, Hamel W, Kunzmann R, Hölzel F (1994): Karyotype Analyses of 20 Human Glioma Cell Lines. *Acta Neurochir* 126, 17-26

Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, Xiao Y, Mahoney J, Protopopov A, Zheng H, Bignell G, Furnari F, Cavenee WK, Hahn WC, Ichimura K, Collins VP, Chu GC, Stratton MR, Ligon KL, Futreal PA, Chin L (2008): Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell* 13, 355–364

Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004): Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400

Danksagung

Ich danke Herrn PD. Dr. med. B. Gunawan für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. habil. E. Kim für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Frau Dr. rer. nat. habil. E. Kim war mir als ständige Ansprechpartnerin während der ganzen Zeit eine große Hilfe und hatte für alle auftretenden Schwierigkeiten und Probleme immer ein offenes Ohr.

Ein weiterer großer Dank gilt Frau J. Wolf-Salgo, die mich geduldig in die Zellkultur der Pathologie eingearbeitet hat und von der ich viel über den sorgfältigen Umgang mit Zellkulturen und der Zytogenetik lernen konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn C. Schmidt-Salue für die immer akkurate Bereitstellung und Pflege der Zelllinien bedanken.

Für die Einführung in die Pathologie und für die Motivation für eine Promotionsarbeit möchte ich mich bei Prof. Dr. med. L. Füzesi, ehemaliger Leiter der Abteilung Gastroenteropathologie des Zentrums Pathologie und Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen bedanken.

Lebenslauf

Am 13.11.1985 wurde ich als Tochter von Doris Rippl, geborene Ochs, und Helmut Leonhard Rippl in Witzenhausen geboren.

1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule in Witzenhausen. Im Herbst 1996 erfolgte der Schulwechsel an die Gesamtschule in Witzenhausen. Diesen Abschnitt der schulischen Ausbildung schloss ich im Sommer 2002 mit der Realschulreife ab. Von September 2002 bis Juni 2005 besuchte ich den Gymnasialzweig, Fachbereich Biotechnologie der Beruflichen Schulen in Witzenhausen und erhielt dort im Juni 2005 die allgemeine Hochschulreife. Im Oktober 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf.

Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im September 2007 und dem Staatsexamen im November 2011 konnte ich das Medizinstudium erfolgreich mit der Approbation abschließen.

Seit Februar 2012 bin ich als Assistenzärztin der Abteilung Medizinische Klinik des Marienkrankenhauses in Kassel tätig.