



Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Putative Tumorstammzellen mit SP-Phänotyp in  
aggressiven B-Zell-Lymphomen

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nina Diering

aus

Hamburg

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. G. Wulf

II. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Aggressive Non-Hodgkin-Lymphome . . . . .	1
1.1.1 Klassifizierung der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome	2
1.1.2 Therapie aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome . . . . .	3
1.2 Konzept der Tumorstammzelle . . . . .	4
1.2.1 Cancer Stem Cells (CSC) in soliden Tumoren . . . . .	6
1.3 Side Population . . . . .	6
1.3.1 Side Population in hämatologischen Malignomen . . . . .	7
1.3.2 Transporter der ABC-Familie . . . . .	10
1.3.3 Aldehyddehydrogenase 1-Aktivität als Marker für Progeni- torzellen . . . . .	12
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung . . . . .	13
<b>2 Material, Methoden und Patientenproben</b>	<b>14</b>
2.1 Material . . . . .	14
2.1.1 Geräte . . . . .	14
2.1.2 EDV . . . . .	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien . . . . .	16
2.1.4 Chemikalien . . . . .	17
2.1.5 Enzyme . . . . .	18
2.1.6 Kits . . . . .	19
2.1.7 Proteine . . . . .	19
2.1.8 Antikörper . . . . .	19

---

2.1.9	Primer . . . . .	20
2.1.10	PBS-Pufferlösung . . . . .	20
2.1.11	Plasmide . . . . .	21
2.1.12	Chemotherapeutika . . . . .	23
2.1.13	Hitzeinaktiviertes FCS . . . . .	23
2.1.14	Zellkulturmedien . . . . .	24
2.1.15	Zelllinien . . . . .	24
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	25
2.2.1	Kultivieren von Zellen . . . . .	25
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	25
2.2.3	Revitalisieren von Zellen . . . . .	25
2.2.4	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer . . . . .	26
2.2.5	Durchflusszytometrie . . . . .	26
2.2.5.1	Höchstfärbung . . . . .	27
2.2.5.2	Kombinierte Färbung mit Hoechst 33342 und einem Chemotherapeutikum . . . . .	28
2.2.5.3	Aldefluor <sup>®</sup> -Färbung . . . . .	28
2.2.6	Antikörperfärbung . . . . .	30
2.2.7	Zytotoxizitätstests . . . . .	30
2.2.7.1	MTT-Assay . . . . .	30
2.2.7.2	Annexin-V-Färbung . . . . .	31
2.2.8	Isolation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation . . . . .	32
2.2.9	Klonogenitätsassay . . . . .	33
2.2.10	Anlegen von Mischkulturen . . . . .	34
2.2.11	Lentivirale Transfektion . . . . .	34
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	36
2.3.1	RNA-Extraktion . . . . .	36
2.3.2	DNA-Extraktion . . . . .	37
2.3.3	RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	37
2.3.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) . . . . .	38
2.3.5	Quantitative Real-time-PCR für ABCA3 . . . . .	39
2.3.6	IgH-PCR . . . . .	40
2.3.6.1	GeneScan <sup>®</sup> . . . . .	42

---

2.3.7	Genearray . . . . .	42
2.3.7.1	Statistik . . . . .	43
2.3.8	Patientenproben und Ethik . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Höchstfärbungen . . . . .	45
3.2	Prozentualer Anteil der Side Population . . . . .	47
3.3	Aldehyddehydrogenase 1 . . . . .	48
3.4	Klonogenitätsanalyse von SP- und NSP-Zellen . . . . .	50
3.5	Isolationskulturen . . . . .	53
3.6	Resistenz der Side Population gegenüber Chemotherapeutika . . . . .	55
3.7	Bestimmung der EC <sub>50</sub> Werte . . . . .	56
3.8	Einfluss der Behandlung mit einem Zytostatikum auf die SP- und NSP-Zellen . . . . .	58
3.9	Expressionslevel von ABCA3 . . . . .	61
3.10	Mischversuche mit GFP-markierten Zellen . . . . .	62
3.11	Genearray . . . . .	63
3.11.1	Differentiell exprimierte Gene . . . . .	66
3.12	Nachweis einer Side Population in Primärmaterial . . . . .	67
3.12.1	Zugehörigkeit der detektierten Side Population zum malignen Klon . . . . .	69
3.12.1.1	IgH-PCR . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Detektion der Side Population und ihr prozentualer Anteil . . . . .	71
4.2	Eigenschaften der CSC . . . . .	73
4.3	Dynamik und Heterogenität der Side Population . . . . .	75
4.3.1	Genexpressionsdaten der aggressiven B-Zell-Lymphome . . . . .	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Rolle der CSC bei der Tumorentstehung und dem Tumorerhalt . . .	5
1.2	Darstellung der Side Population mit und ohne Zugabe von Verapamil	7
2.1	Aufbau des ABCA3-Plasmids - pEGFP-N1+ABCA3 . . . . .	21
2.2	Aufbau des pLKO.1-Plasmids . . . . .	22
2.3	Aldefluor-Färbung . . . . .	29
2.4	Prinzip der Annexin-V-Färbung . . . . .	32
3.1	Höchstfärbungen . . . . .	46
3.2	Prozentualer Anteil der Side Population in B-NHL-Zelllinien . . .	47
3.3	Aldefluor <sup>®</sup> -Färbung von Lymphomzellen . . . . .	49
3.4	Makroskopisches und Mikroskopisches Bild der Colony Assays . .	51
3.5	Colony Assays untersuchter Zelllinien . . . . .	52
3.6	Colony Assay - Daten aller Zelllinien zusammengefasst . . . . .	53
3.7	Wachstumskurven der Kulturen isolierter SP- und NSP-Zellen . .	54
3.8	Höchstfärbungen nach isolierter Kultur von SP- und NSP-Zellen. von OCI-Ly3 . . . . .	55
3.9	Resistenz der Side Population gegenüber Chemotherapeutika . . .	56
3.10	Ermittlung der EC <sub>50</sub> . . . . .	57
3.11	Durchflusszytometeranalyse der SP- und NSP-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin und anschließender Annexin-V-Färbung	59
3.12	Vitalität der SP- versus NSP-Zellen nach Behandlung mit Doxoru- bicin . . . . .	60
3.13	ABCA3-Expression . . . . .	61
3.14	Mischkulturen von OCI-Ly3 . . . . .	63
3.15	Principal Component Analysis von BALM-3, Karpas 422, OCI- Ly3, Ramos und SU-DHL-4 . . . . .	65
3.16	Differentiell exprimierte Gene in SP- und NSP-Zellen. . . . .	67
3.17	Höchstfärbungen von Primärmaterial . . . . .	68

---

3.18 Zugehörigkeit der detektierten SP-Zellen zum malignen Klon . . .	69
3.19 Genescan der SP- und NSP-Zellen aus Primärmaterial . . . . .	70

# Tabellenverzeichnis

1.1	Tumorstammzellen in soliden und hämatopoetischen Malignomen	9
2.1	Geräte . . . . .	14
2.2	EDV . . . . .	15
2.3	Verbrauchsmaterialien . . . . .	16
2.4	Chemikalien . . . . .	17
2.5	Enzyme . . . . .	18
2.6	Kits . . . . .	19
2.7	Proteine . . . . .	19
2.8	Antikörper . . . . .	19
2.9	Primer . . . . .	20
2.10	Pufferlösung . . . . .	20
2.11	Chemotherapeutika . . . . .	23
2.12	Zellkulturmedien . . . . .	24
2.13	Zelllinien . . . . .	24
2.14	Annexin-Puffer . . . . .	31
2.15	Plasmidmix . . . . .	34
2.16	Verdünnung des Transfektionsreagenzes . . . . .	35
2.17	Mastermix für die cDNA-Synthese . . . . .	38
2.18	Einstellungen am Thermocycler für die cDNA-Synthese . . . . .	39
2.19	Mastermix für die Real-time-PCR . . . . .	40
2.20	Einstellungen am Thermocycler für die TaqMan <sup>TM</sup> Real-time-PCR	40
2.21	Mastermix für die IgH-PCR . . . . .	41
2.22	Einstellungen am Thermocycler für die IgH-PCR . . . . .	42
3.1	Prozentualer Anteil der Side Population in B-NHL-Zelllinien . . . .	47
3.2	EC <sub>50</sub> Werte für Doxorubicin und Mitoxantron . . . . .	57
3.3	Anzahl der differenziell exprimierten Gene in SP- und NSP-Zellen	64

---

3.4	Prozentualer Anteil der Side Population in Patientenproben mit B-Zell NHL . . . . .	68
-----	--	----

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABC-Typ	<i>activated B-cell-like type</i>
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
API	Application Programming Interface
ATP	Adenosintriphosphat
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony-forming unit</i>
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon
CML	chronische myeloische Leukämie
COO	<i>cell of origin</i> (Ursprungszelle)
CR	<i>complete remission</i> (Vollremission)
CSC	<i>Cancer Stem Cell(s)</i> (Tumorstammzelle(n))
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DLBCL	<i>diffuse large b-cell lymphoma</i> (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus

---

EC50	<i>half maximal effective concentration (in vitro)</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötale Kälberserum)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
FL1	Fluoreszenzkanal 1
xg	x-fache Erdbeschleunigung
GCL-Typ	<i>germinal center-like type</i>
GCP	<i>good clinical practice</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
IgH	<i>immunoglobulin heavy chain</i> (Immunglobulinschwerkette)
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
IPI	<i>International Prognostic Index</i>
KI	Karnofsky-Index
LDH	Laktatdehydrogenase
L-Glut	L-Glutamin
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamid-Adenin Dinucleotid; reduzierte Form
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; reduzierte Form
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
NSP	<i>Non Side Population</i>

---

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PI	Propidiumiodid
REAL	Revised-European-American-Lymphoma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
SP	<i>Side Population</i>
TAL	Transkriptomanalyselabor
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aggressive Non-Hodgkin-Lymphome

Nachdem seit der Erstbeschreibung des M. Hodgkin in 1858 durch R. Virchow im 19ten und 20sten Jahrhundert die heute bekannten Typen der Lymphome histopathologisch beschrieben worden waren, bestanden zunächst mehrere zusammenfassende Klassifikationssysteme für Lymphome parallel. In Deutschland dominierte die Kiel - Klassifikation, während in den USA vermehrt die *Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphoma for Clinical Usage* verwendet wurde. Die erste einheitliche Klassifikation ermöglichte die REAL (*Revised-European-American-Lymphoma*)-Klassifikation im Jahr 1994 (Taylor und Hartsock 2011). Hier flossen sowohl immunhistochemische und genetische Merkmale als auch zelluläre Herkunft und klinisch relevante Eigenschaften der Lymphome in die Einteilung mit ein. Außerdem wurde das Hodgkin-Lymphom mit seinen Unterformen (klassischer Morbus Hodgkin versus Lymphozyten-prädominanter Morbus Hodgkin) ebenfalls integriert. Anschließend stellte die *World Health Organization* (WHO) ein Expertenteam zusammen und überarbeitete die REAL-Klassifikation erneut. So entstand die seit 2001 gültige "WHO-Klassifikation der Malignen Lymphome" (Stein 2000).

Die aggressiven B- und T-Zell-Lymphome (hochmaligne NHL nach der Kiel-Klassifikation) umfassen auf Basis der WHO-Einteilung alle Prä- und Post- Keimzentrumslymphome sowie die Lymphome aus Vorläuferzellen. Hierbei handelt es sich zu 85% um B- und zu 15% um T-Zell-Lymphome (Trümper et al. 2012). Das weitaus häufigste aggressive Non-Hodgkin-Lymphom ist mit 30%-40% das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (*diffuse large b-cell lymphoma* (DLBCL)), das unter anderem die zentroblastische-, die immunoblastische- und die anablastische Variante nach der Kiel-Klassifikation umfasst (Anagnostopoulos und Stein 2000). Das Burkitt-Lymphom umfasst etwa 4% aller aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome und ist somit eine sehr seltene Erkrankung. Es ist in den meisten Fällen EBV

(Epstein-Barr-Virus)-assoziiert. Das Burkitt-Lymphom wurde ursprünglich vermehrt in den Malariagebieten Afrikas beobachtet und stellt eine der häufigsten Tumorerkrankungen bei Kindern in diesen Gebieten dar. Des Weiteren finden sich HIV-assoziierte Formen und das sporadische Burkitt-Lymphom, welches eine äußerst seltene Tumorentität darstellt (Kompetenznetz Maligne Lymphome, <http://www.lymphome.de/InfoLymphome/PathologieUndKlassifikation/KlassNHL/index.jsp>). Klinisch äußert sich ein NHL vorwiegend mit meist schmerzlosen Lymphknotenschwellungen sowie mit Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Infektanfälligkeit. Häufig kommt es zu sogenannten B-Symptomen, unter denen man einen Symptomkomplex aus Fieber  $>38^{\circ}\text{C}$ , Nachtschweiß oder ungewolltem Gewichtsverlust von  $>10\%$  des Körpergewichtes innerhalb der vergangenen sechs Monate zusammenfasst (Trümper et al. 2012).

### 1.1.1 Klassifizierung der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome

Basierend auf ihren Genexpressionsprofilen wurde vorgeschlagen, innerhalb der Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome drei Subtypen, benannt nach einer vermuteten Ursprungszelle (COO, *cell of origin*), zu unterscheiden. So beschrieben im Jahre 2000 Alizadeh et al. zwei dieser Untergruppen: Zum einen den *germinal center-like*-Typ (GCL-Typ) und zum anderen den *activated B-cell like*-Typ (ABC-Typ). Auf molekulargenetischer Ebene ähneln die B-Zellen des GCL DLBCL denen des Keimzentrums, wohingegen die Zellen des ABC-Typs genetische Ähnlichkeit mit aktivierten B-Zellen des Blutes aufweisen (Staudt und Dave 2005). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich sowohl in ihren dominierenden onkogenen Signalwegen als auch in ihrer klinischen Prognose. GCL DLBCL weisen beispielsweise eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors BCL-6 auf, durch den vermutlich die Differenzierung der B-Zellen mittels Blimp-1 zu Plasmazellen blockiert wird (Alizadeh et al. 2000; Shaffer et al. 2000). In den DLBCL vom ABC-Typ steht die hohe Aktivität des nukleären Faktors kappa B (NF- $\kappa$ B) im Vordergrund, die für das Überleben des malignen Klonen von großer Bedeutung ist (Davis et al. 2001). Klinisch ist mit der Differenzierung eines DLBCL in den Typ des *activated B-cell*-Typs eine geringere Chemotherapiesuszeptibilität und kürzere Überlebensdauer assoziiert (Sweetenham 2011).

Der dritte eigenständige Subtyp wurde 2003 durch Savage et al. beschrieben und als mediastinaler Typ bezeichnet (Savage et al. 2003).

### 1.1.2 Therapie aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome

Bei den aggressiven Lymphomen handelt es sich um schnell proliferierende Tumoren, die in der Regel zeitnah nach Erstdiagnose behandelt werden müssen, um eine unmittelbare Lebensbedrohung für die Patienten abzuwenden. Prognostisch entscheidend für eine mögliche Heilung ist das rasche Herbeiführen einer Vollremission (CR) durch die Primärtherapie. Das Ziel einer CR erreichen ca. 90% aller Patienten, von denen wiederum können mehr als 50% geheilt werden. Um weitere Aussagen über die Krankheitsprognose treffen zu können, wird anhand von Risikofaktoren der Internationale Prognostische Index (IPI) berechnet. In den IPI fließen das Alter, das Stadium, extranodale Manifestationen, Karnofsky-Index (KI) und die Laktatdehydrogenase (LDH) mit ein. Bei Patienten unter 60 Jahren werden lediglich die LDH, das Stadium und der KI mit einbezogen. Keine Berücksichtigung finden die *bulky disease* (>7,5 cm) sowie die molekular- und zytogenetischen Merkmale, anhand derer die DLBC-Lymphome in den aktivierten B-Zell- (ABC) und den Keimzentrums-Typ (GCL) unterteilt werden können (Trümper et al. 2012).

Zur Primärtherapie der DLBCL wird bei Stadium I-IV eine Kombination von Zytostatika nach dem R-CHOP-Schema eingesetzt, i.e. eine Zusammenstellung aus Cyclophosphamid (Alkylanz), Hydroxy-Doxorubicin (TopoisomeraseII-Hemmer, Anthrazyklin), Vincristin (Mitosespindelgift), Prednisolon (Glukokortikoid) und Rituximab (CD20-Antikörper). Die Addition des CD20 Antikörpers zeigte signifikante Vorteile im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie und wird daher in allen Alters- und Risikogruppen eingesetzt (Boye et al. 2003). In der Regel umfasst die primäre Therapie sechs bis acht Zyklen mit den oben genannten Therapeutika, teilweise mit nachfolgender Radiotherapie. Da mehr als die Hälfte der Patienten über 60 Jahre alt ist, ist in vielen Fällen mit einer geringeren Belastbarkeit und begleitenden Vorerkrankungen zu rechnen, wodurch die Chemotherapie ggf. angepasst werden muss.

Rezidive treten meist in den ersten drei Jahren auf, in ihrer Häufigkeit mit deutlicher Abhängigkeit vom initialen Stadium und den weiteren Faktoren des IPI. Tritt das Rezidiv bereits im ersten Jahr nach Chemotherapie auf, so ist die Prognose schlecht. Zu späteren Zeitpunkten kann immer noch ein kurativer Ansatz mittels Zweitlinientherapie, z.B. mit dem DEXA-BEAM-Schema (Dexamethason

plus Carmustin (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (BCNU)) plus Etoposid plus Cytarabin plus Melphalan) oder R-DHAP-Schema (Rituximab, Dexamethason, hochdosis Cytarabin und Cisplatin) gewählt werden; wobei auch beim DEXA-BEAM-Schema eine erneute Gabe von Rituximab möglich ist. Spricht ein junger Patient (< 65 Jahre) auf die wiederholte Chemotherapie gut an, sollte eine autologe Stammzelltransplantation angestrebt werden. Ist es nach fünf Jahren noch zu keinem Rezidiv gekommen, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es auch in Zukunft nicht mehr dazu kommen wird. Nach Ablauf von etwa 10 Jahren ist jedoch ein vermehrtes Auftreten von Zweitmalignomen zu beobachten (Gisselbrecht et al. 2010; Trümper et al. 2012).

## 1.2 Konzept der Tumorstammzelle

Die drei entscheidenden Eigenschaften einer Stammzelle sind die Fähigkeit zur langfristigen Selbsterneuerung, die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung mit Hervorbringen eines Funktionsgewebes (Parenchym) und die Regulation dieser beiden Prozesse. Bevor die Idee der Existenz einer Tumorstammzelle (*cancer stem cell* (CSC)) 1997 durch die Arbeit von Bonnet und Dick ein Gesicht bekam, galt die Theorie der klonalen Evolution als Basismodell der Tumorentstehung. Dieses Modell geht von der Annahme aus, dass beliebige Zellen in einem Zellverband durch Mutationen die Fähigkeit zur klonalen Expansion erwerben. Dieses Potenzial wurde jeder Zelle im entstandenen Tumorverband zugesprochen (Nowell 1976). Ein kritikwürdiger Aspekt dieses Modells ist, dass ausdifferenzierte Zellen zumeist lediglich über eine kurze Lebensspanne verfügen und der Zeitraum, um genetische Mutationen zu akkumulieren und zu entarten somit sehr gering ausfallen würde. Stammzellen hingegen haben eine durchaus größere „Chance“, Veränderungen in der Erbsubstanz anzuhäufen (Fábián et al. 2009). Des Weiteren liefert dieses Modell keine Erklärung für die zelluläre Heterogenität innerhalb eines Tumors oder die Tatsache, dass eine große Anzahl an Tumorzellen erforderlich ist, um neues Tumorwachstum zu initiieren (Sengupta und Cancelas 2010). Die Grundlage für ein hierarchisches Tumormodell lieferten Bonnet und Dick 1997. Sie beschrieben, dass an der Basis einer hierarchisch strukturierten Leukämieerkrankung eine Population von Vorläuferzellen steht, die in der Lage ist, in NOD/SCID (*Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*)-

Mäusen eine akute myeloische Leukämie (AML) zu erzeugen. Leukämie initiiierende Zellen sind - wie gesunde hämatopoetische Progenitorzellen - durch gleichzeitig vorliegende CD34-Positivität und CD38-Negativität gekennzeichnet und liefern dadurch einen Hinweis auf ihre Verwandtschaft mit primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen (Bonnet und Dick 1997). Neben der Annahme, dass eines dieser Modelle die Tumorentstehung korrekt widerspiegelt, ist gleichzeitig eine Kombination beider Modelle denkbar, indem auch die CSC durch genetische Aberrationen zu einer neuen CSC-Population mit klonalem Evolutionspotenzial mutiert (Barabe et al. 2007). Uneinigkeit besteht noch darüber, ob es sich bei den CSC um Stammzellen im eigentlichen Sinne handelt, die durch Mutationen zu Tumorzellen geworden sind oder um Zellen, die zum Zeitpunkt der malignen Transformation in ihrer Differenzierung schon weiter fortgeschritten waren und durch genetische Veränderungen die Eigenschaften einer Stammzelle (Selbsterneuerung, asymmetrische Teilungsfähigkeit und Langlebigkeit) zurückgewonnen haben (Visvader und Lindeman 2008). Zur Erläuterung soll die folgende Abbildung aus einem Review-Artikel von Fábíán et al. aus dem Jahre 2009 dienen.

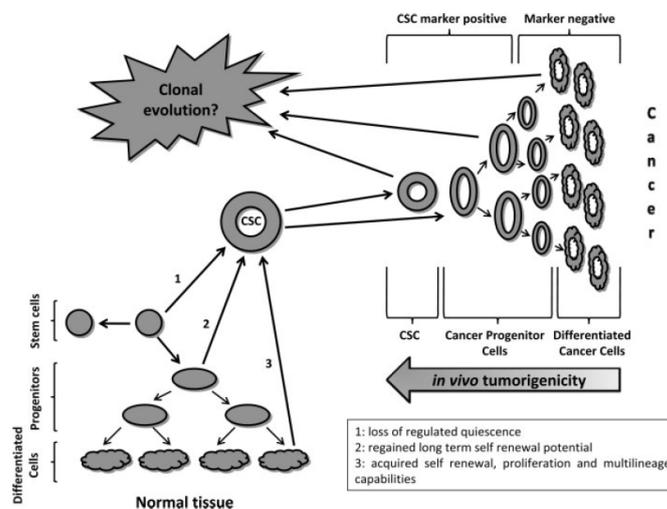


Abbildung 1.1: Rolle der CSC bei der Tumorentstehung und Tumorerhalt. Durch genetische Aberrationen erhalten Stamm-, Progenitor- oder ausdifferenzierte Zellen eines gesunden Gewebes die Eigenschaften der CSCs. Sie sorgen durch ihre Langlebigkeit und Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung für den Erhalt des Tumorgewebes. Innerhalb des Tumorgewebes können wiederum Zellen die Fähigkeit zur klonalen Evolution erwerben und ggf. sogar zur dominierenden und Tumorbologiebestimmenden Population werden. (Fábíán et al. 2009, S. 68. Mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley & Sons, © 2008 International Society for Advancement of Cytometry)

Eine weitere Ergänzung zum oben genannten Tumormodell lieferten Liang et al. und Hu et al. Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass artifiziell hervorgerufene DNA-Schädigung durch UVA-Licht bzw. Zytostatika die Ausbildung von CSCs induziert. Damit liefern sie einen entscheidenden Hinweis dafür, dass CSC möglicherweise obendrein aus Zellen innerhalb der heterogenen Tumormasse entstehen können (Liang et al. 2010; Hu et al. 2012).

### 1.2.1 Cancer Stem Cells (CSC) in soliden Tumoren

Für die Entwicklung tumorspezifischer Therapiekonzepte können die Identifizierung und Charakterisierung der oben genannten CSC von Bedeutung sein. Als Marker für Tumorstammzellen dienen bei soliden Tumoren im Wesentlichen Oberflächenproteine. So wird beispielsweise CD133 für die Identifizierung einer kleinen Zellpopulation mit hoher Tumorigenität in Prostata- (Tang et al. 2007; Mimeault und Batra 2009), Leber- (Suetsugu et al. 2006) und auch Bronchialkarzinomen (Eramo et al. 2008) verwendet. Auch CD44 wurde als möglicher Marker für CSC in soliden Tumoren vorgeschlagen. CD44 wird, häufig auch in Kombination mit weiteren Oberflächeneigenschaften, unter anderem bei Kolonkarzinomen (Ricci-Vitiani et al. 2007), Mammakarzinomen (Al-Hajj et al. 2003), Blasenkarzinomen (Chan et al. 2009) und HNO-Tumoren (Prince et al. 2007) in erhöhtem Maße auf Zellen exprimiert, die sich durch ihre Langlebigkeit und Fähigkeit zur Tumorregeneration *in vitro* oder *in vivo* auszeichnen.

## 1.3 Side Population

Als Hilfsmittel für die Identifizierung von Tumorstammzellen hat sich neben spezifischen Oberflächenproteinen ebenfalls die Höchstfärbung etabliert, mittels derer die sogenannte Side Population (SP) detektiert werden kann. Sie findet vorwiegend bei Malignomen hämatologischen Ursprungs Anwendung.

Der Grundstein zur Erforschung der Side Population wurde von Peggy Goodell und ihrer Arbeitsgruppe im Jahre 1996 gelegt. Im Fokus ihrer Arbeit stand ursprünglich die Frage, inwiefern sich der Zellzyklusstatus auf das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen im Transplantatmodell auswirkt. Für die Zellzyklusanalysen wurde der Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. Das Knochenmark

von Mäusen wurde mit diesem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Hierbei fiel eine kleine Zellpopulation auf, die sich seitlich der Hauptzellpopulation befand (daher der Name Side Population) und mit hämatopoetischen Stammzellen angereichert war (Goodell et al. 1996). Da diese Subpopulation nach Behandlung mit Verapamil nicht mehr detektiert wurde, konnte bereits an dieser Stelle die Beteiligung von ABC-Transportern am Hoechst-Efflux vermutet werden, denn der inhibierende Effekt des Calciumantagonisten Verapamil war für das P-Glykoprotein bereits bekannt (Lelong et al. 1991).

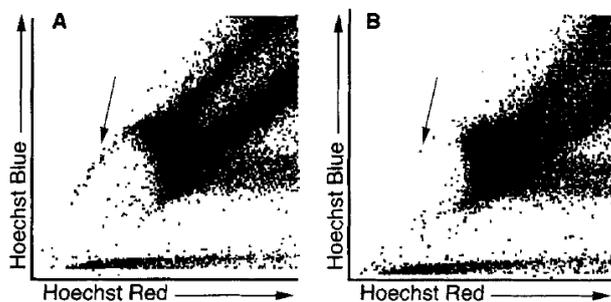


Abbildung 1.2: Darstellung der Side Population mit und ohne Zugabe von Verapamil. Das gesamte Knochenmark von Mäusen wurde mit Hoechst 33342 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Etwa 0,1% aller Zellen stellte sich als schmaler Zellausläufer abseits der Hauptpopulation (Pfeil) dar. (B) Durch Behandlung mit Verapamil war die Side Population kaum noch detektierbar (Goodell et al. 1996, S. 1802. Mit freundlicher Genehmigung des Verlages Rockefeller University Press).

Im Verlauf konnte in zahlreichen gesunden Geweben eine Side Population detektiert werden: Lunge (Summer et al. 2003), Herz (Martin et al. 2004), Haut (Larderet et al. 2006), Leber (Shimano et al. 2003), Skelettmuskulatur (Martin et al. 2004; Meeson et al. 2004), Gehirn (Kim und Morshead 2003) und Brustdrüse (Alvi et al. 2003).

### 1.3.1 Side Population in hämatologischen Malignomen

Wissend, dass die SP im gesunden Gewebe regelhaft mit hämatopoetischen Vorläuferzellen angereicht ist, versuchten Forschergruppen die Informationen für die Detektion pathologisch veränderter hämatologischer Stammzellen zu nutzen (Asakura und Rudnicki 2002). Im Jahre 2001 konnte mittels Höchstoffärbung bei

61 Patientenproben mit AML in >80% die Existenz einer Side Population nachgewiesen werden. Zudem zeigten die SP-Zellen eine erhöhte Resistenz gegen Daunorubicin und Mitoxantron, waren also auch dazu in der Lage, lipophile Chemotherapeutika auszuschleusen und somit deren zytotoxischer Wirkung in gewissem Umfang zu entgehen (Wulf et al. 2001).

Neben der AML wurde bereits der Nachweis für die Existenz einer SP in der chronischen myeloischen Leukämie (CML) erbracht. Hierfür wurde Material von Patienten untersucht, die sich in der chronischen Phase ihrer CML-Erkrankung befanden. Zellen, die sowohl zum Hoechst-Efflux befähigt als auch CD34-positiv und CD38-negativ waren, riefen in immunkompromittierten Mäusen die Produktion von bcr-abl-positiven Leukämiezellen hervor (Jørgensen und Holyoake 2007). Matsui et al. isolierten 2008 eine CD138-negative Subpopulation in humanen Multiplen Myelom-Zelllinien, die sich durch ihre Resistenz gegen Dexamethason, Lenalidomid, Bortezomib und Cyclophosphamid auszeichnete. Verglichen mit der restlichen Tumormasse wiesen diese Zellen eine signifikant erhöhte Aldehyddehydrogenase (ALDH)-Aktivität auf und waren zum Hoechst-Efflux befähigt (Matsui et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Färbung mittels Hoechst 33342 die Möglichkeit bietet, eine kleine Subpopulation zu identifizieren, die Stammeigenschaften aufweist und maßgeblich das Therapieansprechen und dessen Verlauf zu beeinflussen vermag.

Der Nachweis einer solchen Side Population in aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen steht bisher jedoch noch aus. Eine Übersicht über CSC in soliden Tumoren und hämatologischen Malignitäten kann der Tabelle 1.1 entnommen werden.

GEWEBETYP/ ZELLINIE	ART DER IDENTIFIKATION	CHARAKTERISTIKA DER TUMORSTAMMZELLEN	AUTOR
Akute myeloische Leukämie - Mensch	Hoechst-Efflux	Chemoresistenz, Tumorwachstum in vivo	(Wulf et al. 2001)
Chronisch myeloische Leukämie - Mensch	Hoechst-Efflux	Chemoresistenz, CD34+, CD38-	(Jorgensen und Holyoake 2007)
Hodgkin Lymphom - Mensch	Hoechst-Efflux	Chemoresistenz, Tumorwachstum in vitro	(Nakashima et al. 2010)
Mantelzelllymphom - Maus (transgenes Mantelzelllymphom-Blastoid Modell)	Hoechst-Efflux	ABCG2+, BCL-2+ sowie u.a. JAG1+ und NOTCH2+, Langlebigkeit, Tumorwachstum in vitro und in vivo	(Vega et al. 210)
Multiples Myelom - Mensch	Hoechst-Efflux	CD138-	(Matsui et al. 2008)
Neuroblastom - Mensch	Hoechst-Efflux	ABCG2+ und ABCA3+, Chemoresistenz	(Hirschmann-Jax et al. 2004)
Blasenkarzinom - Xenograft Mausmodell	CD44+	Tumorwachstum in vivo, CD47+	(Chan et al. 2009)
HNO-Tumoren - Mensch	CD44+	Tumorwachstum in vivo, BMI1+	(Prince et al. 2007)
Mammakarzinom - Xenograft Mausmodell	CD44+/CD24-	Tumorwachstum in vivo	(Al-Hajj et al. 2003)
Prostatakarzinom - Xenograft Mausmodell	CD44+ und CD133+	Klonogenität und Tumorwachstum in vitro und in vivo	(Tang et al. 2007; Patrawala et al. 2006)
Bronchialkarzinom - Mensch	CD133+	Langlebigkeit in vitro und Tumorwachstum in vivo	(Eramo et al. 2008)
Hepatozelluläres Karzinom - Humane Zelllinie	CD133+	Tumorwachstum in vitro und in vivo	(Suetsugu et al. 2006)
Kolonkarzinom - Mensch	CD133+	Langlebigkeit in vitro und Tumorwachstum in vivo	(Ricci-Vitiani et al. 2007)

Tabelle 1.1: Tumorstammzellen in soliden und hämatologischen Malignomen (ohne Anspruch auf Vollständigkeit)

### 1.3.2 Transporter der ABC-Familie

ABC-Transporter gehören zu einer Familie von Transmembranproteinen, deren gemeinsames Charakteristikum eine ATP (Adenosintriphosphat)-bindende Kasette ist, welcher sie ihren Namen verdanken. Unter dem Verbrauch von ATP werden mit ihrer Hilfe Substrate über intra- oder extrazelluläre Membranen transportiert (Steinbach und Legrand 2007). Bislang sind 48 Proteine dieser Familie bekannt und ihre tragende Rolle bezüglich Chemotherapiesuszeptibilität und -resistenz wurde durch multiple Arbeiten untermauert (Szakács et al. 2004; Dean 2009). Basierend auf ihrem molekularen Aufbau werden die ABC-Transporter in sieben Untergruppen von A-G eingeteilt (Ding et al. 2010).

Die vermehrte Expression dieser Transporter steht bei einer Vielzahl von hämatologischen Malignomen in direktem Zusammenhang mit einem verminderten Therapieansprechen und einer schlechteren Prognose. Besonders bei der AML, dem Non-Hodgkin-Lymphom und dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom wurde diese Korrelation beobachtet (van der Kolk et al. 2000; Greaves et al. 2012; Singh et al. 2011).

Der weitaus am längsten bekannte Transporter dieser Familie ist das P-Glykoprotein, kodiert durch das MDR1-Gen (*multidrug resistance portein 1* (MDR1, ABCB1)). Juliano und Ling wiesen dieses membranständige Protein 1976 in multidrogenresistenten Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster nach (Juliano und Ling 1976). Überdies untersuchten Cole et al. im Jahr 1996 durch Doxorubicin selektierte Zellen einer Bronchialkarzinom-Zelllinie. Diese wiesen jedoch keine einheitliche Überexpression des P-Glykoproteins auf. Die Ursache für die geringere Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin war hier nicht auf die erhöhte Aktivität des Transporters zurückzuführen. Dafür exprimierten diese Zellen vermehrt das *multidrug resistance-associated protein* (MRP), welches ebenfalls der Familie der ABC-Transporter zuzuordnen ist (Cole et al. 1992). Bis heute konnten mindestens 15 dieser energieabhängigen Transporter mit Multidrogenresistenz in Verbindung gebracht werden (Wu et al. 2011). Neben MDR1 und MRP sind ABCG2 und ABCA3 als weitere relevante Vertreter der ABC-Familie zu nennen.

ABCG2 wurde ursprünglich als *Breast Cancer Resistance Protein* in Mammakarzinomen beschrieben und ist unter anderem mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Mitoxantron, Doxorubicin und Daunorubicin assoziiert (Doyle et al. 1998). Eine erhöhte Expression von ABCG2 ist sowohl bei an AML erkrank-

ten Kindern als auch bei Erwachsenen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Steinbach et al. 2002; Uggla et al. 2005). Bei Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom korreliert eine vermehrte ABCG2-Expression sowohl mit einem verkürzten Gesamt- als auch Rezidiv-freien Überleben (Kim et al. 2009). Durch die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges und der damit verbundenen vermehrten Präsenz des Transkriptionsfaktors GLI1, wird die ABCG2-Expression in Zellen eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms hochreguliert und die Toleranz gegenüber Chemotherapeutika auf diese Weise erhöht. Besonders im Beisein stromaler Zellen steigt die Aktivität des Hedgehog-Signalweges und damit verbunden auch die ABCG2-Expression (Singh et al. 2011).

Neben lipophilen Chemotherapeutika zählt auch der DNA-bindende Farbstoff Hoechst 33342 zu den Substraten des ABCG2-Transporters (Robey et al. 2003). Bereits 2001 wiesen Zhou et al. nach, dass ABCG2 in hämatopoetischen Stammzellen vermehrt vorliegt, die Zelldifferenzierung zu unterdrücken scheint und für den SP-Phänotyp mitverantwortlich ist (Zhou et al. 2001).

Ein weiterer Transporter, der mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht wird, ist der intrazelluläre ABC-Transporter A3. Er wurde 1996 erstmals von Klugbauer und Hofmann beschrieben und als ABC-C bezeichnet. Die genetische Information für dieses Protein liegt in unmittelbarer Nähe zum MRP1 (ABCC1)-kodierenden Gen auf Chromosom 16p13.3 und weist sequenzielle Ähnlichkeiten mit den Genen für MRP1 und MDR1 (ABCB1) auf (Klugbauer und Hofmann 1996). Hirschmann-Jax et al. zeigten, dass die mittels Hoechst 33342 identifizierten SP-Zellen weniger sensitiv auf Mitoxantron reagieren als die NSP (*Non Side Population*)-Zellen und, neben ABCG2-, auch eine erhöhte ABCA3-Expression aufwiesen (Hirschmann-Jax et al. 2004). Chapuy et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der ABCA3-Expression und dem Krankheitsverlauf anhand von Primärmaterial an AML erkrankter Patienten. Eine erhöhte Expression dieses Proteins korrelierte dabei mit einer schlechteren Prognose. Des Weiteren konnte in Zelllinien und Primärproben von aggressiven B-Zell-Lymphomen mittels Realtime PCR eine stark erhöhte ABCA3-Expression festgestellt werden (Chapuy et al. 2008). Die Arbeitsgruppe von Aung et al. konnte zeigen, dass die Resistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen gegenüber therapeutischen anti-CD20 Antikörpern durch Bindung der Antikörper an Exosomen verstärkt werden kann. Für die Exosomenproduktion scheint ein

ABCA3-abhängiger Signalweg zu existieren. Die Blockade dieses Transporters verbesserte das Ansprechen der Zellen auf die Therapie deutlich (Aung et al. 2011). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ABCG2 und ABCA3 vermehrt in den SP-Zellen hämatopoetischer Malignome exprimiert werden und zur Multidrogenresistenz beitragen.

### 1.3.3 Aldehyddehydrogenase 1-Aktivität als Marker für Progenitorzellen

Aldehyddehydrogenase (ALDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches der Detoxifikation auf Ebene der Einzelzelle dient, indem es intrazelluläre Aldehyde oxidiert (Yoshida et al. 1998). Gleichzeitig spielt es eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Alkohol, Vitamin A und Cyclophosphamid, wodurch es einen wichtigen Beitrag zum Schutz der Zellviabilität leistet (Jones et al. 1995). Die erhöhte Aktivität des Isoenzym ALDH1 ist eine gut erforschte Eigenschaft hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (Pearce et al. 2005; Fallon et al. 2003; Christ et al. 2007). Neben vermehrtem Vorkommen in gesundem Gewebe ist eine erhöhte ALDH1-Expression in Tumorstammzellen der AML und des Multiplen Myeloms nachgewiesen worden (Pearce et al. 2005; Matsui et al. 2008). Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms in CSC von multiplen soliden Tumoren festgestellt (Huang et al. 2009; Croker et al. 2009; Liang und Shi 2012). In den CD44-positiven Zellen des Mammakarzinoms ist eine erhöhte ALDH1-Aktivität mit einer erhöhten Resistenz gegen radioaktive Strahlen und Chemotherapeutika assoziiert (Croker et al. 2009).

Die Methodik zur Bestimmung der Aktivität dieses zytosolischen Enzyms wurde maßgeblich durch Jones et al. geprägt. Multiple humane Leukämie-Zelllinien wurden mit dem hydrophoben Substrat Dansylaminoacetaldehyd (DAAA) behandelt, welches problemlos in die Zelle diffundieren kann. Die Aldehyddehydrogenase der Zellen oxidiert das Substrat zu Dansylglycin, das aufgrund seiner physiologischen Polarität die Zelle nicht mehr verlassen und bei 521 nm im Durchflusszytometer detektiert werden kann (Jones et al. 1995). Um Negativkontrollen für die Analyse zu erhalten, kann die ALDH mit DEAB (4-(Diethylamino)benzaldehyde) als Inhibitor behandelt werden (Russo et al. 1988). Die in dieser Arbeit verwendete Aldeffluor-Färbung basiert auf dem o.g. Prinzip (vgl. 2.2.5.3).

## 1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Cancer Stem Cells sind Zellen, die eine verminderte Suszeptibilität gegenüber multiplen Noxen aufweisen und eine entscheidende Rolle beim Tumorerhalt und dessen Repopulierung spielen. Um die therapeutischen Strategien zu verbessern gilt es, den Tumor in seiner Heterogenität besser zu verstehen und nicht nur die Tumormasse, sondern auch die möglicherweise existenten, tumorinitiierenden Zellen angreifen zu können. Dafür müssen Wege gefunden werden, diese Zellen zu demaskieren und eingehend zu charakterisieren.

Vor diesem Hintergrund sollen in dieser Arbeit für das diffuse aggressive B-Zell-Lymphom nun folgende Fragen adressiert werden:

1. Lässt sich in Zelllinien und Primärmaterialien von aggressiven B-Zell-Lymphomen reproduzierbar eine Side Population detektieren?
2. Wenn ja, besitzen diese Zellen Stammzeleigenschaften, wie die Fähigkeit zur langfristigen Expansion, ausgehend von einzelnen Zellen, und eine verminderte Suszeptibilität gegenüber Chemotherapeutika?
3. Bestehen innerhalb eines aggressiven B-Zell-Lymphoms hierarchische Strukturen der Differenzierung von Populationen oder handelt es sich um ein dynamisches System?
4. Gibt es auf molekulargenetischer Ebene Hinweise auf die Aktivierung von Signalwegen, die für die Ausprägung des SP-Phänotyps von Bedeutung sind?

## 2 Material, Methoden und Patientenproben

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen
CO <sub>2</sub> Inkubator HERA cell	Heraeus, Osterode
Dampfsterilisator Varioclav <sup>®</sup>	Thermo Scientific, Karlsruhe
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
ELISA-Reader, Modell 680	BioRad, München
FACSAria <sup>™</sup> II	BD Bioscience, Heidelberg
FACSscan	BD Bioscience, Heidelberg
Gefrierschränke:	
- -80°C; -150°C	SANYO, Wiesloch
- -20°C	Liebherr, Biberach
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Kamera:	
- hp Photosmart R742	Palo Alto, USA
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Heidolph, Bremen
Mikroskope:	
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Standard 25	Zeiss, Oberkochen
Stereomikroskop Stemi SV11	Zeiss, Oberkochen
NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	PeqLab, Erlangen
UV/Vis-Spektralphotometer	
Neubauer-Zählkammer 0,00025mm <sup>2</sup>	Brand Gläser, Wertheim
Pipetten:	
Einfach-Pipetten: 10µl, 200µl,1000µl	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.1: Geräte

pH-Meter, pH 211	HANNA Instruments, Kehl
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Osterode
Taqman-Reader 7500 HAT (ABI PRISM)	Applied Biosystems
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad (250 V; 0,5 AMP-T)	Köttermann, Hänigsen
Wipptisch, SSL4 (Stuart)	Barloworld Scientific, Staffordshire, GB
Zentrifugen:	
- Biofuge pico	Heraeus, Osterode
- Multifuge 3, Ausschwingmotor	Heraeus, Osterode
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.1: Geräte

### 2.1.2 EDV

Axio Vision 3.1	Zeiss, Oberkochen
BibTeX 0.99d	Oren Patashnik, GNU Lesser General Public License
FlowJo 5.7.26	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism <sup>®</sup> 5.03 für Windows	GraphPad Software, San Diego, USA ( <a href="http://www.graphpad.com">http:// www.graphpad.com</a> )
JabRef, reference manager	Open source
Microplate Manager 2.6	BioRad, München
MiKTeX 2.9	Christian Schenk, Berlin
OpenOffice.org 3.4.1	Apache Software Foundation, USA
R Development Core Team (2009): R: A language and environment for statistical computing	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Tabelle 2.2: EDV

SDS 2.1	Applied Biosystems, USA
Texmaker Version 3.1	Pascal Brachet, France
Windows7 Home Premium Version 6.1	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 2.2: EDV

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig
Eindrückstopfen	Sarstedt, Braunschweig
Einfrierboxen	Nalgene Labware, Rochester (USA)
Einmalkanülen:	
- BD Microlance 0,45 × 13mm; 26G1/2	BD Bioscience, Heidelberg
- mit Lanzettenschliff 2 × 70 mm	Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen
Einmalspritzen:	
- Omnifix <sup>®</sup> 10 ml / 40 I. U. Insulin- spritze	Braun, Melsungen
Gewebekulturflaschen :	
- 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Braunschweig
Gewebekulturschalen:	
- Ø 35mm	greiner bio-one, Nürtingen
Multi-Well-Platten:	
- 6-Well-Platte	greiner bio-one, Nürtingen
- 24-Well-Platte	BD Bioscience, Heidelberg
- 96-Well-Platte (Rund- und Flachbo- den)	Sartstedt, Braunschweig
- 386-Well-Platte	Abgene, Hamburg
Objektträger, 76 × 26 mm Mattrand	Knittel Gläser, Braunschweig
Parafilm <sup>®</sup>	American National Can, Chicago
Pipetten:	
- Pasteurpipetten, 230 mm	Brand, Wertheim

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

- Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Braunschweig
Pipettenspitzen, 10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Sarstedt, Braunschweig
Reaktionsgefäße, 0,5ml, 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen:	
- FACS Analyse Röhrchen 5ml	Sarstedt, Braunschweig
- FACS Analyse Röhrchen 5ml, Rundboden	BD Bioscience, Heidelberg
- Kryoröhrchen 1,8 ml	Nalgene Labware, Rochester (USA)
- Sterile Plastikröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt, Braunschweig
Sterilfilter, 50 $\mu$ m, Syringe-Type	BD Bioscience, Belgien

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

### 2.1.4 Chemikalien

ALDEFLUOR <sup>®</sup> Assay Buffer	STEMCELL Technologies, France
ALDEFLUOR <sup>®</sup> reagent	STEMCELL Technologies, France
bisBenzimide H33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Deisenhofen
Diethylaminobenzaldehyd (DEAB)	STEMCELL Technologies, France
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT, 0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
FACSFlow <sup>™</sup>	BD Bioscience, Heidelberg
Fugene 6 Reagenz	Roche, Mannheim
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Genescan 400HD Rox	Applied Biosystems
Hepes	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HiDi Formamid	Applied Biosystems
IMDM	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2.4: Chemikalien

Isopropanol	J. T. Baker, Griesheim
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Lymphoprep <sup>TM</sup>	Axis-Shield, Oslo
MethoCult <sup>®</sup> H4230 Methylcellulose without cytokines	STEMCELL Technologies, France
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polybrene <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pop7 Laufgel für Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Puffer:	
- 5× 1 <sub>st</sub> Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
- 10fach PBS	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
- 10fach Puffer für Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Random Hexamers (50 ng/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNaseOut <sup>TM</sup> (5.000 U, 40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (98%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Tabelle 2.4: Chemikalien

### 2.1.5 Enzyme

AmpliTaq Gold (5 U/μl)	Applied Biosystems
SuperScript <sup>®</sup> II RT (10.000 U; 300 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2.5: Enzyme

### 2.1.6 Kits

ALDEFUOR® Kit	STEMCELL Technologies, France
AmpliTaQ Gold Polymerase	Applied Biosystems
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
SYBR® Green Kit	QIAGEN, Hilden
SuperScript® II Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2.6: Kits

### 2.1.7 Proteine

Annexin-V-FLUOS (# 11 828 681 001)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
------------------------------------	---------------------------------

Tabelle 2.7: Proteine

### 2.1.8 Antikörper

ZIELANTIGEN	REAKTIVITÄT	LABEL	HERKUNFT
CD19	Anti-Human (Klon J4.119)	APC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
kappa/lambda Leichtketten	Anti-Human	FITC/PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD44	Anti-Human	FITC	BD Bioscience, Heidelberg

Tabelle 2.8: Antikörper

## 2.1.9 Primer

PRIMER	SEQUENZ, 5' NACH 3'	GRÖSSE	HERKUNFT
ABCA3 fw. RTQ	TTC TTC ACC TAC ATC CCC TAG	139 bp	IBA, Göttingen
ABCA3 rev. RTQ	CCT TTC GCC TCA AAT TTC CC		
$\beta$ -Aktin fw RTQ	CAC ACT GTG GCC CAT CT	99 bp	IBA, Göttingen
$\beta$ -Aktin rev. RTQ	TGA GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG		
IgH-PCR		320- 355bp	IBA, Göttingen
JH Fam-Primer	CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C (an 5' mit 6-fam markiert)		
FR1 VH1	GGC CTC AGT GAA GGT CTC CTG CAA G		
FR1 VH2	GTC TGG TCC TAC GCT GGT GAA ACC C		
FR1 VH3	CTG GGG GGT CCC TGA GAC TCT CCT G		
FR1 VH4	CTT CGG AGA CCC TGT CCC TCA CCT G		
FR1 VH5	CGG GGA GTC TCT GAA GAT CTC CTG T		
FR1 VH6	TCG CAG ACC CTC TCA CTC ACC TGT G		

Tabelle 2.9: Primer

## 2.1.10 PBS-Pufferlösung

PBS	72 g	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
	10 g	$KH_2PO_4$
	ad 5l	Aqua bidest., pH 7,4

Tabelle 2.10: Pufferlösung

### 2.1.11 Plasmide

1.

Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe, um für die TaqMan™ Real-time-PCR (vgl. 2.3.5) eine Standardkurve zu erzeugen, wurde nachfolgendes ABCA3-tragendes Plasmid eingesetzt.

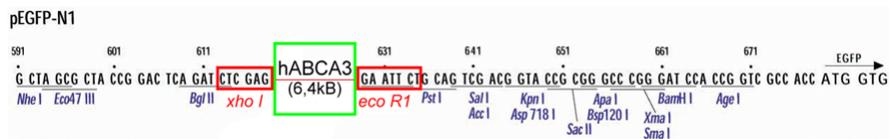
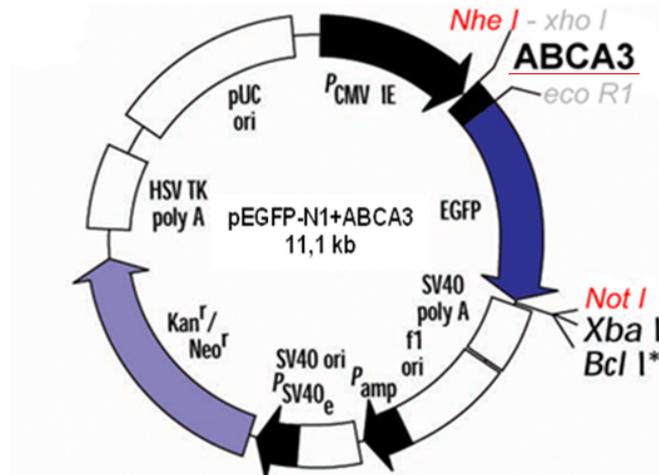


Abbildung 2.1: Aufbau des ABCA3-Plasmids - pEGFP-N1+ABCA3 (a) und die *multiple cloning site*, in welche das humane ABCA3 mit einer Größe von 6,4 kB eingefügt wurde (b) (Abb. mod. nach Cheong et al. 2006, mit freundlicher Genehmigung von Clontech).

2.

Für die Transfektion mit GFP wurde mit einem modifizierten pLKO.1-Vektor (Addgene, USA) gearbeitet, in dem die Puromycinresistenz-Kassette mittels Klonierung durch eine GFP-Kassette ausgetauscht wurde.

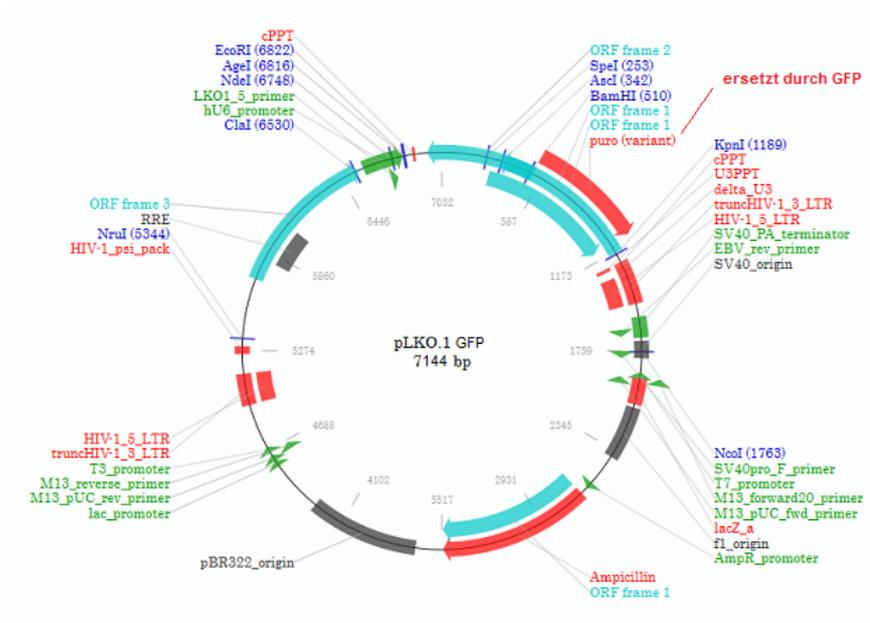


Abbildung 2.2: Aufbau des pLKO.1-Plasmids. Die Puromycinresistenz-Kassette wurde durch eine GFP-Kassette ersetzt (Schnittstellen: Kpn1/BamH1 und NgoMIV/Spe1)(Abb. mod. nach [www.addgene.org](http://www.addgene.org), 2007, mit freundlicher Genehmigung von Addgene).

### 2.1.12 Chemotherapeutika

ZYTOSTATIKUM	STOCKLÖSUNG	MOLEKULARGEWICHT	FIRMA
Novantron <sup>®</sup> (Mitoxantronhydrochlorid)	2 mg/ml	517,41 g/mol	Wyeth, Philadelphia
Daunoblastin <sup>®</sup> (Daunorubicinhydrochlorid)	2 mg/ml	563,99 g/mol	Pfizer, New York
Doxorubicinhydrochlorid	2 mg/ml	579,98 g/mol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Tabelle 2.11: Chemotherapeutika

### 2.1.13 Hitzeinaktiviertes FCS

Das verwendete FCS (Biochrom AG) wurde vor Gebrauch bei 56°C für 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert, in 50 ml-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.1.14 Zellkulturmedien

ZELLINIE	MEDIUM	HERKUNFT
RAMOS	RPMI 1640(1x), 1% L-Glut, 10% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
KARPAS 422	RPMI 1640(1x), 1% L-Glut, 10% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
SU-DHL-4	RPMI 1640(1x), 1% L-Glut, 10% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
BALM-3	RPMI 1640(1x), 1% L-Glut, 10% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
OCI-LY1	IMDM, L-Glut, 20% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
OCI-LY3	IMDM, L-Glut, 20% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
HEK293T	DMEM, 1% L-Glut, 10% FCS, 1% Pen/Strep.	Invitrogen, Karlsruhe
MEDIUM FÜR DIE TRANSFEKTION	OPTI-MEM	GIBCO-BRL, Eggenstein

Tabelle 2.12: Zellkulturmedien

### 2.1.15 Zelllinien

ZELLINIE	ENTITÄT	HERKUNFT	REFERENZ
BALM-3	DLBCL	B. Glass	LOK ET AL. 1979
HEK293	Humane Nierenzelllinie	Cheong et al. 2006	Graham et al. 1977, Cheong et al. 2006
HL-60	Myeloische Leukämie	DSMZ, Braunschweig	
KARPAS 422	GCLDLBCL	DSMZ, Braunschweig	DYER ET AL. 1990
OCI-LY1	GCLDLBCL	Mark Minden - UHN Research	Toronto, Kanada
OCI-LY3	ABCDLBCL	Mark Minden - UHN Research	Toronto, Kanada
RAMOS	Burkitt Lymphom	DSMZ, Braunschweig	KLEIN ET AL. 1975
SU-DHL-4	GCLDLBCL	DSMZ, Braunschweig	EPSTEIN ET AL. 1976

Tabelle 2.13: Zelllinien

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden in einem 37°C warmen Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Suspensionszellen gesplittet, um ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu verschaffen. Je nach Zelllinie wurden sie in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 mit frischem, 37°C warmem Medium versorgt. Zum Erhalt der Kultur wurden sie in 75 cm<sup>2</sup> i.d.R. mit 0,5-1×10<sup>6</sup> Zellen/ml gehalten. Alle 4 Wochen erfolgte die Umsetzung in neue Kulturflaschen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Um ausreichend Zellen für die Experimente zur Verfügung zu haben, wurden sie bis zu vier Tage zuvor aus 75 cm<sup>2</sup> großen in 175 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen umgesetzt.

### 2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Um dem Verlust von Zelllinien durch Kontaminationen oder menschliche Fehler vorzubeugen, wurden in regelmäßigen Abständen Zellen weggefroren. Hierfür wurden jeweils 100 µl DMSO je Kryoröhrchen vorgelegt. Nach der Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer wurden die Zellen auf eine Zielkonzentration von 1-2×10<sup>6</sup> Zellen/900 µl Medium gebracht. Je nachdem um welche Zelllinie es sich handelte, wurde entweder RPMI oder IMDM mit 20% FCS und 1% Pen/Strep. verwendet. In jedes Kryoröhrchen wurden 900 µl Zellsuspension gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 1 ml ergab. Um eine zu schnelle Abkühlung der Zellen zu verhindern, wurden die Kryoröhrchen für mindestens einen Tag in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C gelagert. Dieser gewährleistet eine kontinuierliche Abkühlung von 1°C pro Minute. Am Folgetag wurden die gefrorenen Zellen in eine -150°C kalte Gefriertruhe umgesetzt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.3 Revitalisieren von Zellen

Das Kryotube mit der gewünschten Zelllinie wurde aus dem Stickstofftank entnommen und kurz ins Wasserbad gehalten, um die Zellen unter Sicht aufzutauen. Um das bei 37°C zytotoxisch wirkende DMSO schnellstmöglich zu entfernen,

wurde die Zellsuspension, in nicht vollständig aufgetautem Zustand, mit ca. 5 ml kaltem PBS vermischt und bei 1200 rpm für 12-15 min zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet mit 1 ml 37°C warmem Medium (RPMI mit 10% FCS und 1% Pen/Strep. bzw. IMDM mit 20% FCS und 1% Pen/Strep.) resuspendiert und in eine T25-Kulturflasche überführt, in der ca. 1 ml Medium vorgelegt wurde. Je nach Zelldichte wurde noch Medium hinzugegeben. Die Kulturflasche wurde in einen 37°C warmen Brutschrank gestellt, bei 5%  $CO_2$ . Gegebenenfalls wurden die Zellen am folgenden Tag erneut mit PBS gewaschen um tote Zellen und DMSO Reste zu entfernen.

#### 2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Mit Trypan-Blau wurde eine 1:10 bis 1:100 Verdünnung hergestellt. Es wurden 4 Großquadrate nach Anleitung des Herstellers ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl = (Mittelwert aus 4 Großquadraten)  $\times 10^4 \times$  Verdünnung  $\times$  Volumen der Probe

#### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, mittels Lasertechnik relative Größe (*forward scatter*-FSC) und relative Granularität (*side scatter*-SSC) von Einzelzellen zu detektieren. Die Zellen werden in ein Trägermedium wie PBS aufgenommen und bei Durchtritt durch eine Messküvette durch Laserlicht einer definierten Wellenlänge angeregt. Die oben genannten Eigenschaften sowie die zelleigenen Fluoreszenzeigenschaften erzeugen auf diesem Wege ein Streulicht, welches mit Hilfe sensibler Detektoren quantifiziert werden kann. Des Weiteren lassen sich, unter zur Hilfenahme fluochrom-markierter Antikörper, Oberflächenproteine wie ABC-Transporter, aber auch Fluoreszenzen aus dem Zellinnern, wie zum Beispiel durch GFP (grün fluoreszierendes Protein), messen. Die Zytostatika Doxorubicin und Daunorubicin wurden im PE (Phycocerythrin, Emissionsmaximum bei 578 nm) Kanal gemessen, wohingegen Mitoxantron im APC (Allophycocyanin, Emissionsmaximum bei 660 nm) Kanal detektiert wurde. GFP wurde im FL1 (Fluoreszenzkanal 1, 500 bis 565 nm) Kanal detektiert und zur Darstellung des

Farbstoffs Hoechst 33342 wurde "Hoechst blue" (Emissionsmaximum bei 465 nm) gegen "Hoechst red" (Emissionsmaximum bei 670 nm) aufgetragen. Das Fluoreszenzverhalten wurde mit Hilfe eines 450/20 BP nm ("Hoechst blue") und 670/50 BP nm Filters ("Hoechst red") detektiert. Für diese Arbeit wurde, neben dem FACScan, das FACSAria™ II von BD Bioscience verwendet. Dieses Gerät ist mit einem Ultraviolett-Laser ausgestattet, welcher die Anregung und somit die Detektion von Hoechst 33342 ermöglicht. Gleichzeitig kann hiermit eine Zellsortierung anhand manuell markierter Zielzellpopulationen vorgenommen werden. Zur Auswertung der FACS Daten wurde das Programm Flow Jo verwendet.

### 2.2.5.1 Höchstfärbung

BisBenzimid H 33342 trihydrochlorid (Hoechst 33342) ist ein Farbstoff, der an die adenin-thyminreichen Abschnitte der DNA bindet und diese markiert. Die gesuchte Side Population (SP) verfügt über Transportproteine, mit deren Hilfe sie diesen Farbstoff in gewissen Mengen aus der Zelle ausschleusen kann. Dies ermöglicht später eine Differenzierung der Side Population. Zum ersten Mal wurde diese Färbemethode 1996 in einer Publikation von Goodell et al. im *Journal of experimental medicine* beschrieben (Goodell et al. 1996). Inzwischen ist es ein etabliertes Verfahren, um Side Population-Zellen zu identifizieren (vgl. 1.3).

Die Färbung

Die Zellsuspension aus der Brutflasche wurde in 50 ml-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer berechnet (vgl. 2.2.4). Für  $1 \times 10^6$  Zellen wurde 1 ml 37°C warmes Medium (RPMI mit 10% FCS, 1% Pen/Strep. bzw. IMDM mit 20% FCS, 1% Pen/Strep.) und 10  $\mu$ l Hoechst (Endkonzentration: 10  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 90 min bei konstanten 37°C im geschwenkten Wasserbad. Nach Ablauf der 90 min wurde die Suspension für 10 min bei 4°C mit 1200 rpm zentrifugiert. Die Kühlung beendet den Hoechst-Efflux und bildet den Endpunkt der Färbung. Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und über einen Sterilfilter in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Hinzugabe von 10  $\mu$ l Propidiumiodid (50  $\mu$ g/ml, Emissionsmaximum: 617 nm), zur Demarkierung toter Zellen, erfolgte die Analyse mit dem Durchflusszytometer (FACSAria™ II). Bis dahin wurden die Proben auf Eis gelagert.

### 2.2.5.2 Kombinierte Färbung mit Hoechst 33342 und einem Chemotherapeutikum

Um eine Idee davon zu bekommen, ob die SP-Zellen neben Hoechst auch Chemotherapeutika ausschleusen können, wurden die Zelllinien im Rahmen einer Höchstfärbung einer zusätzlichen Zytostatikabehandlung unterzogen. Zu Beginn erfolgte eine Höchstfärbung (vgl. 2.2.5.1) für 60 min bei 37°C im Wasserbad. Dann wurde zügig das Chemotherapeutikum (Daunorubicin, Doxorubicin oder Mitoxantron) hinzugegeben. Die Zielkonzentration für Mitoxantron lag bei 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , während bei Daunorubicin und Doxorubicin 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt wurden. Das Reaktionsgefäß wurde gevortext und für weitere 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Beim Wasserbad war der Schwenkmechanismus zu jedem Zeitpunkt angeschaltet. Die verwendeten Chemotherapeutika interkalieren in die DNA und können nachfolgend durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften im Durchflusszytometer detektiert werden. Um nach Ablauf der 30 min eine zu starke Abkühlung der Proben zu vermeiden, wurden sie im Anschluss nur für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Dann folgte eine erneute Höchstfärbung. Nach 15 min wurde die Färbung durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 1200 rpm beendet. Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, durch einen Sterilfilter in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Kurz vor der Analyse mit dem FACS Aria™ II wurden 10  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugegeben, um tote Zellen zu demarkieren. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Flow Jo.

### 2.2.5.3 Aldefluor®-Färbung

Alle verwendeten Reagenzien entstammen dem Aldefluor® Kit von STEMCELL Technologies und wurden nach Protokoll des Herstellers vorbereitet und verarbeitet. Aldefluor® diffundiert als nicht toxisches Substrat der Aldehyddehydrogenase (ALDH) über die Zellmembran und wird dort in das negativ geladene, fluoreszierende Produkt BODIPY®-Aminoacetat (BAA<sup>-</sup>) umgesetzt. Der beigefügte Assay Buffer verhindert den aktiven Efflux des Produktes durch Transporter der ABC-Familie. Die Stärke der emittierten Fluoreszenz bei 512 nm ist ein direktes Korrelat für die Aktivität der ALDH in viablen Zellen. Um die Fluoreszenz quantitativ bestimmen zu können, benötigt man einen Nullwert. Dieser wird mit Hilfe

einer Negativkontrolle ermittelt, welche mit Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) versetzt wird, einem spezifischen Inhibitor der ALDH.

FIGURE 1. ALDEFLUOR Assay Schematic

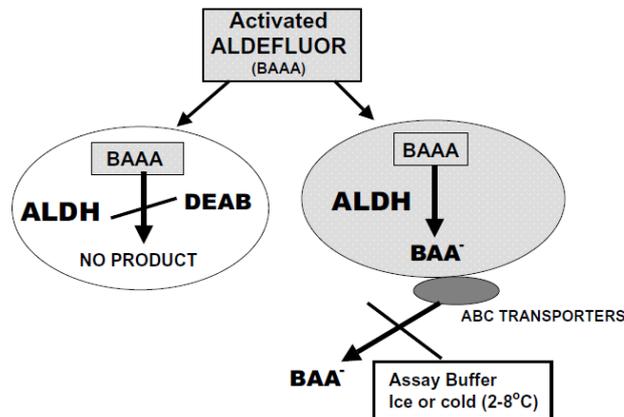


Abbildung 2.3: Funktioneller Ablauf der Aldefluor<sup>®</sup>-Färbung. (Mit freundlicher Genehmigung von STEMCELL Technologies<sup>TM</sup>)

### Vorbereitung des Aldefluor<sup>®</sup> Reagenz

Nachdem alle Reagenzien Raumtemperatur (RT) hatten, wurden 25  $\mu$ l DMSO zum trockenen Aldefluor<sup>®</sup> Reagenz gegeben, gut gemischt und 1 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 25  $\mu$ l 2N HCl dazu geben und nach gutem Mischen 15 min bei RT inkubiert. Zu guter Letzt kamen 360  $\mu$ l Aldefluor<sup>®</sup> Assay Buffer hinzu. Das nun aktivierte Aldefluor<sup>®</sup> Reagenz wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und entweder für den sofortigen Gebrauch (bis zu einer Woche) im Kühlschrank bei  $-7^{\circ}\text{C}$  gelagert oder für eine spätere Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

### Die Färbung

Für die Färbung wurden Ansätze mit je  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit Aldefluor<sup>®</sup> Assay Buffer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurden 10  $\mu$ l aktiviertes Aldefluor<sup>®</sup> Reagenz gegeben und die Proben für 45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  Grad im Wasserbad inkubiert. Als Kontrollen wurden für jeden Ansatz ein Röhrchen mit 5  $\mu$ l DEAB versetzt, welches die ALDH inhibiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 5 min bei  $250 \times g$  pelletiert, in 500  $\mu$ l Assay Buffer resuspendiert und bis zur nachfolgende Analyse am FACScan auf Eis gelagert. Die Aldefluor-Färbung bleibt laut Hersteller bis zu 24 Stunden stabil.

## 2.2.6 Antikörperfärbung

Für die Antikörperfärbungen wurden markierte Antikörper von Beckmann Coulter verwendet. Im Anschluss an eine reguläre Höchstfärbung (vgl. 2.2.5.1) wurden die Proben mit jeweils 5  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Antikörpers versetzt. Für die Antikörperfärbungen des Primärmaterials wurde ein Antikörper gegen CD19 (APC-markiert) mit einer Antikörperkombination gegen die Kappa (FITC-markiert) und Lambda (PE-markiert) Leichtkette kombiniert. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln auf Eis erfolgte nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  PI (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Emissionsmaximum: 617 nm) die Analyse im FACS Aria<sup>TM</sup> II. Als Kontrollen wurden immer Proben mitgeführt, die nur mit Hoechst 33342 gefärbt wurden.

## 2.2.7 Zytotoxizitätstests

### 2.2.7.1 MTT-Assay

Die  $\text{EC}_{50}$  Konzentrationen der Zelllinien Ramos, Karpas-422, SU-DHL-4 und BALM-3 wurden mit Hilfe des MTT-Testes ermittelt (Denizot und Lang 1986). Dieser Test dient der Vitalitätsbestimmung von Zellen. Die verwendete MTT-1-Lösung besteht aus wasserlöslichem, gelbem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; einem Tetrazoliumsals (0,05 g *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*, ad 10 ml PBS). Dieses dringt in die Zellen ein und wird dort, zum Beispiel durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase sowie durch die Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH, in wasserunlösliches, violette Formazan umgewandelt. Die MTT-2 Lösung enthält, neben 33% DMSO und 5% Ameisensäure, 62% Isopropanol, welches die Zellen zerstört und dadurch das Formazan freisetzt. Dieses kann nun photometrisch bestimmt werden.

Auf 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen wurden aufsteigende Konzentrationen von Daunorubicin, Doxorubicin oder Mitoxantron gegeben. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden in jedes Well 10  $\mu\text{l}$  MTT-1 Lösung pipetiert. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Platten für 15 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen der Überstände wurden die Zellpellets in jeweils 100  $\mu\text{l}$  MTT-2-Lösung resuspendiert. Die Extinktionen wurden mit Hilfe des ELISA-Readers bestimmt und die Ergebnisse mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.03 für Windows ausgewertet. Mit Hilfe der *curve fitting function (sigmoidal*

*dose-response, variable slope*) konnte auf dem Boden der gewonnenen Daten eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden, anhand derer die  $EC_{50}$  bestimmt werden konnte. Die  $EC_{50}$  ist diejenige Konzentration des eingesetzten Zytostatikums, bei der eine Reduktion der Viabilität um 50% erreicht wird. Um valide Ergebnisse zu erhalten, wurden für jede Konzentration der Chemotherapeutika Triplikate angesetzt. Alle Inkubationen erfolgten im Brutschrank bei  $37^{\circ}C$  mit 5%  $CO_2$ .

### 2.2.7.2 Annexin-V-Färbung

Die Annexin-V-Färbung wurde mit Annexin-V-FLUOS von Roche durchgeführt. Annexin-V ist ein Protein, welches calciumabhängig an negativ geladene Phospholipide bindet. Es hat eine sehr hohe, spezifische Affinität zu Phosphatidylserin, welches im Rahmen der Apoptose auf der Zellmembran exprimiert wird (Vermes et al. 1995). Da Phosphatidylserin auch bei nekrotischen Zellen auf der Membran zu finden ist und somit auch nekrotische Zellen Annexin-V-FLUOS-positiv sind, erfolgte die Färbung in Kombination mit Propidiumiodid, um diese zu demarkieren. Propidiumiodid kann durch seine Polarität nur bei rupturierter Zellmembran in die Zelle eindringen, sich an doppelsträngige DNA anlagern und diese somit färben (Nicoletti et al. 1991; Dengler et al. 1995). Seine Detektion erfolgt im roten Wellenlängenbereich. Annexin-V-FLUOS wird bei einer Wellenlänge von 450 nm bis 500 nm angeregt und bei 515 nm bis 565 nm (grün) detektiert (FL-1). Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometer (FACScan, BD). Aufgrund der calciumabhängigen Bindung an Phosphatidylserin erfolgte die Färbung in einem calciumhaltigen Puffer. Der Puffer wurde nach Protokoll des Herstellers wie folgt angesetzt:

10 mM HEPES/NaOH
pH 7,4
140 mM NaCl
5 mM $CaCl_2$

Tabelle 2.14: Annexin-Puffer

$1 \times 10^6$  Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen bei 1000 rpm für 10 min pelletiert und einmal mit 500  $\mu l$  PBS gewaschen (1300 rpm, 2 min). Für die Annexin-V-FLUOS-Färbung wurden 100  $\mu l$  Annexin-V-FLUOS-Puffergemisch (10  $\mu l$  Annexin-V-FLUOS in 490  $\mu l$  Annexin-Puffer) auf die Zellen gegeben. Nach kurzem

Vortexen folgte die Inkubation für 10-15 min bei 15-25°C im Dunkeln. Kurz vor der Analyse wurden die Proben mit 500  $\mu\text{l}$  Annexin-Puffer aufgefüllt und mit 100  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RPMI) versetzt. Um die optimalen Einstellungen am Durchflusszytometer zu garantieren, wurden bei jedem Durchlauf für jede Zelllinie 4 Kalibrierungsproben mitgeführt (1. Solo (nur in 500  $\mu\text{l}$  PBS) 2. PI (500  $\mu\text{l}$  PBS und 100  $\mu\text{l}$  PI (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) 3. Annexin-V (100  $\mu\text{l}$  1:50) 4. Annexin-V plus PI). Die Analyse erfolgte am FACScan (BD) nach folgendem Schema unter zur Hilfenahme von FlowYo:

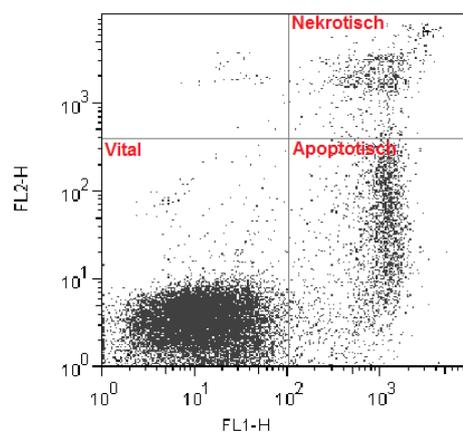


Abbildung 2.4: Prinzip der Annexin-V-Färbung. Vitale Zellen reichern weder Propidiumiodid noch Annexin-V an; sie befinden sich unten links. Durch die grüne Fluoreszenz des Annexin-V-Fluos fallen apoptotische Zellen in den rechten unteren Quadranten. Der Quadrant oben rechts enthält die PI und Annexin-V-Fluos-positiven Zellen, somit die nekrotischen.

### 2.2.8 Isolation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Monozyten) aus peripherem Blut und Knochenmarksaspiraten wurde Lymphoprep<sup>TM</sup> der Firma Axis-Shield verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus Natrium Diatrizoat (9,1%) und Polysacchariden (5,7%), dessen Dichte so eingestellt ist, dass es eine Passage von Erythrozyten und Granulozyten zulässt. Die Isolation erfolgte nach Protokoll des Herstellers durch Dichtezentrifugation. Das Material wurde 1:1 mit 0,9% NaCl verdünnt. Vorsichtig wurden in einem Reaktionsgefäß 6 ml Blut über 3 ml Lymphoprep<sup>TM</sup> geschichtet. Die Röhren wurden nachfolgend für 20 min

bei  $800\times g$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  und ohne Bremse zentrifugiert. Bei längerer vorangegangener Lagerungszeit der Proben wurde die Zentrifugationszeit auf bis zu 30 min heraufgesetzt. Laut Hersteller können antikoagulierte Blutproben noch nach bis zu 6-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur verwendet werden. Durch Aggregation sinken die Erythrozyten und Granulozyten zu Boden und eine Abgrenzung zu den, als helle Bande sichtbaren, mononukleären Zellen wird möglich. Mit Hilfe einer serologischen Pipette lassen sich diese nun leicht herauslösen. Vor ihrer weiteren Verwendung wurden sie bei  $250\times g$  für 10 min mit 0,9% NaCl gewaschen und das Pellet gewonnen.

### 2.2.9 Klonogenitätsassay

Nach der Höchstfärbung erfolgte die Sortierung am FACSAria<sup>TM</sup> II in Side Population (SP) und Non Side Population (NSP). Die Anzahl sortierter Zellen wurde ebenfalls durch das Gerät ermittelt. Die sortierten Zellen wurden bei 1200 rpm für 10 min pelletiert und das Pellet in  $110\ \mu\text{l}$  FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Methylcellulose überführt und kurz gevortext. Pro Petrischale wurden 1,5-2 ml ausplattiert. Die eingesetzte Menge an Methylcellulose orientierte sich an der durch das FACSAria<sup>TM</sup> II ermittelten, sortierten Zellzahl und den Erfahrungswerten durch vorangegangene Platten. Bei den SP-Zellen wurden zwischen  $3,8\times 10^3$  und  $1,9\times 10^4$  Zellen eingesetzt. Bei den NSP-Zellen wurden zwischen  $3,7\times 10^4$  und  $3,3\times 10^5$  Zellen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit 5%  $\text{CO}_2$ . Um eine wassergesättigte Umgebung sicherzustellen, wurde eine Gewebekulturschale mit sterilem Wasser in die Nähe der Versuchsansätze gestellt. Die Platten wurden unter dem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) nach 14 Tagen durchgehend von der gleichen Person ausgezählt. Als Kolonie bzw. CFU werden Zellverbände mit mehr als 50 Zellen gezählt. Sind es weniger, oder wachsen die Zellen diffus, spricht man von *Clustern*. Zur Dokumentation repräsentativer Kolonien und *Cluster* wurden makroskopische sowie mikroskopische Bilder mit einer Digitalkamera (hp Photosmart R742, Palo Alto, USA) bzw. dem Axiovert 100 Mikroskop gemacht.

### 2.2.10 Anlegen von Mischkulturen

GFP (grün fluoreszierendes Protein)-positive und GFP-negative OCI-Ly3 Zellen wurden mit Hoechst 33342 gefärbt, im FACS analysiert und jeweils nach SP und NSP sortiert. Im Anschluss wurden Kulturen angelegt, in denen GFP-positive SP-Zellen mit GFP-negativen NSP-Zellen und vice versa zusammengefügt wurden. Die Mischungsverhältnisse wurden an die natürlichen Bedingungen angepasst. Daher wurden bei OCI-Ly3 4% SP-Zellen eingesetzt. Die optimale Zelldichte wurde experimentell ermittelt und lag bei etwa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium. Die Zellen wurden in IMDM bzw. RPMI mit 20% FCS und 1% Pen/Strep im Brutschrank bei 37°C, mit 5%  $CO_2$ -Atmosphäre hochgezogen und sobald eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung stand erneut mit Hoechst 33342 gefärbt und im FACS analysiert. Dieser Schritt wurde im Abstand von ca. drei Tagen dreimal wiederholt. Bei jeder FACS-Analyse wurde neben Hoechst 33342 auch die GFP-Fluoreszenz detektiert.

### 2.2.11 Lentivirale Transfektion

Teil I

Gewinnung viraler Partikel

Für die lentivirale Transfektion mittels shRNA (short hairpin RNA) wurden zu Beginn HEK293T Zellen mit einer Dichte von  $2,2 \times 10^5$  Zellen in einem Gesamtvolumen von je 2,5 ml auf einer 6-Well-Platte ausplattiert. Als Medium wurde DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS ohne Zusatz von Pen/Strep verwendet. Nach Kultivierung im Brutschrank (37°, 5%  $CO_2$ ) erfolgte am folgenden Nachmittag, sofern eine 50-70% Konfluenz der Zellen erreicht war, die eigentliche Transfektion. Hierzu wurde pro Well ein Mix aus drei Plasmiden in folgenden DNA-Mengen hergestellt:

pCMV-dR8.91 (packaging)	500 ng
pMD.G-VSV-G (Virushülle)	50 ng
pLKO.1-GFP	500 ng
OPTI-MEM zum Gesamtvolumen	30 $\mu$ l

Tabelle 2.15: Plasmidmix

Das Transfektionsreagenz wurde pro Well wie folgt verdünnt:

FuGene 6 Transfection reagent	4 $\mu$ l
OPTI-MEM zum Gesamtvolumen	16 $\mu$ l

Tabelle 2.16: Verdünnung des Transfektionsreagenzes

Das FuGene 6 Reagenz wurde tröpfchenweise zum OPTI-MEM hinzugegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der bereits hergestellte Plasmidmix tröpfchenweise zum verdünnten Transfektionsreagenz gegeben und ebenfalls durch leichtes Schwenken vermengt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 20-30 min bei RT wurde der Transfektionsmix auf die HEK293T Zellen gegeben. Da die HEK293T Zellen sehr anfällig für Störfaktoren sind, erfolgte dies äußerst vorsichtig und zügig. Anschließend wurden sie für 16 h im Brutschrank inkubiert (37°, 5%  $CO_2$ ). Am dritten Tag wurde das Transfektionsmedium gegen je 2,5 ml DMEM mit 10% FCS, 1% Pen/Strep und 1% BSA (Rinderalbumin) ausgetauscht und die Zellen für 24 h zurück in den Inkubator gestellt. Durch den Zusatz von BSA kann die Ausbeute an viralen Partikeln im Überstand etwa verdoppelt werden.

40 h nach der Transfektion konnte am 4. Tag zum ersten Mal der Überstand mit viralen Partikeln gewonnen werden. Die Wells wurden danach erneut mit 2,5 ml frischem DMEM Medium aufgefüllt. Zum Abtrennen von versehentlich geernteten HEK Zellen wurden die viralen Überstände 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort verwendet oder für eine spätere Verwendung bei -80°C weggefroren. Gleiches erfolgte an Tag 5.

## Teil II

### Virale Transfektion der Zielzellen

Der gewonnene virale Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Zellmedium gemischt und auf eine 24-Well-Platte gegeben; Gesamtvolumen 1 ml. Nun wurde Polybrene<sup>®</sup> mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml hinzugegeben. In die so vorbereiteten Wells wurden dann die Zielzellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  hinzugegeben. Die virale Infektion der Zielzellen erfolgte mittels *spin oculation* für 2 h bei 2500 rpm. Im Anschluss wurde der Inhalt eines jeden Wells durch leichtes Auf- und Abpipettieren erneut gemischt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt, regulär in Kultur genommen (2.2.1) und 15 h im Inkubator stehen gelassen. Am Folgetag konnte

dann eine erneute Transfektion erfolgen. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$ /ml auf einer 24-Well-Platte mit Medium, viralem Überstand (1:1) und Polybrene<sup>®</sup> (1  $\mu$ g/ml) eingesetzt. Es wurden alle Schritte aus Teil II wiederholt.

Nach der Transfektion wurden die Zellen bis zu ihrer Verwendung täglich abzentrifugiert und mit frischem Medium versorgt. Bei den verwendeten Plasmiden für die lentivirale Transfektion handelte es sich um die Vektoren pLKO.1, pMD.G-VSV-GG sowie pCMVdR8.91.

(RNAi Consortium (TRC) <http://www.broadinstitute.org/rnai/trc>)

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits von Qiagen durchgeführt. Es wurden ausschließlich Puffer und Säulen verwendet, die dem Kit entstammen. Die RNA-Extraktion wurde an einem RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt, und es wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Für die Aufarbeitung wurden maximal  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellpellets wurden mit 350  $\mu$ l RLT-Lyse Puffer lysiert, welcher zuvor mit 1% Betamercaptoethanol versetzt wurde. Lysate, die nicht sofort extrahiert wurden, wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren, alle anderen wurden zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Lysate wurden auf Shredder-Säulen pipettiert und für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Gewonnenes Eluat wurde im Collection-tube mit 350  $\mu$ l 70%igen Ethanol gemischt und auf RNeasy-Säulen pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 1000 rpm für 15 s. Die Eluate wurden verworfen und die Säulen in einem neuen Collection-tube mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer für 15 s bei 1000 rpm gewaschen. Die Säulen wurden erneut in ein neues Collection-tube gestellt und zügig mit einem Gemisch aus 10  $\mu$ l RNase-free DNase (20  $\mu$ l Aliquots, bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert) und 70  $\mu$ l RDD-Puffer versetzt. Zum Verdau der DNA wurden die Säulen für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Säulen erneut mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer bei 1000 rpm für 15 s gewaschen und in ein neues Collection-tube gestellt. Nach zwei weiteren Waschschritten (1. 15 s bei 1000 rpm, 2. 2 min bei 14000 rpm) mit jeweils 500  $\mu$ l RPE-Puffer wurden die Säulen für 1 min bei 1400 rpm trocken zentrifugiert. Für

die RNA Elution wurden die Säulen in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit *safe-lock* gestellt. Zum Lösen der RNA wurden 30  $\mu\text{l}$  RNase-free  $H_2O$  mittig auf die Säule pipettiert und diese bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Um keine RNA in der Säule zurückzulassen, wurden noch einmal 15  $\mu\text{l}$  RNase-free  $H_2O$  mittig auf die Säule pipettiert und diese für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Unmittelbar nach Gewinnung der RNA erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop<sup>®</sup>. Wurde die RNA nicht gleich im Anschluss für die cDNA-Synthese verwendet, wurde sie bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren.

### 2.3.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNA Mini Kit von Qiagen. Alle verwendeten Puffer und Säulen stammen aus dem DNA Mini Kit des Herstellers. Es wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die Zellpellets wurden in 250  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert, 1:1 mit AL-Lysispuffer und 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K versetzt und kurz gevortext. Proteinase K wird aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* gewonnen und bewirkt, durch Spaltung von Peptidbindungen, die Freisetzung von DNA. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei  $56^\circ\text{C}$  im Wasserbad wurden die Proben mit 250  $\mu\text{l}$  100%igem Ethanol gemischt und auf die DNA-Säule gegeben. Die Säulen wurden für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säulen in einem neuen Collection-tube mit 500  $\mu\text{l}$  AW1 Waschpuffer gewaschen (13000 rpm 2 min). Nach einem weiteren Waschschrift mit 500  $\mu\text{l}$  AW2 Waschpuffer bei 13000 rpm für 3 min, wurden die trockenen Säulen zur Eluation in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit *safe-lock* gestellt. Um die DNA zu lösen, wurden 30  $\mu\text{l}$  HPLC- $H_2O$  mittig auf die Säule pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit folgte die finale Zentrifugation bei 8000 rpm für 2 min. Gleich im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop<sup>®</sup> bestimmt und die DNA bei  $-20^\circ\text{C}$  weggefroren.

### 2.3.3 RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmungen der RNA- und DNA-Proben wurde mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer von PeqLab vorgenommen. Mit Hilfe der Kombination aus fiberoptischer Xenonlichtemission und einem CCD (*charge coupled device*) Sensor reichen, durch die gegebene Oberflächenspannung

der zu messenden Probe, kleinste Volumina ( $1 \mu\text{l}$ ) aus, um die DNA- oder RNA-Konzentration photometrisch zu bestimmen. Um die Reinheit der Probe zu beurteilen, wurde die Absorption bei 230, 260 und 280 nm ermittelt und als Quotienten,  $OD_{230/260}$  und  $OD_{260/280}$ , angegeben. Das Absorptionsmaximum reiner DNA bzw. RNA liegt bei etwa 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm und das von Polysacchariden bei 230 nm. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht  $50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw.  $40 \mu\text{g/ml}$  RNA. Die  $OD_{260/280}$  sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.3.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um die gewonnene RNA in einer Real-time-PCR einzusetzen, wurde sie mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde mit der SuperScript<sup>®</sup> II Reversen Transkriptase von Invitrogen durchgeführt. Hierzu wurden die RNA-Proben auf Eis aufgetaut, je  $20 \mu\text{l}$  in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei  $65^\circ\text{C}$  für 10 min denaturiert. Nach Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  Mastermix wurde die Reaktion im Thermocycler (Biometra) gestartet. Die hierzu verwendeten Reagenzien sowie die Einstellungen für den Thermocycler können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden (vgl. Tab. 2.17 bzw. 2.18). Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren.

MASTERMIX cDNA-SYNTHESE (1 ANSATZ)	
$8 \mu\text{l}$	$5 \times 1_{st} \text{Puffer}$
$4 \mu\text{l}$	DTT (0,1 M)
$3,5 \mu\text{l}$	dNTPs (10 mM)
$2 \mu\text{l}$	Random Hexamers ( $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )
$0,25 \mu\text{l}$	RT SuperScript <sup>®</sup> II ( $300 \text{ U}/\mu\text{l}$ )
$1 \mu\text{l}$	RNaseOut <sup>™</sup> ( $40 \text{ U}/\mu\text{l}$ )
$1,25 \mu\text{l}$	RNase-free $H_2O$

Tabelle 2.17: Mastermix für die cDNA-Synthese

EINSTELLUNGEN AM THERMOCYCLER FÜR CDNA-SYNTHESE	
42°C	50 min
65°C	15 min
4°C	Pause
Zyklenzahl: 35	

Tabelle 2.18: Einstellungen am Thermocycler für die cDNA-Synthese

### 2.3.5 Quantitative Real-time-PCR für ABCA3

Zur quantitativen Genexpressionsanalyse wurde *SYBR*<sup>®</sup> Green in einer TaqMan<sup>™</sup> Real-time-PCR eingesetzt. *SYBR*<sup>®</sup> Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Unter Anregung bei 494 nm wird ein grünes Lichtsignal bei 521 nm emittiert, dessen Intensität proportional zur Menge des vorhandenen PCR-Produktes ist und am Ende eines jeden Zyklus detektiert wird. Somit kann eine Quantifizierung in Realzeit vorgenommen werden. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse lässt sich feststellen, ob es sich bei der detektierten Doppelstrang-DNA, um das zu vervielfältigende Produkt handelt. Durch langsames Erhitzen von 50 auf 94°C werden die Doppelstränge aufgetrennt, wodurch sich *SYBR*<sup>®</sup> Green herauslöst und die Fluoreszenz abnimmt. Dies geschieht bei einer für das DNA-Fragment typischen Schmelztemperatur. Als interne Kontrolle diente das „*Housekeeping-Gen*“  $\beta$ -Aktin, welches, wie auch das „Gen of interest“, als Triplikat aufgetragen wurde. Verdünnungsreihen vom ABCA3-Plasmid (pEGFP-N1+ABCA3, vgl.2.1.11) ( $10^{-3} - 10^{-9}$ ) und von cDNA der HL60 Zelllinie für  $\beta$ -Aktin ( $10^{-3} - 10^{-9}$ ) dienten zur Erstellung einer Standardkurve, welche die quantitative Bestimmung der cDNA in den Proben erlaubten. Als Negativkontrolle wurde für beide Gene steriles Wasser mitgeführt. Für beide Gene wurde ein separater Mastermix mit den jeweiligen Primern vorbereitet (vgl. Tab. 2.19). Auf einer 384-Well-Platte wurden je Ansatz 10  $\mu$ l Mastermix und 2  $\mu$ l der jeweiligen cDNA-Probe aufgebracht. Um zu gewährleisten, dass sich alle Proben gleichmäßig am Wellboden befinden, wurde die Platte nach abkleben mit einer Folie kurz anzentrifugiert, bevor sie ins TaqMan<sup>™</sup> Gerät gestellt wurde. Die Einstellungen am Thermocycler können der Tabelle 2.20 entnommen werden.

MASTERMIX FÜR DIE REAL-TIME-PCR (1 ANSATZ)	
6 $\mu$ l	SYBR®Green
0,6 $\mu$ l	Forward Primer (0,1 nmol/ $\mu$ l Stocklösung, 1:10 verdünnt)
0,6 $\mu$ l	Reverse Primer (0,1 nmol/ $\mu$ l Stocklösung, 1:10 verdünnt)
2,8 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
+ 2 $\mu$ l	cDNA

Tabelle 2.19: Mastermix für die Real-time-PCR

EINSTELLUNGEN AM THERMOCYCLER FÜR DIE TAQMAN™ REAL-TIME-PCR			
Stage 1	50°C	2 min	
Stage 2	95°C	10 min	
Stage 3	95°C	15 sec	40 Zyklen
	58°C	45 sec	
	72°C	1 min	
Stage 4	95°C	15 sec	
	60°C	15 sec	
	95°C	15 sec	

Tabelle 2.20: Einstellungen am Thermocycler für die TaqMan™ Real-time-PCR

Zur Auswertung der Daten wurde SDS2.1 verwendet. Mit Hilfe der Software lassen sich die CT-Werte (Zykluszahlen=Threshold) ermitteln, bei welchem sich die Fluoreszenz des PCR-Produktes deutlich vom Hintergrund abhebt. Setzt man diese in Beziehung mit der jeweiligen Standardkurve kann die Menge des PCR-Produktes quantitativ bestimmt werden. Für den Vergleich der Expressionen zwischen SP- und NSP-Zellen wurden diese jeweils zuerst mit der  $\beta$ -Aktin und der ABCA3-Expression ins Verhältnis gesetzt, um abschließend wiederum miteinander in Beziehung gesetzt zu werden.

### 2.3.6 IgH-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um gezielt bestimmte Abschnitte kleiner DNA-Mengen *in vitro* zu vervielfältigen. Sie besteht grundsätzlich aus drei Schritten: Denaturierung (Auftrennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge), Annealing (Anlagern der Primer) und Elongation (Polymerisation der

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) mittels Taq-Polymerase). Dieser Zyklus wird bei einer PCR 25-45 mal durchlaufen und ermöglicht auf diese Weise eine  $2^{25} - 2^{45}$ -fache Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes. Um bei den sortierten Primärproben die Zugehörigkeit der SP-Zellen zum malignen Klon zu überprüfen, wurde eine IgH-PCR auf Monoklonalität durchgeführt. Physiologischerweise kommt es im Rahmen der Differenzierung der B-Zellen zu einem V-D-J-Schwerketten-Rearrangement, welches einen großen Beitrag zur Vielfältigkeit unserer Immunglobuline leistet. Dominiert jedoch ein maligner Klon, weisen die B-Zellen alle die gleiche Schwerkette auf; sie sind monoklonal. Die PCR-Produkte weisen in dem Falle alle die gleiche Größe auf. Die verwendeten Reagenzien für einen Ansatz sowie die Einstellungen des Thermocyclers können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden (vgl. Tab. 2.21 u. 2.22).

MASTERMIX FÜR DIE IGH-PCR (1 ANSATZ)	
5 $\mu$ l	10×Puffer
3 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 $\mu$ l	dNTPs (10 mM)
1 $\mu$ l	JH fam-Primer (10 $\mu$ M)
1 $\mu$ l	FR1 VH1-6 Mix (jeweils 10 $\mu$ M)
0,2 $\mu$ l	Amplitaq Gold 5 U/ $\mu$ l
ca. 100 ng DNA	
H <sub>2</sub> O X $\mu$ l	Finales Volumen 50 $\mu$ l

Tabelle 2.21: Mastermix für die IgH-PCR

EINSTELLUNGEN AM THERMOCYCLER FÜR DIE IGH-PCR	
95°C	12 min
60°C	3 min
72°C	3 min
96°C	1 min
60°C	1 min
72°C	11 min
4°C	Pause
Zyklenzahl: 40	

Tabelle 2.22: Einstellungen am Thermocycler für die IgH-PCR

### 2.3.6.1 GeneScan®

Der GeneScan® ist ein etabliertes Verfahren, um Amplikonlängen zu detektieren. Der fluoreszierende Farbstoff ROX lagert sich am Anfang und Ende des DNA-Fragmentes an. Die Anzahl der Basenpaare wird bestimmt und in Form eines Peaks graphisch dargestellt. Liegt Monoklonalität vor, dominieren PCR-Produkte mit der gleichen Fragmentlänge und es kommt zur Ausbildung eines spezifischen Peaks. Zur Vorbereitung für den ABI PRISM GeneScan® wurde nach dem Protokoll des Herstellers 1  $\mu$ l des PCR-Produktes mit 20  $\mu$ l Formamid und 0,5  $\mu$ l ROX 400 Standard versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Analyse auf Monoklonalität konnte dann mittels GeneScan® erfolgen.

### 2.3.7 Genearray

Basierend auf der Analyse der Höchstfärbung (vgl. 2.2.5.1) wurden die Zellen von BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly3, Ramos und SU-DHL-4 mittels FACS in Side und Non Side Population sortiert und die RNA unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit von Qiagen (vgl. 2.3.1) extrahiert. Alle weiteren Schritte wurden freundlicherweise durch das Transkriptomanalyselabor (TAL, <http://www.microarrays.med.uni-goettingen.de>) der UMG durchgeführt. Zur Sicherstellung eines validen Ergebnisses wurde die RNA vor ihrer weiteren Verwendung einer Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer unterzogen und ihre Konzentration mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Im Anschluss folgten 4 standardisierte Schritte: Synthese der cRNA: 300 ng RNA wurde über cDNA in cRNA umgeschrieben.

Labeling und Fragmentierung: Die cRNA wurden nach dem Affymetrix Gene Human Array 1.0 ST Protokoll mit Biotin gelabelt und fragmentiert.

Hybridisierung: Im Anschluss an die Fragmentierung erfolgte für 16 h bei 45° und 60 rpm die Hybridisierung der Affymetrix Gene Human Arrays 1.0 ST. Die GeneChips wurden nach dem *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense target Labeling Assay manual* (Affymetrix) Protokoll gewaschen und mit GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) gefärbt.

Scannen der Arrays: Die hybridisierten Microarrays wurden im GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) gescannt und durch die Affymetrix Software sogleich einer Qualitätskontrolle unterzogen (Expression Console™). Zur Qualitätskontrolle der Microarray Analyse wurde die Quantilnormalisierung und die Analyse der differentiell exprimierten Gene mit Hilfe der Software R durchgeführt (Bolstad et al. 2003). Eine *false discovery rate* (FDR) von  $< 0,05$  (5%) wurde zum Filtern der Kandidaten verwendet. Die ersten Analysierungsschritte umfassen hierarchisches Clustern und die *Principal Component Analysis* (PCA). Die daraus resultierenden graphischen Darstellungen ermöglichen es, die Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile zu visualisieren. Weisen die genetischen Profile einen hohen Grad an Übereinstimmung auf, liegen die Punkte in der PCA nahe beieinander. Somit kann man anhand dieser Grafik erkennen, welche Expressionsprofile einander ähneln. Des Weiteren dient es zur Qualitätskontrolle. Von jeder Probe wurden Duplikate angefertigt.

### 2.3.7.1 Statistik

Um das klonogene Potenzial der SP- mit dem der NSP-Zellen zu vergleichen, wurde berechnet, wie viele Kolonien pro Zelle gebildet wurden. Diese Werte wurden mit einem t-Test für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

Um das Wachstumsverhalten der getrennt kultivierten SP- und NSP-Zellen miteinander zu vergleichen wurde für die letzten 4 Messzeitpunkte eine Two-Way ANOVA durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet. Als Wachstumsbeginn wurde jener Zeitpunkt definiert, nach welchem in den folgenden Messungen durchgehend Zellen zählbar waren und somit ein sicherer Hinweis für das einsetzende Wachstum vorlag.

Zum Vergleich der Vitalität der SP- und NSP-Zellen nach Behandlung mit Do-

xorubicin wurde ein gepaarter T-Test angewandt. Auch hier wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant gewertet.

Im Rahmen dieser Arbeit lag das besondere Augenmerk auf den differentiell exprimierten Genen der Side Population versus der Non Side Population. Um diese Gene zu detektieren wurde die Bayes-Statistik des Limma Paket (in der Software R enthalten) (Smyth 2004) verwendet. Es wurde ein genweiser t-Test durchgeführt, gefolgt von der Bestimmung des adjustierten p-Wertes via Multipler Testkorrektur gemäß der Benjamini-Hochberg Methode (Benjamini und Hochberg 1995).

### 2.3.8 Patientenproben und Ethik

Die verwendeten Patientenproben von Patienten mit einem aggressiven B-Zell-Lymphom wurden zu diagnostischen Zwecken entnommen und archiviert bzw. wären andernfalls verworfen worden. Eine zustimmende Stellungnahme der Ethikkommission zu dem Vorhaben sowie individuelle Einwilligungen der Patienten wurden eingeholt. Alle Patientenproben wurden anonymisiert und nach den Grundsätzen der Guten Klinischen Praxis (GCP) gehandhabt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Höchstfärbungen

Zur Identifizierung möglicher Tumorstammzellen wurden vor allem durchflusszytometrische Methoden beschrieben, insbesondere mittels Detektion von Stammzell-assoziierten Zelloberflächenstrukturen markiert durch monoklonale Antikörper. Neben Oberflächenmarkern wie CD133 (Collins et al. 2005; Ricci-Vitiani et al. 2007), CD34 (Kuranda et al. 2011) und CD44 (Al-Hajj et al. 2003; Fillmore und Kuperwasser 2008), oder ABC-Transportern wie ABCG2 (Martin et al. 2004), lassen sich Tumorstammzellen auch funktionell mittels Färbung mit Hoechst 33342 von der Tumormasse abgrenzen. Da dieses Verfahren bereits 2001 in Primärmaterial von Patienten mit AML erfolgreich angewandt wurde und es sich sowohl bei der AML als auch bei den aggressiven B-Zell-Lymphomen um maligne Erkrankungen des Blutes handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Hoechst 33342 verwendet werden (Wulf et al. 2001).

Zunächst wurden mit den Zelllinien BALM-3, Karpas 422, Ramos, und SU-DHL-4 Höchstfärbungen (vgl. 2.2.5.1) durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt standen mir auch die Zelllinien OCI-Ly1 und OCI-Ly3 zur Verfügung und konnten ebenfalls in die Experimente mit einbezogen werden. Es ließ sich reproduzierbar in allen Zelllinien eine Side Population detektieren.

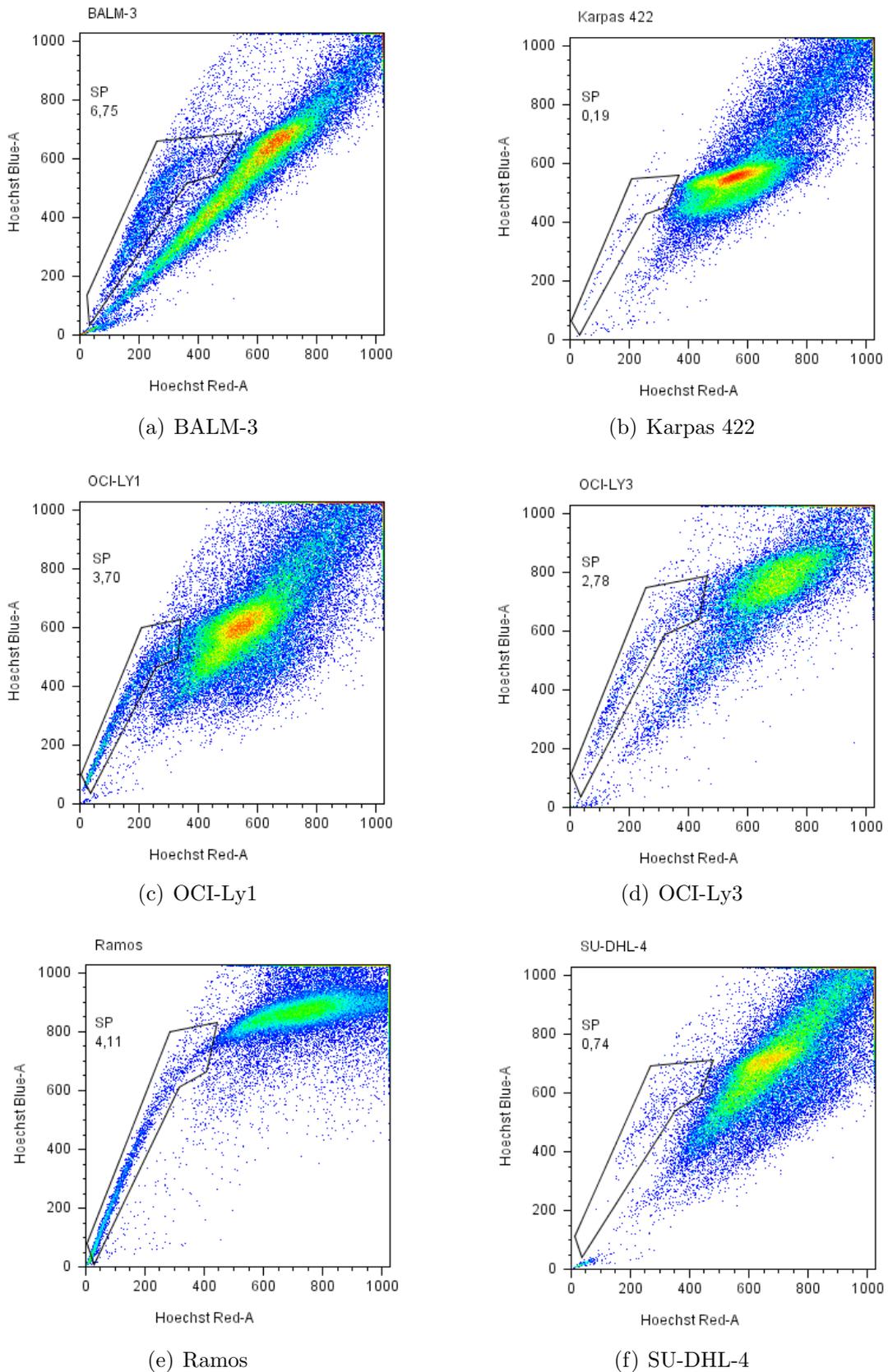


Abbildung 3.1: Höchstfärbungen. Zellen der Lymphomzelllinien BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly1, OCI-Ly3, Ramos und SU-DHL-4, wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und nach Anregung im ultravioletten Spektralbereich durch Doppelfluoreszenzanalyse durchflusszytometrisch analysiert. Die Side Population ist mit einem Areal markiert und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellmenge angegeben.

### 3.2 Prozentualer Anteil der Side Population

Gemittelt über 10 Messungen zeigten sich sowohl von Messung zu Messung als auch zwischen den Zelllinien, Schwankungen im prozentualen Anteil von SP-Zellen an der Gesamtzellzahl einer Zelllinie. Es ließ sich die kleinste Side Population mit durchschnittlich 0,29% bei SU-DHL-4 und die größte bei OCI-Ly3 mit durchschnittlich 2,96% detektieren. Karpas 422 mit 0,44, OCI-Ly1 mit 0,48, Ramos mit 1,47 und BALM-3 mit 2,80% lagen dazwischen.

ZELLINIE	MITTELWERT	STANDARDABWEICHUNG	ANZAHL DER MESSUNGEN
SU-DHL-4	0,29%	0,27	10
Karpas 422	0,44%	0,24	10
OCI-Ly1	0,48%	0,87	10
Ramos	1,47%	2,55	10
BALM-3	2,80%	1,89	10
OCI-Ly3	2,96%	2,18	10

Tabelle 3.1: Prozentualer Anteil der Side Population in B-NHL-Zelllinien

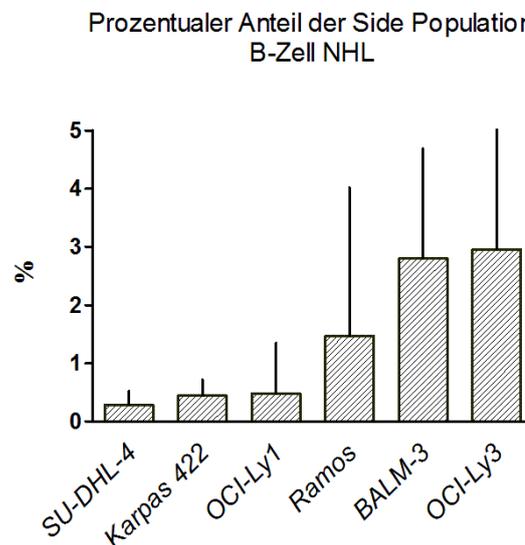
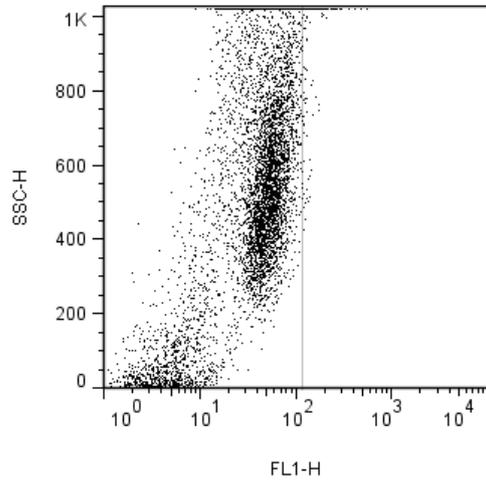


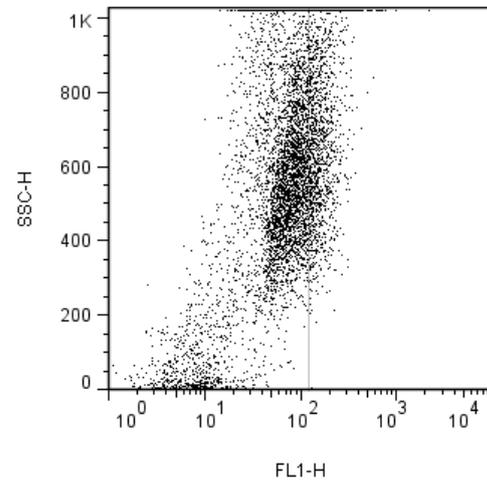
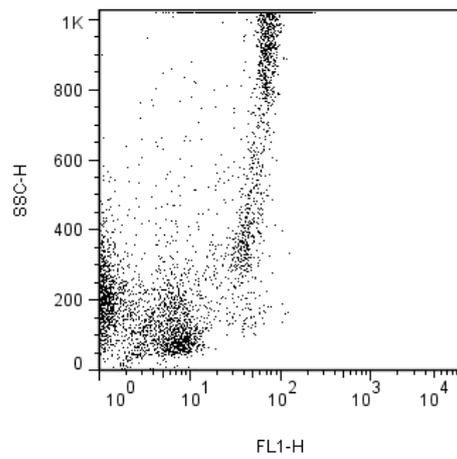
Abbildung 3.2: Prozentualer Anteil der Side Population in B-NHL-Zelllinien

### 3.3 Aldehyddehydrogenase 1

Die ALDH1-Aktivität dient als Marker sowohl für gesunde als auch für maligne Stamm- und Vorläuferzellen zahlreicher Gewebetypen, besonders jedoch für hämatopoetische Stammzellen (vgl. 1.3.3). Zur Evaluation der ALDH1-Aktivität als Marker für Tumorstammzellen in aggressiven B-Zell-Lymphomen wurden die Zelllinien BALM-3, Karpas 422, Ramos und SU-DHL-4 einer Aldefluor<sup>®</sup>-Färbung unterzogen (vgl. 2.2.5.3). Die nachfolgende Analyse der Proben erfolgte am FACS-can. Zur methodischen Kontrolle wurde gesundes Knochenmark mitgeführt. Während im Knochenmark wie erwartet eine abgrenzbare Population von 1,25% aller Zellen mit erhöhter ALDH1-Aktivität zur Darstellung kam, ließ sich eine solche Population in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisen. Eine Verschiebung der gesamten Zellpopulationen nach rechts konnte in allen Proben, Zelllinien und Knochenmark mit Aldefluor<sup>®</sup> beobachtet werden, a.e. entsprechend einer gleichmäßigen basalen ALDH1-Aktivität in allen Zellen beider Zelltypen. Die Aldefluor<sup>®</sup>-Färbung hat sich somit nicht als geeignete Methode zur Identifikation von Tumorstammzellen in Zelllinien aggressiver B-Zell-Lymphome erwiesen. Exemplarisch sind nachfolgend die Färbungen von BALM-3 und gesundem Knochenmark dargestellt (vgl. Abbildung 3.3).



(a) BALM-3 Kontrolle

(b) BALM-3 mit Aldefluor<sup>®</sup>

(c) Gesundes Knochenmark Kontrolle

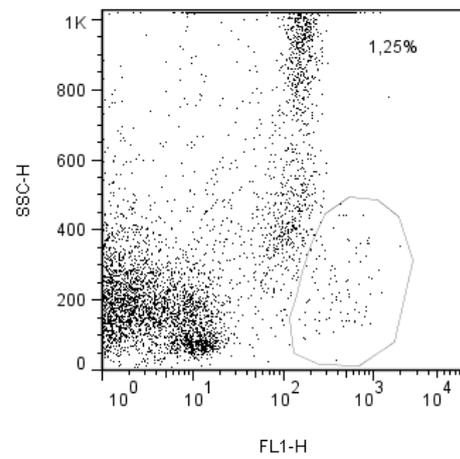
(d) Gesundes Knochenmark mit Aldefluor<sup>®</sup>

Abbildung 3.3: Aldefluor<sup>®</sup>-Färbung von Lymphomzellen. Die Zelllinie BALM-3 wurde einer Aldefluor<sup>®</sup>-Färbung unterzogen. Die Kontrollen sind mit Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) versetzt, einem Inhibitor der ALDH. Aldefluor<sup>®</sup> wird im grünen Wellenbereich detektiert. Zur methodische Kontrolle wurde gesundes Knochenmark mitgeführt. Im Gegensatz zur heterogenen Anfärbung der Zellen im Knochenmark mit Darstellung einer Subpopulation ALDH1-stark positiver Zellen waren die Lymphomzellen homogen positiv.

### 3.4 Klonogenitätsanalyse von SP- und NSP-Zellen

Eine besondere Eigenschaft von Tumorstammzellen ist ihre Fähigkeit zur klonalen Expansion, d.h. zur Ausbildung einer Tumorzellmasse ausgehend von einzelnen Zellen. Zur Beurteilung der Klonogenität durchflusszytometrisch aufgereinigter Zellpopulationen wurde daher die Koloniebildung sortierter Zellen in semisoliden Medien, im sogenannten *Colony Assay*, untersucht. Hierzu wurden, im Anschluss an eine Höchstfärbung, SP- und NSP-Zellen mit dem FACSAria™ II sortiert und in Methylcellulose auf Petrischalen aufgebracht. Nach 14-tägiger Inkubation wurden die Kolonien unter dem Stereomikroskop ausgezählt. Die Zellzahl, die nötig war, um nach 14 Tagen Kolonien in abzählbarer Dichte, i.e. 10-400 Kolonien pro Zellkulturplatte mit 3,5 cm Durchmesser, zu erhalten, wurde experimentell ermittelt. Während bei Ramos  $3,9 \times 10^4$  NSP-Zellen ausreichten, um Kolonien zu erzeugen, mussten bei BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly3, OCI-Ly1 und SU-DHL-4 ca.  $1 \times 10^5$  eingesetzt werden. Demgegenüber standen deutlich niedrigere Mindestzellzahlen bei den SP-Zellen: Bei BALM-3 und Ramos genügten ca.  $3,8 \times 10^3$ , bei Karpas-422 und SU-DHL-4 ca.  $5,6 \times 10^3$  SP-Zellen zur Anzucht von Kolonien. Bei der Zelllinie OCI-Ly3 mussten mit  $6,0 \times 10^3$  die meisten Zellen eingesetzt werden. Besonders bei Ramos und BALM-3 tendierten die NSP-Zellen vermehrt zu einem diffusen Wachstum in *Clustern* als zur Ausbildung definierter Kolonien.

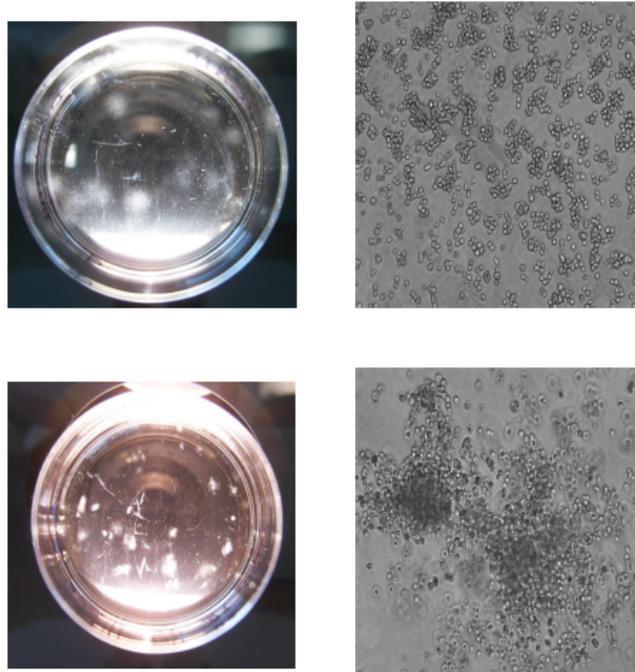
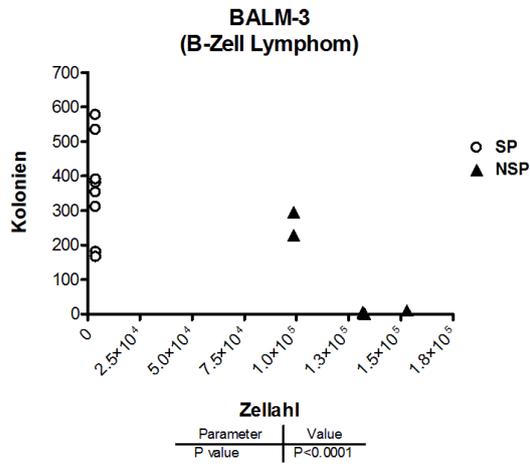
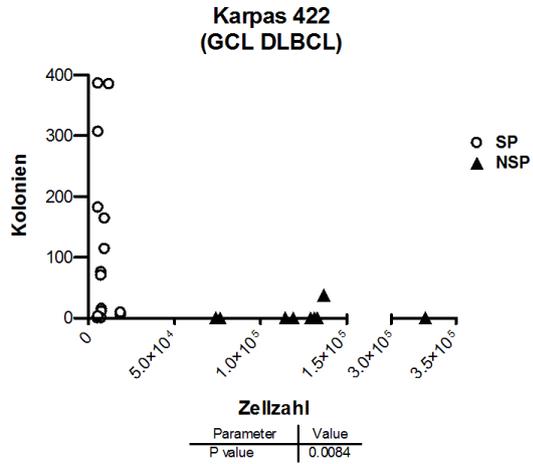


Abbildung 3.4: Makroskopisches und Mikroskopisches Bild der Colony Assays. Links: Methycellulose-Platten von SU-DHL-4 NSP-Zellen (oben) und SP-Zellen (unten). Rechts: Mikroskopische Aufnahmen der jeweiligen Platten. Es wurden  $1,5 \times 10^5$  NSP- und  $5,7 \times 10^3$  SP-Zellen eingesetzt.

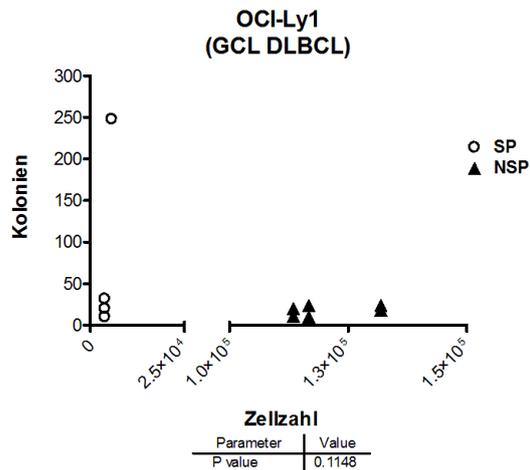
Über alle getesteten Zelllinien hinweg zeigten die SP-Zellen eine deutlich höhere Klonogenität als die NSP-Zellen. Mit Ausnahme von OCI-Ly1 (p-Wert=0,1148) wurden durch die Zellen der SP signifikant mehr Kolonien gebildet. Mit diesen Ergebnissen konnte eine entscheidende Eigenschaft von Tumorstammzellen, die Fähigkeit zur klonalen Expansion, auch bei den SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphom-Zelllinien *in vitro* nachgewiesen werden. In den nachfolgenden Diagrammen 3.5 und 3.6 sind die Daten der Colony Assays aller Zelllinien graphisch dargestellt.



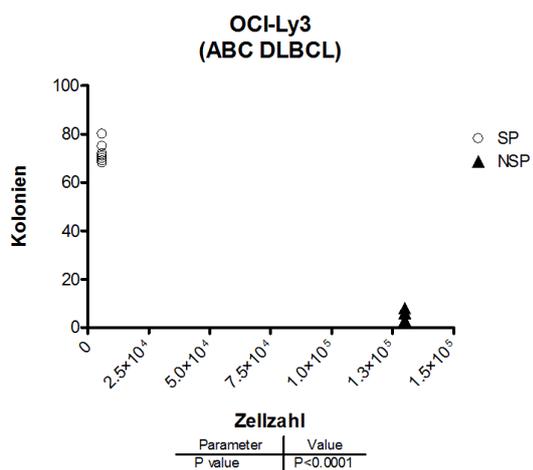
(a) Colony Assay BALM-3



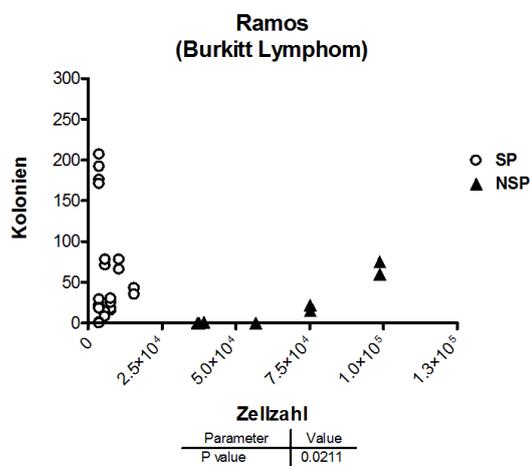
(b) Colony Assay Karpas 422



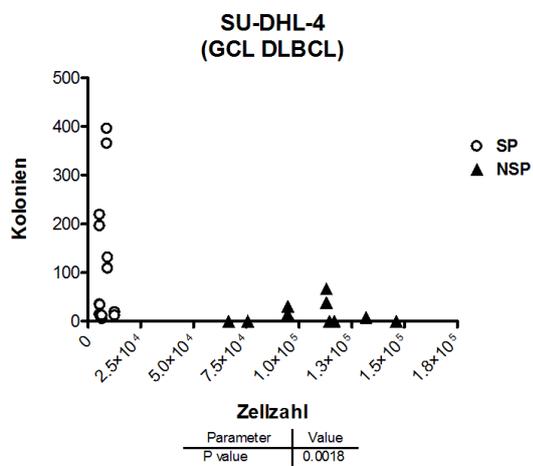
(c) Colony Assay OCI-Ly1



(d) Colony Assay OCI-Ly3



(e) Colony Assay Ramos



(f) Colony Assay SU-DHL-4

Abbildung 3.5: Colony Assays untersuchter Zelllinien. Die Zellen wurden, basierend auf der Höchstfärbung nach SP und NSP sortiert, separiert und auf Methylcelluloseplatten aufgebracht. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien unter dem Stereomikroskop ausgezählt.

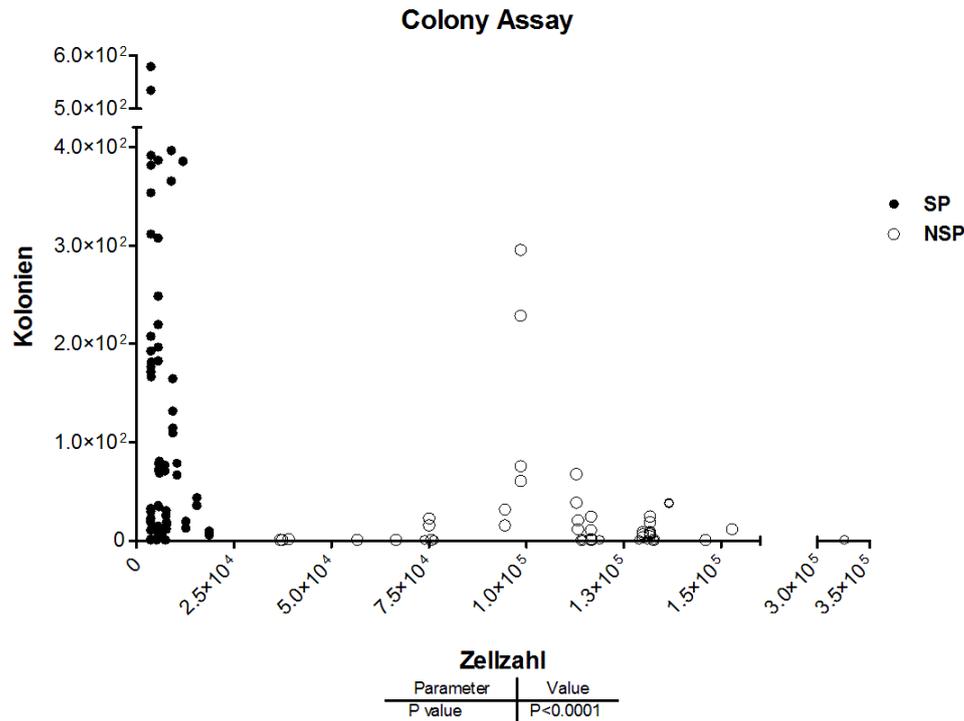


Abbildung 3.6: Colony Assay - Daten aller Zelllinien zusammengefasst. Die Zellen wurden basierend auf der Höchstfärbung nach SP und NSP sortiert, separiert und auf Methylcelluloseplatten aufgebracht. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien unter dem Stereomikroskop ausgezählt.

### 3.5 Isolationskulturen

Nachdem die Anreicherung der Koloniebildungskapazität in den SP-Zellen beobachtet worden war, stellte sich die Frage, ob diese sich auch auf die Situation des Zellwachstums in Suspensionskultur übertragen lies. Des Weiteren eröffnete sich so die Möglichkeit, nach erfolgreicher Anzucht der SP- bzw. NSP-Zellen eine erneute Höchstfärbung anzuschließen. So ließ sich beurteilen, ob in den isolierten Zellkulturen die jeweils andere Subpopulation wieder nachweisbar wurde. Hierzu wurden erneut Höchstfärbungen mit nachfolgender Sortierung durchgeführt. Im Anschluss wurden gleiche Zellmengen von SP- und NSP-Zellen in Kultur genommen. Je nach Zellwachstumsgeschwindigkeit wurde an Tag 4 oder 5 der Anzucht begonnen, alle drei Tage die Gesamtzellzahl in den Kulturen zu ermitteln. Nach Ablauf von ca. 3 Wochen, vorausgesetzt es standen genügend Zellen zur

Verfügung, wurden erneut Höchstfärbungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche präsentierten sich wie folgt: Bei insgesamt 28 Experimenten war es nur in 10 Fällen (35,71%) möglich, mindestens eine der Subpopulationen hochzuziehen. In 9 dieser 10 Versuche konnten die NSP-Zellen entweder gar nicht erst kultiviert werden, i.e. in 4 Fällen, oder zeigten ein deutlich schwächeres Wachstum gegenüber den SP-Zellen, in 5 Fällen. Der Wachstumsbeginn der NSP-Zellen war in 4 der zuletzt genannten 5 Fälle um mindestens einen Messzeitpunkt verzögert. In der Abbildung 3.7 ist das Wachstumsverhalten der beiden Populationen exemplarisch für OCI-Ly3 und BALM-3 dargestellt. Hier zeigen die SP-Zellen ein signifikant schnelleres Wachstum als die NSP-Zellen (P-Wert 0,0003 bzw.  $< 0,0001$ ).

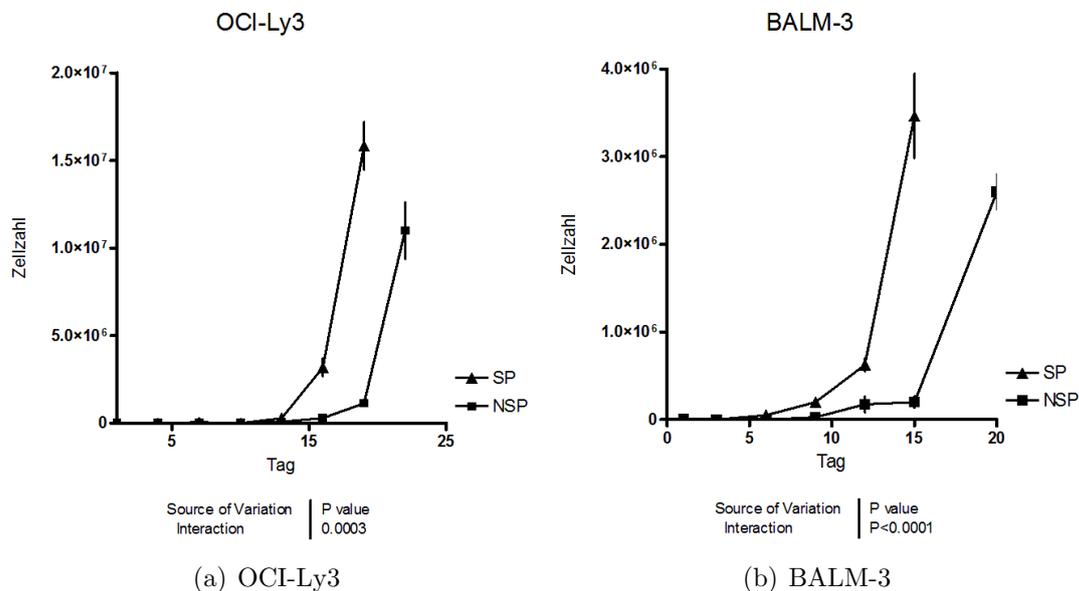
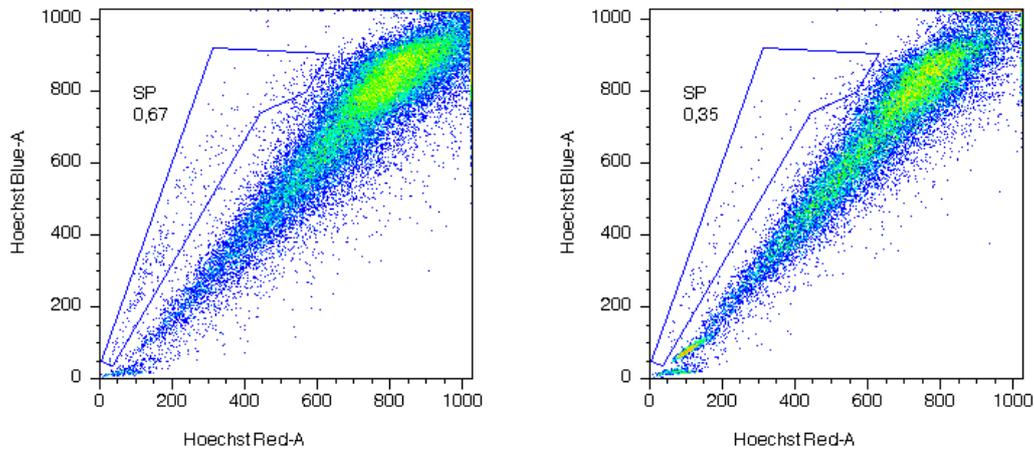


Abbildung 3.7: Wachstumskurven der Kulturen isolierter SP- und NSP-Zellen von OCI-Ly3 (a) und BALM-3 (b). Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und anschließend im durchflusszytometrischen Sortiergerät nach SP und NSP sortiert. Gleiche Zellzahl der beiden Populationen wurden getrennt in Kultur genommen. Ab dem 3. bzw. 4. Tag wurde alle drei Tage die Zellzahl bestimmt.

Bei einer erneuten Höchstfärbung konnten sowohl in der SP- als auch der NSP-Zellkultur beide Zellpopulationen mittels Höchstfärbung nachgewiesen werden. Exemplarisch ist dies in der nachfolgenden Abbildung 3.8 der gefärbten SP- und NSP-Isolationskulturen von OCI-Ly3 nachzuvollziehen.



(a) SP von OCI-Ly3

(b) NSP von OCI-Ly3

Abbildung 3.8: Höchstoffärbungen nach isolierter Kultur von SP- und NSP-Zellen von OCI-Ly3. Sobald in den Isolationskulturen  $1 \times 10^7$  Zellen zur Verfügung standen, wurden diese erneut einer Höchstoffärbung unterzogen und im Durchflusszytometer analysiert.

### 3.6 Resistenz der Side Population gegenüber Chemotherapeutika

Da die Darstellung der SP-Zellen im Durchflusszytometer auf ihrer Eigenschaft zum Hoechst-Efflux basiert, sollte überprüft werden, ob diese Zellen auch zum Efflux von Chemotherapeutika befähigt sind. In Anlehnung an die Arbeit von Wulf et al. 2001 (vgl. 1.3.1) wurden die Zelllinien mit einer Kombination aus Hoechst 33342 und Mitoxantron, Daunorubicin oder Doxorubicin behandelt. Alle drei Zytostatika dringen in den Zellkern vor, interkalieren in die DNA und können durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften mit dem Durchflusszytometer detektiert werden. Die mittels Höchstoffärbung identifizierte Side Population wurde erfasst und ihre Fluoreszenz, hervorgerufen durch die Chemotherapeutika, mit der der Non Side Population verglichen. Nach Behandlung mit Doxorubicin präsentierte sich ein sehr inkonsistentes Bild, wohingegen bei Mitoxantron und Daunorubicin in allen Zelllinien, mit Ausnahme von OCI-Ly3, eine erniedrigte Fluoreszenz durch die chemotherapeutischen Substanzen in den SP-Zellen

gemessen werden konnte. Die geringer ausgeprägte Fluoreszenz der Side Population kann den nachfolgenden Histogrammen 3.9 exemplarisch für BALM-3 (a) und SU-DHL-4 (b) entnommen werden.

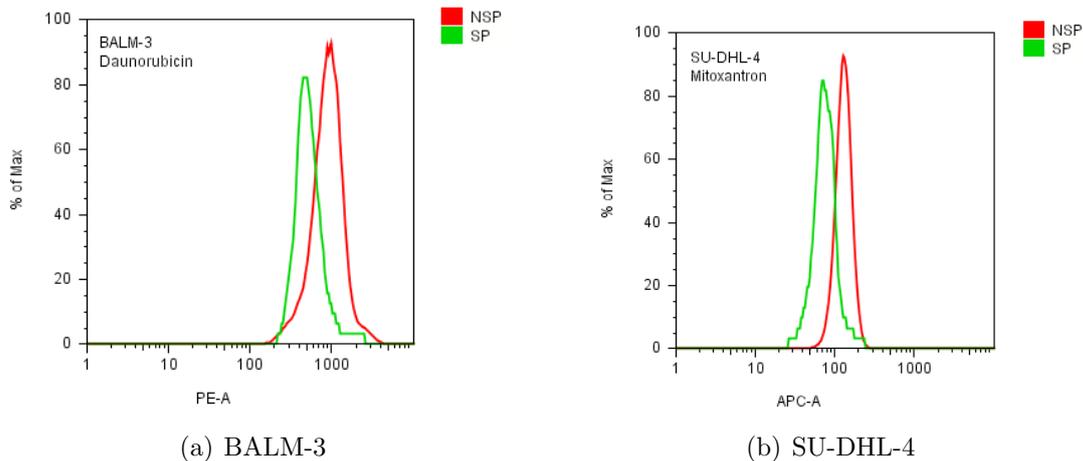


Abbildung 3.9: Resistenz der Side Population gegenüber Chemotherapeutika. Zellen der Zelllinien (a) BALM-3 und (b) SU-DHL-4 wurden mit Hoechst 33342 gefärbt, für 30 min. mit  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  Daunorubicin bzw.  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Mitoxantron inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die durch das Chemotherapeutikum hervorgerufene Fluoreszenz konnte im PE-Kanal (Daunorubicin) bzw. im APC-Kanal (Mitoxantron) detektiert werden.

### 3.7 Bestimmung der $EC_{50}$ Werte

Um in Folgeversuchen mit adäquaten Konzentrationen der Chemotherapeutika arbeiten zu können, sollten für die untersuchten Zelllinien individuelle  $EC_{50}$  Werte für Mitoxantron und Doxorubicin, welches im Rahmen der R-CHOP Therapie (vgl. 1.1.2) häufig klinisch zum Einsatz kommt, ermittelt werden. Die  $EC_{50}$  ist diejenige Konzentration des eingesetzten Zytostatikums, bei der eine Reduktion der Viabilität um 50% erreicht wird. Hierzu wurden MTT-Tests (vgl. 2.2.7.1) angefertigt.

Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen des Zytostatikums behandelt. Anhand der abschließend gemessenen Extinktionswerte konnten die Zelllinien-spezifischen Dosis-Wirkungs-Kurven generiert und die  $EC_{50}$  Werte ermittelt werden. Exemplarisch ist eine solche Kurve in Abbildung 3.10 für Karpas 422 dargestellt. Die ermittelten  $EC_{50}$  Werte können der nachfolgenden

Tabelle 3.2 entnommen werden.

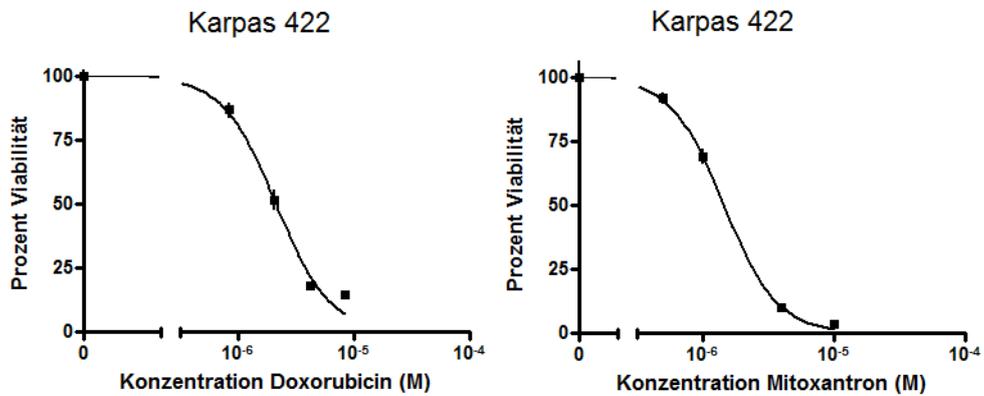


Abbildung 3.10: Ermittlung der  $EC_{50}$ . Zellviabilität von Karpas 422 bei steigender Zytostatikakonzentration; Doxorubicin (links) und Mitoxantron (rechts).

ZELLINIE	$EC_{50}$ FÜR DOXORUBICIN	$EC_{50}$ FÜR MITOXANTRON
BALM-3	$1,3 \mu M$	$1,2 \mu M$
Karpas 422	$2,2 \mu M$	$1,5 \mu M$
Ramos	$5 \mu M$	$1,4 \mu M$
SU-DHL-4	$3,6 \mu M$	$2,7 \mu M$

Tabelle 3.2:  $EC_{50}$  Werte für Doxorubicin und Mitoxantron

### 3.8 Einfluss der Behandlung mit einem Zytostatikum auf die SP- und NSP-Zellen

In den Colony Assays (vgl. 3.4) und den Isolationskulturen (vgl. 3.5) zeigten die Zellen der Side Population einen deutlichen Überlebensvorteil und ein erhöhtes Wachstumspotential gegenüber den verbleibenden NSP-Zellen. Des Weiteren hatten die kombinierten Färbungen mit Hoechst 33342 und einem Zytostatikum gezeigt, dass die Fähigkeit zum Efflux eines lipophilen Chemotherapeutikums in den SP-Zellen erhöht ist (vgl. 3.6). Es sollte nun überprüft werden, ob auch funktionell Chemoresistenz in Lymphom-Zellkulturen nachgewiesen werden könne. Aufgrund seines regelhaften Einsatzes in der Therapie der B-Zell-Lymphome wurden diese Versuche mit dem Anthrazyklin Doxorubicin durchgeführt (vgl. 1.1.2). Die Zelllinien BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly1, OCI-Ly3 und SU-DHL-4 wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (vgl. 2.2.5.1), im FACSAria<sup>TM</sup> II nach SP und NSP sortiert und im Anschluss über 24 Stunden mit Doxorubicin inkubiert. Zielkonzentration war die in den Zytotoxizitätstests ermittelte  $EC_{50}$  (vgl. 3.7). Für die Zelllinien OCI-Ly1 und OCI-Ly3 wurde, in Anlehnung an die  $EC_{50}$  Werte der anderen Zelllinien, eine Konzentration von  $2 \mu M$  festgelegt. Um nach Ablauf der Inkubationszeit die Zellvitalität zu ermitteln, wurde eine Annexin-V-Färbung (vgl. 2.2.7.2) mit durchflusszytometrischer Auswertung durchgeführt.

Es ließ sich bei den Zelllinien BALM-3 und Karpas 422 ein signifikant erhöhter Anteil an vitalen SP-Zellen detektieren (p-Wert= 0,0037 bzw. 0,0323), während bei den Zelllinien OCI-Ly1, OCI-Ly3 und SU-DHL-4 die Unterschiede zwischen SP- und NSP-Zellen in den Anteilen vitaler Zellen mit p-Werten von 0,0935, 0,3021 und 0,7677 nicht signifikant waren. Allerdings war auch bei diesen drei Zelllinien ein Überlebensvorteil der SP-Zellen zu beobachten. In der Abbildung 3.11 sind die Durchflusszytometeranalysen, nach erfolgter Annexin-V-Färbung, exemplarisch für die SP- und NSP-Zellen von OCI-Ly1 dargestellt. Abbildung 3.12 zeigt die Daten aller Zelllinien im Überblick.

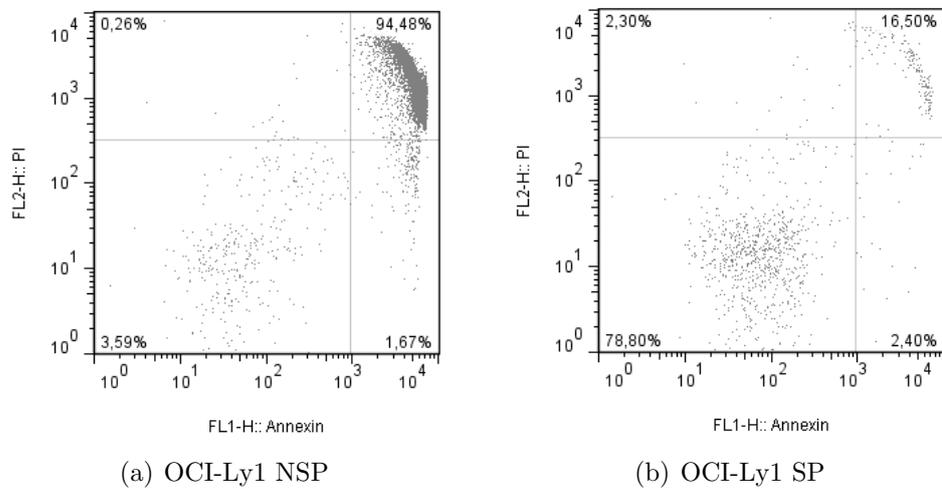


Abbildung 3.11: Durchflusszytometeranalyse der SP- und NSP-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin und anschließender Annexin-V-Färbung. Die OCI-Ly1 Zellen wurden basierend auf ihrem Hoechst-Efflux in SP und NSP sortiert, über 24 Stunden mit Doxorubicin (Zielkonzentration  $EC_{50}$ ) inkubiert und am Folgetag einer Annexin-V-Färbung unterzogen. Die Analyse erfolgte im FACScan. Auf der x-Achse ist die grüne Fluoreszenz des Annexin-Vs (515 nm bis 565 nm) und auf der y-Achse der rote Wellenbereich des Propidiumiodids aufgetragen.

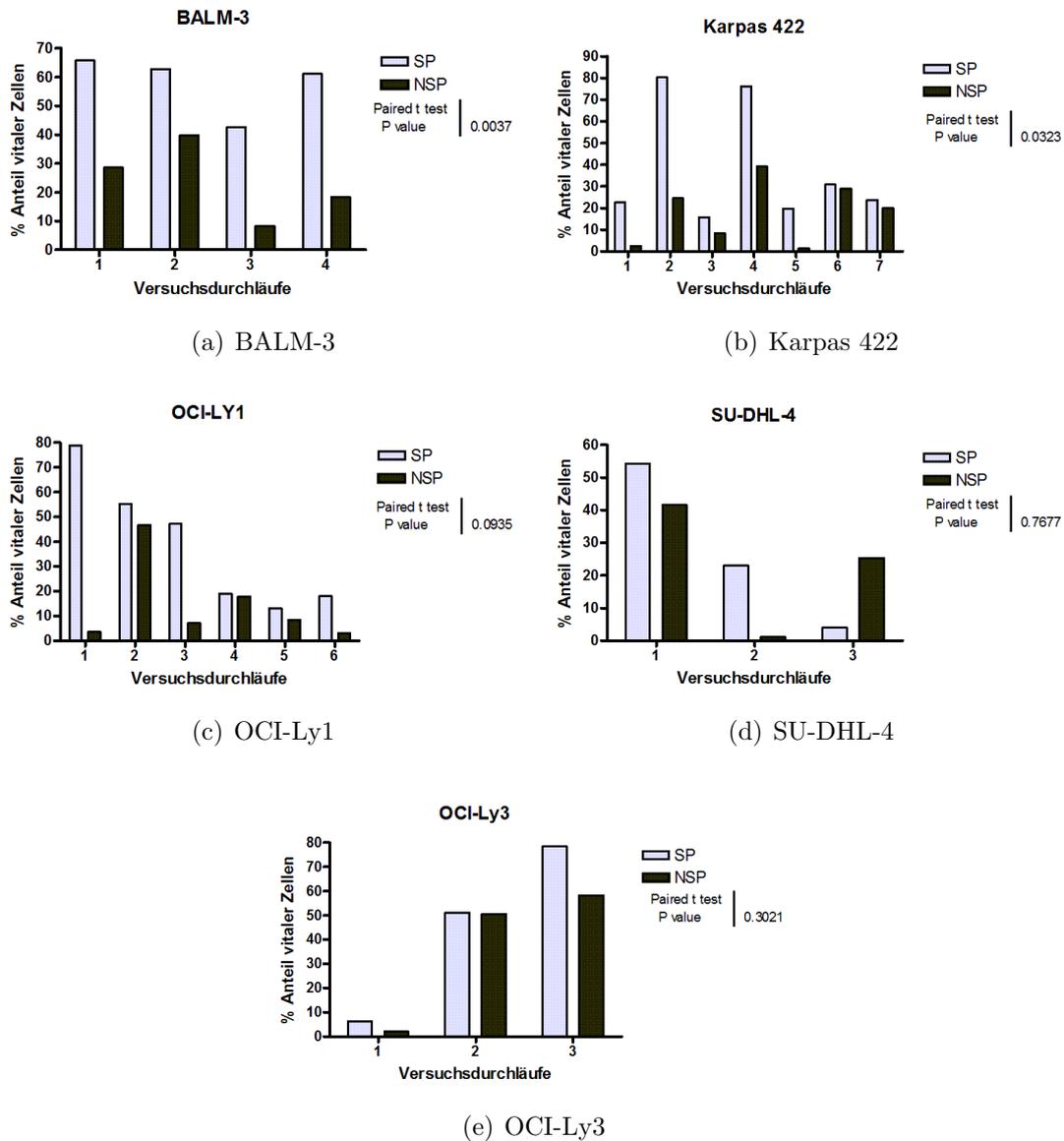


Abbildung 3.12: Vitalität der SP- versus NSP-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin. Die Zellen wurden basierend auf ihrem Hoechst-Efflux in SP und NSP sortiert, über 24 Stunden mit Doxorubicin (Zielkonzentration EC50) inkubiert und am Folgetag einer Annexin-V-Färbung unterzogen. Die Analyse erfolgte mit dem FACScan.

### 3.9 Expressionslevel von ABCA3

Vor dem Hintergrund, dass die Transporter der ABC-Familie sowohl beim Hoechst-Efflux als auch bei der Zytostatikaresistenz eine entscheidende Rolle spielen, stellte sich die Frage, ob in den Zellen der Side Population der aggressiven Lymphome eine erhöhte Expression eines ABC-Transporters vorliegt. Mit dem Vorwissen, dass ABCA3 in einem anderen hämatologischen Malignom, der AML, eine entscheidende Rolle spielt, (vgl. 1.3.2) sollte dessen Expression in den aggressiven Lymphomzelllinien überprüft werden. Basierend auf der Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in SP und NSP getrennt und deren RNA extrahiert (vgl. 2.3.1). Nach der Transkription in cDNA wurde eine TaqMan™ Real-time-PCR durchgeführt und  $\beta$ -Aktin als interner Standard mitgeführt (vgl. 2.3.5). Über alle untersuchten Zelllinien hinweg zeigten sich in der Side Population deutlich erhöhte ABCA3-Expressionslevel im Vergleich mit der Non Side Population.

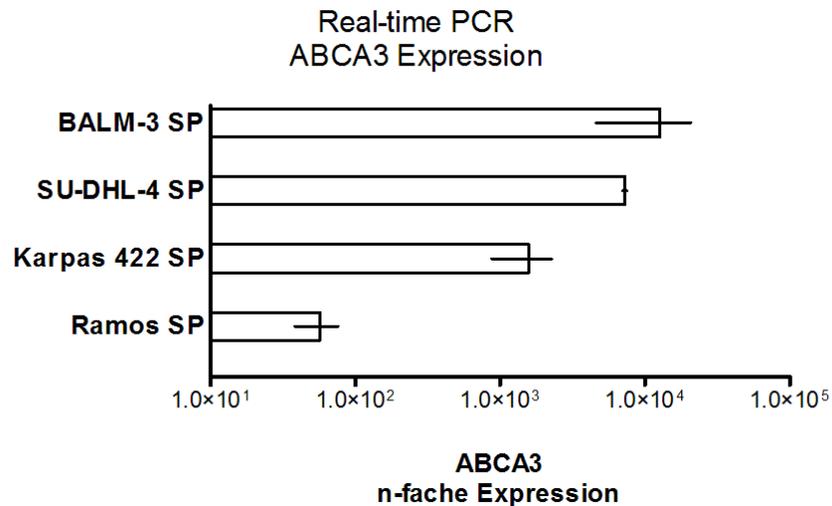


Abbildung 3.13: ABCA3-Expression. Die aus den SP- und NSP-Zellen der Zelllinien BALM-3, SU-DHL-4, Karpas 422 und Ramos gewonnene RNA wurde in cDNA transkribiert und in einer TaqMan™ Real-time-PCR eingesetzt. Die n-fache Expression von ABCA3 in den SP-Zellen im Verhältnis zur Expression in den NSP-Zellen ist hier graphisch dargestellt. Die Expression in den NSP-Zellen wurde als  $n=1$  gesetzt.

### 3.10 Mischversuche mit GFP-markierten Zellen

Die Ergebnisse der Isolationskulturen deuteten darauf hin, dass bei den aggressiven B-Zell-Lymphomen zum einen eine Tumorrepopulierung von der Basis durch SP-Zellen möglich ist, und zum anderen Zellen innerhalb der NSP existieren, die das Potential haben, den SP-Phänotyp zu erwerben. Um diese Hypothese zu überprüfen, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die Zellpopulationen zu markieren und nach Durchmischung fortlaufend zu detektieren. Hierzu wurden OCI-Ly3 Zellen einer lentiviralen Transfektion unterzogen und mit GFP markiert.

Die transduzierten OCI-Ly3 Zellen wurden im Anschluss an eine reguläre Höchstfärbung (vgl. 3.1) in SP und NSP sortiert. Gleiches wurde mit nicht GFP-markierten OCI-Ly3 Zellen durchgeführt. Die so gewonnenen Zellen wurden nun wie folgt durchmischt: GFP-positive SP-Zellen wurden mit GFP-negativen NSP-Zellen und GFP-positive NSP-Zellen mit GFP-negativen SP-Zellen zusammengebracht. In Anlehnung an die zuvor ermittelten Durchschnittswerte der prozentualen Anteile der SP-Zellen an der Gesamtheit der Tumorzellen wurden jeweils ca. 4% SP-Zellen eingesetzt (vgl. 3.2). Die so angelegten Mischkulturen wurden anschließend in regelmäßigen Zeitabständen einer Höchstfärbung unterzogen. In der Analyse wurde, neben der Hoechst-Fluoreszenz, auch GFP im grünen Wellenbereich detektiert. Dieses Mischversuchsexperiment wurde dreimal wiederholt. In allen drei Durchläufen zeigte sich, dass SP-Zellen NSP-Zellen generieren, während zugleich Zellen aus dem NSP-Pool SP-Zellen hervorbringen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich um ein dynamisches System handelt, in dem Zellen innerhalb der NSP den SP-Phänotyp erwerben können.

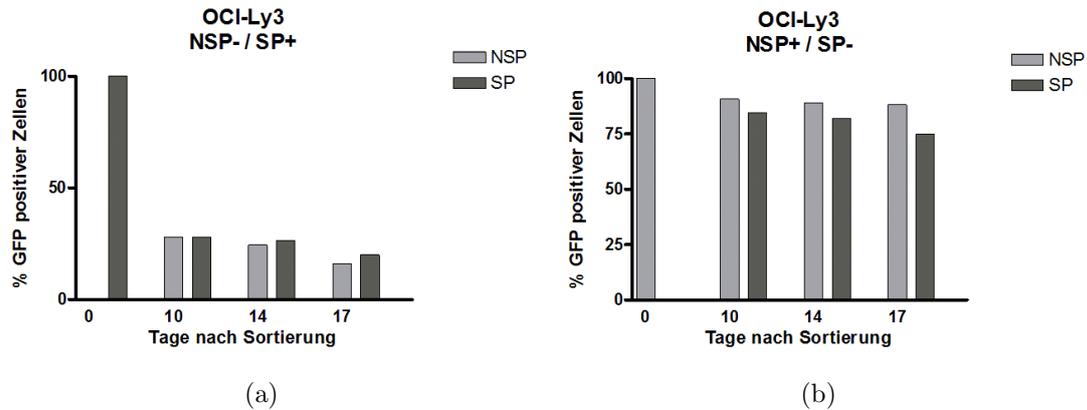


Abbildung 3.14: Mischkulturen von OCI-Ly3. Oci-Ly3 Zellen wurden durch lentivirale Transduktion mit GFP transfiziert und basierend auf den Hoechst-Efflux in SP- und NSP-Zellen separiert. Nachfolgend wurden GFP-positive SP-Zellen mit GFP-negativen NSP-Zellen (a) sowie GFP-negative SP-Zellen mit GFP-positiven NSP-Zellen (b) vermengt. Die so generierten Mischkulturen wurden in definierten Zeitabständen erneuten Höchstfärbungen unterzogen. Neben Hoechst 33342 wurde auch die grüne Fluoreszenz des GFPs am Durchflusszytometer detektiert.

### 3.11 Genearray

Um ein umfassenderes Bild davon zu bekommen, welche Gene oder Genmuster für die Phänotypen von SP- versus NSP-Zellen verantwortlich sein könnten, wurden mit der Unterstützung des Göttinger Transkriptomanalyselabors (TAL) Genexpressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde eine Sortierung der beiden Zellpopulationen mit dem FACSaria™ II auf Basis der Fähigkeit zum Hoechst-Efflux vorgenommen und die RNA der beiden Subpopulationen gewonnen (vgl. 2.3.1). Alle weiteren Schritte wurden im Göttinger TAL durchgeführt (vgl. 2.3.7). Im Rahmen der statistischen Analysen wurde eine *Principal Component Analysis* (PCA) durchgeführt (vgl. Abb. 3.15). Hierbei werden alle quantilnormalisierten *Microarrays* miteinander in Beziehung gesetzt und nach dem Grad ihrer Ähnlichkeit graphisch angeordnet. Da von jeder Probe Duplikate angefertigt wurden, lagen diese erwartungsgemäß jeweils ausgesprochen nahe beieinander. Somit kann man davon ausgehen, dass es im Verlauf nicht zu Probenverwechslungen gekommen ist. Man kann dieser Abbildung entnehmen, dass es in den genetischen Profilen der SP-Zellen von SU-DHL-4 und Ramos viele Gemeinsamkeiten

gibt. Innerhalb der Zelllinien weisen die SP- und NSP-Zellen von Karpas 422 und SU-DHL-4 die größten Unterschiede in ihrem Expressionsprofilen auf, somit kann man hier mit einer hohen Anzahl an unterschiedlich regulierten Genen rechnen. Das Gegenteil ist bei BALM-3 der Fall. Die SP-Zellen scheinen sich genetisch nicht sehr stark von den NSP-Zellen zu unterscheiden. Die Tatsache, dass sich nicht alle SP-Zellen repräsentierende Punkte gruppierten, legt die Vermutung nahe, dass es kein Zelllinien-übergreifendes, den SP-Phänotyp charakterisierendes Genprofil gibt. Eine Übersicht der Anzahl an differentiell exprimierten Genen kann der Tabelle 3.3 entnommen werden.

	RUNTERREGULIERT	HOCHREGULIERT
BALM-3 NSP VERSUS SP	31	16
KARPAS 422 NSP VERSUS SP	1074	406
OCI-LY3 NSP VERSUS SP	0	97
RAMOS NSP VERSUS SP	143	1775
SU-DHL-4 NSP VERSUS SP	422	2176

Tabelle 3.3: Anzahl der differentiell exprimierten Gene in SP- und NSP-Zellen. Als *Cut-Off-Werte* wurden eine *false discovery rate* von  $\leq 0,05$  und eine *fold change* von 0,5 bzw. 2 gewählt.

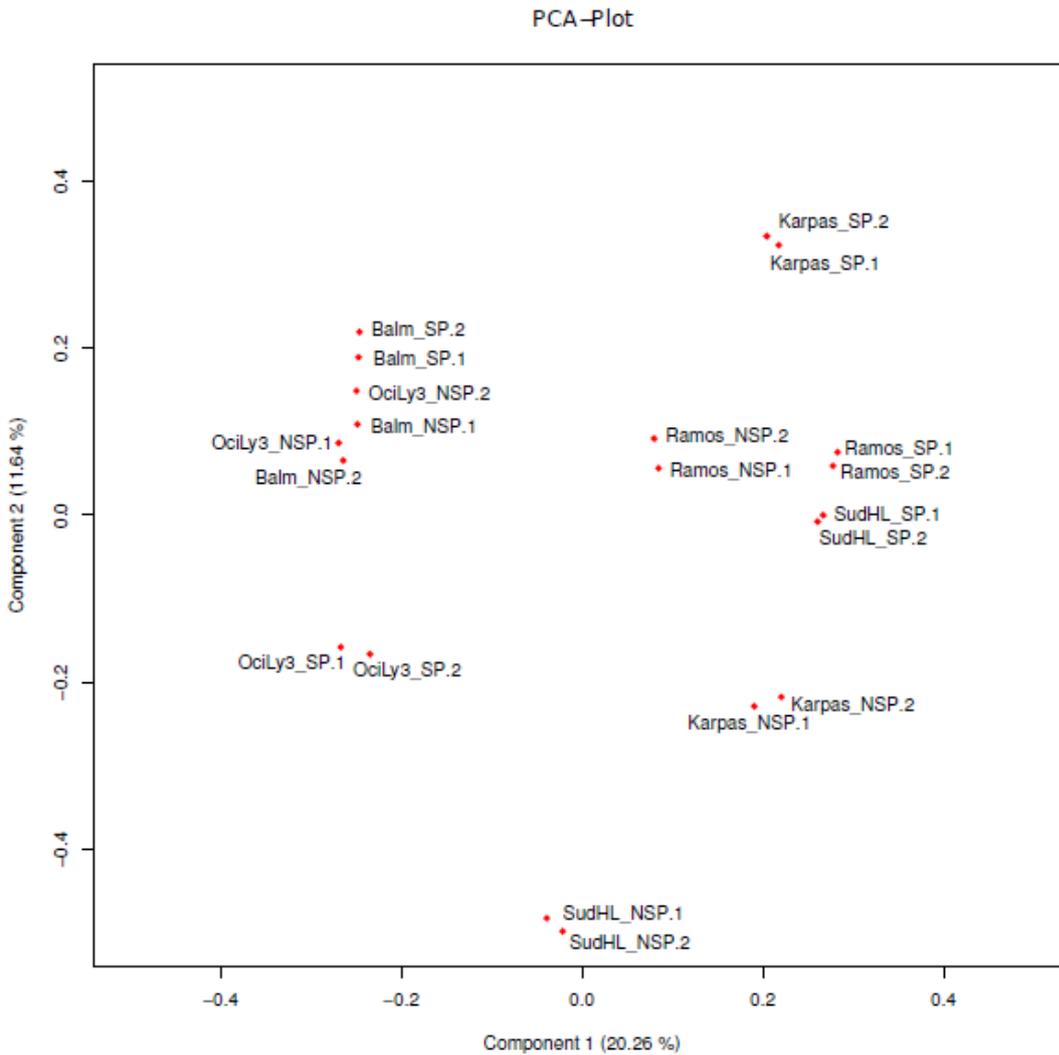


Abbildung 3.15: Principal Component Analysis von BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly3, Ramos und SU-DHL-4. Die generierten Daten der Microarrays wurden statistisch aufgearbeitet, und eine Principal Component Analysis wurde angefertigt. Jedes Genprofil wird durch einen Punkt repräsentiert.

### 3.11.1 Differentiell exprimierte Gene

Die Analysen des Göttinger TALs der Genexpressionsdaten lieferten im Vergleich der NSP- mit der SP-Fraktion unter Einbezug aller Zelllinien keine Gene, die mit einer *fold change* von 0,5 bzw. 2 und einer *false discovery rate* von  $\leq 0,05$  unterschiedlich reguliert waren. Auch die hohen ABCA3-Expressionen, die zuvor in der TaqMan<sup>TM</sup> Real-time-PCR gefunden wurden, konnten hier nicht in der Form bestätigt werden. ABCA3 zeigte sich in keiner Side Population der untersuchten Zelllinien als differentiell stark hochreguliert. In Karpas 422 ließ sich jedoch eine signifikant höhere ABCG2-Expression in den SP-Zellen nachweisen ( $\log_2$  *fold change* SP versus NSP: 1.33785). Des Weiteren kristallisierte sich eine erhöhte CD44-Expression in den SP-Zellen von BALM-3, Karpas 422 und SU-DHL-4 heraus. Diese ließ sich jedoch im Durchflusszytometer mittels Antikörperfärbung bisher nicht bestätigen. Darüber hinaus sind JAG1 und CXCL12 in den SP-Zellen von Karpas 422 und SU-DHL-4 signifikant hochreguliert. Während CXCL12 in den SP-Zellen von OCI-Ly3 herunterreguliert ist (JAG1 ist nicht signifikant differentiell exprimiert).

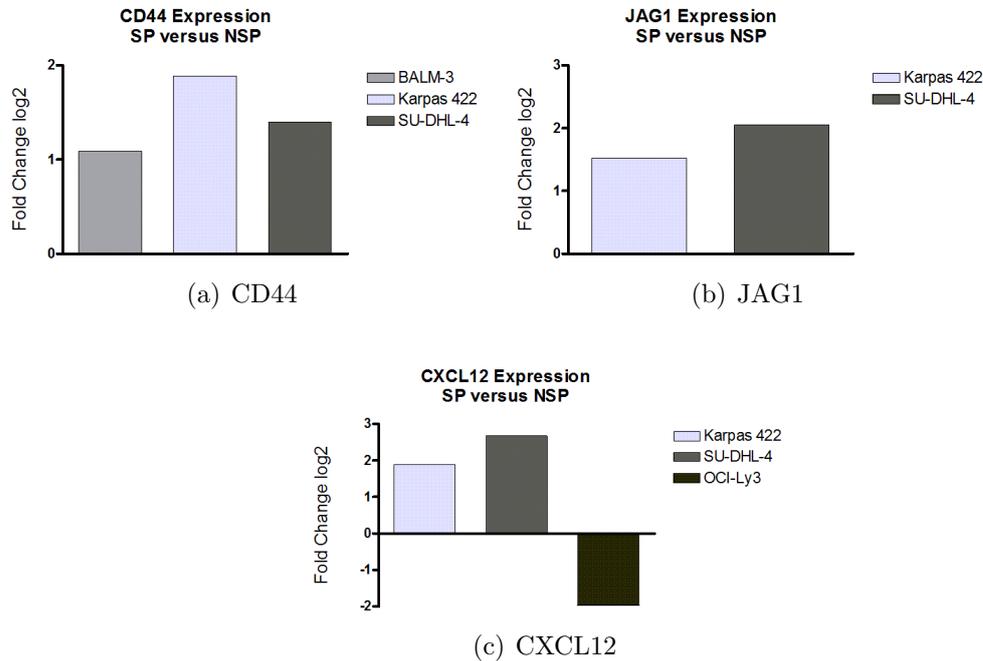
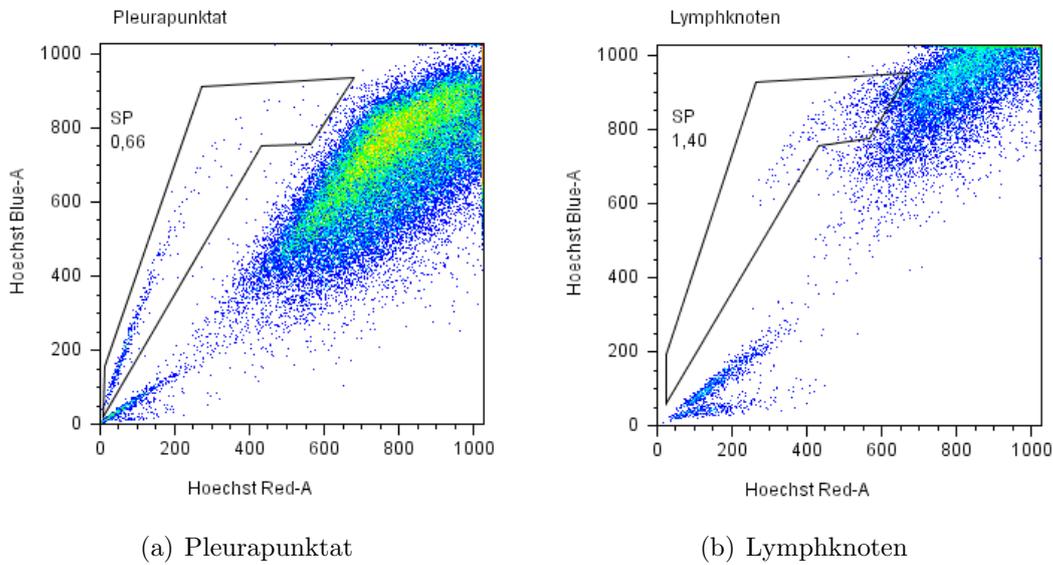


Abbildung 3.16: Differenziell exprimierte Gene in SP- und NSP-Zellen. Die *fold change* ist als  $\log_2$  aufgetragen. Eine *false discovery rate* von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

### 3.12 Nachweis einer Side Population in Primärmaterial

Um den Bezug zur Klinik herzustellen, sollte überprüft werden, ob in Primärmaterial von Patienten mit aggressiven B-Zell-Lymphomen eine Side Population nachgewiesen werden kann. Aus peripherem Blut, Lymphknotenmaterial, Knochenmark bzw. Pleurapunktat erkrankter Patienten wurden mittels Ficoll (vgl.2.2.8) die Leukozyten isoliert, mit Hoechst 33342 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Wenn von einem Patienten genügend Zellmaterial vorhanden war, wurden zwei unabhängige Höchstfärbungen angefertigt. In acht von elf Patientenproben kam eine Side Population zur Darstellung. Prozentual bewegte sich der Anteil der SP-Zellen zwischen 0,15 und 2,06% (vgl. Tabelle 3.4). In Abbildung 3.17 sind exemplarisch die Durchflusszytometerdaten von zwei Patientenproben dargestellt.



(a) Pleurapunktat

(b) Lymphknoten

Abbildung 3.17: Höchsfärbungen von Primärmaterial. Die mononukleären Zellen des Patientenmaterials wurden mittels Ficoll gewonnen, mit Hoechst 33342 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung (a) wurde Pleurapunktat und in Abbildung (b) Material eines Lymphknotens aufgearbeitet.

PATIENTENPROBE	GEWEBETYP	% SIDE POPULATION
Patient 1	Lymphknoten	0,15%
Patient 2	Peripheres Blut	0,23%
Patient 3	Knochenmark	0,36%
Patient 4	Peripheres Blut	0,37%
Patient 5	Lymphknoten	0,50%
Patient 6	Lymphknoten	0,53%
Patient 7	Pleurapunktat	0,66%
Patient 8	Lymphknoten	2,06%

Tabelle 3.4: Prozentualer Anteil der Side Population in Patientenproben mit B-Zell NHL. Bei Patient 3 (1. 0,19% 2. 0,52%; MW: 0,36%), 6 (1. 0,58% 2. 0,47%; MW: 0,53%) und 8 (1. 1,40% 2. 2,71%; MW: 2,06%) konnten zwei unabhängige Messungen durchgeführt werden; die Mittelwerte sind hier angegeben.

### 3.12.1 Zugehörigkeit der detektierten Side Population zum malignen Klon

Um nachzuweisen, dass es sich bei den im Primärmaterial detektierten SP-Zellen um Zellen des malignen Tumorzellklones handelt, wurden zwei Verfahren angewandt. Zum einen wurden im Anschluss an die Höchstfärbung die kappa ( $\kappa$ )- bzw. lambda ( $\lambda$ )-Leichtketten sowie das Oberflächenprotein CD19 mit Hilfe von Antikörpern markiert und deren Fluoreszenz im Durchflusszytometer detektiert. Bei malignen B-Zellklonen müsste sich hierbei die Dominanz einer der beiden Isotypen nachweisen lassen. Zum anderen konnte von drei Proben mittels Sortierung genug Material gewonnen werden, um eine IgH-PCR anzuschließen (vgl. 3.12.1.1). Mit der erstgenannten Methode ließ sich nur in einer von drei Proben die Zugehörigkeit der SP-Zellen nachweisen (vgl. Abbildung 3.18). Sowohl die NSP- als auch die SP-Zellen dieser einen Probe waren APC und PE positiv. Somit handelt es sich bei beiden Zellpopulationen um Tumorzellen aus einem Lambda-Leichtketten tragenden B-Zell Klon.

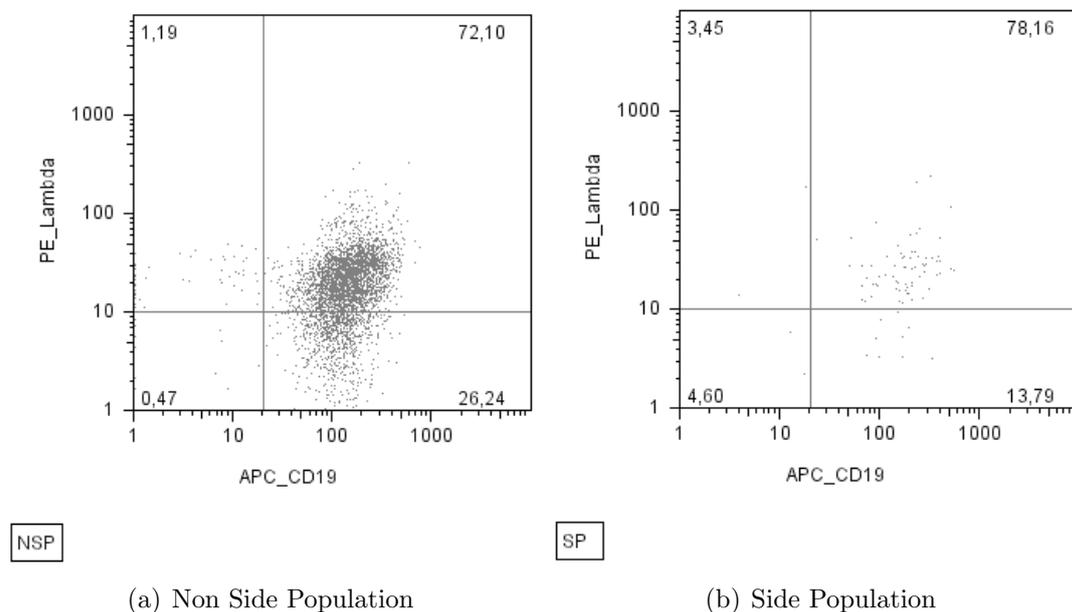


Abbildung 3.18: Zugehörigkeit der detektierten SP-Zellen zum malignen Klon. Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und im Anschluss einer Antikörperfärbung für CD19 (APC), Kappa (FITC)- und Lambda-Leichtketten (PE) unterzogen. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometer. Hier abgebildet sind die Fluoreszenzintensitäten im APC- und PE-Kanal.



## 4 Diskussion

### 4.1 Detektion der Side Population und ihr prozentualer Anteil

Bisher wurde die Side Population vorwiegend in Malignomen beschrieben, deren Ursprung auf Stamm- bzw. Vorläuferzellebene liegt, wie beispielsweise in der AML oder in gastrointestinalen Tumoren (Wulf et al. 2001; Merlos-Suárez et al. 2011). In diesen Tumoren kommt es durch genetische Veränderungen zu einer ungebremsten Proliferation und somit zur Ausbildung einer wachsenden Tumorzellpopulation. Aggressive B-Zell-Lymphome entstehen jedoch nicht primär auf Stammzellebene, sondern aus differenzierten B-Zellen des Keimzentrums (Keimzentrumslymphome, GCB-Typ) oder aus aktivierten B-Zellen nach Keimzentrumsreifung (Postkeimzentrumslymphome, ABC-Typ). Das wiederum bedeutet, dass CSC eines solchen Malignoms die typischen Eigenschaften wie Langlebigkeit und asymmetrische Teilungsfähigkeit zurückgewinnen oder neu erwerben müssen und mit dem Begriff der CSC somit nicht zwangsläufig auf die eigentliche Stammzelle des gesunden Ursprungsgewebes Bezug genommen werden kann (Zhao et al. 2010; Wang und Dick 2005). Inzwischen wird auch über die Existenz einer CSC in Tumoren aus differenzierten Zellen vermehrt diskutiert, wie beispielsweise im Morbus Hodgkin (Nakashima et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den aggressiven B-Zell-Lymphom-Zelllinien BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly1, OCI-Ly3, Ramos und SU-DHL-4 reproduzierbar eine Side Population nach Färbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 im Durchflusszytometer detektiert werden. In den untersuchten Zelllinien traten im Hinblick auf den prozentualen Anteil der SP-Zellen sowohl innerhalb einer Zelllinie als auch im Vergleich der Zelllinien untereinander starke Schwankungen auf. Im Mittel wurden zwischen 0,29% und 2,96% SP-Zellen detektiert. Ähnlich starke Variationen beschrieben Haraguchi et al. 2006 bei den SP-Zellen aus Tumoren des Gastrointestinaltraktes, die zwischen 0,3% und 2,2%

der vitalen Tumorphosphon ausmachten (Haraguchi et al. 2006). Gleichermaßen dokumentierten Hirschman-Jax et al. 2004 schwankende SP-Anteile sowohl in Neuroblastom-Zelllinien (zwischen 4% und 37%) als auch in 15 von 23 Proben erkrankter Patienten (0,8% bis 51%) (Hirschmann-Jax et al. 2004). Einen Erklärungsansatz für diese Variationen könnte der Zeitpunkt der Höchstfärbung liefern. Möglicherweise gibt es vor allem in Zellkulturen einen Zeitpunkt, zu dem ein Gleichgewicht vorliegt, in dem sich der Anteil der Side Population Zellen stabilisiert. Das bedeutet, dass sich nach jedem Wechsel des Zellkulturmediums mit Anpassung der Zelldichte der Suspensionszellen und der damit verringerten Zelldichte erst ein neues Gleichgewicht einstellen muss. Wie lange jede Zelllinie dafür benötigt, ist bisher nicht bekannt. In Neuroblastom-Zelllinien ist nach ca. 2 Wochen ein stationärer Zustand erreicht (Hirschmann-Jax et al. 2004). In diesem Zusammenhang könnte die Zelldichte ein entscheidender Faktor sein. Mitsutake et al. beobachteten, dass sich SP-Zellen in höherer Zahl detektieren lassen, wenn in der Zellkultur zuvor eine geringe Zelldichte vorlag (Mitsutake et al. 2007). Demzufolge könnte der messbare Anteil der SP auch damit zusammenhängen, zu welchem Zeitpunkt die kultivierten Zellen für eine Höchstfärbung herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte nicht nur in Zelllinien, sondern auch in 8 von 11 (72,7%) Proben von Patienten, die an einem aggressiven B-Zell-Lymphom erkrankt waren, eine SP detektiert werden. Bei der Untersuchung von Primärmaterial an AML erkrankter Patienten konnten Wulf et al. 2001 in 80% der Fälle eine SP detektieren. Ihr Anteil war bei den Patienten, die sich als therapieresistent erwiesen oder einen Erkrankungsrückfall erlitten hatten, am höchsten (Wulf et al. 2001). Bei den von uns untersuchten Lymphomzelllinien gehörte nur OCI-Ly3 dem ABC-Typ der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome an. Im klinischen Alltag ist mit diesem Typ eine geringere Chemosensitivität und kürzere Überlebensdauer assoziiert, was durchaus mit den hier detektierten hohen Side Population-Anteilen von durchschnittlich 2,96% vereinbar ist (Sweetenham 2011). Neben dem Farbstoff Hoechst 33342 erwies sich die ALDH vom Isotyp 1 als potenter Marker für Tumorstammzellen in multiplen Tumoren, wie beispielsweise der AML und dem Multiplen Myelom (Pearce et al. 2005; Matsui et al. 2008). In den aggressiven Lymphom-Zelllinien BALM-3, Karpas 422, Ramos und SU-DHL-4 ließ sich keine erhöhte ALDH1-Aktivität detektieren und somit keine Subpopu-

lation putativer Tumorstammzellen identifizieren. Korrelierend dazu zeigte sich in keiner dieser Zelllinien eine signifikant erhöhte Expression dieses Isoenzym in den Genexpressionsanalysen. Für die hier untersuchten Zelllinien ist die ALDH1-Aktivität somit kein geeigneter Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen.

## 4.2 Eigenschaften der CSC

### Klonogenitätspotenzial

Eine entscheidende Voraussetzung für das Tumorwachstum aus einzelnen Zellen ist, neben der Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung, das Potenzial, als Klon zu wachsen. Diese Eigenschaft konnte für die SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphome in Colony Assays nachgewiesen werden. Sie bildeten in allen Zelllinien, mit Ausnahme von OCI-Ly1, signifikant mehr Kolonien pro eingesetzter Zellzahl als die NSP-Zellen. Colony Assays mit CSC aus Schilddrüsen- und Prostatakarzinom-Zelllinien belegten ebenfalls ein erhöhtes Klonogenitätspotenzial dieser Zellpopulation (Mitsutake et al. 2007; Patrawala et al. 2006). Im Rahmen von Langzeitkulturen wurde diese Eigenschaft unter anderem auch in CSC von Kolon- und Bronchialkarzinomen aufgezeigt (Ricci-Vitiani et al. 2007; Eramo et al. 2008). Die SP- und NSP-Zellen der Neuroblastom Zelllinie JF waren beide gleichermaßen in der Lage, Kolonien zu bilden. Allerdings konnte das Wachstum der NSP-Zellen durch Zugabe von 1 ng/ml Mitoxantron komplett gehemmt werden, wodurch eine weitere entscheidende Eigenschaft von CSC deutlich wird: Die Resistenz gegen Zytostatika (Hirschmann-Jax et al. 2004).

### Chemotherapieresistenz und ABC-Transporter

In hämatologischen Malignomen ist eine ausgeprägte Resistenz gegen Chemotherapeutika bereits für die CSC der AML, CML und dem M. Hodgkin dokumentiert (Wulf et al. 2001; Jorgensen und Holyoake 2007; Nakashima et al. 2010). In den SP-Zellen der AML ließ sich nach Behandlung mit Mitoxantron im Durchflusszytometer eine geringere, durch das Therapeutikum hervorgerufene Fluoreszenz detektieren als in den NSP-Zellen (Wulf et al. 2001). Gleiches gilt für die SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphome. Zusätzlich wurden die beiden Populationen getrennt über 24 Stunden mit Doxorubicin inkubiert und

nachfolgend auf ihre Viabilität hin untersucht. Die SP-Zellen zeigten auch hier einen Überlebensvorteil, der bei BALM-3 und Karpas 422 als signifikant gewertet werden konnte. In soliden Tumoren wurde in der Vergangenheit für die CSC multipler Entitäten ebenfalls eine verminderte Chemotherapiesensibilität dokumentiert. Hierzu zählen unter anderem das Neuroblastom, gastrointestinale Tumoren und seit 2012 auch das Prostatakarzinom (Hirschmann-Jax et al. 2004; Haraguchi et al. 2006; Zhang et al. 2012). Zhang et al. wiesen eine verminderte Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin, Docetaxel und Vinblastin von Tumorstammzellen aus Prostatakarzinomen nach (Zhang et al. 2012). Sie konnten außerdem eine stark erhöhte ABCG2-Transporter-Expression in den chemotherapieresistenten CSC nachweisen, zu dessen Substraten auch der DNA-bindende Farbstoff Hoechst 33342 zählt (Zhang et al. 2012; Robey et al. 2003). Zhou et al. zeigten bereits 2001, dass dieser Transporter maßgeblich zum SP-Phänotyp beiträgt und vermehrt in hämatologischen Stammzellen vorliegt (Zhou et al. 2001). Somit lässt sich vermuten, dass auch die SP-Zellen der hier untersuchten aggressiven Lymphome eine erhöhte Expression dieses Transporters aufweisen, da sie nachweislich zum Hoechst-Efflux befähigt sind. Dies ließ sich jedoch mit Hilfe der Genexpressionsanalysen nur für die SP-Zellen von Karpas 422 sicher nachweisen. Bei Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom korrelierte eine vermehrte Expression des ABC-Transporters G2 sowohl mit einem verkürzten Gesamt- als auch rezidivfreien Überleben (Kim et al. 2009; Singh et al. 2011). Möglicherweise spielen hier aber auch weitere ABC-Transporter eine Rolle und ABCG2 ist nicht allein für den SP-Phänotyp verantwortlich.

### ABCA3

Neben ABCG2 wird auch das Transportprotein ABCA3 mit Chemoresistenz in Verbindung gebracht. Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten TaqMan<sup>TM</sup> Real-time-PCRs zeigen in den SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphom-Zelllinien BALM-3, Karpas 422, Ramos und SU-DHL-4 eine starke Überexpression von ABCA3. Diese Daten sind gut mit den Ergebnissen von Chapuy et al. aus dem Jahre 2008 vereinbar, die ebenfalls in Zelllinien aggressiver B-Zell-Lymphome eine erhöhte Expression dieses ABC-Transporters dokumentierten. Bei nachfolgenden Untersuchungen von Patientenmaterial konnte außerdem gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von ABCA3 mit einer schlechteren Prognose korrelierte

(Chapuy et al. 2008). Dieser Zusammenhang ist wahrscheinlich auf den Einfluss des Transporters auf die Suszeptibilität der Zellen gegenüber Chemotherapeutika zurückzuführen.

Des Weiteren zeigten Hirschmann-Jax et al., dass Neuroblastom-Zelllinien neben der ABCG2- auch eine erhöhte ABCA3-Expression aufweisen. Die SP-Zellen sowohl aus den Zelllinien als auch aus Primärmaterial erkrankter Patienten reagierten weniger sensitiv auf Mitoxantron als die NSP-Zellen (Hirschmann-Jax et al. 2004).

Im Rahmen der Primärtherapie von aggressiven B-Zell-Lymphomen wird eine Kombination verschiedener Therapeutika eingesetzt, zu denen auch der anti-CD20-Antikörper Rituximab gehört (R-CHOP)(vgl. 1.1.2). Die Wirksamkeit dieses Antikörpers wird indirekt durch den ABC-Transporter A3 beeinflusst, indem er die Biogenese von Exosomen fördert, die Rituximab bindenden können. Wie dies auf molekularer Ebene funktioniert, ist noch nicht ausreichend geklärt, fest steht jedoch, dass die Blockade dieses Transporters das Therapieansprechen der Zellen deutlich verbessert (Aung et al. 2011).

### 4.3 Dynamik und Heterogenität der Side Population

Die durchgeführten Isolationskulturen und Mischversuche mit GFP-markierten Zellen deuten auf eine Dynamik zwischen den beiden Zellpopulationen hin.

Der prozentual detektierbare Anteil der SP-Zellen weist sowohl in den unterschiedlichen Tumorentitäten (0%-20%) als auch innerhalb einer Entität kontinuierlich Schwankungen auf (Wu und Alman 2008; Haraguchi et al. 2006). Gibt es neben dem Färbungszeitpunkt (vgl. 4.1) noch eine andere mögliche Erklärung? Im Jahre 2009 lieferten Liang et al. erste Hinweise darauf, dass der Anteil von Tumorstammzellen in einem Tumor durch Provokation vermehrter genomische Instabilität gesteigert wird. Im Anschluss an eine Bestrahlung mit UV-Licht wurde in einer Nasopharynxkarzinom-Zelllinie eine Vermehrung der SP-Zellen von 3% auf 9% der Gesamttumormasse dokumentiert (Liang et al. 2010). Hu et al. konnten 2012 zeigen, dass NSP-Zellen einer Leberkarzinom-Zelllinie durch die Behandlung mit Carboplatin Stammzeleigenschaften erwerben (Hu et al. 2012). Ergänzend dazu beobachteten Chaffer et al. die Entstehung von CSC bzw. Zellen mit Stammzellpotential in Zelllinien aus transformiertem und gesundem Brust-

pithelgewebe, ganz ohne genetische Manipulation (Chaffer et al. 2011).

In der Zusammenfassung deuten diese Arbeiten darauf hin, dass ein dynamisches System zugrunde liegen könnte, welches unter anderem durch äußere Noxen wie Chemotherapeutika beeinflussbar ist.

Eine Dynamik zwischen den beiden Zellpopulationen ließ sich auch bei den aggressiven B-Zell-Lymphomen feststellen: In den Mischkulturen der GFP-markierten Zellen zeigte sich deutlich, dass aus dem Pool der Tumormasse Zellen mit SP-Phänotyp hervorgehen können. In getrennten Kulturen ließen sich nach circa 3 Wochen auch in der NSP-Kultur wieder SP-Zellen detektieren. Gleichsinnige Ergebnisse dokumentierten auch Mitsutake et al. im Jahre 2007: Inmitten der NSP-Zellen von Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien ließen sich tumorinitiierende Zellen nachweisen, aus denen SP-Zellen hervorgingen (Mitsutake et al. 2007).

Innerhalb eines Tumors herrscht eine weitaus größere funktionelle Heterogenität als bisher angenommen, die sich auch in der CSC-Population wieder finden lässt (Navin et al. 2011; Gisina et al. 2011). In Kolontumoren sind beispielsweise inzwischen mindestens vier unterschiedliche Subpopulationen mit der Fähigkeit zur Tumorinitiierung nachgewiesen worden (Gisina et al. 2011).

Wie es zu dieser großen Vielfalt und Dynamik kommen kann, ist noch nicht ausreichend geklärt. Möglicherweise spielen epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung, eine entscheidende regulierende Rolle.

Überträgt man dieses Wissen auf die Klinik, wird deutlich, dass diese Dynamik und Heterogenität den gezielten Angriff auf die CSC erschweren und eine alleinig gegen die CSC gerichtete Therapie nicht zielführend sein können. Vielmehr sollte eine duale Therapie angestrebt werden, die neben der Tumormasse auch gegen die SP-Zellen gerichtete ist. Um solche Medikamente entwickeln zu können, gilt es, auf molekulargenetischer Ebene Signalwege und/oder Botenstoffe zu identifizieren, die für die CSC essentiell sind und zu ihrer Erhaltung und/oder Induktion beitragen.

#### 4.3.1 Genexpressionsdaten der aggressiven B-Zell-Lymphome

Um die SP-Zellen aggressiver B-Zell-Lymphome eingehender zu charakterisieren, wurden durch das Göttinger TAL Genearrays angefertigt und analysiert. Bei der Auswertung dieser Daten müssen jedoch Aspekte berücksichtigt werden, die die Aussagekraft von Genexpressionsdaten einschränken können: Die Rohdaten,

die mit Genchips gewonnen werden, durchlaufen einen mehrschrittigen Bearbeitungsprozess und können mit Hilfe unterschiedlicher Software aufgearbeitet werden. Jede Software arbeitet mit eigenen Algorithmen und generiert somit zum Teil unterschiedliche Genlisten. Hinzukommen die strengen Kriterien nach denen die unterschiedlich stark regulierten Gene als signifikant gewertet werden (*fold change* von 0,5 bzw. 2 gewählt, *false discovery rate* (FDR) von  $< 0,05$  (5%)), wodurch Gene mit geringer Regulation auf Ebene der Transkription trotz biologischer unterschiedlicher Rolle in den verglichenen Zellpopulationen durch das Raster fallen können. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft könnte durch eine genetische Heterogenität innerhalb der Non Side und Side Population zustande kommen. Eine solche Heterogenität erschwert die Suche nach den entscheidenden Genen und/oder Signalwegen, welches/welcher vorwiegend zur Tumorbildung durch SP-Zellen beiträgt. Da in dieser Arbeit nur ein sehr begrenzter Probenumfang untersucht wurde, lassen die Daten keine allgemeingültigen Aussagen zu. Sie liefern jedoch wertvolle Informationen im Hinblick auf mögliche, den SP-Phänotyp maßgeblich beeinflussende Gene und Signalwege, die in zukünftigen Experimenten weiter validiert und untersucht werden sollten.

Auf den SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphome wurde eine erhöhte CD44-Expression nachgewiesen. Dieses Oberflächenprotein wurde bereits auf den CSC multipler Malignome gefunden und zu ihrer Identifizierung herangezogen (Al-Hajj et al. 2003; Prince et al. 2007; Chan et al. 2009). Alleinstehend oder in Kombination mit anderen Markern, wie beispielsweise CD24, ermöglicht die erhöhte CD44-Expression die Anreicherung einer Zellpopulation mit der Fähigkeit zur Langlebigkeit und Ausbildung des ursprünglichen, heterogenen Tumorgewebes *in vivo*. In den Tumoren, die aus CD44+ Zellen hervorgingen, waren im Verlauf sowohl CD44+ als auch CD44- Zellen nachweisbar (Al-Hajj et al. 2003; Prince et al. 2007). Auch wenn sich die erhöhte Expression auf den SP-Zellen bisher nicht mittels Antikörperfärbung bestätigen ließ, sollte dies, aufgrund seiner Präsenz in anderen CSC, durch sensiblere Testverfahren, wie beispielsweise einer RT-PCR, genauer überprüft werden.

In den B-Zell-Lymphom-Zelllinien Karpas 422 und SU-DHL-4 wurde neben CD44 auch eine erhöhte CXCL12-Expression nachgewiesen. In gesundem Knochenmark findet man CD44 vermehrt auf den CD34+ Vorläuferzellen. Dort spielt es eine wichtige Rolle beim *Homing* und Anwachsen der Zellen in ihrer de-

signierten Lokalisation. Bei diesem Prozess sind zusätzlich Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und VLA-4 beteiligt. Ihre Aktivierung wiederum erfolgt durch das Chemokin CXCL12, welches primär an CXCR4 bindet und neben der Stammzellmigration auch deren Proliferation und die B-Zell Differenzierung induzieren kann. Inhibition von CD44 führt zu einer verminderten CXCL12-Aktivierung, wodurch eine Verlinkung des entsprechenden Chemokinrezeptors CXCR4 und der Adhäsionsmechanismen deutlich wird (Dick und Lapidot 2005). Als klinisches Beispiel dient sowohl die ALL als auch die AML, deren Zellen in Abhängigkeit dieses Signalweges im Knochenmark reteniert werden (Juarez et al. 2007; Nervi et al. 2009).

Allgemein spielt die CXCL12/CXCR4-Interaktion in Malignomen eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression, der Angiogenese und Metastasierung (Teicher und Fricker 2010). Die für die lymphatischen Metastasen bedeutende Lymphangiogenese wird, unabhängig vom VEGFR-3-Signalweg, *in vivo* durch CXCL12 induziert und somit entscheidend vorangetrieben (Zhuo et al. 2012). In Prostatakarzinomen ist dieser Signalweg in den CD44+/CD133+ CSC aktiviert und beeinflusst zahlreiche Faktoren wie die Klonogenität und Tumorigenität. Die Behandlung mit einem CXCR4-Antagonisten in Kombination mit Taxotere zeigte signifikant bessere Ergebnisse als die Taxotere-Monotherapie (Dubrovskaja et al. 2012). Ähnliche Funktionen dieser Signalkaskade wären auch bei den aggressiven B-Zell-Lymphomen denkbar. Die verminderte Expression von CXCL12 in den SP-Zellen von OCI-Ly3 könnte Ausdruck des unterschiedlichen B-Zell-Lymphom-Typs sein, da diese Zelllinie, im Gegensatz zu Karpas 422 und SU-DHL-4, vom ABC- und nicht vom GCL-Typ ist.

Als typisches Stammzellgen zeigten die SP-Zellen von Karpas 422 und SU-DHL-4 eine erhöhte JAG1-Expression, eines Liganden des Notch-Signalweges. Die Notch-Signalkaskade spielt eine dominante Rolle bei der Selbsterneuerung von Stammzellen, der Apoptose und Proliferation (Dickson et al. 2007). Ein erhöhtes Level an JAG1-Protein ist bei Patienten mit Brustkrebs mit einem schlechten *Outcome* assoziiert, und in Tumoren der Nebenniere trägt JAG1 zu einer vermehrten Zellproliferation und Tumoraggressivität bei (Dickson et al. 2007; Simon et al. 2012). Haraguchi et al. konnten in den SP-Zellen gastrointestinaler Tumoren ebenfalls eine erhöhte Expression dieses Gens finden (Haraguchi et al. 2006). Die Rolle des Notch-Signalweges sollte auch in den SP-Zellen der aggressiven B-Zell-Lymphome

genauer untersucht und als mögliches Therapie-Target ins Auge gefasst werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Genexpressionsanalysen einige potenzielle Kandidatengene identifiziert haben, deren Rolle in den SP-Zellen der aggressiven Lymphome jedoch noch verifiziert und eingehender untersucht werden muss. Zukünftig könnten sich so neue Behandlungsansätze entwickeln und die Therapieoptionen für aggressive B-Zell-Lymphome erweitern lassen.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Anwendung des DNA-bindenden Farbstoffes Hoechst 33342 in den Zelllinien BALM-3, Karpas 422, OCI-Ly1, OCI-Ly3, Ramos und SU-DHL-4 reproduzierbar eine Side Population im Durchflusszytometer detektiert werden. Außerdem konnte in Primärmaterial an B-Zell NHL erkrankter Patienten eine Side Population detektiert und ihre Zugehörigkeit zum malignen Klon nachgewiesen werden. Der Phänotyp der SP-Zellen ist somit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisbar. Mit Hilfe des FACSAria™ II konnte die Side und Non Side Population separiert und die Side Population genauer charakterisiert werden. Die enzymatische ALDH1-Aktivität war in den SP-Zellen nicht erhöht und konnte somit nicht zur Identifikation dieser Subpopulation herangezogen werden. SP-Zellen wiesen Eigenschaften von Tumorstammzellen auf. Mit Ausnahme von OCI-Ly1 ließ sich in allen Zelllinien zeigen, dass die SP-Zellen eine signifikant höhere Klonogenität besaßen. Desweiteren waren die SP- den NSP-Zellen auch in Suspensionskulturen in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit signifikant überlegen. Neben dem Farbstoff Hoechst können SP-Zellen von aggressiven B-Zell-Lymphomen Chemotherapeutika wie Daunorubicin und Mitoxantron vermehrt ausschleusen und weisen eine geringere Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin auf. Mischversuche mit GFP-markierten Zellen ergaben Hinweise auf die Existenz eines dynamischen Systems, welches die Entstehung von SP- aus NSP-Zellen nahelegt. Auf molekulargenetischer Ebene konnte eine erhöhte ABCA3-Expression nachgewiesen und mittels *Generarray* konnten einige potenziell SP-Zellen-prägende Kandidatengene wie CD44, CXCL12 und JAG1 identifiziert werden. Zusammenfassend lassen sich in diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen regelmäßig Zellen mit SP-Phänotyp, Chemotherapeutika-Resistenz und Kapazität zur autonomen Proliferation nachweisen, die in einem Gleichgewicht mit den NSP-Zellen innerhalb des Lymphoms stehen. Der molekulare Phänotyp der DLBCL SP-Zellen ist durch ein differenziertes Genexpressionsmuster, insbesondere eine hohe Expression des ABC-Transporters A3, gekennzeichnet.

## 6 Literaturverzeichnis

(Al-Hajj et al. 2003) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 3983-3988

(Alizadeh et al. 2000) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X et al. (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403(6769), 503-511

(Alvi et al. 2003) Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MM, Dale TC, Smalley MJ (2003): Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res* 5(1), R1-8

(Anagnostopoulos und Stein 2000) Anagnostopoulos I, Stein H (2000): Großzellige B-Zell-Lymphome: Varianten und Entitäten. *Der Pathologe* 21, 178-189

(Asakura und Rudnicki 2002) Asakura A, Rudnicki MA (2002): Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 30(11), 1339-1345

(Aung et al. 2011) Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R et al. (2011): Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(37), 15336–15341

(Barabe et al. 2007) Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE (2007): Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 316(5824), 600-604

(Benjamini und Hochberg 1995) Benjamini Y, Hochberg Y (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1), 289-300

(Bolstad et al. 2003) Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003): A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19(2), 185-193

(Bonnet und Dick 1997) Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7), 730-737

(Boye et al. 2003) Boye J, Elter T, Engert A (2003): An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol* 14(4), 520-535

(Chaffer et al. 2011) Chaffer C, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli A, Wiggins P, Rodrigues L, Brooks M, Reinhardt F, Su YF, Polyak K et al. (2011): Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(19), 7950-7955

(Chan et al. 2009) Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti JJ, Chang HY, van de Rijn M et al. (2009): Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33), 14016-14021

(Chapuy et al. 2008) Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, Ban N, Wenzel D, Reinhardt D, Zapf A et al. (2008): Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia* 22, 1576-1586

(Cheong et al. 2006) Cheong N, Madesh M, Gonzales LW, Zhao M, Yu K, Ballard PL, Shuman H (2006): Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *J Biol Chem* 281(14), 9791-9800

(Christ et al. 2007) Christ O, Lucke K, Imren S, Leung K, Hamilton M, Eaves A, Smith C, Eaves C (2007): Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica* 92(2007), 1165-1172

(Cole et al. 1992) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258(5088), 1650-1654

(Collins et al. 2005) Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005): Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer res* 65(23), 10946-10951

(Crocker et al. 2009) Crocker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL (2009): High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med* 13(8B), 2236-2252

(Davis et al. 2001) Davis R, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001): Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194(12), 1861-1874

(Dean 2009) Dean M (2009): ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14(1), 3-9

(Dengler et al. 1995) Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH (1995): Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs* 6(4), 522-532

(Denizot und Lang 1986) Denizot F, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2), 271-277

(Dick und Lapidot 2005) Dick J, Lapidot T (2005): Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol* 82(5), 389-396

(Dickson et al. 2007) Dickson B, Mulligan A, Zhang H, Lockwood G, O'Malley F, Egan S, Reedijk M (2007): High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 20(6), 685-693

(Ding et al. 2010) Ding XW, Wu JH, Jiang CP (2010): ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer. *Life Sci* 86(17-18), 631-637

(Doyle et al. 1998) Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15665-15670

(Dubrovska et al. 2012) Dubrovska A, Elliott J, Salamone RJ, Telegeev GD, Stakhovsky AE, Schepotin IB, Yan F, Wang Y, Bouchez LC, Kularatne SA et al. (2012): CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells. *PLoS One* 7(2), e31226

(Eramo et al. 2008) Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008): Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15(3), 504-514

(Fábián et al. 2009) Fábián A, Barok M, Vereb G, Szöllosi J (2009): Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? *Cytometry A* 75(1), 67-74

(Fallon et al. 2003) Fallon P, Gentry T, Balber AE, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, Storms RW, Smith C (2003): Mobilized peripheral blood SSCloALDH-br cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol* 122(1), 99-108

(Fillmore und Kuperwasser 2008) Fillmore CM, Kuperwasser C (2008): Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10(2), R25

(Gisina et al. 2011) Gisina AM, Lupatov AY, Karalkin PA, Mainovskaya OA, Petrov LA, Sidorov DV, Yarygin VN, Yarygin KN (2011): Detection of minor subpopulations of colorectal adenocarcinoma cells expressing cancer stem cell markers. *Bull Exp Biol Med* 151(2), 234-238

(Gisselbrecht et al. 2010) Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, Bosly A, Ketterer N, Shpilberg O, Hagberg H et al. (2010): Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 28(27), 4184-4190

(Goodell et al. 1996) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996): Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183(4), 1797-1806

(Greaves et al. 2012) Greaves W, Xiao L, Sanchez-Espiridion B, Kunkalla K, Dave KS, Liang CS, Singh RR, Younes A, Medeiros LJ, Vega F (2012): Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols. *J Hematol Oncol* 5(1), 47-52

(Haraguchi et al. 2006) Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M (2006): Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem cells* 24(3), 506-513

(Hirschmann-Jax et al. 2004) Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK (2004): A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39), 14228-14233

(Hu et al. 2012) Hu X, Ghisolfi L, Keates AC, Zhang J, Xiang S, Lee DK, Li CJ (2012): Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle* 11(14), 2691-2698

(Huang et al. 2009) Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM (2009): Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69(8), 3382-3389

(Jones et al. 1995) Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J(1995): Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 85(10), 2742-2746

(Jørgensen und Holyoake 2007) Jørgensen HG, Holyoake TL(2007): Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans* 35(Pt5), 1347-1351

(Juarez et al. 2007) Juarez J, Dela Pena A, Baraz R, Hewson J, Khoo M, Cisterne A, Fricker S, Fujii N, Bradstock KF, Bendall LJ (2007): CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia* 21(6), 1249-1257

(Juliano und Ling 1976) Juliano RL, Ling V (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455(1), 152-162

(Kim et al. 2009) Kim JE, Singh RR, Cho-Vega JH, Drakos E, Davuluri Y, Khokhar FA, Fayad L, Medeiros LJ, Vega F (2009): Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 22(10), 1312-1320

(Kim und Morshead 2003) Kim M, Morshead CM (2003): Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci* 23(33), 10703-10709

(Klugbauer und Hofmann 1996) Klugbauer N, Hofmann F (1996): Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 391(1-2), 61-65

(Koch et al. 2014) Koch R, Demant M, Aung T, Diering N, Cicholas A, Chapuy B, Wenzel D, Lahmann M, Güntsch A, Kiecke C et al. (2014): Populational equilibrium through exosome-mediated Wnt signaling in tumor progression of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 123(14), 2189-98

(van der Kolk et al. 2000) van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Vellenga E (2000): P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 6(8), 3205-3214

(Kompetenznetz Maligne Lymphome, <http://www.lymphome.de/InfoLymphome/PathologieUndKlassifikation/KlassNHL/index.jsp>) Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V. Sprecher und V.i.S.d.P. nach §10 Abs.3 MDStV: Prof. Dr. Michael Hallek, Köln unter: <http://www.lymphome.de/InfoLymphome/PathologieUndKlassifikation/KlassNHL/index.jsp> (abgerufen am 08.02.2010)

(Kuranda et al. 2011) Kuranda K, Berthon C, Leprêtre F, Polakowska R, Jouy N, Quesnel B (2011): Expression of CD34 in hematopoietic cancer cell lines reflects tightly regulated stem/progenitor-like state. *J Cell Biochem* 112(5), 1277-1285

(Larderet et al. 2006) Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT (2006): Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 24(4), 965-974

(Lelong et al. 1991) Lelong IH, Guzikowski AP, Haugland RP, Pastan I, Gottesman MM, Willingham MC (1991): Fluorescent verapamil derivative for monitoring activity of the multidrug transporter. *Mol Pharmacol* 40(4), 490-494

(Liang und Shi 2012) Liang D, Shi Y (2012): Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 29(2), 633-639

(Liang et al. 2010) Liang Y, Zhong Z, Huang Y, Deng W, Cao J, Tsao G, Liu Q, Pei D, Kang T, Zeng YX (2010): Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *J Biol Chem* 285(7), 4931-4940

(Martin et al. 2004) Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ (2004): Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265(1), 262-275

(Matsui et al. 2008) Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, McNiece I, Lin L, Ambinder RF, Peacock C et al. (2008): Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 68(1), 190-197

(Meeson et al. 2004) Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ (2004): Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* 22(7), 1305-1320

(Merlos-Suárez et al. 2011) Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, Iglesias M, Céspedes MV, Rossell D, Sevillano M, Hernando-Momblona X, da Silva-Diz V, Muñoz P et al. (2011): The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8(5), 511-524

(Mimeault und Batra 2009) Mimeault M, Batra SK (2009): Characterization of nonmalignant and malignant prostatic stem/progenitor cells by Hoechst side population method. *Methods Mol Biol* 568, 139-149

(Mitsutake et al. 2007) Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S (2007): Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 148(4), 1797-1803

(Nakashima et al. 2010) Nakashima M, Ishii Y, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R (2010): The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Sci* 101(11), 2490-2496

(Navin et al. 2011) Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D et al. (2011): Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472(7341), 90-94

(Nervi et al. 2009) Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK, Prior JL, Piwnica-Worms D, Bridger G, Ley TJ et al. (2009): Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* 113(24), 6206-6214

(Nicoletti et al. 1991) Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2), 271-279

(Nowell 1976) Nowell PC (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260), 23-28

(Patrawala et al. 2006) Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K et al. (2006): Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25(12), 1696-1708

(Pearce et al. 2005) Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D (2005): Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 23(6), 752-760

(Prince et al. 2007) Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007): Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3), 973-978

(Ricci-Vitiani et al. 2007) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007): Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445(7123), 111-115

(Robey et al. 2003) Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, Poruchynsky MS, Bates SE (2003): Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* 89(10), 1971-1978

(Russo et al. 1988) Russo JE, Haugwitz D, Hilton J (1988): Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino)benzaldehyde. *Biochem Pharmacol* 37(8) , 1639-1642

(Savage et al. 2003) Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F et al. (2003): The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102(12) (2003), 3871-3879

(Sengupta und Cancelas 2010) Sengupta A, Cancelas JA (2010): Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? *J Cell Physiol* 225, 7-14

[Shaffer et al. 2000] Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM (2000): BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, in am-  
mation, and cell cycle control. *Immunity* 13(2), 199-212

(Shimano et al. 2003) Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T (2003): Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* 163(1), 3-9

(Simon et al. 2012) Simon DP, Giordano TJ, Hammer GD (2012): Upregulated JAG1 enhances cell proliferation in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 18(9), 2452-2464

(Singh et al. 2011) Singh RR, Kunkalla K, Qu C, Schlette E, Neelapu SS, Samaniego F, Vega F (2011): ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 30(49), 4874-4886

(Smyth 2004) Smyth G (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3(1), Article 3

(Staudt und Dave 2005) Staudt L M, Dave S (2005): The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 87, 163-208

(Stein 2000) Stein H (2000): Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome: Nach "REAL" ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens. *Der Pathologe* 21(2), 101-105

(Steinbach und Legrand 2007) Steinbach D, Legrand O (2007): ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia* 21(6), 1172-1176

(Steinbach et al. 2002) Steinbach D, Sell W, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A (2002): BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16(8), 1443-1447

(Suetsugu et al. 2006) Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H (2006): Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351(4), 820-824

(Summer et al. 2003) Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A (2003): Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(1), L97-104

(Sweetenham 2011) Sweetenham JW (2011): Molecular signatures in the diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* 18(4), 288-292

(Szakács et al. 2004) Szakács G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M et al. (2004): Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6(2), 129-137

(Tang et al. 2007) Tang DG, Patrawala L, Calhoun T, Bhatia B, Choy G, Schneider-Broussard R, Jeter C (2007): Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog* 46(1), 1-14

(Taylor und Hartsock 2011) Taylor CR, Hartsock RJ (2011): Classifications of lymphoma; reflections of time and technology. *Virchows Arch* 458(6), 637-648

(Teicher und Fricker 2010) Teicher BA, Fricker SP (2010): CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16(11), 2927-2931

(Trümper et al. 2012) Trümper L, Uppenkamp M, Schmidberger H, Dornhoff W: B- und T-Zell-Lymphome (NHL); in: Taschenbuch Onkologie 2012/13 - Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie; hrsg. v. Preiß J, Dornhoff W, Hagmann F-G, Schmieder A unter Mitarbeit namhafter Autoren; 16. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München 2012, 15-31

(Uggla et al. 2005) Uggla B, Ståhl E, Wågsäter D, Paul C, Karlsson MG, Sirsjö A, Tidefelt U (2005): BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. *Leuk Res* 29(2), 141-146

(Vega et al. 210) Vega F, Davuluri Y, Cho-Vega JH, Singh RR, Ma S, Wang RY, Multani AS, Drakos E, Pham LV, Lee YC et al. (2010): Side Population of a Murine Mantle Cell Lymphoma Model Contains Tumor-Initiating Cells Responsible for Lymphoma Maintenance and Dissemination. *J Cell Mol Med* 14(6B), 1532-1545

(Vermes et al. 1995) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using uorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1), 39-51

(Visvader und Lindeman 2008) Visvader JE, Lindeman GJ (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8(10) (2008), S. 755-768

(Wang und Dick 2005) Wang JC, Dick JE (2005): Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15(9), 494-501

(Wu und Alman 2008) Wu C, Alman BA (2008): Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 268(1), 1-9

(Wu et al. 2011) Wu CP, Hsieh CH, Wu YS (2011): The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Mol Pharm* 8(6), 1996-2011

(Wulf et al. 2001) Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA (2001): A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 98(4), 1166-1173

(Yoshida et al. 1998) Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C (1998): Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251(3), 549-557

(Zhang et al. 2012) Zhang L, Jiao M, Li L, Wu D, Wu K, Li X, Zhu G, Dang Q, Wang X, Hsieh JT et al.(2012): Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J Cancer Res Clin Oncol* 138(4), 675-686

(Zhao et al. 2010) Zhao XF, Reitz M, Chen QC, Stass S (2010): Pathogenesis of early leukemia and lymphoma. *Cancer Biomark* 9(1-6), 341-374

(Zhou et al. 2001) Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H et al. (2001): The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7(9), 1028-1034

(Zhuo et al. 2012) Zhuo W, Jia L, Song N, Lu XA, Ding Y, Wang X, Song X, Fu Y, Luo Y (2012): The CXCL12-CXCR4 Chemokine Pathway: A Novel Axis Regulates Lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 18(19), 5387-5398