

Aus der Klinik für Neurochirurgie

(Prof. Dr. med V. Rohde)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Etablierung und Charakterisierung eines experimentellen Modells für invasive
Gliome**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christoph Richter

aus Bochum

Göttingen 2018

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

I. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Hans-Christoph Ludwig

II. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Christof Kramm

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2018

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Neuropathologische Klassifizierung/Historisches	7
1.2 Klinik.....	9
1.3 Diagnostik.....	9
1.4 Aktueller Therapiestandard des GBM	10
1.5 Prognose	11
1.6 Tumorstammzellkonzept, Stand der Wissenschaft.....	12
1.7 Experimentelle Modelle für GICs.....	14
1.7.1 In-vitro-Modell.....	14
1.7.2 In-vivo-Modell	15
2 Ziel der Arbeit	17
3 Material und Methode	19
3.1 Zellkultur.....	19
3.1.1 Passagierung	20
3.1.2 Ornithinbeschichtung von Deckgläsern	21
3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung <i>in vitro</i>	21
3.1.4 Limited dilution assay von G112-SP-Gliomasphären	21
3.2 Bestrahlung <i>in vitro</i>	22
3.3 Intrakranielle Implantation	23
3.4. In-vivo-Bestrahlungsversuch	25
3.5. Immunhistochemie	26
3.6. Auswertungsmethoden.....	30
4. Ergebnisse	30
4.1. Charakterisierung von G112-SP mit besonderer Beachtung der GIC- Eigenschaften.....	30

4.1.1 Selbsterneuerungskapazität <i>in vitro</i>	31
4.1.2 Phänotypische Plastizität und Differenzierung <i>in vitro</i>	31
4.1.3 Tumorigenität	33
4.1.4 Invasivität	35
4.1.5 CD133-Expression	40
4.1.6 Intratumorale Heterogenität.....	41
4.1.7 Radioresistenz.....	43
5 Diskussion	44
5.1 Tumorigenität, GIC-spezifische Marker, Differenzierung.....	44
5.2 Radioresistenz.....	46
5.3 Invasivität und intratumorale Plastizität	47
6 Zusammenfassung.....	50
7 Literaturverzeichnis	52
8 Anhang	62
8.1 Tabellen.....	62
8.2 Graphen	64

Abkürzungsverzeichnis

AC133	glycosyliertes Epitop von CD133
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Komplex
ap	anterior posterior
aqua bidest	zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
BTISC	<i>brain tumor initiating stem-like cell</i> = Hirntumor initierende Stamm-ähnliche Zelle
CCT	kranielle Computertomographie
CD	<i>cluster of differentiation</i> = Unterscheidungsgruppen
CD133	Prominin-1
cMRT	kranielle Magnetresonanztomographie
Co	Kobalt
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ED	extrazelluläre Domäne
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
G112	Gliomzelllinie G112
GBM	Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> = saures Gliafaserprotein
GIC	<i>glioma initiating cell</i> = Gliom induzierende Zelle
Gy	gray
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPF	<i>high power fields</i> = Haupt Gesichtsfeld
IG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IR	<i>irradiation</i> = Bestrahlung

KE	Maus-Code
KM	Kontrastmittel
KPS	<i>Karnofsky performance score</i>
max.	maximal
MEM	<i>eagles minimum essentials medium</i>
MGMT	O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase
min	Minute
Na	Natrium
Napthhol-AS-Bi-Phosphat	6-Bromo-2-phosphohydroxy-3-naptholsäure o-Anisidid
NB	neurobasal (Medium)
NGS	<i>normal goat serum</i>
NPC	<i>neural progenitor cells</i> = neurale Progenitoren
NSC	<i>neural stem cells</i> = neurale Stammzellen
p.	Passage
p53	Tumorsuppressorgen p53
pa	posterior anterior
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCV	Procarbazin, Cecenu=Lomustin, Vincristin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pfs	<i>progression free survival</i>
pH	potentia hydrogenii
SP	<i>side population</i> = Gliomstammzellen
ST	<i>standard culture</i> = Monolayer-Kulturen
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline</i> + Tween 20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U87	Gliomzelllinie U87
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV

In der aktuellen Veröffentlichung durch das Robert Koch-Institut zeigt sich erneut eine kontinuierliche Zunahme der Inzidenz und Prävalenz von Krebserkrankungen (Bertz et al. 2010). Maligne Hirntumoren machen, prozentual gesehen, nur einen geringen Prozentsatz aller Neoplasien aus (Kaatsch et al. 2013). Im Gegensatz zu anderen Krebsentitäten gibt es bislang für maligne Hirntumoren, gleich welcher Genese, bis auf ionisierende Strahlung (Meulepas et al. 2014) keine Umweltfaktoren oder andere bekannte beeinflussbare Faktoren, bei denen ein vermehrtes Auftreten nachgewiesen werden konnte (Kaatsch et al. 2013). Dies ist der Grund, warum präventive Maßnahmen bislang in der Hirntumorforschung so gut wie keine Rolle spielten und eher operative Strategien sowie präklinische und klinische adjuvante Therapiekonzepte ständiger Erneuerung unterliegen.

Von allen malignen Tumoren machen Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) in Deutschland ca. 2,5% aus (Kaatsch et al. 2013).

Die hirneigenen Tumoren bilden eine weitergehende Klassifizierung. In dieser genannten sind die glialen Tumoren mit ca. 70% am häufigsten von allen Tumoren des ZNS vertreten (Ohgaki und Kleihues 2005 a, Louis et al. 2007).

Nach der neuesten WHO-Klassifikation ist das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV (GBM), als glialer astrozytärer Tumor, mit 65% der mit Abstand am häufigsten auftretende (Louis et al. 2007). Der Altersgipfel liegt im Median bei 64 Jahren, die Inzidenz für Europa und Nordamerika liegt bei ca. 3/100.000 (Louis et al. 2007).

1.1 Neuropathologische Klassifizierung/Historisches

Nach der WHO-Klassifikation werden Hirntumoren in vier Grade (WHO-Grad I-IV) eingeteilt (Louis et al. 2007). Diese richtet sich nach der Histopathologie. Für astrozytäre Tumoren werden zur Gradeinteilung histopathologisch Zellkern-Pleomorphie, erhöhte Mitoserate, Tumornekrosen und die Endothelproliferation bzw. pathologische Gefäße betrachtet. Treffen alle morphologischen Kriterien zu, wird der gliale astrozytäre Tumor viertgradig eingeteilt und als GBM bezeichnet. Das „multiforme“ Bild der Histopathologie, welches sich auch makroskopisch widerspiegelt, wurde erstmals von Bailey und Cushing Anfang des 20. Jahrhunderts

beschrieben und hat diesem Tumor also seinen Namen verliehen (Bailey und Cushing 1927). Eine erste systematische Darstellung von intrakraniellen Tumoren erfolgte bereits 1888 durch Bramwell. Interessanterweise beschrieb schon er die herausragend wichtige Rolle der klinischen Diagnose: „in no disease is an exact diagnosis of more importance“ (Bramwell 1888) (s. Abb. 1b und c). Die erste Operation eines Glioms an einem lebenden Patienten wird dem Chirurgen Godlee und dem Neurologen Bennett zugesprochen. Am 25. November 1884 operierten sie einen 25-jährigen Patienten an einem intrazerebralen Tumor. Die Lokalisation des Tumors erfolgte alleine anhand der klinischen Symptomatik. Der Patient überlebte die Operation, verstarb jedoch vier Wochen später an den Folgen einer post-operativen Meningitis (Bennett und Godlee 1885).

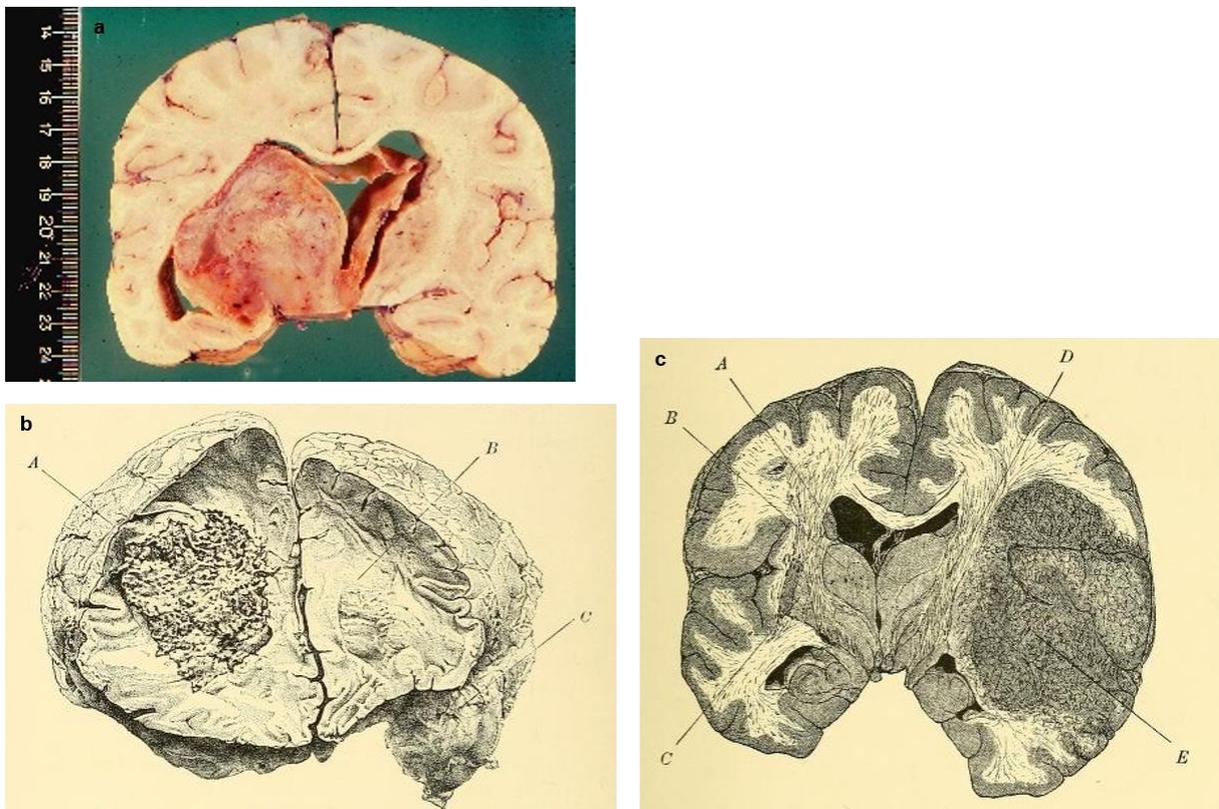


Abbildung 1: Typische „multiforme“ Erscheinung eines Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV.

a: koronare Schnittebene eines makropathologischen Präparats mit Tumorwachstum im Bereich der Stammganglien rechts (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Sommer, Abteilung für Neuropathologie, Universitätsmedizin Mainz). **b:** Zeichnung eines pathologischen Präparats mit einem rechts-frontalen „Sarkom“ (Bramwell 1888). **c:** Schematische Darstellung eines links-hemisphärischen Tumors (Bramwell 1888).

Gliale astrozytäre Tumoren können im Verlaufe mehrerer Jahre malignisieren und somit in ihrem WHO-Grad aufsteigen. In über 90% ist jedoch die Entstehung eines hochgradigen Tumors *de novo* (Ohgaki und Kleihues 2013). Eine unifokale Erstmanifestation ist die Regel, es gibt jedoch auch multifokale Tumoren (Thomas et al. 2013). Eine sehr seltene Ausprägungsform ist das disseminierte Wachstum, man spricht dann von einer Gliomatosis cerebri (Rudà et al. 2014).

1.2 Klinik

Maligne hirneigene Tumoren können sehr unterschiedliche Symptome verursachen. Die häufigste Manifestation ist ein generalisierter tonisch klonischer epileptischer Anfall (Englot et al. 2012). Diesen bezeichnet man auf Grund des pathologischen Korrelats für den Anfall als symptomatische Epilepsie. Des Weiteren sind therapieresistente Kopfschmerzen, Schwindel und Übelkeit als Zeichen der intrakraniellen Drucksteigerung durch die Raumforderung möglich. Die Gesamtbreite an neurologischen Ausfallsymptomen kann, je nach Lage des Tumors, in eloquenten Regionen auftreten. Paresen, sensible Ausfälle, dysphasische Störungen, Sehstörungen, Hirnnervenausfälle, Wesensänderungen sowie Vigilanzminderung können auftreten. Diese entstehen durch lokale, destruiende Infiltration von Tumorzellen in gesundes zerebrales Gewebe zum einen, zum anderen durch die raumfordernde Wirkung der Tumormasse oder eines Perifokalödems (vasogenes Hirnödem). Des Weiteren können Komplikationen sekundär als Folge der Raumforderung entstehen wie beispielsweise ein Hydrocephalus occlusus durch Verlegung der Liquorabflusswege oder ein Hydrocephalus bei Meningeosis gliomatosa, welche die Aussaat von Tumorzellen im Liquorsystem beschreibt.

1.3 Diagnostik

Die Diagnostik von intrakraniellen Raumforderungen erfolgt in jedem Falle durch eine kraniale Schnittbilddiagnostik mittels kranialer Computertomographie (CCT) sowie kranialer Magnetresonanztomographie (cMRT) jeweils Kontrastmittel (KM)-unterstützt. Der Goldstandard ist die cMRT T1- gewichtete Sequenz mit KM. Da durch das Tumorwachstum häufig eine Störung der Bluthirnschranke eintritt, kommt es zu einer Kontrastmittelaufnahme des Tumors in den KM-Sequenzen (Wintersperger et al. 2009). Typischerweise ist diese KM-Aufnahme girlandenförmig konfiguriert. Dieses Phänomen kommt durch vitales Tumorgewebe in den

Randbezirken des Tumors zustande, während das Zentrum bereits häufig nekrotischen Umbauvorgängen unterworfen ist (s. Abb. 2 a + b).

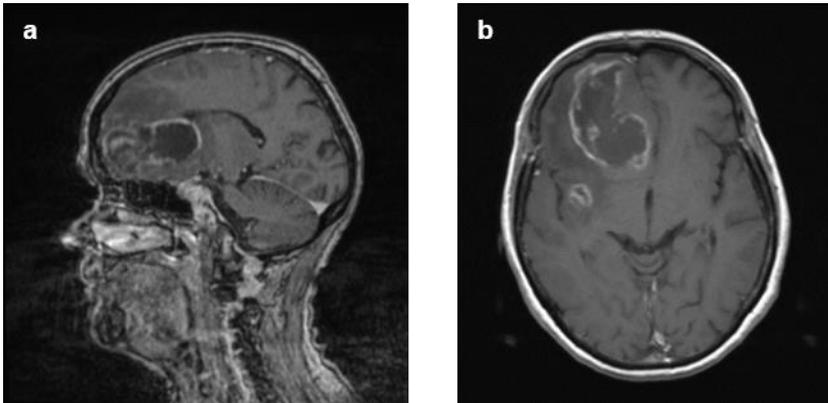


Abbildung 2: GBM in kernspintomographischen Aufnahmen des Craniums in T1-Wichtung mit KM. a: sagittale Ebene b: axiale Ebene. Es zeigt sich eine rechts-frontale Raumforderung mit typischer girlandenförmiger KM-Aufnahme, hoch verdächtig auf ein GBM.

Differentialdiagnostisch kommen andere maligne Tumoren in Betracht (z.B. Metastasen, Lymphome) sowie Abszedierungen. Meist ist jedoch durch die typische girlandenförmige KM-Aufnahme und das diffuse Wachstum die Verdachtsdiagnose sehr wahrscheinlich. Die endgültige Diagnose kann nur histopathologisch erfolgen.

Zur Differenzierung von möglichen Differentialdiagnosen können auch MR-Spektroskopie und die Positronenemissionstomographie (PET) hilfreich sein.

1.4 Aktueller Therapiestandard des GBM

Die Therapie besteht heute nach aktueller Studienlage aus der am prognostisch wichtigsten vollständigen Resektion der KM-aufnehmenden Tumoranteile (Lacroix et al. 2001). Die Gesamtheit des Tumors kann durch das infiltrative Wachstum in gesundes Hirngewebe nicht vollständig reseziert werden (Giese und Westphal 1996, Giese et al. 2003). Trotzdem hat sich gezeigt, dass eine Resektion von mehr als 98% des KM-aufnehmenden Tumors zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens führt (Lacroix et al. 2001). Auf Grund dessen wird seit neuestem auch die supramarginale Resektion, also die Resektion weit über die KM-aufnehmenden Anteile bis zum nächsten eloquenten Areal, diskutiert (Duffau 2014). Bei nicht möglicher vollständiger Resektion der KM-aufnehmenden Anteile, z.B. auf Grund der Lage des Tumors in der Nähe von eloquenten Arealen, sollte zumindest eine Biopsie

die Diagnose sichern. Hiernach folgen in einem multimodalen Therapiekonzept die Radiotherapie der erweiterten Tumorregion mit einer kumulativen Gesamtdosis von 60 Gy sowie eine Chemotherapie. Nach aktueller Studienlage wird die kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid (Dosis 75 mg/m²), gefolgt von 6 Zyklen einer Temozolomid-Monotherapie (Dosis 150-200 mg/m²) in dem Schema 1-5/28 Tagen als Goldstandard angesehen (Stupp et al. 2005). Es gibt noch viele weitere adjuvante Therapiekonzepte, die im Laufe der letzten 30 Jahre angewendet wurden. Hierunter befinden sich jedoch viele Medikamente mit ähnlichen biochemischen Angriffspunkten. Besonders das PCV-Schema (Procarbazin, Cecenu=Lomustin, Vincristin) ist hier zu nennen. Einzig das oben genannte Schema konnte das mediane Überleben im Vergleich zu anderen Therapiekonzepten verlängern.

Neuere Forschung im Bereich der Antiangiogenese wie zum Beispiel die Anwendung von Bevacizumab (Chinot et al. 2014) oder andere Immuntherapien haben auch in der glialen Tumorbehandlung Einzug erhalten, sind jedoch bislang über frühe Phase-3-Studien noch nicht hinausgekommen (Chinot et al. 2011) und sind als Standardtherapien daher noch nicht etabliert.

Zunehmend werden molekulare Marker wichtiger. So konnte die IDH-1 Mutation als prognostischer Marker etabliert werden (Combs et al. 2011).

Die Methylierung des Promotors der O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wird seit jüngster Zeit auch eine prädiktive Wertigkeit zugesagt (Wick et al. 2013, Wick et al. 2014). Die Effektivität von alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid ist abhängig vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors (Hegi et al. 2005, Weller et al. 2009, Kanemoto et al. 2014). Eine individualisierte Therapie wird daher diskutiert (Weller et al. 2010, Wick et al. 2014). Jedoch kann der vollständige Verzicht auf alkylierende Substanzen mangels Alternativen in der Primärtherapie noch nicht etabliert werden.

1.5 Prognose

Das mediane Überleben von Patienten mit erstdiagnostiziertem GBM hat sich trotz stetigen Fortschritten im Bereich der operativen Neurochirurgie sowie den adjuvanten Therapien in den letzten 20 Jahren nur wenig verbessert. Es hängt stark von Einflussfaktoren wie dem Alter, klinischen Zustand, erfasst durch den *Karnofsky*

performance score (KPS) bei Erstdiagnose und von genetischen Einflussgrößen z.B. MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, IDH-1-Mutation (Weller et al. 2009) ab. Bei vollständiger Resektion des Tumors und adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von weiteren 6 Zyklen einer adjuvanten Temozolomid-Monotherapie im Schema 1-5/28 Tagen, beträgt das mediane Überleben 14,6 Monate (Stupp et al. 2005). Für das rezidivierende GBM ist die Prognose noch schlechter, des Weiteren gibt es noch keine etablierte Standardtherapie in der Rezidivsituation. Die Therapieansätze in der Rezidivsituation unterscheiden sich daher in den unterschiedlichen Zentren in Deutschland.

1.6 Tumorstammzellkonzept, Stand der Wissenschaft

Jüngste Entwicklungen im Verständnis der Biologie von Gliomen oder genauer gesagt zellulärer Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der normalen Hirn-Architektur und -Funktion dienen, haben wichtige Einblicke für mögliche Gründe des Versagens der Standardtherapie des GBM erbracht. Eine der fundamentalen Erkenntnisse, die entscheidend für das Verständnis sowohl der normalen Hirnfunktion als auch der Pathologie war, ist die Entdeckung, dass neurale Stammzellen nicht nur während der Neurulation auftreten, sondern auch im adulten Gehirn persistieren (Gage 2000). Diese neuronalen Stammzellen sind multipotent, sind also in der Lage, sich in die neurale, astrogliale oder oligodendrogliale Zelllinie zu differenzieren. Sie sind besonders im Gyrus dentatus sowie subventrikulär bzw. subependymal zu finden (Gil-Perotín et al. 2013), welche als Stammzellnischen im adulten Gehirn gelten und sind stets postnatalen Ursprungs. Sie haben die Möglichkeit, sich ständig selbst zu erneuern und zu differenzieren sowie bei Schäden des ZNS zu migrieren, welches als *homing* bezeichnet wird (Gil-Perotín et al. 2013). Es wurde versucht, Stammzellmarker in dieser Population zu definieren. So wurde Prominin-1 (CD133) sowie Nestin in Stammzellen gefunden im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen (Gil-Perotín et al. 2013). Die Identifizierung von vereinzelter Populationen von CD133-exprimierenden Gliomzellen führte zur Hypothese, dass neurale Stammzellen (NSC) oder Progenitoren (NPC) die Zellen des Ursprungs von malignen Gliomen sind (Singh et al. 2004). Diese grundlegenden Erkenntnisse haben Gliome in die Gruppe von Krebserkrankungen eingereiht, welche aus „Tumorstammzellen“ von Stammzellen oder Progenitoren hervorgehen (s. Abb. 3).

Diese sollen die Erkrankung auslösen und auch unterhalten (Reya et al. 2001, Oliver et al. 2004).

Innerhalb der heterogenen Zellpopulation von malignen Gliomen wird angenommen, dass eine Subpopulation von so genannten *brain tumor initiating stem-like cells* (BTISC`s) oder auch Gliom-induzierenden Zellen (*glioma initiating cells*=GIC) mit Tumorstammzellattributen zu finden ist (s. Abb. 3). Als Tumor-induzierende Einheit soll diese das Wachstum und die Re-Population mit allen möglichen Facetten der biologischen und histopathologischen Eigenschaften des GBM repräsentieren (Singh et al. 2004, Vescovi et al. 2006). Es wird somit ein „hierarchisches Paradigma“ propagiert (Chen et al. 2010, Wicha et al. 2006). Die Einführung dieser Hypothese der Hierarchie hat eine besondere klinische Bedeutung, da es eine plausible Erklärung für die unvermeidliche Rezidivierung des GBM nach erfolgter zytotoxischer Therapie bietet. Die Neigung zur Rezidivierung erklärt sich durch eine außerordentlich hohe Resistenz von Glioblastomzellen gegen Radio- und Chemotherapie (Bao et al. 2006, Schmalz et al. 2011, Caldera et al. 2012) und ist der Hauptgrund für die limitierende Prognose (Reardon et al. 2006). Jedoch fehlt z. Z. noch das grundlegende Verständnis für Ursprung, Progression und Resistenzmechanismen dieser Subpopulation sowie die Charakterisierungsmöglichkeit zur Identifikation in der Heterogenität des Tumors.

Die aktuelle Forschung orientiert sich daran, diese Subpopulation von Tumorstammzellen zu identifizieren, mit dem Ziel, diese als Angriffspunkt zu nutzen (Tysnes et al. 2010). Hierzu gehört es, zunächst spezifische Marker für diese Subpopulation zu finden. In den letzten Jahren wurde CD133, ein Transmembranprotein, als Marker für Tumorstammzellen auch in malignen Gliomen diskutiert und als ultimativer Marker von GICs benannt (Singh et al. 2004). Allerdings wurde in einigen Studien die Signifikanz als Marker für die Identität von GICs und die klinische Relevanz bezweifelt (Clément et al. 2009, Kim et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass auch CD133-negative Zellen Tumoren induzieren können (Wang et al. 2008, Ogden et al. 2008). Des Weiteren wurde in einigen Arbeiten eine Korrelation von CD133-Expression und klinischem Outcome in Patienten mit GBM bezweifelt (Kim et al. 2011), in einer Studie konnte sogar eine inverse Korrelation gesehen werden (Kase et al. 2013). Dies würde die Wertigkeit des Markers in Frage

stellen. Zumindest ist eine universelle Einsetzbarkeit als Tumorstammzellmarker fraglich. Eine Reihe weiterer Membranproteine (CD15), zellulärer Filamente (Nestin) und anderer Proteine wurden als Stammzellmarker herangezogen.

Zusammenfassend konnte bislang kein zuverlässiger, universeller Marker ausgemacht werden.

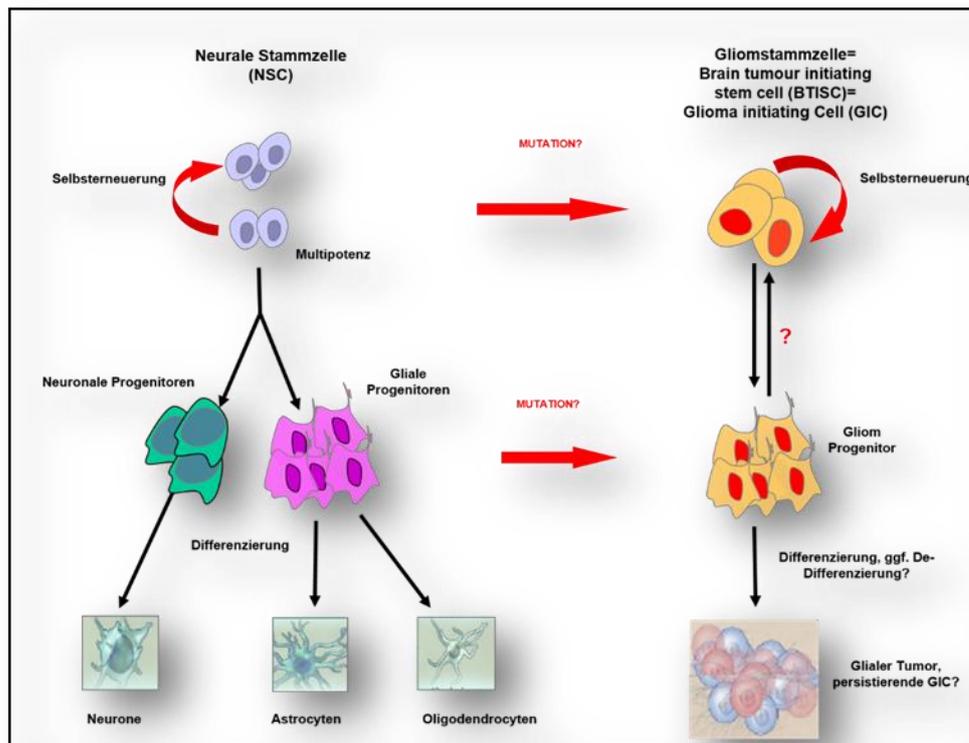


Abbildung 3: Hierarchisches Modell der durch Stammzellen induzierten Neurogenese sowie Gliomagenese. GICs gehen aus Neuralen Stammzellen oder Progenitoren hervor und differenzieren in gliale Tumorzellen. GICs persistieren innerhalb der Heterogenität des Tumors.

1.7 Experimentelle Modelle für GICs

1.7.1 In-vitro-Modell

Eine allgemeine Annahme ist die Fähigkeit von GICs *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen (FCS-) zu proliferieren und sich selbst zu erneuern (Galli et al. 2004). Unter Serum-freien Bedingungen wachsen nicht-adhärenente Sphären aus mehreren GBM-Zellen, die so genannten „Neurosphären“ oder „Gliomasphären“ (s. Abb. 4b) mit Stammzellattributen (Laks et al. 2009). Unter Zugabe von Serum wachsen adhärenente Kulturen, die sogenannten „Monolayer-Kulturen“ (s. Abb. 4a) ohne

Stammzellattribute *in vitro*. Serum hat per se einen Differenzierung-induzierenden Effekt auf neurale Stammzellen oder Progenitoren. Auf der Grundlage der angenommenen Ähnlichkeit von NSCs/NPCs und GICs wird impliziert, dass Serum-Faktoren ebenfalls einen die Differenzierung induzierenden Effekt in GICs auslösen (Lee et al. 2006). Jedoch wurde auch gezeigt, dass in einigen Tumorzelllinien eine gewisse *side population* ihre Stammzellattribute unter Serum-Bedingungen behalten kann (Setoguchi et al. 2004). Dies könnte resultieren aus einem Verlust oder einer veränderten Funktion von Mechanismen, welche die terminale Differenzierung in normalen Stammzellen induzieren. Wenn man betrachtet, dass die terminale Differenzierung vergesellschaftet ist mit dem Sistieren der Proliferation in normalen Stammzellen, könnte der Verlust oder die veränderte Differenzierung in Tumorstammzellen zu einer fortgeführten Proliferation führen, selbst unter Bedingungen, die eine Differenzierung begünstigen. Trotzdem ist es noch unklar, ob die Fähigkeit der Differenzierung alleine auf die Subpopulation der GICs beschränkt ist.

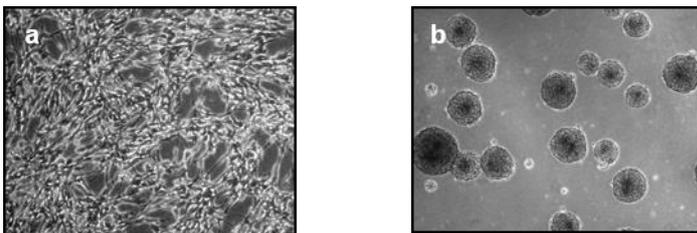


Abbildung 4: Verschiedene Wachstumsmuster von Gliomzellen *in vitro*. a: Typisches Wachstum von heterogenen Populationen von Gliomzellen als adhärenzte Monolayer unter der Zugabe von Serum. b: Gliomasphären generiert aus GICs, selektiert unter Serum-freien Bedingungen.

1.7.2 In-vivo-Modell

Präklinische Forschung an neuen adjuvanten Therapiekonzepten ist immer noch sehr abhängig von In-vivo-Modellen (Candolfi et al. 2007).

Die Verfügbarkeit von experimentellen Tiermodellen, welche die Biologie, Morphologie und Pathologie von humanen GBM rekapitulieren, ist daher von größter Bedeutung, um die Mechanismen der Invasivität, Rezidivierung und Radio-Chemoresistenz von GBM im Menschen besser zu verstehen und therapieren zu können. Intrakranielle und subkutane Modelle in Nagetieren sind seit jeher zum Verständnis der Tumorbilogie *in vivo* im Gebrauch, um präklinische

Therapieoptionen zu erforschen (Xie et al. 2008). Es erscheint jedoch in der aktuellen Literatur eine breite Variabilität von experimentellen In-vivo-Modellen, die kontrovers diskutiert werden (Jacobs et al. 2011). Hauptkritikpunkt ist zumeist der biologische Phänotyp von *in vivo* gewachsenen Tumoren, die häufig humane GBM nur schlecht repräsentieren. Kritisiert wird zumeist die mangelnde Invasivität der Xenograft-Transplantate (Radaelli et al. 2009). Einer der Gründe für diese beschriebene Diskrepanz in der gängigen Literatur könnte die Uneinheitlichkeit der experimentellen Modelle sein. Zum einen werden Xenograft-Transplantate aus Biopsien verwendet. Kritisiert wird an diesem Model die Heterogenität des Zellmaterials. Positiv zu bewerten wäre die Tatsache, dass die Tumorzellen, die aus diesem Material gewonnen werden, noch nie in Kontakt mit Serum gekommen sind. Des Weiteren werden Xenograft-Transplantate aus etablierten Gliomzelllinien verwendet. Hauptkritikpunkt hier ist die meist langjährige Exposition von Serum. Positiv zu bewerten ist die Reinheit des Tumorzellmaterials. Erste Versuche Gliomzelllinien zu etablieren sind bereits in den 1970er Jahren in Schweden beschrieben worden (Westermarck et al. 1973). Aus dieser Zeit stammen auch die noch heute gebräuchlichen Zelllinien U87 (Ponten und Westermarck 1978) und U251 (Westermarck et al. 1973).

Zusammengefasst werden Hirntumorstammzellen mit folgenden Eigenschaften beschrieben:

Die fundamentalen klinischen Eigenschaften der "Tumorigenität in einem orthotopen Modell" (Vescovi et al. 2006) sowie die "Resistenz gegen zytotoxische Therapien" (Bao et al. 2006).

Des Weiteren die biologischen Eigenschaften: "Extensive Selbsterneuerung *ex vivo* oder *in vivo*", die Fähigkeit zur "aberranten Differenzierung" sowie die Kapazität "nicht-tumorigene Endzellen zu erzeugen" (Vescovi et al. 2006).

2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es nun, ein experimentelles invasives Gliommodell reproduzierbar zu etablieren und mit Hinblick auf die derzeit erreichbaren Kern-Eigenschaften der Tumorstammzelltheorie zu charakterisieren: Tumorigenität, klinische Radioresistenz, Potenzial zur Selbsterneuerung, Differenzierung, phänotypische Plastizität und Heterogenität sowie eine mit dem GBM vergleichbare Morphologie.

Hierzu wurde die Gliomzelllinie G112 untersucht, welche bereits in einer Arbeit Proliferation *in vitro* gezeigt hatte, jedoch nicht *in vivo* charakterisiert wurde (Akudugu et al. 2001). Zur Untersuchung der klinischen sowie biologischen Kriterien der Tumorstammzellen wurde eine Versuchsanordnung gewählt, in der GICs der ursprünglichen Gliomzelllinie G112 (G112-ST) durch Serum-freie Kulturbedingungen selektioniert wurden (G112-SP). GICs wurden untersucht auf die derzeit gängigen Kriterien für Tumorstammzellen *in vitro*. Zur Untersuchung der klinischen Kriterien wurden GICs (G112-SP) als Xenograft immundefizienten Mäusen zerebral mittels Stereotaxie implantiert. Zum Vergleich dienten Xenograft-Transplantate der Gliomzelllinie U87, die als nicht-stammzellige Zelllinie gilt.

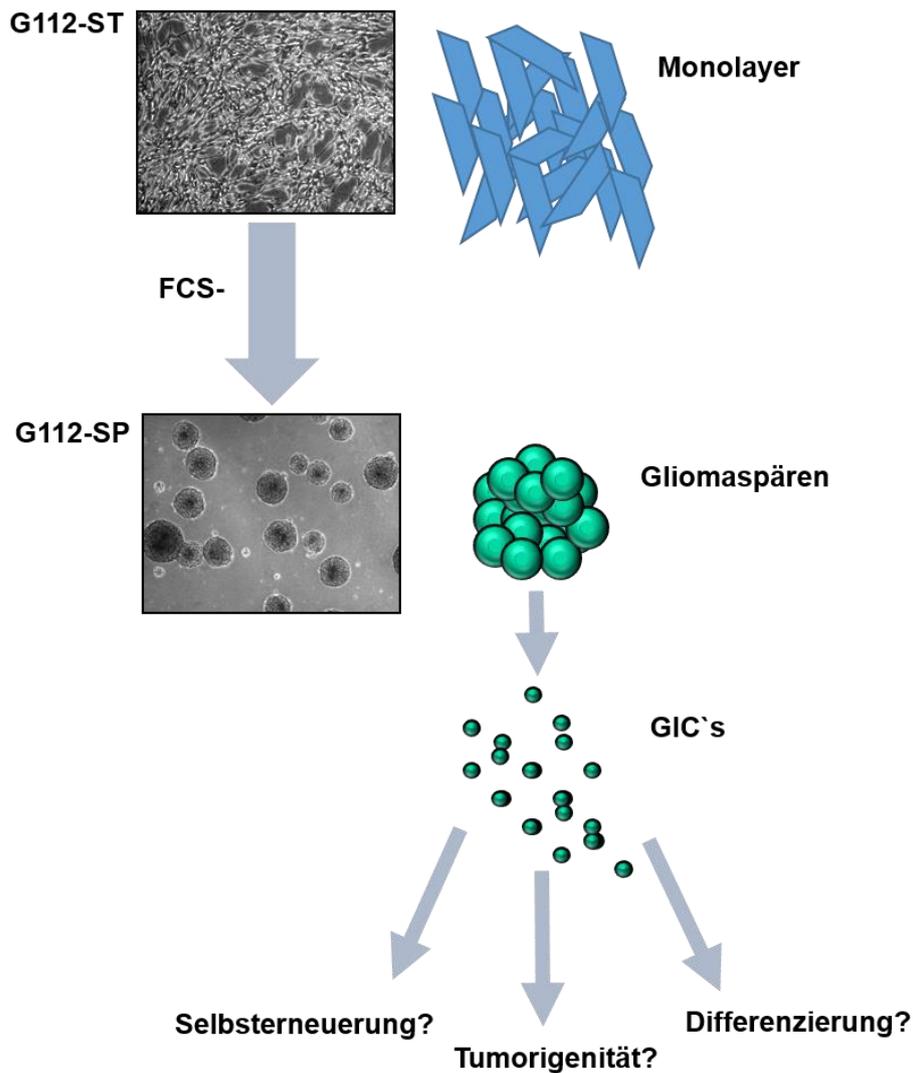


Abbildung 5: Untersuchung von GICs aus G112 auf die Tumorstammzell-Kriterien. Aus der ursprünglichen Gliomzelllinie G112-ST werden unter Serum-freien Bedingungen (FCS-) Gliomasphären erzeugt (G112-SP). GICs aus Gliomasphären werden hinsichtlich Selbsterneuerung, Differenzierung und Tumorigenität untersucht.

Entstehende Tumoren wurden histopathologisch und immunhistochemisch charakterisiert. Zur Untersuchung der Radioresistenz von Tumorstammzellen wurden sowohl zu implantierende Zellen (*ex vivo*) als auch bereits *in vivo* gewachsene Tumore mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und das klinische Verhalten der Tiere (Gesamtüberleben) betrachtet.

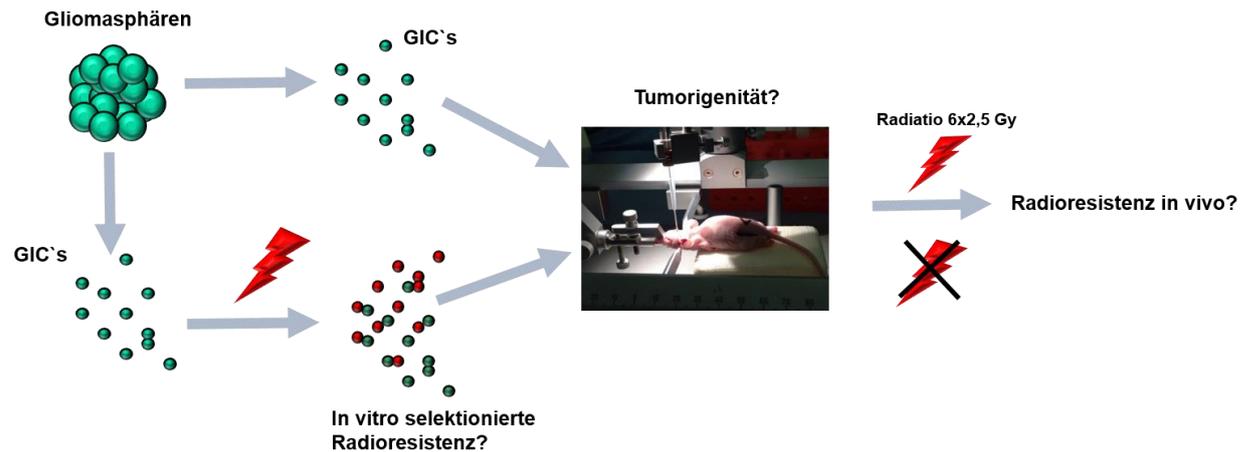


Abbildung 6: Untersuchung von GICs aus G112-SP auf die klinischen Kriterien der Tumorigenität und Radioresistenz. Aus Gliomasphären gewonnene GICs *in vitro* bestrahlt oder nicht bestrahlt werden in Mäuse implantiert. Zur Untersuchung der Radioresistenz *in vivo* werden implantierte Mäuse bestrahlt mit 6 Fraktionen von je 2,5 Gy. In der Kontrollgruppe erfolgt keine Bestrahlung.

3 Material und Methode

Für diese Arbeit war eine Reihe von Vorversuchen notwendig. Die Arbeiten der Zellkultur sowie die In-vitro-Immunfluoreszenzfärbungen wurden alle unter der Leitung von Dr. rer. nat. habil. Ella L. Kim im neuroonkologischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

3.1 Zellkultur

Die Bereitstellung der Gliomzellsuspensionen für die Implantation erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. habil. Ella L. Kim im neuroonkologischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen. Die verwendeten Zellen wurden in einem Inkubator (Forma Scientific, Marietta, U.S.A.) inkubiert (37°C, 5% CO₂ Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit). Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (Baker Company, Sanford, U.S.A.) Für diese Arbeit wurden folgende etablierte Gliomzelllinien verwendet:

Die Zelllinie G112 wurde im neuroonkologischen Labor des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf, Abteilung Neurochirurgie, Prof. Dr. M. Westphal etabliert (Westphal et al. 1994, Heese et al. 2005).

Die Zelllinie U87 ist eine etablierte Gliomzelllinie und wurde bereits 1975 beschrieben (Ponten 1975). Das Genom dieser Zelllinie wurde als erste Gliomzelllinie

ausnahmslos sequenziert (Clark et al. 2010). Seither wurde diese in über 2000 Publikationen verwendet oder zitiert. Die Gliomzelllinie U87 wurde erworben von American Type Cell Collection (ATCC, accession number HTB-14).

Die Kultivierung von G112 als adhärenente Monolayer-Kulturen (G112-ST) erfolgte unter Zusatz von Eagle`s Minimum Essentials Medium (MEM), (Gibco, Rockville, U.S.A.) mit 10% FCS (Gibco, Rockville, USA) sowie 5ml 100x Natriumpyruvat und 5ml L-Glutamin (Gibco, Rockville, USA). Die Selektion von Gliomzellen mit Stammzell-ähnlichem Charakter (G112-SP) gelingt in Neurobasal Medium (Invitrogen, Carlsbad, Ca, U.S.A.) ergänzt mit B27 supplement (Invitrogen, Carlsbad, Ca, U.S.A.) sowie fibroblast growth factor-2 (FGF), 10 ng ml⁻¹ (R&D, Minneapolis, U.S.A.) und epidermal growth factor (EGF), 20 ng ml⁻¹ (R&D Minneapolis, U.S.A.). Hierunter wachsen Gliomasphären heran bis zu einer durchschnittlichen Größe von 100 µm (s. Abb. 4 b).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebe-Kulturflaschen, nach Erreichen von 80% Konfluenz wurde nach ca. 4-5 Tagen passagiert.

3.1.1 Passagierung

Für G112-ST erfolgte die Passagierung wie folgt: Das überschüssige Medium wurde entfernt und mit PBS zwei Mal gewaschen. Das Ablösen der adhärenenten Zellen gelang mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Rockville, USA), inkubiert für 5-10 min bei 37 °C. Konnten mikroskopisch Abrundungen der Zellen erkannt werden, erfolgte das Überführen in frisches Medium. Die Dispergierung gelang durch wiederholtes Pipettieren.

Für Gliomasphären (G112-SP) erfolgte die Passagierung nach folgendem Schema: Die Gliomasphären wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert. Die Vereinzelung der GICs wurde durch Trypsin ergänzt. Die gewonnenen Einzelzellen wurden dann in neue Kulturflaschen umgesetzt.

3.1.2 Ornithinbeschichtung von Deckgläsern

Zur Bearbeitung von G112-SP musste auf Grund der fehlenden Adhärenz eine Ornithinisierung der Lochplatten oder Deckgläser für die Färbungen erfolgen. Hierzu wurde Poly-L-Ornithin Lösung 15µg/ml in PBS (Gibco, Rockville USA) gelöst und auf die Deckgläser oder die Lochplatten aufgetragen und bei 37°C für 24h inkubiert. An den zwei Folgetagen wurde jeweils drei Mal mit PBS gewaschen und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung *in vitro*

Für die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach oben beschriebener Ornithinisierung in 24-Lochplatten mit jeweils 1×10^3 Zellen zunächst eine Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA, 3,7% in PBS für 5 min). Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Zur besseren intrazellulären Bindung der Antikörper wurde die Zellmembran mit einer 0,3%-TritonX-100-Lösung (0,3% TritonX-100 in PBS, 10min bei RT) permeabilisiert. Es folgte nach dreimaligem Waschen die Blockung mit bovine serum albumin Block (BSA) für 30 min um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Zur Immunfluoreszenzfärbung *in vitro* wurden folgende Antikörper verwendet: Humanes Nestin (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), GFAP (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark). Für GFAP oder Nestin (1:400 in BSA) wurde bei 4°C über Nacht oder für 90-180 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem sekundären AK AlexaFluor488 oder AlexaFluor555 (1:500 in BSA) für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Kernfärbung mit DAPI (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, USA) vorgenommen. Nach weiterem Waschen mit PBS erfolgte die Versiegelung mit 5µl Mounting Medium auf einen Objektträger. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

3.1.4 Limited dilution assay von G112-SP-Gliomasphären

G112-SP-Zellen bestimmter Konzentration wurden in das erste Well einer 96 Well-Platte ausgesät in NB-Medium. Die anderen Wells wurden mit jeweils 150 µl NB-Medium vorpipettiert. Nun folgte die weitere Verdünnung der Zellsuspension durch Pipettieren von Well zu Well. Nach Ansetzen des Versuchs wurden nach 10 bis 21 Tagen die Platten auf die Bildung von Gliomasphären untersucht. Hierbei wurde

beurteilt, ob die Zelllinie auch in subklonaler Konzentration in der Lage ist, Gliomasphären zu bilden.

3.2 Bestrahlung *in vitro*

Um einen radioresistenten Subtyp zu selektionieren, wurde eine Versuchsanordnung gewählt in der trituierte Einzelzellen aus Gliomasphären bestrahlt und hiernach in einer Erholungsphase erneut zu Gliomasphären passagiert wurden. Diese Versuchsanordnung wurde nun mehrfach wiederholt, in der Annahme, die radioresistente Subpopulation stetig herauszuselektionieren (s. Abb. 7).

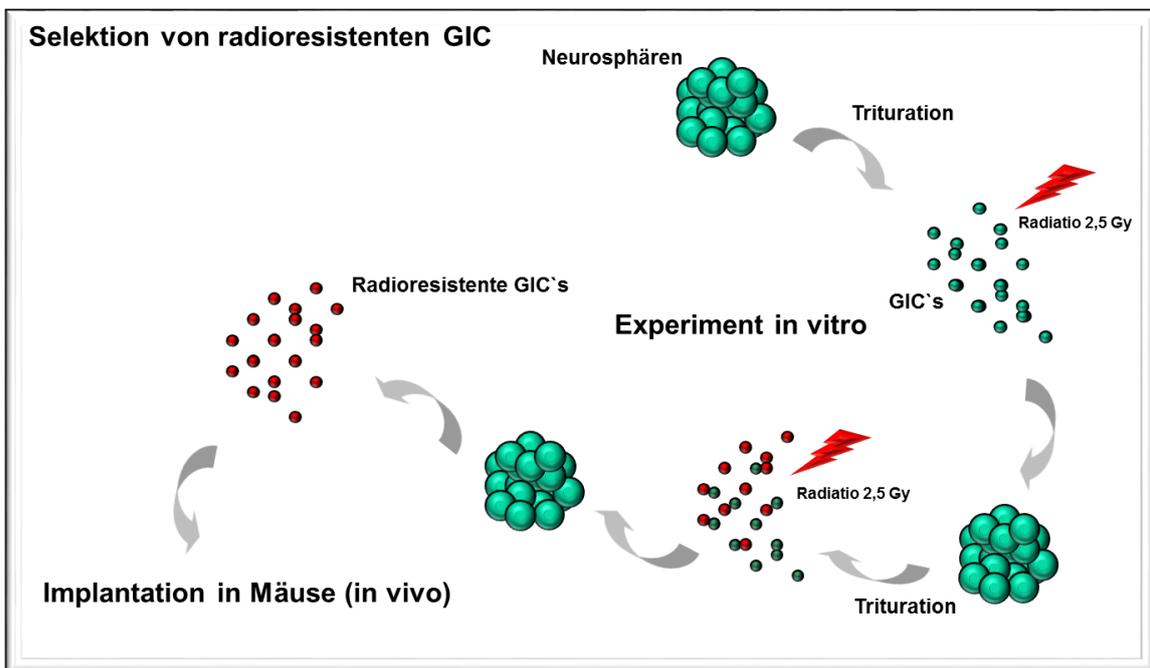


Abbildung 7: Selektionierung des radioresistenten Phänotyps *in vitro*. Repetitive Bestrahlung von GICs *ex vivo* führt zu einem radioresistenten Phänotyp.

Die Bestrahlungsversuche wurden unter Supervision von Frau Margret Rave-Fränk, Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Unviersitätsmedizin Göttingen, durchgeführt (^{60}Co -Quelle, Dosisleistung 1 Gy/min bei Raumtemperatur). Es wurden ausschließlich Zellen der selektierten Sublinie G112-SP der 11. Passage (G112-SP p.11) bestrahlt. Die Bestrahlung (*irradiation*=IR) erfolgte fraktioniert mit Einzeldosen von 2,5 Gy.

Es wurden so 3 Gruppen erzeugt:

G112 SP p.11; 3 fraktionierte Bestrahlungen *ex vivo* mit jeweils 2,5 Gy (kumulative Gesamtdosis 7,5 Gy)

G112 SP p.11; 5 fraktionierte Bestrahlungen *ex vivo* mit jeweils 2,5 Gy (kumulative Gesamtdosis 12,5 Gy)

G112 SP p.11; 7 fraktionierte Bestrahlungen *ex vivo* mit jeweils 2,5 Gy (kumulative Gesamtdosis 17,5 Gy)

3.3 Intrakranielle Implantation

Die Implantationen von U87 Zellen in die Mäuse (NMRI, Charles River, Wilmington, U.S.A.) als In-vivo-Model erfolgten vor der beschriebenen Versuchsreihe nach gleichem Protokoll, wie die weiter unten beschriebene Vorgehensweise zur Implantation der Zelllinie G112 in immundefiziente Mäuse (NMRI, Charles River, Wilmington, U.S.A.). Die Linie U87 diente als Vergleich zur neu zu charakterisierenden Zelllinie G112.

Einzelzellen wurden durch eine kombinierte Trypsinierung und mechanische Triturierung erhalten. Zur Implantation wurden Zellsuspensionen mit einer Konzentration 50.000 Zellen/ μ l, Vitalität 97-98%, mit Hilfe einer Neubauer-improved-Zählkammer im Inversmikroskop (Zeiss, Feldbach, Schweiz) vorbereitet.

Allgemeines Procedere: Die Tierexperimente wurden streng nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Erlaubnis zur Durchführung von Tierexperimenten erfolgte durch Genehmigung des Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Genehmigung #33.42502-092/06). Es wurden ausschließlich immundefiziente Nacktmäuse verwendet (NMRI, 5-6 Wochen alt, Charles River, Wilmington, U.S.A., s. Abb. 8a). Zur intrakraniellen Implantation wurden Einzelzellsuspensionen aus Monolayer- oder Gliomaspärenkulturen verwendet. Vor der Implantation wurden die Mäuse narkotisiert mit einer intraperitonealen Injektion von 15 mmol Avertin (Sigma-Aldrich) in der Dosierung 0.3 ml/10 g Körpergewicht. Das Kranium wurde in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) (s. Abb 8b + c). Nach einem sagittalen Hautschnitt im Bereich der Mittellinie und Darstellung

der Kalotte erfolgte eine Bohrlochtrepanation mittels Subcutannadel. Die Zellsuspensionen wurden in das Caudato-Putamen der rechtshirnigen Hemisphäre mit einer Mikroliterspritze / Hamilton syringe (Hamilton, Reno, U.S.A.) injiziert (s. Abb. 8 d). Folgende stereotaktische Koordinaten wurden verwendet: Referenz zum Bregma (Treffpunkt der Sutura coronalis mit der Sutura sagittalis): 1 mm (anteroposteriore Achse), 3 mm (lateromediale Achse), 2,5 mm (vertikale Achse). Zwei μl der Tumorzellsuspension (1×10^5 Zellen pro μl) wurden stereotaktisch in das rechte Striatum injiziert (s. Abb 10 a + d). Der Wundverschluss erfolgte mit Einzelknopfnähten. Die Mäuse wurden zur eindeutigen Identifikation an den Ohren tätowiert und mit einem Zahlen-Code versehen. Mit Tumorzellen implantierte Mäuse wurden im Tierstall der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Der Tag / Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden Licht : 12 Stunden Dunkelheit. Die Tiere wurden täglich klinisch untersucht und auf das Auftreten von neurologischen Symptomen als klinisches Korrelat für die Entwicklung eines raumfordernden Hirntumors überwacht. Tiere mit klinisch-neurologischen Symptomen (Paresen, Vigilanzminderung, Kachexie) wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien terminiert mit einer letalen Dosis von intraperitoneal appliziertem Avertin. Es folgte eine Thorakotomie, so dass durch Punktion des linken kardialen Ventrikels eine Perfusion mit Kochsalzlösung gefolgt von Fixierungslösung (4% Paraformaldehyd) durchgeführt werden konnte. Das Zerebrum wurde entnommen und in Fixierungslösung (4% Paraformaldehyd) gekühlt bei max. 7°C gelagert. Die Maus wurde nach Terminierung mit einem Code (KE-Nummer) versehen, um die Dokumentation zu gewährleisten.

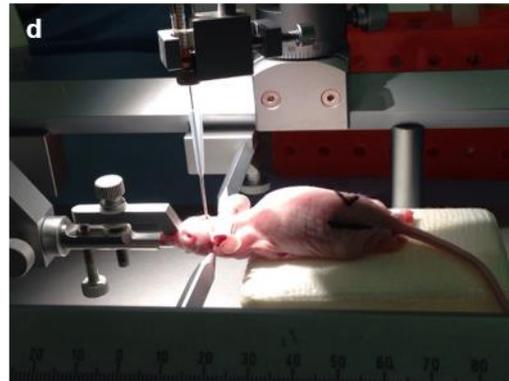
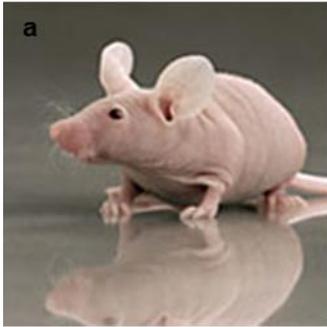


Abbildung 8: Darstellung der stereotaktischen Implantation. **a:** NMRI-Maus, 5 Wochen alt von Charles River Laboratories International, Inc. ©, Wilmington, U.S.A. **b:** Stereotaktischer Rahmen, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland. **c:** Fixierung der Maus im Stereotaktischen Rahmen sowie Desinfektion des Schädels. **d:** Stereotaktische Implantation der Tumorzellsuspension mit einer Hamilton syringe.

3.4. In-vivo-Bestrahlungsversuch

Es wurde ein Linearbeschleuniger aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen, verwendet (Varian Clinac 600 C accelerator, Palo Alto, CA, U.S.A.). Das Zielvolumen (Maushirn) wurde bestrahlt mit 6 MV Photonen mit einer Dosisrate von 2.4 Gy/min in ap-pa Technik (2 opponierende Bestrahlungsfelder).

Die Dosisfindung sowie die Feststellung des Bestrahlungszeitpunktes erfolgten bereits in einem Vorversuch. Dieses Therapie-Regime hatte einen inhibitorischen Effekt auf die Tumorstadiumsrate von Xenograft-Transplantaten aus Gliomzellen ohne Stammzellcharakter (Schauff et al. 2009). Die Bestrahlung wurde 54 Tage nach erfolgter Implantation begonnen. Die zu bestrahlenden Tiere wurden vor der jeweiligen Bestrahlung narkotisiert mit einer intraperitonealen Injektion von 15 mmol

Avertin (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) in der Dosierung 0.3 ml/10 g Körpergewicht. Die Bestrahlung erfolgte fraktioniert mit Einzeldosen von 2,5 Gy im Abstand von jeweils 2-3 Tagen.

3.5. Immunhistochemie

Alle Labormaterialien und Lösungen wurden aus dem Labor der Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen verwendet.

Wahl der immunhistochemischen Marker:

1. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) ist seit 1980 als immunhistochemischer Marker von GBM bekannt und wird auch zur Differenzierung als astroglialer Marker gegenüber anderen Tumoren in der täglichen pathologischen Routine verwendet (Velasco et al.1980).

2. p53: Eine Mutation im p53-Gen von GBM hat sich in ca. 31% in GBM herausgestellt (Ohgaki et al. 2004). In der Zelllinie G112 wurde diese bereits bestätigt (Kim et al. 2010).

3. Nestin wurde als Stammzellmarker beschrieben (Dell'Albani 2008). Eine Expression von Nestin und Vimentin hatte sich auch vermehrt in invasiven glialen Zellen gezeigt (Rutka et al.1999).

4. Vimentin Expression wurde vermehrt in invasiven glialen Zellen gezeigt (Rutka et al. 1999). Eine Überexpression von Vimentin hatte sich in Gliomzellen unter Bestrahlung gezeigt (Trog et al. 2008).

5. CD133 wird als Tumorstammzellmarker propagiert (Dell'Albani 2008, Mizrak et al. 2008).

Fixierte Mäusehirne wurden dehydriert und eingebettet in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden geschnitten mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM2000 R, Wetzlar, Deutschland). Schnitte von 5 µm Schichtdicke wurden auf Glas-Objektträger plziert, deparaffinisiert mit Xylol (C₈H₁₀) und hydriert mit abnehmenden Konzentrationen von Isopropanol. Zur allgemeinen histopathologischen Untersuchung wurden die Schnitte mit Haematoxylin and Eosin (H&E) gefärbt nach dem Protokoll des Routinelabors der Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen: Die mit dem

Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von Isopropanol. Hiernach Färbung mit Hämalaun nach Mayer für ca. 5 min. Nach Spülen mit Aqua bidest. kurzes Eintauchen in 1% HCl-Alkohol Lösung. Bläuen unter Leitungswasser für ca. 10 min. Färbung mit 1% Eosin für ca. 5 min. Nach Spülen mit Aqua bidest. aufsteigende Reihe von Isopropanol und Xylol und Eindeckelung mit DePeX mounting medium (Serva, Heidelberg, Deutschland). Zur histomorphologischen Analyse wurden folgende Antikörper in der Arbeit verwendet: humanes Nestin (Ab28944, Abcam Inc., U.S.A.), CD133 (Ab66141, Abcam Inc, MA, U.S.A.), CD133/AC133 (Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland), GFAP (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), Vimentin (Dianova, Hamburg, Deutschland), p53 (FL393, Santa Cruz, CA, U.S.A.).

Hierbei wurden die vom Hersteller vorgegebenen Protokolle soweit modifiziert, dass die Signale des zu markierenden Rezeptors in den histologischen Schnitten ohne Hintergrundartefakte zur Darstellung kamen.

Vimentin (Dianova): Die mit dem Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von Isopropanol. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Präparate auf den Glasobjektträgern mit Protease (Typ XXIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) in 60 ml aqua bidest, bei 37°C inkubiert und kurz in Ethanol gespült. Nach Antigen-Demaskierung, wurde in Casein 0,2% (2g/1000ml Phosphate Buffered Saline (PBS) +1ml 100% Tween 20) für 15 min bei Raumtemperatur geblockt um unspezifische Antigenbindungen zu verhindern. Anschließend wurde mit dem primären Antikörper (AK) Vimentin (1:500, Dianova) gelöst in Tris-Buffered Saline + Tween 20 (TBST) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen (drei Mal in TBST, jeweils 5 min) wurde der sekundäre Antikörper goat anti rabbit IG/AP (1:250, Dako, Santa Clara, CA, U.S.A.) gelöst in TBST in einer feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem Waschen mit TBST (drei Mal, jeweils 5 min) wurde mit Neufuchsin (Entwicklungschromogen / Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Komplex=APAAP-Methode, Neufuchsin Stammlösung: 5% Neufuchsin in 2 M HCL gelöst/ 50 ml Tris-Puffer, 20 mg Levamisol; 10 mg Natriumnitrit, 250 µl aqua bidest, 100 µl Neufuchsin Stammlösung; 14 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat, 300 µl Dimethylformamid, pH 8,8,

filtriert) gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin, die Eindeckelung erfolgte mit Immumount (Dako, Santa Clara, CA, U.S.A.).

Nestin (Ab28944): Die mit dem Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von Isopropanol. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Präparate auf den Glasobjektträgern gekocht in 10 mM Citrat (2,951 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat/l, pH6). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde in Casein 0,2% (2 g/1000 ml PBS +1 ml 100% Tween 20) für 15 min bei Raumtemperatur geblockt um unspezifische Antigenbindungen zu verhindern. Zur erweiterten Blockung von unspezifischen Antigenbindungen wurde in 10% Normal Goat Serum (NGS) gelöst in Tris-Buffered Saline (TBS) für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit dem primären AK Nestin (1:5000, Abcam) gelöst in 1% NGS in TBS in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen (3 mal in TBS, jeweils 5 min) wurde mit dem sekundären AK goat anti rabbit IG/AP (1:250, Dako) gelöst in 1% NGS in TBS in einer feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS, wurde mit Neufuchsin gefärbt. Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin, die Eindeckelung erfolgte mit Immumount (Dako).

GFAP(Dako): Die mit dem Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von Isopropanol. Es wurde in Casein (Thermo Scientific) 0,2% (2 g/1000 ml PBS +1 ml 100% Tween 20) für 15 min bei Raumtemperatur geblockt um unspezifische Antigenbindungen zu verhindern. Anschließend wurde mit dem primären AK GFAP (1:1000, Dako) gelöst in 1% NGS in TBS in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde der sekundäre AK goat anti rabbit, biotinylated (1:500, Dako) gelöst in 1% NGS in TBS appliziert. Nach weiterem Waschen (drei Mal in TBS, jeweils 5 min) erfolgte die Applizierung von Streptavidin AP (Vectastain Kit, Vector labs, U.S.A.) für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach Waschen mit TBS, wurde mit Neufuchsin gefärbt. Gegenfärbung erfolgte mit Haematoxylin, die Eindeckelung erfolgte mit Immumount (Dako).

p53 (FL393, Santa Cruz): Die mit dem Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von

Isopropanol. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Präparate auf den Glasobjektträgern gekocht in 10 mM Citrat (2,951 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat/l, pH6). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde in Casein 0,2% für 15 min bei Raumtemperatur geblockt um unspezifische Antigenbindungen zu verhindern. Zur erweiterten Blockung von unspezifischen Antigenbindungen wurde in 10% NGS gelöst in TBS für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit dem primären AK p53 (FL393, 1:50, Santa Cruz) gelöst in 1% NGS in TBS in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde mit dem sekundären AK goat anti rabbit IG/AP (1:250, Dako) gelöst in 1% NGS in TBS in einer feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS (drei Mal in TBS, jeweils 5 min), wurde mit Neufuchsin gefärbt. Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin, die Eindeckelung erfolgte mit Immumount (Dako).

CD133: Die mit dem Präparat versehenen Glasobjektträger wurden deparaffinisiert mit Xylol und hydriert mit absteigenden Konzentrationen von Isopropanol. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Präparate auf den Glasobjektträgern gekocht in 10 mM Citrat (2,951 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat/l, pH6). Anschließend wurde mit dem primären AK CD133 (AC133, 1:25, Miltenyi) gelöst in 25mM Tris-HCl, 75mM NaCl in 1% BSA in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen mit TBST wurde geblockt mit 1% H₂O₂ für 10 min. Nach erneutem Waschen in TBST wurde mit dem sekundären AK goat anti mouse IG/AP (1:500) gelöst in 25 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl in 1% BSA in einer feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem Waschen (3 Mal in TBST, jeweils 5 min) erfolgte die Applizierung von Streptavidin AP (Vectastain Kit, Vector labs, U.S.A.) für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach Waschen mit TBST wurde mit Neufuchsin gefärbt. Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin, die Eindeckelung erfolgte mit Immumount (Dako).

Als Negativkontrolle dienten jeweils nach Protokoll behandelte Schnitte ohne Applikation von primärem AK.

Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop (Olympus BX 40, Hamburg, Deutschland) aus dem Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Photographische Bilddokumentation wurde mit Hilfe einer integrierten

Kamera (Olympus, Hamburg, Deutschland) sowie der Software Cella (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland) durchgeführt.

3.6. Auswertungsmethoden

Zur Charakterisierung der Gliomzelllinie G112 oder der Sublinie G112-SP mit GIC-Charakteristika wurden die H&E-Färbungen sowie die immunhistochemischen Färbungen der nicht-bestrahlten (*ex-vivo* und *in vivo*) Tumoren aus adhärennten Monolayern (G112-ST) sowie aus Gliomasphären-Kulturen (G112-SP) analysiert. Standardisiert wurden Tumorlokalisierung, Tumorgrenzen, Infiltration mit Infiltrationswegen, Nekrosen, Mitoserate, Gefäßproliferation, sowie immunhistochemische Muster der Marker p53, GFAP, Nestin, Vimentin und CD133 sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet. Die Auswertung der Mitoserate erfolgte jeweils in 10 *high power fields* (HPF) mit 400-facher Vergrößerung.

Zur Analyse der Auswirkung der Bestrahlung wurden Survivalanalysen mittels Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Der Vergleich von Experiment- und Kontrollgruppe erfolgte durch Erfassung der statistischen Unterschiede mit dem ungepaarten t-Test. Statistische Signifikanz wurde bei Wahrscheinlichkeitswerten $<0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von G112-SP mit besonderer Beachtung der GIC-Eigenschaften

In einem Vorversuch wurden Zehn etablierte Gliomzelllinien auf die Fähigkeit der Selbsterneuerung unter Serum-freien Bedingungen untersucht (s. Tab. 1). Von den zehn untersuchten Zelllinien konnten nur 3 (G112, U87, U251) unter Serum-freien Bedingungen in NB-Medium unbegrenzt weiter proliferieren (s. Tab. 1).

4.1.1 Selbsterneuerungskapazität *in vitro*

Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung ist ein grundlegendes Charakteristikum von Tumorstammzellen.

Um zu überprüfen, ob Gliomasphären (G112-SP) von der Zelllinie G112 die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern, wurde ein *limited dilution assay* (Verdünnungsanalyse) in einem Vorversuch durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass G112-SP die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt, da Gliomasphären aus einer sub-klonalen Zelldichte entstehen konnten (Abb. 9 zeigt repräsentative Ergebnisse des *limited dilution assay*).

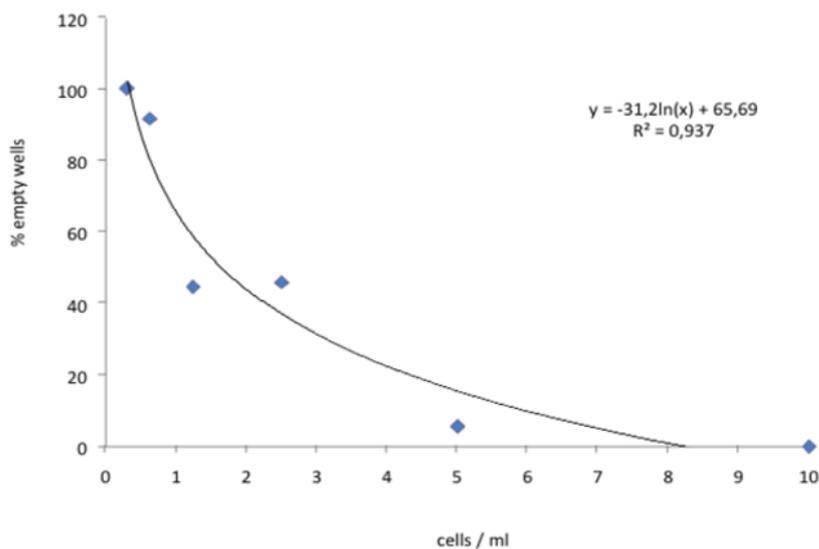


Abbildung 9: Selbsterneuerungskapazität von G112-SP *in vitro*. *Limited dilution assay* (Verdünnungsanalyse) zeigt, dass G112-SP-Gliomasphären aus einer sub-klonalen Zelldichte (< 5 Zellen / ml) generiert werden können.

4.1.2 Phänotypische Plastizität und Differenzierung *in vitro*

Phänotypische Plastizität ist ein grundlegendes Charakteristikum von Tumorstammzellen.

Diese kann sich manifestieren in der Veränderung der Expression von Zelllinien-spezifischen phänotypischen Markern als Antwort auf Stimuli, die Stammzellendifferenzierung induzieren. *In vitro* kann die phänotypische Plastizität von GICs offenbart werden durch Kulturbedingungen mit Exposition von Differenzierung begünstigenden Faktoren, in Anlehnung zu neuronalen Stammzellen. So geht das

Herauslassen von Wachstumsfaktoren bFGF und EGF, die eine Selbsterneuerung in NSCs/NPCs begünstigen oder die Exposition von Serum, mit einer Differenzierung von NSCs/NPCs und einigen (jedoch nicht allen) GICs einher. So wurde auch gezeigt, dass einige GICs einen im Wesentlichen differenzierten Phänotyp aufweisen, vergleichbar mit differenzierten Progenitoren (Rieske et al. 2009). Um die Differenzierungskapazität von G112-SP Zellen zu erfassen, wurde die Expression der NSCs/NPCs-Marker Nestin oder des Astrozyten-Marker GFAP mittels Immunofluoreszenz analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass G112-SP, die unter Selbsterneuerung begünstigenden Bedingungen (bFGF+, EGF+) kultiviert wurden oder Bedingungen, die Differenzierung induzieren (bFGF-/EGF- oder Serum-Exposition) ähnliche Muster von GFAP- und Nestin-Expression zeigten. Es zeigte sich in der überwiegenden Anzahl an Zellen eine homogene co-Expression der o.g. Marker (s. Abb. 10). Dies zeigt, dass G112-SP Zellen, zumindest unter In-vitro-Konditionen die NSCs/NPCs zur Differenzierung begünstigen, nicht in der Lage sind zur weiteren Differenzierung. Es zeigt sich jedoch ein konstitutiv gemischter Phänotyp, gekennzeichnet durch die gleichzeitige Expression von Nestin (Marker von NSCs/NPCs) und GFAP (Astrozytenmarker).

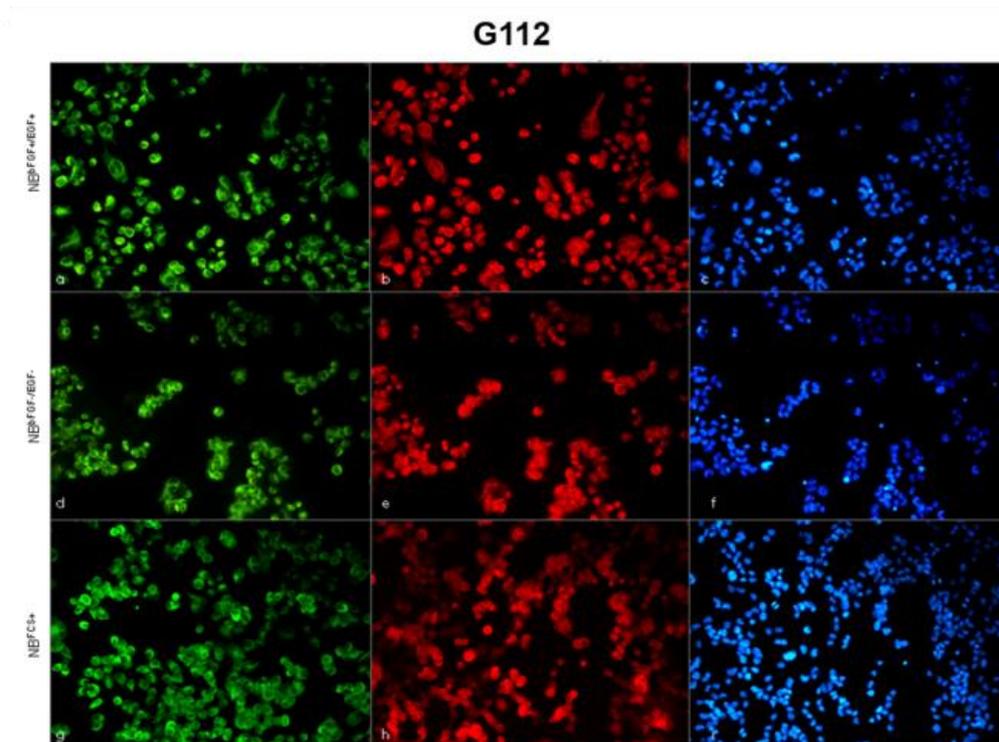


Abbildung 10: Differenzierung von G112-SP *in vitro*. Immunfluoreszenz-Färbung von G112-SP *in vitro* unter Bedingungen die Selbsterneuerung begünstigen ($NB^{FGF+/EGF+}$, erste Reihe) oder Differenzierung begünstigen ($NB^{FGF-/EGF-}$ und NB^{FCs} , zweite und dritte Reihe) für Nestin (grün) und GFAP (rot) Kernfärbung mit DAPI (blau).

4.1.3 Tumorigenität

Das führende Kriterium von GICs ist die herausragende Fähigkeit, das Tumorwachstum zu induzieren.

Um das Potenzial der Tumorigenität von G112-SP zu evaluieren, wurde ein orthotopes Maus-Modell verwendet. Parallel hierzu wurde zur Kontrolle auch die ursprüngliche, unter Serum-Bedingungen kultivierte, Zelllinie G112-ST verwendet. Von 4 mit G112-SP implantierten Tieren haben 4 Tiere (100%) mikroskopisch nachweisbare, solide Tumoren entwickelt. Es zeigte sich, dass die G112-SP-Subpopulation tumorigen ist und Tumoren mit vergleichbarer Effektivität induzieren kann wie die parentale G112-ST (s. Tab. 2). Die IHC-Auswertung zeigte das hohe tumorigene Potenzial von G112-SP mit sehr invasiven Tumoren bereits 56 Tage nach erfolgter Implantation (s. Abb. 11).

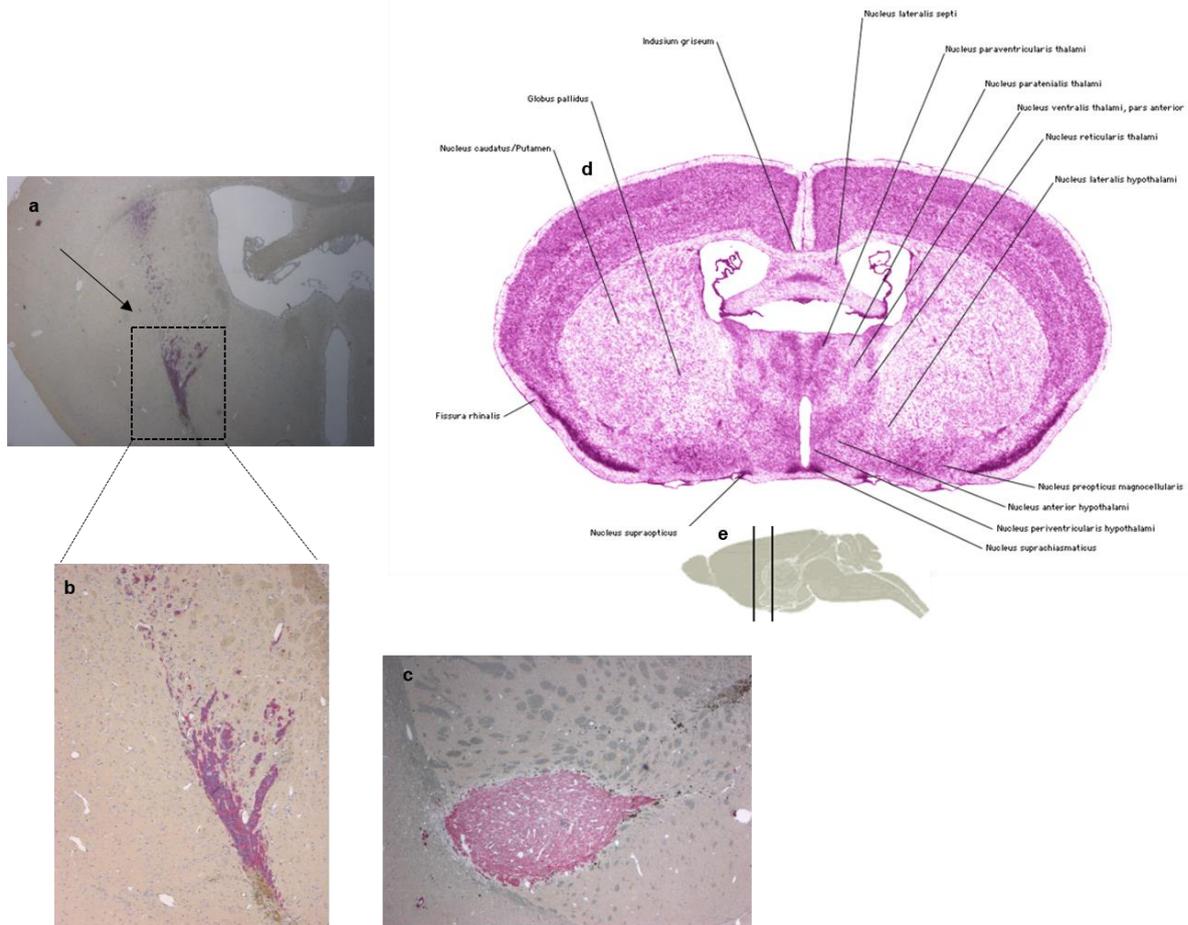


Abbildung 11: Tumorgenität von G112-SP. **a:** Infiltrierender Tumor 56 Tage nach der Implantation. Coronarer Schnitt durch ein Maushirn in 20-facher Vergrößerung, immunhistochemische Färbung mit Vimentin zur besseren Kontrastierung. Darstellung des Stichkanals (Pfeil) mit beginnender Infiltration. **b:** Vergrößerte Darstellung des Stichkanals in 40-facher Vergrößerung. **c:** Im Gegensatz hierzu kugeliges Wachstum von U87 ohne Infiltration (40-fache Vergrößerung, Färbung mit Vimentin). **d:** Anatomische Darstellung des Maushirns in koronarer Schnittebene mit Beschriftung der anatomischen Strukturen (Sidman 2001). **e:** schematische Darstellung der Schnittebene in sagittaler Ebene (Sidman 2001).

Die klinische Symptomatik durch den raumfordernden Tumor der transplantierten Tiere zeigte sich sehr heterogen. Es konnten typische Ausfallserscheinungen in den Tieren mit symptomatischer intrazerebraler Raumforderung gesehen werden. So zeigten sich Paresen bis hin zur Hemisymptomatik, vokale Entäußerungen, soziale Abgrenzungen zu den Tieren im Käfig, fehlende Nahrungsaufnahme mit resultierender Kachexie bis hin zur Vigilanzminderung.

4.1.4 Invasivität

Ein ausgeprägter invasiver Phänotyp ist ein grundlegendes morphologisches Kriterium von GBM.

Um zu erfassen, ob Tumoren induziert durch G112-SP, die Kriterien der Invasivität von humanen GBM erfüllen, wurde die Morphologie der G112-SP-Tumoren immunhistochemisch analysiert.

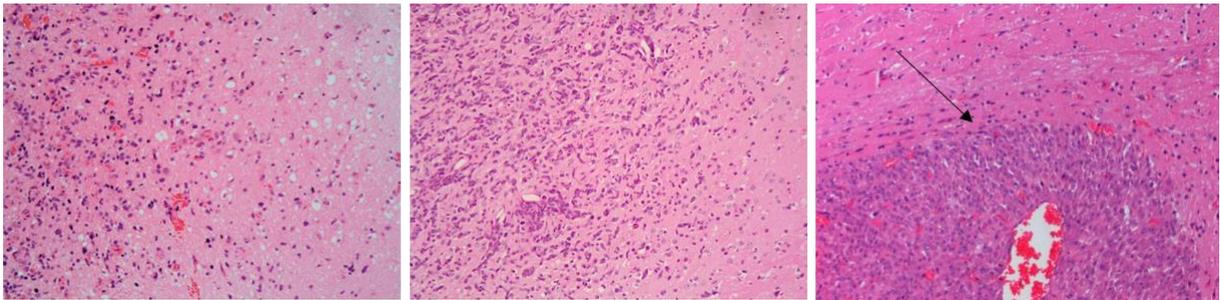


Abbildung 12: Histomorphologische Charakterisierung des humanen GBM und Xenograft Modellen G112-SP und U87. H&E Färbung, 100-fache Vergrößerung. Links: Humanes GBM WHO-Grad IV (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Schulz-Schaeffer, Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen). **Mitte:** Xenograft von G112-SP. **Rechts:** Xenograft von U87. Deutlich zu erkennen ist das ähnlich infiltrierende Wachstumsmuster von G112-SP im Vergleich zum humanen GBM während U87 eine scharfe Tumorgrenze zeigt (Pfeil).

Bei der histopathologischen Betrachtung in der standardisierten H&E Färbung zeigte sich in allen vier untersuchten G112-SP-Tumoren ein intrazerebrales Wachstum. Grundlegende histomorphologische Eigenschaften sowie Invasivität zeigten dabei keine Unterschiede (s. Tab. 2). Bei den intrazerebral gewachsenen Anteilen zeigte sich, dass das Wachstumsmuster von G112-SP in vielen Aspekten denen von humanen GBM ähnelt (s. Abb. 12, vergleiche linke und mittlere Abbildung). Hingegen zeigte sich bei Xenograft-Transplantaten der Zelllinie U87 ein eher kugeliges Wachstum mit scharfer Tumorgrenze zum gesunden Hirngewebe (s. Abb. 12, rechts). Des Weiteren konnten die weiteren typischen histopathologischen Kriterien des humanen GBM nachvollzogen werden nämlich Strichnekrosen mit Pseudopallisadenbildung, hohe Mitoseraten ($\bar{x}=26,5/\text{HPF}$) sowie Kernpleomorphie (s. Abb. 13 a). Auffällig waren unterschiedliche Zelltypen in der Heterogenität des Tumors (s. Abb.13 b)

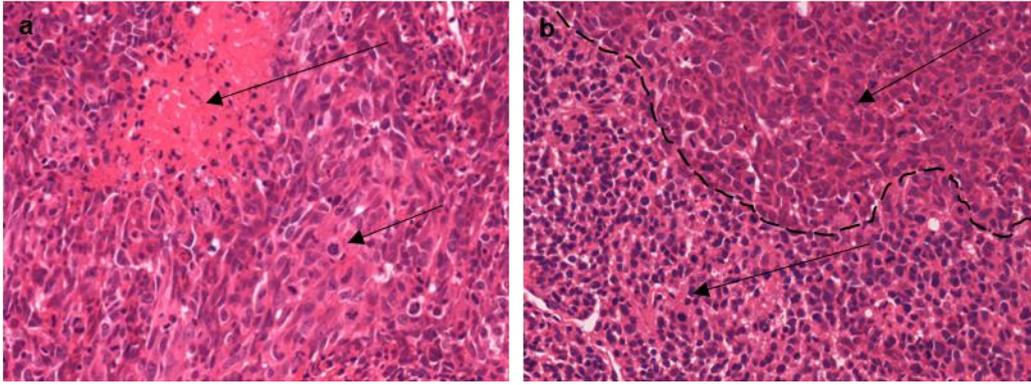


Abbildung 13: Typische Morphologie von G112-SP im *tumor bulk*. **a:** G112-SP, H&E Färbung, 200-fache Vergrößerung. Ausgeprägte Kernpleomorphie, Strichnekrosenbildung (oberer Pfeil) sowie einige sichtbare Mitosen (unterer Pfeil). **b:** G112-SP, H&E Färbung, 200-fache Vergrößerung. Auffällig sind verschiedene Zelltypen in der Heterogenität des Tumors (Pfeile).

Die Antigen-spezifischen immunhistochemischen Färbungen konnten weitere interessante intra- und inter-tumorale Aspekte aufdecken. Nestin and Vimentin sind vornehmlich in Tumorzellen im Tumorrand und in der Infiltrationszone exprimiert (s. Tab. 2, Abb.14, 16 und 17). Besonders invasive Einzelzellen, die distant vom *tumor bulk* schwer in der etablierten H&E Färbung zu erkennen gewesen wären, konnten so kontrastreich dargestellt werden. Es konnte in allen G112-SP-Tumoren ein diffuses Wachstum gesehen werden, mit Invasion von Einzelzellen in gesundes Hirngewebe hinein (s. Abb. 14 und 16). Es konnten so auch bereits beschriebene Invasionswege von Tumorzellen (Giese et al. 1996, Begemann et al. 2004) nachvollzogen werden. So zeigten sich typische Invasionswege im Bereich der Infiltrationszone als diffuse Infiltration. Des Weiteren konnten Einzelzellen entlang von weißen Bahnen (z.B. Corpus callosum, s. Abb. 14), subependymal, perivaskulär und als diffuse Tumoraussaat im Liquorsystem gesehen werden (s. Abb.15).

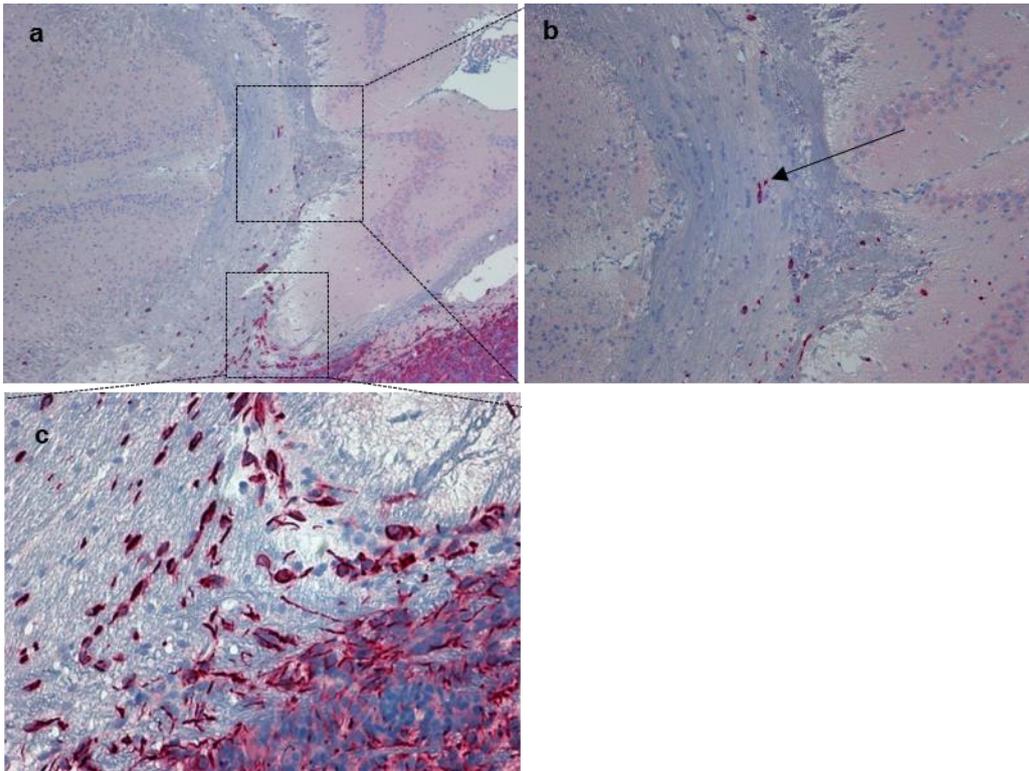


Abbildung 14: Charakterisierung von Invasionsmustern in G112-SP Xenografttransplantaten. Färbung für Nestin. Infiltration in das Corpus callosum. Einzelzellen infiltrieren entlang der weißen Bahnen zur kontralateralen Hemisphäre (Pfeil). Vergrößerung 40-fach (a), 100-fach (b) und 200-fach (c). Die Färbung erfolgte mit Neufuchsin und zeigt daher die typische rötliche Anfärbung.

Die Invasionswege spielen in der Therapie von Patienten eine wichtige Rolle. Zeigt sich in der Bildgebung eine KM-Aufnahme in der Balkenregion mit Ausbreitung zur kontralateralen Hemisphäre oder subependymal mit Tumordissemination entlang der Liquorwege, liegt bereits eine weit vorangeschrittene Tumorerkrankung vor. Eine vollständige operative Entfernung des KM-aufnehmenden Tumors ist in diesen Fällen nicht mehr möglich.

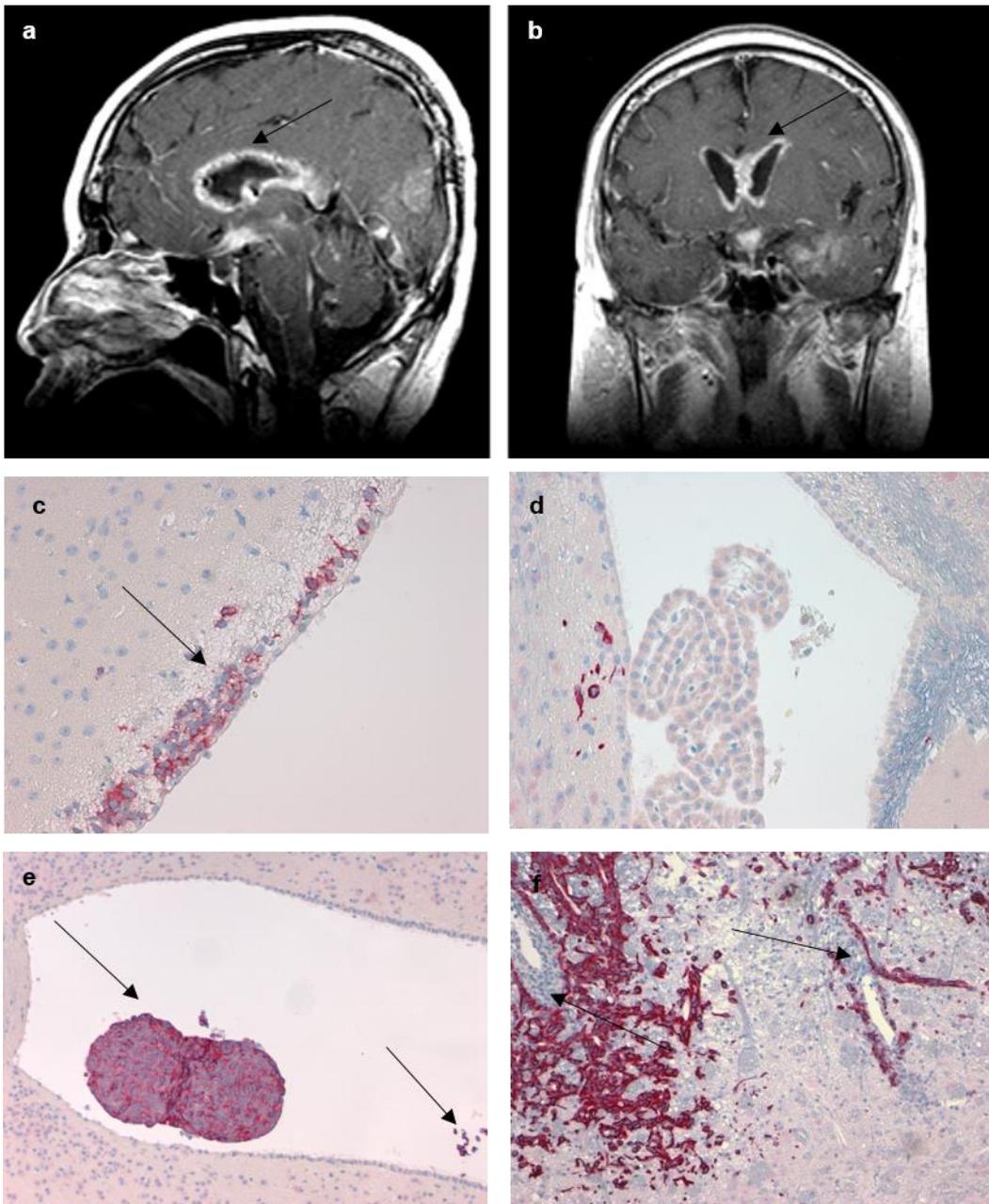


Abbildung 15: Typische Invasionswege von GBM in Mäusen mit G112-SP-Xenograft. **a:** MRT Bildgebung in T1-Wichtung mit KM in sagittaler Ebene und **b:** coronare Ebene mit Infiltration von Tumorzellen subependymal als periventrikuläre Auskleidung (Pfeile) (Begemann et al. 2004). **c:** subependymale Auskleidung (Pfeil) in experimentellem Modell G112-SP, rechts im Bild Ventrikel (Nestin, 200-fache Vergrößerung) **d:** Infiltration von einzelnen G112-SP Tumorzellen in der Nähe zum Ependym, in der Bildmitte Ventrikel mit Plexus chorioideus (Nestin, 200-fache Vergrößerung). **e:** Intraventrikuläre Aussaat von großen G112-SP-Tumoranteilen (linker Pfeil) sowie einzelnen Tumorzellen (rechter Pfeil) im 3. Ventrikel (Nestin, 100-fache Vergrößerung). **f:** perivaskuläre Infiltration von G112-SP-Tumorzellen mit für GBM typischer Endothelproliferation (Pfeile).

Im Gegensatz zu G112-SP-Xenografttransplantaten zeigte U87 wenige bis keine Infiltration zum umgebenden zerebralen Gewebe (s. Abb. 16 c & d und Abb. 17 b).

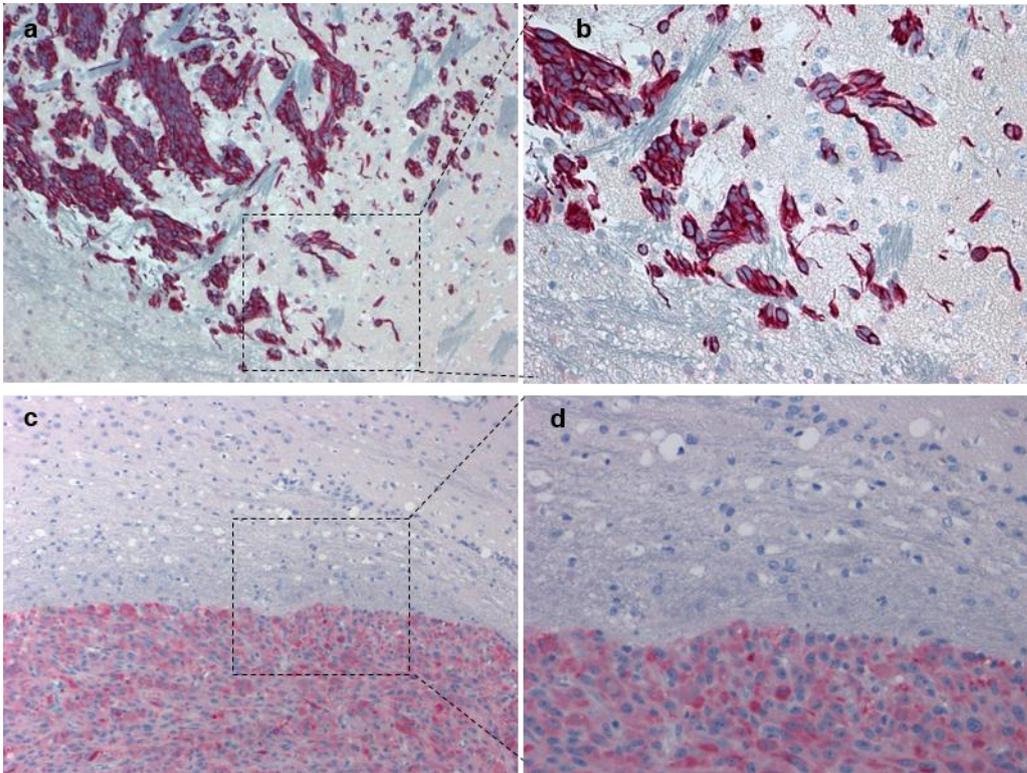


Abbildung 16: Vergleich der Wachstumsmuster von G112-SP und U87 Xenografttransplantaten, IHC mit Nestin. a: Diffuse Infiltration von G112-SP-Zellen in das gesunde zerebrale Gewebe (100-fache Vergrößerung) sowie b: 200-fache Vergrößerung. c: Kugeliges Wachstum mit scharfer Abgrenzung zum umgebenden zerebralen Gewebe in U87-Xenograft (100-fache Vergrößerung) sowie d: 200-fache Vergrößerung.

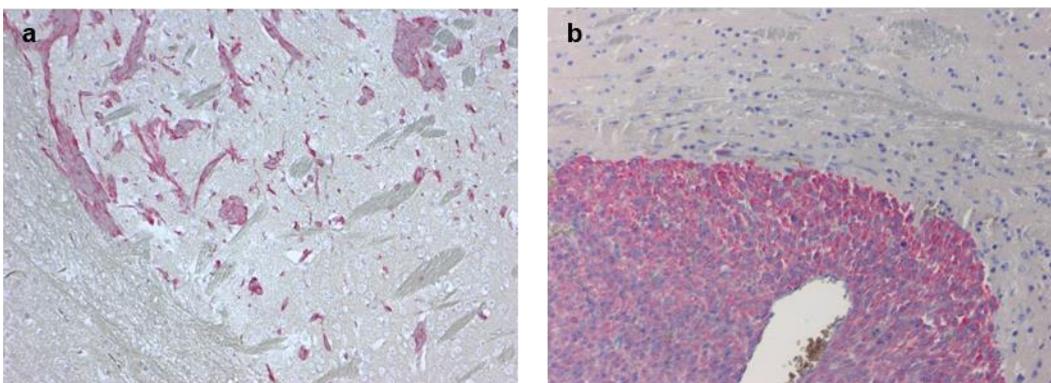


Abbildung 17: Vergleich der Wachstumsmuster von G112-SP und U87 Xenografttransplantaten, IHC mit Vimentin. a: G112-SP, 100-fache Vergrößerung. b: U87, 100-fache Vergrößerung. Wie bei der Färbung mit Nestin (s. Abb. 15) zeigt sich eine Färbung der invasiven Population.

4.1.5 CD133-Expression

CD133 wird propagiert als phänotypischer Marker, der spezifisch exprimiert wird von GICs.

Die Expression von CD133 wurde in G112-SP-Tumoren evaluiert durch IHC. Sowohl die glykosylierte Form AC133, als auch die nicht-glykosylierte CD133 (Daten nicht gezeigt) konnte in G112-SP immunhistochemisch bis auf einzelne Zellen nicht nachgewiesen werden (s. Abb 18 a & b). Wie erwartet, zeigte die CD133-positive Retina (Jászai et al. 2011) verwendet als als Positivkontrolle eine deutliche Färbung (s. Abb. 18 c & d).

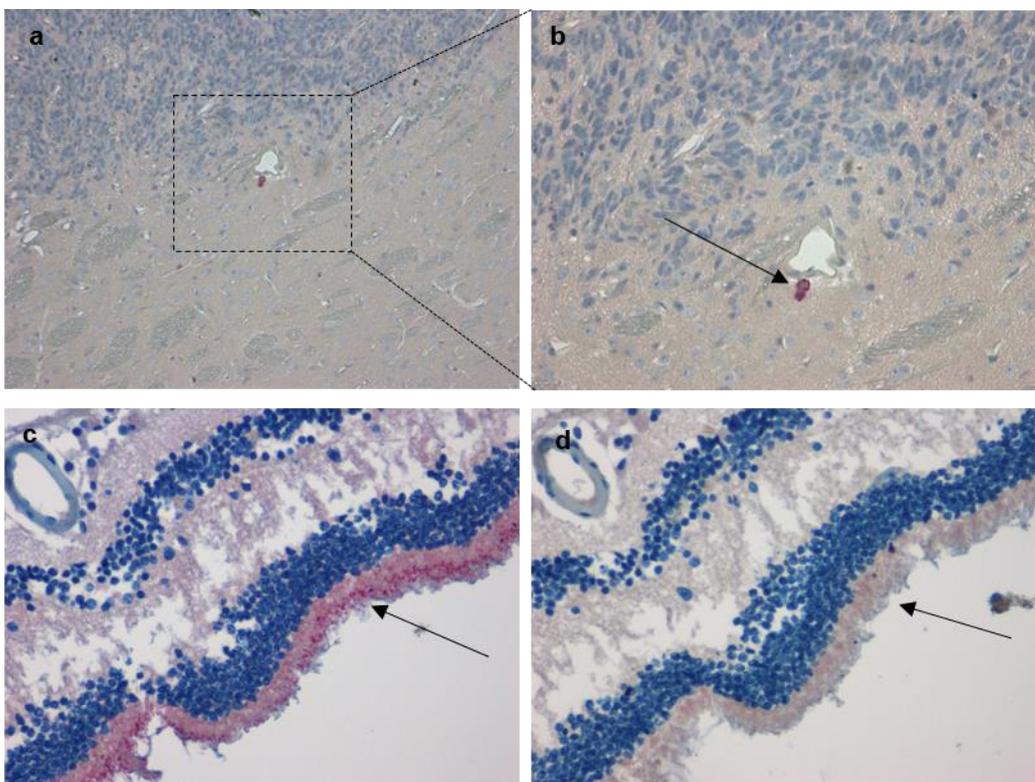


Abbildung 18: IHC Färbung für CD133 mittels anti-AC133 AK. a: G112-SP, 100-fache Vergrößerung und **b:** 200-fache Vergrößerung. Nur vereinzelt positive Zellen (Pfeil). **c:** Positivkontrolle Retina, 200-fache Vergrößerung. **d:** Negativkontrolle (Retina ohne AK gegen AC133).

4.1.6 Intratumorale Heterogenität

Intratumorale phänotypische Heterogenität ist ein grundlegendes histomorphologisches Kennzeichen von GBM.

Es wird angenommen, dass die phänotypische Differenzierung von GICs einer der Hauptfaktoren für die phänotypische Heterogenität in GBM darstellt. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass es in der Subpopulation G112-SP an der Fähigkeit der phänotypischen Differenzierung *in vitro* mangelt, da sich ein homogenes Expressionsmuster von Nestin und GFAP zeigte (s. Abb. 10). Um zu erfassen, ob die fehlende Fähigkeit zur weiteren Differenzierung *in vitro* eine generelle fehlende phänotypische Plastizität von G112-SP-Zellen widerspiegelt und somit die Unfähigkeit zur Erzeugung heterogener Tumoren beinhaltet, wurden Xenograft-Transplantate aus G112-SP-Zellen immunhistochemisch auf die Expression von Nestin und GFAP analysiert.

Die Analyse zeigte auf, dass sich G112-SP-Xenograft-Transplantate, im Gegensatz zu G112-SP-Zellen *in vitro*, nicht phänotypisch homogen darstellten. Es zeigte sich eine deutliche Heterogenität in Hinblick auf die Nestin- und GFAP-Expression (s. Abb. 19). Tumoren generiert aus G112-SP-Zellen konnten ein bestimmtes fleckförmiges Expressionsmuster erkennen lassen mit Arealen in denen sich ein vollständiger Verlust sowohl der Nestin- als auch der GFAP-Expression zeigte (s. Abb. 19). Schlussfolgernd demonstrieren diese Resultate, dass G112-SP-Zellen die Fähigkeit der phänotypischen Plastizität beinhalten, da durch diese heterogene Tumoren erzeugt wurden.

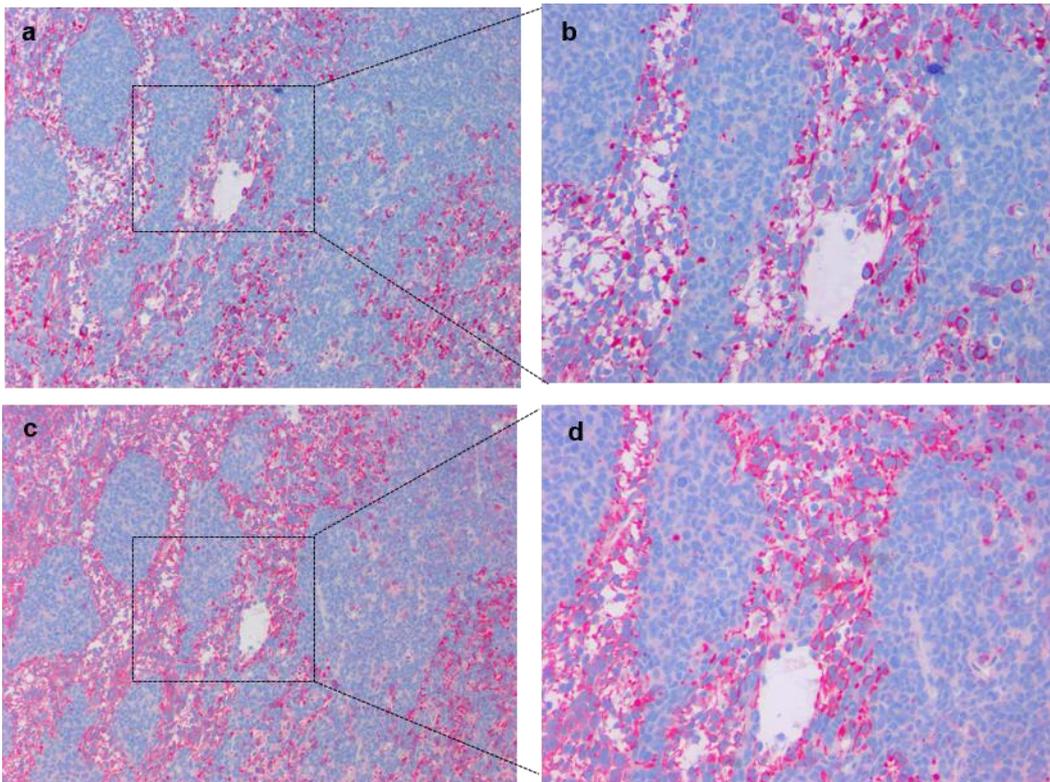


Abbildung 19: Phänotypische Analyse von G112-SP-Xenograft. **a:** Immunhistochemische Färbung für GFAP, 100-fache Vergrößerung. **b:** Ansicht der markierten Region in (a) in 200-facher Vergrößerung. **c:** Immunhistochemische Färbung für Nestin, 100-fache Vergrößerung. **d:** Ansicht der markierten Region in (c) in 200-facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen ist der kombinierte Verlust an GFAP und Nestin.

G112 beinhaltet eine TP53-Mutation innerhalb des hot-spot Codon 273 und exprimiert transkriptionell inaktives, mutiertes p53 (Kim et al. 2010).

Die immunhistochemische Färbung für p53 zeigte auch eine intratumorale Heterogenität von p53-Expression (s. Abb. 20).

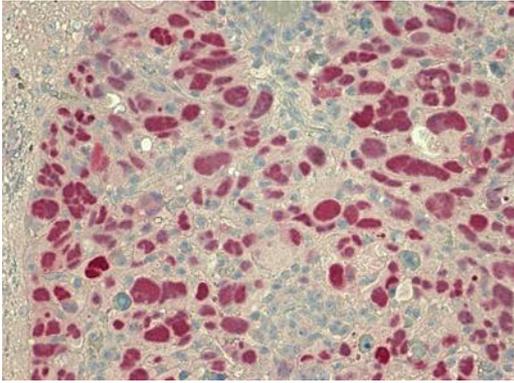


Abbildung 20: p53-Expression von G112-SP. Immunhistochemische Färbung für p53 in G112-SP, 200-fache Vergrößerung. Typische nukleäre Färbung in einer Fraktion von Tumorzellen.

4.1.7 Radioresistenz

Intrinsische Radioresistenz ist eine grundlegende klinische Eigenschaft von GICs.

Um zu untersuchen, ob in G112-SP die charakteristische Eigenschaft der Radioresistenz nachvollzogen werden kann, wurden Mäuse mit G112-SP- Xenograft-Transplantaten mit 6 fraktionierten Sitzungen von je 2,5 Gy (kummulative Gesamtdosis 15 Gy) bestrahlt. In der Kontrollgruppe wurde die Radiatio nicht durchgeführt. Es zeigte sich keine signifikante Änderung im Gesamtüberleben ($p > 0,06$) der bestrahlten G112-SP gegenüber den „naiven“ (nicht-bestrahlten) Tieren (s. Graph 3). Das klinische Charakteristikum der Radioresistenz konnte somit bestätigt werden.

Als Verleich wurden auch Tiere mit Xenograft-Transplantaten der ursprünglichen, unter Serum-Bedingungen kultivierten Zelllinie G112-ST mit 6 fraktionierten Sitzungen von je 2,5 Gy (kummulative Gesamtdosis 15 Gy) bestrahlt. In der Kontrollgruppe wurde die Bestrahlung nicht durchgeführt. Die statistische Auswertung ergab hier einen Überlebensvorteil ($p < 0,00001$) durch die Bestrahlung von G112-ST gegenüber den „naiven“ (nicht-bestrahlten) Tieren (Graph 3). Es zeigte sich somit dass der Stammzellcharakter der Radioresistenz in der Heterogenität der unselektionierten gemischten Zellpopulation (G112-ST) nicht zum tragen kommt.

Um zu untersuchen, ob der radioresistente Phänotyp *in vitro* selektioniert werden kann, wurden *ex vivo* vorbestrahlte Zellen von G112-SP in Mäuse implantiert und mit 6 fraktionierten Sitzungen von je 2,5 Gy (kummulative Gesamtdosis 15 Gy)

bestrahlt. Es konnte eine signifikante Korrelation gesehen werden zwischen Anzahl an Vorbestrahlungen *ex vivo* und niedrigerem Überlebensvorteil (s. Graph 4).

Somit konnte verifiziert werden, dass der vorselektionierte radioresistente Phänotyp *in vitro* auch *in vivo* persistiert.

5 Diskussion

5.1 Tumorigenität, GIC-spezifische Marker, Differenzierung

Es wird angenommen, dass GICs die aggressivste und klinisch relevanteste Subpopulation in GBM einnehmen. Es mangelt jedoch am Verständnis über die Rolle welche GIC bei Entstehung, Progression und Rezidivierung von GBM spielen. Es fehlen noch immer definierende Kriterien für diese, wahrscheinlich nur eine Minderheit betreffende, Subpopulation im Tumor. Während die Fähigkeit Tumoren zu induzieren sowie eine ausgesprochene Radioresistenz zur Definition von GIC herangezogen wurden (Bao et al. 2006), ist auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz von Bedeutung (Vescovi et al. 2006). Es wurde jedoch die Relevanz einer unbegrenzten Selbsterneuerung sowie Tumorinduktion zuletzt kontrovers diskutiert. Vollkommen unklar ist immer noch die Relevanz von phänotypischen Markern, die helfen sollen GIC von den Zellen mit weniger Stammzellattributen zu unterscheiden. Auch wenn viele Antigene gefunden wurden die "echte" GIC identifizieren sollen, so ist doch ein einheitlicher Marker bislang noch nicht entdeckt worden. Ein Beispiel hierfür ist CD133 (Prominin-1), ein Fünf-Transmembranglycoprotein, welches ursprünglich auf CD34⁺-hämatopoetischen Stammzellen identifiziert wurde und benutzt wird um hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren zu isolieren (Yin et al. 1997). Als CD133 als Stammzellmarker in GBM postuliert wurde (Singh et al. 2004), konnte in vielen Arbeiten eine Fokussierung auf dieses Protein als universellen Tumorstammzellmarker in GBM gesehen werden. In letzter Zeit wurde jedoch in mehreren Arbeiten gezeigt, dass dieser Marker alleine nicht ausreicht um die Tumorstammzellen in GBM zu bestimmen. Es gibt Kontroversen in wieweit CD133 zur Bestimmung von allen GIC geeignet ist und des Weiteren, wie weitreichend eine Korrelation zur klinischen Relevanz vorhanden ist (Cheng et al. 2009). So wurde zuletzt sogar eine prognostische Wertigkeit zugesprochen (Zeppernick et al. 2008) sowie auch eine Grad an Malignität (Han et al. 2015). Eine so weitreichende Wertigkeit scheint jedoch

mehr als fraglich. So wurde z.B. gezeigt, dass auch CD133-negative Zellen Tumoren induzieren können (Beier et al. 2007, Wang et al. 2008). In dieser Arbeit konnte kein Nachweis einer Expression von CD133 *in vivo* erbracht werden.

Es wurde schon in Vorversuchen gezeigt, dass einige unter Serum-Bedingungen gewachsene Zelllinien die Eigenschaft der Selbsterneuerung unter Serum-freien Bedingungen besitzen (Tabelle 1). Es sollte nun untersucht werden, ob es möglich ist experimentelle Hirntumoren mit ähnlichen Eigenschaften wie humane Gliome zu initiieren.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass G112-SP als Xenograft Tumoren in immundefizienten Mäusen erzeugen kann. Damit wurde eines der wichtigsten Kriterien der Stammzelltheorie, nämlich die Fähigkeit zur Induktion von Tumoren, erfüllt.

Die allgemeine Annahme, dass unter Serum-Bedingungen keine Vermehrung von Gliomstammzellen auf langfristige Sicht zu erreichen ist, wurde impliziert, da unter diesen Bedingungen neurale Stammzellen (NSC) oder Progenitoren (NPC) *in vitro* differenzieren. Tatsächlich zeigen primäre Gliom-Kulturen, die unter Serum-Bedingungen kultiviert wurden, eine ausgesprochene Heterogenität und exprimieren Marker von differenzierenden NSC/NPC (Pollard et al. 2009). Es ist jedoch nicht wirklich geklärt, ob diese Differenzierung auch in der Gesamtheit der Gliomstammzellen stattfindet. Die Ergebnisse dieses Xenograft-Experiments führen zu der Erkenntnis, dass die Stammzellattribute der Tumorinduktion auch unter Serum-Kulturbedingungen persistieren können, da G112-ST mit gleicher Potenz Tumoren erzeugte wie G112-SP.

Die Annahme, dass "Serum per se" also die gesamte Stammzellpotenz beseitigt, ist somit widerlegt.

Die vorangegangenen *in vitro* durchgeführten Versuche zeigten einen differenzierten GFAP+/Nestin+-Phänotyp von G112. Auch unter Differenzierungs-induzierenden Konditionen (bFGF/EGF-, FCS+) zeigte sich eine nahezu gleichförmige Expression von Nestin und GFAP (s. Abb. 10). Dies impliziert, dass die G112-SP-Population *in vitro* kein ausgeprägtes Differenzierungspotential besitzt. Allerdings zeigte sich in den *in vivo* gewachsenen Tumoren eine Reduktion der GFAP und der Nestin-

Expression. GFAP zeigte ein fleckförmiges Verteilungsmuster besonders im Haupttumor unter Aussparung der invasiven Population. Nestin positive Zellen zeigten sich vornehmlich in der invasiven Population. Interessanterweise zeigte sich innerhalb des Haupttumors ein fast vollständig überlappendes Expressionsmuster von Nestin und GFAP in G112-SP (s. Abb 19). Diese Resultate zeigen, dass GIC`s die intrinsische Fähigkeit zur de-Differenzierung besitzen. Der Verlust an GFAP und Nestin in einer bestimmten Fraktion von G112-SP Zellen während des Tumorwachstums zeigt, dass die Induktion der de-Differenzierung *in vivo* stattgefunden hat.

Da das Phänomen in dem In-vivo-Experiment aufgetreten ist, spielt möglicherweise die Tumorumgebung *in vivo* bzw. die Interaktion mit der Umgebung, das so genannte *micro-environment* (Goffart et al. 2013), eine große Rolle.

5.2 Radioresistenz

Es besteht ein allgemeiner Konsens, dass besonders die Stammzellsubpopulation für die ausgesprochene Radioresistenz in GBM verantwortlich ist (Zeppernick et al. 2008, Bao et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass *in vitro* CD133/AC133-positive Zellen eine höhere Radioresistenz aufweisen als CD133/AC133-negative (Bao et al. 2006). In der Arbeitsgruppe Giese/Kim konnte *in vitro* für die Sublinie G112-SP bereits eine erhöhte Radioresistenz im Vergleich zu der parentalen, unter Serum-Bedingungen gewachsenen, G112-ST-Zelllinie gesehen werden (s. Graph 1+2). In einzelnen Arbeiten konnte jedoch auch gezeigt werden, dass CD133-positive Zellen nicht zwangsläufig eine höhere Radioresistenz besitzen als CD133-negative (McCord et al. 2009). Die Gründe für diese vollkommen gegläufigen Befunde sind weiter unklar. Des Weiteren wurde diskutiert, ob erst die Tumorumgebung bzw. die Interaktion mit derselben zu einer erhöhten Radioresistenz führt (Jamal et al. 2010). Die Bestrahlungsversuche in dieser Arbeit zeigen, dass die G112-SP-Sublinien, die unter Serum-freien Bedingungen gewachsen waren eine höhere Radioresistenz aufweisen (s. Graph 3). Dies korreliert mit den vorherbeschriebenen In-vitro-Ergebnissen. Bestrahlte Tiere zeigten keine signifikante Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Hingegen zeigten bestrahlte Tiere mit Xenograft-Transplantaten aus Zellen, die unter Serum-Bedingungen kultiviert wurden, einen Überlebensvorteil im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

Die Mitoserate in den untersuchten G112-SP war signifikant höher als in G112-ST (s. Tabelle 2). Eine vermehrte Radioresistenz in G112-SP kann daher nicht mit einer verminderten Proliferation erklärt werden. Kritisch anzumerken wäre, dass die untersuchten Gruppen mit wenigstens vier Tieren klein sind. Zumindest ist jedoch ein Trend zu erkennen. Hieraus wäre "ein mehr" an Stammzellcharakter bzw. eine höhere Dichte an Zellen mit Stammzellattributen der unter Serum-freien Bedingungen kultivierten G112 abzuleiten. Des Weiteren konnte eine Selektion der radioresistenten Subpopulation von GIC`s erreicht werden (s. Graph 4).

Zusammengefasst betrachtet, konnte mit den Bestrahlungsversuchen die intrinsische Radioresistenz von GIC`s in G112 verifiziert werden.

Somit wurden die sicher erreichbaren klinischen Eigenschaften für GBM-Tumorstammzellen, nämlich die klinischen Fähigkeiten der Tumorinduktion und der Radioresistenz, nachvollzogen.

5.3 Invasivität und intratumorale Plastizität

Die Charakterisierung der *in vivo* gewachsenen Tumore zeigte, dass histomorphologisch ein sehr ähnliches Wachstum im Vergleich zu humanen GBM erzielt werden konnte. Des Weiteren konnten die weiteren typischen histopathologischen Kriterien des humanen GBM nachvollzogen werden nämlich Strichnekrosen mit Pseudopallisadenbildung, hohe Mitoseraten sowie Kernpleomorphie und Endothelproliferate bzw. große pathologische Gefäße.

Die histopathologische WHO-Klassifizierung Grad IV des GBM konnte somit nachvollzogen bzw. erfüllt werden.

Die typischen Invasionswege subependymal, entlang von weißen Bahnen sowie entlang von Gefäßen konnten besonders in den immunhistochemischen Färbungen mit Vimentin und Nestin dargestellt werden. Auch die quantitative Auswertung zeigte, dass sowohl in G112-ST, als auch G112-SP besonders in der invasiven Zone Nestin und Vimentin exprimiert wurde. Die Co-Expression von Nestin und Vimentin ist auch *in vitro* beschrieben und korrelierte in einem Matrigel-Experiment mit einer hohen Invasivität (Rutka et al.1999). Auch *in vivo* wurde bereits in einem Xenograft-Modell eine höhere Expression von Nestin und Vimentin in der invasiven Population von GBM gezeigt (Aaberg-Jessen et al. 2013).

So können auch einzelne Tumorzellen, die entfernt vom *tumor bulk* lokalisiert sind, kontrastreich dargestellt werden. Das Xenograft-Modell G112 zeigt also im Vergleich zur häufig verwendeten etablierten Zelllinie U87 deutliche Vorteile bzgl. der histomorphologischen Eigenschaften (s. Abb. 11, 16 und 17).

Zusammengefasst konnte mit dieser Arbeit ein invasives Modell zur Untersuchung von Gliomen *in vivo* etabliert werden. Die Zelllinie G112 wurde zum ersten mal charakterisiert. Vorteile bzgl. des invasiven Charakters besonders im Vergleich zu U87 konnten gesehen werden. Der fehlende invasive Charakter ist in Arbeiten mit Gliom-Xenograft-Modellen häufig ein großer Kritikpunkt (Candolfi et al. 2007).

Vescovi et al. beschrieben Hirntumorstammzellen mit folgenden Eigenschaften:

1. "Tumorigenität in einem orthotopen Modell"
2. "Extensive Selbserneuerung *ex vivo* oder *in vivo*"
3. "Fähigkeit zur Differenzierung"
4. "Kapazität, nicht tumorigene Endzellen zu erzeugen"

Als eine weitere Eigenschaft von GIC wurde später die intrinsische Radio- und Chemoresistenz definierend hinzugefügt (Bao et al. 2006).

Mit dieser Arbeit konnten in G112-SP folgende Kriterien von GICs erreicht bzw. nachvollzogen werden:

1. Die Tumorigenität in einem orthotopen Modell konnte reproduzierbar erreicht werden (s. Abb. 11, Tabelle 2).
2. Es zeigte sich sowohl *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen (Tabelle 1, Abb. 9) als auch *in vivo* durch das Tumorwachstum der Xenograft-Transplantate eine ausgeprägte Selbsterneuerung.
3. G112 beinhaltet eine TP53-Mutation innerhalb des *hot-spot* Codon 273 und exprimiert transkriptionell inaktives, mutiertes p53 (s. Abb. 20).

4. Ein Differenzierungspotenzial *in vitro* konnte für G112-SP nicht bestätigt werden. Dafür bestätigte sich die Plastizität von G112-SP in der de-Differenzierung in einer Subpopulation von Tumorzellen *in vivo* (s. Abb. 19).

5. Die intrinsische Radioresistenz von G112-SP konnte durch die Bestrahlungsversuche verifiziert werden.

Die Kapazität, nicht tumorigene Endzellen zu erzeugen wurde nicht untersucht. Das Potenzial nicht-tumorigene, differenzierte Tumorzellen zu generieren kann jedoch bei fehlender Differenzierungskapazität auch nicht erwartet werden. Die nicht definierende Fähigkeit der Multipotenz von GICs *in vivo* wurde ebenfalls nicht untersucht. In einem weiteren Versuch könnten hierzu Xenografttransplantate von G112-SP mit Markern der neuronalen Linie (β 3-tubulin) oder der oligodendroglialen Linie (O4) analysiert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass eine interessante Erkenntnis die Möglichkeit der de-Differenzierung von GICs sein könnte. Diese wurde bislang nicht als Tumorstammzellattribut beschrieben und sollte weiter untersucht werden. Das "eine In-vivo-Modell" von einer bestimmten Gliomzelllinie, mit der präklinisch jede phänotypische Ausprägung des GBM untersucht werden kann, wird es wahrscheinlich nie geben. Die Heterogenität des GBM sowie die schwer zu erfassende Subpopulation von GIC werden auch in Zukunft die Untersuchung in einem In-vivo-Modell erschweren.

In einigen aktuellen Arbeiten hatte sich z.B. die gute Untersuchungsmöglichkeit von U87 bzgl. der Angiogenese auf Grund der Sekretion von VEGF sowie einer Expressierung von VEGFR2 und einer ausgesprochen guten Vaskularisation gezeigt. Hier werden aktuell die neueren VEGF-Antagonisten wie Bevacizumab untersucht (Mesti et al. 2014). Eine Untersuchung der Invasivität scheint jedoch bei dem kugeligen und scharf abgegrenzten Wachstum schwer möglich und ist für diesen bestimmten Zweck auch nicht nötig. Die Sublinie G112-SP hingegen zeigte ein vergleichbares invasives Muster wie humane GBM und könnte für weitere Untersuchungen diesbezüglich verwendet werden.

In Zukunft wäre es daher sicherlich wünschenswert, für eine bestimmte Fragestellung auch ein bestimmtes In-vivo-Modell zur Verfügung zu haben.

Das GBM wird daher auch in näherer Zukunft eine Herausforderung in der prä-klinischen Forschung und in der klinischen Behandlung bleiben.

6 Zusammenfassung

Das GBM gehört weiterhin zu den therapeutischen Herausforderungen. Trotz der Fortschritte in der chirurgischen Behandlung sowie den adjuvanten Therapien ist die Prognose weiterhin ernüchternd. Dies ist begründet durch die unausweichliche Rezidivierung trotz durchgeführter maximaler Therapie. Die jüngsten Erkenntnisse reihen das GBM in die malignen Erkrankungen ein, die aus so genannten Tumorstammzellen (GICs) hervorgehen. Es wird angenommen, dass diese Subpopulation für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich ist und auch zur Unterhaltung derselben führt durch einen hohen Grad an Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Man erhofft sich durch nähere Erkenntnisse über diese Subpopulation, wirksame Therapien zu entwickeln, um die Rezidivhäufigkeit zu verringern und damit die Prognose zu verbessern. Die genauen Eigenschaften dieser GICs sind jedoch noch nicht völlig geklärt. In Analogie zu neuronalen Stammzellen und Progenitoren wurden die Fähigkeiten der ständigen Selbsterneuerung, Differenzierung sowie Multipotenz für GICs angenommen. Des Weiteren gelten die außerordentliche Resistenz gegen zytotoxische Therapien und die Fähigkeit zur Erzeugung von invasiven Tumoren mit einer typischen Morphologie des GBM in einem orthotopen Modell als herausragende Attribute dieser Subpopulation. Leider ist es bislang nicht gelungen, eindeutige phänotypische Marker für GICs zu etablieren, die diese sicher identifizieren können in der ausgesprochenen Heterogenität des Tumors. Die derzeitigen orthotopen Modelle werden häufig kritisiert, da eine dem GBM typische invasive Morphologie fehlt. Ziel der Arbeit war es nun ein orthotopes Modell reproduzierbar zu etablieren und auf die Kerneigenschaften der Tumorstammzellattribute zu charakterisieren. Hierzu wurde die etablierte Gliomzelllinie G112 untersucht. Mit der Arbeit konnten die derzeitigen definierenden klinischen Attribute der Tumorigenität in einem orthotopen Mausmodell und der Radioresistenz erfüllt werden. Der morphologische Aspekt zeigte einen invasiven Phänotyp, vergleichbar mit humanen GBM. Widerlegt ist die Annahme, dass Serum-Kulturbedingungen in jedem Falle die Tumorstammzellattribute unterdrücken. Interessanterweise zeigte sich *in vitro* bereits ein differenzierter Phänotyp, während sich in den Xenograft-Transplantaten eine ausgesprochene

Heterogenität der untersuchten Differenzierungsmarker zeigte. Eine neue Erkenntnis könnte also auch die Möglichkeit zur de-Differenzierung sein und sollte weiter untersucht werden. Da es weiter an identifizierenden Markern für GICs mangelt, wird die Untersuchung auch in Zukunft eine Herausforderung bleiben. Die genaue Identifikation dieser Subpopulation und ihrer Resistenzmechanismen wird jedoch vielleicht der Schlüssel zu einer wirksamen adjuvanten Therapie sein.

7 Literaturverzeichnis

Aaberg-Jessen C, Nørregaard A, Christensen K, Pedersen CB, Andersen C, Kristensen BW (2013): Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 546–560

Akudugu J, Gäde G, Böhm L (2001): Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. *Life Sci* 68,1153–1160

Bailey P, Cushing HW: A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. J. B. Lippincott, Philadelphia 1926

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

Bauer N, Fonseca A, Florek M, Freund D, Jászai J, Bornhäuser M, Fargeas CA, Corbeil D (2008): New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tissues Organs (Print)* 188, 127–138

Begemann M, Tsiouris AJ, Malkin MG (2004): Leptomeningeal and ependymal invasion by glioblastoma multiforme. *Neurology* 63, E8

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007): CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67, 4010–4015

Bennett AH, Godlee RJ (1885): Case of cerebral tumour, the surgical treatment. *Medico-Chirurgical Transactions* 68, 243-275

Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurt BM, Wolf U: Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut, Berlin 2010

Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B (2008): The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 86, 1025–1032

Bramwell B: Intracranial tumours. Pentland, Edinburgh 1888

Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Monzeglio O, Piazzini A, Schiffer D (2012): MGMT hypermethylation and MDR system in glioblastoma cancer stem cells. *Cancer Genomics Proteomics* 9, 171–178

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF et al. (2007): Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 85, 133–148

Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS et al. (2010): A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362–375

Cheng J, Liu B, Zhang X (2009): How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat Rev* 35, 403–408

Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, Zeaiter A, Das A, Phillips H, Modrusan Z, Cloughesy T (2011): AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther* 28, 334–340

Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D et al. (2014): Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370, 709–722

Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF (2010): U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 6, e1000832

Clément V, Dutoit V, Marino D, Dietrich P, Radovanovic I (2009): Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer* 125, 244–248

Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, Hartmann C (2011): Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back? *Radiat Oncol* 6, 115

Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB (2001): Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2, 82–91

Dell'Albani P (2008): Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res* 33, 2407–2415

Duffau H (2014): Is supratotal resection of glioblastoma in noneloquent areas possible? *World Neurosurg* 82, e101-3

Englot DJ, Berger MS, Chang EF, Garcia PA (2012): Characteristics and treatment of seizures in patients with high-grade glioma: a review. *Neurosurg Clin N Am* 23, 227-35, vii-viii

Gage FH (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004): Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011–7021

Giese A (2003): Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir Suppl* 88, 153–162

Giese A, Westphal M (1996): Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39, 235-50; discussion 250-2

Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens ME, Westphal M (1996): Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38, 755–764

Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, Ramírez M, García-Belda P, García-Verdugo JM (2013): Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* 296, 1435–1452

Goffart N, Kroonen J, Rogister B (2013): Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)* 5, 1049–1071

Han M, Guo L, Zhang Y, Huang B, Chen A, Chen W, Liu X, Sun S, Wang K, Liu A et al. (2015): Clinicopathological and Prognostic Significance of CD133 in Glioma Patients: A Meta-Analysis. *Mol Neurobiol*; Epub ahead of print.

Heese O, Disko A, Zirkel D, Westphal M, Lamszus K (2005): Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro Oncol* 7, 476–484

Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997–1003

Hill RP (2006): Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 66, 1891-5; discussion 1890

Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA (2011): Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* 3, e00063

Jaksch M, Múnera J, Bajpai R, Terskikh A, Oshima RG (2008): Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Res* 68, 7882–7886

Jamal M, Rath BH, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ (2010): Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clin Cancer Res* 16, 6049–6059

Jászai J, Fargeas CA, Graupner S, Tanaka EM, Brand M, Huttner WB, Corbeil D (2011): Distinct and conserved prominin-1/CD133-positive retinal cell populations identified across species. *PLoS One* 6, e17590

Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J et al.: *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Auflage; Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin 2013

Kanemoto M, Shirahata M, Nakauma A, Nakanishi K, Taniguchi K, Kukita Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Kato K (2014): Prognostic prediction of glioblastoma by quantitative assessment of the methylation status of the entire MGMT promoter region. *BMC Cancer* 14, 641

Kase M, Minajeva A, Niinepuu K, Kase S, Vardja M, Asser T, Jaal J (2013): Impact of CD133 positive stem cell proportion on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Radiol Oncol* 47, 405–410

Kemper K, Sprick MR, De Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G et al. (2010): The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 70, 719–729

Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücken E, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W et al. (2010): Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol* 12, 389–400

Kim K, Lee K, Kim H, Moon K, Jung T, Jung S, Lee M (2011): The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology* 31, 494–502

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002): The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 215-25; discussion 226-9

Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E et al. (2001): A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95, 190–198

Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, Angenieux B, Orozco NM, Foran I, Yong WH, Vinters HV, Liao LM, Lazareff JA et al. (2009): Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells* 27, 980–987

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

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97–109

McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ (2009): CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin Cancer Res* 15, 5145–5153

Mesti T, Savarin P, Triba MN, Le Moyec L, Ocvirk J, Banissi C, Carpentier AF (2014): Metabolic impact of anti-angiogenic agents on U87 glioma cells. *PLoS One* 9, e99198

Meulepas JM, Ronckers CM, Smets AM J B, Nievelstein RA, Jahnen A, Lee C, Kieft M, Laméris JS, van Herk M, Greuter MJ et al. (2014): Leukemia and brain tumors among children after radiation exposure from CT scans: design and methodological opportunities of the Dutch Pediatric CT Study. *Eur J Epidemiol* 29, 293–301

Mizrak D, Brittan M, Alison MR (2008): CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214, 3–9

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, Kang J, Assanah M, McKhann GM, Sisti MB et al. (2008): Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62, 505-14; discussion 514-5

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

Ohgaki H, Kleihues P (2005 b): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 479–489

Ohgaki H, Kleihues P (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764–772

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC et al. (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64, 6892–6899

Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2004): Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 42, 885–888

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M et al. (2009): Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580

Pontén J: Neoplastic human glia cells in culture; in: *Human Tumor Cells in Vitro*; hrsg. v. Fogh J; Plenum Press, New York 1975, 175–185

Pontén J, Westermarck B (1978): Properties of human malignant glioma cells in vitro. *Med Biol* 56, 184–193

Radaelli E, Ceruti R, Patton V, Russo M, Degrassi A, Croci V, Caprera F, Stortini G, Scanziani E, Pesenti E et al. (2009): Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol Histopathol* 24, 879–891

Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD (2006): Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol* 24, 1253–1265

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

Rieske P, Golanska E, Zakrzewska M, Piaskowski S, Hulas-Bigoszewska K, Wolańczyk M, Szybka M, Witusik-Perkowska M, Jaskolski DJ, Zakrzewski K et al. (2009): Arrested neural and advanced mesenchymal differentiation of glioblastoma cells-comparative study with neural progenitors. *BMC Cancer* 9, 54

Rudà R, Bertero L, Sanson M (2014): Gliomatosis cerebri: a review. *Curr Treat Options Neurol* 16, 273

Rutka JT, Ivanchuk S, Mondal S, Taylor M, Sakai K, Dirks P, Jun P, Jung S, Becker LE, Ackerley C (1999): Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci* 17, 503–51

Schauff AK, Kim EL, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Brockmann MA, Giese A (2009): Inhibition of invasion-associated thromboxane synthase sensitizes experimental gliomas to gamma-radiation. *J Neurooncol* 91, 241–249

Schmalz PGR, Shen MJ, Park JK (2011): Treatment resistance mechanisms of malignant glioma tumor stem cells. *Cancers (Basel)* 3, 621–635

Setoguchi T, Taga T, Kondo T (2004): Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 3, 414–415

Sidman RL: High resolution mouse brain atlas. Harvard Medical School, Boston 2001

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

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987–996

Thomas RP, Xu LW, Lober RM, Li G, Nagpal S (2013): The incidence and significance of multiple lesions in glioblastoma. *J Neurooncol* 112, 91–97

Trog D, Yeghiazaryan K, Schild HH, Golubnitschaja O (2008): Up-regulation of vimentin expression in low-density malignant glioma cells as immediate and late effects under irradiation and temozolomide treatment. *Amino Acids* 34, 539–545

Tysnes BB (2010): Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia* 12, 506–515

Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P (1980): Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer* 45, 484–494

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006): Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6, 425–436

Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Røsland G, Thorsen F, Stuhr L et al. (2008): CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761–768

- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC et al. (2009): Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 27, 5743–5750
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME (2010): MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 6, 39–51
- Westermarck B, Pontén J, Hugosson R (1973): Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81, 791–805
- Westphal M, Hänsel M, Hamel W, Kunzmann R, Hölzel F (1994): Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)* 126, 17–26
- Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006): Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66, 1883-90; discussion 1895-6
- Wick W, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Weiler M et al. (2013): Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 81, 1515–1522
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G (2014): MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol* 10, 372–385
- Wintersperger BJ, Runge VM, Tweedle MF, Jackson CB, Reiser MF (2009): Brain tumor enhancement in magnetic resonance imaging: dependency on the level of protein binding of applied contrast agents. *Invest Radiol* 44, 89–94
- Xie Q, Thompson R, Hardy K, DeCamp L, Berghuis B, Sigler R, Knudsen B, Cottingham S, Zhao P, Dykema K et al. (2008): A highly invasive human glioblastoma pre-clinical model for testing therapeutics. *J Transl Med* 6, 77

Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, Hu J, Hwang JY, Farkas DL, Black KL et al. (2009): Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *Br J Cancer* 101, 303–311

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997): AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC (2008): Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14, 123–129

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 1:

Serum-grown cell line	Reference	Minimal cell density (cells/ml)	Number of passages in serum-free medium
SNB19		2×10^5	0
G130		2×10^5	0
LNZ308		2×10^5	1
G62		2×10^5	3
G120		2×10^4	3
G55		2×10^4	3
G44		2×10^4	4
U87		10^3	> 70
U251		10^2	> 70
G112		10^2	> 70

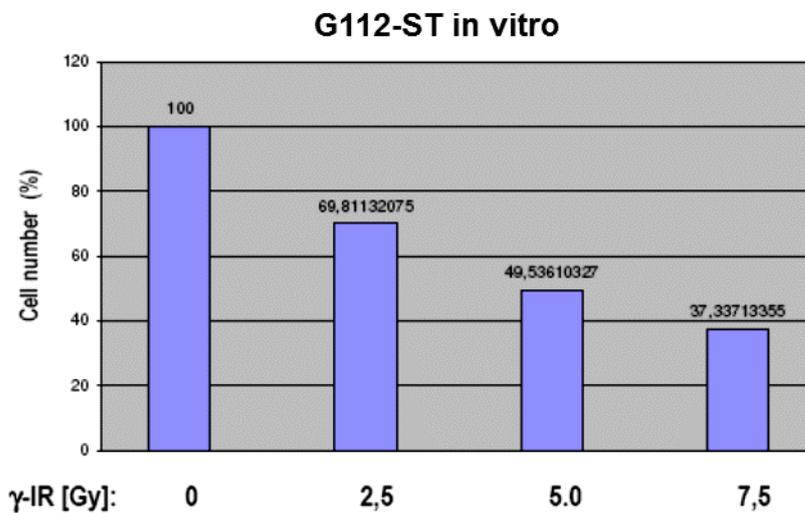
Tabelle 1: Screening von etablierten Gliomzelllinien auf die Fähigkeit der Selbsterneuerung.

Selbsterneuerungskapazität von etablierten, unter Serumbedingungen kultivierten Gliomzelllinien in Serum-freiem Medium. *Minimal cell density*: Minimale Anzahl an Tumorzellen, die für die Formierung von Neurosphären in Serum-freien Bedingungen notwendig sind. Von den 10 untersuchten Zelllinien zeigten nur G112, U251 und U87 eine ausgeprägte Selbsterneuerungskapazität unter Serum-freien Bedingungen.

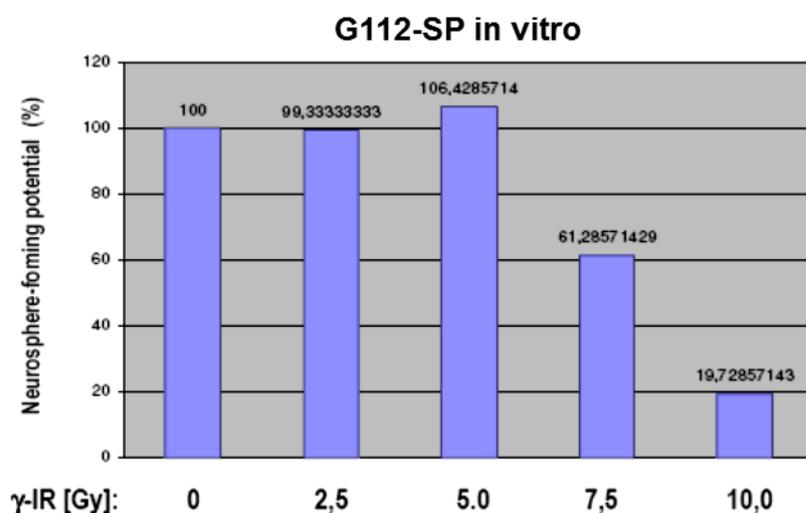
Charakterisierung G112 Histopathologie									
G112-ST					###	G112-SP			
Versuchstier	1	2	3	4		5	6	7	8
Tumor	groß, extradural, intraventrikulär. Anteile intracerebral	groß, intracerebral, extradurale anteile, Liquoraussaat	klein, intracerebral, Anteile extradural, cerebellär	groß, extradural, nach intracerebral infiltrierend		2 Zelltypen, groß, extradural, intraventrikulär, nach intracerebral wachsend	2 Zelltypen, sehr groß, intracerebral und extradural	groß, intracerebral, kleine Anteile extradural, keine Liquoraussaat	2 Zelltypen, sehr groß, intracerebral, Anteile extracerebral, keine Liquoraussaat
Tumorgrenzen	unscharf, diffuse Infiltration, fingerförmig	teils scharf begrenzt, teils diffus, fingerförmig	unscharf, diffuse Infiltration, fingerförmig	überwiegend scharf, zum Teil diffus		überwiegend scharf, zum Teil diffus	sehr diffus	teils scharf, teils diffus	diffus
GFAP									
Anteil positiver Zellen	5%	30%	10%	5%		40%	40%	5%	20%
Nestin									
Anteil positiver Zellen	>90%	>90%	>90%	80%		70%	80%	40%	40-50%
Vimentin									
Anteil positiver Zellen	>80%	20%	50%	80%		30%	10%	10%	10%
Mitoserate 40er Vergrößerung HPF	14,4	12,8	10,9	17,3		19,9	27,7	28,1	29,3

Tabelle 2: Histopathologische Charakterisierung von G112. Histopathologische Auswertung der Wachstumsmuster in G112-ST und G112-SP. Es zeigen sich keine Unterschiede bzgl. der Tumorigenität und des Wachstumsmusters. Die Auswertung der Mitoserate in G112-ST und G112-SP zeigt eine höhere Mitoserate in G112-SP

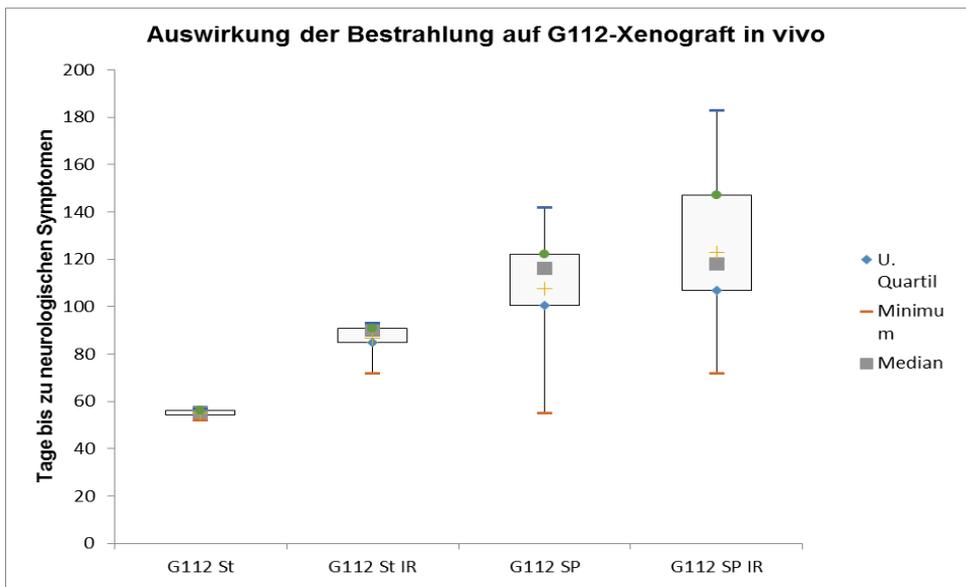
8.2 Graphen



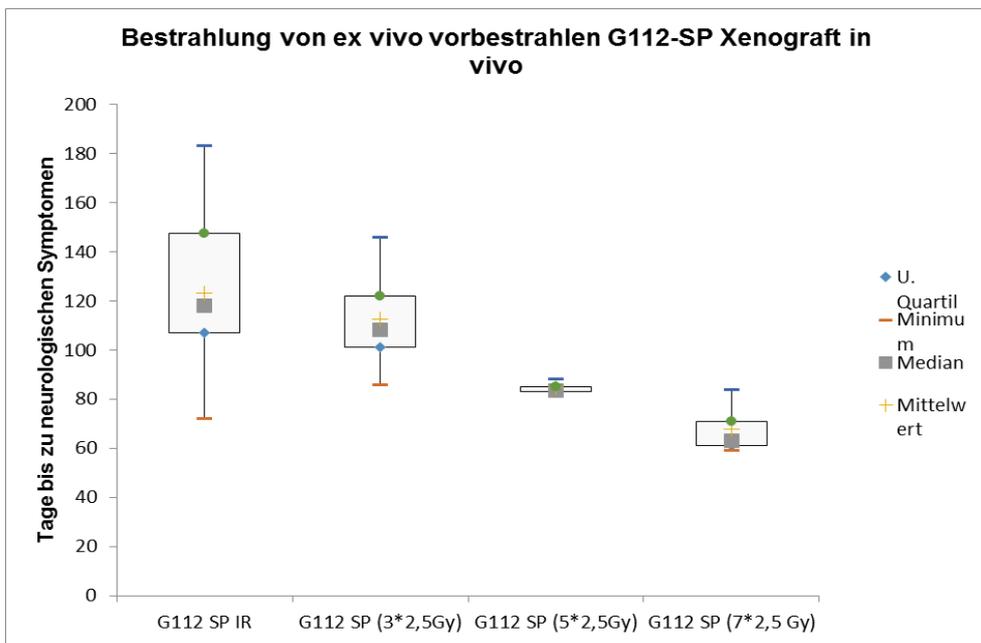
Graph 1: Bestrahlung von G112-ST in vitro. Auf der X-Achse zunehmende kummulative Gesamtdosis. Zu erkennen ist die abnehmende Zahl an vitalen Zellen mit zunehmender Gesamtdosis. Hinweise auf eine Radioresistenz finden sich nicht.



Graph 2: Bestrahlung von G112-SP in vitro. Auf der x-Achse zunehmende kummulative Gesamtdosis. Zu erkennen ist die stabile Neurosphärenzahl trotz Bestrahlung bei 2,5 Gy und 5,0 Gy hinweisend auf eine intrinsische Radioresistenz.



Graph 3: Auswirkung der Bestrahlung in vivo. Zu erkennen ist ein Überlebensvorteil der G112-ST-implantierten Tiere unter Bestrahlung (IR) gegenüber den Nicht-Bestrahlten ($p < 0,00001$). Bei G112-SP ist kein Überlebensvorteil zu erkennen ($p > 0,6$), hinweisend auf eine intrinsische Radioresistenz.



Graph 4: Der radioresistente Phänotyp von ex vivo vorbestrahlten G112-SP persistiert in vivo.

Bestrahlte Tiere mit G112-SP-Xenograft haben einen Überlebensvorteil gegenüber bestrahlten Tieren mit 5 bzw. 7 mal 2,5 Gy ex vivo vorbestrahlten G112-SP-Xenograft ($p < 0,00001$).

Danksagung

Danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. habil. Ella L. Kim sowie Herrn Prof. Dr. med Alf Giese für die Bereitstellung des Themas sowie für die fortwährende Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Christoph Ludwig für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Im neuroonkologischen Labor in der Abteilung für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich insbesondere Herrn Christoph Schmitz-Salue für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich danken Herrn PD Dr. med. Walter Schulz-Schaeffer und Herrn Dr. med. Arne Wrede aus der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Hilfestellung zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen sowie Frau Margret Rave-Fränk, Dipl. Biologin, aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Hilfestellung bei den Bestrahlungsversuchen.

Lebenslauf

Am 13.03.1983 wurde ich, Christoph Matthias Gerd Richter, in Bochum geboren. Derzeit bin ich wohnhaft in der Münsterstraße 1A in 55116 Mainz.

Noch in meinem Geburtsjahr erfolgte der Umzug nach Hamburg. Hier besuchte ich von 1989 bis 1991 die Grundschule Appelhoff sowie von 1991 bis 1993 die Grundschule Alsterredder. Es folgte der Besuch des Gymnasium Oberalster von 1993 bis 1999. Die gymnasiale Oberstufe besuchte ich nach Umzug in Kassel im Wilhelmsgymnasium. Hier absolvierte ich am 11.06.2002 das Abitur. Es folgte der Wehrdienst mit Grundausbildung und Einsatz als Panzergrenadier im 4./PzGrenBtl 152 Schwarzenborn vom 01.07.2002 bis 31.10.2002. Danach erfolgte der Einsatz im Sanitätsdienst StoSanZentrum Schwanewede Ast. Hamburg-Fischbek vom 01.11.2002 bis 31.03.2003. Das Studium der Humanmedizin begann ich zum Sommersemester 2003 an der Georg-August-Universität Göttingen. Dieses wurde mit Bestehen der ärztlichen Prüfung am 17.11.2009 abgeschlossen. Seit 2007 war ich tätig im neuroonkologischen Labor der Klinik für Neurochirurgie in der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Dr. rer. nat. habil. Ella L. Kim. Meine erste berufliche Tätigkeit als Assistenzarzt begann in der Klinik für Neurochirurgie, Universitätsmedizin Göttingen am 01.01.2010. Seit dem 15.04.2011 bin ich als Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Klinik, Universitätsmedizin Mainz beschäftigt. Hier strebe ich die weitere Ausbildung zum Facharzt für Neurochirurgie an.