

Die Rolle von miR210 auf den Stammzellphänotyp  
in Glioblastomen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der-Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dohmen Hildegard

aus Amern-Schwalmtal

Gießen 2017

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr.Till Acker

Gutachter: Prof. Dr. Acker

Gutachter: PD Dr. Stein

Tag der Disputation: 01.02.2018

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Gliome: Übersicht, Klassifikation, Klinik, Diagnostik, Therapie</b>	<b>1</b>
1.1.1. Übersicht der Gliome	1
1.1.2. Klassifikation	2
1.1.3. Klinik, Diagnostik und Therapie	5
<b>1.2. Glioblastom: Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren, Histo- und Molekularpathologie, Therapie und Prognose</b>	<b>6</b>
1.2.1. Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren	7
1.2.2. Histo- und Molekularpathologie	8
1.2.3. Therapie und Prognose	10
<b>1.3. Die Rolle von Stammzellen und Tumorstammzellen bei der Krebsentstehung</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Der Einfluss von Hypoxie und Hypoxia inducible-factors (HIF) auf die Tumorprogression</b>	<b>19</b>
<b>1.5. Die Bedeutung von MicroRNA´s im Rahmen von Tumorerkrankungen</b>	<b>23</b>
<b>2. Material-Methoden</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>28</b>
2.1.1. Geräte und Materialien	28
2.1.2. Chemikalien	29
2.1.3. Puffer und Lösungen	30
2.1.4. Antikörper	32
2.1.4.1. Primärantikörper (IF)	32
2.1.4.2. Sekundärantikörper	32
<b>2.2. Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1. Arbeiten mit DNA, Proteinen und Zellen	32
2.2.1.1. Herstellung lentiviraler Partikel	32
2.2.1.2. Generierung stabiler Zelllinien	33
2.2.1.3. Proteinextraktion und Western Blot Analyse	33
2.2.1.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.2.1.5. Zytospins- Gewebeaufbereitung	35
2.2.2. Grundlagen der Immunhistochemie	36
2.2.3. Färbungen an Zytospins	37
2.2.3.1. BrdU Immunfluoreszenzfärbung	37
2.2.3.2. CD133 Immunfluoreszenzfärbung	38
2.2.3.3. Phospho-Histon H3 Immunfluoreszenzfärbung	39
2.2.3.4. TUNEL Immunfluoreszenzfärbung	40
2.2.3.5. DAPI Immunfluoreszenzfärbung	40

2.2.4.	FACS Durchflusszytometrische Analysen	41
2.2.5.	Präparation und Gewebeaufbereitung; Intrakranielles Tumor-Xenograft-Modell	42
2.2.6.	Färbungen an Gewebeschnitten	42
2.2.6.1.	Hämatoxylin Färbung	42
2.2.6.2.	Carboanhydrase IX Immunfluoreszenzfärbung	44
2.2.6.3.	CD133 Immunfluoreszenzfärbung	45
2.2.6.4.	Endomucin Immunfluoreszenzfärbung	46
2.2.6.5.	HIF-1 $\alpha$ Immunfluoreszenzfärbung	46
2.2.6.6.	Phospho-Histon H3 Immunfluoreszenzfärbung	47
2.2.6.7.	TUNEL Immunfluoreszenzfärbung	48
2.2.6.8.	DAPI und TOPRO Fluoreszenzfärbung	50
2.2.7.	Statistische Auswertung	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1.	miR210 Überexpression beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp	51
3.2.	miR210 Überexpression erhöht die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien	52
3.3.	miR210 Überexpression induziert Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen	55
3.4.	miR210 Überexpression erhöht <i>in vivo</i> in 046X Glioblastomen das Tumolvolumen und die Gefäßdichte	58
3.5.	miR210 Überexpression erhöht <i>in vivo</i> in G55 Glioblastomen das Tumolvolumen	61
3.6.	miR210 Knockdown beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp	62
3.7.	miR210 Knockdown beeinflusst die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien	63
3.8.	miR210 Knockdown beeinflusst Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen	64
3.9.	miR210 Knockdown reduziert <i>in vivo</i> in 046X Glioblastomen das Tumolvolumen und die Gefäßdichte	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1.	Die Bedeutung von miR210 auf die Hypoxieantwort von Tumorzellen	71
4.2.	Die Rolle von miR210 in der Induktion des Stammzellphänotyps	74

<b>4.3. Der Einfluss von miRNA´s (miR210) auf die Tumorprogression</b>	<b>76</b>
<b>4.4. Ausblick und Perspektiven - Können miR210 oder andere miRNA´s einen diagnostischen- oder therapeutischen Einfluss auf die Behandlung maligner Tumore nehmen?</b>	<b>78</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6. Summary</b>	<b>81</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>11. Publikationsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>12. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>118</b>
<b>13. Curriculum Vitae</b>	<b>119</b>

# 1. Einleitung

Das Glioblastom (WHO Grad IV) zählt trotz multimodaler Therapiekonzepte noch immer zu den tödlichsten Krebsformen Erwachsener mit einer medianen Überlebenszeit von weniger als 15 Monaten und infauster Prognose (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016). Glioblastome zeichnen sich durch ein diffus infiltratives Wachstum, Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie und eine hohe Rezidivneigung aus. Die Entdeckung tumorinitiierender Krebsstammzellen innerhalb hypoxischer intratumoraler Nischen im Glioblastom lieferte neue Erklärungsansätze für die hohe Rezidivrate und Therapieresistenz. Daneben konnten zahlreiche miRNA's in malignen Tumoren nachgewiesen werden, welche einen wichtigen Einfluss auf die Tumorprogression nehmen und von prognostischer Relevanz sind. Ziel der Arbeit war, unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen an verschiedenen Glioblastomzelllinien, *in vitro* und *in vivo* den Einfluss von miRNA210 auf den Stammzellphänotyp und die Tumorprogression im Glioblastom zu untersuchen.

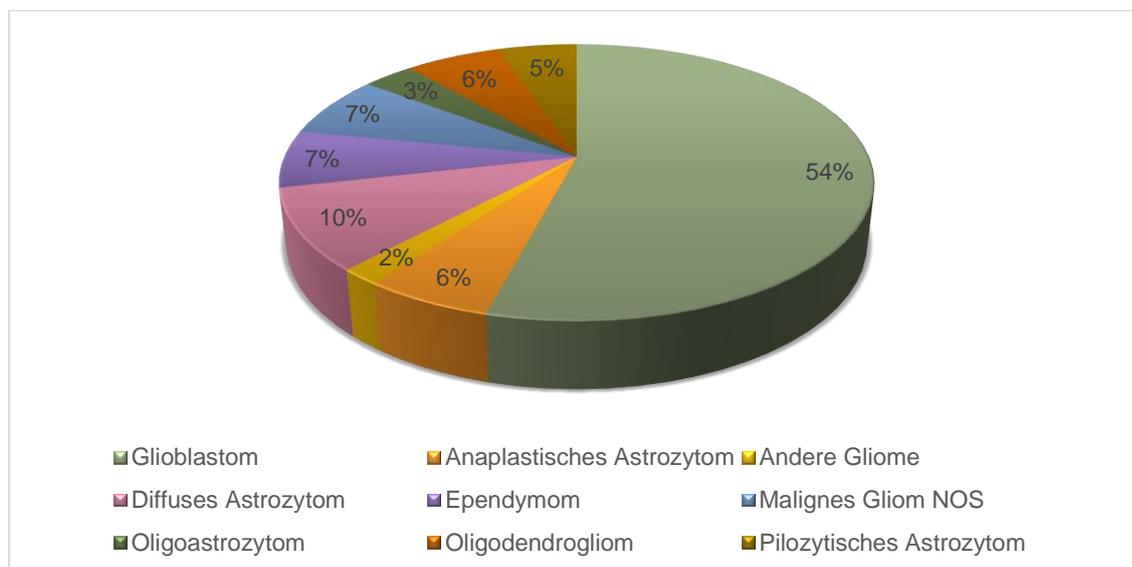
## 1.1. Gliome: Übersicht, Klassifikation, Klinik, Diagnostik, Therapie

### 1.1.1. Übersicht der Gliome

Als Gliome werden Hirntumore des zentralen Nervensystems bezeichnet, die von Gliazellen ausgehen. Sie können im Gehirn und Rückenmark auftreten. Der Begriff Gliom wurde erstmals von Rudolf Virchow (1821-1902) in seinen Vorlesungen „Die krankhaften Geschwülste“ verwendet. Wesentliche Grundlagen zum Verständnis der Gliome (Ohgaki & Kleihues, 2009) gehen auf Harvey Cushing und Percival Bailey aus den 1920er Jahren zurück. Sie unterteilten die Tumore aufgrund gewisser Ähnlichkeiten mit Gliazellen und führten den Begriff Glioblastoma multiforme ein. Die erste Operation eines Patienten mit Glioblastom erfolgte 1904 in Wien. 1949 entwickelte James Watson Kernohan das Konzept der biologischen Graduierung und unterteilte Gliome in 4 Grade (Kernohan, Mabon, & et al., 1949). Klaus Joachim Zülch fusionierte wiederum das Graduierungskonzept von Kernohan mit dem Konzept von Cushing/Bailey (Zulch, 1952) und schuf die Grundlagen der heutigen WHO Klassifikation (World Health Organisation) von Tumoren des zentralen Nervensystems (Louis et al., 2016). Die WHO Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems umfasst über 100 Tumorentitäten und basiert auf histopathologischen, immunhistochemischen- und molekularpathologischen Parametern. Grundlage für die neue aktuelle WHO Klassifikation war ein Treffen im Jahre 2014 in der niederländischen Stadt Haarlem. Dort wurde ein Konzept (Haarlem

Consensus Richtlinien) zur Inklusion histologischer und molekularer Daten zu einer integrativen Diagnose erarbeitet (Louis et al., 2014).

In Deutschland liegt die Inzidenzrate für Gliome pro Jahr bei 5.3/100.000 Einwohnern. Nach den Leukämien stellen die Gliome die zweithäufigste Tumorerkrankung im Kindesalter dar (Ohgaki & Kleihues, 2005). Unter den primär hirneigenen Tumoren stellen die astrozytär differenzierten Gliome mit bis zu 90% die größte Gruppe dar (Dolecek, Propp, Stroup, & Kruchko, 2012; Ostrom et al., 2015)



**Abbildung 1.1. Verteilung primärer Hirntumore und Gliome nach histologischen Subtypen gemäß CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005 -2009.** Modifiziert nach (Dolecek et al., 2012).

### 1.1.2. Klassifikation

Bei den Gliomen handelt es sich um eine heterogene Gruppe gut- und bösartiger Tumore, welche anhand ihrer biologischen Wertigkeit in benigne Gliome (WHO Grad I) und maligne Gliome (WHO Grad IV) eingeteilt werden. Gliome werden zudem danach unterteilt, welchem glialen Zelltyp sie am meisten ähneln. Entsprechend werden Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome unterschieden. Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, aus welchen Zellen das Glioblastom hervorgeht. Unter den astrozytären Gliomen wird das pilozytische Astrozytom dem WHO Grad I, das diffuse Astrozytom dem WHO Grad II, das anaplastische Astrozytom dem WHO Grad III

und das Glioblastom, welches über 50% aller astrozytären Gliome ausmacht, dem WHO Grad IV zugeordnet.

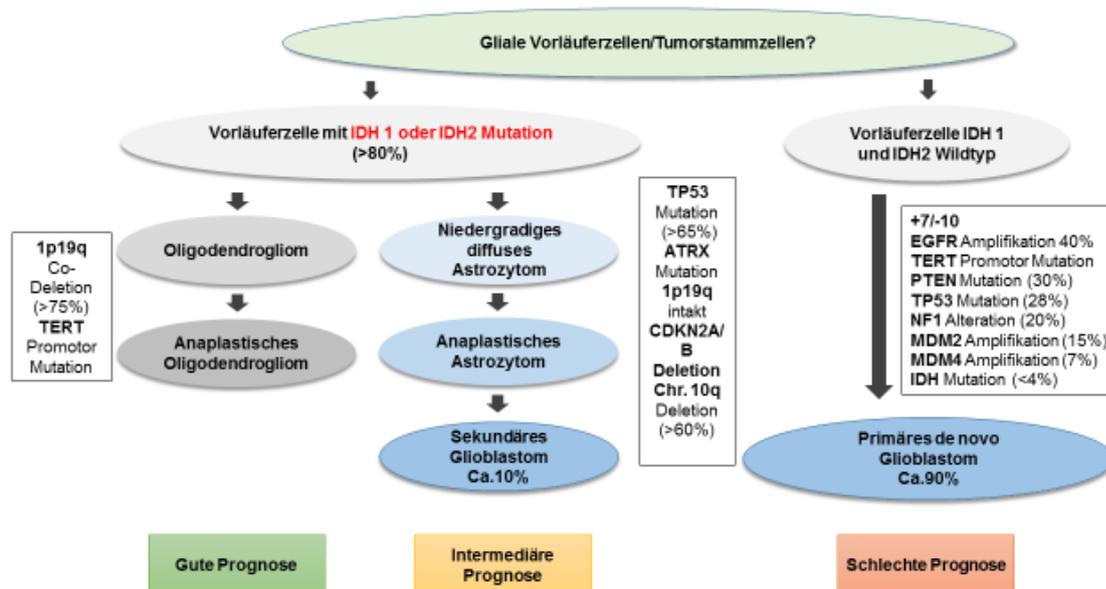
<b>Astrozytäre und oligodendrogliale Tumore</b>	<b>WHO Grad I</b>	<b>WHO Grad II</b>	<b>WHO Grad III</b>	<b>WHO Grad IV</b>
Subependymales- Riesenzell-Astrozytom	•			
Pilozytisches Astrozytom	•			
Pilomyxoides Astrozytom		•		
Pleomorphes Xanthoastrozytom		•		
Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom			•	
Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert		•		
Gemistozytisches Astrozytom, IDH-mutiert		•		
Diffuses Astrozytom, IDH-Wildtyp		•		
Diffuses Astrozytom, NOS		•		
Anaplastisches Astrozytom, IDH-mutiert			•	
Anaplastisches Astrozytom, IDH-Wildtyp			•	
Anaplastisches Astrozytom, NOS			•	
Glioblastom, IDH-Wildtyp				•
Riesenzell Glioblastom				•
Gliosarkom				•
Epitheloides Glioblastom				•
Glioblastom, IDH-mutiert				•
Glioblastom, NOS				•
Diffuses Mittellinien Gliom, H3 K27M-mutiert				•
Oligodendrogliom IDH-mutiert, 1p19q codeletiert		•		
Oligodendrogliom, NOS		•		

Astrozytäre und oligodendrogliale Tumore	WHO Grad I	WHO Grad II	WHO Grad III	WHO Grad IV
Anaplastisches Oligodendrogliom IDH-mutiert, 1p19q codeletiert			•	
Anaplastisches Oligodendrogliom, NOS			•	
Oligoastrozytom, NOS		•		
Anaplastisches Oligoastrozytom, NOS			•	

**Tabelle 1.1. Ausgesuchte diffuse Gliome analog der aktuellen WHO Klassifikation** (Louis et al., 2016).

Aktuell werden astrozytäre und oligodendrogliale Gliome WHO Grad II-IV anhand von Mutationen in den Genen für Isocitratdehydrogenase 1 (IDH) oder Isocitratdehydrogenase 2 in IDH mutierte und nicht IDH mutierte (wild-typ) differenziert. Die IDH mutierten werden wiederum in zwei Gruppen unterteilt. In eine Gruppe werden Oligodendrogliome (WHO Grad II-III) mit Codeletion der Chromosomenarme 1p und 19q sowie Mutationen im Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)- Promotor eingeteilt. Die andere Gruppe entspricht den nicht Codeletierten Astrozytomen (WHO Grad II-IV), welche eine TP53 (Tumorsuppressorgenprodukt) – und ATRX (Alpha Thalassämie mental Retardierungs Syndrom x-linked) Mutation aufweisen (Eckel-Passow et al., 2015; Weller et al., 2015).

Die meisten Glioblastome entstehen *de novo*, d.h. ohne ein zuvor bekanntes niedergradiges Gliom und machen den Großteil der IDH-Wildtyp Gliome aus. Primäre Glioblastome mit IDH Mutation sind selten (<10%). Molekulargenetisch finden sich Zugewinne auf Chromosom 7, Verluste auf Chromosom 10, Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)- Mutationen und Amplifikationen verschiedener Onkogene, insbesondere des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) auf Chromosom 7. Die Prognose der Gliome korreliert sehr eng mit der genetischen Einteilung (Sturm et al., 2012).



**Abbildung 1.2. Molekularpathologische Veränderungen in astrozytären und oligodendroglialen Gliomen.** Modifiziert nach (Ohgaki & Kleihues, 2009); Reuss et al. und Weller et al. 2015

### 1.1.3. Klinik, Diagnostik und Therapie

Die klinischen Symptome eines intrakraniellen Prozesses können sich anhand neu aufgetretener fokaler- oder generalisierter Krampfanfälle, Zeichen erhöhten Hirndrucks wie beispielsweise Übelkeit und Erbrechen und Bewusstseins- und Persönlichkeitsveränderungen manifestieren. Bei Verdacht auf einen Hirntumor sollten eine klinisch- neurologische Untersuchung und eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittelgabe durchgeführt und bei Verlaufskontrollen die gleichen Ebenen gewählt werden (Leitlinien analog der neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft, NOA). Ein häufiger MRT Befund, insbesondere bei Verdacht auf ein malignes Gliom, ist eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung, welche durch eine vermehrte Vaskularisation des pathologischen Prozesses mit Affektion der Blut-Hirn-Schranke entsteht. Der in der Bildgebung nachgewiesene pathologische Prozess sollte, wenn möglich, durch eine stereotaktische Biopsie oder offene Resektion neurochirurgisch und histopathologisch abgeklärt werden. Die weniger invasive stereotaktische Biopsie, welche sich zum Beispiel bei Inoperabilität oder eingeschränkter Anästhesiefähigkeit älterer Patienten anbietet, weist mit Entnahme serieller Biopsiezylinder  $<5\text{mm}^3$  trotz der geringen Probengröße eine hohe Treffsicherheit und diagnostische Zuverlässigkeit auf (D. Jain et al., 2006; Tilgner, Herr, Ostertag, & Volk,

2005). Bereits während der navigierten Entnahme von Serienbiopsien kann innerhalb weniger Minuten durch einen Neuropathologen im Operatioosaal anhand von Ausstrichpräparaten eine histomorphologische Begutachtung erfolgen. Neben der histologischen Diagnosesicherung rücken ergänzende molekularpathologische Untersuchungen immer mehr in den Vordergrund. Unterschieden werden diagnostische Marker zur genaueren Klassifizierung (IDH, 1p19q), prognostische Marker zur Vorhersage der Prognose (1p19q, MGMT-O<sup>6</sup>-methylguanin–DNA methyltransferase) und prädiktive Marker (1p19q, MGMT) zur Aussage über ein Therapieansprechen (Cairncross et al., 2013; Hegi et al., 2005; van den Bent et al., 2013; Wick, Wiestler, & Platten, 2015). Anhand von Next Generation Sequenzierungs (NGS)- und Arrayverfahren konnte eine große Anzahl diagnostischer Gensignaturen (Zacher et al., 2016) mit Ausblick auf eine zielgerichtete Therapie wie z.B. bei nicht kleinzelligen EGFR mutierten Bronchialkarzinomen (Kwak et al., 2010), BRAF mutierten Melanomen (Berghoff & Preusser, 2017; Davies et al., 2002), chronischen Leukämien mit BCR-ABL Translokation (Druker, 2001) und HER2 amplifizierten Mammakarzinomen (Slamon & Pegram, 2001) identifiziert werden. Die Therapie der diffusen Gliome besteht generell in der chirurgischen Resektion, gefolgt von einer Strahlen- und Chemotherapie (s. Kapitel 1.2.3. Therapie und Prognose des Glioblastoms).

## **1.2. Glioblastom: Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren, Histo- und Molekularpathologie, Therapie und Prognose**

Das Glioblastom zählt zu den häufigsten primären malignen astrozytär differenzierten Hirntumoren des Erwachsenen und entspricht dem WHO Grad IV. Trotz komplexer multimodaler Therapiekonzepte mit chirurgischer-, Radio- und Chemotherapie ist die Prognose infaust und die mittlere Überlebenszeit beträgt nur 14,9 Monate (Chinot et al., 2014; Stupp et al., 2005; Thakkar et al., 2014). Es wird unterschieden zwischen primären und sekundären Glioblastomen, welche sich über unterschiedliche genetische Veränderungen entwickeln (s. Kapitel 1.1.2. Klassifikation der Gliome, 1.2.2 Histo- und Molekularpathologie), Patienten unterschiedlicher Altersgruppen betreffen und einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf aufweisen (Reuss, Kratz, et al., 2015; Reuss, Sahm, et al., 2015; Schwartzenuber et al., 2012; Sturm et al., 2014). Fast 90% der Glioblastome entstehen *de novo*, das heißt ohne eine bekannte Vorläuferläsion. Die übrigen 10% entsprechen sekundären Glioblastomen, welche sich langsam aus einem diffusen Astrozytom WHO Grad II oder anaplastischen Astrozytom WHO Grad III entwickeln und bei jüngeren Patienten auftreten.

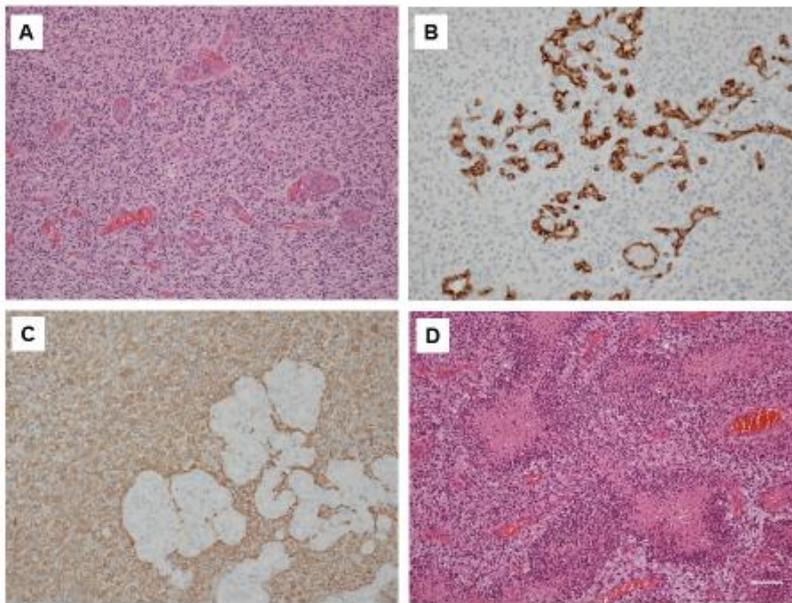
### 1.2.1. Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren

Die Inzidenz in der westlichen Welt liegt bei 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und ist damit höher als die der asiatischen und afrikanischen Länder. Mit 45,2% der malignen primären Hirntumore, 54% aller Gliome und 16% aller primären- und sekundären Hirntumore macht das Glioblastom einen Großteil der Gliome aus (Ostrom et al., 2013; Ostrom et al., 2015). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren, wobei Männer häufiger erkranken (6/100.000) als Frauen (4.5/100.000) und Menschen mit weißer Hautfarbe doppelt so oft wie die schwarze Bevölkerung (Louis et al., 2007). Glioblastome wachsen bevorzugt supratentoriell in den Hemisphären (frontal, parietal, temporal und occipital). Seltener finden sich, bei deutlich jüngeren Patienten, Glioblastome im Kleinhirn, welche histo- und molekularpathologisch von niedergradigen Gliomen, insbesondere dem pilozytischen Astrozytom (WHO Grad I) abzugrenzen sind. Bei entsprechender Größenausdehnung des Tumors resultiert ein erhöhter intrakranieller Druck mit Gefahr der Einklemmung. Eine liquorigene Metastasierung bei Gliomen ist sehr selten.

Die ursächlichen Mechanismen für die Entstehung der Glioblastome sind bislang nicht genau bekannt. Risikofaktoren für die Entstehung sind eine vorausgegangene ionisierende Bestrahlung z.B. bei einer Leukämie im Kindesalter. Umgebungsbedingte Risikofaktoren konnten bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen werden (Ohgaki, 2005). Es gibt Hinweise auf eine Assoziation von immunologischen Erkrankungen und dem Auftreten von Gliomen. Eine geringere Häufigkeit zeigte sich bei Patienten mit Allergien oder atopischen Erkrankungen wie Asthma oder Ekzemen (Thakkar et al., 2014). Keine Assoziation zeigte sich hingegen bei Zigaretten- und Alkoholkonsum. Inkonsistente Ergebnisse zeigten sich bei der Verwendung von Mobiltelefonen (Benson et al., 2013; Hardell & Carlberg, 2009). Nur eine geringe Anzahl von 5% der Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf, zum Beispiel in Assoziation mit einer genetischen Erkrankung wie der Neurofibromatose Typ I (Farrell & Plotkin, 2007), Turcot-Syndrom (Grips et al., 2002), multiple endokrine Neoplasie Typ II A (Sanchez-Ortiga, Boix Carreno, Moreno-Perez, & Pico Alfonso, 2009).

### 1.2.2. Histo- und Molekularpathologie

Histopathologisch weist das Glioblastom Malignitätszeichen wie eine zelluläre Polymorphie, nukleäre Atypie, erhöhte Mitoserate, Gefäßthrombosen und tumoreigene Nekrosen mit Pseudopalisading auf. Eine Besonderheit sind intratumorale glomeruloide Gefäßproliferate, welche von diskontinuierlichen Perizytenanordnungen umgeben werden, die keinen Kontakt zu astrozytären Endfüßen aufweisen (Rojiani & Dorovini-Zis, 1996).



**Abbildung 1.3. Histopathologische Charakteristika des Glioblastoms:** (A) Polymorpher diffus infiltrierender astrozytär differenzierter Tumor mit glomeruloiden Gefäßproliferaten in der Hämatoxylin-Eosin Färbung. (B) Immunhistochemische VEGFR Expression innerhalb glomeruloider Gefäßproliferate. (C) Immunhistochemische GFAP Expression astrozytärer Tumorzellfortsätze unter Aussparung der Gefäße. (D) Tumoreigene Nekrosen mit Pseudopalisading in der Hämatoxylin-Eosin Färbung (Skalierungsbalken = 50µm).

Anhand der beschriebenen histologischen Charakteristika alleine können primäre und sekundäre Glioblastome nicht voneinander unterschieden werden. In den letzten Jahren wurden eine Reihe molekularpathologischer Veränderungen identifiziert, deren Häufigkeitsverteilung zwischen primären- und sekundären Glioblastomen sehr unterschiedlich ist (Kapitel 1.1.2.). Daneben konnte ein unterschiedliches Therapieansprechen beobachtet werden, was wiederum vermuten lässt, dass es sich bei den jeweiligen Tumorentitäten um unterschiedliche Subtypen handelt und mutmaßlich ein Zusammenhang mit der Entstehung der unterschiedlichen Entitäten

besteht (Eckel-Passow et al., 2015; Filbin & Suva, 2016; Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Sturm et al., 2014). Die funktionellen und molekularen Veränderungen betreffen jedoch die gleichen Signalwege. Es handelt sich dabei insgesamt um Mutationen in Signalwegen, die in die Regulation von Apoptose, Migration, Proliferation und Zellzyklus eingreifen. Insbesondere involviert sind der EGFR/RAS/NF1/PTEN/PIK3 (Zellproliferation, Blockade von Apoptosen); der P16<sup>INK4a</sup>/CDK4/RB1 (Zellzyklus, Proliferation) -und TP53/MDM2/MDM4/P14<sup>ARF</sup> Signalweg (Ohgaki & Kleihues, 2009). Im Jahre 2008 wurde im „The cancer genome atlas“ (TCGA) an einer großen Patientenkohorte von 91 Patienten und 601 Genen ein Mutationsspektrum des Glioblastoms erstellt. Auf dieser Basis teilten Verhaak et al. im Jahre 2010 Glioblastome in vier Subtypen, den proneuralen-, neuralen-, klassischen- und mesenchymalen Subtyp, ein. Bei fast allen Subtypen konnten TP53- und RB (Retinoblastom)- Mutationen und Mutationen im Rezeptortyrosinkinase (RTK)- Signalweg nachgewiesen werden. Als besonderes Charakteristikum wurde für den klassischen Subtyp eine Amplifikation von Chromosom 7 und EGFR (Epidermal Growth Factor Rezeptor, EGFR entspricht einem Apoptose reduzierenden und Zellwachstum stimulierenden Rezeptor) und eine Deletion von Chromosom 10 beschrieben. Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 fanden sich kaum im klassischen Subtyp. Der mesenchymale Subtyp zeichnete sich durch Deletionen im Chromosom 17 (hemizygoter LOH 17q11.2) aus, welches das Neurofibromin 1 Gen enthält. Zudem fand sich, vermutlich als Folge der intratumoralen Nekrose und Entzündungsreaktion, innerhalb des mesenchymalen Subtyps eine vermehrte Expression von Proteinen des NF- $\kappa$ B Signalweges und Tumornekrosefaktor assoziierter Gene. Im proneuralen Subtyp fanden sich insbesondere PDGFRA Alterationen und Punktmutationen im IDH1-Gen. Daneben konnten häufig TP53 Mutationen und TP53 LOH (Verlust der Heterozygotie) nachgewiesen werden. Im neuralen Subtyp konnte eine vermehrte Expression neuronaler Marker wie NEFL (Neurofilament), GABRA1 (Gamma-aminobutyric-Rezeptor) und SYT1 (Synaptotagmin) nachgewiesen werden (Verhaak et al., 2010). Sturm et al. unterteilten Glioblastome anhand unterschiedlicher DNA Methylierungsprofile in sechs Subgruppen, welche mit spezifischen molekularen Alterationen und klinischen Parametern korrelieren. Zwei Subgruppen, die gehäuft bei Kindern und Jugendlichen auftreten, zeichnen sich durch Mutationen im Gen für das Histon H3.3 aus. Zum einen K27 mutierte, meistens pädiatrische Glioblastome des proneuralen Subtyps, daneben G34 mutierte Glioblastome. Als dritte Gruppe fanden sich IDH mutierte Glioblastome, die mit dem proneuralen Subtyp korrelieren, RTK I Glioblastome, die mit PDGFRA Amplifikation einhergehen, RTK II mit klassischem Subtyp des Glioblastoms korrelierend und ein mesenchymaler Subtyp (Sturm et al., 2012). Primäre Glioblastome zeigen häufig (>45%)

Mutationen oder Amplifikationen im Chromosom 7, speziell des EGFR Locus (kodiert den epidermalen Wachstumsfaktor auf 7p11-12). Der EGFR Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, dessen Aktivierung über Bindung unterschiedlicher Liganden erfolgt. Mutationen im EGFR Gen tragen über eine Aktivierung des nachgeschalteten Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase/AKT-Signalweges zur erhöhten Proliferation, Induktion der Angiogenese, Migration und Hemmung der Apoptose bei. In vielen Tumoren ist EGFR hochreguliert, was zu unkontrolliertem Wachstum und verstärkter Metastasenbildung führt, ferner zu einer geringeren Chemo- und Radiosensitivität. Es finden sich Mutationen oder Amplifikationen des CDK6 Locus (kodiert die Cyclin-abhängige Kinase 6) auf 7q21. Häufig finden sich außerdem Verluste bzw. Deletionen der Heterozygotie des Chromosoms 10 (LOH 10q und 10p), Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 19, Vermehrungen genetischen Materials auf den Chromosomen 1q, 12q, 20q und 21. Typische Verluste, neben den bereits erwähnten auf den Chromosomen 10 bzw. 10q sowie 9p, konnten vor allem auf 1q, 6q, 13q, 14q, 19q und 22q detektiert werden (Eckel-Passow et al., 2015; Louis et al., 2007; Ohgaki & Kleihues, 2007; Sturm et al., 2014). Des Weiteren finden sich homozygote Deletionen von CDKN2A/B, P16<sup>INK4a</sup> und RB1 (Retinoblastom Signalweg), Mutationen von PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog), TERT Mutationen (Telomerase reverse Transkriptase), weniger häufig eine Überexpression der Gene MDM2 und MDM4 (mouse double minute) und selten Mutationen der Isocitratdehydrogenase (IDH). Sekundäre Glioblastome weisen in ca. 65% eine TP53 (Tumorsuppressorgen)- und ATRX (Alpha Thalassämie/mental Retardierungs Syndrom X-linked) Mutation sowie eine Mutation im Isocitratdehydrogenase 1 Gen auf (ca. 80%). Typische nachzuweisende Aberrationen in sekundären Glioblastomen umfassen Zugewinne auf den Chromosomen 8q, 10p, 12p und 17q, während Verluste laut Literatur häufig auf 3p, 4q, 5q und 11p zu finden sind. Auch Verluste auf 22q, 18q und 19q konnten in einer höheren Häufigkeit in sekundären als in primären Glioblastomen nachgewiesen werden (Eckel-Passow et al., 2015; Sturm et al., 2014; Weller et al., 2015).

### **1.2.3. Therapie und Prognose**

Die Therapie des Glioblastoms (analog der Leitlinie AWMF) umfasst die chirurgische Versorgung mittels Tumorreduktion und Dekompression und liefert unter Zuhilfenahme von 5-Aminolävulinsäure bei weitestgehend vollständiger Resektion Hinweise auf einen Überlebensvorteil (Stummer et al., 2006). Anzumerken ist, dass die eigentliche Tumormasse aufgrund der Biologie und des diffus infiltrativen Tumorwachstums über die makroskopisch erkennbare Tumormasse hinausgeht. Zudem hat die Prävention

postoperativer neurologischer Defizite bei Gliomen, die nicht vollständig resezierbar sind (Tumorlokalisierung innerhalb eines eloquenten Areals) höhere Priorität als der Versuch einer radikalen Operation. Zur Dokumentation des operativen Ergebnisses und zum Ausschluss einer frühen postoperativen Komplikation (z.B. Blutung) wird innerhalb der ersten 72 Stunden nach Operation eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel durchgeführt. Der Tumorresektion folgt eine Radiotherapie mit einer Gesamtdosis von 60 Gy und abhängig vom Alter und MGMT Promotor-Methylierungsstatus eine konkomitante Chemotherapie mit Temozolomid gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie mit 6 Zyklen Temozolomid (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2005). Temozolomid ist ein alkylierendes, Blut-Hirn-Schranken gängiges Chemotherapeutikum, welches die DNA Replikation hemmt und oral verabreicht werden kann. O<sup>6</sup>-methylguanin–DNA methyltransferase (MGMT) ist ein DNA Reparaturenzym, das die durch eine alkylierende Chemotherapie entstandenen DNA Schäden behebt. Die Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer verminderten Transkription des MGMT-Gens, was eine verminderte DNA Reparatur und erhöhte Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Temozolomid zur Folge hat (Hegi et al., 2005). In den Arbeiten von Hegi und Stupp et al. aus dem Jahre 2005 konnte in einer randomisierten prospektiven 573 Probanden umfassenden Studie gezeigt werden, dass eine konkomitante Gabe von Temozolomid plus Radiotherapie bzw. eine adjuvante Gabe von Temozolomid nach Radiotherapie das Überleben von Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom signifikant verbessert. Die Überlebenszeit stieg von 12,1 Monate bei Patienten die nur bestrahlt wurden auf 14,6 Monate bei kombinierter Radio- und Chemotherapie (Stupp et al., 2009). Die zwei Jahres-Überlebensrate lag bei 26,5% bei kombinierter Radio-Chemotherapie im Vergleich zu 10,4% bei Behandlung mit Radiotherapie alleine. Bei älteren Glioblastom Patienten (>60. Lebensjahr) dient der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus nach zwei unabhängigen Phase III- Studien als prädiktiver Marker für den Therapieentscheid, ob eine alleinige Bestrahlung oder Chemotherapie durchgeführt wird (Malmstrom et al., 2012; Wick et al., 2012).

Solide Tumore zeichnen sich durch einen besonderen Gefäßreichtum aus. Man hat daher in den letzten Jahren neben der zytotoxischen Chemo- und Radiotherapie versucht, Patienten mit antiangiogenen Therapien zu behandeln. Interessant war, dass es darunter zu einer „Normalisierung“ der intratumoralen Gefäße mit verbessertem Nährstoff- und Sauerstofftransport und nicht zu einem vermehrten Tumorwachstum kam. Zusätzlich nahm die Gefäßpermeabilität ab, was mit einem verbesserten Sauerstoff-, Nährstoff- und Wirkstofftransport und besserem Therapieansprechen einherging. Daneben führte die verbesserte Oxygenierung zu einer erhöhten Proliferationsrate perivaskulär und perinekrotisch lokalisierter Tumorzellen mit verbessertem

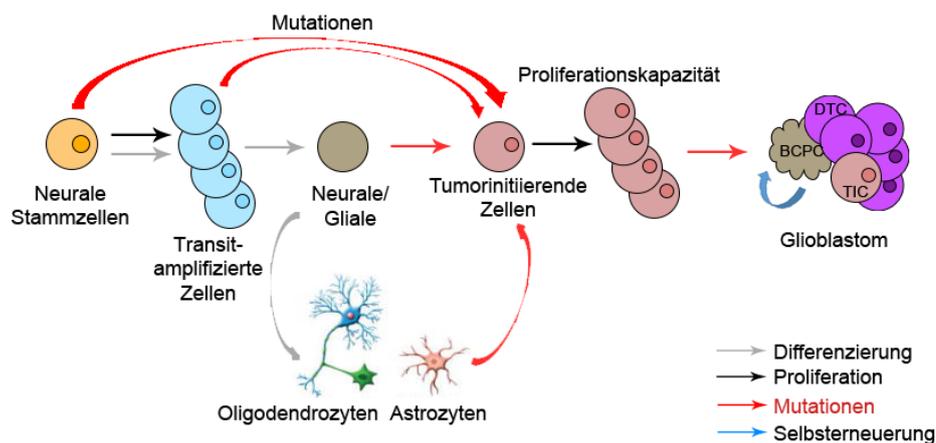
Therapieansprechen, da schnell proliferierende Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber zytotoxischer Behandlung und Bestrahlung aufweisen (R. K. Jain, 2005). Unter antiangiogener Therapie kommt es durch die Abnahme der Gefäßpermeabilität zu einer gesteigerten Therapieeffektivität, Abnahme des Hirnödems und Reduktion neurologischer Defizite, so dass letztlich die Steroidsubstitution reduziert werden kann. Es zeigte sich allerdings, dass sich im Rahmen der Anti-VEGF Therapien relativ schnell Resistenzen, mit Ausbildung eines schnellen und aggressiven Tumorwachstums, entwickelten. Bei Patienten mit Rezidivglioblastomen konnte in Phase II Studien allenfalls das progressionsfreie, nicht jedoch das Gesamtüberleben verbessert werden (Friedman et al., 2009).

Die Entdeckung intratumoraler Heterogenität und häufiger genetischer Alterationen, die für die Gliomprogression verantwortlich gemacht werden, lieferte in den letzten Jahren einen großen Beitrag zum Verständnis der molekularen Signalwege für die Gliomentstehung (Eckel-Passow et al., 2015; Sturm et al., 2014; Verhaak et al., 2010). Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der schlechten Prognose und hohen Rezidivrate sind neue Therapieansätze dringend erforderlich um z.B. gezielt in gestörte Wege der intrazellulären Signaltransduktion maligner Zellen einzugreifen, beziehungsweise Rezeptoren spezifisch zu blockieren (Chinot et al., 2016; Sandmann et al., 2015). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass nicht die Haupttumormasse das Tumorwachstum unterhält, sondern eine Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften existiert, und dass sich diese tumorinitiierenden Zellen (BTSC's) bevorzugt in perivaskulären Nischen aufhalten (Charles & Holland, 2010).

### **1.3. Die Rolle von Stammzellen und Tumorstammzellen bei der Krebsentstehung**

Menschliche Gewebetypen unterliegen einer ständigen Zellerneuerung. Um unter physiologischen Bedingungen die Komplexität der Gewebearchitektur aufrecht zu erhalten, bedarf es einer Population undifferenzierter langlebiger Zellen mit außergewöhnlichem Wachstumspotential, welche als Stammzellen bezeichnet werden. Stammzellen zeichnen sich durch drei wesentliche Charakteristika wie Selbsterneuerung, homöostatische Kontrolle und die Fähigkeit zur Differenzierung aus. Je nach Art der Stammzelle haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe (pluripotente Stammzellen) oder in bestimmte Gewebetypen (multipotente Stammzellen) zu entwickeln. Embryonale Stammzellen entstehen bei der ersten Zellteilung der befruchteten Eizelle und sind *in vivo* und *in vitro* in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Ekto-, Meso- und Entoderm) zu entwickeln. Sie werden daher als pluripotent bezeichnet. Sie wurden erstmals 1981 aus Blastozysten der Maus isoliert (Evans &

Kaufman, 1981). Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen sind adulte Stammzellen im Organismus nach der Geburt vorhanden. Aus diesen können während des gesamten Lebenszyklus des Organismus neue spezialisierte Zellen gebildet werden. Adulte Stammzellen können unter Erhaltung der morphologischen und funktionellen Gewebestruktur verletzungsbedingt geschädigtes Gewebe ersetzen (Forge, Li, Corwin, & Nevill, 1993). Aufgrund eines geringeren Differenzierungspotentials als embryonale Stammzellen können adulte bzw. multipotente Stammzellen nur Zellen eines Gewebetyps ausbilden. So können neurale Stammzellen neuronale und gliale Zellen im Nervensystem generieren. Reya et al. hatten vor einigen Jahren beschrieben, dass Hirntumorzellen Eigenschaften neuraler Stammzellen aufweisen (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). So ist, um unkontrolliertes Tumorwachstum zu verhindern, eine strenge Regulation der Stammzellen hinsichtlich des Proliferationspotentials und der Zellteilung erforderlich.



**Abbildung 1.4. Mögliche Abstammungslinie für die Ontogenese und Produktion von Tumorstammzellen (Tumor-initiiierende Zellen; TIC's) sowie für die Entwicklung eines Glioblastoms.** Während der Entwicklung erfahren neurale Stammzellen verschiedene Amplifikationen, die es ihnen ermöglichen, Transit amplifizierende Zellen auszubilden, die zu neuronalen/glialen Vorläuferzellen differenzieren. Diese Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit, entweder neuronale oder gliale Zellen zu bilden. Mutationen, die zur Ausbildung eines Glioblastoms beitragen, können in allen Ebenen dieser Abstammungslinie auftreten und Tumorinitiierende Zellen (TIC's) ausbilden. TIC's werden Stammzeleigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation, das Vermögen, hirntumorpropagierende Zellen (BCPC's), differenzierte Tumorzellen (DTC's) oder Tumorvorläuferzellen zu bilden, nachgesagt. Modifiziert nach Hadjipanayis et al. J Mol Med 2009.

Die asymmetrische Zellteilung generiert als Tochterzellen eine Stammzelle und eine sich rasch teilende Vorläuferzelle, welche weiter ausdifferenziert. Ein asymmetrischer Zellteilungsmodus garantiert ein Gleichgewicht zwischen Selbsterhaltung und Differenzierung. Eine verbrauchende symmetrische Zellteilung bringt zwei sich weiter differenzierende Vorläufer als Tochterzellen hervor. Dieser Teilungsvorgang würde langfristig zur Abnahme der Stammzellpopulation in einem Gewebe führen. Die Stammzellen sind in einer besonderen Umgebung angesiedelt, die als Stammzellnische bezeichnet wird. Diese Nische stellt eine Region dar, die auf Selbsterneuerung, Überleben und Erhalt von Stammzellen spezialisiert ist. Gegenstand aktueller Forschung ist zu untersuchen, in-wie-weit Umgebungsfaktoren das Verhalten von Stammzellen beeinflussen (Sneddon & Werb, 2007). Neurale Stammzellnischen im adulten Gehirn sind in der subventrikulären Zone zwischen dem Seitenventrikel und dem Striatum, sowie der subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippocampus, identifiziert worden. Eine Stammzellnische wird von zellulären Bestandteilen, der subventrikulären Zone zwischen dem Seitenventrikel und Striatum, subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippocampus und metabolischen Faktoren gebildet. In beiden beschriebenen Regionen wurden Stammzellen identifiziert, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen und sich in reife Zellen des Gehirns differenzieren ließen (Reynolds, Tetzlaff, & Weiss, 1992; Reynolds & Weiss, 1992; Vescovi, Galli, & Reynolds, 2006). Folglich könnte der zelluläre Ursprung glialer Tumore innerhalb Neurogenese aktiver Zonen liegen. Bei der Inokulation von Karzinogenen in Mäusehirne konnte 1969 von Hopewell und Wright ein deutlich verstärktes Tumorwachstum in der Subventrikularzone beobachtet werden, im Vergleich dazu deutlich geringer im peripheren Kortex (Hopewell & Wright, 1969).

In der Gliomgenese kommt dem Erhalt von Hirntumorstammzellen (BTSC's) innerhalb der perivaskulären Nische eine besondere Bedeutung zu. Die perivaskuläre Nische besteht aus Gefäßproliferaten mit umgebenden Perizyten, Lymphozyten, Makrophagen, Mikroglia, Astrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Charles & Holland, 2010; Gilbertson & Rich, 2007). Die Zellheterogenität innerhalb der perivaskulären Nische begründet möglicherweise auch die zahlreich involvierten Signalwege wie z.B. Sonic Hedgehog (SHH) und Phosphoinositid-3- Kinasen/Serin-Threonin/Proteinkinase B (PI3K/AKT). Seidel et al. konnten zeigen, dass CD133 positive Hirntumorstammzellen vermehrt in hypoxischen perivaskulären Nischen zu finden sind (Seidel et al., 2010).

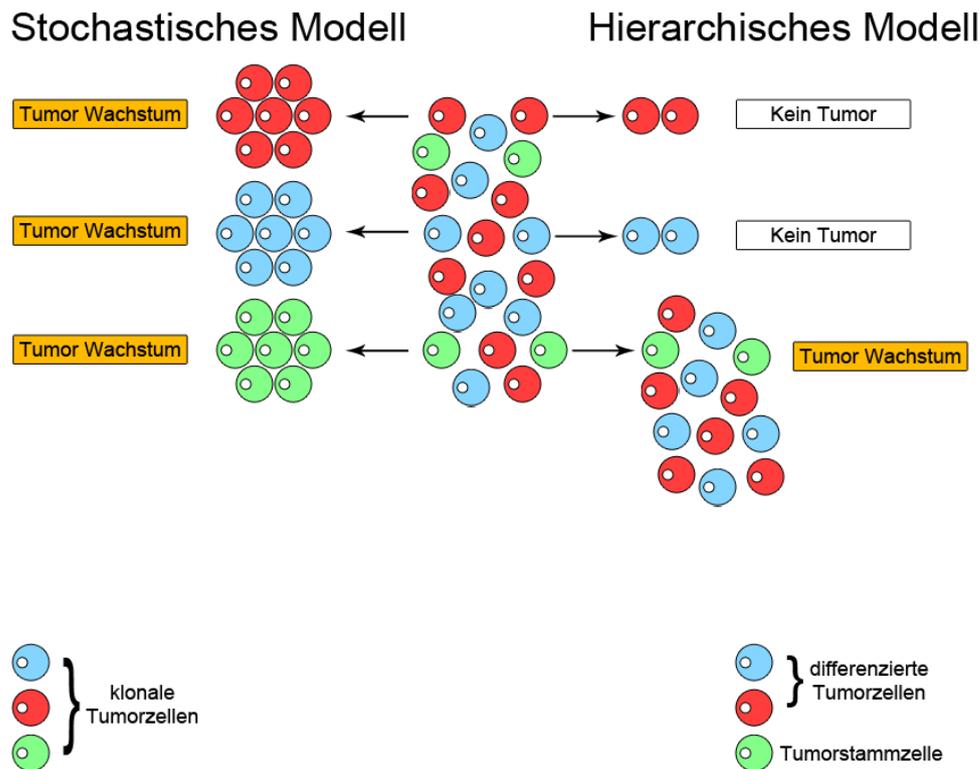
Perizyten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen oder Neuralleistenzellen. Sie dienen der Stabilisierung neu entwickelter Gefäße. Zudem kommen Perizyten immunologische Funktionen zu (Bergers & Song, 2005). Perizyten exprimieren

zahlreiche immunhistochemische Marker wie z.B.  $\alpha$ -smooth muscle actin, Desmin und PDGFR- $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor). Makrophagen entstehen aus CD34+ Knochenmarkvorläuferzellen, die im Anschluss zu Monozyten differenzieren. Neben Makrophagen finden sich Lymphozyten als Zellen des Immunsystems innerhalb der Tumorumgebung. Endothelzellen stellen die Kernkomponente der Blut-Hirn-Schranke dar, gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor und können mit CD31 und CD34 immunhistochemisch dargestellt werden (Garlanda & Dejana, 1997). Daneben kommt den Astrozyten eine wesentliche Rolle in der Erhaltung der Blut-Hirn-Schranke zu (J. H. Kim et al., 2006).

Von Rubinstein et al. wurde postuliert, dass der Ursprung maligner pädiatrischer Hirntumore (Medullo-, Retino- und Neuroblastom) in einer fehlerhaften Differenzierung ortsständiger Zellen liegt. Rubinstein favorisierte beim kindlichen Medulloblastom die Entstehung aus ortsständigen Körnerzellen der äußeren Hirnrinde (Rubinstein, 1972). Eine Hypothese war zudem die Entstehung von primären Gehirntumoren aus tumorigenen Stammzellen, die im adulten Gehirn verbleiben. 1992 gelang es erstmalig, neurale Stammzellen aus adulten und embryonalen Mäusehirnen zu isolieren und mit Hilfe von Wachstumsfaktoren zu kultivieren. Es bildeten sich Neurosphären aus. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Zellen proliferative Eigenschaften besitzen, zur Selbsterneuerung befähigt sind und in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können. Nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob Stammzellen sich in einem G<sub>0</sub> Stadium befinden oder langsam ein G<sub>1</sub> Stadium durchlaufen (Blau, Brazelton, & Weimann, 2001; Crowe, Parsa, & Sinha, 2004; Morrison, Shah, & Anderson, 1997; Reynolds et al., 1992; Reynolds & Weiss, 1992; Uchida et al., 2000). Stammzellen können anhand spezifischer Marker voneinander unterschieden werden. Alpha-Fetoprotein ist beispielsweise ein Marker für endodermale Stammzellen, Nestin für ektodermale- und Desmin für mesodermale Stammzellen. Mutationen innerhalb bestimmter Signalwege, die zur Selbsterneuerung normaler Stammzellen erforderlich sind, führten auch zur Tumorentstehung (Crowe et al., 2004; Ruiz i Altaba, Sanchez, & Dahmane, 2002).

Die moderne Tumorthherapie hat sich in den letzten Jahren weiterentwickelt. Trotzdem verhalten sich zahlreiche Tumore therapierefraktär und es kommt nach kurzer Remission zum Rezidiv. Ein Grund dafür ist, dass die bisher angewandten konventionellen Tumorthapien überwiegend gegen die Haupttumormasse und nicht gegen das eigentliche Ziel, eine Subpopulation von Zellen, welche Stammzeleigenschaften besitzt und resistent gegen traditionelle Krebstherapien ist, gerichtet sind. Diese Zellen weisen bestimmte Charakteristika wie Selbsterneuerungspotential,

vermehrte Proliferation, Tumorpropagation, Invasion, Gefäßneubildung und eine Resistenz gegen Radio- und Chemotherapie auf. Erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Stammzellen und Tumorausbildung gab es in den 1960er Jahren. In akuten myeloischen Leukämien war *in vitro* nur eine kleine Zellpopulation in der Lage, über längere Zeit extensiv zu proliferieren (Bruce & Van Der Gaag, 1963). Wegweisende Versuche, um zu untersuchen, ob der hierarchische Aufbau der Hämatopoese auch im Tumor erhalten bleibt, kamen 1997 von einer Forschergruppe aus Toronto. In einem Tiermodell von John Dick und Dominique Bonnet wurden Zellpopulationen verschiedener akuter myeloischer Leukämieformen (AML), welche eine Expression der Oberflächenmarker CD34<sup>+</sup> und CD38<sup>-</sup> aufwiesen, separiert. Obwohl diese Zellfraktion nur einen geringen Prozentsatz aller Zellen ausmachte (ca. 0,2%), konnte ausschließlich durch diese Zellfraktion Leukämie in NOD/SCID Mäusen (non-obese diabetic mice with severe combined immunodeficiency) initiiert werden. Die weiteren Leukämiezellen waren hingegen in tausendfach höherer Konzentration nicht tumorinitiiierend (Bonnet & Dick, 1997). Zudem wurden von Matsui et al. Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften im Multiplen Myelom und von Al-Hajj et al. Tumorstammzellen in Brustkrebs beschrieben (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003; Matsui et al., 2004). Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde das Konzept der Tumorstammzelle postuliert. Dieses besagt, dass nur eine kleine Subpopulation von Tumorzellen in der Lage ist, Tumorwachstum zu initiieren und aufrecht zu erhalten. Entsprechend dieses Modells geht man von einem Aufbau des Tumors analog zur Zellhierarchie im gesunden Gewebe aus. Die an der Spitze stehende Tumorstammzelle produziert sowohl identische Tochterzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch differenzierte Tochterzellen mit limitiertem Proliferationspotential, die für den Hauptteil der differenzierten Tumorzellmasse verantwortlich sind. Ausgehend von diesem Modell sollte es möglich sein, zwei Zellfraktionen zu isolieren. Zum einen tumorinitiiierende Zellen, wovon jede einzelne zur Generierung von neoplastischen Zellen befähigt ist, zum anderen nicht tumorinitiiierende Zellen. Die tumorinitiiierenden Zellen zeichnen sich analog zur physiologischen Stammzelle durch ihr Potential zur Selbsterneuerung, Differenzierung und unbegrenzten Proliferation aus (Reya et al., 2001). Es werden zwei Modelle zum Wachstumsverhalten tumorinitiiierender Zellen in der Tumorausbildung unterschieden. Das stochastische Modell besagt, dass jede Zelle innerhalb eines Tumors die gleiche Fähigkeit besitzt, das Tumorwachstum voranzutreiben. Dem steht das hierarchische Modell gegenüber, laut dem nur eine kleine Subpopulation tumorinitiiierender Zellen zur Tumorausbildung führt, der überwiegende Zellanteil hingegen nicht.



**Abbildung 1.5. Stochastisches und Hierarchisches Modell.** Das stochastische Modell besagt, dass alle Zellen Ausgangspunkt für die Tumorbildung sein können, während innerhalb des hierarchischen Modells nur eine kleine Anzahl von Tumorstammzellen (grüne Zellen) zur Tumorausbildung führt (modifiziert nach Reya et al. 2001).

Die in Analogie zur Stammzellnische in spezifischen Mikromilieus lokalisierten Tumorstammzellen werden über molekulare (intrinsische)-, sauerstoffabhängige (extrinsische) Mechanismen und perivaskuläre Umgebungsfaktoren wie Hypoxie kontrolliert (Seidel et al. 2010). Auch die Tumorerogenität und Progression wird durch intrinsische (genetische Mutationen) und extrinsische (Umgebungseinflüsse) Faktoren beeinflusst. Für Glioblastome charakteristische genetische Veränderungen, wie Mutationen von p53 und PTEN (Phosphatase and tensin homolog) und chromosomale Aberrationen finden sich in Stammzellen und Nicht-Stammzellen (Singh, Clarke, Hide, & Dirks, 2004; Singh et al., 2003). Stammzellen persistieren für lange Zeit, teilen sich deutlich langsamer und differenzieren weniger, was Gelegenheit zur Akkumulation von Mutationen gibt, die letztlich die Krebsentstehung begünstigen.

Interessanterweise postulierte der deutsche Pathologe Rudolf Virchow bereits vor 150 Jahren, dass Krebs durch die Aktivierung ruhender stammzellähnlicher Zellen in reifem Gewebe entsteht. Park et al. hatten 1971 von der Existenz der Krebsstammzellen berichtet (Park, Bergsagel, & McCulloch, 1971). Auch andere Forschergruppen konnten

später eine Zellpopulation in malignen Tumoren beschreiben, die Stammzeleigenschaften aufwies und als Krebsstammzellen bezeichnet wurde (Blau et al., 2001; Bonnet & Dick, 1997; Dalerba, Cho, & Clarke, 2007; Lapidot et al., 1994; Reya et al., 2001).

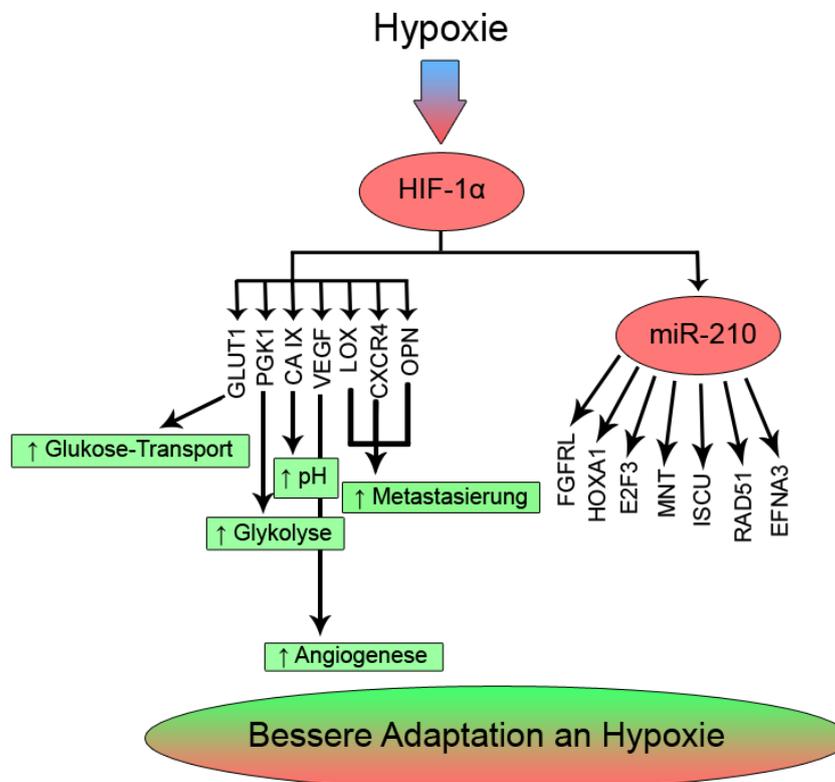
Der erste Identifizierung und Charakterisierung von Tumorstammzellen aus humanen Hirntumoren gelang einer Forschergruppe im Jahre 2003. Tumorstammzellen wurden anhand spezifischer Oberflächenmarker (CD133) aus Gliomen und Medulloblastomen selektioniert. Mehrere Gründe sprachen dafür, dass es sich dabei um Hirntumorstammzellen handelte. Es kam zur Ausbildung klonaler Cluster, die an Neurosphären erinnerten. Diese Zellen zeigten Selbsterneuerungs- und Proliferationskapazität sowie Differenzierungspotential, dem Herkunftstumorgewebe ähnlich zu sein. Die Injektion von nur 100 CD133 positiven Zellen in NOD/SCID Mäuse war ausreichend, um Hirntumore zu entwickeln. Die Transplantation von  $10^5$  CD133 negativen Zellen hingegen führte zu keiner Tumorentstehung (Singh, Hawkins, et al., 2004). Forschergruppen berichteten auch von der Entdeckung tumorinitiierender Stammzellen in pädiatrischen Hirntumoren (Hemmati et al., 2003). Daneben konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass maligne Hirntumoren einen höheren Stammzellindex (CD133<sup>+</sup>) aufweisen als niedergradige Hirntumore und histologisch gleiche Tumore teilweise unterschiedliche Stammzellindizes aufweisen, was möglicherweise als prädiktiv für die Prognose zu werten ist (Galli et al., 2004; Singh, Clarke, et al., 2004; Singh et al., 2003). An Biopsiegewebe humaner maligner Gliome konnten mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD133 Glioblastom-initiierende Zellen charakterisiert werden, die *in vitro* und *in vivo* durch Selbsterneuerung und Proliferation das Wachstum des Tumors gewährleisten und im Gegensatz zu Nicht-Stammzellen in geringer Zellzahl (<100) Tumoren *in vivo* bildeten (Beier et al., 2007). CD133 findet als Stammzellmarker weit verbreitet Verwendung, wobei nicht jede CD133 positive Zelle eine Tumorstammzelle darstellt. Einige Arbeitsgruppen berichten, dass auch aus Glioblastomzelllinien gewonnene CD133 negative Zellen im Tiermodell Tumore initiieren und aus CD133 negativen CD133 positive Zellen zu gewinnen sind, was den Gebrauch von CD133 als universalen Tumorstammzellmarker in Frage gestellt hat (Chen et al., 2010; J. Wang et al., 2008). Über die Bedeutung des neuralen und embryonalen Stammzellmarkers SOX2 wurde beschrieben, dass er in pädiatrischen Hirntumoren wie zum Beispiel dem Medulloblastom exprimiert wird (Hemmati et al., 2003; Vescovi et al., 2006). Für den neuralen Stammzellmarker Nestin wurde eine Expression in Tumorstammzellkulturen des Glioblastoms nachgewiesen (Hemmati et al., 2003). Die Expression des Oberflächenproteins CD34 konnte als Marker für Tumorstammzellen unterschiedlicher Tumorentitäten wie z.B. dem Mammakarzinom nachgewiesen werden

(Al-Hajj et al., 2003). Tumorstammzellen wurden in zahlreichen Tumoren wie z.B. Brust (Al-Hajj et al., 2003; Geng, Alexandrou, & Li, 2014; Ponti et al., 2005), Gehirn (Singh et al., 2003; Singh, Hawkins, et al., 2004), Kopf-Hals (Allegra & Trapasso, 2012; Prince et al., 2007), Leber (Ma et al., 2007), Lunge (Eramo et al., 2008; C. F. Kim et al., 2005), Haut (Malanchi et al., 2008), Dickdarm (Dalerba, Dylla, et al., 2007; O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007), Melanom (Fang et al., 2005), Eierstock (Bapat, Mali, Koppikar, & Kurrey, 2005), Bauchspeicheldrüse- (Hermann et al., 2007; C. Li et al., 2007) und in der Vorsteherdrüse (Collins, Berry, Hyde, Stower, & Maitland, 2005) gefunden und mit Tumorstammzellmarkern (CD15, CD34, CD133) dargestellt. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten klinische Charakteristika von Glioblastomen der CD133 Expression gegenüber. Hier zeigte sich anhand von Arrayanalysen zum Beispiel, dass eine niedrige CD133 Expression mit einer Hochregulation von Genen assoziiert war, die in Zusammenhang mit einem invasiven Wachstum und dem mesenchymalen oder proliferativen Glioblastomsubtyp stehen. Eine hohe CD133 Expression hingegen korrelierte mit einer besseren Abgrenzbarkeit des Tumors und einer Expression von Genen des proneuralen Phänotyps (Joo et al., 2008).

#### **1.4. Der Einfluss von Hypoxie und Hypoxia inducible-factors (HIF) auf die Tumorprogression**

Sauerstoff ist ein essentieller Regulator des Zellmetabolismus, des Überlebens und der Proliferation. Der reguläre Sauerstoffpartialdruck ist organspezifisch und liegt im gesunden menschlichen Gehirn bei 1-5%, in gesundem Gewebe bei circa 7% und kann sich innerhalb eines nekrotischen Tumors auf unter 1% reduzieren. Jede Zelle besitzt die Fähigkeit, die Sauerstoffkonzentration zu messen (Semenza & Wang, 1992). Niedrige Sauerstoffspannungen finden sich bei häufigen ischämischen Erkrankungen wie z.B. Herzinfarkten, Schlaganfällen, peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten und chirurgischen Wunden. Zudem entstehen hypoxische Zustände physiologisch, zum Beispiel in großer Höhe und im Verlauf pathologischer Prozesse wie beispielsweise während des Tumorwachstums. Das Auftreten hypoxischer Tumorareale resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf und ist eine charakteristische Eigenschaft solider Tumore, die früh während der Tumorentstehung auftritt und zum einen in der schnellen Proliferation, zum anderen in der Tatsache begründet liegt, dass Tumore nur bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> durch Diffusion alleine versorgt werden können. Der Tumorprogress hängt somit von einer ausreichenden Gefäßneubildung ab (Carmeliet & Jain, 2000; Hjelmeland, Lathia, Sathornsumetee, & Rich, 2011; Rojiani & Dorovini-Zis, 1996). Als wichtigster Vermittler bei der Anpassung an Hypoxie wurde der Hypoxie induzierende Faktor (hypoxia inducible factor-HIF)

beschrieben (Semenza & Wang, 1992). Ein geringes Absinken des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe führt bereits zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  und induziert die Transkription zahlreicher Zielgene (**Abb.1.5.**), welche entscheidend die Adaptation an Hypoxie begünstigen und einen positiven Effekt auf das Wachstumsverhalten von Tumoren haben (Semenza, 1998; Sullivan & Graham, 2007).



**Abbildung 1.6. HIF-1 $\alpha$ - und miR210 Targetgene und ihre Funktionen in Tumoren.** HIF-1 $\alpha$  reguliert zahlreiche Gene, die in metabolische Mechanismen wie z.B. den Glukosetransport (GLUT1), Glykolyse; Phosphoglyceratkinase (PGK1), pH-Wert; Carboanhydrase IX, Gefäßneubildung; (VEGF), Metastasierung; Lysyloxidase (LOX), Chemokinrezeptor 4; CXCR4 und Osteopontin (OPN) involviert sind. miR210 gilt als hypoxieinduziertes HIF-1 $\alpha$  Target und hemmt die Expression zahlreicher Gene, die in eine Vielzahl zellulärer Funktionen involviert sind. Die Hochregulation von miR210 unter Hypoxie führt indirekt über HIF-1 $\alpha$  zur Hemmung der Expression zahlreicher Gene und zellulären Adaptation an hypoxische Umgebungsbedingungen (modifiziert nach Huang et al. miR210 micromanager of the hypoxia pathway).

HIF als ein Schlüsseltranskriptionsfaktor reguliert unter hypoxischen Bedingungen Gene, die die Angiogenese, Proliferation, Erythropoese und das Überleben fördern (Semenza, 2003). Zudem fördert HIF die Selbsterneuerung und den Stammzellphänotyp (**Abb:3.1 und Abb.3.2**). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist der potenteste Promotor der Gefäßneubildung und das meist untersuchte HIF-induzierte Zielgen (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003; Forsythe et al., 1996). Zur besseren Versorgung mit

Sauerstoff ist HIF außerdem in die Regulation der Erythropoese über Erythropoietin und in die Regulation des Blutgefäßtonus und Eisenstoffwechsels involviert. Zudem erfolgt eine Adaptation der Tumorzellen an Hypoxie mit O<sub>2</sub>-unabhängiger Energiegewinnung (ATP Bildung) durch Umstellung der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse (Semenza, 2003). Nahezu alle der beteiligten Enzyme der Glykolyse, als auch die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT2, welche die Aufnahme von Glukose in die Zelle steuern, werden durch HIF reguliert. Ein weiteres HIF-Zielgen ist die Carboanhydrase IX (CAIX), welche die bei der Glykolyse entstehende Azidose, die durch einen erhöhten Laktatanfall entsteht, ausgleicht (Wykoff et al., 2000). HIF-1 $\alpha$  induzierte Zielgene spielen zudem eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation (Wachstumsfaktoren wie IGF-2), Apoptose (z.B. NIX und BNIP3), Zellmigration und Invasion (z.B. Vimentin, Matrixmetalloproteinase-2 und der Chemokinrezeptor CXCR4) als auch als Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien maligner Tumore (Denko, 2008; Semenza, 2003). Hypoxie erhöht außerdem die genetische Instabilität in Tumorzellen z.B. durch Hemmung von DNA Reparaturgenen. So ist die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  ein entscheidendes Merkmal verschiedener Tumorentitäten (Glioblastome, Bronchial-, Mamma- und kolorektale Karzinome) und nimmt Einfluss auf die Aktivierung von Onkogenen (RAS) oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (PTEN). EGFR Zugewinne und PTEN Verluste, welche bei primären Glioblastomen häufig vorkommen, erhöhen HIF1 $\alpha$ - Level (Zhong et al., 1999; Zundel et al., 2000). Darüber hinaus induziert HIF-1 $\alpha$  hypoxievermittelt eine Reihe von miRNAs, wobei insbesondere eine Assoziation zwischen der Expression von miR210 unter Hypoxie nachgewiesen wurde (Gee, Ivan, Calin, & Ivan, 2014). Bei Gliomen, insbesondere beim Glioblastom konnte eine strenge Korrelation zwischen der HIF-1 $\alpha$  Expression, dem Tumorgrad und der Tumolvaskularisation nachgewiesen werden (Zagzag et al., 2000).

HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer labilen sauerstoffabhängig regulierten  $\alpha$ -Untereinheit und aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit besteht, wobei 1995 die Klonierung der  $\beta$ -Untereinheit durch Wang und Semenza zeigte, dass diese bereits bekannt war und als aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) bezeichnet wurde. Beide Transkriptionsfaktoren besitzen an ihren aminoterminalen Enden eine bHLH (basic helix-loop-helix) sowie eine PAS-Domäne (PER/ ARNT/ SIM), bestehend aus den Untereinheiten PAS-A und PAS-B. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist spezifisch für das HIF-1 $\alpha$  Heterodimer, wohingegen HIF-1 $\beta$  auch mit weiteren Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS-Familie dimerisieren kann. Die bHLH und PAS-Region sind für die Heterodimerisierung zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit und für die DNA-Bindung der Zielgene verantwortlich (Jiang, Rue, Wang, Roe, & Semenza, 1996; Semenza,

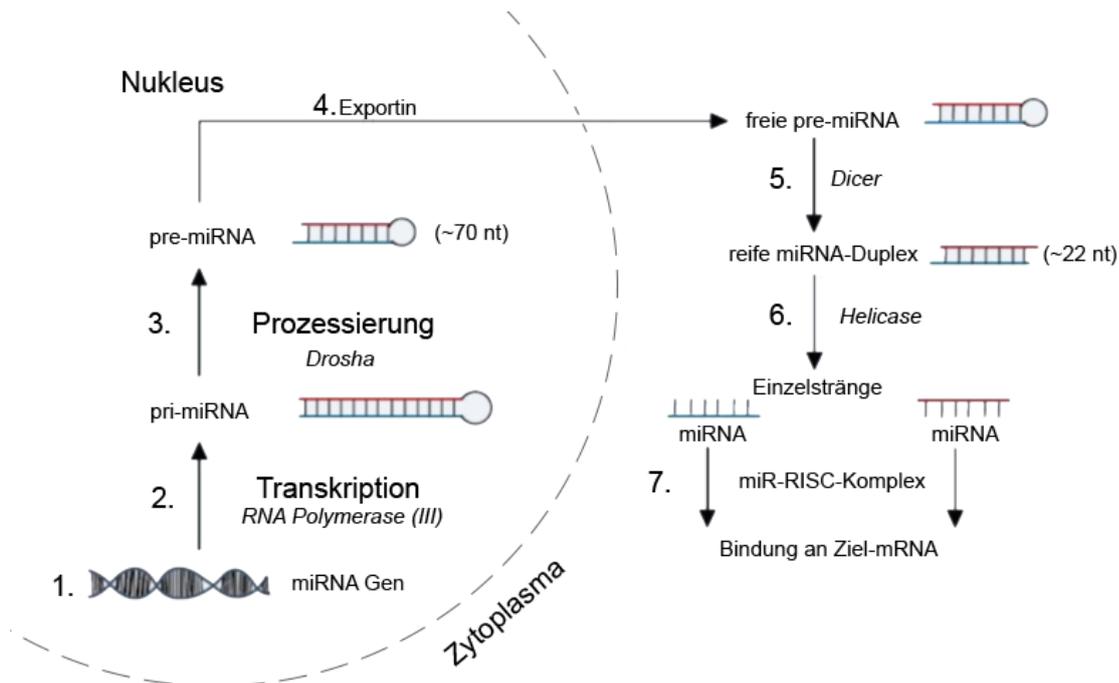
2003). HIF-1 $\alpha$  besitzt zusätzlich eine C- und eine N-terminale Transaktivations-Domäne (TAD-C und TAD-N), die durch eine Inhibitions-Domäne verbunden sind. Die TAD-N ist Teil der ODD-(oxygen dependent degradation) Domäne, während die TAD-C als Zielregion für die post-translationale Modifikation der Phosphorylierung oder Acetylierung dient und zuletzt mit Koaktivatoren wie p300/CBP interagiert, was zur transkriptionellen Aktivierung von HIF führt (Arany et al., 1996; Lando, Peet, Whelan, Gorman, & Whitelaw, 2002). HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  verfügen trotz struktureller Ähnlichkeiten über unterschiedliche Regulationsmechanismen und Zielgene (Loboda, Jozkowicz, & Dulak, 2012).

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 hängt von der durch Hypoxie bedingten Stabilisierung seiner Untereinheit HIF-1 $\alpha$  ab. Die  $\beta$ -Untereinheit hingegen wird unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck exprimiert und liegt konstitutiv im Zellkern exprimiert vor, da sie keine ODD-Domäne besitzt. Dies bedeutet, dass das HIF-1 $\alpha$  Protein synthetisiert und unter Normoxie sofort über eine Ubiquitin-/Proteasom-Degradationskaskade, vermittelt durch ein Genprodukt des Tumorsuppressorgens von Hippel-Lindau (pVHL) mit einer der kürzesten Halbwertszeiten aller zellulären Proteine in weniger als 5 Minuten ubiquitiniert und anschließend abgebaut wird. Unter hypoxischen Bedingungen ist HIF-1 $\alpha$  stabil (Salceda & Caro, 1997; Semenza, 2008). Die Bindung zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem pVHL bedarf der post-translationalen Hydroxylierung zweier Prolin-Reste (Pro-402 und Pro-564), die sich innerhalb des Polypeptid-Segmentes bekannt als ODD- (oxygen dependent degradation) Domäne von HIF-1 $\alpha$  befinden. Diese Hydroxylierungsreaktion wird durch das Enzym Prolylhydroxylase (PHD), auch HIF Prolylhydroxylase (HPH) genannt, unterhalten und benötigt Sauerstoff, Ascorbat und 2-Oxoglutarat als Substrat. Prolylhydroxylasen gehören zur Familie der Dioxygenasen. Es wurden drei homologe HIF-Prolylhydroxylasen (PHD-1,-2,-3) beschrieben und als Sauerstoffsensoren identifiziert (Ivan et al., 2002). Ascorbinsäure dient durch die antioxidative Wirkung der Reduktion. Prolylhydroxylasen benötigen Eisen als Kofaktor. PHD-1 befindet sich ausschließlich im Zellkern, PHD-2 überwiegend im Zytoplasma und PHD-3 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. PHD-2 ist das wichtigste Enzym für die Degradierung von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen (Berra et al., 2003). Bei Abnahme des zellulären Sauerstoffpartialdruckes verringert sich die HIF-1 $\alpha$  Hydroxylierung. Das Protein stabilisiert, transloziert in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 $\beta$  und der daraus resultierende HIF-1-Komplex bindet an eine spezifische Basensequenz des HRE (hypoxia responsive element), welches bei vielen hypoxie-adaptiven Genen in der Promotorregion vorhanden ist. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene. Ein zweiter Weg der Degradation von HIF-1 $\alpha$  erfolgt über die Hydroxylierung

durch HIF-Asparaginyl-Hydroxylase factor-inhibiting-HIF (FIH). Die Hydroxylierung eines Asparaginrestes von HIF-1 $\alpha$  bewirkt die Blockierung der Interaktion zwischen HIF-1 und dem Ko-Aktivator CBP/p300 unter normoxischen Bedingungen. Ebenso wie die Prolylhydroxylasen ist FIH-1 sowohl Eisen- als auch 2-Oxoglutarat-abhängig. Ascorbinsäure wird auch hier benötigt, um eine spontane Oxidation von Fe<sup>2+</sup> zu verhindern. HIF-1 $\alpha$ - und HIF-1 $\beta$  werden ubiquitär im Gewebe vieler Spezies exprimiert. Über eine lange Zeitspanne dominierten hypoxieinduzierbare Faktoren (HIF's) in der Hypoxieforschung. In den letzten Jahren lieferten die Entdeckungen hochregulierter miRNA's in hypoxischen Gewebearealen (solides Tumorgewebe, infarziertes Myokard chirurgische Wunden) neue Aspekte bezüglich des Zellüberlebens (Y. C. Chan, Banerjee, Choi, & Sen, 2012; Fasanaro et al., 2008; Huang, Le, & Giaccia, 2010; Zhang et al., 2009).

### **1.5. Die Bedeutung von MicroRNA's im Rahmen von Tumorerkrankungen**

Micro RNA's sind nicht-Proteinkodierende RNA's (bestehend aus 17-25 Nukleotiden), welche die Genexpression posttranskriptional beeinflussen (Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008). Die erste miRNA, lin-4 wurde 1993 im Fadenwurm *C.elegans* entdeckt (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Im Jahr 2001 wurde erstmals die Bezeichnung miRNA verwendet (Ruvkun, 2001). Bis zum Jahre 2012 wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mehrere Hundert miRNA's nachgewiesen (Lagos-Quintana, Rauhut, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Lau, Lim, Weinstein, & Bartel, 2001; R. C. Lee & Ambros, 2001). Das Ziel einer miRNA ist immer eine mRNA. MiRNA's sind in ihrer Basensequenz vollständig oder zu einem Teil komplementär zu einer mRNA und können sich an eine mRNA anlagern. An eine mRNA können sich wiederum mehrere miRNA's anlagern. Micro-RNAs stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen DNA, mRNA und Proteinbiosynthese dar. Von der Transkription der miRNA bis zur Entstehung der reifen miRNA erfolgen mehrere Zwischenschritte (Biogenese der miRNA Abb 1.7.).



**Abbildung 1.7 MicroRNA Biogenese.** miRNA Gene werden von der RNA-Polymerase III zur pri-miRNA transkribiert. Durch die RNase III Drosha wird die pri-miRNA zur 60-70bp langen pre-miRNA prozessiert und durch Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Durch das RNaseIII Enzym Dicer wird die pre-miRNA in eine 18-24bp lange Duplex-miRNA geschnitten. Nach Entwindung und Trennung wird die reife, einzelsträngige miRNA in den RISC eingebaut und kann an ihre Zieltranskripte binden. Durch den RISC Komplex kann die Aktivität der Zielgene über unterschiedliche Methoden herunterreguliert werden. Dies ist abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen der miRNA und der mRNA des Zielgens, sowie von RNA Bindeproteinen der Argonaut-Familie. Bei teilweiser Übereinstimmung der Bindesequenz wird die Translation durch Bindung gehemmt, bei hoher Komplementarität wird die Ziel mRNA zerschnitten. Pri-miRNA = primäre miRNA, pre-miRNA = Vorläufer miRNA, RISC = RNA induzierender Stilllegungskomplex.

MiRNA's sind endogene RNAs, die mittels RNA-Polymerase III als lange primäre miRNA (pri-MiRNA) Transkripte mit 5'-Cap Struktur und polyA-Schwänzen synthetisiert werden (Y. Lee et al., 2004). Teilweise liegen miRNA's in Clustern angeordnet vor und werden als Polycistron transkribiert (Y. Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002), während etwa 40% der miRNA's in den Introns proteinkodierender Gene lokalisiert sind und nach dem Spleißen autonom prozessiert werden (Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst, & Bradley, 2004). Pri-miRNA-Transkripte besitzen einen haarnadelartig gefalteten Abschnitt. Dieser Abschnitt wird bei der Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus

dem RNase III Enzym Drosha und dem doppelsträngigen RNA-bindenden Protein Pasha (DGCR8), in die Vorläufer-miRNA (pre-MiRNA) umgesetzt (Y. Lee et al., 2003). Die 60-70nt lange pre-miRNA wird mit Hilfe des Rezeptorproteins RAN-GTP-abhängigen Transporters Exportin-5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA mittels einer weiteren RNase III (Dicer) auf eine 18-24nt lange Duplex dsRNA getrimmt (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Die terminale Haarschleife wird abgetrennt (Knight & Bass, 2001), sodass ein 20-25bp langer Duplex vorliegt. Die thermodynamische Energie des 5'-Endes der miRNA-miRNA\* Duplex ist unterschiedlich und der Strang mit der geringeren Stabilität des 5'-Endes wird in den RNA-induzierten Stilllegungskomplex (RISC) inkorporiert, während der komplementäre miRNA\*-Strang schnell degradiert wird. Reife miRNA's entfalten ihre Wirkung, indem sie den Abbau ihrer Ziel-mRNA forcieren, oder deren Translation hemmen. Wenn man davon ausgeht, dass miRNA circa 30-60% der proteinkodierenden Gene beeinflussen, liegt die Vermutung nahe, dass sich unter diesen Genen auch solche befinden, die eine Rolle bei der Tumorgenese und in zahlreichen anderen biologischen Prozessen wie Gewebemöostase, kardiovaskulären-, neurologischen- und metabolischen Erkrankungen spielen. Aktuelle Studien belegen die kritische Rolle von miRNA's für die Regulierung fundamentaler zellulärer Mechanismen wie Entwicklung, Zellwachstum, Proliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod und Migration (Gee et al., 2014).

An Tumoren konnte gezeigt werden, dass miRNA sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften besitzen (Dang & Myers, 2015). Tumorsuppressive miRNAs, welche in Tumoren herunterreguliert sind, können z.B. pro-tumorigen wirkende mRNA nicht mehr hemmen und die Tumorgenese wird gefördert. Hingegen können andere miRNA's als Onkogene wirken und sind in Tumoren hochreguliert. miRNA's, die eine kausale Rolle entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen in der Karzinomentstehung spielen, werden als Onkomir's bezeichnet (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Die ersten in der Karzinogenese relevanten miRNA's wurden bei der chronisch lymphatischen Leukämie entdeckt (Calin et al., 2002). Hier zeigte sich, dass verglichen mit Normalgewebe oder Lymphozyten, miR15 und miR16 in Blutproben von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie in 68% fehlte oder herunterreguliert war. Die Reduktion von miR15 und miR16 führte zu erhöhten BCL2 Levels und vermehrter tumorigener Wirkung in CLL. Dementsprechend weisen miR15 und miR16 tumorsuppressive Wirkung auf. 2005 konnten von Lu et al. in 334 Tumoren, Zelllinien und nicht malignen Zellen 217 miRNA's analysiert werden, deren Level, verglichen mit nicht malignen Zellen, in Tumoren deutlich reduziert vorlagen (Lu et al., 2005). Bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC), welche in der Standardtherapie mit

Sorafenib behandelt wurden und im Verlauf eine Therapieresistenz entwickelten, konnte ein Zusammenhang von miR122, IGF-1R, RAS/RAF/ERK hergestellt werden (Xu et al., 2016). In Microarray Analysen war die leberspezifische miR122 Expression in Sorafenib resistenten Zellen deutlich reduziert. Die Überexpression von miR122 hingegen machte die toleranten Zellen sensitiv für Sorafenib und führte zur Apoptose.

Die ersten miRNA's in Hypophysenadenomen und Glioblastomen wurden im Jahre 2005 nachgewiesen. In kultivierten Glioblastomzellen führte der Knockdown von miR21 zu einer Aktivierung von Caspasen, was die Apoptoseaktivität steigerte und zum Zelltod führte. Eine Überexpression von miR21 hingegen führte zu einem malignen Phänotyp mit Blockade apoptoserelevanter Gene. Chan et al. konnten deutlich erhöhte miR21 Level in Glioblastomtumorergewebe, Glioblastomzellkulturen und sechs etablierten Zelllinien (A172, U87, U373, LN229, LN428 und LN308) verglichen mit nicht neoplastischem fetalen und adulten Hirngewebe nachweisen (J. A. Chan, Krichevsky, & Kosik, 2005). Mehrere Arbeitsgruppen haben inzwischen unterschiedliche miRNA's in Gliomstammzellen nachgewiesen. So konnten Silber et al. eine reduzierte Expression von miR124 und miR137 in Grad III und Grad IV Gliomen im Vergleich zu Normalgewebe nachweisen. Außerdem induzierte die Transfektion dieser beiden miRNA's in neuronalen Stammzellen und in Gliomstammzelllinien zelluläre Differenzierungsmarker, G1 Zellzyklusarrest und CDK6 Reduktion, was wiederum den tumorsuppressiven Charakter von miR124 und miR137 in Gliomstammzellen unterstreicht. In Glioblastomen konnte eine Reduktion der miR451 in CD133<sup>+</sup> Zellen, eine reduzierte Sphärenbildung und Proliferation in Gliomstammzellen nachgewiesen werden, was die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR451 aufzeigt. Eine interessante Rolle kommt miR34a zu. Die Transfektion in Gliomstammzellen führt zu einer verminderten Expression der Stammzellmarker CD133 und Nestin und einer vermehrten immunhistochemischen Anfärbbarkeit astrozytärer und oligodendroglialer Markerproteine. Die am häufigsten unter hypoxischen Bedingungen exprimierte miRNA ist -miR210- (Y. C. Chan et al., 2012). Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben eine HIF-1 $\alpha$  abhängige miR210 Regulation (Huang et al., 2009; Kelly, Souza, Clish, & Puigserver, 2011; Nakada et al., 2011), wobei die miR210 Expression auch von HIF-2 $\alpha$  beeinflusst wird (McCormick et al., 2013; Zhang et al., 2009). Eine Hochregulation von miR210 konnte in zahlreichen soliden Tumoren wie z.B. Brustkrebs (Foekens et al., 2008; Volinia et al., 2006), Glioblastomen (Malzkorn et al., 2010), Lungentumoren (Cho, Chow, & Au, 2009; Miko et al., 2009), Lymphomen (Lawrie et al., 2008), Melanomen (Satzger et al., 2010), Nierenzell- und Ovarialkarzinomen (Redova et al., 2013; Vaksman et al., 2011), Osteosarkomen (Cai, Lin, Cai, Tang, & Wang, 2013) und Pankreaskarzinomen (Greither et al., 2010; Papaconstantinou et al., 2013; J. Wang et al., 2009) nachgewiesen werden. In

Brustkrebs, Kopf-Hals und kolorektalen Tumoren konnte ein Zusammenhang zwischen Hypoxie, miR210 Expression und ungünstiger Prognose nachgewiesen werden (Camps et al., 2008; Gee et al., 2010). So ging eine erhöhte miR210 Expression im Serum von Patienten mit kolorektalen Tumoren mit einer ungünstigen Prognose einher (Qu et al., 2014).

Unterschiedliche Arbeitsgruppen kommen letztlich zum dem Schluss, dass eine veränderte miR210 Expression, abhängig vom zellulären Kontext, die Apoptoseempfindlichkeit fördert oder hemmt (Fasanaro et al., 2008; Yang et al., 2012). Im hellzelligen Nierenkarzinom geht eine erhöhte miR210 Expression beispielsweise mit einem günstigen Verlauf einher (McCormick et al., 2013). Tagscherer et al. konnte in Übereinstimmung zu anderen Arbeitsgruppen außerdem zeigen, dass die anti-tumorigene Wirkung von miR210 durch Abnahme der Proliferation und Zunahme von Zellen in der G2 Phase des Zellzyklus überwiegt. Insgesamt geht die erhöhte Expression von miR210 in den meisten malignen Tumoren aber mit einer schlechten Prognose einher (Qiu et al., 2013). So liegen in der Literatur also gegensätzliche Ergebnisse darüber vor, ob miRNA210 eher als positiver oder negativer prognostischer Biomarker fungiert. Die häufigsten Techniken zum Nachweis von miRNA´s sind Mikroarrays und Echtzeit-(RT)-PCR.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Experimente humane primäre Glioblastomzellen aus Tumorgewebe gewonnen (Tierversuchsantrag Regierungspräsidium Darmstadt v54-19c20/15-F42/1 und V54-19 c 20/15 F 42/13; „Kontrolle von CSC durch Angiogenese und Hypoxie“) und in Kultur gebracht.

## 2. Material-Methoden

### 2.1. Materialien

Im Folgenden sind Geräte sowie Materialien, Chemikalien, Lösungen und Puffer und Primär- und Sekundärantikörper alphabetisch aufgelistet.

#### 2.1.1. Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Zytozentrifuge	Tharmac Spin CS2R	Tharmac
DAKO Cytomation Pen	#2002	DAKO
Dampfgarer		Braun
Einmalhandschuhe		Hartmann-Heidenheim
Einmalpasteurpipetten		Hartmann-Heidenheim
Eppendorf Röhrchen		Eppendorf
Falcon Röhrchen (15ml, 50ml)	Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Feuchte Kammer		
Fluoreszenzmikroskop	DM 2000	Leica Wetzlar
Glasgeräte (Bechergläser, Kolben, Küvetten, Messzylinder)		
Kamera	DFC 450 C	Leica Wetzlar
Kryoboxen		
Kühlschrank 4°/-11°		Bosch
Magnetrührer	Yellow line	
Mikroskop	Eclipse	Nikon
Mikrotestplatten		Thermo scientific
Mikrotom	SM 2010R	Leica
Objektträger	Superfrost	Thermo

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Pinzetten		Sarstedt Nürnberg
Pipettenspitzen		Eppendorf
Scalpell		Braun
Vortex		
Wärmeschrank		Medite
Wippschüttler	Titramax 101	Heidolf Titramax
Zentrifuge	Universal 30 RF	Hettich

Tabelle 2.1 Geräte und Arbeitsmaterial

### 2.1.2. Chemikalien

Lösungsmittel sowie Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Germany) und Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Chemikalien	Hersteller
4',6-Diamidin-2-Phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Thermo Fischer Scientific
7-Actinoaminomycin D (7-AAD)	#559925
Accutase	Sigma #6964
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen)
BSA	
Compensation beads	#552843
Deoxyribonuklease I	#D4527-20KU
Eosin	K. Roth Karlsruhe
Ethanol (70%, 96%, 100%)	Apotheke UKGM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	B. Braun (Melsungen)
Hämalaun nach Mayer	Apotheke UKGM

Chemikalien	Hersteller
IgG Normal Maus	Invitrogen #10400C
Ketamin	
Kryoprotektionlösung	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Braun (Melsungen)
NaCl	Braun (Melsungen)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Braun (Melsungen)
Normales Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH, # B11-035,
OneComp e Beads	eBiosciences, #01-1111-42
Paraformaldehyd (PFA) 4%	
Sucrose 3%	Karl Roth (Karlsruhe)
SYTOX in DMSO	Invitrogen, #S11348
Tissue-Tek®	Firma Sakura, Zoeterwouden, Niederlande
TO-PRO3	Invitrogen
Triton X-100	Serva
Trockeneis	Apotheke
Xylazin	

Tabelle 2.2. Chemikalien

### 2.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung	pH
Blocking Puffer	PBS/10% NGS+0,1%TX-100	
Borat Puffer 0,1M	3,8g di-Natrium tetraborat decahydrat (MW381,4)/100ml Wasser	8,5
Citrat Puffer 0,01M	1,47g tri-natrium citrat (MW294,1) in 500ml Wasser/ 1M HCL/DCS	6
EDTA	1,21g Trise-Base (10mM), 0,37g EDTA (1mM), auffüllen bis 1000ml mit Aqua dest	8

Puffer/Lösung	Herstellung	pH
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) PBS		
Inkubationspuffer	20% NGS/1xPBS/0,1%TX-100	
Kryoprotectionlösung	500ml 0,1M PB pH 7,4, 250ml Ethylenglycol, 250ml Glycerin	
PFA 4%	4g in 100ml PBS (Phosphatpuffer in Kochsalzlösung), pH7,4	
Sucrose	30% Sucrose in 0,1M PB	
Waschpuffer (1%TritonX- 100 in 1x PBS)	1gTX-100/100ml PBS	7,4

**Tabelle 2.3. Puffer und Lösungen**

#### **Ansetzen von Gebrauchslösung (1xPBS) 1000ml**

Aqua dest. + Stammlösung (10x) ->1000ml Gebrauchslösung

900ml+100ml=1000ml. Den pH Wert einstellen auf pH 7,4.

#### **Ansetzen von Stammlösung (10x PBS; Phosphatpuffer in Kochsalzlösung)**

pH 7,4, 1.3 M NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH mit NaOH einstellen

für	500 ml	1000 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2,6g	5,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	6,22g	12,44g
NaCL	38,0g	76g

**Tabelle 2.4. Ansetzen von Stammlösung**

#### **Ansetzen von Triton X/ 0,01% Waschlösung (2000ml)**

Zuerst 0,2g TX-100 + 1800ml Aqua dest. + 200ml Stammlösung (10xPBS; Phosphatpuffer in Salzlösung). Den pH Wert einstellen auf pH 7,

## **2.1.4. Antikörper**

### **2.1.4.1. Primärantikörper (IF)**

**Monoklonal Maus Anti Endomucin** Klon V.7C7, Bioscience

**Monoklonal Maus Anti Bromodeoxyuridine** Klon Bu20a, DakoZytomation M0744

**Polyklonal Kaninchen Anti Carboanhydrase IX** Novus Biologicals ,100-4171

**Polyklonal Kaninchen Anti HIF1 $\alpha$**  Cayman Chemical, Nr.10006421

**Polyklonal Kaninchen Anti CD133 (Prominin 1)** Sigma Aldrich Nr. 9493

**Polyklonal Kaninchen Anti Phospho Histon** Bethyl Lab #IHC00061

**TUNEL ApopTag Detektion Kit** Millipore S7165

**293C3-APC (CD133/2)** Miltenyi #130-090-854

### **2.1.4.2. Sekundärantikörper**

**Alexa Fluor 568 Ziege Anti Maus IgG (IF)** Invitrogen #11004

**Alexa Fluor 568 Ziege Anti Ratte IgG (IF)** Invitrogen #11077

**Alexa-Fluor 568 Ziege Anti Kaninchen IgG (IF)** Invitrogen #11011

**Maus IgG2b-APC** Miltenyi ,130-092-217

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Arbeiten mit DNA, Proteinen und Zellen**

#### **2.2.1.1. Herstellung lentiviraler Partikel**

Die lentiviralen Partikel zur Generierung der stabilen microRNA210 Knockdown-, bzw. Überexpressionszelllinien wurden mit Hilfe der lentiviralen Verpackungsplasmide pMD2.VSV-G (ENV-Plasmid) und pCM8.91 (core-packaging Plasmid) hergestellt. Die verwendeten microRNA Plasmide (pmiRZIP000, knockdown Kontrolle; pmiRZIP210, microRNA210 antisense Sequenz; pCDH-CMV-MCS-EF1copGFP, Überexpressionskontrolle; pMIRNA1-210, microRNA210-Precursor exprimierendes Plasmid) wurden über SBI System Biosciences bezogen.

Für die Herstellung der Viren wurden 24 Stunden vor der Transfektion  $4 \times 10^6$  293T-HEK Zellen in T-75-Zellkulturflaschen mit DMEM- Vollmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium zwei Stunden vor der geplanten Transfektion durch 6 ml antibiotika-freies Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden 500 µl OPTI-MEM Medium mit 4,875 µg pCM8.91 und 2,625 µg pMD2.VSV-G, sowie 7,5 µg des jeweiligen microRNA Konstrukts versetzt und mit 45 µl FuGENE HD Transfektionsreagenz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die 293T HEK Zellen aufgebracht. Am folgenden Tag wurden 4 ml DMEM mit 10% FCS zugegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der mit Lentiviren angereicherte Überstand abgenommen und zum Entfernen etwaiger Zelltrümmer mithilfe eines 0,45 µm Filters filtriert. Zur Aufkonzentration der Viren wurde anschließend für 2 Stunden eine Ultrazentrifugation bei 4°C und 55000g durchgeführt, der Überstand verworfen und die Viren in 100 µl DMEM-F12 resuspendiert. Die Viren wurden bis zur weiteren Verwendung in 10 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung des Virus Titer wurden 24h vor der Infektion  $3 \times 10^4$  G55TL Zellen pro well in einer 24-well-Platte ausgesät und die Titerung unter Zugabe von 8 µg/µl Polybrene gemäß der Anleitung des Herstellers (siehe Trans-Lentiviral shRNA Bulk Packaging System, Open Biosystems) durchgeführt. Die transduzierten Zellkolonien wurden mit Hilfe der Expression von GFP fluoreszenzmikroskopisch gezählt und der Virus Titer bestimmt.

#### **2.2.1.2. Generierung stabiler Zelllinien**

Für die Generierung stabiler Zelllinien wurden 24 Stunden vor der Transduktion  $5 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well-Platten auf Laminin ausgesät. Für die Transduktion wurde das Zellkulturmedium durch 800 µl DMEM-F12 mit 8 µg/µl Polybrene ersetzt und die Entsprechende Menge an Virus mit einer Multiplicity of Infection (MOI) von 5 (5 Virenpartikel pro Zelle) zugegeben. Nach acht Stunden wurde das Medium durch 2 ml Tumorsphärenmedium ersetzt und die Zellen für weitere 48 Stunden auf Laminin kultiviert. Hiernach wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C mit Accutase inkubiert, um sie vom Laminin zu lösen und anschließend in eine Sphären-Kultur überführt.

#### **2.2.1.3. Proteinextraktion und Western Blot Analyse**

Die unter Normoxie und/oder Hypoxie kultivierten primären Glioblastomzelllinien wurden für die Proteinextraktion auf Eis in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C für eine Minute bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sphären auf Eis mit Laemmli Puffer lysiert. Das Proteinlysate wurde anschließend für 60 Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin SonoPlus) homogenisiert und für 5

Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend kalorimetrisch mit Hilfe der Lowry Methode auf einem Mikroplattenleser (Berthold TriStar LB941) bestimmt und die Proteinextrakte einer Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen.

Während der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die negativ geladenen Proteine wandern hierbei durch ein graduiertes, 8-12 prozentiges Polyacrylamidgel zur Anode und verteilen sich größenabhängig im Gel. Die polymerisierten Gele werden hierbei in einem Laufpuffer in eine Elektrophoresekammer eingespannt und 40 µg des Proteinlysats in Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich zu den Proteinproben wird zur Größenbestimmung ein farbig markierter Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 90 Minuten bei einer angelegten Spannung von 100V durchgeführt. Die separierten Proteine im Acrylamidgel wurden anschließend durch das Anlegen einer positiven Spannung auf eine PVDF Membran übertragen und unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit einer 5% Milchpulverlösung blockiert. Der Nachweis der Proteinbanden auf der PVDF Membran erfolgte über Nacht bei 4°C mit spezifischen Antikörpern gegen die zu detektierenden Proteine, sowie einem Antikörper gegen Tubulin, der als Ladekontrolle eingesetzt wurde. Die spezifischen Antikörper binden hierbei an das zu detektierende Protein, während ein anschließend eingesetzter, mit einer Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase; HRP) konjugierter Zweitantikörper an die jeweiligen Erstantikörper bindet und hiernach mit Hilfe einer durch die Peroxidase vermittelten Chemilumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

#### **2.2.1.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Die quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht eine exakte Quantifizierung von spezifischen PCR- Produkten mithilfe der Detektion von Fluoreszenzsignalen, die mit der Bildung doppelsträngiger PCR Produkte einhergehen. Hierbei wird in der PCR Reaktion ein in DNA doppelsträngiger interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR Green) eingesetzt, dessen Fluoreszenzsignal analog zur zunehmenden Anzahl der PCR Produkte ansteigt. Die PCR Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit dem Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) in einem StepOnePlus System (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei für die Reaktion 4 µl cDNA (5 ng/µl) und 200nM forward- (fw) und reverse (rev) Primer eingesetzt wurden. Alle Analysen wurden im Triplet durchgeföhrt.

Die Reaktionsbedingungen lauteten dabei wie folgt:

Reaktionsablauf	°C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Enzym Aktivierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	45
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Denaturierung	95°C	1 min	1
Annealing/Elongation	60°C	1 min	1
Schmelzkurve	55°C	15 sec	0,5°C schrittweiser Temperaturanstieg auf 95°C
Ende	4°C	∞	

**Tabelle 2.5. qPCR Programm für die SYBR Green Methode**

Die Quantifizierung der PCR Produkte erfolgt hierbei über eine softwareunterstützte Berechnung des Fluoreszenzsignals, bei der die Signalintensität den zehnfachen Wert des Grundsignals überschreitet, was als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle, Ct) für das jeweilige Primer-Paar angegeben wird. Mithilfe des Ct-Wertes des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) und dem Ct-Wert eines, im gleichen Ansatz amplifizierten, unregulierten Haushaltsgens (housekeeping gene, HKG) kann nun anhand der  $\Delta\Delta Ct$  Methode (Pfaffl, Nucleic Acids Research 2001) die relative Expression des zu untersuchenden Zielgens bestimmt werden. Mithilfe der aufgezeichneten Schmelzkurve der PCR Produkte, in der Primer-Dimere und unspezifische Reaktionsprodukte dargestellt werden, kann die Qualität der PCR Reaktion kontrolliert werden.

#### 2.2.1.5. Zytospins- Gewebeaufbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Experimente humane primäre Glioblastomzellen aus Tumorgewebe gewonnen (Tierversuchsantrag Regierungspräsidium Darmstadt v54-19c20/15-F42/1 und V54-19 c 20/15 F 42/13; „Kontrolle von CSC durch Angiogenese und Hypoxie“) und in Kultur gebracht (Seidel, Garvalov, & Acker, 2015). Für die im Anschluß durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurden 300.000 primäre Glioblastomzellen pro well in eine 6 well Platte ausgesät und 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen in Tumorsphären Kulturmedium (TSM) mit je 20ng/ml EGF und bFGF inkubiert. Für die hypoxischen

Bedingungen wurden die entsprechenden Proben anschliessend für 96 Stunden unter Hypoxie (1% Sauerstoff) kultiviert, während die Kontrollen weiter unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden. Anschliessend wurden die Zellen mit Hilfe eines Enzymgemischs (Accutase) separiert, mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von 50.000/mL eingestellt. Die Zellzahl wurde mit dem CASY Zell-Zählgerät und Analyse System Model TT ermittelt (Roche Diagnostics GmbH # 05651697001). Über elektronische Impulse wurden Größe, Verteilung und Zellfunktionsfähigkeit der Probe analysiert. Vor der Zählung wurden 100µl Zellsuspension in 10 ml CASY Lösung (Roche Diagnostics GmbH # 05651808001) verdünnt und die Analyse entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die Zellen wurden 4 bzw. 5 Minuten mit 800 bzw. 900 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert. Pro Objektträger wurden 500µl verwendet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Objektträger getrocknet und anschliessend gefärbt (s. Immunfluoreszenzfärbungen an Zytospins 2.2.3.1-2.2.3.5.)

## **2.2.2. Grundlagen der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie macht sich die spezifische Bindung von Antikörpern, die gegen bestimmte Gewebs- bzw. Zellantigene gerichtet sind, zunutze. Dabei werden meist mehrere Antikörper nacheinander verwendet. Der Primärantikörper ist gegen das darzustellende Antigen (z. B. Phospho-Histon H3) gerichtet. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das Fc-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. Zum Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen wurde bei allen Immunfluoreszenzfärbungen eine Negativkontrolle (indem man bei der Färbung auf den Primärantikörper verzichtete), verwendet. Alle anderen Färbeschritte liefen dabei in analoger Weise ab. Dabei zeigte sich bei den Negativkontrollen keine spezifische Färbereaktion. Eine unspezifische Anfärbung durch die übrigen Reagenzien war folglich ausgeschlossen.

### 2.2.3. Färbungen an Zytospins

Die folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden an Zytospins durchgeführt:

Färbung	Darstellung	Seite
BrdU	Proliferation	37
CD133	Tumorstammzellen	38
Phospho-Histon H3	Proliferation	39
TUNEL	Apoptotische Zellen	40
DAPI	Kernfärbung	40

**Tabelle 2.6. Färbungen an Zytospins**

Für die Färbungen an Zytospins wurden Gebrauchs-, Stamm- und Waschlösungen, wie unter 2.1.3. in Material und Methoden beschrieben, angesetzt. Die statistischen Auswertungen der an Zytospins durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten analog der Beschreibung (Statistische Auswertung 2.2.7.).

#### 2.2.3.1. BrdU Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung proliferierender Zellen wurde eine Färbung gegen BrdU (Monoklonal Maus Anti Bromodeoxyuridine Klon Bu20a, DakoZytomation M0744) in einer Verdünnung von 1:200 durchgeführt. BrdU ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es entsteht durch Verbindung von Desoxyribose mit der Nucleobase 5-Bromuracil. BrdU kann von der Zelle aufgenommen werden und in phosphorylierter Form anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S- Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA als Markierung eingebaut werden, um die Zellproliferation (anhand einer Immunfluoreszenzfärbung in Form eines nukleären Färbesignals) zu messen. Für die Bindung des Antikörpers ist eine Denaturierung der DNA im Sinne einer Vorbehandlung mit Säure und Hitze notwendig. BrdU kann Mutationen auslösen. Für die BrdU Färbung wurden 300.000 primäre Glioblastomzellen pro well in eine 6 well Platte ausgesät und 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen in Tumorsphären Kulturmedium (TSM) mit je 20ng/ml EGF und FGF inkubiert. Für die hypoxischen Bedingungen wurden die entsprechenden Proben anschliessend für 96 Stunden unter Hypoxie (1% Sauerstoff) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Enzymgemischs (Accutase) separiert, mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von 50.000/mL eingestellt. Die Zellen wurden mit BrdU in einer Konzentration von 10µM für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, mit PBS

gewaschen und für 10 Minuten auf Eis mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem waschen mit PBS wurde die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in PBS gelagert. Die 4°C PBS asservierten Zellen wurden 8 Minuten bei 800 Runden pro Minute zentrifugiert, die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und vor dem Färben für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd nachfixiert und anschliessend 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Zytospins in 0,01M Citratpuffer (pH 6.0) 5 Minuten in einem Dampfgarer (Braun) gekocht und danach 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Objektträger wurden 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 2N Salzsäure um die BrdU markierte DNA im Zellkern zu denaturieren und für die Antikörpermarkierung zugänglich zu machen. Die Objektträger wurden zur Neutralisation 2 mal 5 Minuten in 0,1M frisch angesetzten Boratpuffer (s. 2.1.3 Tabelle Puffer und Lösungen) gegeben. Danach wurden die Zytospins 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen und eine Stunde in 20% normalem Ziegen Serum/PBS geblockt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Monoklonal Maus Anti Bromodeoxyuridine Klon Bu20a, DakoZytomation M0744) in einer Verdünnung von 1:200 in 10% normalem Ziegen Serum/PBS über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zytospins 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und anschliessend eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 568 Ziege Anti Maus Invitrogen #11004) in einer Verdünnung von 1:500 in 10% normalem Ziegen Serum/PBS inkubiert. Der verdünnte Antikörper wurde, um Präzipitate zu vermeiden, eine Minute mit 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurden die Zytospins 3 mal 2 Minuten mit PBS gewaschen, 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (1:5000, Thermo Fischer Scientific) gefärbt, 2 mal 5 Minuten in PBS sowie 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und feucht mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2000). Jedem Fluoreszenzbild wurde eine korrespondierende DAPI Aufnahme zugeordnet. Es wurden jeweils 15 Bilder pro Bedingung aufgenommen und BrdU positive Zellen (%) quantitativ bestimmt.

### **2.2.3.2. CD133 Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung von Tumorstammzellen haben wir an Zytospins eine Färbung mit dem Tumorstammzellmarker CD133 (Polyklonal Kaninchen Anti CD133 (Prominin 1); Sigma Aldrich Nr. 9493) durchgeführt. Die Zytospins wurden in einer Küvette mit PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung 10 Minuten in 0,01M Citrat Puffer (pH 6.0) in einem Dampfgarer (Braun) gekocht. Danach wurden die Objektträger 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und in 0,01% Triton X-100/ PBS 3 mal 5 Minuten gewaschen. Die Zytospins wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in 20% normalem

Ziegenerum/ 0,1% Triton X-100/PBS geblockt und zwei Stunden mit dem Primärantikörper (Polyklonal Kaninchen Anti CD133 (Prominin 1) Sigma Aldrich Nr. 9493) in einer Verdünnung von 1:250 (10% normales Ziegenerum/ 0,1% Triton X-100/PBS) inkubiert. Danach wurden die Zytospins 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen; Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur in 10% normalem Ziegenerum/ 0,01% Triton X-100/ PBS inkubiert. Der verdünnte Sekundärantikörper wurde, um ein Ausflocken zu vermeiden, eine Minute mit 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach folgte ein weiterer Waschschriff von 3 mal 5 Minuten mit PBS. Anschließend wurden die Zellkerne 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (1:5000, Thermo Fischer Scientific) gefärbt. Die Zytospins wurden 2 mal 5 Minuten in PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und feucht mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2000). Jedem Fluoreszenzbild wurde eine korrespondierende DAPI Aufnahme zugeordnet. Es wurden jeweils 10 Bilder pro Bedingung aufgenommen.

### **2.2.3.3. Phospho-Histon H3 Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der Proliferationsrate wurde eine Färbung mit Phospho-Histon-H3 (Polyklonal Kaninchen Anti Phospho Histon; Bethyl Lab #IHC00061) in einer Verdünnung von 1:200 durchgeführt. Die Zellen wurden 1 Minute in PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung 10 Minuten in TE-Puffer (pH 8.0) in einem Dampfgarer (Braun) gekocht und bei Raumtemperatur 20 Minuten abgekühlt. Danach wurden die Zytospins in 0,01% Triton X-100/ PBS 3 mal 5 Minuten gewaschen, eine Stunde bei Raumtemperatur in 20% normalem Ziegenerum/ 0,1% Triton X-100/PBS geblockt und zwei Stunden mit dem Primärantikörper (Polyklonal Kaninchen Anti Phospho Histon; Bethyl Lab #IHC00061) in einer Verdünnung von 1:200 (10% normales Ziegenerum/ 0,1% Triton X-100/ PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen; Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:200 eine Stunde bei Raumtemperatur in 10% normalem Ziegenerum/ 0,01% Triton X-100/ PBS inkubiert. Der verdünnte Sekundärantikörper wurde, um eventuell vorhandene Präzipitate zu eliminieren, vor der Verwendung eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurden die Objektträger 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen, eine Kernfärbung mit DAPI (1:5000, Thermo Fischer Scientific) bei Raumtemperatur über 5 Minuten durchgeführt und die Objektträger wiederum 2 mal 5 Minuten in PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und feucht mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2000). Jedem

Fluoreszenzbild wurde eine korrespondierende DAPI Aufnahme zugeordnet. Es wurden jeweils 10 Bilder pro Bedingung aufgenommen und die Anzahl pHH3 positiver Zellen (%) quantitativ analysiert.

#### **2.2.3.4. TUNEL Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung apoptotischer Zellkerne wurde eine TUNEL Färbung (ApopTag® Red (Fluorescein) in situ – Kit) durchgeführt. Zu Beginn der Färbeprozedur wurden die auf die Objektträger aufgebrachten Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 Minuten fixiert. Danach wurden mit dem DAKO Cytomation PEN® Begrenzungslinien auf die Objektträger aufgebracht, um ein austrocknen der Zellen während der Inkubation zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei -20°C in Ethanol: Essigsäure (2:1) permeabilisiert, 2 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und die überstehende Flüssigkeit auf den Objektträgern mit einer Pasteurpipette abpipettiert. Die Zytospins wurden in einer Feuchtkammer mit Equilibrationspuffer (Komponente im ApopTag® Kit) für 10 Sekunden (75µl Puffer/ pro Objektträger) inkubiert und alle überschüssige Flüssigkeit auf den Objektträgern abpipettiert. Im Anschluss wurden die Zytosins bei 37° C für eine Stunde mit TdT Enzym (Komponente im ApopTag® Kit) (33µl Enzym+77µl Reaktionspuffer/pro Objektträger) inkubiert und die Reaktion hiernach mit Stop / Wasch – Puffer (fertige Komponente im ApopTag® Kit) für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler gestoppt. Nach dreimaligem waschen in PBS (je 5 Minuten) wurden die Zytospins 30 Minuten mit Anti-Digoxigenin-Konjugat (Komponente im ApopTag® Kit; 62µl Konjugat+68µl Blocking Lösung/Objektträger) unter Lichtprotektion bei Raumtemperatur inkubiert, 4x in PBS für je 2 Minuten gewaschen und mit DAPI (Thermo Fischer Scientific) 10 Minuten in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS gefärbt. Danach wurden die Zytospins 5 Minuten in PBS gewaschen und mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023, DAKO) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2000). Jedem Fluoreszenzbild wurde eine korrespondierende DAPI Aufnahme zugeordnet. Es wurden jeweils 19 Bilder pro Bedingung aufgenommen und die Anzahl TUNEL positiver Zellen (%) analysiert.

#### **2.2.3.5. DAPI Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) durchgeführt. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) bindet an zelluläre DNA und kann bei einem bestimmten Absorptionsmaximum mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Je kondensierter das Kernchromatin ist, desto stärker fluoresziert die DNA. Somit treten Kondensationszustände wie Apoptosen, aber auch Mitosen, deutlich in Erscheinung.

#### 2.2.4. FACS Durchflusszytometrische Analysen

Die Zellen wurden, damit sie für die Fluorescence-Activated-Cell-Sorting-Analyse (FACS) einzeln vorliegen, 15 Minuten bei 37°C mit Accutase behandelt. Nach zwei Waschschritten mit FACS Färbepuffer (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) wurden die Zellen 20 Minuten mit 20 µl normalem Maus IgG (Invitrogen) bei 4°C geblockt und anschließend 30 Minuten bei 4°C mit 10 µl CD133/2 (293C3)-APC konjugiertem Antikörper (Miltenyi Biotec #130-090-854) inkubiert. Für entsprechende Isotypkontrollen wurde Maus IgG2b-APC, Miltenyi #130-092-217 verwendet. Fünf Minuten vor der Analyse wurde 1 µl Sytox blau Kernfärbung (Invitrogen) hinzugegeben, um avitale Zellkerne anzufärben, welche von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte an einem FACS Canto II, BD Biosciences während die Datenanalyse CD133 positiver vitaler Einzelzellen mithilfe der spezialisierten Software (FlowJov7/9, Tree Star) vorgenommen wurde.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, mit dessen Hilfe Zellpopulationen anhand unterschiedlicher Zellgröße und –morphologie sowie unterschiedlichem Expressionsmuster von spezifischen Antigenen, die mittels Antikörper markiert werden, innerhalb einer Gesamtpopulation identifiziert und quantifiziert werden können. Für das Messprinzip können entweder Antigene mittels fluorchromgekoppelter Antikörper markiert, fluoreszierende Proteine spezifisch an zelluläre Strukturen gebunden, oder Substrate durch eine chemische Reaktion intrazellulär zu einem fluoreszierenden Molekül umgesetzt werden. Die daraus resultierenden fluoreszenzmarkierten Zellen fließen bei der Messung in hohem Tempo in den Mikrokanal einer Küvette und passieren dabei einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge. Das dabei entstehende Streulicht wird im Vorwärtsstreulicht-Kanal (forward scatter, FSC) als Maß für die Größe der Zelle und im Seitwärtsstreulicht-Kanal (sideward scatter, SSC) als Maß für die Granularität der Zelle ermittelt. Parallel zum Streulicht kommt es durch die laserinduzierte Anregung der fluoreszierenden Moleküle zur Emission von Fluoreszenzsignalen, welche von einem Photomultiplier detektiert werden. Bei allen durchflusszytometrischen Methoden wurden drei Proben pro Bedingung gemessen und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Als Kontrolle diente jeweils eine Probe, die mit einem Fluoreszenzgekoppelten IgG Molekül analog zum spezifischen Antikörper aufgearbeitet wurde.

## **2.2.5. Präparation und Gewebeaufbereitung; Intrakranielles Tumor-Xenograft-Modell**

Für die intrakraniellen Xenograft Modelle wurden die primären Glioblastomzelllinien GBM 046X und etablierte GBM Zelllinien G55 verwendet (S. Seidel). Um die Gehirne zu entnehmen, wurden die Mäuse mit Ketamin anaesthetisiert (250 µl/20g Körpergewicht Ketamin intraperitoneal; auf 2 ml 10% Ketamin) und mit Xylazin, einem Beruhigungsmittel (0.5 ml 2% in 9 ml 0.9% Kochsalz), muskelrelaxiert. Für die intrakardiale Perfusion über den linken Ventrikel wurde der Brustkorb eröffnet und eine 3 minütige kardiale Perfusion mit 0,9% Kochsalzlösung durchgeführt. Danach erfolgte eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 6 Minuten. Anschließend wurde das Gehirn freipräpariert und mit 4% Paraformaldehyd bei 4° C über Nacht postfixiert und anschliessend 4 Tage bei 4°C in 30% Sucrose entwässert (S. Seidel). An einem Schlittenmikrotom (Leica Wetzlar SM2010) wurden Dickschnitte der Gehirne von 20- und 40µm angefertigt. Dabei wurde ein spezieller Aufsatz des Mikrotoms mit Trockeneis heruntergekühlt und mit einer Schicht Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) versehen um eine feste Verbindung zwischen Platte und Gehirn herzustellen. Die Gehirne wurden nach absetzen des Kleinhirns mit dem Occipitalpol aufgefroren. Es wurden nacheinander je 10 Schnitte von 40µm und je 4 Schnitte von 20µm Dicke geschnitten und in aufeinanderfolgende 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, welche zur Asservierung der Hirnschnitte 1,25 ml Kryoprotektionlösung enthielten. Folglich wurden in jedes Röhrchen zwischen 7 und 10 Schnitte mit 480 µm Abstand zueinander asserviert (jeder 12. Schnitt). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Hirnschnitte bei -20° Grad gelagert.

## **2.2.6. Färbungen an Gewebeschnitten**

### **2.2.6.1. Hämatoxylin Färbung**

Von den kryoasservierten Gewebeschnitten wurde zur Darstellung der Morphologie und Berechnung des Tumorumfanges eine komplette Schnittfolge von 40µm Schnittdicke Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Es handelt sich dabei um eine Routinefärbung, welche der Darstellung von Zellkernen und Zytoplasma dient. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalun färbende Eigenschaften entwickelt. Hämalun färbt alle Strukturen mit saurem pH-Wert wie z.B. Zellkerne und Desoxyribonukleinsäure (DNA) blau. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff der alle basischen Strukturen z.B. das Zytoplasma und Mitochondrien rot färbt. Eosin wird zunächst überfärbt und anschließend differenziert. Zu Vorbereitung der Färbung wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur

getrocknet. Vor dem Färben wurden die Gewebeschnitte in einer Glasküvette 2 Minuten mit PBS rehydriert und anschließend kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Dann wurden die Objektträger in eine Glasküvette gestellt und 8 – 10 Minuten in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser gewaschen und 1 Minute bzw. bis zu einem sichtbaren Farbumschlag unter Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 4 Minuten in 1%igem Eosin gefärbt (1%iges Eosin in 70% Ethanol reinst gelöst; 1 Tropfen Eisessig pro 100ml Eosin), in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich mit 2-3 Tropfen Eindeckmedium (Thermo Scientific/Medite) mit einem Deckglas eingedeckt. Nachdem die Schnitte unter dem Abzug getrocknet waren erfolgte die Auswertung.

Das Schema der aufsteigenden Alkoholreihe wie folgt:

Reihenfolge	Substanz	Verweildauer
1	70% Ethanol	30 Sek. bis 1 Min.
2	96% Ethanol	2x 30 Sek. bis 1 Min.
3	100% Ethanol	2x 5 Min.
4	Xylol	2x 5 Min.

**Tabelle 2.7. Schema aufsteigende Alkoholreihe**

Die folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden an kryoasservierten Gewebeschnitten (20µm und 40µm) durchgeführt:

Färbung	Darstellung	Seite
Carboanhydrase IX	Hypoxie	44
CD133	Stammzellmarker	45
Endomucin	Gefäße	46
HIF	Hypoxie	46
Phospho-Histon H3	Proliferation	47
TUNEL	Apoptosen	48
DAPI und TOPRO	Kernfärbung	50

**Tabelle 2.8. Färbungen an Gewebeschnitten**

Für die Färbungen an Gewebeschnitten wurden, wie unter 2.1.3. beschrieben, Gebrauchs-, Stamm- und Waschlösungen angesetzt.

#### **2.2.6.2. Carboanhydrase IX Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung hypoxischer Tumorareale erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Carboanhydrase IX (Polyklonal Kaninchen Anti Carboanhydrase IX; Novus Biologicals ,100-4171) in einer Verdünnung von 1:1000. Zu Beginn wurden die in Kryoprotektionlösung asservierten 40 µm dicken Gewebeschnitte in eine Petrischale mit PBS gegeben. Es wurden jeweils 2-3 Gewebeschnitte pro Gehirn zur Permeabilisation bei Raumtemperatur mit 1% TritonX-100/PBS für eine Stunde in 24-Loch Mikrotiterplatten gegeben. Für die Färbungen wurden nur Gewebeschnitte, die mit bloßem Auge Tumorareale erkennen ließen, ausgewählt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Schnitte eine Stunde in 0,5% TritonX-100/PBS/5% normales Ziegenserum bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Polyklonal Kaninchen Anti Carboanhydrase IX; Novus Biologicals,100-4171) in einer Verdünnung 1:1000 mit Blocking Puffer (0,5% TritonX-100 in PBS/5% normales Ziegenserum) über eine Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst 3 x 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und anschließend 1 x 15 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen; Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocking Puffer über Nacht bei Raumtemperatur. Vor der Verwendung wurde der verdünnte Sekundärantikörper eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert, um eventuell vorhandene Präzipitate zu eliminieren. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach drei weiteren Waschschritten von je 15 min in PBS/0,01% Triton 5 Minuten in PBS mit DAPI (1:5000, Thermo Fischer Scientific) und TO-PRO3 (1:1000, Invitrogen) gefärbt (10 Minuten), 3 mal 5 Minuten in PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023;Dako) eingedeckt. Zur quantitativen Analyse (s. statistische Auswertung 2.2.7) hypoxischer Tumorareale wurde jeder DAPI Aufnahme ein immunfluoreszenzgefärbtes Bild zugeordnet. Pro Tumor wurden 10 Aufnahmen angefertigt. Alle Bilder enthielten ausschließlich Tumorgewebe. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J wurden mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Threshold) alle CAIX-positiven Areale dargestellt. Fehlmarkierungen aufgrund von Artefakten oder farblichen Schwankungen wurden manuell korrigiert.

### 2.2.6.3. CD133 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung von Tumorstammzellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD133 (Polyklonal Kaninchen Anti CD133 (Prominin 1); Sigma Aldrich Nr. 9493) in einer Verdünnung von 1:100 und 1:250 durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden auf Superfrost Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Gewebeschnitte mit DAKO Cytomation PEN® eingekreist. Zur Antigendemaskierung wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten in PBS rehydriert, zehn Minuten in Citratpuffer (0,01M pH6.0; 1.47 g Tri-Natrium Citrat/500ml destilliertes Wasser) im Dampfgarer (Braun) erhitzt und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt (Der Puffer wurde jeweils vor der Inkubation 20 min gekocht). Danach wurden die Gewebeschnitte 15 Minuten in 0,01%Tx-100/PBS gewaschen, eine Stunde mit 0,1% Tx-100 in PBS und anschließend zwei Stunden mit 0,1% Tx-100/PBS/20% normalem Ziegenserum geblockt. Anschließend wurden die Schnitte mit zwei verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:250) des Primärantikörpers (Polyklonal Kaninchen Anti CD133 (Prominin 1); Sigma Aldrich Nr. 9493) in Blockingpuffer (0,1%Tx-100 in PBS/10% normales Ziegenserum) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton gewaschen. Danach erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen; Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocking Puffer (0,1% TritonX-100 in PBS/10%normales Ziegenserum) bei Raumtemperatur. Um Präzipitate zu vermeiden, wurde der verdünnte Sekundärantikörper vor der Inkubation eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und 15 Minuten in PBS gewaschen. Zur Darstellung der Kerne wurden die Gewebeschnitte mit DAPI (Thermo Fischer Scientific) gefärbt. Die Inkubation erfolgte 10 Minuten in einer Verdünnung von 1:5000. Anschließend wurden die Schnitte 2 mal 5 Minuten mit PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und feucht mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Zur quantitativen Berechnung (s. statistische Auswertung 2.2.7) CD133 positiver Zellen *in vivo* wurden 10 Bilder pro Tumor (Regionen, welche ausschließlich Tumor enthielten) mit einer Software (ImageJ) analysiert. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm wurden mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Threshold) alle membranös mit CD133 Antikörper angefärbten Zellen dargestellt und quantitativ analysiert. Fehlmarkierungen aufgrund von Artefakten oder farblicher Schwankungen wurden manuell korrigiert.

#### **2.2.6.4. Endomucin Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der Blutgefäße an Gewebeschnitten erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Endomucin (Monoklonal Anti Maus Endomucin Klon V.7C7, Bioscience) in einer Verdünnung von 1:500. Am ersten der vier Färbetage wurden die in Kryoprotektionlösung asservierten 40 µm dicken Schnitte in eine Petrischale und für die Permeabilisation (1% TritonX-100/PBS) 2-3 Gewebeschnitte/Loch für eine Stunde bei Raumtemperatur in 24-Loch Mikrotiterplatten gegeben. Für die Färbungen wurden nur Schnitte, welche makroskopisch sichtbar Tumor enthielten (GFP Markierung), ausgewählt. Die Hirnschnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,5% TritonX-100/PBS/5% normales Ziegenerum geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für 48 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Monoklonal Anti Maus Endomucin Klon V.7C7, Bioscience) in einer Verdünnung von 1:500 in Blockingpuffer (0,5% TritonX-100 in PBS/5% normales Ziegenerum) inkubiert. Am dritten Färbetag wurden die Hirnschnitte zunächst 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und anschließend 1 mal 15 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 568, Ziege Anti-Ratte; Invitrogen #11077) in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockingpuffer (0,5% TritonX-100 in PBS/5% normales Ziegenerum) bei Raumtemperatur über Nacht. Um Präzipitate zu vermeiden, wurde der verdünnte Sekundärantikörper vor der Inkubation eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Am vierten Färbetag wurden die Schnitte 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und 1 mal 15 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (Thermo Fischer Scientific) in einer Verdünnung von 1:5000 für 10 Minuten. Danach wurden die Hirnschnitte 2 mal 5 Minuten in PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und auf Superfrost Objektträger aufgezogen und mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Pro Tumor wurden 10 Aufnahmen angefertigt. Alle Bilder enthielten ausschließlich Tumorgewebe. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J wurde mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Threshold) die Gefäßdichte (%) im Tumorrand quantitativ analysiert (s. statistische Auswertung 2.2.7). Fehlmarkierungen aufgrund von Artefakten oder farblicher Schwankungen wurden manuell korrigiert.

#### **2.2.6.5. HIF-1α Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung von HIF-1α innerhalb hypoxischer Tumorbereiche wurde eine Immunfluoreszenz Färbung gegen HIF-1α (Polyklonal Kaninchen Anti HIF1α Cayman Chemical, Nr.10006421) in einer Verdünnung von 1:250 durchgeführt. Zu Beginn wurden die in Kryoprotektionlösung asservierten Gewebeschnitte von 40 µm Dicke in eine Petrischale mit PBS gegeben. Zur Permeabilisierung wurden 2-3 Gewebeschnitte /

Loch in 24-Loch Mikrotiterplatten für eine Stunde in 1% TritonX-100/PBS inkubiert. Ausgewählt wurden nur Gewebeschnitte, welche makroskopisch anhand der GFP Markierung erkennbar Tumor enthielten. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blockingpuffer inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Polyklonal Kaninchen Anti HIF1 $\alpha$ ; Cayman Chemical, Nr.10006421) in einer Verdünnung von 1:250 in Blockingpuffer (0,5% TritonX-100 in PBS/5% normales Ziegenserum) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in den Mikrotiterplatten 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und 1 mal 15 Minuten in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocking Puffer (0,5% TritonX-100 in PBS/5%normales Ziegenserum) bei Raumtemperatur über Nacht in abgedunkelten Mikrotiterplatten inkubiert. Um Präzipitate zu vermeiden, wurde der verdünnte Sekundärantikörper vor der Inkubation eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in den Mikrotiterplatten 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und 15 Minuten in PBS gewaschen. Zur Darstellung der Kerne wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten mit DAPI (Thermo Fischer Scientific) in einer Verdünnung von 1:5000 gefärbt, danach 3 mal 15 Minuten mit PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Pro Tumor wurden 10 Aufnahmen angefertigt. Alle Bilder enthielten ausschließlich Tumorgewebe. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J wurden mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Threshold) die HIF-1 $\alpha$  positiven Areale (%) dargestellt und quantitativ analysiert (s. statistische Auswertung 2.2.7). Fehlmarkierungen aufgrund von Artefakten oder farblichen Schwankungen wurden manuell korrigiert.

#### **2.2.6.6. Phospho-Histon H3 Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der proliferierenden Zellen wurde eine Färbung gegen Phospho-Histon H3 (Polyklonal Kaninchen Anti Phospho Histon; Bethyl Lab #IHC00061) in einer Verdünnung von 1:200 durchgeführt.

Histon H3 ist eines der Haupt-Histonproteine, das mit anderen Histonen die Hauptproteinbestandteile in eukaryotischen Zellen bildet. Phospho-Histon H3 ist bei Säugetieren während der Interphase unbedeutend, erreicht jedoch während der Mitose eine maximale Chromatinkondensation, welche somit eine Differenzierung zwischen apoptotischen und mitotischen Zellkernen erlaubt. Der Vorteil der Phospho-Histon H3 Färbung im Vergleich zu Ki67 liegt darin, dass nur Zellen während der Mitose angefärbt werden, d.h. in der Prophase-, Metaphase-, Anaphase und Telophase, nicht in der Interphase und somit eine wirkliche Aussage zum Mitoseindex gemacht werden kann.

Bei der Ki67/Mib1 Färbung hingegen werden Zellen in allen Phasen des Zellzyklus markiert, ausgenommen G0.

Eine Schnittfolge (jeder 12. Schnitt) des Gehirns wurde in PBS gewaschen, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden, um eine vollständige Benetzung im weiteren Färbeablauf sicher zu stellen, mit einem DAKO Cytomation PEN® umrandet. Am nächsten Tag wurden die aufgezogenen Schnitte in PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung für 5 Minuten in TE-Puffer (pH 8.0) in einem Dampfgerat (Braun) gekocht und im Anschluss 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Waschen der Schnitte in 0,01% Triton X-100/ PBS 2 mal 5 Minuten und in PBS 1 mal 5 Minuten wurden die Schnitte für 4 Stunden bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über zwei Nächte in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Polyklonal Kaninchen Anti Phospho Histon; Bethyl Lab #IHC00061) in einer Verdünnung von 1:200 (10% normales Ziegenserum/ 0,5% Triton X-100/ PBS) inkubiert. Nach einmaligem waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und in PBS wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 568 Ziege Anti-Kaninchen; Invitrogen #11011) in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei Raumtemperatur in 10% normalem Ziegenserum/ 0,5% Triton X-100/ PBS inkubiert. Um Präzipitate zu vermeiden, wurde der verdünnte Sekundärantikörper vor der Inkubation eine Minute bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 mal 15 Minuten in PBS/0,01% Triton und 1 mal 15 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Kernfärbung mit DAPI (1:5000, Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Nach der Kernfärbung wurden die Gewebeschnitte 2 mal 5 Minuten in PBS und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und auf Superfrost Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023; Dako) eingedeckt. Pro Tumor wurden 10 Bilder (Areale, ausschließlich aus dem Tumorrand) quantitativ analysiert (s. statistische Auswertung 2.2.4.).

#### **2.2.6.7. TUNEL Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung apoptotischer Zellkerne wurde eine TUNEL Färbung (ApopTag® Red (Fluorescein) in situ – Kit) durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden vor der Färbung auf Superfrost Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte eine Umrandung der aufgezogenen Schnitte mit dem DAKO Cytomation PEN®, um eine vollständige Benetzung des Gewebes mit Antikörper und Inkubationslösung sicherzustellen und das austrocknen der Gewebeschnitte zu vermeiden. Die Schnitte wurden zu Beginn 5 Minuten in PBS rehydriert, 5 Minuten in Citratpuffer (0,01M pH6.0; 1.47 g Tri-Natrium Citrat/500ml destilliertes Wasser) in einem

Dampfgarer (Braun) erhitzt und anschliessend 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die Schnitte für 10 Sekunden in einer Feuchtkammer mit Equilibrationspuffer (Komponente im ApopTag® Kit) (75µl Puffer/ pro Objektträger) inkubiert. Nach abpipettieren des Equilibrationspuffers von den Schnitten wurde das TdT Enzym (Komponente im ApopTag® Kit) auf das Gewebe gegeben (33µl Enzym+77µl Reaktionspuffer/pro Objektträger) und eine Stunde bei 37° C in einem Brutschrank inkubiert, anschließend das TdT Enzym abpipettiert und die Schnitte in einer Küvette mit dem Stop / Wasch – Puffer (fertige Komponente im ApopTag® Kit) auf dem Schüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Schnitte 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und im Anschluss unter Lichtprotektion bei Raumtemperatur 30 Minuten mit Anti – Digoxigenin – Konjugat (Komponente im ApopTag® Kit; 62µl Konjugat+68µl Blocking Lösung/Objektträger) inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen und mit DAPI (Thermo Fischer Scientific) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS für 10 Minuten gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift von 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Fluoreszenzhaftmedium (#S3023, DAKO) eingedeckt und über Nacht abgedunkelt getrocknet.

Durch die TUNEL- Analyse können Strangbrüche in der DNA detektiert werden, wie sie vor allem in nekrotischen Zellen vorliegen. Während der Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die ApopTag® – Methode basiert auf der Detektion von ein- und doppelsträngigen DNA- Brüchen (DNA 3´- OH Endigungen) im Kern der apoptotischen Zelle, noch bevor diese Zelle ein typisches morphologisches Bild der Apoptose zeigt. Es empfiehlt sich jedoch, die mit ApopTag® positiv gefärbten Zellkerne auf ihre Morphologie in der DAPI Färbung zu untersuchen, insbesondere um nekrotische von apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Die normalen oder proliferativen Zellen haben im Gegensatz zu apoptotischen Zellen eine nicht signifikante Anzahl an solchen DNA 3´- OH Endigungen. Das Prinzip dieser Methode besteht in einer Bindung von Nukleotidtriphosphaten (dNTP, im Reaktionspuffer) mit Hilfe von terminaler Desoxynukleotidyl – Transferase (TdT – Enzym) an die 3´- OH Endigungen der ein- und doppelsträngigen DNA Fragmente einer apoptotischen Zelle. Die dNTPs beinhalten das Desoxygenin, an welches der Anti – Desoxygenin – Antikörper bindet. Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin oder Fluorescein) konjugiert, was letztendlich die Detektion der Bindungsstellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops ermöglicht. Pro Tumor wurden 10 Bilder (Areale, ausschließlich aus dem Tumorrand) quantitativ analysiert (s. statistische Auswertung 2.2.7).

### **2.2.6.8. DAPI und TOPRO Fluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine Kernfärbung mit DAPI und TOPRO durchgeführt. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) und TOPRO (Absorptionsmaximum von  $\lambda=642\text{nm}$  und Emissionsmaximum von  $\lambda=661\text{nm}$ ) entsprechen Fluoreszenzfarbstoffen, welche an zelluläre DNA binden und bei einem bestimmten Absorptionsmaximum mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden können. Dabei bilden sich die Zellkerne stark fluoreszierend ab, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz allenfalls als schwacher unspezifischer Hintergrund in Erscheinung tritt. Je kondensierter das Kernchromatin ist, desto stärker fluoresziert die DNA. Somit treten Kondensationszustände wie Apoptosen, aber auch Mitosen, deutlich in Erscheinung.

### **2.2.7. Statistische Auswertung**

Die Analyse der immunfluoreszenz gefärbten Zytospin- und Schnittpräparate erfolgte quantitativ morphometrisch mit einem entsprechenden Programm (Image J). Image J ist ein von Wayne Rasband in Java geschriebenes Bildbearbeitungsprogramm, das für medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse verwendet wird und sehr gut für das Vermessen von Strukturen und Mikroskopaufnahmen geeignet ist. Es kann je nach Bedarf um zahlreiche Makros erweitert werden. Das Programm und der Quelltext sind frei verwendbar (Open source). Die Darstellung der Daten nach der Auswertung mit der Image J Software erfolgte mit der GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und Adobe Illustrator Software (Graphik- und Zeichenprogramm).

Zur statistischen Auswertung wurde der Students t-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Im Fall von Unterscheidungen zwischen  $>2$  Versuchsgruppen wurde eine Varianzanalyse mittels Anova (analysis of variance) durchgeführt. Im Anschluss wurde zum Vergleich multipler Proben der Bonferroni Test angewandt. Von allen Ergebnissen sind sowohl der Mittelwert (MW) als auch der Standardfehler (SEM, standard error of the mean) des Stichprobenmittelwertes angegeben. Ein p- Wert von  $<0,05$  wird als signifikant (\*), ein p-Wert von  $<0,01$  als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von  $<0,001$  (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet. Ausreißer wurden mit dem Grubbs Test eliminiert.

### 3. Ergebnisse

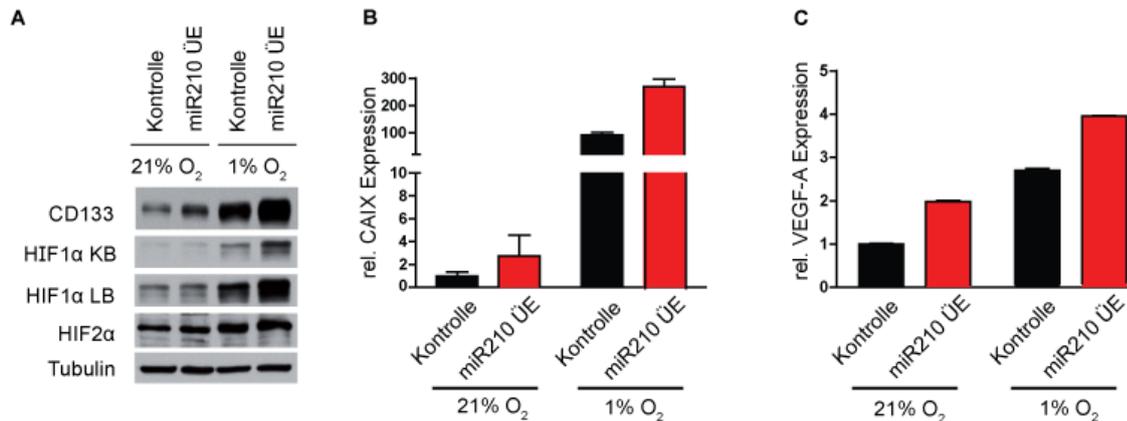
Ein häufiges Phänomen im Rahmen der Tumorprogression ist die Ausbildung intratumoraler hypoxischer Umgebungsbedingungen. Dies führt über hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIF's) zur Aktivierung von Signalkaskaden, die die zelluläre Adaptation an Hypoxie begünstigen. Über HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  werden verschiedene zelluläre Mechanismen reguliert, welche das Tumorwachstum, metabolische Funktionen (Glykolyse), Invasion, Metastasierung, Differenzierung und Selbsterneuerung beeinflussen. Eine besondere Bedeutung in der Genregulation unter hypoxischen Bedingungen kommt der HIF-1 $\alpha$  induzierten miR210 Expression zu.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war, *in vitro* und *in vivo* unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen an verschiedenen Glioblastom-zelllinien den Einfluss von miR210 auf den Stammzellphänotyp zu untersuchen.

#### 3.1. miR210 Überexpression beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp

Die Expression von HIF in unterschiedlichen Tumoren wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Dem hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktor (HIF-1) kommt als Hauptregulator der Sauerstoff-abhängigen Genexpression durch Aktivierung seiner Zielgene wie beispielsweise Carboanhydrase IX und VEGF eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression zu. Um den hypoxieinduzierten Einfluss von miR210 auf den Stammzellphänotyp (CD133) zu untersuchen, haben wir miR210 in Glioblastomzellen überexprimiert (**Abb.3.1.**). In Immunoblot Analysen (**Abb.3.1:A**) konnten wir auf Proteinebene durch Überexpression von miR210 unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen eine vermehrte Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 sowie eine Stabilisierung der hypoxieinduzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  nachweisen. Dieser Effekt wurde unter hypoxischen Bedingungen zusätzlich verstärkt. Da der hypoxieinduzierten Expression von HIF Zielgenen eine entscheidende Rolle für die Tumorprogression zukommt, haben wir auf RNA Ebene die Carboanhydrase IX- und VEGF Expression untersucht (**Abb.3.1:B, C**). Wir konnten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen Anstieg der relativen CAIX Expression von 1.00 auf 2.75 und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen einen Anstieg von 91.21 auf 268.97 nachweisen. Für VEGF-A zeigte sich ein Anstieg der relativen Expression von 1.00 auf 1.97 unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und von 2.70 auf 3.95 unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. VEGF ist das wichtigste HIF-1 $\alpha$  Zielgen und spielt eine wesentliche Rolle in der Gefäßneubildung. Nachdem wir

auf Proteinebene (**Abb.3.1:A**) zeigen konnten, dass die Überexpression von miR210 die CD133 Expression erhöht, haben wir wiederum miR210 überexprimiert und Q-RT-PCR- und FACS-Analysen durchgeführt, um auf mRNA- und zellulärer Ebene den Einfluss auf den Stammzellphänotyp zu untersuchen (**Abb.3.2:A, B**).

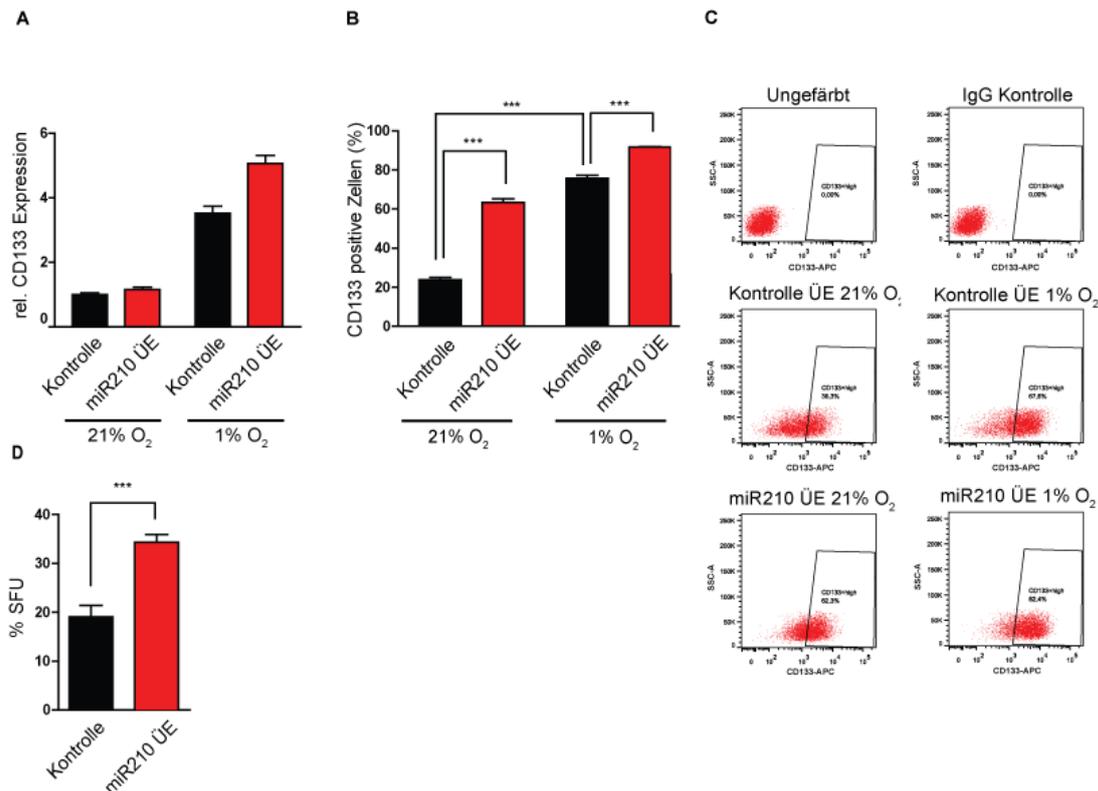


**Abbildung 3.1. miR210 Überexpression induziert die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp.** (A) Immunoblot Analysen der primären humanen Glioblastomzelllinie GBM046X mit Darstellung mittels Antikörper sichtbar gemachter Proteine (CD133, HIF-1α, HIF-2α). Als Ladungskontrolle wurde Tubulin eingesetzt. Die Überexpression der hypoxieinduzierten miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X erhöht unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 und stabilisiert die hypoxieinduzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1α und HIF-2α. Dieser Effekt wird unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen zusätzlich verstärkt (S. Seidel). (B, C) Quantitative RT-PCR (GBM046X) der CAIX und VEGF-A Expression. miR210 Überexpression erhöht die hypoxieinduzierte Expression der HIF-1α Zielgene CAIX und VEGF-A unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen (n=3) (S. Seidel).

### 3.2. miR210 Überexpression erhöht die Stammzellpolution in primären Glioblastomzelllinien

In der Literatur wurde im Jahre 2009 beschrieben, dass Hypoxie den intratumoralen Stammzellphänotyp im Glioblastom reguliert (Z. Li et al., 2009). In der quantitativen RT-PCR (**Abb.3.2:A**) konnten wir einen Anstieg der relativen CD133 Expression auf RNA Ebene unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen von 1.00 auf 1.15 und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen von 3.52 auf 5.06 nachweisen. Um *in vitro* die Anzahl CD133 positiver Zellen zu ermitteln, wurden durchflusszytometrische Analysen (FACS) zur quantitativen Bestimmung der Stammzellpopulation durchgeführt (**Abb.3.2:B**). Die FACS Analyse ist ein Verfahren mit dessen Hilfe Zellpopulationen

anhand unterschiedlicher Zellgröße und Morphologie sowie unterschiedlichem Expressionsmuster mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (Antigen-Antikörper-Reaktion) dargestellt und innerhalb einer Gesamtpopulation quantifiziert werden können. Die Analyse dient insbesondere dem Nachweis von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Das Glykoprotein CD133, auch Prominin genannt, wurde erstmals 1997 in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben. Seit den Untersuchungen von Singh et al. und anderen Arbeitsgruppen wird CD133 als Marker für Tumorstammzellen insbesondere des Glioblastoms angesehen (Singh, Clarke, et al., 2004; Singh et al., 2003; Soeda et al., 2009). Wir konnten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen hoch signifikanten Anstieg CD133 positiver Zellen von 23,86% auf 63,30% und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen hoch signifikanten Anstieg von 75,80% auf 91,73% nachweisen. Auffallend war, dass das etablierte Phänomen der hypoxieinduzierten Expression des Stammzellmarkers CD133 durch die Überexpression von miR210 zusätzlich gesteigert werden konnte, was auf einen direkten Einfluss von miR210 auf den Stammzellphänotyp im Glioblastom schliessen lässt. Exemplarische Dotplot Darstellung (**Abb.3.2:C**) der FACS-Analyse mit dem Primärantikörper gegen Epitop2 des Tumorstammzellmarkers CD133. Ein wichtiges *in vitro* Charakteristikum von Tumorstammzellen unter serumfreien Bedingungen ist die Selbsterneuerungskapazität unter der Ausbildung von Sphären (Singh et al., 2003). Um den Einfluss von miR210 auf das Selbsterneuerungspotential näher zu untersuchen, haben wir miR210 überexprimiert und Sphärenformations Assays durchgeführt (**Abb.3.2:D**), die bei Überexpression von miR210 eine signifikante Zunahme der Sphärenbildung von 19.07% auf 34.27% zeigten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den vorausgegangenen Ergebnissen der Q-RT-PCR und FACS-Analyse. Die Zunahme der Sphärenbildung stützt unsere Hypothese, dass miR210 den Stammzellphänotyp fördert. Nachdem unsere *in vitro* Ergebnisse der Q-PCR und FACS Analyse mit der vermehrten CD133 Expression deutlich auf einen hypoxiegetriggerten stammzellinduzierenden Effekt von miR210 hinwiesen, haben wir *in vitro* die Proliferations- und Apoptoseaktivität an humanen Glioblastomzellen (Zytospins) anhand von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

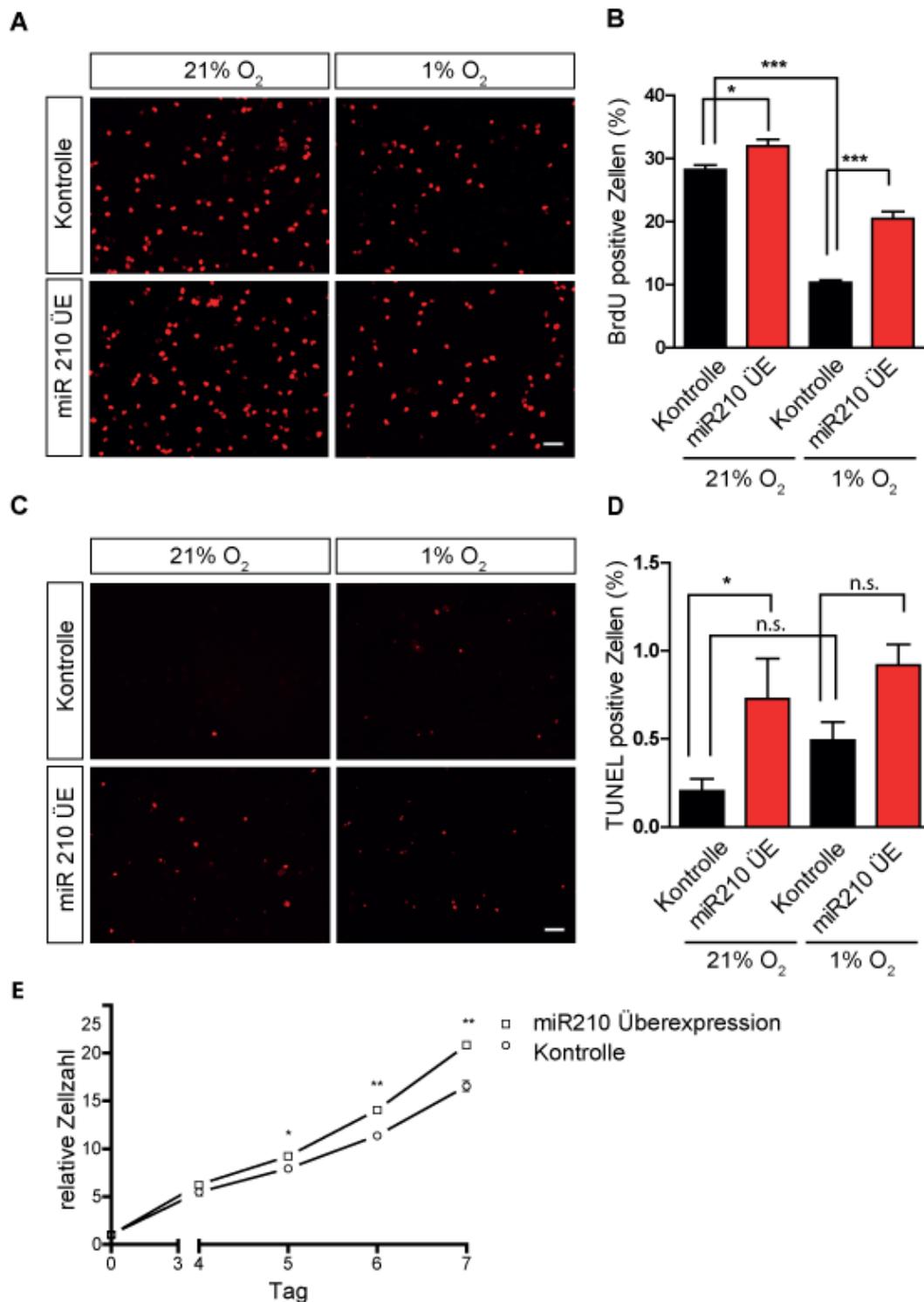


**Abbildung 3.2. miR210 Überexpression erhöht die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien.** (A) Quantitative RT-PCR (GBM046X) der CD133 Expression. Die Überexpression der hypoxieinduzierten miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X fördert die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen (n=3) (S.Seidel). (B) In einer fluoreszenzbasierten durchflusszytometrischen Analyse (FACS) führt die Überexpression von miR210 zu einem signifikanten Anstieg der CD133 positiven Zellfraktion unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. (C) Exemplarische Dotplot Darstellung der FACS-Analyse mit dem Primärantikörper gegen Epitop2 des Tumorstammzellmarkers CD133 (n=3). (D) miR210 Überexpression erhöht die Selbsterneuerungskapazität (Sphärenbildung) in humanen Glioblastomzelllinien (n=6) (S. Seidel). Ein p-Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p-Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.3. miR210 Überexpression induziert Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen

Primäre humane GBM046X Glioblastomzellen wurden in Anwesenheit von 5-Bromo-2-deoxy-uridin (BrdU) inkubiert. BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, bzw. Desoxyuridin. Es entsteht durch Verbindung von Desoxyribose mit der Nukleobase 5-Bromuracil. BrdU kann von der Zelle aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) als Markierung in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Das in die DNA integrierte BrdU kann mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert und hierdurch die Zellproliferation anhand von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert (**Abb.3.3:A**) werden. Pro Bedingung wurden 14 Bilder aufgenommen, wobei jeder BrdU Immunfluoreszenzfärbung bzw. Aufnahme eine korrespondierende DAPI (Kernfärbung) Aufnahme zugeordnet und eine quantitative Analyse BrdU positiver Zellen vorgenommen wurde. Verglichen wurde der Einfluss von miR210 Überexpression unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. In der Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU (5-Bromo-2-deoxy-uridin) zeigte sich interessanterweise, dass der etablierte Effekt der hypoxieinduzierten Reduktion der Zellproliferation durch die miR210 Überexpression abgeschwächt wurde (**Abb.3.3:B**) und miR210 somit indirekt Einfluss auf Stammzeleigenschaften hat. Wir konnten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen Anstieg von 28,21% auf 31,96% und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen Anstieg von 10,31% auf 20,47% BrdU positiver Zellen verglichen mit Kontrollzellen nachweisen. Da bekannt ist, dass miR210 in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist, welche die Tumorgenese beeinflussen (Huang et al., 2010), haben wir neben der Proliferation die Apoptoseaktivität (**Abb.3.3:C**) unter dem Einfluss der miR210 Überexpression untersucht. Durch die TUNEL-Analyse können Strangbrüche in der DNA detektiert werden, wie sie vor allem in nekrotischen Zellen vorliegen. Das Prinzip dieser Methode besteht in einer Bindung von Nukleotidtriphosphaten mithilfe terminaler Desoxynukleotidyl – Transferase an die 3'-OH Endigungen der ein- und doppelsträngigen DNA Fragmente einer apoptotischen Zelle. Die dNTPs beinhalten das Desoxygenin, an welches der Anti-Desoxygenin-Antikörper bindet. Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, was letztendlich eine Detektion mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2000) ermöglicht. Pro Bedingung wurden 19 Bilder aufgenommen, zu jedem TUNEL Immunfluoreszenz gefärbten eine korrespondierende DAPI Aufnahme erstellt und eine quantitative Analyse apoptotischer Zellen mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Image J vorgenommen. Als apoptotisch wurden Zellen mit hochkondensierten, stark fluoreszierenden und mehrfach segmentierten oder fragmentierten Kernen gewertet. In den vorliegenden Immunfluoreszenzfärbungen

konnten wir unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen eine Zunahme von 0,20% auf 0,72% und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen eine Zunahme von 0,49% auf 0,71% (**Abb.3.3:D**) apoptotischer TUNEL positiver Zellen (\*P < 0.05; \*\* P < 0.01) detektieren. Die Ergebnisse zeigen, dass akute Veränderungen der Sauerstoffkonzentration einen pro-apoptotischen Faktor darstellen. Um zu analysieren, ob im Rahmen der Tumorgenese die durch miR210 Überexpression abgeschwächte hypoxieinduzierte Hemmung der Proliferation die Apoptoserate überwiegt, haben wir Wachstumsanalysen der GBM Zelllinie 046X über einen definierten Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt (**Abb.3.3:E**). Hier zeigte sich eine Zunahme der relativen Zellzahl, was unterstreicht, dass der positive Effekt der miR210 Überexpression auf die Zellproliferation größer als auf die Apoptoserate ist.



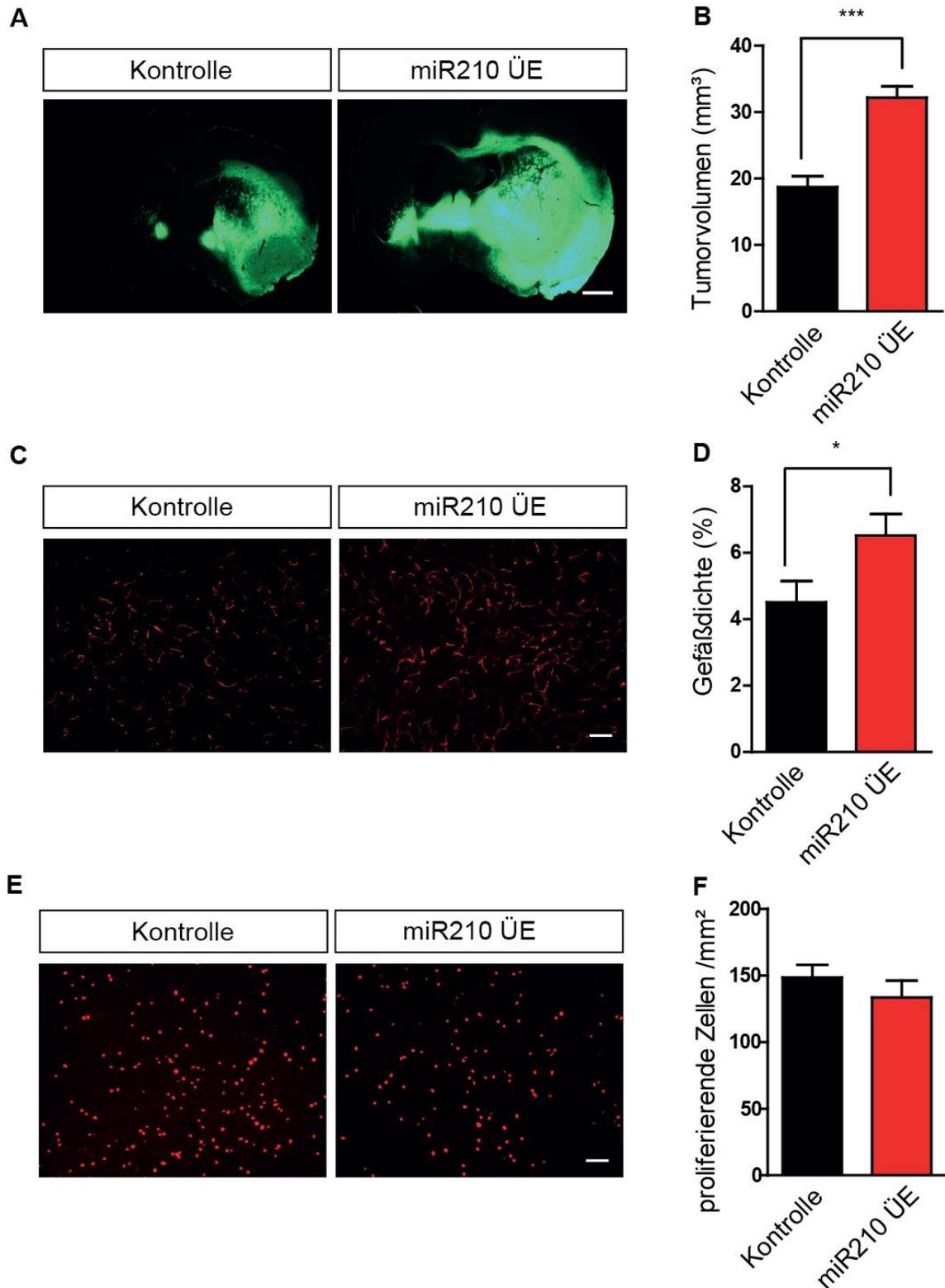
**Abbildung 3.3. *In vitro* Überexpression von miR210 induziert Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen. (A)** Überexpression von miR210 erhöht die Proliferationsrate humaner Glioblastomzellen in einem BrdU-Inkorporationsassay unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. Exemplarische Bilder (n=14). **(B)** In einer vergleichenden quantitativen Analyse wurde die Anzahl BrdU positiver Zellen (%) bestimmt (\*P < 0.05, \*\*\* P < 0.001). **(C)** Überexpression von miR210 unter normoxischen- und hypoxischen Bedingungen induziert Apoptose. TUNEL

Immunfluoreszenzfärbung. Exemplarische Bilder (n=19). **(D)** In einer vergleichenden quantitativen Analyse wurde die Anzahl TUNEL positiver Zellen (%) bestimmt (\*P < 0.05, n.s. nicht signifikant). **(E)** Wachstumskurve mit Zunahme der relativen Zellzahl der primären Glioblastomzelllinie GBM046X Zelllinie (n=3) (S. Seidel). Alle Werte entsprechen Mittelwerten und SEM (Skalierungsbalken =50µm). Ein p- Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p-Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.4. miR210 Überexpression erhöht *in vivo* in 046X Glioblastomen das Tumolvolumen und die Gefäßdichte

Das Hauptkriterium von Tumorstammzellen ist die Tumorinitiierung *in vivo* (Singh, Hawkins, et al., 2004). Nachdem wir *in vitro* an kultivierten Glioblastomzelllinien zeigen konnten, dass miR210 einen Einfluss auf Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Proliferation hat (**s. Abb.3.2:D, Abb.3.3:A, Abb.3.3:E**), interessierte uns insbesondere, ob diese Mechanismen auf ein intrakranielles Xenograft-Transplantationsmodell der Maus übertragbar sind. Die *in vivo* Ergebnisse an GBM046X Glioblastomen deckten sich mit unseren vorausgegangenen *in vitro* Resultaten. Wir konnten *in vivo* zeigen, dass die Überexpression von miR210 mit einer deutlichen Volumenzunahme der Tumore einherging (**Abb.3.4:A**). Die Tumore wiesen histologisch ein infiltratives Wachstum mit Ausbreitung über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre auf. Um das Tumolvolumen zu berechnen, haben wir Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnittfolgen kryoasservierter Dickschnitte (jeder 12. Schnitt, 480 µm) analysiert. Die Berechnung des Tumorumens erfolgte, indem die Tumorfläche der einzelnen Schnitte zu einer Gesamtfläche addiert und diese mit der Dicke des Schnittes (0,04mm) und nochmals mit 12 multipliziert wurden, da nur jeder 12. Schnitt eines jeweiligen Gehirnes aufgezoen war. Dies ergab entsprechend der Formel ( $V [mm^3] = \text{Totale Tumorfläche [mm}^2] \times 0.04 \text{ mm (Schnittdicke } 40\mu\text{m)} \times 12$ ) das angenäherte Tumolvolumen in mm<sup>3</sup>. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei Überexpression von miR210 ein hoch signifikanter Anstieg des Tumorumens von 18,73mm<sup>3</sup> auf 32,18mm<sup>3</sup>. Kontrollen (n=7) und miR210 Überexpression (n=8) (**Abb.3.4:B**). Da bekannt ist, dass der hypoxieinduzierte Wachstumsfaktor VEGF als wichtigstes HIF Zielgen die Gefäßneubildung fördert, hat uns interessiert, ob die Größenzunahme aus einer Zunahme der Gefäßdichte resultiert. Zur Darstellung der intratumoralen Gefäße haben wir Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Gefäßmarker (Endomucin) angefertigt. (**Abb.3.4:C**). Es wurden von jedem Tumor 10 mit Endomucin Antikörper gefärbte Immunfluoreszenz Bilder in zehnfacher Vergrößerung (Leica DM 2000, Software 4.71)

aus dem Tumorgewebe bzw. Tumorrand und jeweils korrespondierende DAPI (Kernfärbung) Bilder aufgenommen. Danach erfolgte die Auswertung der Gefäßdichte mit einem Bildanalyseprogramm (Image J) mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Threshold). Fehlmarkierungen aufgrund von Artefakten wurden manuell korrigiert. Aus allen Einzelbildern eines Tumors wurde der Mittelwert und im Anschluss die prozentuale Gefäßdichte berechnet. Es zeigte sich bei Überexpression von miR210 analog zu einem signifikanten Anstieg des Tumorumfanges ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte von 4,50% auf 6,52% pro Tumorfläche (**Abb.3.4:D**). Nachdem wir nun *in vitro* zeigen konnten, dass miR210 Überexpression den Effekt der hypoxieinduzierten verminderten Proliferation schwächt (**Abb.3.3:A, B**), miR210 Überexpression *in vivo* zu einer Zunahme des Tumorumfanges (**Abb.3.4:A, B**) und der Gefäßdichte (**Abb.3.4:C, D**) führt, hat uns insbesondere der Einfluss der miR210 Überexpression auf die Proliferationsaktivität interessiert. Ausgehend davon haben wir *in vivo* Immunfluoreszenzfärbungen mit dem etablierten Proliferationsmarker Phospho-Histon H3 angeschlossen (**Abb.3.4:E**). Es wurden pro Tumor 10 Phospho-Histon H3- und 10 korrespondierende DAPI- Aufnahmen angefertigt. Phospho-Histon H3 ist ein Haupt-Histonprotein, das mit anderen Histonen die Hauptproteinbestandteile in eukaryotischen Zellen bildet. Der Vorteil der Phospho-Histon H3 Färbung im Vergleich zu Ki67 liegt darin, dass nur Zellen während der Mitose angefärbt werden, somit eine wirkliche Aussage zum Mitoseindex gemacht werden kann. Bei Ki67/Mib1 hingegen werden alle Zellzyklusphasen, ausgenommen G0, markiert. Verglichen mit den Kontrollen (148 proliferierende Zellen /mm<sup>2</sup>) zeigte sich in der Überexpression (133 proliferierende Zellen /mm<sup>2</sup>) kein signifikanter Unterschied.

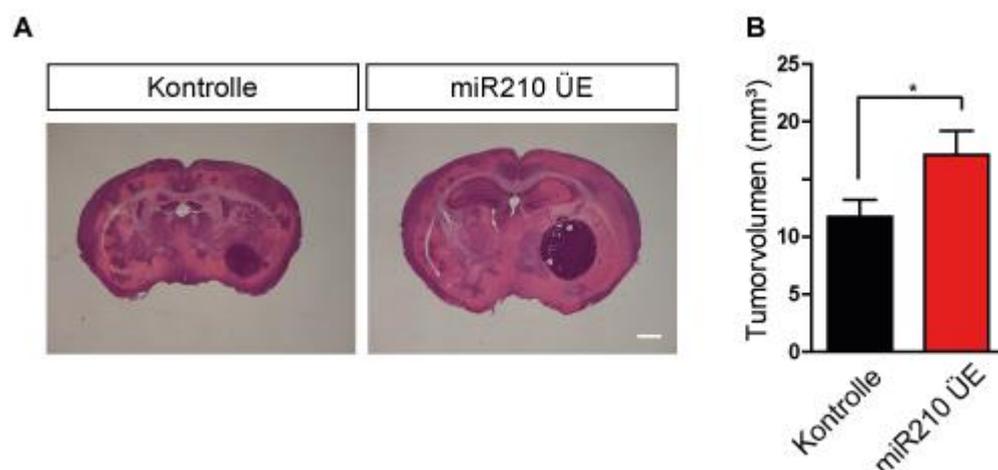


**Abbildung 3.4. miR210 Überexpression erhöht Tumorvolumen und Gefäßdichte im GBM046X Xenograft-Tumormodell. (A)** miR210 Überexpression in humanen Glioblastomzellen erhöht das Tumorvolumen *in vivo*. Exemplarische Bilder der das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) exprimierenden Tumore (Skalierungsbalken =1mm). **(B)** Vergleichende quantitative Analyse einer HE gefärbten Schnittfolge (480µm) zur Berechnung des Tumorvolumens. Kontrollen (n=7) und miR210 Überexpression (n=8). (\*\*\*)  $P < 0.001$ ). **(C)** miR210 Überexpression erhöht die intratumorale Gefäßdichte (%). Exemplarische Bilder einer Endomucin Immunfluoreszenzfärbung (Skalierungsbalken

=100µm). **(D)** Vergleichende quantitative Analyse Endomucin gefärbter GBM046X Xenograft Tumore (\*P < 0.05). **(E)** miR210 Überexpression hat keinen Einfluss auf Proliferationsrate. Exemplarische Bilder (Skalierungsbalken =100µm). **(F)** Vergleichende quantitative Analyse der Phospho- Histon H3 gefärbten Glioblastome (n.s). Ein p- Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p-Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.5. miR210 Überexpression erhöht *in vivo* in G55 Glioblastomen das Tumolvolumen

Um zu überprüfen, ob sich die *in vivo* Ergebnisse der primären Glioblastomzelllinie GBM046X (s. Ergebnisse 3.4.) auch auf Tumormodelle etablierter Zelllinien übertragen lassen, haben wir an einer weiteren Zelllinie (G55 GBM) *in vivo* Analysen durchgeführt (**Abb.3.5.**). Die erwähnte Zelllinie wird *in vitro* unter Serumzugabe kultiviert und weist keine nachweisbare Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 auf. Um dennoch Rückschlüsse auf miR210 induzierte Stammzeleigenschaften zu ziehen, haben wir das Tumolvolumen der etablierten Zelllinie *in vivo* analysiert. Die Tumolvolumenberechnung erfolge nach der zuvor beschriebenen Formel (s. 3.4. Ergebnisse) an HE gefärbten Schnittpräparaten (**Abb.3.5:A**). Wir konnten zeigen, dass bei Überexpression von miR210 auch in dieser Zelllinie (G55 GBM) das Tumolvolumen im Vergleich zu den Kontrollen von 11,84mm<sup>3</sup> auf 15,55 mm<sup>3</sup> signifikant anstieg (**Abb.3.5:B**). Interessant war außerdem, dass Glioblastome dieser Zelllinie, verglichen mit GBM046X Glioblastomen, ein deutlich weniger invasives Wachstum aufwiesen. Kontroll- und miR210 Überexpression (n=8).

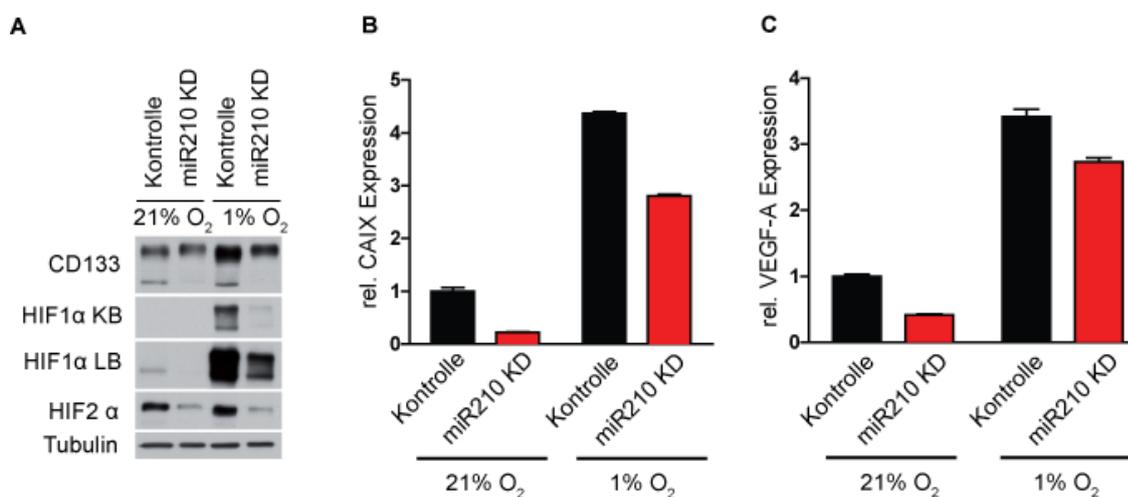


**Abbildung 3.5. miR210 Überexpression erhöht Tumolvolumen im Xenograft-Tumormodell in etablierten G55 Glioblastomzelllinien. (A)** miR210 Überexpression

erhöht das Tumorzellen *in vivo*. Exemplarische Übersichtsbilder einer HE-Färbung (Skalierungsbalken =1mm). **(B)** Vergleichende quantitative Analyse einer HE gefärbten Schnittfolge (480µm) zur Berechnung des Tumorzellen. Kontroll- und miR210 Überexpression (n=8). (\*P < 0.05). Ein p- Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p- Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.6. miR210 Knockdown beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp

Um den Einfluss von miR210 Knockdown auf den Stammzellphänotyp in Glioblastomzelllinien zu untersuchen, haben wir im Umkehrschluss die Expression der hypoxieinduzierten miR210 in der humanen Glioblastomzelllinie GBM046X ausgeknockt (**Abb.3.6.-Abb.3.9.**). Wir konnten auf Proteinebene (**Abb.3.6:A**) beobachten, dass der Knockdown von miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X sowohl unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- als auch unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 sowie der hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktoren HIF-1α und HIF-2α verringert. Gleichzeitig haben wir auf RNA Ebene die Expression der HIF-1α Zielgene Carboanhydrase IX- und VEGF untersucht (**Abb.3.6.B, C**). Der Knockdown von miR210 führte unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen zu einer Reduktion der relativen CAIX Expression von 1.00 auf 0.22 und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen von 4.36 auf 2.80. Für VEGF-A zeigte sich eine Reduktion der relativen Expression von 1.00 auf 0.41 (21% O<sub>2</sub>) und von 3.41 auf 2.73 (1% O<sub>2</sub>).

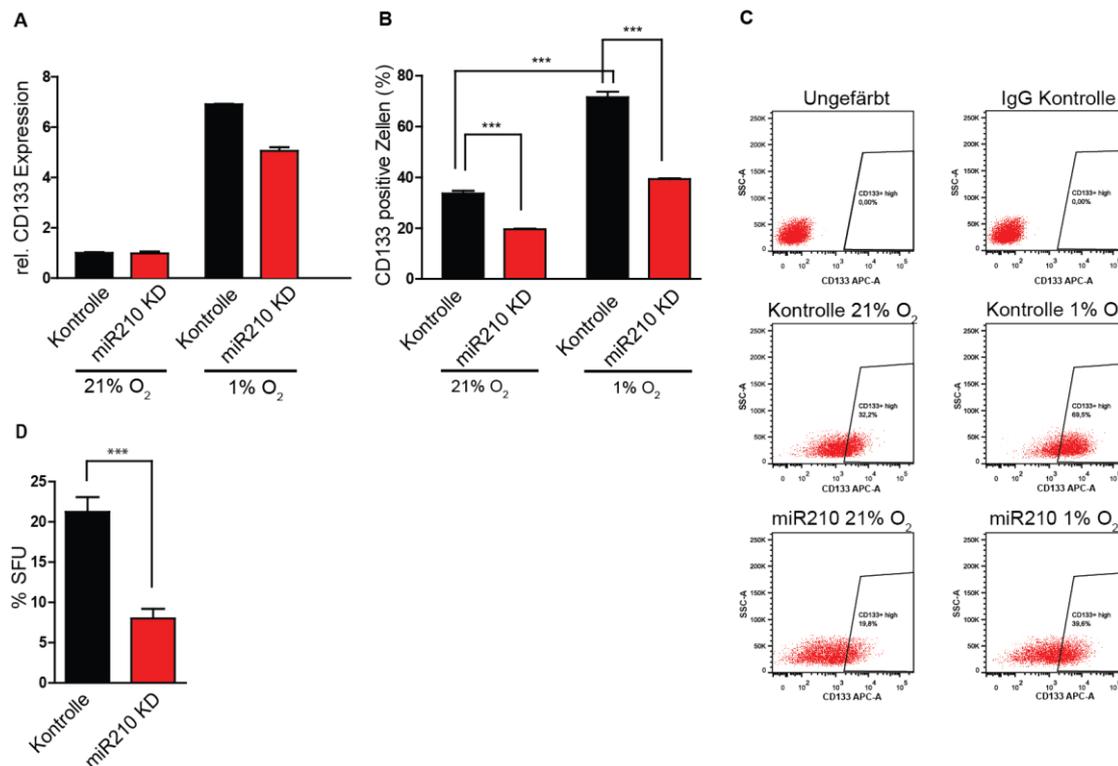


**Abbildung 3.6. miR210 Knockdown beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp. (A)** Immunoblot Analysen der

primären humanen Glioblastomzelllinie GBM046X mit Darstellung mittels Antikörper sichtbar gemachter Proteine (CD133, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ ). Als Ladungskontrolle wurde Tubulin eingesetzt. Der Knockdown der hypoxieinduzierten miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X verringert unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 sowie der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  (S. Seidel). **(B, C)** Quantitative RT-PCR (GBM046X) der CAIX und VEGF-A Expression. Der miR210 Knockdown erniedrigt die hypoxieinduzierte Expression der HIF-1 $\alpha$  Zielgene CAIX und VEGF-A unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen (n=3) (S. Seidel).

### 3.7. miR210 Knockdown beeinflusst die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien

Um auf mRNA- und zellulärer Ebene eine Aussage über den Einfluss von miR210 auf den Stammzellphänotyp machen zu können haben wir Q-RT-PCR- und FACS- Analysen mit dem Stammzellmarker CD133 durchgeführt. In der quantitativen RT-PCR **(Abb.3.7:A)** konnten wir eine Reduktion der relativen CD133 Expression auf RNA Ebene unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen von 1.00 auf 0.98 und unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen von 6.90 auf 5.05 nachweisen. Um *in vitro* wiederum die Anzahl CD133 positiver Zellen zu ermitteln, haben wir durchflusszytometrische Analysen (FACS) zur quantitativen Bestimmung des Stammzellmarkers CD133 durchgeführt **(Abb.3.7:B)**. Hierbei zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme CD133 positiver Zellen von 33,60% auf 19,56% unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen und von 71,53% auf 39,30% unter hypoxischen (1%O<sub>2</sub>) Bedingungen. Besonders interessant war hier, dass wir unter hypoxischen (1%O<sub>2</sub>) Bedingungen einen Anstieg CD133 positiver Zellen sahen, dieser im Knockdown jedoch auf das Niveau der Kontrollzellen unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) reduziert werden konnte. Exemplarische Dotplot Darstellung **(Abb.3.7:C)** der FACS-Analyse mit dem Primärantikörper gegen Epitop2 des Tumorstammzellmarkers CD133 (n=3). Korrelierend zur Reduktion des Stammzellmarkers CD133 auf Protein- (Abb.3.6:A) und RNA- (Abb.3.7:A) Ebene konnten wir außerdem zeigen, dass miR210 Knockdown auch die Selbsterneuerungskapazität in humanen Glioblastomzelllinien (n=6) reduzierte **(Abb.3.7:D)**.

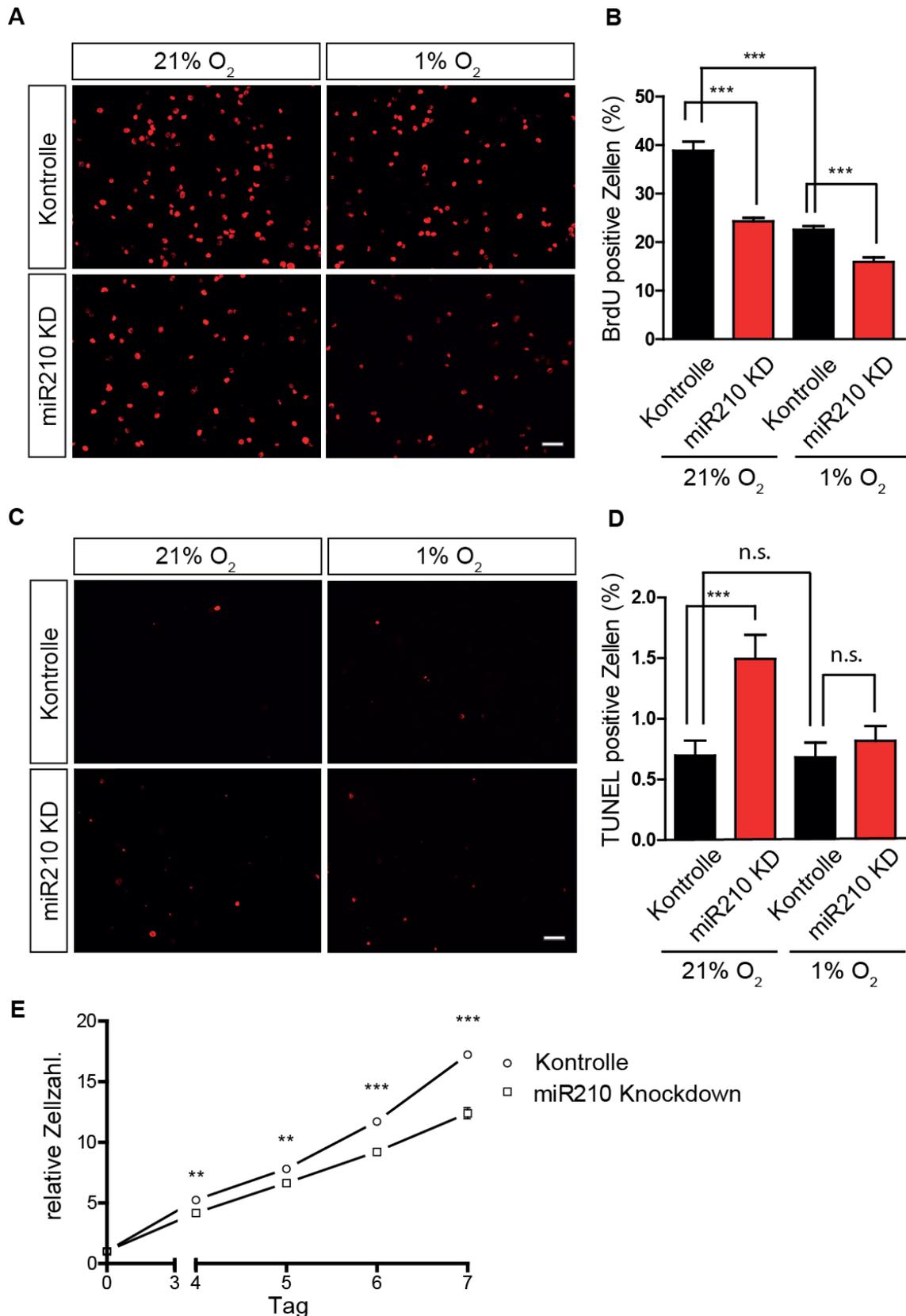


**Abbildung 3.7. miR210 Knockdown reduziert die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien.** (A) Quantitative RT-PCR (GBM046X) der CD133 Expression. Der Knockdown der hypoxieinduzierten miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X reduziert die hypoxieinduzierte Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen (n=3) (S. Seidel). (B) In einer fluoreszenzbasierten durchflusszytometrischen Analyse (FACS) führt der Knockdown von miR210 zu einer Reduktion der CD133 positiven Zellfraktion unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. (C) Exemplarische Dotplot Darstellung der FACS-Analyse mit dem Primäntikörper gegen Epitop2 des Tumorstammzellmarkers CD133 (n=3). (D) miR210 Knockdown reduziert die Selbsterneuerungskapazität (Sphärenbildung) in humanen Glioblastomzelllinien (n=6) (S. Seidel). Ein p-Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p-Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.8. miR210 Knockdown beeinflusst Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen

Um die Ergebnisse, die wir in der Überexpression *in vitro* (s. Ergebnisse 3.3) gewonnen haben mit dem Effekt im Knockdown zu vergleichen, haben wir im Umkehrschluss die hypoxieinduzierte Expression von miR210 in der humanen Glioblastomzelllinie GBM046X ausgeknockt (**Abb.3.8.**).

Um *in vitro* den Einfluss auf stammzellassoziierte Eigenschaften wie Selbsterneuerung und Proliferation zu untersuchen wurden primäre Glioblastomzelllinien in Anwesenheit von BrdU inkubiert (5-Bromo-2-deoxy-uridin) (**Abb.3.8:A**). Pro Bedingung wurden 15 Bilder aufgenommen und zu jedem BrdU Bild eine korrespondierende DAPI Aufnahme erstellt. Wir konnten zeigen, dass die Ergebnisse im Knockdown Versuch mit unseren Ergebnissen der Überexpressionsexperimente korrelierten. Es zeigte sich in den quantitativen Analysen (**Abb.3.8:B**), verglichen mit den Kontrollen, eine hoch signifikante Abnahme der Proliferationsrate von 38,84% auf 24,30% unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und von 22,57% auf 15,93% unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. Zur Bestimmung der Apoptoserate haben wir wiederum eine TUNEL Immunfluoreszenz Färbung durchgeführt (**Abb.3.8:C**). Pro Bedingung wurden 19 Bilder aufgenommen und zu jedem TUNEL Bild eine korrespondierende DAPI Aufnahme erstellt. Wir konnten (**Abb.3.8:D**) unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) eine hoch signifikante Zunahme von 0,69% auf 1,49% und unter hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) eine Zunahme von 0,68% auf 0,81% im Vergleich zu Kontrollzellen zeigen. Unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen konnten wir, verglichen mit normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen, eine Abnahme apoptotischer Zellen detektieren. Korrelierend zu der Abnahme BrdU positiver Zellen (Abb.3.8:B) ergaben die Wachstumsanalysen (**Abb.3.8:E**) über einen definierten Zeitraum von 7 Tagen eine Reduktion der relativen Zellzahl.

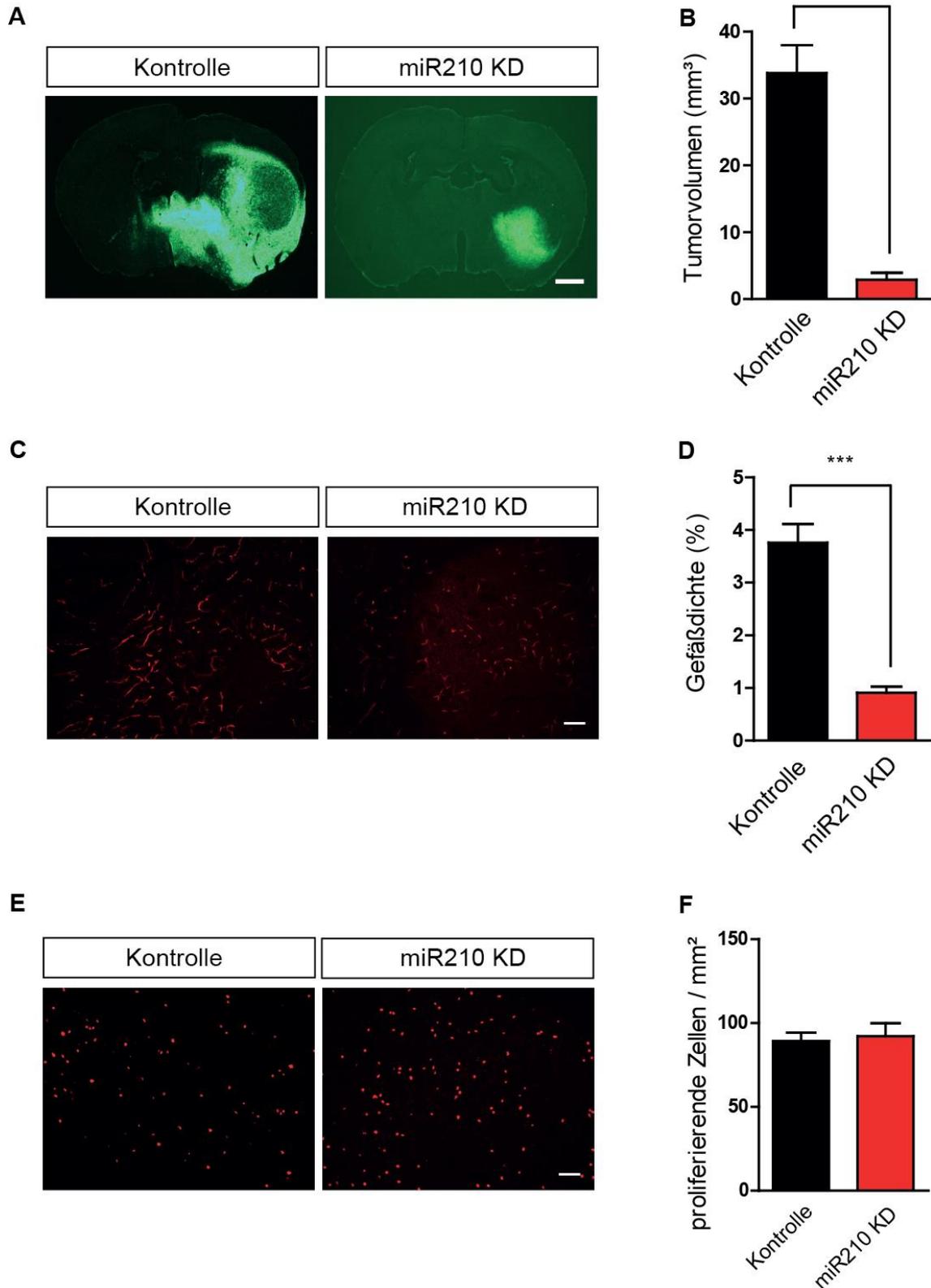


**Abbildung 3.8. *In vitro* Knockdown von miR210 beeinflusst Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen. (A)** Knockdown von miR210 reduziert die Proliferationsrate humaner Glioblastomzellen in einem BrdU Inkorporationsassay unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen. 5-Bromodeoxyuridin Immunfluoreszenzfärbung. Exemplarische Bilder (n=15). **(B)** In einer vergleichenden quantitativen Analyse wurde die Anzahl BrdU positiver Zellen (%) bestimmt (21% O<sub>2</sub> und

1% O<sub>2</sub>)<sup>\*\*\*</sup> P < 0.001). **(C)** Knockdown von miR210 unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen induziert Apoptose. TUNEL Immunfluoreszenzfärbung (n=19). Exemplarische Bilder. **(D)** In einer vergleichenden quantitativen Analyse wurde die Anzahl TUNEL positiver Zellen (%) bestimmt. **(E)** Wachstumskurve mit Reduktion der relativen Zellzahl/Tag der GBM046X Zelllinie (n=3) (S. Seidel). Alle Werte entsprechen Mittelwerten und SEM. (<sup>\*\*\*</sup> P < 0.001, n.s.), (Skalierungsbalken =50µm). Ein p- Wert von <0,05 wird als signifikant (\*), ein p-Wert von <0,01 als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von <0,001 (<sup>\*\*\*</sup>) als höchstsignifikant betrachtet.

### 3.9. miR210 Knockdown reduziert *in vivo* in 046X Glioblastomen das Tumolvolumen und die Gefäßdichte

Um die *in vitro* Effekte des miR210 Knockdown (s. Ergebnisse 3.7 und 3.8.) mit den Effekten *in vivo* zu vergleichen, haben wir miR210 Knockdown Zellen mittels eines intrakraniellen Xenograftmodells in Nacktmäuse transplantiert. Unsere *in vivo* Daten stützen die Ergebnisse *in vitro* (**Abb.3.9.**) Durch den Knockdown von miR210 in der primären Glioblastomzelllinie GBM046X konnten wir eine signifikante Abnahme des Tumolvolumens im Xenograftmodell beobachten (**Abb.3.9:A**). Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte analog zu den Volumenberechnungen des Überexpressionsmodells (3.4.). Verglichen mit den Kontrollen fand sich in der Knockdown Gruppe eine hoch signifikante Abnahme des Tumolvolumens (**Abb.3.9:B**) von 33,83 mm<sup>3</sup> auf 2,92 mm<sup>3</sup> (Kontrollgruppe (n=7) und miR210 Knockdowngruppe (n=8)). Um *in vivo* zu untersuchen, welchen Einfluss miR210 Knockdown auf die Gefäßdichte hat, haben wir wiederum Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Gefäßmarker Endomucin durchgeführt (**Abb.3.9:C**). Es wurden von jedem Tumor 10 Endomucin und 10 korrespondierende DAPI Aufnahmen in zehnfacher Vergrößerung aus dem Tumorrand aufgenommen. Die Auswertung erfolgte analog zum Überexpressionsmodell (3.4.) mit dem Bildanalyseprogramm Image J. Verglichen mit den Kontrollen zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme der Gefäßdichte (**Abb.3.9:D**) von 3,76% auf 0,91%. Um die *in vitro* gewonnenen Daten (s. Ergebnisse 3.8) mit den Effekten *in vivo* zu vergleichen, haben wir wiederum die Proliferationsrate (PHH3) bestimmt (**Abb.3.9:E**). Pro Tumor wurden 10 Phospho-Histon H3 Aufnahmen quantitativ analysiert. Die Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- (89 proliferierende Zellen/ mm<sup>2</sup>) und Knockdown- (92 proliferierende Zellen/mm<sup>2</sup>) Tumoren (**Abb.3.9:F**).



**Abbildung 3.9. miR210 Knockdown reduziert Tumorstadium und Gefäßdichte im GBM046X Xenograft-Tumormodell. (A)** miR210 Knockdown reduziert das Tumorstadium *in vivo* im Vergleich zum Kontrollgewebe. Exemplarische Bilder der, das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) exprimierenden, Tumore (Skalierungsbalken = 1mm). **(B)** Vergleichende quantitative Analyse einer HE gefärbten Schnittfolge (480µm) zur Berechnung des Tumorstadiums. Kontrollgruppe (n=7) und miR210 Knockdown (n=8) (\*\*\*)  $P < 0.001$ . **(C)** miR210 Knockdown verringert die intratumorale Gefäßdichte (%).

Exemplarische Bilder der Endomucin Immunfluoreszenzfärbung (Skalierungsbalken =100µm). **(D)** Vergleichende quantitative Analyse an einer Endomucin gefärbten Schnittfolge GBM046X (\*\*\*)  $P < 0.001$ ). **(E)** Knockdown von miR210 hat *in vivo* keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Exemplarische Bilder (Skalierungsbalken =100µm). **(F)** Vergleichende quantitative Analyse der Phospho-Histon H3 gefärbten Glioblastome. Ein p- Wert von  $<0,05$  wird als signifikant (\*), ein p-Wert von  $<0,01$  als hoch signifikant (\*\*) und ein p-Wert von  $<0,001$  (\*\*\*) als höchstsignifikant betrachtet.

## 4. Diskussion

Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste maligne Hirntumor des Erwachsenen und geht trotz multimodaler Therapie mit Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie mit Temozolomid mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 12 bis 15 Monaten und einer hohen Rezidivrate einher (Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005). Pathognomonisch für maligne Hirntumore, insbesondere für das Glioblastom, sind Gefäßproliferate und hyperzelluläre Areale mit pseudopalisierenden Nekrosen (Kleihues et al., 2002; Louis et al., 2007; Louis et al., 2016). Die Gefäßproliferate spielen eine wesentliche Rolle als Transport- und Leitsystem für Nährstoffe, Sauerstoff und im Rahmen der Tumorzellaussaat. Die hyperzellulären Tumorareale innerhalb pseudopalisierender Tumornekrosen entstehen durch ein Abwandern der Tumorzellen, weg von nekrotischen Gewebsarealen, sowie von den okkludierten- und degenerierten Gefäßproliferaten des Tumorzentrums. Die migrierenden hypoxischen Tumorzellen weisen eine erhöhte Expression von HIF-1, HIF-2 und VEGF und eine erhöhte Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie auf und werden wiederum geschützt durch Gefäße, die durch Hypoxie- medierte molekulare Prozesse ausgebildet werden (Hambardzumyan & Bergers, 2015; Vaupel & Harrison, 2004; Vaupel & Mayer, 2007). Die im Rahmen der intratumoralen Hypoxie über VEGF neugebildeten Gefäße weisen Lücken zwischen den Endothelzellen auf, was zum einen die Ausbildung eines vasogenen Hirnödems fördert, zum anderen zur Stase und Hypoxämie führt und die Chemoresistenz begünstigt. Unter den Tumorzellen, die unter den zuvor beschriebenen ungünstigen Mikromillieubedingungen mit verminderter Nährstoff- und Sauerstoffversorgung überleben können, finden sich auch Tumorstammzellen (CSCs) (Filatova, Acker, & Garvalov, 2013; Hambardzumyan & Bergers, 2015). In den letzten Jahren konnten in verschiedenen soliden Tumoren intratumorale Krebsstammzellpopulationen nachgewiesen werden, welche von hypoxischen Umgebungsbedingungen profitieren und möglicherweise für die hohe Rezidivrate und Therapieresistenz verantwortlich sind (Galli et al., 2004; Heddleston et al., 2011; Heddleston, Li, McLendon, Hjelmeland, & Rich, 2009; Seidel et al., 2010; Singh, Clarke, et al., 2004; Singh et al., 2003; Singh, Hawkins, et al., 2004). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass das hypoxische Tumormikromillieu für einen Großteil der pathognomonischen Charakteristika und die Aggressivität von Glioblastomen verantwortlich ist.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Schlüsselmechanismen zu identifizieren, über die Hypoxie die Tumormalignität im Glioblastom fördert. Hierbei konnten wir zeigen, dass miR210 eine wichtige pro-tumorigene Rolle im Glioblastom zukommt und die HIF-1 medierte miR210 Expression als Teil eines feedforward loops HIF vermittelte

Funktionen, wie Angiogenese oder den Tumorstammzellphänotyp, welche essentiell für das Tumorstammwachstum sind, vorantreibt. Unsere Befunde legen nahe, dass miR210 aufgrund seiner wichtigen Rolle in Tumoren eine interessante therapeutische Zielstruktur darstellen könnte.

#### **4.1. Die Bedeutung von miR210 auf die Hypoxieantwort von Tumorzellen**

Hypoxie resultiert aus einer Imbalance zwischen dem intrazellulären Sauerstoffangebot und dem zellulären Verbrauch und ist ein häufiges Phänomen solider Tumore. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ein hypoxisches Mikromilieu das Tumorstammwachstum in soliden Tumoren begünstigt (Melillo, 2006; Semenza, 2008), einen negativen prognostischen Faktor z.B. in Hirn-, Kopf-Hals-, Cervix-, Pankreas- und Prostata Tumoren darstellt und mit einer reduzierten Effektivität in der strahlentherapeutischen Behandlung einhergeht. Da die Sauerstoffkonzentration im Tumorgewebe in der Regel deutlich niedriger als im umliegenden gesunden Gewebe ist und hypoxische Umgebungsbedingungen das Tumorstammwachstum begünstigen, steht Hypoxie seit langem im Fokus der Tumorforschung. In normalem Hirngewebe liegt der Sauerstoffgehalt, je nach Hirnareal, zwischen 7,5% und 0,5% (Dings, Jager, Meixensberger, & Roosen, 1998) und kann im Rahmen der Malignisierung auf unter 1% abfallen (Vaupel & Mayer, 2007). In Gebärmutterhals- und Brusttumoren konnte beispielsweise ein deutlich reduzierter Sauerstoffgehalt im Vergleich zu normalem Gebärmutterhals- und Brustdrüsengewebe gemessen werden (Vaupel & Harrison, 2004). Aufgrund der verlängerten Diffusionsstrecke während der rapiden Tumorstammprogression kann der Sauerstoffbedarf durch die bereits vorhandenen Gefäße nicht mehr gedeckt werden und es kommt in soliden Tumoren zur Ausbildung intratumoraler hypoxischer Areale. Durch die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  stabilisiert. Dieser induziert die Transkription spezifischer HIF-Zielgene wie VEGF oder miR210. Diese hochkomplexen adaptiven Mechanismen kontrollieren wiederum die Regulierung von Zellüberleben, Proliferation, Apoptose, Metastasierung und Gefäßneubildung (Acker & Plate, 2002; Alaiti et al., 2012; Bao et al., 2006; Fasanaro et al., 2008; Fasanaro et al., 2009; Henze & Acker, 2010; J. W. Lee, Bae, Jeong, Kim, & Kim, 2004; Pistollato et al., 2010; Semenza, 1998). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  eine Schlüsselrolle bezüglich der Gefäßneubildung und Stammzellhomöostase während der Tumorstammgenese zukommt und eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und miR210 mit einer schlechten Prognose korreliert (Filatova et al., 2013; Heddleston et al., 2011; Heddleston et al., 2010; Z. Li et al., 2009; Seidel et al., 2010). Über HIF-2 $\alpha$

werden Gene transkribiert, die den Gliomstammzellphänotyp, die Selbsterneuerungskapazität und die Tumorinitiierung fördern.

Seit im Jahre 2007 für einige miRNA's gezeigt wurde, dass sie vermittelt durch hypoxieinduzierbare Transkriptionsfaktoren, vermehrt unter hypoxischen Bedingungen exprimiert werden (HRM-hypoxia-regulated-miRNA's), z.B. miR23, miR24, miR26, miR27, miR103, miR107, miR181, miR210, miR213 und miR373 (Huang et al., 2009; Kulshreshtha et al., 2007) folgten zahlreiche Studien zur Rolle hypoxieinduzierter miRNA's, u.a. auch zur Rolle der Hypoxie-induzierten miR210. miRNA's sind nicht kodierende RNA's, die in wichtige biologische- und die Tumorigenese betreffende Prozesse wie Angiogenese, Metabolismus, Apoptose, Zellzyklusregulation, Proliferation, Metastasierung und Resistenzentwicklung gegen Krebstherapien involviert sind. Da miRNA's die Translation negativ regulieren, vermindern sich die mRNA Level und daraus resultierend die Proteinexpression ihrer Zielgene mit steigender miRNA Expression. Im menschlichen Genom existieren über 1000 miRNA's, wobei jede miRNA über 100 mRNA's reguliert. Um noch unbekannte Ziel-mRNA's zu identifizieren, werden verschiedene Computerprogramme wie z.B. Pic-Tar verwendet (Krek et al., 2005). Diese Programme suchen nach Komplementarität zwischen den miRNA Seed-Sequenzen und den 3'-UTR aller bekannten Gene, wobei das resultierende Set in der Regel hunderte Gene enthält (Saito & Saetrom, 2010). Eine Hochregulation pro-onkogener miRNA's reduziert die Expression tumorsuppressiver Proteine und eine Reduktion tumorsuppressiver miRNA's resultiert in einer erhöhten Expression onkogener Proteine. Insbesondere an malignen Tumoren konnte gezeigt werden, dass miRNA's sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften besitzen können (Dang & Myers, 2015). Eine erhöhte miR210 Expression wurde in verschiedenen hypoxischen Tumoren nachgewiesen, wo sie die Gefäßneubildung und Tumorprogression förderte (Fasanaro et al., 2008; Kulshreshtha et al., 2007).

Hervorzuheben ist die hochkomplexe Interaktion zwischen HIF-1 und miRNA's (Henze & Acker, 2010). Unsere Vorarbeiten zeigen, dass miR210 in Glioblastomen Hypoxie abhängig über HIF1 induziert wird. So führte die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  zu einer verstärkten, der Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  hingegen zu einer verringerten miR210 Expression. In ähnlicher Weise zeigten Huang et al. unter Hypoxie eine generelle Induktion von miR210 an Kopf-Hals- und Pankreaskrebszelllinien. Hier war die ektope miR210 Expression vergleichbar mit der unter hypoxischen Bedingungen. Sie zeigten außerdem, dass miR210 als ein *in vivo* Marker für Hypoxie fungiert und die unter Normoxie exprimierten nicht für die Adaptation an Hypoxie zuständigen Gene unterdrückt. Unter Normoxie zeigte sich kein Effekt auf das Zellwachstum. Um im Verlauf

zu untersuchen, ob die Induktion von miR210 unter Hypoxie gewebe- oder zelllinienspezifisch ist, setzte die Arbeitsgruppe von Huang Kopf-Hals-, Lungen-, Nieren- und Kolonzelllinien hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub> /24 Stunden) aus. Es zeigte sich eine generelle Induktion von miR210 in allen untersuchten Gewebetypen (Huang et al., 2009) was nahelegt, dass miR210 ein HIF-1 $\alpha$  reguliertes Gen ist (Huang et al., 2009).

Im Verlauf der Tumorprogression kommt es über HIF-1 zu einer zellulären Adaptation an niedrige Sauerstoffkonzentration, wobei eine Tumorprogression trotz hypoxischer Mikromilieubedingungen ermöglicht wird (Semenza, 2003, 2010). Auf zellulärer Ebene wird die Umstellung von der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse forciert (Warburg-Effekt) (Semenza, 2007). Aus den veränderten metabolischen Abläufen resultiert ein vermehrter Laktatanfall, wobei Pouyssegur et al. zeigen konnten, dass erniedrigte intratumorale pH-Werte ein häufiges Phänomen darstellen und mit einem vermehrten Tumorwachstum, einer erhöhten Metastasierungsrate und Aktivierung Matrix-degradierender Enzyme einhergehen (Chiche, Brahimi-Horn, & Pouyssegur, 2010; Kroemer & Pouyssegur, 2008). Um im Verlauf die intra- und extrazelluläre Homöostase wieder herzustellen wird z.B. vermehrt Carboanhydrase IX (CAIX) exprimiert. Hypoxie spielt zudem eine Rolle in der Zellzyklusregulation und Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie TGF und IGF (Semenza, 2003). Darüber hinaus werden über HIF antiapoptotische Gene (z.B. BNIP3) aktiviert und p53 stabilisiert. Auf lokaler Ebene werden unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 $\alpha$  Gene wie beispielsweise VEGF aktiviert (Alaiti et al., 2012; Fasanaro et al., 2008), die die Gefäßneubildung fördern. Die Induktion von HIF ist somit eine Voraussetzung für die Adaptation des Tumors an das hypoxische Mikromilieu und die Aktivierung typischer Tumormerkmale wie Wachstum, Progression, Malignität und Angiogenese (Semenza, 1998, 2008, 2010, 2012). Interessanterweise sind neben Hypoxie eine ganze Reihe weiterer Faktoren wie z.B. tumorspezifische genetische Alterationen identifiziert worden, die HIF in Tumoren weiter induzieren (Semenza, 2003). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung und Kontrolle von HIF essentiell für die Tumorprogression ist.

Unsere Befunde zeigen, dass miR210 zu einer Induktion von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  führt und zudem auch HIF-induzierte Zielgene aktiviert. So führte die Überexpression von miR210 unter hypoxischen (1%O<sub>2</sub>) Bedingungen zu einem Anstieg, der Knockdown von miR210 zu einer Reduktion der HIF-Targetgene Carboanhydrase IX und VEGF-A auf mRNA Ebene. In Übereinstimmung führte die miR210 Überexpression in primären humanen Glioblastomzelllinien (GBM046X) unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub> für 96h) Bedingungen zu einer Stabilisierung der

hypoxieinduzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Der Knockdown von miR210 hingegen führte zu einer verminderten Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Unsere Befunde bestätigen bisherige Beobachtungen, die zeigen, dass miR210 HIF-1 induziert. So wiesen Kelly et al. nach, dass miR210 zu einer Repression von GPD1L führt, was mit einer Reduktion der Aktivität von PHDs einhergeht und HIF-1 aktiviert (Kelly et al., 2011). Insgesamt lassen diese Befunde den Schluss zu, dass miR210 als Teil eines feedforward loops agiert, in dem die Hypoxie vermittelte HIF-1 Induktion zur Hochregulation von miR210 führt, die wiederum die Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  verstärkt.

#### **4.2. Die Rolle von miR210 in der Induktion des Stammzellphänotyps**

Im Jahre 2002 konnten aus Hirntumoren erstmalig Zellen isoliert werden, welche sich durch die Fähigkeit auszeichneten, *in vitro* Sphären auszubilden (Ignatova et al., 2002; Stopschinski, Beier, & Beier, 2013). In zahlreichen Arbeiten wurden seitdem die Charakteristika von Gliomstammzellen beschrieben (Galli et al., 2004; Reya et al., 2001; Singh et al., 2003; Singh, Hawkins, et al., 2004). Dazu gehört *in vitro* die Sphärenbildung und Expression von Stammzellmarkern (Vescovi et al., 2006), *in vivo* die Fähigkeit zur Tumorausbildung, Differenzierung und Selbsterneuerung. Zahlreiche Studien der letzten Jahre lassen den Schluss zu, dass die Tumorentstehung, hohe Rezidivneigung und Therapieresistenz Krebsstammzellen bzw. Tumorzellen mit einem Stammzellphänotyp zuzuschreiben ist (Singh, Clarke, et al., 2004; Singh et al., 2003; Sundar, Hsieh, Manjila, Lathia, & Sloan, 2014; Vescovi et al., 2006). Intratumorale Krebsstammzellen befinden sich in einer Art „Ruhestadium oder Winterschlaf“ und weisen eine reduzierte Zellzykluskinetik auf, was dazu führt, dass Krebsstammzellen häufig resistent gegenüber radio- und chemotherapeutischen Ansätzen sind. Daneben sind Krebsstammzellen bevorzugt in für sie spezifischen perivaskulären Nischen (Gilbertson & Rich, 2007) und am Rand hypoxischer Nekrosen lokalisiert (Calabrese et al., 2007; Keith & Simon, 2007; Pistollato et al., 2010; Schiffer et al., 2014; Seidel et al., 2010), was die Tumorentstehung, Ausbreitung, Metastasierung und Rezidiventstehung begünstigt und die Therapieeffektivität reduziert (Filatova et al., 2013). So konnten CD133<sup>+</sup> Phänotypen, abhängig von Ihrer Lokalisation, differenziert werden (Christensen, Schroder, & Kristensen, 2008, 2011; Hambardzumyan & Bergers, 2015; Ricci-Vitiani et al., 2010). Wang et al. konnten in Glioblastomen zeigen, dass sich unter CD133<sup>+</sup> Krebsstammzellen eine Subpopulation von Endothel-Progenitorzellen mit den gleichen somatischen Mutationen wie in den Tumorzellen fanden (R. Wang et al., 2010).

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten *in vitro* zeigen, dass unter hypoxischer Kultivierung die Bildung von Tumorsphären zunahm (Griguer et al., 2008; Heddleston et al., 2009; Soeda et al., 2009) und Hypoxie den Stammzellphänotyp und die Expression von Stammzellmarkern wie z.B. Oct4, Sox2 und CD133 über HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  (Bar, Lin, Mahairaki, Matsui, & Eberhart, 2010; Heddleston et al., 2009; Seidel et al., 2010) induziert. Um eine mögliche Verbindung der miR210 induzierten HIF-Expression auf stammzellphänotypische Eigenschaften zu untersuchen, haben wir in primären Glioblastomzelllinien, die unter Stammzellbedingungen kultiviert werden, miR210 überexprimiert bzw. reduziert und Sphärenformationsassays durchgeführt. Durch die Überexpression von miR210 konnten wir eine signifikante Zunahme der Sphärenbildung beobachten. Die Zunahme stützt unsere Hypothese, dass miR210 die Selbsterneuerungskapazität bzw. den Stammzellphänotyp fördert. Umgekehrt führte die Reduktion von miR210, übereinstimmend zu den Resultaten von Yang et al., zu einer Abnahme der Sphärenbildung. Die Arbeitsgruppe hatte an humanen hypoxischen Gliomstammzellen den Einfluss von miR210 Knockdown auf Stammzeleigenschaften untersucht und neben der reduzierten Sphärenbildung eine verminderte Expression des Stammzellmarkers CD133 nachgewiesen (Yang, Wei, Guo, Shen, & Liu, 2014), was auf einen antitumorigenen Effekt des miR210 Knockdown rückschließen lässt. Korrelierend mit den Ergebnissen von Li et al., die gezeigt haben, dass hypoxieinduzierbare Faktoren, - insbesondere HIF-2 $\alpha$  und HIF-regulierte Gene - bevorzugt in Krebsstammzellen, - weniger in differenzierten Tumorzellen und neuronalen Progenitorzellen - exprimiert werden, führt die Reduktion von HIF *in vitro* in Gliomstammzellen zu einer Reduktion der Selbsterneuerungskapazität und *in vivo* zu einem reduzierten Potential der Tumorigenität von Gliomstammzellen (Z. Li et al., 2009).

Das Glykoprotein CD133, auch Prominin genannt, wurde erstmals 1997 in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben und wird seit den Untersuchungen von Singh et al. und anderen Arbeitsgruppen als Marker für Tumorstammzellen, insbesondere des Glioblastoms, angesehen (Singh, Clarke, et al., 2004; Singh et al., 2003; Soeda et al., 2009).

In ähnlicher Weise konnten wir zeigen, dass der Knockdown von miR210 die Expression des Stammzellmarkers CD133 reduziert, die Überexpression von miR210 hingegen die CD133 Expression erhöht. Um *in vitro* die Anzahl CD133 positiver Zellen zu ermitteln, wurden durchflusszytometrische Analysen (FACS) zur quantitativen Bestimmung der Stammzellpopulation durchgeführt. Wir konnten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>)- und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen einen hoch signifikanten Anstieg CD133 positiver Zellen nachweisen. Ein wegweisender Aspekt war hier, dass das etablierte Phänomen

der hypoxieinduzierten Expression des Stammzellmarkers CD133 durch die Überexpression von miR210 zusätzlich gesteigert werden konnte, was auf einen direkten Einfluss von miR210 auf den Stammzellphänotyp im Glioblastom schließen lässt. Hingegen führte die Reduktion von miR210 mittels Knock-down zu einer Reduktion des hypoxiebedingten Anstiegs CD133 positiver Zellen auf das Niveau der Kontrollzellen unter normoxischen Bedingungen. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse unsere Hypothese, dass die Hypoxie induzierte miR210 den Stammzellphänotyp vermutlich über die Expressionssteigerung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  fördert.

### 4.3. Der Einfluss von miRNA's (miR210) auf die Tumorprogression

Ein Hauptcharakteristikum für die Definition von Tumorstammzellen ist die Fähigkeit zur Tumorentstehung *in vivo* (Singh, Hawkins, et al., 2004). Nachdem wir *in vitro* an kultivierten Glioblastomzelllinien zeigen konnten, dass miR210 Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerungskapazität und Proliferation fördert, interessierte uns, ob wir diese Mechanismen auf unsere intrakraniellen Xenograft-Transplantationsmodelle der Maus übertragen können. Wir haben miR210 überexprimiert bzw. über Knock-down reduziert, um an primären Glioblastomzelllinien GBM046X den Einfluss von miR210 auf das Tumorstadium zu untersuchen. Die *in vivo* Ergebnisse deckten sich hierbei mit unseren vorausgegangenen *in vitro* Resultaten. Wir konnten *in vivo* zeigen, dass die Überexpression von miR210 mit einer deutlichen Zunahme, der Knockdown mit einer Reduktion des Tumorstadiums, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltumoren, einherging. Um zu zeigen, dass unsere Beobachtungen nicht zelllinienspezifisch sind, haben wir miR210 zusätzlich in einer etablierten Glioblastomzelllinie (G55) überexprimiert und konnten auch hier eine Zunahme des Tumorstadiums nachweisen. In Übereinstimmung mit unseren *in vitro* Befunden, die zeigen, dass miR210 HIF und HIF-Targetgene -wie beispielsweise den proangiogenen Faktor VEGF- induzieren, führte die miR210 Überexpression zu einer erhöhten Tumorstadiumsdichte, was möglicherweise in kausalem Zusammenhang mit dem signifikant erhöhten Tumorstadium steht.

Der Einfluss von miR210 auf das Tumorstadium wurde in verschiedenen soliden Tumorentitäten untersucht. Die Arbeitsgruppe um Ying et al. hat beispielsweise am Hepatozellulären Karzinom (HCC) gezeigt, dass die Überexpression von miR210 die zelluläre Adaptation an Hypoxie, das Tumorstadium und das Invasions- und Metastasierungsverhalten beeinflusst, indem durch ein Downstreamtarget (vakuolenmembran Protein 1; VPM1), das negativ mit der miR210 Expression korreliert und unter Hypoxie reduziert exprimiert wird, die Hypoxie-induzierte Metastasierung hepatozellulärer Karzinome begünstigt wird (Ying et al., 2011). Yang et al. hingegen untersuchten die Knockdown Effekte von miR210. Die Arbeitsgruppe hatte miR210

downregulierte humane Hepatomzellen SMMC-7721 subkutan in Nacktmäuse implantiert und konnte ein deutlich verzögertes Tumorwachstum nachweisen (Yang, Wei, Sun, & Liu, 2013). Daneben führte die miR210 Downregulation an humanen Hepatomzellen zu einer Zunahme apoptotischer Zellen und einer Abnahme der Proliferationsrate (Yang et al., 2012).

Unsere Ergebnisse bestätigen die Daten von Ying et al. und Yang et al. und unterstützen eine pro-tumorigene Rolle von miR210, die auch durch verschiedene klinische Studien gestützt wird. So haben mehrere Arbeitsgruppen die Expression verschiedener miRNA's mit den Gliomsubtypen und dem klinischen Verlauf korreliert. Die Arbeitsgruppe um Barbano et al. hat miRNA Signaturen mit verschiedenen Gliomphänotypen und aggressivem Verlauf korreliert. Sie verglichen ihre miRNA Panels mit Glioblastom Datensets des TCGA und zeigten, dass miR21 und miR210 eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese zukommt und miRNA's mögliche Ansatzpunkte in der Behandlung von Gliomen darstellen könnten (Barbano et al., 2014). Lai et al. haben Gliomgewebe der WHO Grade II-IV mit tumorfreiem Hirngewebe verglichen und konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von miR210 mit Gliomen eines histopathologisch höheren Tumorgades und niedrigem Karnofsky-Performance-Status (KPS) korrelierte. Zudem konnten sie nachweisen, dass die miR210 Expression signifikant mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben (Progression free survival)- und Gesamtüberleben (Overall survival) korrelierte (Lai, Dong, Ding, Miao, & Lin, 2014).

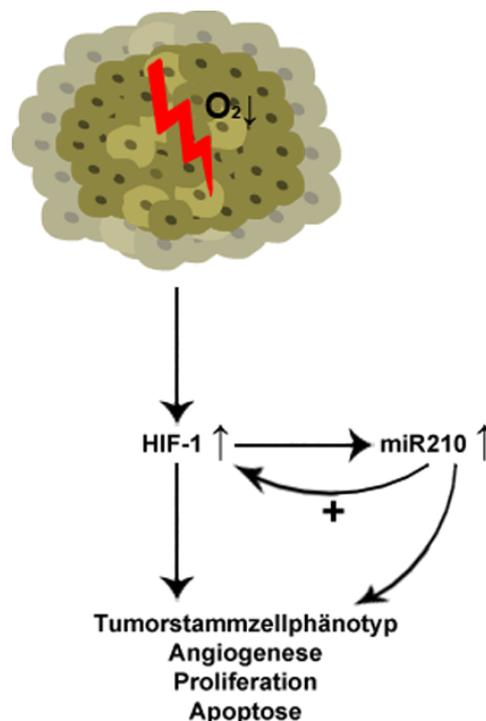
#### **4.4. Ausblick und Perspektiven - Können miR210 oder andere miRNA´s einen diagnostischen- oder therapeutischen Einfluss auf die Behandlung maligner Tumore nehmen?**

Da miRNA´s in zahlreiche die Tumorentstehung und Metastasierung betreffende Prozesse involviert sind, liegt nahe, dass wirksame diagnostische und therapeutische Weiterentwicklungen nur erreicht werden können, wenn die Zusammenhänge zwischen Tumorentstehung, Tumorwachstum, Progression und miRNA aufgedeckt werden. Die unterschiedlichen miRNA-Expressionsprofile in Tumoren und die Identifikation von Zielgenen eröffnen für maligne Tumoren neue Therapieansätze. Es ist daher gut vorstellbar, dass in Glioblastomen, wie auch durch diese Arbeit gestützt, die spezifischen miRNA Expressionsprofile und Funktionen bei der Suche nach effektiven prädiktiven Biomarkern, therapeutischen Markern und Targettherapien in Zukunft einbezogen werden.

In unterschiedlichen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass abhängig vom miRNA-Expressionsprofil ein Therapieansatz um Krankheiten zu reduzieren, bzw. Tumoren zu eliminieren, die Wiederherstellung oder Inhibition der Funktionalität der miRNA´s sein könnte. Eine Möglichkeit wäre, synthetische miRNA´s in erkranktes Gewebe zu geben, um gestörte Prozesse (Proliferation, Apoptose, Zellzyklus) wieder herzustellen. Daneben könnten miRNA´s inhibitorisch beeinflusst werden. In der Literatur wurde von Garzon et al. über anti-miRNA´s wirkende Agenzien berichtet, welche sich gegen OnkomiR´s richten (Garzon, Calin, & Croce, 2009). Außerdem könnte die Inaktivierung hypoxieinduzierter miRNA´s eine sinnvolle Strategie darstellen, hypoxische Tumoreareale, welche mit Standardtherapien nicht ausreichend behandelbar sind, zu erreichen. Mit der Kenntnis, dass miRNA´s in zahlreiche normale und pathologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert sind, führt die Entdeckung und Charakterisierung von miRNA´s und RNA basierender posttranskriptioneller epigenetischer Regulationsmechanismen zu einem Paradigmenwechsel in der Behandlung maligner Tumore, die das Überleben und die Lebensqualität an Glioblastomen erkrankter Patienten verbessern können.

Die Quantifizierung von miR210 könnte beispielsweise in künftige klinische Untersuchungen weiter integriert werden, um wertvolle Informationen über die Tumorbiologie zu erhalten, welche in relevante Therapieentscheidungen mit einbezogen werden könnten. Interessanterweise ermöglicht ein spezifischer Nachweis von miRNA´s nicht nur eine Aussage über die Tumorentität sondern eine Einteilung von Patientengruppen unterschiedlicher Prognose und entsprechender Therapie (Lages et

al., 2011; Lu et al., 2005; Scapoli et al., 2010). So konnte, nachdem es in der Gliombehandlung mit Angiogenesehemmern zu Resistenzentwicklungen gekommen war, bei an resezierten Glioblastom Gewebeproben eine Patientengruppe anhand von TCGA miRNA Expressions Daten mit „prognostisch günstigem miRNA Profil“ detektiert werden (Hayes et al., 2016; Loges, Schmidt, & Carmeliet, 2010). Daneben können microRNA's in der Differenzierung histopathologisch nicht sicher abgrenzbarer Tumorentitäten hilfreich sein. Riester et al. zeigten beispielsweise, dass die hypoxieassoziierte miR210 als Marker für die Differenzierung zwischen Osteoblastomen und Osteosarkomen herangezogen werden kann (Riester et al., 2016). In der Literatur liegen zudem Beobachtungen darüber vor, dass die miR210 Expression mit der Tumordignität in hämatologischen und soliden gastrointestinalen Tumoren korreliert. So wiesen Patienten mit diffus großzelligem B-Zell Lymphom erhöhte miR210 Werte im Serum (Lawrie et al., 2008) und an Pankreastumoren erkrankte Patienten erhöhte miR210 Level im Plasma auf (J. Wang et al., 2009). Neben den Erkenntnissen, dass hypoxischen Umgebungsbedingungen eine wesentliche Ursache für das Therapieversagen im Rahmen der Gliomtherapie zukommt, steht insbesondere die Induktion von miR210 in Hirntumoren im Fokus neuester Untersuchungen, da sie die zelluläre Adaptation an Hypoxie begünstigt (Kelly et al., 2011; Yang et al., 2014). Wie unsere Versuche zeigen, könnte miR210 künftig ein therapeutisches Target darstellen, das zu einer gezielten Eliminierung von Gliomstammzellen in hypoxischen Nischen sowie zur Inaktivierung des pro-tumorigenen HIF-Signalwegs eingesetzt werden kann.



**Abbildung 4.1.** Wechselwirkung zwischen HIF-1 und miR210

## 5. Zusammenfassung

Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste maligne Hirntumor des Erwachsenen und geht trotz multimodaler Therapie mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 12-15 Monaten einher. Das Glioblastom zeichnet sich durch eine ausgeprägte intratumorale morphologische, phänotypische und zelluläre Heterogenität u.a. mit Krebsstammzellen aus, die für die Tumorentstehung, Rezidivbildung und Therapieresistenz verantwortlich gemacht werden. Krebsstammzellen befinden sich in spezifischen perivaskulären und hypoxischen Nischen. Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen hat man in letzter Zeit den Fokus auf microRNA's gerichtet, die essentielle pro-tumorigene Eigenschaften wie Angiogenese, Zelldifferenzierung und -migration fördern und die zelluläre Adaptation an Hypoxie begünstigen.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Schlüsselmechanismen zu identifizieren, die hypoxieinduziert die Tumormalignität im Glioblastom fördern. Hierbei konnten wir eine wichtige pro-tumorigene Rolle der Hypoxie/HIF-induzierten miR210 im Glioblastom identifizieren. Methodisch wurde die miR210 Expression über lentivirale „Gain“- und „loss-of-function“ Experimente *in vitro* und *in vivo* in humanen primären und etablierten Glioblastomzellen unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen moduliert. Die Überexpression von miR210 förderte die Stammzeleigenschaften in Glioblastomen und erhöhte die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 auf Protein- bzw. mRNA- Ebene. Gleichzeitig aktivierte miR210 eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF Targetgenen (VEGF, Carboanhydrase IX). In Übereinstimmung mit einer pro-tumorigenen Rolle führte die Überexpression von miR210 zur einer signifikanten Zunahme des Tumolvolumens und der Gefäßdichte in zwei intrakraniellen Xenograftmodellen der Maus (GMB046X, G55 GBM). Hingegen reduzierte die Inhibition von miR210 über lentivirale Überexpression von antisense Oligonukleotiden den Tumorstammzellphänotyp und das Tumorwachstum.

Schlüsselerkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass miR210 eine wichtige pro-tumorigene Rolle im Glioblastom zukommt und dass die HIF-1 vermittelte miR210 Expression als Teil eines feedforward loops HIF abhängige Tumorcharakteristika wie Angiogenese oder den Tumorstammzellphänotyp, die essentiell für die Tumorprogression sind, vorantreibt. Unsere Befunde legen nahe, dass miR210 als potentieller Therapieansatzpunkt zu einer gezielten Eliminierung von Gliomstammzellen in hypoxischen Nischen sowie zur Inaktivierung des pro-tumorigenen HIF-Signalwegs herangezogen werden kann.

## 6. Summary

Glioblastoma (WHO grade IV) is the most common malignant brain tumor in adults and is associated with a median survival of only 12-15 months despite a multimodal therapy. Glioblastoma is characterized by intratumoral morphological, phenotypic and cellular heterogeneity and among others by the presence of cancer stem cells, which are responsible for tumor formation, recurrence, and resistance to therapy. Cancer stem cells reside in specific perivascular and hypoxic niches. In search for new therapeutic approaches, the focus has recently been shifted to microRNAs, which promote essential pro-tumorigenic properties such as angiogenesis, differentiation and migration and support cellular adaptation to hypoxia.

The aim of this work was to identify new key mechanisms that promote tumor malignancy in glioblastomas through hypoxia. Here, we could identify an important pro-tumorigenic role of the hypoxia /HIF induced miR210 in glioblastoma. Methodically, miR210 expression was modulated using lentiviral “gain” and “loss-of function” experiments *in vitro* and *in vivo* in human primary and established glioblastoma cells under normoxic (21% O<sub>2</sub>) and hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. The over-expression of miR210 promoted stem cell properties in glioblastomas and increased the expression of the tumor stem cell marker CD133 at the protein and /or mRNA level. Concomitantly, miR210 activated the expression of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and specific HIF target genes (VEGF, carbonic anhydrase IX). In line with a pro-tumorigenic role of miR210, the over-expression of miR210 resulted in a significant increase in tumor volume and vascularization in two intracranial xenograft mouse models (GBM046X, G55 GBM). Conversely, the inhibition of miR210 via lentiviral over-expression of antisense oligonucleotides decreased the tumor stem cell phenotype and tumor growth.

The key results of this study are, that miR210 plays an important pro-tumorigenic role in glioblastoma and furthermore that the HIF-1 mediated miR210 expression - as part of a feedforward loop- drives HIF dependent tumor characteristics such as angiogenesis or the tumor stem cell phenotype, which are essential for tumor progression. Our findings suggest that miR210 could be used as a potential therapeutic approach for targeted elimination of glioma stem cells in hypoxic niches as well as for the inactivation of the pro-tumorigenic HIF signaling pathway.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BCR-ABL	Philadelphia-Chromosom
bHLH	Basic Helix loop Helix
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting-protein 3
BRAF	Onkogen
BrdU	Bromdesoxyuridin
CA IX	Carboanhydrase
CD133	Antigen prominin-1
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CNS	Zentrales Nervensystem
CSC	Cancer stem-cells
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FACS	Durchflusszytometrie
FSC	Forward Scatter
GBM	Glioblastom
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT1	Glukosetransporter
GLUT2	Glukosetransporter
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H3F3A	Histone H3.3
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIF	Hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxic responsive element
IDH	Isozitatdehydrogenase
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IgG	Immunglobulin G
KD	Knockdown
LOH	Loss of heterozygosity
M	Mol

MDM2	Mouse double minute 2
MDM4	Mouse double minute 4
Mg	Milligramm
MGMT	MGMT-O <sup>6</sup> -methylguanin-DNA methyltransferase
Min	Minute
miRNA	Mikro-RNA
ML	Milliliter
mRNA	messenger--RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NF1	Neurofibromin 1
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NIX	Pro-apoptisches Gen
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe comb. Immunodeficiency
Oct4	octamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
ODD	sauerstoffabhängige Domäne
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PER/ARNT/SIM	Protein-Domäne

PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
PHH3	Phosphohiston H3
PIK3	Phosphatidylinositol 3-kinase
pre-MiRNA	Micro-RNA
pri-MiRNA	Primärtranskript micro-RNA
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RAS	Proto-Onkogen Rat sarcoma
RB1	Retinoblastom Tumorsuppressorprotein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Radiotherapie
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
SFU	Sphere-formation-unit
SSC	Seitwärtsstreulicht
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TdT	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TO-PRO3	TO-PRO-3 Iodide
TP53	Tumorsuppressor-Gen 53

TSC	Tuberöse Sklerose
TUNEL	TdT mediated dUTP-biotin nick end labelling
ÜE	Überexpression
VEGF	Vascular-endothelial-growth-factor
VHL	Von Hippel-Lindau
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 8. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.1.** Verteilung primärer Hirntumore und Gliome nach histologischen Subtypen gemäß CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005 -2009. Modifiziert nach (Dolecek et al., 2012).

**Abbildung 1.2.** Molekularpathologische Veränderungen in astrozytären und oligodendroglialen Gliomen. Modifiziert nach (Ohgaki & Kleihues, 2009); Reuss et al. und Weller et al. 2015

**Abbildung 1.3.** Histopathologische Charakteristika des Glioblastoms

**Abbildung 1.4.** Mögliche Abstammungslinie für die Ontogenese und Produktion von Tumorstammzellen (Tumor-initiiierende Zellen; TIC's) sowie für die Entwicklung eines Glioblastoms.

**Abbildung 1.5.** Stochastisches und Hierarchisches Modell (modifiziert nach Reya et al. 2001)

**Abbildung 1.6.** HIF-1 $\alpha$ - und miR210 Targetgene und ihre Funktionen in Tumoren (modifiziert nach Huang et al.; miR210 micromanager of the hypoxic pathway)

**Abbildung 1.7.** MicroRNA Biogenese

**Abbildung 3.1.** miR210 Überexpression induziert die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp

**Abbildung 3.2.** miR210 Überexpression erhöht die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien

**Abbildung 3.3.** *In vitro* Überexpression von miR210 induziert Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen

**Abbildung 3.4.** miR210 Überexpression erhöht Tumolvolumen und Gefäßdichte im GBM046X Xenograft-Tumormodell

**Abbildung 3.5.** miR210 Überexpression erhöht Tumolvolumen im Xenograft-Tumormodell in etablierten G55 Glioblastomzelllinien

**Abbildung 3.6.** miR210 Knockdown beeinflusst die Expression von HIF und HIF Zielgenen und induziert den Stammzellphänotyp

**Abbildung 3.7.** miR210 Knockdown reduziert die Stammzellpopulation in primären Glioblastomzelllinien

**Abbildung 3.8.** *In vitro* miR210 Knockdown beeinflusst Proliferation und Apoptose in humanen Glioblastomzellen

**Abbildung 3.9.** miR210 Knockdown reduziert Tumolvolumen und Gefäßdichte im GBM046X Xenograft-Tumormodell

**Abbildung 4.1.** Wechselwirkung zwischen HIF-1 und miRNA

## 9. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1.1.** Ausgesuchte diffuse Gliome analog der aktuellen WHO Klassifikation (Louis et al., 2016)

**Tabelle 2.1.** Geräte und Arbeitsmaterial

**Tabelle 2.2.** Chemikalien

**Tabelle 2.3.** Puffer und Lösungen

**Tabelle 2.4.** Ansetzen von Stammlösung

**Tabelle 2.5.** qPCR Programm für die SYBR Green Methode

**Tabelle 2.6.** Färbungen an Zytospins

**Tabelle 2.7.** Schema aufsteigende Alkoholreihe

**Tabelle 2.8.** Färbungen an Gewebeschnitten

## 10. Literaturverzeichnis

- Acker, T., & Plate, K. H. (2002). A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med (Berl)*, *80* (9), 562-575. doi:10.1007/s00109-002-0355-1
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Alaiti, M. A., Ishikawa, M., Masuda, H., Simon, D. I., Jain, M. K., Asahara, T., & Costa, M. A. (2012). Up-regulation of miR-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded CD34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *J Cell Mol Med*, *16*(10), 2413-2421. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01557.x
- Allegra, E., & Trapasso, S. (2012). Cancer stem cells in head and neck cancer. *Oncotargets Ther*, *5*, 375-383. doi:10.2147/OTT.S38694
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., . . . Livingston, D. M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(23), 12969-12973.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., . . . Rich, J. N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, *66*(16), 7843-7848. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1010
- Bapat, S. A., Mali, A. M., Koppikar, C. B., & Kurrey, N. K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, *65*(8), 3025-3029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3931
- Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., & Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, *177*(3), 1491-1502. doi:10.2353/ajpath.2010.091021

- Barbano, R., Palumbo, O., Pasculli, B., Galasso, M., Volinia, S., D'Angelo, V., . . . Parrella, P. (2014). A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. *PLoS One*, *9*(10), e108950. doi:10.1371/journal.pone.0108950
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., . . . Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma -derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, *67*(9), 4010 -4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
- Benson, V. S., Pirie, K., Schuz, J., Reeves, G. K., Beral, V., Green, J., & Million Women Study, C. (2013). Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study. *Int J Epidemiol*, *42*(3), 792 -802. doi:10.1093/ije/dyt072
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, *7*(4), 452 -464. doi:10.1215/S1152851705000232
- Berghoff, A. S., & Preusser, M. (2017). Targeted Therapies for Melanoma Brain Metastases. *Curr Treat Options Neurol*, *19*(4), 13. doi:10.1007/s11940 -017-0449-2
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J*, *22*(16), 4082 -4090. doi:10.1093/emboj/cdg392
- Blau, H. M., Brazelton, T. R., & Weimann, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, *105*(7), 829 -841.
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, *3*(7), 730-737.

- Bruce, W. R., & Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*, *199*, 79-80.
- Cai, H., Lin, L., Cai, H., Tang, M., & Wang, Z. (2013). Prognostic evaluation of microRNA-210 expression in pediatric osteosarcoma. *Med Oncol*, *30*(2), 499. doi:10.1007/s12032-013-0499-6
- Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., . . . Mehta, M. (2013). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*, *31*(3), 337-343. doi:10.1200/JCO.2012.43.2674
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., . . . Gilbertson, R. J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, *11*(1), 69 -82. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.020
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down -regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(24), 15524 -15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Camps, C., Buffa, F. M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., . . . Ragoussis, J. (2008). hsa -miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*, *14*(5), 1340 -1348. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1755
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, *407*(6801), 249 -257. doi:10.1038/35025220
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA -21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, *65*(14), 6029 -6033. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0137
- Chan, Y. C., Banerjee, J., Choi, S. Y., & Sen, C. K. (2012). miR -210: the master hypoxamir. *Microcirculation*, *19*(3), 215 -223. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00154.x

- Charles, N., & Holland, E. C. (2010). The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle*, *9*(15), 3012 -3021. doi:10.4161/cc.9.15.12710
- Chen, R., Nishimura, M. C., Bumbaca, S. M., Kharbanda, S., Forrest, W. F., Kasman, I. M., . . . Phillips, H. S. (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, *17*(4), 362 -375. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.049
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med*, *14*(4), 771 -794. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
- Chinot, O. L., Nishikawa, R., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Cloughesy, T., . . . Wick, W. (2016). Upfront bevacizumab may extend survival for glioblastoma patients who do not receive second-line therapy: an exploratory analysis of AVAglio. *Neuro Oncol*. doi:10.1093/neuonc/now046
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., . . . Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, *370*(8), 709 -722. doi:10.1056/NEJMoa1308345
- Cho, W. C., Chow, A. S., & Au, J. S. (2009). Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer*, *45*(12), 2197 -2206. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.039
- Christensen, K., Schroder, H. D., & Kristensen, B. W. (2008). CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol*, *90*(2), 157 -170. doi:10.1007/s11060-008-9648-8
- Christensen, K., Schroder, H. D., & Kristensen, B. W. (2011). CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes. *J Neurooncol*, *104*(1), 129 -143. doi:10.1007/s11060-010-0488-y

- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, *65*(23), 10946 -10951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
- Crowe, D. L., Parsa, B., & Sinha, U. K. (2004). Relationships between stem cells and cancer stem cells. *Histol Histopathol*, *19*(2), 505 -509.
- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, *58*, 267-284. doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., . . . Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(24), 10158 -10163. doi:10.1073/pnas.0703478104
- Dang, K., & Myers, K. A. (2015). The role of hypoxia -induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci*, *16*(3), 6353 -6372. doi:10.3390/ijms16036353
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., . . . Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949 -954. doi:10.1038/nature00766
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, *8*(9), 705 -713. doi:10.1038/nrc2468
- Dings, J., Jager, A., Meixensberger, J., & Roosen, K. (1998). Brain tissue pO<sub>2</sub> and outcome after severe head injury. *Neurol Res*, *20 Suppl 1*, S71-75.
- Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., & Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*, *14 Suppl 5*, v1-49. doi:10.1093/neuonc/nos218
- Druker, B. (2001). Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*, *38*(3 Suppl 8), 9 -14.

- Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., . . . Jenkins, R. B. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*, *372*(26), 2499-2508. doi:10.1056/NEJMoa1407279
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., . . . De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, *15*(3), 504 -514. doi:10.1038/sj.cdd.4402283
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, *6*(4), 259 -269. doi:10.1038/nrc1840
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154 -156.
- Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., . . . Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, *65*(20), 9328 -9337. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1343
- Farrell, C. J., & Plotkin, S. R. (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin*, *25*(4), 925 -946, viii. doi:10.1016/j.ncl.2007.07.008
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., . . . Martelli, F. (2008). MicroRNA -210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, *283*(23), 15878 -15883. doi:10.1074/jbc.M800731200
- Fasanaro, P., Greco, S., Lorenzi, M., Pescatori, M., Brioschi, M., Kulshreshtha, R., . . . Martelli, F. (2009). An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *J Biol Chem*, *284*(50), 35134 -35143. doi:10.1074/jbc.M109.052779
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, *9*(6), 669 -676. doi:10.1038/nm0603-669

- Filatova, A., Acker, T., & Garvalov, B. K. (2013). The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(2), 2496 -2508. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.008
- Filbin, M. G., & Suva, M. L. (2016). Gliomas Genomics and Epigenomics: Arriving at the Start and Knowing It for the First Time. *Annu Rev Pathol*, *11*, 497-521. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044208
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, *9*(2), 102 -114. doi:10.1038/nrg2290
- Foekens, J. A., Sieuwerts, A. M., Smid, M., Look, M. P., de Weerd, V., Boersma, A. W., . . . Martens, J. W. (2008). Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(35), 13021 -13026. doi:10.1073/pnas.0803304105
- Forge, A., Li, L., Corwin, J. T., & Nevill, G. (1993). Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science*, *259*(5101), 1616 -1619.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, *16*(9), 4604 -4613.
- Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., . . . Cloughesy, T. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, *27*(28), 4733 -4740. doi:10.1200/JCO.2008.19.8721
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., . . . Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, *64*(19), 7011 -7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Garlanda, C., & Dejana, E. (1997). Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *17*(7), 1193 -1202.

- Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, 60, 167-179. doi:10.1146/annurev.med.59.053006.104707
- Gee, H. E., Camps, C., Buffa, F. M., Patiar, S., Winter, S. C., Betts, G., . . . Harris, A. L. (2010). hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer*, 116(9), 2148 -2158. doi:10.1002/cncr.25009
- Gee, H. E., Ivan, C., Calin, G. A., & Ivan, M. (2014). HypoxamiRs and cancer: from biology to targeted therapy. *Antioxid Redox Signal*, 21(8), 1220 -1238. doi:10.1089/ars.2013.5639
- Geng, S. Q., Alexandrou, A. T., & Li, J. J. (2014). Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett*, 349(1), 1 -7. doi:10.1016/j.canlet.2014.03.036
- Gilbertson, R. J., & Rich, J. N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 733 -736. doi:10.1038/nrc2246
- Greither, T., Grochola, L. F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P., & Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*, 126(1), 73-80. doi:10.1002/ijc.24687
- Griguer, C. E., Oliva, C. R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D. J., Lancaster, J. R., Jr., & Gillespie, G. Y. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One*, 3(11), e3655. doi:10.1371/journal.pone.0003655
- Grips, E., Wentzensen, N., Sutter, C., Sedlacek, O., Gebert, J., Weigel, R., . . . Hennerici, M. (2002). [Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome]. *Nervenarzt*, 73(2), 177 -182.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., . . . Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23 -34.

- Hambardzumyan, D., & Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer*, *1*(4), 252 -265. doi:10.1016/j.trecan.2015.10.009
- Hardell, L., & Carlberg, M. (2009). Mobile phones, cordless phones and the risk for brain tumours. *Int J Oncol*, *35*(1), 5 -17.
- Hayes, J., Thygesen, H., Gregory, W., Westhead, D. R., French, P. J., Van Den Bent, M. J., . . . Short, S. C. (2016). A validated microRNA profile with predictive potential in glioblastoma patients treated with bevacizumab. *Mol Oncol*. doi:10.1016/j.molonc.2016.06.004
- Heddleston, J. M., Hitomi, M., Venere, M., Flavahan, W. A., Yang, K., Kim, Y., . . . Hjelmeland, A. B. (2011). Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment. *Curr Pharm Des*, *17*(23), 2386 -2401.
- Heddleston, J. M., Li, Z., Lathia, J. D., Bao, S., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. ( 2010). Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*, *102*(5), 789 - 795. doi:10.1038/sj.bjc.6605551
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, *8*(20), 3274 -3284.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., . . . Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 997 -1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Mesterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., & Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(25), 15178 - 15183. doi:10.1073/pnas.2036535100
- Henze, A. T., & Acker, T. (2010). Feedback regulators of hypoxia -inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*, *9*(14), 2749 -2763. doi:10.4161/cc.9.14.12591

- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., . . . Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, *1*(3), 313 -323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hjelmeland, A. B., Lathia, J. D., Sathornsumetee, S., & Rich, J. N. (2011). Twisted tango: brain tumor neurovascular interactions. *Nat Neurosci*, *14*(11), 1375 - 1381. doi:10.1038/nn.2955
- Hopewell, J. W., & Wright, E. A. (19 69). The importance of implantation site in cerebral carcinogenesis in rats. *Cancer Res*, *29*(11), 1927 -1931.
- Huang, X., Ding, L., Bennewith, K. L., Tong, R. T., Welford, S. M., Ang, K. K., . . . Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia -inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell*, *35*(6), 856 -867. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.006
- Huang, X., Le, Q. T., & Giaccia, A. J. (2010). MiR -210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med*, *16*(5), 230 -237. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.004
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA -interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, *293*(5531), 834 -838. doi:10.1126/science.1062961
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., & Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem -like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, *39*(3), 19 3-206. doi:10.1002/glia.10094
- Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D. C., Michelson, K. S., Gunzler, V., Kondo, K., . . . Kaelin, W. G., Jr. (2002). Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(21), 13459 -13464. doi:10.1073/pnas.192342099

- Jain, D., Sharma, M. C., Sarkar, C., Deb, P., Gupta, D., & Mahapatra, A. K. (2006). Correlation of diagnostic yield of stereotactic brain biopsy with number of biopsy bits and site of the lesion. *Brain Tumor Pathol*, *23*(2), 71 -75. doi:10.1007/s10014-006-0204-y
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, *307*(5706), 58 -62. doi:10.1126/science.1104819
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, *271*(30), 17771 -17778.
- Joo, K. M., Kim, S. Y., Jin, X., Song, S. Y., Kong, D. S., Lee, J. I., . . . Nam, D. H. (2008). Clinical and biological implications of CD133 -positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest*, *88*(8), 808 -815. doi:10.1038/labinvest.2008.57
- Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia -inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, *129*(3), 465 -472. doi:10.1016/j.cell.2007.04.019
- Kelly, T. J., Souza, A. L., Clish, C. B., & Puigserver, P. (2011). A hypoxia -induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol*, *31*(13), 2696 -2706. doi:10.1128/MCB.01242-10
- Kernohan, J. W., Mabon, R. F., & et al. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, *24*(3), 71 -75.
- Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., . . . Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, *121*(6), 823 -835. doi:10.1016/j.cell.2005.03.032
- Kim, J. H., Kim, J. H., Park, J. A., Lee, S. W., Kim, W. J., Yu, Y. S., & Kim, K. W. (2006). Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*, *39*(4), 339 -345.

- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, *61*(3), 215 -225; discussion 226-219.
- Knight, S. W., & Bass, B. L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR -1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *293*(5538), 2269 -2271. doi:10.1126/science.1062039
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., . . . Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, *37*(5), 495-500. doi:10.1038/ng1536
- Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, *13*(6), 472 -482. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.005
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F. J., . . . Ivan, M. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*, *27*(5), 1859 -1867. doi:10.1128/MCB.01395-06
- Kwak, E. L., Bang, Y. J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., . . . Iafrate, A. J. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, *363*(18), 1693 -1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448
- Lages, E., Guttin, A., El Atifi, M., Ramus, C., Ipas, H., Dupre, I., . . . Issartel, J. P. (2011). MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One*, *6*(5), e20600. doi:10.1371/journal.pone.0020600
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853 -858. doi:10.1126/science.1064921
- Lai, N. S., Dong, Q. S., Ding, H., Miao, Z. L., & Lin, Y. C. (2014). MicroRNA -210 overexpression predicts poorer prognosis in glioma patients. *J Clin Neurosci*, *21*(5), 755 -760. doi:10.1016/j.jocn.2013.06.024

- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, *295*(5556), 858 -861. doi:10.1126/science.1068592
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645 -648. doi:10.1038/367645a0
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. ( 2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 858 -862. doi:10.1126/science.1065062
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., . . . Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour -associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, *141*(5), 672 -675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., & Kim, K. W. (2004). Hypoxia - inducible factor (HIF -1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, *36*(1), 1 -12. doi:10.1038/emm.2004.1
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543) , 862-864. doi:10.1126/science.1065329
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843 -854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415 - 419. doi:10.1038/nature01957
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, *21*(17), 4663 - 4670.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, *23*(20), 4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., . . . Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, *67*(3), 1030-1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., . . . Rich, J. N. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, *15*(6), 501 -513. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018
- Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2012). HIF -1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol*, *56*(5 -6), 245 -251. doi:10.1016/j.vph.2012.02.006
- Loges, S., Schmidt, T., & Carmeliet, P. (2010). Mechanisms of resistance to anti -angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer*, *1*(1), 12 -25. doi:10.1177/1947601909356574
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., . . . Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, *114*(2), 97 -109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis, D. N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D. W., Reifenberger, G., von Deimling, A., . . . International Society Of, N.-H. (2014). International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*, *24*(5), 429 -435. doi:10.1111/bpa.12171
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., . . . Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, *131*(6), 803 -820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., . . . Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(7043), 834 -838. doi:10.1038/nature03702
- Ma, S., Chan, K. W., Hu, L., Lee, T. K., Wo, J. Y., Ng, I. O., . . . Guan, X. Y. (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, *132*(7), 2542 -2556. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.025
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., . . . Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, *452*(7187), 650 -653. doi:10.1038/nature06835
- Malmstrom, A., Gronberg, B. H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., . . . Nordic Clinical Brain Tumour Study, G. (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *13*(9), 916 -926. doi:10.1016/S1470-2045(12)70265 -6
- Malzkorn, B., Wolter, M., Liesenberg, F., Grzendowski, M., Stuhler, K., Meyer, H. E., & Reifenberger, G. (2010). Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol*, *20*(3), 539 -550. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00328.x
- Matsui, W., Huff, C. A., Wang, Q., Malehorn, M. T., Barber, J., Tanhehco, Y., . . . Jones, R. J. (2004). Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, *103*(6), 2332 -2336. doi:10.1182/blood-2003-09-3064
- McCormick, R. I., Blick, C., Ragoussis, J., Schoedel, J., Mole, D. R., Young, A. C., . . . Harris, A. L. (2013). miR -210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. *Br J Cancer*, *108*(5), 1133 -1142. doi:10.1038/bjc.2013.56
- Melillo, G. (2006). Inhibiting hypoxia -inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res*, *4*(9), 601 -605. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0235

- Miko, E., Czimmerer, Z., Csanky, E., Boros, G., Buslig, J., Dezso, B., & Scholtz, B. (2009). Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Exp Lung Res*, *35*(8), 646 -664. doi:10.3109/01902140902822312
- Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, *88*(3), 287 -298.
- Nakada, C., Tsukamoto, Y., Matsuura, K., Nguyen, T. L., Hijjiya, N., Uchida, T., . . . Moriyama, M. (2011). Overexpression of miR -210, a downstream target of HIF1alpha, causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*, *224*(2), 280 -288. doi:10.1002/path.2860
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106 -110. doi:10.1038/nature05372
- Ohgaki, H. (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, *25*(1), 1 - 7.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, *109*(1), 93 -108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, *170*(5), 1445 -1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*, *100*(12), 2235 -2241. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., . . . Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*, *15 Suppl 2*, ii1-56. doi:10.1093/neuonc/not151
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., . . . Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central

- Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 4, iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189
- Papaconstantinou, I. G., Manta, A., Gazouli, M., Lyberopoulou, A., Lykoudis, P. M., Polymeneas, G., & Voros, D. (2013). Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas*, 42(1), 67 - 71. doi:10.1097/MPA.0b013e3182592ba7
- Park, C. H., Bergsagel, D. E., & McCulloch, E. A. (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst*, 46(2), 411 -422.
- Pistollato, F., Abbadì, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., . . . Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*, 28(5), 851 - 862. doi:10.1002/stem.415
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., . . . Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65(13), 5506 -5511. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., . . . Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 973 -978. doi:10.1073/pnas.0610117104
- Qiu, S., Lin, S., Hu, D., Feng, Y., Tan, Y., & Peng, Y. (2013). Interactions of miR - 323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J Transl Med*, 11, 10. doi:10.1186/1479-5876-11-10
- Qu, A., Du, L., Yang, Y., Liu, H., Li, J., Wang, L., . . . Wang, C. (2014). Hypoxia - inducible MiR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer. *PLoS One*, 9(3), e90952. doi:10.1371/journal.pone.0090952

- Redova, M., Poprach, A., Besse, A., Iliev, R., Nekvindova, J., Lakomy, R., . . . Slaby, O. (2013). MiR -210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*, *34*(1), 481 -491. doi:10.1007/s13277-012-0573-2
- Reuss, D. E., Kratz, A., Sahm, F., Capper, D., Schrimpf, D., Koelsche, C., . . . von Deimling, A. (2015). Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathol*, *130*(3), 407 - 417. doi:10.1007/s00401-015-1454-8
- Reuss, D. E., Sahm, F., Schrimpf, D., Wiestler, B., Capper, D., Koelsche, C., . . . von Deimling, A. (2015). ATRX and IDH1 -R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol*, *129*(1), 133 -146. doi:10.1007/s00401-014-1370-3
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105 -111. doi:10.1038/35102167
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF -responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, *12*(11), 4565 -4574.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707 -1710.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., . . . De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, *468*(7325), 824 -828. doi:10.1038/nature09557
- Riester, S. M., Torres-Mora, J., Dudakovic, A., Camilleri, E. T., Wang, W., Xu, F., . . . van Wijnen, A. J. (2016). Hypoxia -related microRNA-210 is a diagnostic marker for discriminating osteoblastoma and osteosarcoma. *J Orthop Res*. doi:10.1002/jor.23344

- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, *14*(10A), 1902 -1910. doi:10.1101/gr.2722704
- Rojiani, A. M., & Dorovini-Zis, K. (1996). Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Neurosurg*, *85*(6), 1078 -1084. doi:10.3171/jns.1996.85.6.1078
- Rubinstein, L. J. (1972). Presidential address. Cytogenesis and differentiation of primitive central neuroepithelial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, *31*(1), 7-26.
- Ruiz i Altaba, A., Sanchez, P., & Dahmane, N. (2002). Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer*, *2*(5), 361 -372. doi:10.1038/nrc796
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, *294*(5543), 797 -799. doi:10.1126/science.1066315
- Saito, T., & Saetrom, P. (2010). MicroRNAs --targeting and target prediction. *N Biotechnol*, *27*(3), 243 -249. doi:10.1016/j.nbt.2010.02.016
- Salceda, S., & Caro, J. (1997). Hypoxia -inducible factor 1alpha (HIF -1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, *272*(36), 22642 -22647.
- Sanchez-Ortiga, R., Boix Carreno, E., Moreno-Perez, O., & Pico Alfonso, A. (2009). [Glioblastoma multiforme and multiple endocrine neoplastic type 2 A]. *Med Clin (Barc)*, *133* (5), 196 -197. doi:10.1016/j.medcli.2008.06.021
- Sandmann, T., Bourgon, R., Garcia, J., Li, C., Cloughesy, T., Chinot, O. L., . . . Bais, C. (2015). Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J Clin Oncol*, *33*(25), 2735 -2744. doi:10.1200/JCO.2015.61.5005

- Satzger, I., Mattern, A., Kuettler, U., Weinspach, D., Voelker, B., Kapp, A., & Gutzmer, R. (2010). MicroRNA -15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer*, *126*(11), 2553 -2562. doi:10.1002/ijc.24960
- Scapoli, L., Palmieri, A., Lo Muzio, L., Pezzetti, F., Rubini, C., Girardi, A., . . . Carinci, F. (2010). MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol*, *23*(4), 1229 - 1234.
- Schiffer, D., Mellai, M., Annovazzi, L., Caldera, V., Piazzzi, A., Denysenko, T., & Melcarne, A. (2014). Stem cell niches in glioblastoma: a neuropathological view. *Biomed Res Int*, *2014*, 725921. doi:10.1155/2014/725921
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X. Y., Jones, D. T., Pfaff, E., Jacob, K., . . . Jandolo, N. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, *482*(7384), 226 -231. doi:10.1038/nature10833
- Seidel, S., Garvalov, B. K., & Acker, T. (2015). Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. *Methods Mol Biol*, *1235*, 263-275. doi:10.1007/978-1-4939-1785-3\_19
- Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., . . . Acker, T. (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*, *133*(Pt 4), 983 -995. doi:10.1093/brain/awq042
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia -inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, *8*(5), 588 -594.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF -1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *3*(10), 721-732. doi:10.1038/nrc1187
- Semenza, G. L. (2007). HIF -1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr*, *39*(3), 231 -234. doi:10.1007/s10863-007-9081-2

- Semenza, G. L. (2008). Hypoxia -inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life*, *60*(9), 591 -597. doi:10.1002/iub.93
- Semenza, G. L. (2010). Defining the role of hypoxia -inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, *29*(5), 625 -634. doi:10.1038/onc.2009.441
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia -inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, *33*(4), 207 -214. doi:10.1016/j.tips.2012.01.005
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, *12*(12), 5447 -5454.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., & Dirks, P. B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, *23*(43), 7267 -7273. doi:10.1038/sj.onc.1207946
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, *63*(18), 5821 -5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., . . . Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396 -401. doi:10.1038/nature03128
- Slamon, D., & Pegram, M. (2001). Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol*, *28*(1 Suppl 3), 13 -19.
- Sneddon, J. B., & Werb, Z. (2007). Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell*, *1*(6), 607 -611. doi:10.1016/j.stem.2007.11.009
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., . . . Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133 -positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, *28*(45), 3949-3959. doi:10.1038/onc.2009.252

- Stopschinski, B. E., Beier, C. P., & Beier, D. (2013). Glioblastoma cancer stem cells - from concept to clinical application. *Cancer Lett*, *338*(1), 32 -40. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.033
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H. J., & Group, A. L.-G. S. (2006). Fluorescence -guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, *7*(5), 392 -401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665 -9
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (20 09). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, *10*(5), 459 -466. doi:10.1016/S1470-2045(09) 70025-7
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 987 -996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D. T., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., . . . Pfister, S. M. (2014). Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*, *14*(2), 92 -107. doi:10.1038/nrc3655
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D. A., Jones, D. T., Konermann, C., . . . Pfister, S. M. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*, *22*(4), 425 -437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
- Sullivan, R., & Graham, C. H. (2007). Hypoxia -driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev*, *26*(2), 319 -331. doi:10.1007/s10555-007-9062-2

- Sundar, S. J., Hsieh, J. K., Manjila, S., Lathia, J. D., & Sloan, A. (2014). The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus*, *37*(6), E6. doi:10.3171/2014.9.FOCUS14494
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *23*(10), 1985 - 1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- Tilgner, J., Herr, M., Ostertag, C., & Volk, B. (2005). Validation of intraoperative diagnoses using smear preparations from stereotactic brain biopsies: intraoperative versus final diagnosis--influence of clinical factors. *Neurosurgery*, *56*(2), 257 -265; discussion 257-265.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., . . . Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(26), 14720 -14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720
- Vaksman, O., Stavnes, H. T., Kaern, J., Trope, C. G., Davidson, B., & Reich, R. (2011). miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma. *J Cell Mol Med*, *15*(7), 1593 -1602. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01148.x
- van den Bent, M. J., Brandes, A. A., Taphoorn, M. J., Kros, J. M., Kouwenhoven, M. C., Delattre, J. Y., . . . Hoang-Xuan, K. (2013). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*, *31*(3), 344 -350. doi:10.1200/JCO.2012.43.2229
- Vaupel, P., & Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*, *9 Suppl 5*, 4-9. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-4
- Vaupel, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, *26*(2), 225 -239. doi:10.1007/s10555-007-9055-1

- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., . . . Cancer Genome Atlas Research, N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, *17*(1), 98 - 110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
- Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*, *6*(6), 425 -436. doi:10.1038/nrc1889
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., . . . Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(7), 2257 -2261. doi:10.1073/pnas.0510565103
- Wang, J., Chen, J., Chang, P., LeBlanc, A., Li, D., Abbruzzesse, J. L., . . . Sen, S. (2009). MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)*, *2*(9), 807 -813. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0094
- Wang, J., Sakariassen, P. O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S. O., Svendsen, A., . . . Enger, P. O. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, *122*(4 ), 761 -768. doi:10.1002/ijc.23130
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., . . . Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem -like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, *468*(7325), 829 -833. doi:10.1038/nature09624
- Weller, M., Weber, R. G., Willscher, E., Riehmer, V., Hentschel, B., Kreuz, M., . . . Reifenberger, G. (2015). Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. *Acta Neuropathol*, *129*(5), 679 -693. doi:10.1007/s00401-015-1409-0
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., . . . Society, N. O. A. S. G. o. N.-o. W. G. o. G. C. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the

- NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13(7), 707 -715. doi:10.1016/S1470-2045(12)70164 -X
- Wick, W., Wiestler, B., & Platten, M. (2015). Treatment of anaplastic glioma. *Cancer Treat Res*, 163, 89-101. doi:10.1007/978-3-319-12048-5\_6
- Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., . . . Harris, A. L. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*, 60(24), 7075 -7083.
- Xu, Y., Huang, J., Ma, L., Shan, J., Shen, J., Yang, Z., . . . Qian, C. (2016). MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by targeting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways. *Cancer Lett*, 371(2), 171-181. doi:10.1016/j.canlet.2015.11.034
- Yang, W., Sun, T., Cao, J., Liu, F., Tian, Y., & Zhu, W. (2012). Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro. *Exp Cell Res*, 318(8), 944 -954. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.010
- Yang, W., Wei, J., Guo, T., Shen, Y., & Liu, F. (2014). Knockdown of miR-210 decreases hypoxic glioma stem cells stemness and radioresistance. *Exp Cell Res*, 326(1), 22 -35. doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.022
- Yang, W., Wei, J., Sun, T., & Liu, F. (2013). Effects of knockdown of miR-210 in combination with ionizing radiation on human hepatoma xenograft in nude mice. *Radiat Oncol*, 8, 102. doi:10.1186/1748-717X-8-102
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24), 3011-3016. doi:10.1101/gad.1158803
- Ying, Q., Liang, L., Guo, W., Zha, R., Tian, Q., Huang, S., . . . He, X. (2011). Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 54(6), 2064 -2075. doi:10.1002/hep.24614

- Zacher, A., Kaulich, K., Stepanow, S., Wolter, M., Kohrer, K., Felsberg, J., . . . Reifenberger, G. (2016). Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. *Brain Pathol.* doi:10.1111/bpa.12367
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., & Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, *88*(11), 2606-2618.
- Zhang, Z., Sun, H., Dai, H., Walsh, R. M., Imakura, M., Schelter, J., . . . Grandori, C. (2009). MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle*, *8*(17), 2756-2768.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., . . . Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, *59*(22), 5830-5835.
- Zulch, J. (1952). [Pathology and biology of brain neoplasms]. *Wien Med Wochenschr*, *102*(35-36), 711-715.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., . . . Giaccia, A. J. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, *14*(4), 391-396.

## 11. Publikationsverzeichnis

**BRAF-mutated pleomorphic xanthoastrocytoma is associated with temporal location, reticulin fiber deposition and CD34 expression.**

Koelsche C, Sahm F, Wöhrer A, Jeibmann A, Schittenhelm J, Kohlhof P, Preusser M, Romeike B, Dohmen-Scheufler H, Hartmann C, Mittelbronn M, Becker A, von Deimling A, Capper D.

Brain Pathol. 2014 Apr;24(3):221-9. doi: 10.1111/bpa.12111. Epub 2014 Jan 29.

**Small supratentorial, extraaxial primitive neuroectodermal tumor causing large intracerebral hematoma.**

Burkhardt JK, Kockro RA, Dohmen-Scheufler H, Woernle CM, Bellut D, Kollias S, Bertalanffy H.

Neurol Med Chir (Tokyo). 2011;51(6):441-4.

**Accuracy of image-guided pedicle screw placement using intraoperative computed tomography-based navigation with automated referencing. Part II: thoracolumbar spine.**

Scheufler KM, Franke J, Eckardt A, Dohmen H.

Neurosurgery. 2011 Dec;69(6):1307-16. doi: 10.1227/NEU.0b013e31822ba190.

**Accuracy of image-guided pedicle screw placement using intraoperative computed tomography-based navigation with automated referencing, part I: cervicothoracic spine.**

Scheufler KM, Franke J, Eckardt A, Dohmen H.

Neurosurgery. 2011 Oct;69(4):782-95; discussion 795. doi: 10.1227/NEU.0b013e318222ae16.

**Transsphenoidal extension of heterotopic glioneuronal tissue: pathoanatomic considerations in symptomatic neonates.**

Kau T, Gysin C, Dohmen-Scheufler H, Brotschi B, Schiegl H, Kellenberger CJ, Boltshauser E, Scheer I.

Childs Nerv Syst. 2011 May;27(5):771-8. doi: 10.1007/s00381-010-1326-4. Epub 2010 Nov 6.

**Less invasive surgical correction of adult degenerative scoliosis. Part II: Complications and clinical outcome.**

Scheufler KM, Cyron D, Dohmen H, Eckardt A.

Neurosurgery. 2010 Dec;67(6):1609-21; discussion 1621. doi: 10.1227/NEU.0b013e3181f918cf.

**Less invasive surgical correction of adult degenerative scoliosis, part I: technique and radiographic results.**

Scheufler KM, Cyron D, Dohmen H, Eckardt A.

Neurosurgery. 2010 Sep;67(3):696-710. doi: 10.1227/01.NEU.0000377851.75513.FE.

**Multiple intracranial melanoma metastases: case report and review of the literature.**

Guzel A, Maciaczyk J, Dohmen-Scheufler H, Senturk S, Volk B, Ostertag CB, Nikkhah G.

J Neurooncol. 2009 Jul;93(3):413-20. doi: 10.1007/s11060-008-9785-0. Epub 2009 Feb 1. Review.

**Percutaneous transforaminal lumbar interbody fusion for the treatment of degenerative lumbar instability.**

Scheufler KM, Dohmen H, Vougioukas VI.

Neurosurgery. 2007 Apr;60(4 Suppl 2):203-12; discussion 212-3

## 12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Wetzlar, den

## 13. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

---