

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus-

Funktion des Transkriptionsfaktors SOX2 in Glioblastomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Catharina Collet
aus Dortmund
2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2012

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
„Funktion des Transkriptionsfaktors SOX2 in Glioblastomen“

im Institut für Neuropathologie der Universität Münster

unter der Anleitung von:
Univ.-Prof. Dr. W. Paulus

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Bielefeld, 27.12.2012

Catharina Collet

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus -
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
ZUSAMMENFASSUNG

Funktion des Transkriptionsfaktors SOX2 in Glioblastomen
Catharina Collet

Gliome sind die häufigsten primären Hirntumore des Menschen, deren Prognose aufgrund inadäquater Therapiemöglichkeiten trotz zahlreicher Forschungsfortschritte immer noch sehr ungünstig ist. In den letzten Jahren wurde die Hirntumorstammzell-Hypothese aufgestellt, welche die Existenz einer Subpopulation an Tumor-initiiierenden, Stammzell-ähnlichen Zellen innerhalb der heterogenen Tumormasse postuliert. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Zellfraktion ist von großem Interesse zum Verständnis der Tumorbio­logie sowie zur Entwicklung effektiverer Therapiestrategien.

Der Transkriptionsfaktor SOX2 ist während der Neurogenese für die Beibehaltung des Stammzell-Status verantwortlich und wird in Gliomen häufig überexprimiert. Die Aufklärung seiner Funktion in Gliomen ist daher von großem Interesse.

In vorliegender Arbeit wurden verschiedene Funktionen des SOX2 mittels vergleichender Studien in den etablierten humanen Glioblastom-Zelllinien U373MG und U87MG nach einem shRNA-induzierten SOX2-Knockdown bzw. einer durch rekombinante DNA generierten SOX2-Überexpression untersucht. Zudem wurde der SOX2-Expressionsstatus in der für zukünftige *in vivo*-Versuche geeignete Rattengliom-Zelllinie C6TL bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass SOX2 funktionelle Effekte im Sinne eines stimulierenden Einflusses auf Proliferations- und Koloniebildungseigenschaften der untersuchten Tumorzellen hat. Außerdem konnten Downstream-Effekte des SOX2 auf *NOTCH1* sowie *GFAP* nachgewiesen werden. In der C6TL-Zelllinie wurde eine SOX2-Expression nachgewiesen, sodass im Rahmen folgender *in vivo*-Versuche ein SOX2-Knockdown sinnvoll erscheint.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2012

Abkürzungen und Definitionen

Abb.	Abbildung
AEG	anophthalmia-esophageal-genital syndrome
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BMI1*	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTSC	brain tumor stem cell (<i>engl.</i> Hirntumorstammzelle)
bzw.	beziehungsweise
cCT	kranielle Computertomographie
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
CD133*	Prominin 1
cMRT	kranielle Magnetresonanztomographie
C-MYC*	myelocytomatosis oncogene
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
<i>engl.</i>	englisch
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF4*	fibroblast growth factor 4
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP*	Glial Fibrillary Acid Protein
h	Stunde(n)
HMG box	high-mobility-group box
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min.	Minute(n)

MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSI1*	MUSASHI Homolog 1
NANOG*	NANOG Homeobox
OCT3/4*	Octamer binding protein 3/4
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
ref. in	referiert in
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
Rpm	Umdrehungen/Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
sek.	Sekunde (n)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	short hairpin RNA
SOX2*	SRY-related HMG (high-mobility-group)-box 2
SRY*	sex determining region Y
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> [Enzymeinheit(en)]
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v	volume to volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight to volume (Gewicht/Volumen)
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Tumore des Zentralen Nervensystems	1
1.1.1. Neuroepitheliale Tumore des ZNS	1
1.1.1.1. Glioblastoma multiforme	3
1.2. Tumorstammzellhypothese	5
1.2.1. Neurale Stammzellen im adulten ZNS	5
1.2.2. Hirntumore und Tumorstammzellhypothese	7
1.3. SRY-related high-mobility-group box (SOX) transcription factors	10
1.3.1. Molekulare Grundlagen	10
1.3.2. Funktionen von SOX-Proteinen	12
1.3.3. SOXB-Familie und SOX2	13
1.4. Fragestellung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Geräte	16
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.3. Lösungen und Puffer	18
2.1.4. Kits und Produkte	20
2.1.5. Enzyme	20
2.1.6. Standards	20
2.1.7. Antikörper	21
2.1.7.1. Primäre Antikörper	21
2.1.7.2. Sekundäre Antikörper	21
2.1.8. Zellkulturen	22
2.1.8.1. Etablierte Zelllinien	22
2.1.8.2. Vektoren	22
2.1.8.3. Medien und Zusätze für die Zellkultur	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Methoden der Zellkultur	24
2.2.1.1. Allgemeines	24
2.2.1.2. Kultivierung von Zellen	24
2.2.1.3. Kryokonservierung	25
2.2.1.4. Anzucht der Zellen/ Auftauen	25
2.2.1.5. Zellzahlbestimmung	26
2.2.1.6. Neubauer-Zählversuch	26
2.2.1.7. MTT-Assay	26
2.2.1.8. Bestimmung der Zellgröße	28
2.2.1.9. Methylcellulose-Assay	30

2.2.2. Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2.1. RNA-Isolierung	32
2.2.2.2. cDNA-Synthese	34
2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)	34
2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.2.5. Quantitative RT-PCR	37
2.2.3. Proteinanalytische und immunhistologische Methoden	40
2.2.3.1. Herstellung von Proteinlysaten	40
2.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	40
2.2.3.3. Immunoblot (Western Blot)	41
2.2.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz	44
2.3. Statistik	45
3. Ergebnisse	46
3.1 SOX2-Knockdown in U373MG-Zellen	46
3.1.1. Morphologie	48
3.1.1.1. Morphologie in der Zellkultur	48
3.1.1.2. Bestimmung der Zellgröße	49
3.1.2. Proliferationseigenschaften	49
3.1.2.1. Neubauer-Zählkammer	49
3.1.2.2. MTT-Assay	51
3.1.3. Koloniebildungseigenschaften	52
3.1.4. SOX2-Downstream-Gene	53
3.1.4.1. <i>NOTCH1</i>	53
3.1.4.2. <i>GFAP</i>	55
3.1.5. SOX2-Statusbestimmung	57
3.2. SOX2-Überexpression in U87MG-Zellen	58
3.2.1. Morphologie	61
3.2.1.1. Bestimmung der Zellgröße	61
3.2.2. Proliferationseigenschaften	62
3.2.2.1. Neubauer-Zählkammer	62
3.2.2.2. MTT-Assay	63
3.2.3. SOX2-Downstream-Gene	64
3.2.3.1. <i>NOTCH1</i>	64
3.2.3.2. <i>GFAP</i>	65
3.2.4. SOX2-Statusbestimmung	66
3.3. SOX2-Statusbestimmung in C6TL-Zellen	67
3.3.1. Konventionelle RT-PCR	67
3.3.2. Quantitative RT-PCR	68
3.3.3. Western Blot	68

4. Diskussion	69
4.1. Einfluss von <i>SOX2</i> auf die Zell-Morphologie	71
4.2. Einfluss von <i>SOX2</i> auf Proliferationseigenschaften	72
4.3. Einfluss von <i>SOX2</i> auf Koloniebildungseigenschaften	74
4.4. Downstream-Targets von <i>SOX2</i> : <i>NOTCH1</i>	75
4.5. Einfluss von <i>SOX2</i> auf den Differenzierungsmarker <i>GFAP</i>	77
4.6. <i>SOX2</i> -Status in der C6TL-Zelllinie	79
4.7. Ausblick	80
5. Literaturverzeichnis	81
6. Danksagung	91
Anhang	

1. Einleitung

1.1. Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS)

Tumore des ZNS stehen mit einem Anteil von 2-3% aller malignen Tumoren des erwachsenen Menschen an unterer Stelle der Gesamtstatistiken von Krebserkrankungen. Bei Kindern dagegen stellen sie nach den Leukämien die zweithäufigste Tumorentität dar (48). Zwischen im Kindes- und Erwachsenenalter auftretenden Hirntumoren bestehen hinsichtlich vorherrschenden Entitäten, Therapien und Prognosen teilweise große Unterschiede; im Weiteren soll es um die Hirntumoren des Erwachsenen gehen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen primären und sekundären Hirntumoren, wobei sich erstgenannte direkt aus den verschiedenen Geweben des ZNS entwickeln. Sekundäre Neoplasien entstehen durch die Aussaat von Tumorzellen, die von einem Tumor außerhalb des ZNS stammen; solche Metastasierungen sind vor allem bei Primärtumoren wie Mamma- und Bronchialkarzinomen beschrieben (39).

Die verschiedenen Tumorentitäten des ZNS werden anhand der international anerkannten WHO-Klassifikation eingeteilt. Diese orientiert sich an histologischen, immunhistochemischen sowie genetischen Kriterien unter Einbezug epidemiologischer und klinischer Gesichtspunkte, wie beispielsweise Symptome und Risikofaktoren des Patienten sowie Ergebnisse des neuroradiologischen Befundes (55).

1.1.1. Neuroepitheliale Tumore des ZNS

Mehr als 70% der primären Hirntumore des Erwachsenen sind neuroepithelialen Ursprungs. Sie gehen von den Stützzellen des ZNS, den sogenannten Gliazellen, aus und werden dementsprechend als Gliome bezeichnet. Im ZNS existieren verschiedene Gliazelltypen – Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Zellen des Plexus choroideus – sodass die Gliome weiterhin in Astrozytome, Oligodendrogliome, Mischformen (Oligoastrozytome) und Ependymome untergruppiert werden (s. Tab. 1.1) (66). Un-

ter den Gliomen wird die größte Gruppe von den Astrozytomen gebildet, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.

Die Einteilung der Hirntumore nach ihrer Dignität (*engl.* Grading) erfolgt anhand histologischer Kriterien (mitotische Aktivität, Kernatypien, Nekrosen, pathologische Gefäßproliferation) (17). Da Gliome im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren sehr selten außerhalb des ZNS metastasieren, stellt das Grading – neben Faktoren wie beispielsweise Lokalisation des Tumors, Alter und Allgemeinzustand des Patienten – den wichtigsten prognostischen Faktor dar (58). Die WHO-Klassifikation sieht eine vierstufige Einteilung vor, wobei die Malignität von Grad I nach IV zunimmt (vgl. Tab. 1.1).

	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Astrozytome (A.)	Subependymales Riesenzell-A.	Pilomyxoides A.	Anaplastisches A.	Glioblastom
	Pilozytisches A.	Diffuses A.		Riesenzell-Glioblastom
		Pleomorphes A.		Gliosarkom
Oligodendrogliome (Od.)		Oligodendrogliom	Anaplastisches Od.	
Oligoastrozytome (Oa.)		Oligoastrozytom	Anaplastisches Oa.	
Ependymome (E.)	Subependymom	Ependymom	Anaplastisches E.	
	Myxopapilläres E.			

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation neuroepithelial differenzierter Tumore. Modifiziert nach (55).

Astrozytome des WHO-Grad I gelten prinzipiell als benigne: sie zeichnen sich durch ein relativ langsames, umschriebenes Wachstum aus und lassen sich in der Regel komplett resektieren – Ausnahmen bilden Tumore in nicht zugänglichen Regionen des ZNS, die somit aus technischen Gründen inoperabel sind. Dies bedingt eine insgesamt günstige Prognose mit rezidivfreien postoperativen 10-Jahres-Überlebensraten von 96% (67).

Tumoren des WHO-Grad II sind ebenfalls gut differenziert und langsam wachsend, rezidivieren allerdings häufiger und zeigen oft eine Progression hin zu höhergradigen Tumoren der Grade III oder sogar IV (42).

Die niedergradigen Tumoren der WHO-Grade I und II treten vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen auf (medianes Alter bei Diagnosestellung je nach Entität 17.-20. Lebensjahr) (66).

Höhergradige Astrozytome (WHO-Grad III und IV) sind meist supratentoriell lokalisiert (36), haben ihre Häufigkeitsgipfel im älteren Erwachsenenalter (Grad III: 40.-50., Grad IV: 45.-70. Lebensjahr (15)) und sind mit wesentlich schlechteren Prognosen verbunden. So beträgt das mediane Überleben bei Grad III-Tumoren lediglich 2-3 Jahre. Die Prognose von Grad IV-Tumoren muss nach der Art des Tumors differenziert werden: Glioblastom-Patienten versterben meist innerhalb eines Jahres, während an anderen Grad IV-Tumoren Erkrankte oftmals günstigere Prognosen aufweisen. Beispielsweise sind für Medulloblastom-Patienten 5-Jahres-Überlebensraten von 60-80% nach kombinierter Strahlen- und Chemotherapie bekannt. Dieser Unterschied kommt einerseits durch die verschiedene Verfügbarkeit effektiver Therapien zustande – für das Glioblastom existieren derzeit leider nur wenige erfolgversprechende Therapiestrategien (55). Die verheerende Prognose ist außerdem zu großen Teilen durch das charakteristische Wachstum dieser Tumore bedingt: die diffus-infiltrierende Invasion der Tumorzellen weit in umliegendes gesundes Hirnparenchym hinein erschwert eine komplette chirurgische Resektion bzw. macht sie unmöglich. Dies führt unweigerlich zu der extrem hohen Rezidivrate (66).

1.1.1.1. Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primäre Hirntumor des Erwachsenen mit einem Altersgipfel um das 60. Lebensjahr (58,66,67).

Histomorphologisch zeigen diese Tumore dem Namen entsprechend ein zellreiches, pleomorphes Spektrum: neben Riesenzellen finden sich Mitosen, Tumornekrosen mit umgebenden Pseudopalisaden und proliferierendes Endothel (15,36).

Man unterscheidet zwischen den häufigeren primären und den sekundären Glioblastomen. Erstere, auch als *de-novo*-Glioblastome bezeichnet, entstehen aus gesundem Hirngewebe. Die betroffenen Patienten weisen bei einem ra-

schen Krankheitsverlauf (meist weniger als 3 Monate) in der Regel weder klinische Frühsymptome noch radiologisch oder morphologisch fassbare Veränderungen im Sinne einer weniger malignen Vorläuferläsion auf (15,36).

Im Gegensatz dazu entwickeln sich sekundäre Glioblastome im Rahmen einer Tumorprogression von niedergradigen Astrozytomen ausgehend – 70% der Grad II-Gliome progredieren innerhalb von 5-10 Jahren nach Diagnosestellung zu einem Grad III bzw. -IV-Tumor. Die Patienten sind in der Regel jünger (medianes Erkrankungsalter 40 Jahre) und der Krankheitsverlauf ist protrahierter (36,58).

Eine Reihe von zyto- und molekulargenetischen Veränderungen sind als für die Genese dieser beiden Formen des Glioblastoma multiforme (mit-) verantwortlich beschrieben worden. Zwar zeigen primäre im Vergleich zu sekundären Glioblastomen Mutationen verschiedener Gene, in beiden Fällen werden hierdurch aber in der Konsequenz dieselben zellulären Signaltransduktionen beeinflusst – nämlich vor allem die p53-, Rb1- und Pi3-Kinase/Akt-Signalwege sowie bestimmte Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (9,36,43).

Das klinische Bild imponiert mit eher unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, fokalen oder generalisierten Krampfanfällen, neurologischen Herdsymptomen, Papillenödem oder anderen Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Drucks, aber auch psychischen Auffälligkeiten wie Persönlichkeitsveränderungen (7,36).

Bildmorphologisch (in der kraniellen Computertomographie (cCT) oder Magnetresonanztomographie (cMRT)) stellt sich das Glioblastom typischerweise als Läsion mit zentraler Nekrose, girlandenförmigem randständigem Kontrastmittel-Enhancement und ausgeprägtem perifokalen Ödem dar (36).

Eine bedeutende Rolle kommt der neuropathologischen Diagnostik zu – zum Einen müssen differentialdiagnostisch Metastasen und andere maligne primäre Hirntumoren, aber auch nichttumoröse Raumforderungen wie Abszesse oder posttraumatische Veränderungen ausgeschlossen werden; zum Anderen ist die histomorphologische Beurteilung Voraussetzung für die Erstellung eines sinnvollen Therapiekonzepts (7).

Therapeutisch stellt das Glioblastom weiterhin eine große Herausforderung dar; ein suffizientes Therapieschema konnte bisher nicht erarbeitet werden. Die Standardtherapie des Glioblastoms besteht zurzeit in der neurochirurgischen Resektion gefolgt von einer adjuvanten Radiochemotherapie. Ergänzend existieren verschiedene Studienprotokolle, in deren Rahmen Verfahren zur Migrations-, Invasions-, und Angiogenesehemmung sowie zur Immuntherapie der klinisch-experimentellen Kontrolle unterzogen werden (7). Dabei muss berücksichtigt werden, dass die oben erläuterten Subtypen des Glioblastoms unter anderem aufgrund der verschiedenen genetischen Aberrationen auf unterschiedliche Therapien ansprechen. Dieser Sachverhalt verdeutlicht nochmals die Bedeutung der weiteren Erforschung der Genetik der Glioblastome (100).

1.2. Tumorstammzell-Hypothese

1.2.1. Neurale Stammzellen im adulten ZNS

Eine Stammzelle ist eine multipotente unspezialisierte Zelle, welche sich im Wesentlichen durch die Fähigkeiten auszeichnet, sich erstens im Rahmen einer Zellteilung selbst erneuern sowie zweitens in reifere Nachkommen differenzieren zu können. Dabei resultiert eine symmetrische Teilung in der Bildung genetisch identischer Tochterzellen. Die bei einer asymmetrischen Teilung entstehenden Zellen unterscheiden sich dagegen in ihrem Geno- und damit auch Phänotyp. In diesem Rahmen können Stammzellen weiter in sogenannte Progenitorzellen differenzieren. Diese besitzen eine eingeschränktere Differenzierungsfähigkeit (Pluripotenz) und differenzieren durch weitere Prozesse zu einer reifen Zelle (s. Abb. 1.1). Auf diese Weise sind Stammzellen an Bildung, Erhalt und Regeneration verschiedener Gewebe beteiligt (86).

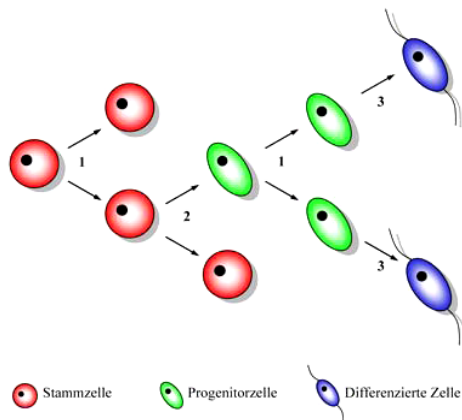


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Stammzellteilung.

(1): Symmetrische Teilung in zwei identische Nachkommen.
 (2): Asymmetrische Teilung in eine multipotente Stammzelle und eine weiter differenzierte pluripotente Progenitorzelle.
 (3): Differenzierung der Progenitorzelle in einen reifen Zelltyp.

Aus (86).

Solche Vorgänge finden auch im ZNS statt und werden dort Neurogenese genannt. Man versteht darunter einen Prozess, bei dem neurale Stammzellen in die drei reifen Hauptzelltypen des ZNS – nämlich Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten – differenzieren (68) (s. Abb. 1.2).

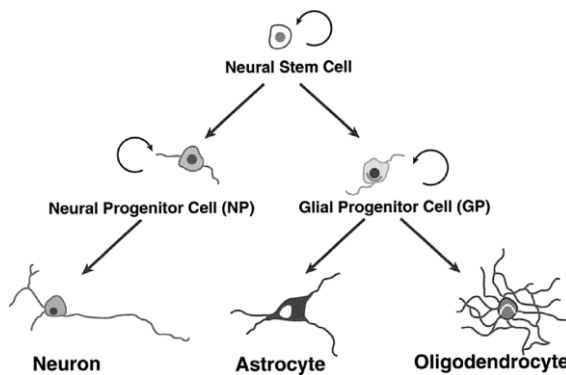


Abbildung 1.2: Neurogenese.

Neurale Stammzellen generieren neurale (NP) und gliale Progenitor-Zellen (GP); erstere differenzieren in Neurone, letztere in Astrozyten und Oligodendrozyten.

Aus (68).

Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass die Neurogenese bei Säugern pränatal abgeschlossen sei. Seit den 1960er Jahren lieferten tierexperimentelle Forschungen Ergebnisse, welche dieses Dogma in Frage stellten (2,29,81). 1998 gelang dann erstmals die Isolierung einer Zellpopulation mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften aus dem humanen Gehirn (23,26,101). Weitere Forschung ergab, dass die adulte Neurogenese sich vorwiegend in zwei Regionen des Gehirns abspielt, nämlich in der Subventrikularzone der lateralen Ventrikel sowie im Hippokampus (20). Die neuronalen adulten Stammzellen der Subventrikularzone konnten als eine Population *GFAP*-positiver Astrozyten identifiziert werden (3,49).

Offenbar ist die Neurogenese im adulten ZNS einer hierarchischen Regulation unterworfen: die multipotenten Stammzellen sind ortsständig und generieren

pluripotente Progenitorzellen. Diese wiederum generieren Neuroblasten, welche lediglich zur neuronalen Differenzierung befähigt sind und über verschiedene Wege und Mechanismen in kortikale Areale des ZNS migrieren, wo sie in neue Interneurone differenzieren (s. Abb. 1.2 und 1.3) (105).

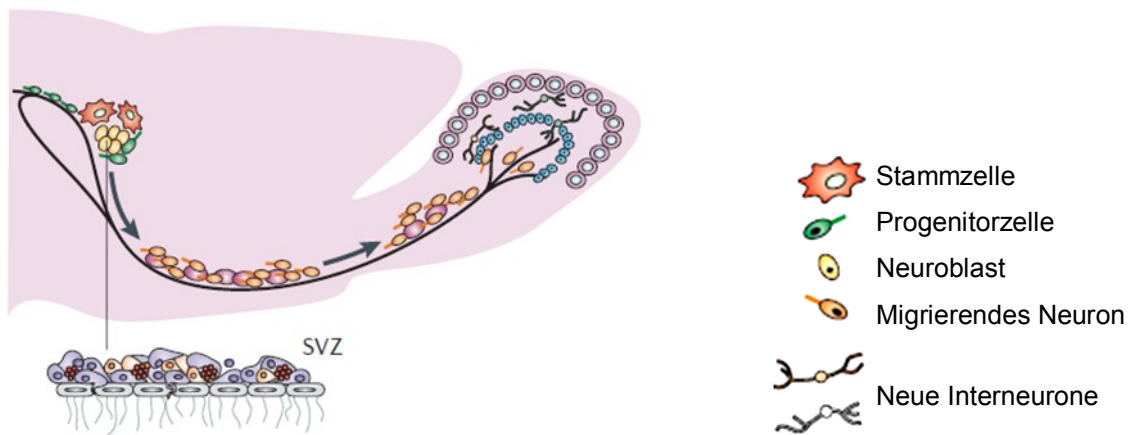


Abbildung 1.3: Modell der adulten Neurogenese im schematischen Sagittal-Schnitt durch den lateralen Ventrikel mit Darstellung der Subventrikularzone (SVZ).

Ortständige multipotente Stammzellen generieren ebenfalls ortständige Progenitorzellen, diese wiederum zum Bulbus olfactorius migrierende Neuroblasten, welche schließlich in neue Interneurone differenzieren. Modifiziert nach (105).

Die Identifizierung und Isolierung neuraler Stammzellen ist mit der Bestimmung verschiedener spezifischer Markerproteine wie CD133, NESTIN, BMI1, MSI1 und auch SOX2 (34,53,91,102,116,117) wesentlich simplifiziert worden. Mit dem transmembranösen Glykoprotein CD133 ist ein Marker bekannt, der die Identifizierung der Stammzellfraktion mittels FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analyse erlaubt – alle anderen aufgeführten Marker liegen intrazellulär vor und sind daher mittels dieser Methode nicht bestimmbar.

1.2.2. Hirntumore und Tumorstammzellhypothese

In der Forschung existieren verschiedene Modellvorstellungen zur Tumorgenerese. Dabei wird meist davon ausgegangen, dass durch eine Reihe genetischer Mutationen eine Ursprungszelle mit Tumor-initiiierendem Potential entsteht. Dieser Typus wird als Tumorstammzelle bezeichnet (77) und zeichnet sich durch folgende Fähigkeiten aus: Selbsterneuerung, Multipotenz und Tumor-Initiierung

nach orthotoper Transplantation (105). Die Existenz solcher Tumorstammzellen wurde zunächst bei hämato-onkologischen Erkrankungen wie der Leukämie und dem Multiplen Myelom nachgewiesen, im weiteren Verlauf auch für solide Tumoren wie Mamma-Karzinome (1,10,60).

Ausgehend von der in Kapitel 1.2.1. erläuterten Erkenntnis, dass auch im adulten Hirn neurale Stammzellen existieren, wurde die Tumorstammzell-Hypothese auch für Hirntumore aufgestellt.

Validiert wird diese Hypothese durch verschiedene Erkenntnisse. So weisen Regulationsmechanismen der Selbsterneuerung neuraler adulter Stammzellen verblüffende funktionelle und genetische Parallelen zu der Tumorbilogie maligner Gliome auf (16,69,109). Außerdem konnte in der putativen Tumorstammzellpopulation eine Expression Stammzell-spezifischer Markerproteine nachgewiesen werden. Darüber hinaus scheint eine vermehrte Stammzellmarker-Expression negativ mit der Prognose des jeweiligen Tumors zu korrelieren (34,53,57,91,102,116,117).

Mittels der Tumorstammzellhypothese lässt sich auch die histomorphologische Vielfalt der Gliome einleuchtend erklären. Ein Nebeneinander von Zellen verschiedener Reifungsgrade und Differenzierungslinien ist keine Seltenheit, sondern im Gegenteil sehr charakteristisch für Gliome im Allgemeinen und im Besonderen für das Glioblastom. Mit den Oligoastrozytomen existiert sogar eine von der WHO international klassifizierte Untergruppe der Gliome, dessen Diagnosestellung das Vorliegen verschieden differenzierter neuronaler Zellen zwingend voraussetzt. Eine multipotente Tumorstammzelle mit der Fähigkeit, Nachkommen verschiedener neuronaler Zelllinien zu generieren, ist als Ursprungszelle eines solchen Tumors sehr gut denkbar (58,92).

Zur Entstehung eines solchen Zelltypus existieren zurzeit mehrere Modellvorstellungen. So könnte eine Hirntumorstammzelle theoretisch sowohl aus einer neuralen adulten Stammzelle, als auch aus einer Progenitorzelle oder aber im Rahmen einer De-Differenzierung aus einer reifen neuralen Zelle entstehen. Als De-Differenzierung wird ein Prozess bezeichnet, bei dem sich eine genetisch determinierte Zelle in einen weniger spezialisierten Status „zurück“-entwickelt (s. Abb. 1.4).

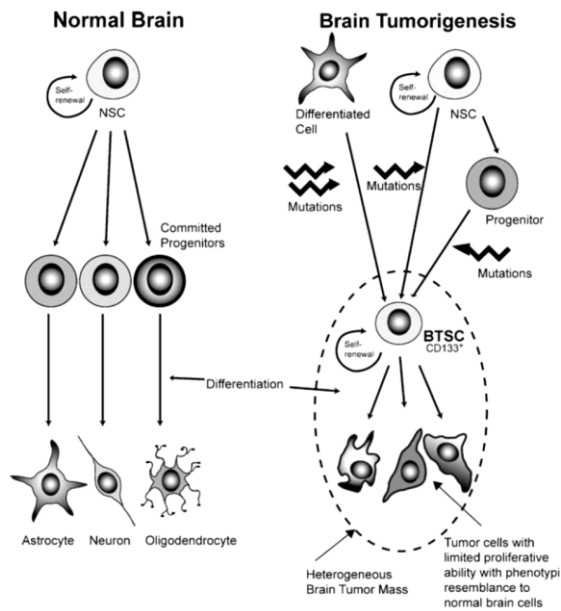


Abbildung 1.4: Vorstellungen zur Entstehung einer Hirntumorstammzelle.

Links: normale Neurogenese (s. auch Abb. 1.2).

Rechts: verschiedene genetische Aberrationen in neuronalen Stammzellen, Progenitorzellen oder differenzierten Zellen resultieren in der Formation einer Hirntumorstammzelle (*engl.* brain tumor stem cell, BTSC), welche mittels ihrer spezifischen Eigenschaften eine heterogene Tumormasse kreiert. Aus (92).

Die Tumorstammzell-Hypothese betrachtet die Tumorigenese also als eine Art unregulierte Selbsterneuerung, welche von multipotenten Tumorstammzellen ausgeht (92). Unabhängig von ihrem Anteil an der Gesamtmasse des Tumors (zwischen <1% bis 40% (91)) muss diese Subpopulation im Rahmen einer erfolgreichen Therapie eliminiert werden – denn andernfalls sorgen die überlebenden Stammzellen immer wieder für erneutes Tumorwachstum.

Man hat festgestellt, dass mit steigender Anzahl von Tumorstammzellen an der Gesamtmasse die Malignität des jeweiligen Tumors zunimmt. Diese Korrelation könnte zum Teil daher rühren, dass die Tumorstammzellen aufgrund ihrer Langlebigkeit geradezu prädisponiert für die Akkumulation weiterer Malignitätsfördernder genetischer Mutationen sind (91,92).

Die Charakterisierung und genauere Erforschung der Tumorstammzell-Population verspricht ein besseres Verständnis der Tumorbilogie und eröffnet gleichzeitig die Möglichkeiten zur Entwicklung effektiverer Therapiestrategien. Neben den unter Kapitel 1.2.1 erläuterten Verfahren zur Identifizierung einer Stammzellfraktion innerhalb einer Zellpopulation kommt bei Tumorzellverbänden auch die Bestimmung der Potenz zur Tumorsphäroidbildung *in vitro* zum Einsatz.

1.3. SRY-related high-mobility-group box (SOX) transcription factors

Die Differenzierung von Zellen ist ein Prozess, der im Zusammenspiel einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Die Familie der SOX-Proteine ist eine heterogene Gruppe solcher aktivierend und/oder reprimierend wirkender Faktoren. Gemeinsames Merkmal ist das Vorhandensein einer DNA-bindenden hochkonservierten high-mobility-group box (HMG box) Domäne, bestehend aus 79 Aminosäuren, welche erstmalig in dem y-chromosomalen Gen *SRY* (*sex determining region Y*) identifiziert wurde. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 20 für diese Transkriptionsfaktoren kodierende Gene sowohl in der Maus als auch im Menschen bekannt. Dabei werden gewebespezifische Expressionsmuster beobachtet. SOX-Proteine werden in acht Gruppen von A bis H eingeteilt (51).

1.3.1. Molekulare Grundlagen

Über die HMG box-Domäne binden SOX-Proteine mit geringer Sequenzspezifität die DNA. Im Gegensatz zu den meisten anderen DNA-bindenden Proteinen, welche an der großen Furche der Doppelhelix binden und nur eine geringe Konformitätsänderung zur Folge haben, binden SOX-Proteine an die kleine Furche und lösen dadurch eine deutliche Veränderung der Raumstruktur der DNA aus (*engl.* bending), bei der die Doppelhelix in einem Winkel von 30 bis 110° gebogen wird (s. Abb. 1.6). Dies vereinfacht bzw. erlaubt die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an die große Furche der DNA und ist damit für die regelrechte Funktion des SOX-Proteins essentiell (87).

Auch die Affinität der SOX-Proteine zur DNA ist geringer als bei anderen bekannten Transkriptionsfaktoren. Erhöht werden kann sie durch spezifische Wechselwirkungen mit einem oder mehreren Bindungspartnern. Abhängig vom jeweiligen Partner kann dasselbe SOX-Protein dann auch als Transkriptionsfaktor verschiedener Gene dienen (38).

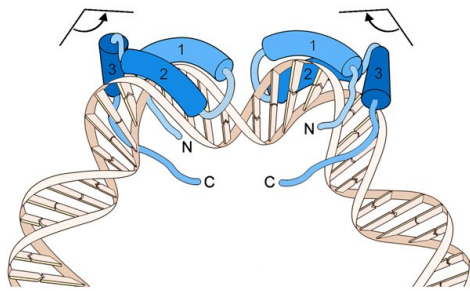


Abbildung 1.6: SOX-DNA-Bindung.

Die HMG box-Domäne, welche aus drei L-förmig konfigurierten α -Helices besteht (1, 2, 3), bindet an die kleine Furche der DNA, welche dadurch in einem Winkel von $30-110^\circ$ aufgeklappt wird (hier sind zwei die DNA in gegenüberlicher Richtung bindende HMG-box-Domänen abgebildet). N=N-Terminus, C=C-Terminus. Aus (51).

Die meisten SOX-Proteine besitzen also zur Interaktion mit Bindungspartnern weitere funktionelle Domänen, welche innerhalb der einzelnen Familien ebenfalls hochkonserviert sind – zwischen den Familien existieren jedoch teilweise große Unterschiede (s. Abb. 1.7) (51).

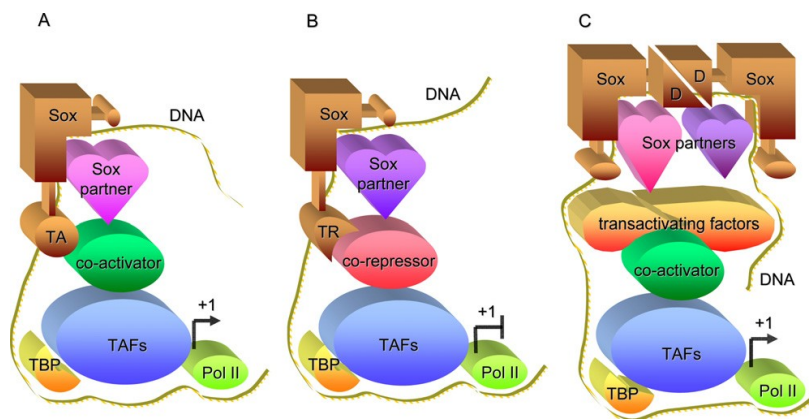


Abbildung 1.7: Molekulare Wirkmechanismen von SOX-Proteinen.

Die DNA-bindende HMG-box-Domäne ist L-förmig dargestellt, mit weiteren funktionellen Domänen am N- und C-Terminus.

Links: Etwa die Hälfte der SOX-Proteine (Gruppen A, B1, C, E, F, H) agiert als aktivierende Transkriptionsfaktoren. Eine an ihrem C-Terminus befindliche Domäne (TA [transactivation]) interagiert mit einem aktivierenden Co-Faktor (co-activator). Dieser interagiert mit der Transkriptions-Maschinerie (TBP [TATA-bindendes Protein] und TAFs [TBP-assoziierte Faktoren]). Die Polymerase II (Pol II) transkribiert die DNA in RNA.

Mitte: Andere SOX-Proteine (der Gruppen B2, G, D) wirken reprimierend. Ihre C-terminale Domäne (TR [transrepression]) interagiert mit einem reprimierenden Co-Faktor (co-repressor) und blockiert so die Transkription.

Rechts: Einige SOX-Proteine (der Gruppen A und D) entfalten ihre Wirkung über die Organisation von verschiedenen Bindungspartnern, ohne direkten Kontakt mit Co-Faktoren. Einige SOX-Proteine (der Gruppen E und D) bilden Homodimere über eine spezifische N-terminale Domäne (D).

Aus (51).

1.3.2. Funktionen von SOX-Proteinen

Für die Gruppe der SOX-Transkriptionsfaktoren ist eine Fülle an Funktionen in den verschiedensten Prozessen des Organismus beschrieben – beispielsweise während der Hämatopoese, Kardiogenese, Angiogenese und Neurogenese. Sehr gut untersucht sind die Funktionen von SOX-Genen der B1-Familie während der Neurogenese (s. Kapitel 1.3.3.). Die gliale Differenzierung im zentralen sowie im peripheren Nervensystem wird dagegen von SOXE- und SOXD-Genen reguliert (52,95-97,110). Prinzipiell spielen Mitglieder der B1-Familie meist eine regulierende Rolle in Stammzellen, während solche der Gruppen A, C, E und F in späteren Entwicklungsstadien die frühe Differenzierung kontrollieren. SOXD-Gene sind häufig an den letzten Schritten von Differenzierungsprozessen beteiligt (51).

Dysfunktionen der SOX-Proteine während der Embryogenese ziehen häufig schwerwiegende Folgen nach sich: so ist eine heterozygote Mutation des SOX10 mit dem Waardenberg-Syndrom, welches durch Innenohrschwerhörigkeit und Pigmentstörungen gekennzeichnet ist, und dem Morbus Hirschsprung, einer Aganglionose der Darmwand, assoziiert (76). Eine Mutation des SOX9 führt zu der Kampomelen Dysplasie, eines seltenen, meist im frühen Kindesalter letalen skeletalen Mißbildungssyndroms (93).

Für einige Tumorentitäten sind Veränderungen der Expression von SOX-Genen *in vivo* beobachtet worden (s. Tab. 1.2).

Tumorentität	Veränderte SOX-Expression	Referenz
Kleinzelliges Bronchial-Karzinom	1, 2, 3, 21	Gure <i>et al.</i> , 2000 (32)
Prostata-Karzinom	2	Sattler <i>et al.</i> , 2000 (85)
Medulloblastom	4, 11	Lee <i>et al.</i> , 2002 (50)
Mamma-Karzinom	4	Graham <i>et al.</i> , 1999 (30)
Pankreas-Karzinom	7	Katoh <i>et al.</i> , 2002 (40)
Magen-Karzinom		
Kolorektales Karzinom		
Mamma-Karzinom		

Tabelle 1.2: Exemplarische Auflistung einiger Tumorentitäten, bei denen Veränderungen der Expression (erhöht oder vermindert) verschiedener SOX-Gene beobachtet wurde.

Eine direkte tumorigene Wirkung wurde für das SOX3 beschrieben: in embryonalen Hühner-Fibroblasten fungiert dieses als Onkogen (114).

1.3.3. SOXB-Familie und SOX2

Die SOXB-Gruppe besteht aus den Untergruppen *B1* (SOX1, 2, 3) und *B2* (SOX14, 21) (103). Dabei wirken sie zum Einen gegenseitig auf die Transkription ihrer Zielgene, indem die SOXB1-Gruppe aktivierend, SOX14 und 21 aber reprimierend wirken. Zum Anderen wird die Aktivität der *B1*-Gruppe *in vivo* direkt von SOX14 und 21 inhibiert (38,51,84).

Die Bindung des SOX2 an die Ziel-DNA ist wie erwähnt von kooperativen Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren abhängig (113). Solche Bindungspartner sind beispielsweise OCT3/4, NANOG, C-MYC und KL4 (4,11,82,99,115).

In der Neurogenese spielen die SOXB1-Mitglieder eine wichtige Rolle, indem sie an verschiedenen Regulationsmechanismen maßgeblich beteiligt sind. Dabei sind sie während verschiedener Entwicklungsstadien sowie auch im adulten Hirn exprimiert. Über die Inhibierung der neuralen Differenzierung bewirken sie die Beibehaltung eines Stammzell-ähnlichen Status (13), während späterer Phasen der Differenzierung neuraler Zellen wird ihre Expression dann heruntergefahren (110). Im Falle einer Inhibierung ihrer Expression während der Embryogenese kommt es zu einem verfrühten Verlust des Stammzell-Status in neuralen Progenitorzellen, eine Überexpression wiederum inhibiert die Neurogenese (13,31). Während der Entwicklung der Neuralleiste wirkt SOX2 an der Regulation der Proliferation der beteiligten Zellen mit (106). SOX2 ist aber auch wie bereits erwähnt im adulten ZNS von Bedeutung: im murinen adulten Gehirn konnten Ferri *et al.* eine Expression des Proteins in der subventrikulären Zone und im hippokampalen Gyrus Dentatus, also den Hirnarealen, in denen die postnatale Neurogenese stattfindet, nachweisen. Eine reduzierte Expression führte dort zu einem Verlust neuronaler Vorläuferzellen und in der Folge zu Neurodegeneration, wie sie beispielsweise bei Erkrankungen wie Morbus Huntington und Alzheimer beobachtet wird (22,25,107).

Mutationen im SOX2-Gen führen zu Missbildungen, deren komplexe Muster in verschiedenen Geweben die essentiellen und vielfältigen Funktionen belegen. So sind Störungen der Entwicklung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (41), Fälle des seltenen AEG-Syndroms (*engl.* anophthalmia-esophageal-genital syndrome) (112) und andere Anophthalmie-Syndrome (24), sonstige Malformationen des ZNS sowie Haarverlust (33) im Zusammenhang mit SOX2-Mutationen beschrieben.

Untersuchungen zur Expression und Funktion von SOX-Genen in Glioblastomen sind in den letzten Jahren begonnen worden. Dabei zeigte sich in verschiedenen Gliomen für SOX-Gene der SOXE- und SOXD-Familien eine heterogene Expression (88). In Untersuchungen zum Expressionsverhalten des SOX2 in Glioblastomen konnten Schmitz *et al.* eine Überexpression nachweisen, während die Expression in normalem Hirngewebe sowie in Gewebeproben anderer maligner Hirntumore vernachlässigbar gering war. Dieses Protein kann damit als ein mögliches Target im Rahmen einer Immuntherapie mit cytotoxischen T-Zellen gelten (89). In weiteren Studien am Institut für Neuropathologie der Universität Münster und in auswärtigen Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse reproduziert werden (74). Interessanterweise wird darüber hinaus eine positive Korrelation des SOX2-Expressionslevels mit dem Malignitätsgrad von Gliomen postuliert (57).

Scheinbar existieren Unterschiede in der Funktion des SOX2 zwischen Glioblastomen und (murinen) neuronalen adulten Stammzellen. Eine erhöhte SOX2-Expression ist Bedingung für eine erfolgreiche adulte Neurogenese (51), während sie in Gliomen mit einer glialen Differenzierung verbunden ist (74). In neuronalen adulten Stammzellen ist die Funktion des SOX2 überdies zeit- und ortsabhängig; für astrozytäre Tumoren wurde dies noch nicht untersucht (51).

1.4. Fragestellung der Arbeit

Vorausgehende Studien zum SOX2 erbrachten den Nachweis einer Überexpression dieses Transkriptionsfaktors in Gliomen, so dass das Wissen um dessen spezifische Funktionen in der Tumorbilogie von großem Interesse ist. Nicht nur das Verständnis der typischen Morphologie und des charakteristischen Invasionsverhaltens astrozytärer Tumoren könnte so erweitert, auch könnten neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war dementsprechend eine Untersuchung von Funktionen des SOX2 in Gliomzellen. Es sollten dabei Proliferations- und Koloniebildungs-Eigenschaften, morphologische Charakteristika sowie Effekte auf SOX2-Downstream-Targets untersucht werden. In erster Linie kamen dabei zur Generierung erster Daten *in vitro*-Versuche mit etablierten Glioblastom-Zelllinien in Betracht. Als besonders geeignet erwiesen sich in Vorarbeiten am Institut für Neuropathologie der Universität Münster die humanen Glioblastom-Zelllinien U373MG und U87MG. Für die vorliegende Arbeit wurde daher einerseits in der U373MG-Zelllinie ein stabiler shRNA-induzierter SOX2-Knockdown, andererseits in der U87MG-Zelllinie durch das Einbringen rekombinanter DNA eine SOX2-Überexpression generiert, um anschließend an diesen Zellpopulationen vergleichende Studien durchführen zu können.

Im weiteren Verlauf der Forschung werden sicherlich aus *in vivo*-Versuchen gewonnene Daten von Interesse werden. Aus diesem Grund wurde darüber hinaus der SOX2-Expressionsstatus in der Rattengliom-Zelllinie C6TL, welche sich für *in vivo*-Versuche gut eignet und am hiesigen Institut bereits etabliert ist, bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Beschreibung	Typenbezeichnung	Firma, Herkunftsort
Autoklav	HV 85	BPW Labortechnik, Süßen
Blot-Apparatur	Trans-Blot Cell	BioRad, München
Digitalkamera für BX50	F-View II	Olympus, Tokio, Japan
Digitalkamera für IX50	C-3030	Olympus, Tokio, Japan
Elektrophoresekammer	Vertikal	BioRad, München
Elektrophoresekammer	Horizontal	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop	BX50	Olympus, Tokio, Japan
Gefriermikrotom	CM3050 S	Leica, Wetzlar
Geldokumentationsanlage		UVP, Bambridge, England
Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO ₂ -Atmosphäre	Heracell	Heraeus, Hanau
Inverses Fluoreszenzmikroskop	IX50	Olympus, Tokio, Japan
Inverses Zellkulturmikroskop	CK30	Olympus, Tokio, Japan
Kugelmühle	Mikro-Dismembrator U	Braun, Melsungen
Magnetrührer		IKA, Labortechnik, Staufen
Multipette		Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer		Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-mV-Meter	pH526	WTW, Weilheim
Photometer	NanoPhotometer	Implen, München
Rotorsystem	Roto-Shake Genie	Scientific Industries, München
Real-Time-PCR-Gerät	Geneamp5700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Software für Digitalkamera	Analysis five	Soft Imaging System, Münster
Spannungsgeräte		BioRad, München
Sterilbank	Hera Safe HS12	Heraeus, Hanau
Thermocycler	MultiCycler PTC 200 MJ Research	Biozym, Hessisch Oldendorf

Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	Dual Intensity Ultra-violet Transilluminator	UVP, Cambridge, UK
Vortex	Genie II	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Zellzählapparat	CASY [®] 1	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0 Rotor SS34	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Cytospin3	Shandon, Frankfurt
Allgemeine Laboratoriumsmaterialien		Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth GmbH, Karlsruhe
BSA	New England Biolabs, Frankfurt am Main
CasyTon-Lösung	Innovatis-AG, Reutlingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1%)	Roth GmbH, Karlsruhe
Fluoromount-Eindeckmedium	DakoCytomation, Hamburg
Formaldehyd 37%	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin (100%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
G418 Sulfat	PAA Laboratories, Linz, Österreich

Hoechst-Farbstoff 33258	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Biorad, München
Tris(hydromethyl)-aminomethan	Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol™	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.3. Lösungen und Puffer

Blockierungslösung für Western-Blot (MP-TST)	5% (w/v)	Magermilchpulver 1x TST
Blot-Puffer (1x)	48 mM	Tris-HCl
	39 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
Cell-Dissociation-Puffer	0,04 M	TrisHCl, pH 7,4
	1 mM	EDTA
	0,15 M	NaCl
Lower-Tris	1.5 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4% (v/v)	SDS
Upper-Tris	0,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4% (w/v)	SDS

Lysepuffer für Proteinbestimmungen	10 mM	Tris-HCL pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	2% (v/v)	IGEPAL CA-630
	1% (v/v)	Natrium-Desoxycholat
	0,1% (w/v)	SDS
	1mM	PMSF
	1:1000	Protease-Inhibitor-Cocktail
Methylcellulose	500 ml	Millipore-Wasser, autoklaviert
	8,4 g	Methylcellulose
	200 ml	DMEM
MTT-Stock-Lösung	5 mg	MTT
	1 ml	PBS
PBS	137 mM	NaCl
	2,68 mM	KCl
	1,66 mM	NaH ₂ PO ₄
	9,58 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH7,4
Ponceau-S-Färbelösung	2% (w/v)	Ponceau-S
	3% (w/v)	Trichloressigsäure
	3% (w/v)	Sulfosalicylsäure In Aqua dest.
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	4% (w/v)	SDS
	40% (w/v)	Glycerol
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	10% (v/v)	2-β-Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	0,2 M	Glycin
	0,05%	Tween 20
		pH 2,5
10x TST-Puffer	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,5 M	NaCl
	1%	Tween 20

2.1.4. Kits und Produkte

High Capacity Reverse Transcription cDNA Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
GenElute [®] Mammalian Total RNA Mini-prep Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
D _C Protein Assay (Lowry-Reagenz)	BioRad, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA

2.1.5. Enzyme

HotStar Taq DNA Polymerase (2,5 U)	Qiagen, Hilden
------------------------------------	----------------

2.1.6. Standards

Blue Ranger [®] Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (<i>Proteingrößenstandard für Gelelektrophorese</i>)	Pierce, Rockford, USA
BSA-Standard für BioRad D _C Protein Assay (<i>Protein-Konzentrationsstandard für Lowry-Assay</i>)	BioRad, München
100bp Ladder [®] (<i>DNA-Größenstandard für Gelelektrophorese</i>)	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

2.1.7. Antikörper

2.1.7.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFAP MN118	Maus, monoklonal	IF: 1:100	Perbio, Bonn
Anti-GFAP 20334	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:2000 WB: 1:5000	Dako, Hamburg
Anti-SOX2 MO15040	Maus, monoklonal	IF: 1:100	Neuromics, Herford
Anti- β -AKTIN A5541	Maus, monoklonal	WB: 1:10000	Sigma, Deisenhofen
Isotypen-Kontrolle Maus IgG2a	Maus, monoklonal	IF: kontrollabhängig	Dako, Hamburg
Isotypen-Kontrolle Kaninchen IgG	Kaninchen, polyklonal	IF: kontrollabhängig	Dako, Hamburg

IF: Immunfluoreszenz

WB: Western Blot

2.1.7.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Gekoppelter Fluoreszenz- Farbstoff	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG, A11029	Alexa Fluor 488	Ziege, polyklonal	IF: 1:200	Molecular Probes, Göttingen
Anti-Maus IgG, 115-165-062	Cy3 (Indocarbocyanin)	Ziege, polyklonal	IF: 1:100	Jackson Immu- noresearch, Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, A3682	Peroxidase	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kanin- chen IgG, T 6778	TRITC	Ziege, polyklonal	IF: 1:400	Sigma, Deisenhofen
anti-Kanin- chen IgG, A 2074	Peroxidase	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Sigma, Deisenhofen

IF: Immunfluoreszenz

WB: Western Blot

2.1.8. Zellkulturen

2.1.8.1. Etablierte Zelllinien

U373MG* ¹	Humane Zelllinie Epithelähnliches Wachstum Aus einem humanen Glioblastom isoliert Referenz: Ponten et al., 1968 (78)
U87MG* ²	Humane Zelllinie Epithelähnliches Wachstum Aus einem humanen Glioblastom isoliert Referenz: Ponten et al., 1968 (78)
Rat I* ³	Rattenfibroblasten-Zelllinie, immortalisiert Referenz: Mishra et al., 1973 (62)
C6TL* ⁴	Rattengliom-Zelllinie Fibroblastenähnliches Wachstum Referenz: Paulus et al., 1996 (71)

*¹ bezogen von European Collection of Cell Cultures

*² bezogen von ATCC (American Type Culture Collection)

*³ freundlicherweise überlassen von Dr. rer. nat. Volker Senner
(Institut für Neuropathologie, UK Münster)

*⁴ freundlicherweise überlassen von Dr. rer. nat. Volker Senner
(Institut für Neuropathologie, UK Münster)

2.1.8.2. Vektoren

SureSilencing™ shRNA Plasmid	-GAACCAGCGCATGGACAGTTA-	Biomol, Hamburg
SureSilencing™ shRNA Plasmid, Random Sequence	-GGAATCTCATTTCGATGCATAC-	Biomol, Hamburg
pcDNA3.1/myc-His A/SOX2	Full length SOX2 in position of KpnI-XhoI	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/myc-HisA	Without Insert	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8.3. Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high Glucose 4,5 g/L, + L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FCS Gold (Fetal calf serum)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Penicillin/ Streptomycin, 100x concentrate	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin/ EDTA (1:250), 1x concentrate	PAA Laboratories, Linz, Österreich

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Zellkultur

2.2.1.1. Allgemeines

Jegliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer keimarmen, vor Arbeitsbeginn mit 70%-igem Ethanol gereinigten Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Unter die Werkbank gebrachte Utensilien bzw. Lösungen und Puffer wurden zuvor sterilisiert bzw. desinfiziert.

2.2.1.2. Kultivierung von Zellen

Die adhärent wachsenden humanen Glioblastom-Zelllinien U373MG und U87MG sowie die Rattenzelllinien C6TL und Rat I wurden in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), welches mit 10% FBS Gold und den Antibiotika Penicillin G (100 U/mL)/Streptomycin-Sulfat (100 µL/mL) angereichert wurde und im Folgenden DMEM (+/+) genannt wird, kultiviert.

Um die Zellpopulationen der stabil transfizierten U373MG-Knockdown- und U87MG-Überexpressions-Klone frei von nicht- transfizierten Zellen zu halten, wurden diese unter ständigem Selektionsdruck kultiviert (DMEM (+/+) mit Zusatz von G418 (Neomycin; Stock-Konzentration 100 mg/ml) – U373MG: 8µl/ml; U87MG: 4µl/ml).

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre.

Ein Mediumwechsel erfolgte je nach Zelllinie alle 4-7 Tage. Als Entscheidungskriterien dienten der makroskopische Befund des Mediums, der mikroskopische Zustand der Zellen und die Notwendigkeit des regelmäßigen Mediumwechsels zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks (alle 3-4 Tage) bei den U373MG-Knockdown- und den U87MG-Überexpressions-Klonen. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und frisches auf die Zellen gegeben.

Eine Passagierung war je nach Zelllinie alle 3-7 Tage notwendig. Dazu wurden die Zellen, nachdem sie mit PBS gewaschen worden waren, mit Trypsin/EDTA-

Lösung versetzt und für 3-5 min. bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösungsgrades der Zellen und vorsichtigem Beklopfen des Kulturgefäßes wurden die Zellen in DMEM (+/+) resuspendiert, wobei dessen FCS-Komponente das zytotoxische Trypsin inaktivierte. Die Zellen konnten dann in gewünschter Verdünnung wieder ausgesät werden.

2.2.1.3. Kryokonservierung

Analog zum Vorgehen bei der Passagierung wurden die Zellen abtrypsiniert, resuspendiert und anschließend abzentrifugiert, sodass das Zellpellet in mit 1:10 DMSO versetztem DMEM (+/+) aufgenommen werden und in Kryoröhrchen à 1 ml gefüllt werden konnte. In Styroporboxen wurden die Zellen für mindestens 12 Stunden auf -80°C gekühlt, um dann in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert werden zu können.

2.2.1.4. Anzucht der Zellen/ Auftauen

Die 1 ml Zellsuspension enthaltenden Kryoröhrchen wurden im 37°C-Wasserbad zügig aufgetaut und in 9 ml DMEM (+/+) aufgenommen. Anschließend wurde diese Suspension 5 min. bei 1700 rpm und 25°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem DMEM (+/+) aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.5. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μl einer Zellsuspension in ein Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer (s. Abb. 2.1) pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in vier Quadranten ausgezählt und hieraus anschließend der Mittelwert gebildet. Multipliziert mit 10^4 ergab sich so die Zellzahl pro Milliliter.

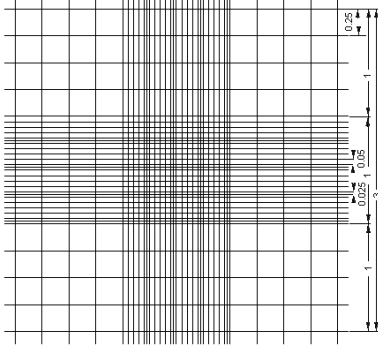


Abbildung 2.1: Neubauer-Zählkammer

Alle Maße in mm, Großquadrat: 1 mm^2 , Gruppenquadrat: $0,04 \text{ mm}^2$, Kleinstquadrat: $0,0025 \text{ mm}^2$.
[Quelle: LO-Laboroptik]

2.2.1.6. Neubauer-Zählversuch

Zur Untersuchung der Proliferationseigenschaften der U373MG-Knockdown- sowie der U87MG-Überexpressions-Klone wurden zum Zeitpunkt Null $1 \cdot 10^5$ Zellen in einer 10 cm-Petrischale ausgesät. Pro Klon wurden vier Schalen ausplattiert, sodass jeweils ein 24-, 48-, 72- und 96-Stunden-Wert gemessen werden konnte.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA gelöst und mit 2 ml DMEM (+/+) in ein Falcon-Röhrchen überführt.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Kammer wie unter 2.2.1.5. beschrieben. Zur Minimierung eines Zählfehlers wurde jede Suspension insgesamt vier Mal ausgezählt und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert berechnet.

2.2.1.7. MTT-Assay

Zur Charakterisierung der Proliferationseigenschaften verschiedener Zellpopulationen wurden neben der Auszählung mit der Neubauer-Kammer MTT-Assays durchgeführt. Dieser quantitative kolorimetrische Assay basiert auf der Reduk-

tion des gelbfarbenen wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das wasserunlösliche, blau-violette Formazan. Diese Reaktion wird von endoplasmatischen Enzymen in Anwesenheit von NADH und NADPH sowie zu geringeren Teilen von mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen katalysiert. Dieser Assay ist also in erster Linie ein Maß für die Glykolyserate einer Zellpopulation, folglich ebenso eines für die Anzahl vitaler Zellen dieser Population (8).

Für die Standard-Reihe wurden Verdünnungsreihen von U373MG- bzw. U87MG-Zellen hergestellt, wobei ausgehend von der höchsten Konzentration mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/200 μ l zehn Verdünnungen jeweils im Verhältnis 1:1 hergestellt wurden. Auf diese Weise ergab sich für die niedrigste Verdünnung rechnerisch eine Konzentration von 97,656 Zellen/200 μ l. Mit Hilfe der Multipette konnten exakt 200 μ l pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät werden.

Von den zu untersuchenden Zellpopulationen wurden Zellsuspensionen mit der gewünschten Konzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen/200 μ l hergestellt. Für jede Zelllinie wurden dabei mindestens 10 Wells angesetzt. Jeweils vier identische Ansätze wurden pipettiert, sodass jeweils ein 0-, 24-, 48-, und ein 72-Stunden-Wert gemessen werden konnten.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre inkubiert.

Der 0-Stunden-Wert konnte, nachdem die Zellen nach drei bis vier Stunden adhären geworden waren, gemessen werden. Dazu wurde das DMEM (+/+) vorsichtig unter Verwendung einer 10 μ l-Pipettenspitze abgesaugt.

Mit der Multipette wurden in jede Vertiefung 200 μ l der zuvor angesetzten MTT-Gebrauchslösung (1 ml Stock-Lösung auf 9 ml DMEM (+/+)) gegeben. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre.

Anschließend wurde die MTT-Gebrauchslösung wie oben beschrieben abgesaugt und zur Lösung des Formazan 200 μ l Isopropanol pro Well mit der Multipette auf die Zellen gegeben. Die Extinktion wurde bei 570 nm im Plattenphotometer gemessen.

Für die Messung des 24-, 48- und 96-Stunden-Wertes wurde analog verfahren.

2.2.1.8. Bestimmung der Zellgröße

Die Bestimmung der Zellgröße der U373MG-Knockdown- sowie der U87MG-Überexpressions-Klone erfolgte mit Hilfe des CASY[®]1 Model DT nach dem Prinzip der Widerstandsmessung.

Dieses Zellanalysesystem registriert die von passierenden Zellen ausgelösten Widerstandsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit. Über eine Pulsflächen-Analyse wird gleichzeitig die Bestimmung der Größenverteilung der Zellpopulation ermöglicht.

Zunächst wurde unter Zuhilfenahme der Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer eine Zellsuspension mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt.

Jeweils 10 μ l dieser sorgfältig resuspendierten Suspension wurden in 10 ml einer isotonischen Elektrolytlösung (Casyton-Lösung) gegeben und die Messung durchgeführt.

Vor jeder Messung wurde das Gerät zur Reinigung mit Casyton-Lösung gespült.

Mit Hilfe der installierten Software des CASY[®]1 Model DT können Werte in einem Bereich von 3,2-40 μ m in Intervallen von 1 μ m gemessen und dargestellt werden. So erhält man einen Graphen, der die Zellzahl in Abhängigkeit vom Zellvolumen darstellt. Dieser Graph weist drei Maxima auf: ersteres stellt Zelldebris dar, das folgende tote Zellen, das dritte schließlich repräsentiert vitale Zellen (s. Abb. 2.2).

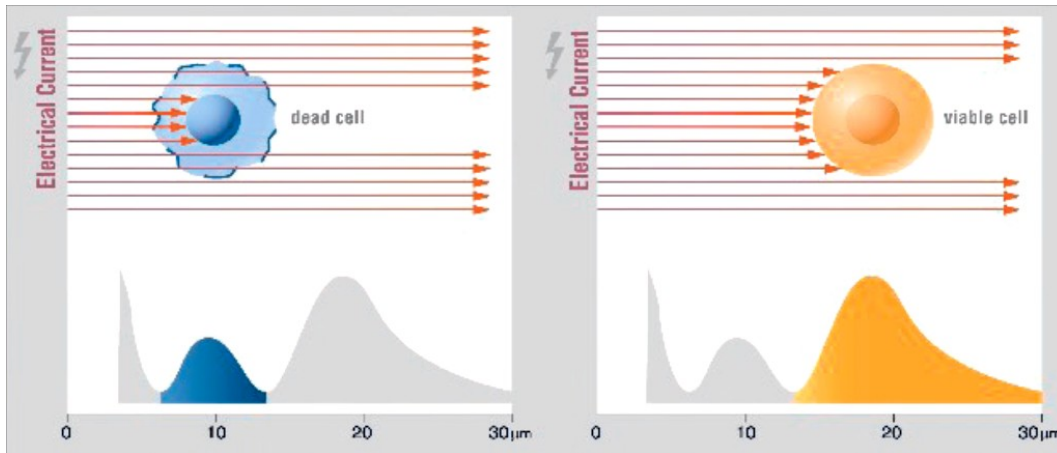


Abbildung 2.2: Bestimmung von Zellgröße und -Vitalität mit Hilfe der Widerstandsänderungsmessung.

Links: Membranen toter Zellen sind für elektrischen Strom permeabel, sodass in dem Fall die Größe des Nukleus gemessen wird. Diese Messdaten spiegeln sich als das zweite Maximum des Graphen (hier blau) wider.

Rechts: Im Gegensatz dazu wird von Membranen vitaler Zellen Strom absorbiert, sodass das wahre Zellvolumen bestimmt wird, welches sich graphisch als drittes Maximum (hier orange) darstellt.

[Quelle: http://www.bioway.com.tw/Files/DownloadFile/Innovatis_Casy_DT.pdf]

Außerdem wurden mit Hilfe des CASY[®]1 Model DT die Vitalitätsgrenzen der U373MG-Knockdown- sowie der U87MG-Überexpressions-Klone bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Messung einer möglichst zu mehr als 90% aus vitalen Zellen bestehenden Kultur wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden 100 µl derselben Probe 1:4 mit 100%igem Ethanol versetzt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die Zellen abstarben. 10 µl dieser Suspension wurden in 10 ml Casyton-Lösung gegeben und wiederum eine Minute inkubiert. 3 ml dieser Totkontrolle wurden mit 7 ml der bereits gemessenen vitalen Suspension versetzt und am CASY[®]1 Model DT gemessen.

Dabei stellt der Tiefpunkt zwischen dem Peak der toten und dem der vitalen Zellen die untere Vitalitätsgrenze dar. Als vitale Zellen können dann alle diejenigen gewertet werden, die von dieser Grenze bis zum Ende der Skalierung gezählt werden.

2.2.1.9. Methylcellulose-Assay

Zur Bestimmung der Koloniebildungseigenschaften der Zellen kam der Methylcellulose-Assay zum Einsatz.

Zunächst wurde die gelartige Suspension aus pulverförmiger Methylcellulose hergestellt. Dazu wurden 200 ml autoklaviertes Millipore-Wasser in einem ebenfalls autoklavierten Erlenmeyerkolben mit Rührfisch auf einem Magnetrührer erwärmt. Nachdem das Pulver nach und nach unter Rühren hinzugegeben worden war, wurde das Gemisch zum Kochen gebracht, sodass die Methylcellulose sich vollständig auflöste. Die Suspension wurde unter Rühren auf Raumtemperatur gebracht und anschließend mit 200 ml DMEM, welches zuvor im Wasserbad auf 37°C gebracht worden war, versetzt. Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht und unter ständigem Rühren konnte die fertige Methylcellulose in 50 ml-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Zuvor wurde eine Sterilprobe angelegt, die im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre inkubierte.

Es wurden pro Klon Zellsuspensionen mit definierten Zellzahlen (165 Zellen/ml bzw. 200 Zellen/ml) im Duplikat ausgesät, diese wurden bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre über 16 Tage inkubiert. Lichtmikroskopisch konnten dann diejenigen Kolonien, die als vital betrachtet wurden (aus mehr als 50 Zellen bestehend und ein dichtes Wachstumsmuster aufweisend), gezählt werden.

Zunächst wurde der Methylcellulose-Ansatz wie folgt hergestellt (n=3):

- 1800 µl Methylcellulose
- 600 µl FCS Gold
- 1630 µl DMEM, serumfrei

Die Methylcellulose wurde mit Hilfe einer 1,2/0,9G Kanüle und einer 2 ml-Spritze in bereitgestellte Röhrchen gefüllt. Die übrigen Komponenten wurden hinzupipettiert.

Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben abtrypsinisiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die gewünschten Konzentrationen berechnen zu können.

Lagen die berechneten Werte für die auszusäende μl -Anzahl im Bereich zwischen 1 und 10 μl , wurde diese Menge zum Ansatz hinzugegeben; andernfalls wurde eine geeignete Verdünnung der Ursprungs-Zellsuspension hergestellt. Diese wurde erneut ausgezählt, um den Fehler so gering wie möglich zu halten. Mit Hilfe einer 1,2/0,9G Kanüle und einer 2 ml-Spritze wurden die so hergestellten Ansätze sorgfältig resuspendiert und anschließend jeweils 1 ml in einer unbeschichteten 35mm-Petrischale ausgesät.

Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Petrischalen in einer halbgeschlossenen Schale bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre für 16 Tage inkubiert. Zusätzlich wurden zur Erzeugung eines feuchteren Milieus drei mit 2-3 ml PBS befüllte, geöffnete 35 mm-Petrischalen in der Schale platziert. Während der Inkubationszeit wurden die Kulturgefäße so wenig wie möglich bewegt um ein „Verrutschen“ der Kolonien zu verhindern.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. RNA-Isolierung

RNA-Isolierung aus Zellen

In vorliegender Arbeit wurde zur RNA-Isolierung das GenElute[®] Mammalian Total RNA Miniprep Kit des Herstellers Sigma-Aldrich verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

Von der zu untersuchenden Zelllinie wurden in einer Six-Well-Platte $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung ausgesät, die bei 37°C und 5% CO₂ und in gesättigter H₂O-Atmosphäre inkubiert wurden und bei gewünschter Konfluenz von 80-100% geerntet wurden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie unter 2.2.1.2. beschrieben abtrypsinisiert und anschließend 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Es folgten ein Waschschriff mit 500 ml PBS sowie eine erneute Zentrifugation.

Das erhaltene Zellpellet wurde mit dem im Kit enthaltenen Lysepuffer, der zuvor frisch mit 1:100 (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt worden war, aufgenommen, in ein RNase-freies Eppendorff-Gefäß überführt und auf Eis gelagert.

Alternativ wurde der Lysepuffer – nach vorangegangenem Waschen der Zellen mit PBS – direkt auf die Zellen gegeben, sodass diese sich lösten und mit einem sterilen Zellschaber vom Kulturgefäß in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt werden konnten.

Sowohl das im Lysepuffer enthaltene Guanidin-Isothiocyanat als auch das Disulfidbrücken-reduzierende β-Mercaptoethanol wirken denaturierend auf Proteine und Enzyme, sodass eventuell vorhandene RNAsen inaktiviert werden.

Zum Entfernen von Zelltrümmern und zum Scheren von DNA wurde das Lysat in eine GenElute Filtration Column pipettiert und für 2 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die erhaltene Flüssigkeit wurde mit einem äquivalenten Volumen 70%igen Ethanol (250 µl) versetzt; hierdurch wird die selektive Bindung der RNA an die Siliciumdioxid-Säule begünstigt.

Diese Suspension wurde in eine GenElute Binding Column pipettiert und 15 sek. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Es folgten zwei Waschgänge mit jeweils 500 µl Wash Solution 1 bzw. Wash Solution 2 einschließlich anschließender 15-sekündiger Zentrifugation bei 13.000 rpm, wobei die Durchflüsse stets verworfen wurden.

Einem dritten Waschschrift mit Wash Solution 2 folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm zum sorgfältigen Trocknen der Säule.

Zum Eluieren der RNA wurden zweimal 20 µl Elution Solution auf die Säule gegeben und diese für jeweils 1 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Mittels Spektralphotometrie wurde die RNA-Konzentration im Eluat bestimmt. Die unverdünnte Probe wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ gemessen, sodass die RNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet werden konnte:

$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

$$\text{OD}_{260} = \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm}$$

$$40 = \text{RNA-Multiplikationsfaktor}$$

Durch eine zusätzliche Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280\text{nm}$ und der Berechnung des Quotienten A_{260}/A_{280} konnte die Reinheit der RNA-Probe bzw. deren Verunreinigung mit DNA bzw. Protein beurteilt werden: idealerweise liegt der Quotient bei 1,9 – 2,0.

Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur RNA-Isolierung aus Gewebe wurde das Kit der Firma Sigma verwendet.

Analog zur Isolierung aus adhärennten Zellen wurde der Lyse-Puffer hergestellt und auf Eis gelagert.

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte von 7 µm Dicke einer nativen Gewebeprobe hergestellt, die in 500 µl des Lysepuffers gegeben wurden, bis diese Suspension die gewünschte schleimig-zähe Konsistenz hatte.

Die Probe wurde bei -80°C gelagert.

Im Routine-Labor wurde an einem Histologieschnitt eine Standard-HE (Hämotoxylin-Eosin)-Färbung angefertigt, um das Vorhandensein von Tumorgewebe in der Probe nachzuweisen.

2.2.2.2. cDNA-Synthese

Zur Synthetisierung von komplementärer DNA (cDNA) aus zuvor isolierter mRNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Dabei wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, bestehend aus je einer RNA- und einer DNA-abhängigen Polymerase, einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben.

Zunächst wurde 1 µg mRNA mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl verdünnt. Anschließend erfolgte die Denaturierung für 5 min. bei 65°C im Thermocycler. Nachdem die Proben auf 4°C abgekühlt waren, konnten jeweils 10 µl eines Master-Mixes hinzugegeben werden.

Dieser Master-Mix war zuvor nach folgendem Pipettierschema hergestellt worden:

2 µl	10x RT-Buffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100mM)
2 µl	10x Random Primer
1 µl	MultiScribe™ Reverse Transcriptase
1 µl	RNase-Inhibitor (0,25 µl RNase-Inhibitor-Stocklösung + 0,75 µl 1x RT-Buffer)
3,2 µl	RNase-freies Wasser

Die Synthese erfolgte im Thermocycler bei folgendem Programm:

1. 10 min. bei 25°C
2. 120 min. bei 37°C
3. 5 sek. bei 86°C

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription

Um die Expression eines Gens zu untersuchen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR) eingesetzt, die eine selektive Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten genspezifischen Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer Express der Firma Applied Biosystems entworfen. Die Syn-

these erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg. Die Primer wurden so positioniert, dass die amplifizierten Genabschnitte ein Intron flankierten. Eine Amplifizierung potentiell kontaminierter genomischer DNA konnte ausgeschlossen werden, da die Länge der Introns stets größer als 5 kb war.

Zunächst wurde ein Master-Mix nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

74,5 µl	HPLC-H ₂ O
10 µl	10x PCR-Puffer
8 µl	dNTP-Mix (2,5 mM)
1 µl	Primer fwd (100 pm/µl)
1 µl	Primer rev (100 pm/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (2,5 U)

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA-Zugabe.

Weiterhin wurde zur Sicherung der Integrität und Qualität der eingesetzten DNA ein separater Probensatz mit für das konstant exprimierte housekeeping-Gen *Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)* spezifischen Primern mitgeführt.

Ziel-cDNA, Spezies	Primersequenz – forward
	Primersequenz – reverse
SOX2, human	5'-CCGGCGGCAACCAGAAAAACAG-3' 5'-CCGCCGGGGCCGGTATTTAT-3'
SOX2, Maus	5'-CCGGCGGCAACCAGAAGAACA-3' 5'-CGCCGCGGCCGGTATTTATA -3'
<i>GAPDH</i> , human	5'-CCTCTTGAAGATGCTGAAACAGG-3' 5'-TTCACCTTGCTCGTGCCTCA-3'
<i>GAPDH</i> , Ratte	5'-GCCATCACTGCCACCCAGAAGAC-3' 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAAA-3'

Tabelle 2.1: Verwendete Primer der RT-PCR

Auf jeweils 19 µl des Master-Mixes wurde 1 µl cDNA pipettiert. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

1. 95°C, 15 min.: Denaturierung der cDNA
2. 94°C, 1 min.
3. 60°C, 1 min.: Annealing (Hybridisierung der Primer)
4. 72°C, 1 min.: Elongation durch die Taq-Polymerase

Nachdem die Schritte zwei bis vier 34 Mal wiederholt worden waren, wurden die Proben zunächst für 10 min. auf 72°C, dann bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt. Anschließend wurde die erfolgreiche Amplifikation mit Hilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese verifiziert.

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente anhand ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde mit 1,5%-igen Agarose-Gelen in 1x TAE-Puffer gearbeitet. Durch Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid, welches als organischer Fluoreszenzfarbstoff in die Doppelhelix der DNA interkaliert, auf 100 ml Agarose-Lösung kann die Nukleinsäure durch Anregung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

Die RT-PCR-Produkte wurden zur Beschwerung mit jeweils 2 µl Bromphenolblau-Auftragspuffern versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente konnte mit Hilfe eines aufgetragenen DNA-Größenstandards bestimmt werden.

In einer mit 1x TAE-Puffer befüllten horizontalen Elektrophoresekammer erfolgte die Auftrennung der Fragmente bei 100 V für 45 min..

Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht abfotografiert.

2.2.2.5. Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR, beruhend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht eine Quantifizierung der DNA über Fluoreszenz-Messungen. Die Fluoreszenz wird während jedes einzelnen PCR-Zyklus gemessen und verhält sich folglich proportional zur Menge des PCR-Produktes.

Anhand der Auswertung der Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase, während der optimale Reaktionsbedingungen (optimale Mengenverhältnisse von Template/ Primer/ Polymerase; wenig Interferenz der Produkte untereinander) herrschen, lässt sich dann eine Aussage über die Quantität eines bestimmten PCR-Produktes treffen.

Die Sonde, ein zu einem Sequenzabschnitt der cDNA spezifisches Oligonukleotid, das am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher trägt, emittiert im intakten Zustand nur wenig Fluoreszenz. Kommt es zur Dissoziation des Quenchers vom Fluoreszenzfarbstoff, wie es im Verlauf der Amplifikation durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase geschieht, wird Energie in Form von Fluoreszenzlicht frei. Bei jedem Zyklus kommt es so zur Zerstörung von genau einer Sonde, sodass die Fluoreszenz proportional zur Zyklenzahl steigt.

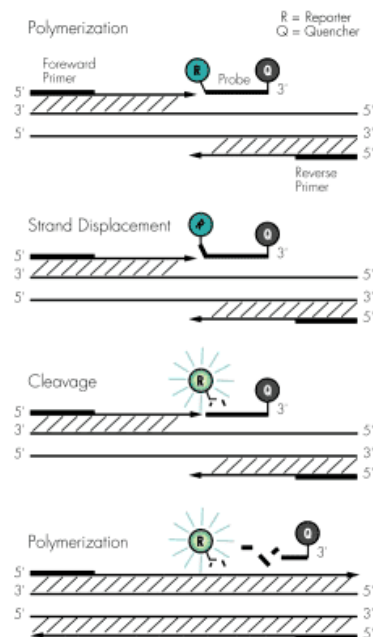


Abbildung 2.3: Prinzip der quantitativen RT-PCR.
[Quelle: IBATAGnology
(http://www.iba-go.com/images/naps/rt_pcr.gif)]

Durch den Einsatz spezifischer Primer und Sonden können selektiv die für den Versuch interessanten Sequenzen untersucht werden.

Als Referenzgen diente in dieser Arbeit das *GAPDH* (*Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase*), das sich aufgrund seines relativ konstanten Vorkommens in den Zellen gut als Housekeeping-Gen zur Kontrolle der gleichmäßigen RNA-Konzentration in verschiedenen Proben eignet.

Die Auswertung nach der differentiellen Genregulation erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Pfaffl.

Hierbei wird der C_t -Wert (engl.: cycle treshold) bestimmt, welcher als derjenige Zyklus der qRT-PCR definiert ist, in dem die Fluoreszenz erstmalig einen definierten, konstanten Wert übersteigt.

Zunächst wird zur Normierung der Messergebnisse der sogenannte ΔC_t -Wert als Differenz aus den C_t -Werten von Ziel- und Referenzgen gebildet ($\Delta C_t = C_t$ Zielgen – C_t Referenzgen). Anschließend wird der relative Expressionsunterschied als sogenannter $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet, indem der ΔC_t -Wert der Kontrolle von demjenigen der zu untersuchenden Proben subtrahiert wird ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ Probe – ΔC_t Kontrolle; in vorliegender Arbeit zum Beispiel ΔC_t K4.3 – ΔC_t Kneg.9) (73).

Für die Amplifikationsreaktion wurden jeweils 1 μ l des synthetisierten cDNA-Templates und 19 μ l eines Master-Mixes pipettiert. Die entsprechenden Zusammensetzungen sind in Tabelle 2.2 angegeben.

SOX2 human/ Maus, NOTCH-1, GFAP		GAPDH human/ Ratte	
1 μ l	Gene Expression Assay	0,83 μ l	Primer fwd
10 μ l	TaqMan [®] Master Mix	0,83 μ l	Primer rev
8 μ l	RNAse-freies Wasser	0,83 μ l	Sonde
		10,42 μ l	TaqMan [®] Master Mix
		7,09 μ l	RNAse-freies Wasser

Tabelle 2.2 : Zusammensetzung des Master-Mixes bei der qRT-PCR.

Die für die jeweiligen Gene verwendeten Gene Expression Assays und der Taqman[®] Mastermix sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Die Sequenzen der Primer und der Sonde der GAPDH-Referenz-Gene sind in Tabelle 2.4 bzw. 2.5 angegeben.

Taqman [®] Mastermix für real-time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Taqman [®] Gene Expression Assay NOTCH1, Hs01062011_m1	Applied Biosystems, Darmstadt
Taqman [®] Gene Expression Assay GFAP, Hs00157674_m1	Applied Biosystems, Darmstadt
Taqman [®] Gene Expression Assay SOX2, Hs01053049_s1	Applied Biosystems, Darmstadt

Tabelle 2.3: Master-Mix und genspezifische Assays der qRT-PCR

GAPDH fwd	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
GAPDH rev	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'
Sonde	5' -CTGGCATTGCCCTCAACGACCA-3'

Tabelle 2.4: GAPDH human, Primer und Sonde.

GAPDH fwd	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
GAPDH rev	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'
Sonde	5'-CTGGCATTGCCCTCAACGACCA-3'

Tabelle 2.5: GAPDH Ratte, Primer und Sonde.

Die Proben wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Als Negativkontrolle diente die Non-Template-Control (NTC), bei der kein cDNA-Template zugegeben worden war.

Die Amplifikation lief nach folgendem Protokoll:

1. 2 min. bei 50°C
2. 10 min. bei 95°C
3. 15 sek. bei 95°C
4. 1 min. bei 60°C

2.2.3. Proteinanalytische und immunhistologische Methoden

2.2.3.1. Herstellung von Proteinlysaten

Um Proteinlysate der adhärenen Zelllinien herzustellen, wurden diese in 10cm²-Kulturschalen ausgesät, im Brutschrank inkubiert und bei 80-100%-iger Konfluenz zunächst mit PBS gewaschen. 250 µl eines Lysepuffers (Zusammensetzung s. Kapitel 2.1.3) wurden auf die Zellen gegeben, die dann mit einem Zellschaber geerntet und in auf Eis gelagerte Reaktionsgefäße überführt werden konnten.

2.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration in Lysaten zu bestimmen, kam die Methode nach Lowry zum Einsatz (56). Hierbei entstehen in alkalischer Lösung in einem ersten Schritt blau-violette Komplexe zwischen Peptidbindungen und im Reagenz enthaltenen Cu²⁺-Ionen (sogenannte Biuretreaktion). Es folgt die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺, wobei Letzteres wiederum die im Folin-Ciocalteau's-Reagenz (Folin-Reagenz) enthaltenen Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)- Heteropolysäuren reduziert. Dies bewirkt einen Farbumschlag der gelbfarbenen Folin-Reagenz nach blau. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wird die Extinktion gemessen, die sich proportional zur Konzentration des Protein-Kupfer-Komplexes und damit zu der des enthaltenen Proteins verhält. Unter Zuhilfenahme einer Standard-Eichkurve mit bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Konzentrationen von 0 bis 1100 µg/ml Protein kann der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden.

In vorliegender Arbeit wurde der BioRad DC Protein Assay der Firma BioRad nach dessen Angaben verwendet.

2.2.3.3. Immunoblot (Western Blot)

In vorliegender Arbeit wurde der Western Blot eingesetzt, bei dem mit Hilfe spezifischer Antikörper das Vorhandensein bestimmter Proteine in einem Gewebe- oder Zelllysate überprüft werden kann.

Die Proteine eines Lysats wurden nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe einer SDS-Page (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt, um dann elektrophoretisch vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht und immobilisiert zu werden.

Zur biochemischen Detektion des zu untersuchenden Proteins wurden ein gegen eben dieses gerichteter Primärantikörper sowie ein gegen den Primärantikörper gerichteter Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Das im verwendeten SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Kit des Herstellers Pierce enthaltene Luminol wird durch die Peroxidase oxidiert, sodass die dabei entstehende Lichtenergie auf einem Röntgenfilm gemessen werden kann. Diese Lichtemission verhält sich innerhalb eines linearen Bereiches proportional zu der Menge des gebundenen Sekundärantikörpers, folglich auch zu der auf der Membran vorhandenen Proteinmenge.

Vorbereitung der Proben

Zunächst wurden die Lysate – unter Zuhilfenahme der Messdaten des Lowry – durch Verdünnung mit dem verwendeten Lysepuffer auf identische Proteinendkonzentrationen gebracht, sodass jeweils 25 µl auf das Gel aufgetragen werden konnten.

Nachdem die Proteine durch die Zugabe von 10 µl 5xSDS-Mercaptoauftragspuffer und eine 5-minütige Inkubation bei 95°C denaturiert worden waren, erfolgte eine vierminütige Zentrifugation bei 2000 rpm.

Bis zum Gelauftrag wurden die Proben auf Eis gelagert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine anhand ihres spezifischen Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli verwandt. Das anionische SDS lagert sich an hydrophobe Regionen

der denaturierten Proteine an, wodurch es zur Maskierung der Eigenladung der Proteine kommt. Daher resultiert eine dem Molekulargewicht entsprechende Wanderung im elektrischen Feld.

Das SDS-Polyacrylamid-Gel setzt sich aus zwei in pH-Wert und Polyacrylamid-Konzentration unterschiedlichen Schichten zusammen. Die Proben werden in Taschen der ersten Schicht eingebracht, des so genannten Sammelgels, welches zur Konzentrierung der Proben vor dem Eintritt in die zweite Schicht dient, dem Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes erfolgt.

Trenngel		Sammelgel	
4,66 ml	Acrylamid	830 µl	Acrylamid
3,5 ml	Lower Tris	1,25 ml	Upper Tris
5,84 ml	Aqua dest.	2,92 ml	Aqua dest.
100 µl	APS	40 µl	APS
20 µl	Tremed	10 µl	Tremed

Table 2.6: Zusammensetzung der verwendeten Gele

Das Gel wurde in eine mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und die Geltaschen mit jeweils 25 µl der Proben sowie 5 µl des Molekulargewichtsstandards BlueRange®Prestained Protein Marker Mix der Firma Pierce befüllt. Die Elektrophorese lief etwa 1,5 Stunden bei 120 V, bis das untere Ende des Gels vom Probenpuffer erreicht worden war.

Transfer und Immobilisierung

Nachdem das Sammel- vom Trenngel abgetrennt worden war, wurde letzteres circa 10-15 min. in Blotpuffer gewaschen. Die zur Herstellung des „Blot-Sandwiches“ benötigten Schwämme, Filterpapiere sowie die Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Düsseldorf) wurden ebenfalls in Blotpuffer inkubiert. Das fertige Sandwich, das mit der Membran zur Anode und mit dem Gel zur Kathode ausgerichtet, luftblasenfrei zusammengesetzt worden war, wurde in die Blotkammer eingesetzt. Nun folgte der Transfer bei 4°C, 100 V und 0,25 mA für eine Stunde. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu sichern, wurde anschließend eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Als Azofarbstoff bindet

dieser reversibel an positiv geladene Aminosäurereste. Zur Entfärbung wurde mit 1x TST-Puffer gewaschen.

Detektion der Proteine

Vor dem Aufbringen des Primärantikörpers auf die Nitrozellulosemembran wurden unspezifische Proteinbindungsstellen über eine mindestens 30-minütige Inkubation mit 5%igem Magermilchpulver in 1x TST-Puffer (MMP-TST) abgesättigt. Ein in geeigneter Verdünnung in MMP-TST hergestellter Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rotorsystem (Roto-Shake Genie, Scientific Industries) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1x TST-Puffer (3x10 min.) zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper. Vor der einstündigen Inkubation des in geeigneter Verdünnung in MMP-TST hergestellten Peroxidase-konjugierten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers erfolgte wiederum ein Blockierungsschritt mit MMP-TST für mindestens 30 min.. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1x TST-Puffer (3x10 min.) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Kits der Firma Pharmacia Biotech sichtbar gemacht. Dabei handelt es sich um eine Chemilumineszens-Reaktion, bei der es in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zur Oxidation von Luminol kommt. Katalysiert wird dieser Schritt durch die am Sekundär-Antikörper gebundene Merrettich-Peroxidase. Die entstehende Lichtemmission, die proportional zum gebundenen Sekundärantikörper, folglich zur Menge vorhandenen Proteins, ist, kann auf einem Röntgenfilm als Schwarzfärbung detektiert werden. Die Membran wurde für 3 min. mit aus den Detergenzien A und B (1:40) frisch hergestellter Reaktionslösung unter stetigem Schwenken inkubiert. Unmittelbar im Anschluss wurde ein Röntgenfilm (CRONEX, Agfa, Mortsel, Belgien) mit verschiedenen Expositionszeiten (1 sek. bis 1 h) belichtet.

Um einen gleichmäßigen Probenauftrag sicherzustellen und zur späteren Quantifizierung wurde eine Kontrolle mit dem housekeeping-Genprodukt β -Aktin durchgeführt. Zunächst wurden durch eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer denaturierenden Substanz (Stripping-Puffer) die zuvor gebundenen Antikörper wieder entfernt. Nach dem gründlichen Waschen mit 1x

TST-Puffer (3x10 min.) erfolgte der β -Aktin-Nachweis analog zu oben beschriebenen Protokoll.

2.2.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Expression bestimmter Proteine an adhärennten Zellen darzustellen, wurde die Immunhistologie mit Fluoreszenz durchgeführt.

Dazu wurden zunächst $1 \cdot 10^5$ Zellen auf sterilen, zusätzlich mit 70%igem Ethanol gereinigten Deckgläschen, die in Six-Well-Schalen gelegt worden waren, ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre inkubiert.

Sobald die Zellkulturen die gewünschte Semi-Konfluenz erreicht hatten (i.d.R. nach einem Tag), wurden die Zellen nach Absaugen des DMEM (+/+)-Kulturmediums und anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS 10 min. mit 3,7%-igem Paraformaldehyd in 1x PBS-Puffer fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellmembranen 5 min. mit 0,1%-igem Triton-PBS permeabilisiert, um die Anfärbung intrazellulärer Proteine zu ermöglichen. Wieder folgten zwei Waschgänge mit PBS, daraufhin wurden mittels 0,5%-igem BSA-PBS unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt. Der gewünschte Primärantikörper wurde in geeigneter Verdünnung in 0,5%-igem BSA-PBS hergestellt. Von dieser Lösung wurden 150-180 μ l vorsichtig auf jeweils ein Deckgläschen gegeben, so dass sich die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung auf dem Gläschen hielt, ohne herunterzulaufen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C.

Zum Entfernen der Antikörperlösung wurden die Deckgläschen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 0,5%-igem BSA-PBS für 20 min.. Ein in geeigneter Verdünnung in 0,5%-igem BSA-PBS hergestellter Sekundärantikörper wurde analog zum Primärantikörper aufgebracht und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ab dem Auftragen des Sekundärantikörpers war zum Schutz des an diesen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes eine Verdunkelung der Präparate notwendig. Nach drei Waschgängen à 5 min. mit PBS erfolgte die Kern-Färbung mit dem Hoechst 33258-Farbstoff (1mg/ml) für 1 min..

Nachdem die Deckgläschen mit Aqua dest. gespült worden waren, konnten sie mit Fluoromount-Eindeckmedium fixiert werden. Dazu wurde jeweils ein Tropfen Fluoromont auf einen Objektträger gegeben, das Deckgläschen luftblasenfrei darauf aufgelegt und das Ganze mit Filterpapier getrocknet. Nach etwa einer Stunde konnte das Präparat mit Nagellack versiegelt werden.

2.3. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student T-Test. Signifikant waren dabei alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ im T-Test, hoch signifikant diejenigen mit $p < 0,01$, höchst signifikant jene mit $p < 0,005$.

3. Ergebnisse

3.1 SOX2-Knockdown in U373MG-Zellen

Zur Untersuchung der möglichen Auswirkungen des SOX2-Expressionslevels auf morphologische Charakteristika, die Proliferations- und Koloniebildungseigenschaften, sowie auf die Expression von SOX2-Target-Genen, wurden vergleichende Versuche an SOX2-exprimierenden Zellen und solchen, bei denen die Expression supprimiert worden war, durchgeführt.

Dazu wurde zunächst die SOX2-Expression acht verschiedener etablierter humaner Glioblastomzelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Da sich die höchste Expression in der U373MG-Zelllinie zeigte (s. Abb. 3.1A), wurde mit dieser weitergearbeitet.

Durch stabile Transfektion mit SureSilencing™ shRNA (Vektorkarte s. Anhang) wurde in den U373MG-Zellen ein stabiler Knockdown generiert; in vorliegender Arbeit wurde mit den Klonen SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 gearbeitet.

Der Knockdown wurde im Western Blot verifiziert: die transfizierten Klone SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 wiesen einem mit einer nicht-kodierenden Zufalls-Sequenz transfizierten Kontrollklon (als SOXKO_control bezeichnet) gegenüber eine SOX2-Restexpression von 17 bzw. 18,2 % auf (s. Abb. 3.1B/C).

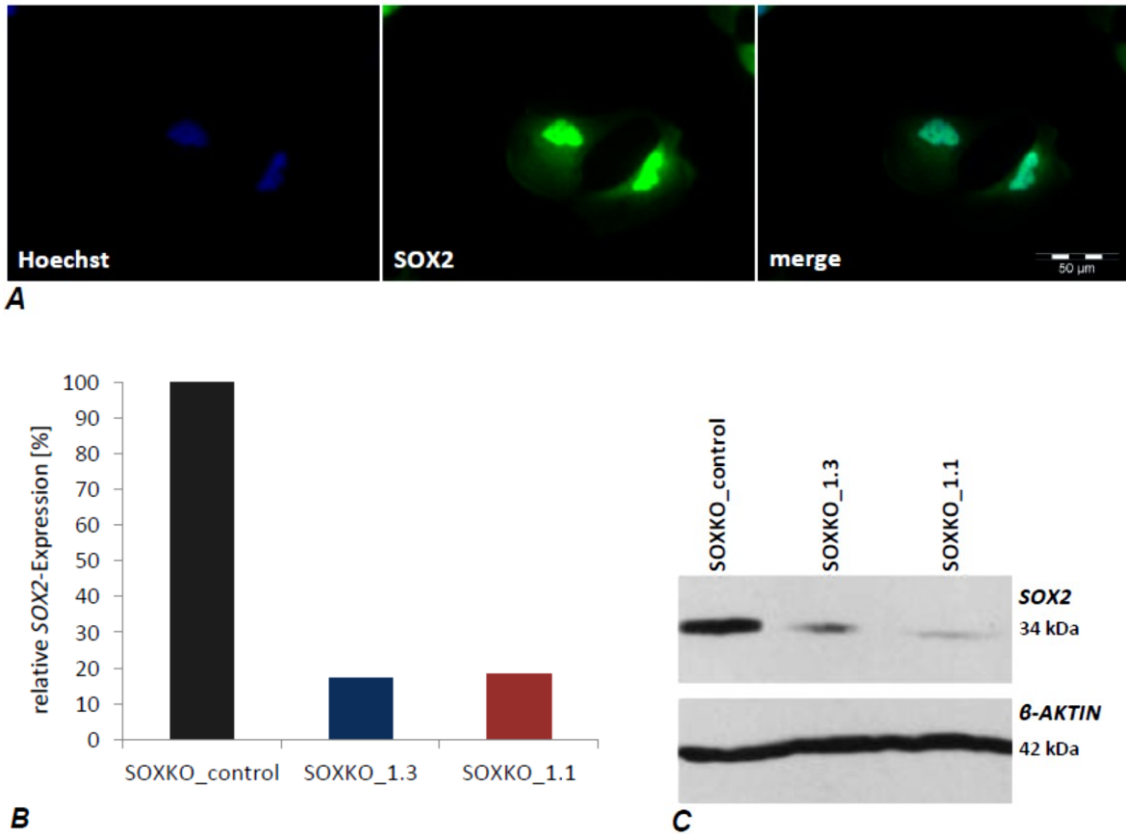


Abbildung 3.1: SOX2-Status in U373MG-Zelllinie und U373MG-Knockdown-Klonen.

A: Indirekte Immunfluoreszenz an U373MG-Zellen.

Die Hoechst-Färbung zeigt den Nukleus. In der SOX2-Färbung ist deutlich ein kernständiges Fluoreszenzsignal erkennbar. Merge: Übereinanderlagerung beider Färbungen.

B: Relative SOX2-Expression auf mRNA-Ebene

in den U373MG-Knockdown-Klonen SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 versus SOXKO_control in der qRT-PCR.

C: SOX2-Expression auf Protein-Ebene

in den U373MG-Knockdown-Klonen SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 versus SOXKO_control im Western Blot.

[Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Weber]

3.1.1 Morphologie

3.1.1.1 Morphologie in der Zellkultur

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der U373MG-Knockdown-Klone ließen sich geringe Unterschiede in der Morphologie feststellen: SOXKO_control wies im Vergleich zu den Knockdown-Klonen ein homogeneres Wachstumsmuster mit spindelförmigen Zellen auf. Die Populationen der Klone SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 zeigten sich in ihrer Zellform heterogener.

Auch beim Mikroskopieren von mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Zellkulturen fiel dieses unterschiedliche Wachstumsmuster auf (s. Abb. 3.2). Das dargestellte Phänomen war vor allem in niedrigeren Passagen auffällig; in höheren Passagen verloren sich die Differenzen zunehmend.

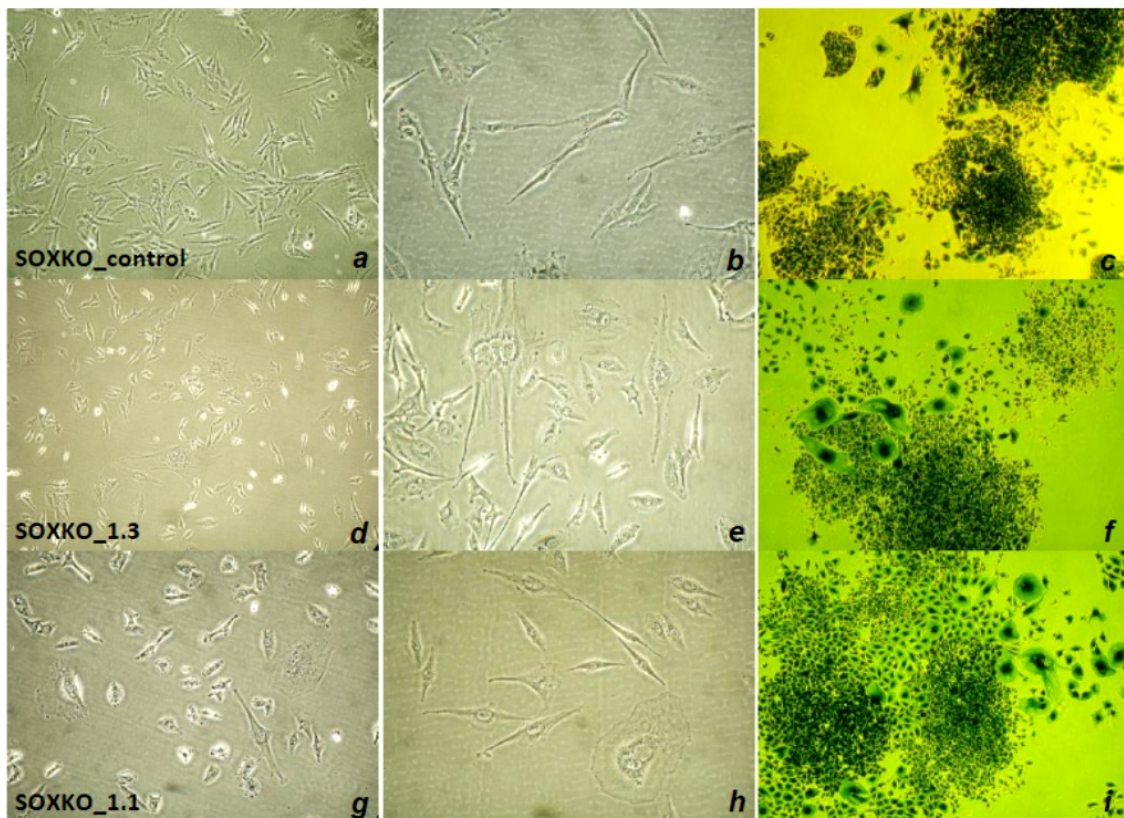


Abbildung 3.2: Wachstumsmuster der U373MG-Knockdown-Klone in der Zellkultur.

a-c: SOXKO_control, **d-f:** SOXKO_1.3, **g-i:** SOXKO_1.1

a, b, d, e, g, h: ungefärbte Zellkulturen.

c, f, i: mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbte Zellkulturen.

3.1.1.2 Bestimmung der Zellgröße

Zur weiteren Untersuchung morphologischer Charakteristika der U373MG-Klone wurde die Zellgröße mit Hilfe eines CASY[®]1 Model DT-Zellzählers (s. Kapitel 2.2.1.8.) bestimmt.

Die mittlere Zellgröße betrug für SOXKO_control und SOXKO_1.1 21 μm , für SOXKO_1.3 22 μm , wobei ein statistisch signifikanter Unterschied nicht festgestellt werden konnte (s. Abb. 3.3).

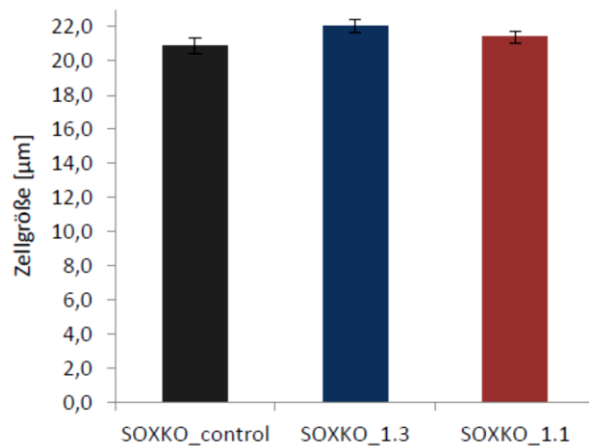


Abbildung 3.3: Mittlere Zellgröße der U373-MG-Klone.

3.1.2 Proliferationseigenschaften

3.1.2.1 Neubauer-Zählkammer

Die Auswirkungen des SOX2-Knockdowns auf die Proliferation wurden untersucht, indem Zellpopulationen der U373MG-Klone SOXKO_control, SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1 zu definierten Zeitpunkten mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden. Zu diesem Zweck wurden zum Zeitpunkt Null pro Klon jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert und im Brutschrank inkubiert. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden diese wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben ausgezählt. Um den Fehler zu minimieren, wurde pro Klon und Zeitpunkt mit je vier Ansätzen gearbeitet, aus denen der jeweilige Mittelwert berechnet wurde.

Dabei zeigte sich bereits für den 24-h-Wert ein Trend zu einer niedrigeren Proliferationsrate der Knockdown-Klone gegenüber dem Kontrollklon. Dieser Trend verstärkte sich über die Zeit, sodass in den 48- und 72-h-Werten für SOXKO_1.1 eine signifikant geringere, für SOXKO_1.3 eine hoch signifikant geringere Proliferation im Vergleich zu SOXKO_control gemessen wurde (s. Abb. 3.4).

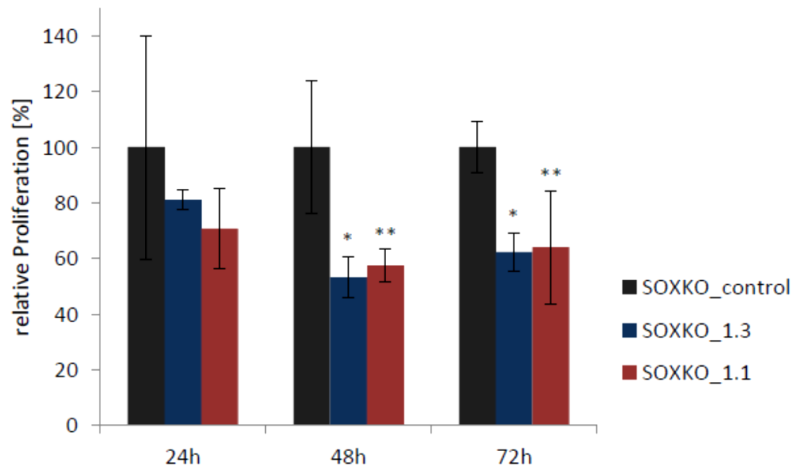


Abbildung 3.4: Relative Proliferation der U373MG-Knockdown-Klone im Neubauer-Zählversuch über 72 Stunden. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$)

3.1.2.2 MTT-Assay

Des Weiteren kam zur Validierung der beobachteten Suppression der Proliferation durch den SOX2-Knockdown der MTT-Assay zum Einsatz, dessen Ergebnisse diejenigen des Neubauer-Zählversuchs bestätigten. Auch hier zeichnete sich bereits im 24-h-Wert eine Verringerung der Proliferationsrate in den Knockdown-Klonen ab. Im 48- und 72-h-Wert zeigte sich dann eine statistisch höchst-signifikante Fortsetzung dieses Trends (s. Abb. 3.5).

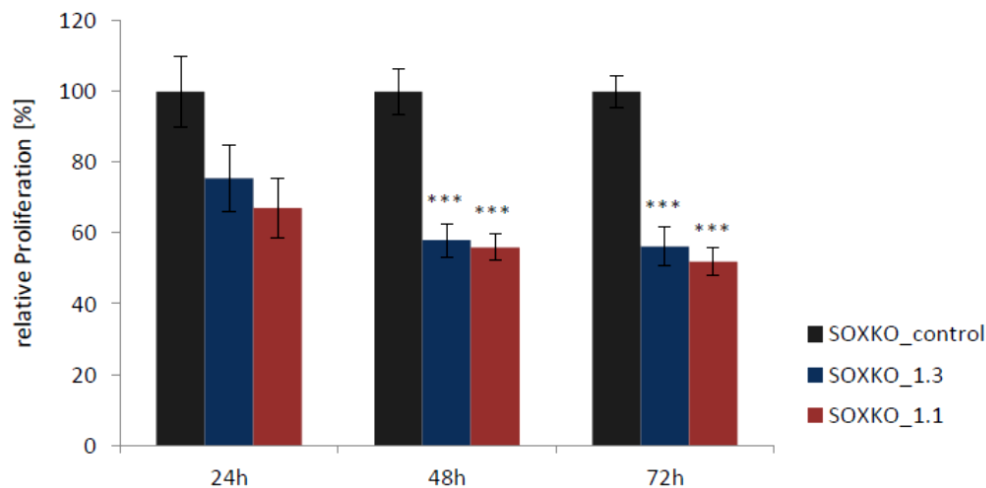


Abbildung 3.5: Relative Proliferationsrate der U373MG-Knockdown-Klone im MTT-Assay über 72 Stunden.
(***=p<0,005)

3.1.3 Koloniebildungseigenschaften

Um zu eruieren, ob der SOX2-Expressionsstatus auf Stammzeleigenschaften Einfluss nimmt, wurden Koloniebildungseigenschaften der U373MG-Zellpopulationen mittels des unter 2.2.1.9 erläuterten Methylcellulose-Assays untersucht.

Bei der Bestimmung der prozentualen Koloniebildungsrate (Gebildete Kolonien/Ausgesäte Zellzahl x 100) zeigte sich im t-Test eine statistisch signifikant höhere Koloniebildungsrate für den Kontrollklon SOXKO_control (19,25-19,87%) gegenüber den Knockdown-Klonen SOXKO_1.3 (11,21-12,50%) und SOXKO_1.1 (13,00-13,58%) bei 165 bzw. 200 ausgesäten Zellen (s. Abb. 3.6).

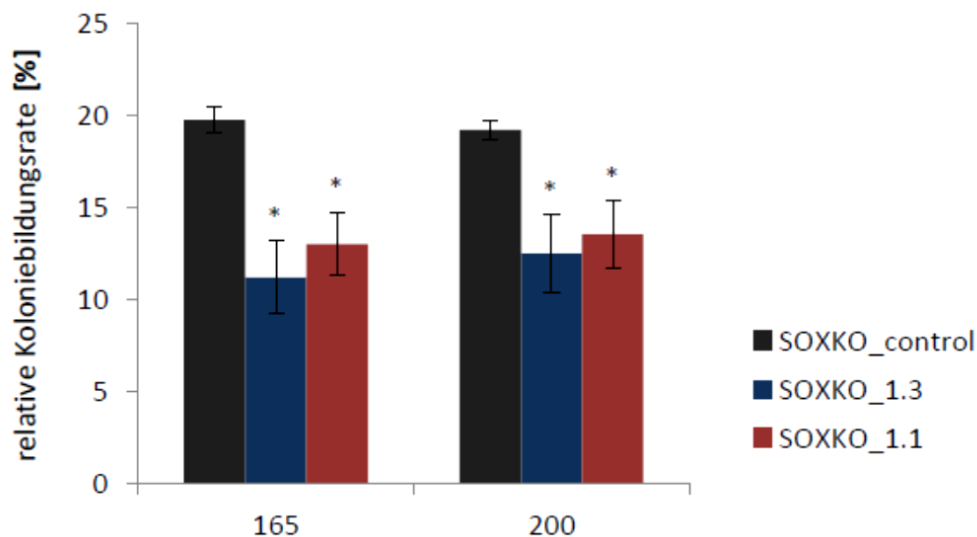


Abbildung 3.6: Relative Koloniebildungsrate der U373MG-Knockdown-Klone vs. SOXKO_control im Methylcellulose-Assay bei 165 und 200 ausgesäten Zellen. (*= $p < 0,05$)

3.1.4 SOX2-Downstream-Gene

Zur Untersuchung möglicher Downstream-Effekte des SOX2 in den U373MG-Knockdown-Klonen wurde die Expression verschiedener Target-Gene des SOX2, nämlich *NOTCH1* und *GFAP*, untersucht. Zum Einsatz kamen dabei die quantitative RT-PCR, die indirekte Immunhistologie mit Fluoreszenz sowie der Western Blot. Ein Vorhandensein solcher Downstream-Effekte würde belegen, dass der SOX2-Knockdown tatsächlich funktionelle Auswirkungen auf zellulärer Ebene hätte.

3.1.4.1 NOTCH1

Genprodukte der *NOTCH*-Familie spielen als Mitglieder evolutionär konservierter Signalwege, die für interzelluläre Interaktionen in Zellverbänden kodieren, eine Rolle bei der Zelldifferenzierung neuronaler Gewebe (75).

In mehreren Studien zeigte sich eine Überexpression von *NOTCH1* sowohl in Glioblastom-Zelllinien als auch in primären Zellkulturen humaner Glioblastome, wobei eine Down-Regulation von *NOTCH1* in diesen Zelllinien zu geringerer Proliferation und Apoptose führte (75,79).

In der Literatur wurde *NOTCH1* bereits als SOX2-Downstream-Target beschrieben (5).

Hier wurden die Expressionslevel von *NOTCH1* in den U373MG-Klonen mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Quantitative RT-PCR

In der differentiellen Genanalyse wiesen die Knockdown-Klone im Vergleich zum Kontrollklon SOXKO_control ein hoch signifikant geringeres *NOTCH1*-Expressionslevel auf (s. Abb. 3.7).

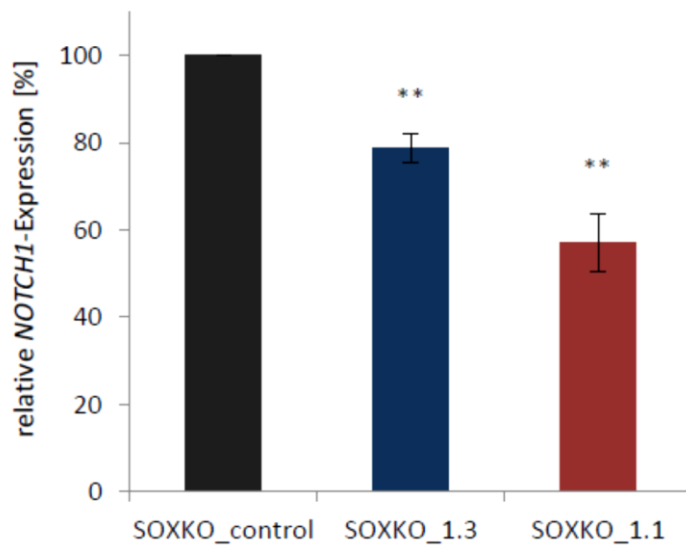


Abbildung 3.7: Relative NOTCH1-Expression der U373MG-Knockdown-Klone SOXKO_1.1 und SOXKO_1.3 vs. SOXKO_control in der quantitativen RT-PCR. (**=p<0,01)

3.1.4.2 GFAP

GFAP dient als für ein Intermediärfilament kodierendes Gen als Marker für differenzierte Astrozyten; somit zur Unterscheidung von anderen, sich differenzierenden glialen Zellen.

Die *GFAP*-Expressionslevel wurden auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR, auf Proteinebene mittels indirekter Immunhistologie mit Fluoreszenz und Western Blot untersucht.

Quantitative RT-PCR

In der differentiellen Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR konnte eine statistisch hoch-signifikant reduzierte *GFAP*-Expression bei den Kontrollklonen SOXKO_1.1 (43%) und SOXKO_1.3 (23%) gegenüber dem Kontrollklon SOXKO_control (100%) festgestellt werden (s. Abb. 3.8).

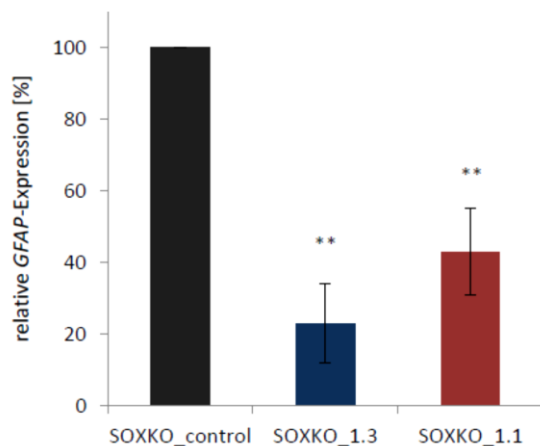


Abbildung 3.8: Relative *GFAP*-Expression der U373MG-Knockdown-Klone SOXKO_1.1 und SOXKO_1.3 vs. SOXKO_control in der quantitativen RT-PCR. (**= $p < 0,01$)

Indirekte Immunhistologie mit Fluoreszenz

Die geringere *GFAP*-Expression der Knockdown-Klone konnte zudem auch auf Proteinebene in der indirekten Immunhistologie mit Fluoreszenz bestätigt werden.

Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop war bei allen drei untersuchten Zellpopulationen ein *GFAP*-Signal sichtbar, wobei der Kontrollklon SOXKO_control ein zwar geringfügig, aber dennoch erkennbar stärkeres aufwies (s. Abb. 3.9).

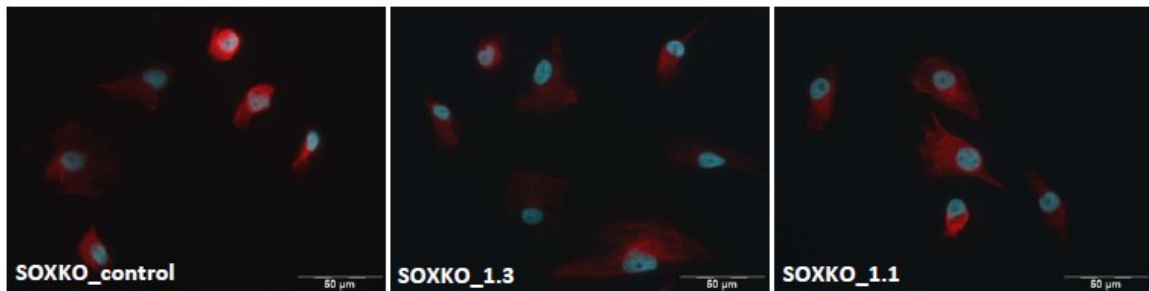


Abbildung 3.9: Immunzytochemischer Nachweis der *GFAP*-Expression in U373MG-Klonen SOXKO_control, SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1. Färbung mit dem Primärantikörper 20334 (anti-*GFAP*) und TRITC-konjugiertem Sekundärantikörper T6778 (rotes Fluoreszenz-Signal) und kernständiger Hoechst-Färbung (blaues Fluoreszenz-Signal).

Western Blot

Um die *GFAP*-Expressionslevel auf Proteinebene quantifizieren zu können, wurden zusätzlich zur indirekten Immunhistologie mit Fluoreszenz Western Blots durchgeführt.

Bei diesen Experimenten ergab sich ebenfalls eine um 53% signifikant schwächere *GFAP*-Expression für den Klon SOXKO_1.1 versus SOXKO_control. Für den Klon SOXKO_1.3 konnte eine 33%ig geringere Expression gezeigt werden, die allerdings nicht statistisch signifikant ist (s. Abb. 3.10).

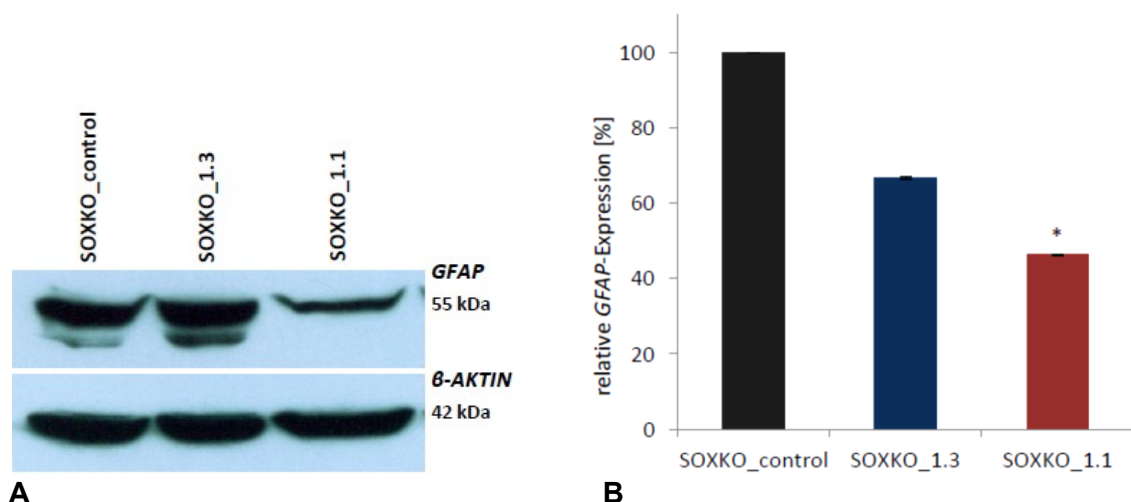


Abbildung 3.10: Immunchemischer Nachweis von *GFAP* und dem housekeeping-Genprodukt β -*AKTIN* in U373MG-Klonen im Western Blot.

A: Foto des Trenngels. **B:** Relative *GFAP*-Expression nach Quantifizierung der Expression mittels der Software „Gel-Pro-Analyser“ der Firma Media Cybernetics. (*= $p < 0,05$)

3.1.5 SOX2-Statusbestimmung

Während der Versuchsreihen wurden mittels quantitativer RT-PCR regelmäßig Kontrollen des SOX2-Knockdownstatus durchgeführt, um eben diesen im Verlauf sicherzustellen. Die Ergebnisse bestätigten einen konstant-stabilen SOX2-Knockdown in den U373MG-Zellen, sodass die Unterschiede in den untersuchten Eigenschaften mit großer Wahrscheinlichkeit auf eben diesen Knockdown zurückgeführt werden können.

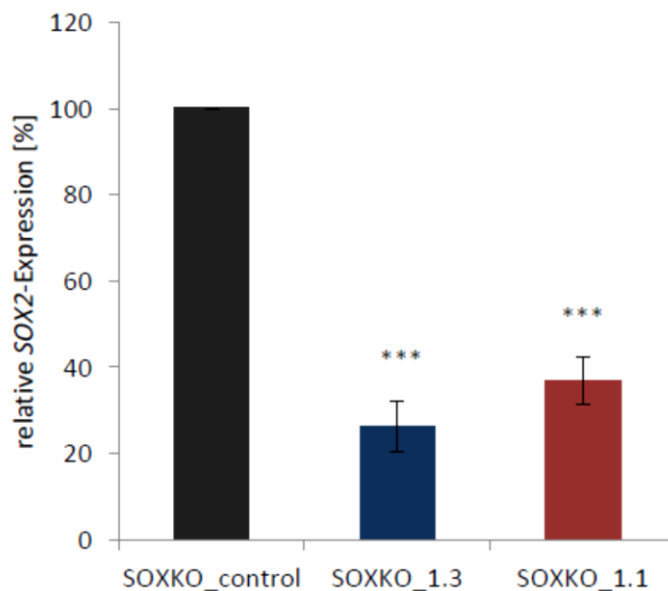


Abbildung 3.11: Relative SOX2-Expression der U373MG-Knockdown-Klone SOXKO_1.1 und SOXKO_1.3 vs. SOXKO_control in der quantitativen RT-PCR. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,005$)

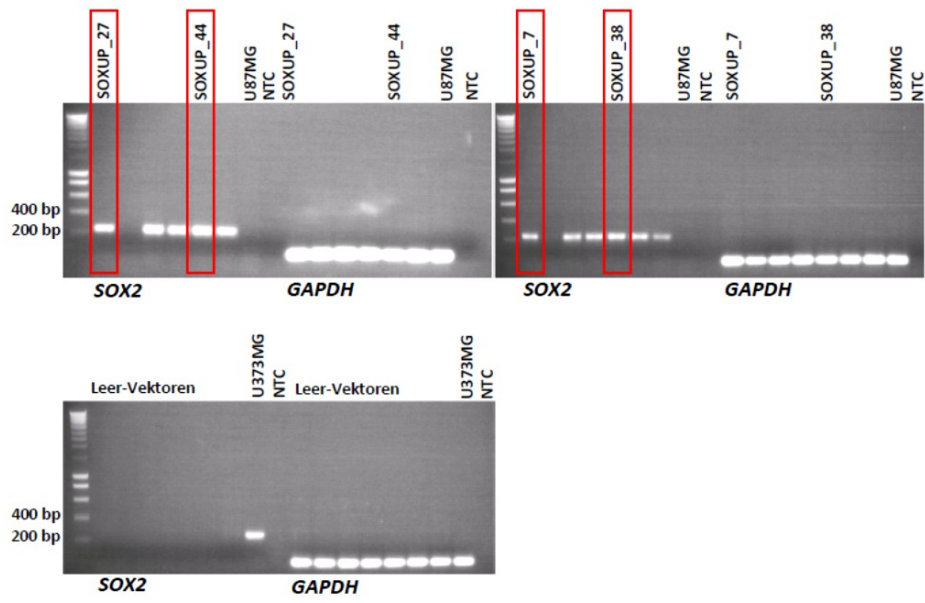
3.2 SOX2-Überexpression in U87MG-Zellen

Zur Bekräftigung der Untersuchungsergebnisse des SOX2-Knockdowns in U373MG-Zellen wurde an ursprünglich nicht SOX2-exprimierenden Zellen der etablierten humanen Glioblastomzelllinie U87MG eine spiegelbildlich angelegte Überexpressions-Studie durchgeführt.

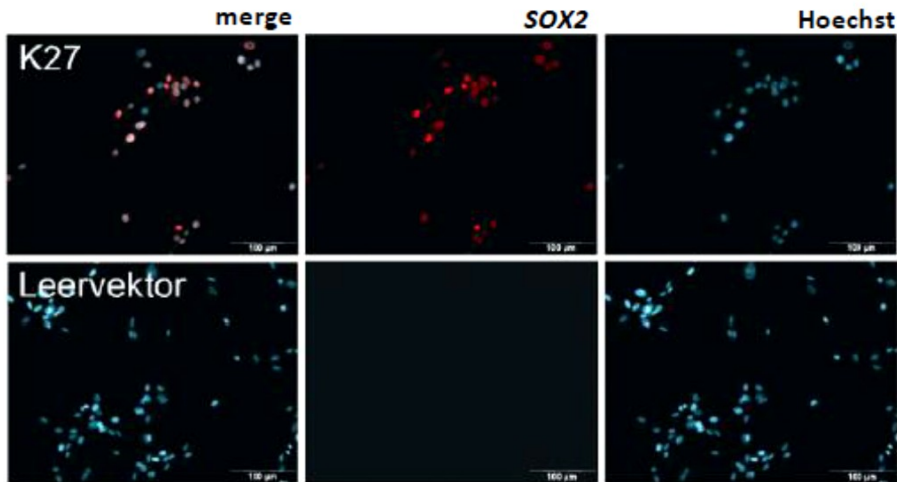
Mittels einer konventionellen RT-PCR an U87MG-Zellen konnte die hier fehlende SOX2-Expression gezeigt werden (s. Abb. 3.12A).

Zellen dieser Zelllinie wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1/myc-His A (Vektor-karte s. Anhang), in welches die SOX2-Gensequenz in Position KpnI-XhoI eingebracht worden war, stabil transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion konnte mittels konventioneller und quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene sowie mittels Western Blot und indirekter Immunhistologie mit Fluoreszenz auf Proteinebene nachgewiesen werden (s. Abb. 3.12).

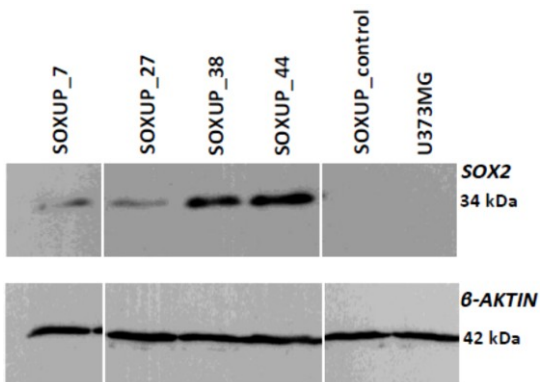
In dieser Arbeit wurde mit den Überexpressions-Klonen SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 sowie dem Kontrollklon SOXUP_control (mit einem eine nicht-kodierende Zufallssequenz tragenden Leervektor transfizierter Klon) gearbeitet.



A



B



C

Abbildung 3.12: s. Legende auf der folgenden Seite.

Abbildung 3.12: SOX2-Status in U87MG-Zellen und den stabil transfizierten U87MG-Überexpressionsklonen.

A: Konventionelle RT-PCR. Die U87MG-Zellen sowie die U87MG-Negativkontrollen (Leervektoren) exprimieren kein SOX2, während die U87MG-Überexpressionsklone sowie die als Positivkontrolle aufgetragenen U373MG-Zellen ein deutliches SOX2-Signal zeigen.

B: Indirekte Immunfluoreszenz. Von rechts nach links: Hoechst-Kernfärbung, SOX2-Färbung, merge: Übereinanderlagerung der beiden vorigen Bilder. Der U87MG-Überexpressionsklon SOXUP_27 (hier als K27 bezeichnet) zeigt im Gegensatz zu U87MG Leervektor-Klon SOXUP_control (hier als Leervektor bezeichnet) ein deutlich kernständiges SOX2-Signal (rot).

C: Western Blot. Die als Positivkontrolle dienenden U373MG-Zellen sowie die U87MG Überexpressionsklone zeigen eine SOX2-typische Bande bei 34 kDa, während bei dem U87MG-Leervektor SOXUP_control keine Bande sichtbar ist.

[Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Weber]

Eine nachträgliche Überprüfung der in die Überexpressions-Klone eingebrachte Gensequenz zeigte, dass diese nicht zu 100% dem humanen, in den U373MG-Zellen exprimierten SOX2 entsprach. Humanes SOX2 besitzt 317 Aminosäuren; in einer durchgeführten Gensequenzierung der zur stabilen Transfektion in den U87MG-Zellen verwendeten DNA sind insgesamt fünf Punktmutationen, darunter drei Aminosäureaustausche sowie zwei stille Mutationen, nachgewiesen worden (s. Tab. 3.1).

Aminosäure	Punktmutation	Auswirkung
71	(ATC)→(ACC) Isoleucin→Threonin	HMG-Box neutral, unpolar→neutral, polar
86	(GAG) →(GGG) Glutaminsäure→Glycin	HMG-Box sauer, polar→neutral, unpolar
143	(GTC)→(GTT)	still
152	(GGC)→(GAC) Glycin→Asparaginsäure	neutral, unpolar→sauer, polar
277	(TAT)→(TAC)	still

Tabelle 3.1: In der Gensequenzierung nachgewiesene Punktmutationen in der zur stabilen Transfektion der U87MG-Klone benutzten SOX2-Gensequenz.

3.2.1 Morphologie

3.2.1.1 Bestimmung der Zellgröße

Mit Hilfe der CASY-Technologie wurden die Zellgrößen der U87MG-Überexpressionsklone SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 im Vergleich zum Kontrollklon SOXUP_control bestimmt.

Hierbei zeigte sich ein geringeres mittleres Zellvolumen für die Überexpressionsklone, wobei die Ergebnisse für die Klone SOXUP_7, SOXUP_38 und SOXUP_44 im t-Test statistische Signifikanz aufwiesen.

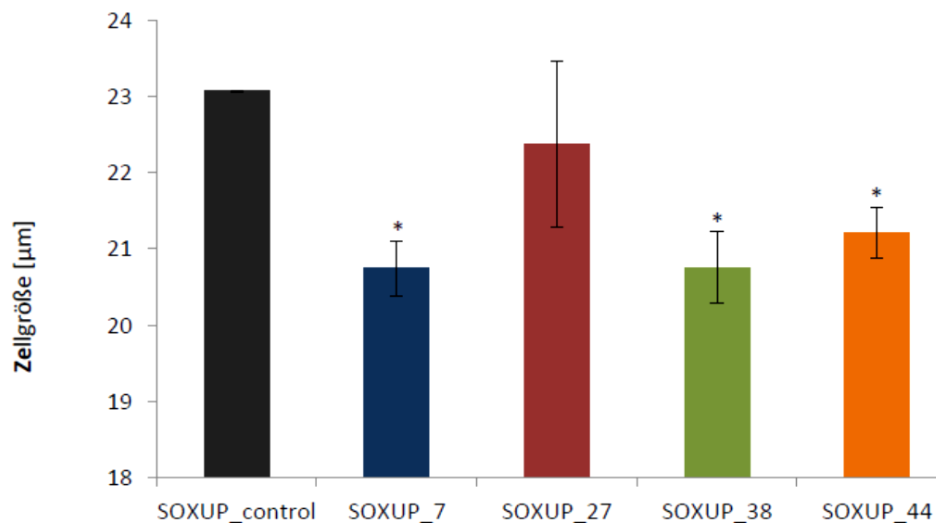


Abbildung 3.13: Vergleich der Zellvolumina der U87MG-Überexpressionsklone SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 im Vergleich zum U87MG-Kontrollklon SOXUP_control.

(* = $p < 0,05$)

3.2.2 Proliferationseigenschaften

3.2.2.1 Neubauer-Zählkammer

Analog zur Untersuchung der Proliferationseigenschaften bei den U373MG-Klonen wurde auch bei den U87MG-Überexpressionsklonen SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 versus SOXUP_control der Neubauer-Zählkammer-Versuch durchgeführt.

Hierbei ergab sich unter einer SOX2-Überexpression eine höhere relative Proliferationsrate gegenüber dem Kontrollklon. Dieser Effekt verstärkte sich über die Zeit. Statistische Signifikanzen variierten je nach Klon und Zeitintervall; im 72-Stunden-Wert wiesen alle Überexpressionsklone eine statistisch signifikant höhere Proliferation gegenüber SOXUP_control auf (s. Abb. 3.14).

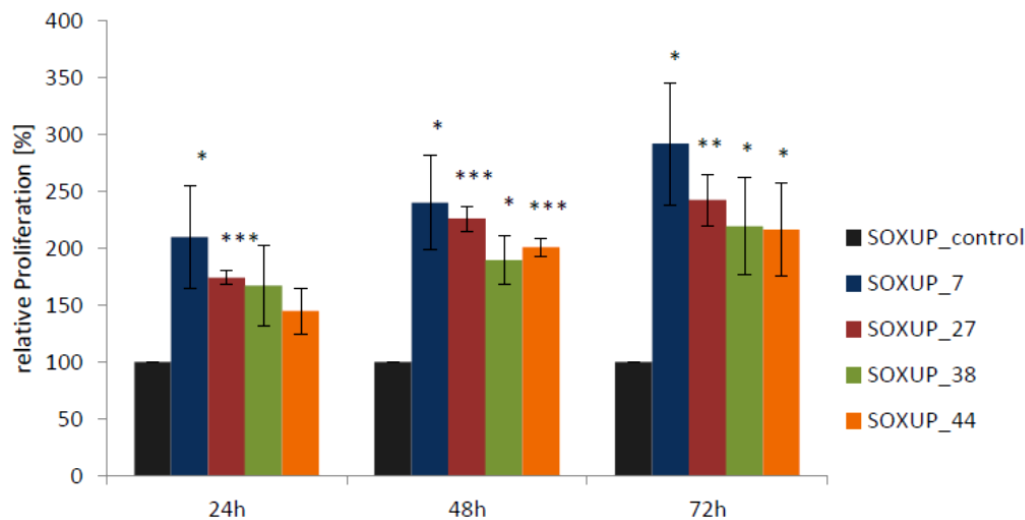


Abbildung 3.14: Relative Proliferation der U87MG-Klone im Neubauer-Zählversuch über 72 Stunden.

(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$)

3.2.2.2 MTT-Assay

Ebenfalls in Analogie zu den Versuchen mit den U373MG-Klonen wurde der MTT-Assay mit den U87MG-Überexpressionsklonen SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 versus SOXUP_control durchgeführt.

Auch hier zeigte sich der Trend zu einer höheren relativen Proliferationsrate der Überexpressionsklone gegenüber dem Kontrollklon. Dieser Effekt war allerdings vor allem bei dem Klonen SOXUP_38 und SOXUP_44 weniger stark ausgeprägt. Darüber hinaus kann eine statistische Signifikanz lediglich für den Klon SOXUP_27 festgehalten werden (s. Abb. 3.15).

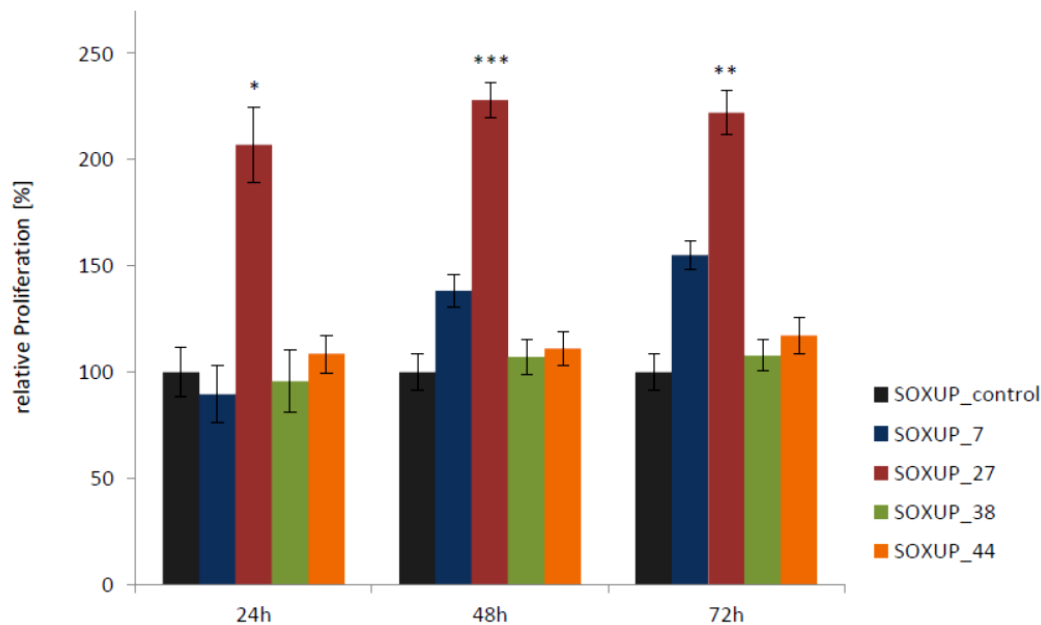


Abbildung 3.15: Relative Proliferationsrate der U87MG-Überexpressionsklone SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 versus SOXUP_control im MTT-Assay.

(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$)

3.2.3 SOX2-Downstream-Gene

3.2.3.1 NOTCH-1

Quantitative RT-PCR

Genau wie bei den U373MG-Klonen wurden auch hier die Effekte der SOX2-Überexpression auf *NOTCH1* als ein Target-Gen des untersuchten Transkriptionsfaktors mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Dabei stellte sich eine für SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 signifikant geringere Expressionsrate dar. SOXUP_7 wies ebenfalls eine geringere Rate auf; dies erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant (s. Abb. 3.16).

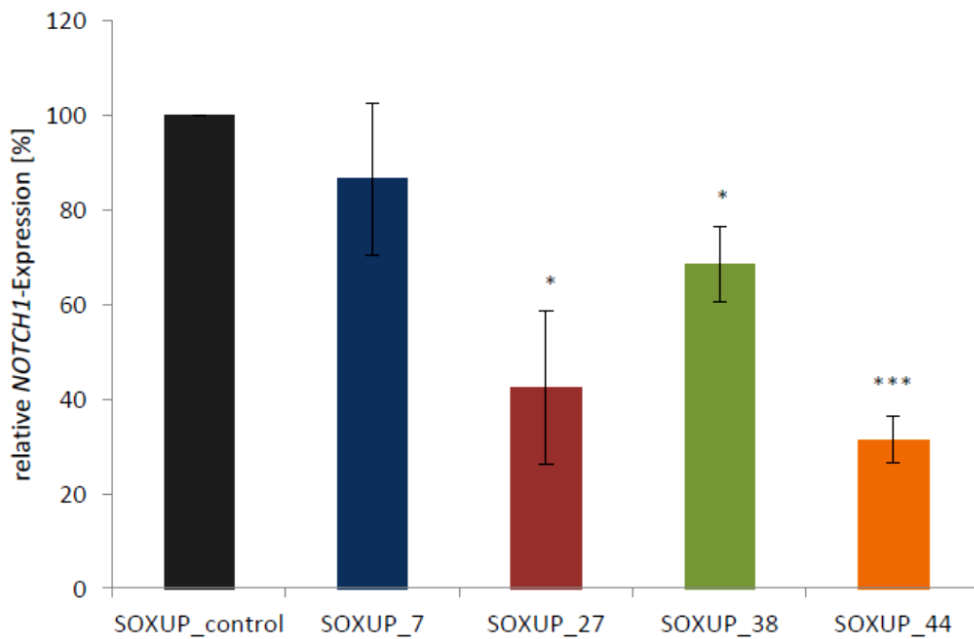


Abbildung 3.16: Relative *NOTCH1*-Expression der U87MG-Überexpressionsklone SOXUP_7, SOXUP_27, SOXUP_38 und SOXUP_44 versus SOXUP_control in der quantitativen RT-PCR.

(* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$)

3.2.3.2 GFAP

Indirekte Immunhistologie mit Fluoreszenz

Zur Untersuchung des *GFAP*- in Abhängigkeit vom *SOX2*-Expressionsstatus außerdem eine indirekte Immunhistologie mit Fluoreszenz durchgeführt. Es wurden Färbungen an Zellen des U87MG-Kontrollklons *SOXUP_control*, des U87MG-Überexpressionsklons *SOXUP_27* sowie des U373MG-Kontrollklons *SOXKO_control* hergestellt.

Wie erwartet ist in den *SOXUP_27*- sowie in den *SOXKO_control*-Zellen das kernständige grün fluoreszierende *SOX2*-Signal deutlich sichtbar, im Gegensatz zu den U87MG-Kontrollklon-Zellen. Das rot fluoreszierende zytoskelettale *GFAP*-Signal weist ausschließlich der U373MG-Kontrollklon *SOXKO_control* auf (s. Abb. 3.17).

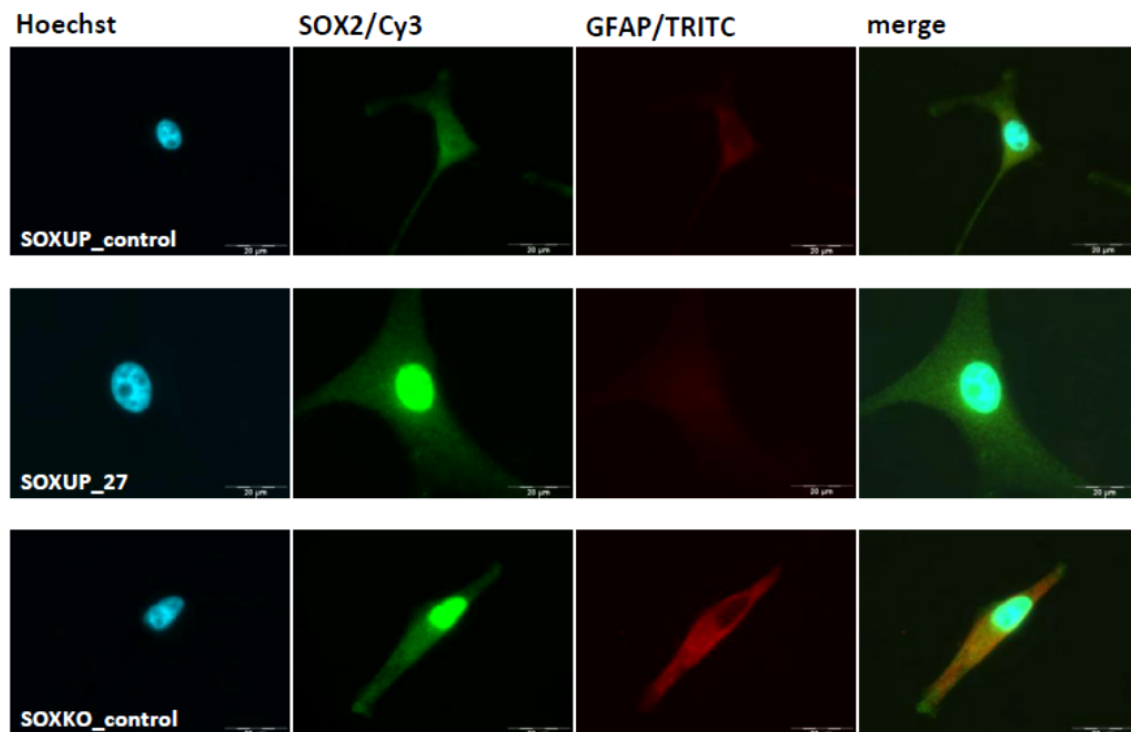


Abbildung 3.17: Indirekte Immunhistologie mit Fluoreszenz.

Erste Spalte: Hoechst-Kernfärbung. *Zweite Spalte:* Färbung mit Primärantikörper anti-SOX2 und Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper 115-165-062. *Dritte Spalte:* Färbung mit Primärantikörper anti-GFAP und TRITC-konjugiertem Sekundärantikörper T6778. *Vierte Spalte:* Übereinanderlagerung der Bilder der ersten drei Spalten.

Obere Reihe: U87MG-Kontrollklon *SOXUP_control*. *Mittlere Reihe:* U87MG-Überexpressionsklon *SOXUP_27*. *Untere Reihe:* U373MG-Kontrollklon *SOXKO_control*.

3.2.4 SOX2-Statusbestimmung

Um im Verlauf der Experimente das SOX2-Expressionslevel zu validieren, wurde dieser mittels konventioneller RT-PCR regelmäßig bestimmt. Dabei zeigte sich eine konstante Überexpression des Transkriptionsfaktors (s. Abb. 3.18).

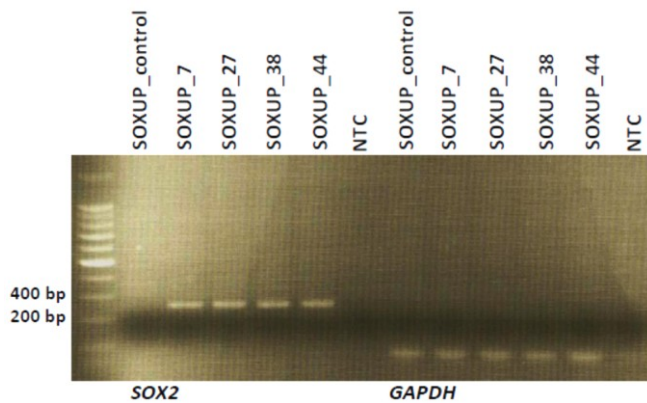


Abbildung 3.18: SOX2-Expression in U87MG-Zellen in der konventionellen RT-PCR. SOX2-mRNA kann in den U87MG-Überexpressionsklonen nachgewiesen werden, der Kontrollklon SOXUP_control exprimiert kein SOX2. NTC=Non-template-control.

3.3 SOX2-Statusbestimmung in C6TL-Zellen

Neben der humanen Zelllinie U373MG und U87MG wird in der Tumorforschung auch häufig die Gliomzelllinie C6 aus der Ratte eingesetzt. Diese eignet sich insbesondere für *in-vivo*-Versuche, z.B. im Rahmen von Xenotransplantaten in das Gehirn von Nacktmäusen (71), da sich dort ein dem humanen Gliom vergleichbares Invasionsverhalten zeigt. Für zukünftige Versuche wäre es daher von Interesse, den Expressionsstatus von SOX2 in dieser Zelllinie zu ermitteln. In vorliegender Arbeit wurde der SOX2-Expressionsstatus in der Rattengliomzelllinie C6TL mittels konventioneller RT-PCR, Gen-Sequenzierung, quantitativer RT-PCR und Western Blot untersucht.

3.3.1 Konventionelle RT-PCR

Zur Untersuchung der SOX2-Expression auf mRNA-Ebene wurde zunächst eine konventionelle RT-PCR durchgeführt. Hier konnte in den C6TL-Zellen wie auch in den als Positivkontrolle mitgeführten U373MG-Klonen SOXKO_control, SOXKO_1.3 und SOXKO_1.1, außerdem im nativen Rattenhirn SOX2-mRNA nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente neben der Non-template-control aus den Rattenfibroblasten Rat I gewonnene mRNA (s. Abb. 3.19).

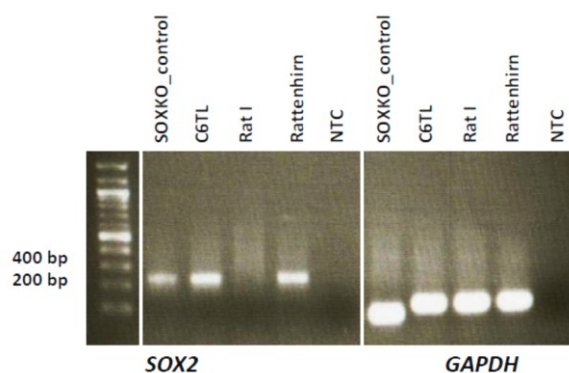


Abbildung 3.19: Konventionelle RT-PCR zum SOX2-mRNA-Nachweis in C6TL-Zellen. Als Positivkontrollen wurden die U373MG-Klone SOXKO_control, SOXKO_1.3, SOXKO_1.1 mitgeführt, als Negativkontrolle die Rattenfibroblasten-Zelllinie Rat I. Auch im Rattenhirn konnte SOX2-mRNA nachgewiesen werden. NTC=Non-template-control.

3.3.2 Quantitative RT-PCR

Um das Expressionslevel zu quantifizieren, wurde außerdem eine quantitative RT-PCR durchgeführt, wobei als Negativkontrolle die Rattenfibroblasten Rat I, die als mesenchymales Gewebe kein SOX2 exprimieren, dienten.

Die Expressionsanalyse wies eine etwa 250.000%ig höhere SOX2-Expression in den C6TL-Zellen gegenüber den Fibroblasten nach (s. Abb. 3.21).

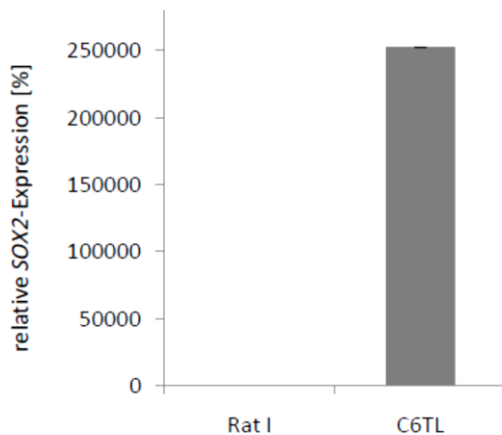


Abbildung 3.21: Relative SOX2-Expression in der quantitativen RT-PCR in der C6TL-Zelllinie vs. Rat I-Fibroblasten.

3.3.3 Western Blot

Auch auf Proteinebene war im Western-Blot die SOX2-Expression in der C6TL-Zelllinie nachweisbar; als Positivkontrolle dienten hier nachgewiesenerweise SOX2-exprimierende U373MG-Zellen (s. Abb. 3.22).

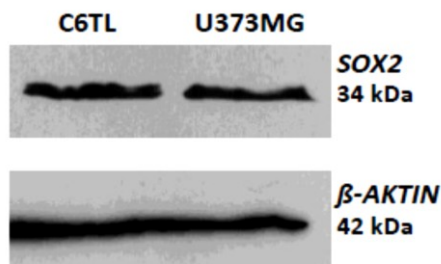


Abbildung 3.22: Immunchemischer Nachweis im Western Blot von SOX2 und dem housekeeping-Genprodukt β -AKTIN in der C6TL-Zelllinie. Als Positivkontrolle ist die U373MG-Zelllinie mitgeführt.

4. Diskussion

Maligne Gliome stellen als WHO-Grad-IV-Tumore des ZNS die häufigste primäre intrakranielle Tumorentität des Erwachsenen dar (18). Zugleich haben sich diese Tumore als ausgesprochen resistent gegenüber den heute bekannten chirurgischen, chemo- und radiotherapeutischen Strategien erwiesen. Die mangelhaften therapeutischen Möglichkeiten sowie das aggressive diffus-invasive Wachstumsverhalten der Neoplasie weit in umliegendes gesundes Hirnparenchym hinein und die hohe Rezidivrate bedingen verheerende Prognosen für die betroffenen Patienten mit medianen Überlebensraten von lediglich 14,6 Monaten nach Diagnosestellung trotz leitliniengerechter multimodaler Therapie (65,98).

Vor einigen Jahren konnte eine bestimmte Zellpopulation in Glioblastomen charakterisiert werden, welche sich einerseits durch Fähigkeiten, die in gesunden Geweben adulten neuralen Stammzellen zugeschrieben werden, andererseits durch ein tumorigenes Potenzial auszeichnet. Konkret handelt es sich dabei um die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung in verschiedene neuronale Zelltypen (also Multipotenz), sowie zur Initiierung von Tumorwachstum nach orthograde Transplantation. Dieser in primären Zellkulturen von vornehmlich Glioblastomen und Medulloblastomen nachgewiesene Zelltypus wird als Hirn-Tumorstammzelle bezeichnet und mittlerweile als verantwortlich für Initiierung, Aufrechterhaltung und Progression des aggressiven Wachstumsverhaltens angesehen (27,46,91,105,108,116). Auch in den etablierten humanen Gliomzelllinien U373MG und U87MG sowie der Ratten-Gliomzelllinie C6TL konnte unter der heterogenen Zellmasse ein Stammzell-ähnlicher Typus – die sogenannte Side population – nachgewiesen werden (44,70,108).

Diese Erkenntnisse haben nicht nur wesentlich zum besseren Verständnis der spezifischen Morphologie von Glioblastomen beigetragen, sondern sind auch als Gegenstand weiterer Forschung Hoffnungsträger neuer, effektiverer Therapiestrategien.

Um Tumorstammzellen in der heterogenen Tumormasse identifizieren zu können, hat man sogenannte Stammzellmarker bestimmt, darunter neben CD133, NESTIN, BMI1 und MUSASH1 auch SOX2 (57). Dieses Protein gehört zu einer

Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in verschiedensten Geweben an Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Neben SOX2 spielen SOX1 und SOX3, die gemeinsam die SOXB1-Gruppe bilden, während früher Entwicklungsphasen des ZNS eine Rolle; in späteren Phasen der neuralen Differenzierung werden diese Proteine herunter reguliert (110). Sie fungieren als Inhibitor neuronaler Differenzierung – und damit als ein wesentlicher Faktor für die Beibehaltung eines Stammzell-ähnlichen Status (13).

Schmitz *et al.* fanden den Transkriptionsfaktor SOX2 sowohl in Proben humaner Glioblastome als auch in verschiedenen etablierten Gliomzelllinien, u.a. U373MG, überexprimiert (74,89); zudem scheinen SOX2-Expression und Malignitätsgrad von Gliomen positiv miteinander zu korrelieren (57). Eigene Vorarbeiten am Institut für Neuropathologie der Universität Münster zeigten ebenfalls eine SOX2-Überexpression in primären Zellkulturen maligner Gliome, während in etablierten Gliomzelllinien eine heterogene SOX2-Verteilung zu finden war. So wies die Zelllinie U373MG eine SOX2-Expression auf – im Gegensatz zu der ebenfalls untersuchten U87MG-Gliomzelllinie, für die ein SOX2-Nachweis weder auf mRNA- noch auf Proteinebene erbracht werden konnte (s. Kapitel 3.1. und 3.2.).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum Einen die genauere Untersuchung der Funktion des SOX2 in humanen Gliomzelllinien. Dazu wurden die oben erwähnten Zelllinien U373MG und U87MG ausgewählt, da sie sich aufgrund ihres unterschiedlichen SOX2-Expressionsstatus sehr gut für die vorgesehenen Versuchsreihen eigneten. In diesen spiegelbildlich angelegten Studien sollte der Einfluss des SOX2 auf bestimmte Eigenschaften, die für das Invasionsverhalten dieser Tumore maßgeblich sind – beispielsweise Proliferation und Koloniebildung – untersucht werden. Zum Anderen wurde mit Blick auf zukünftige *in vivo*-Versuche der SOX2-Expressionsstatus in der Ratten-Gliomzelllinie C6TL, die zu diesem Zweck gut geeignet wäre, bestimmt.

4.1. Einfluss von SOX2 auf die Zell-Morphologie

In der Zellkultur zeigte sich mikroskopisch bei SOX2-Knockdownklonen der U373MG-Zelllinie eine heterogenere Morphologie im Vergleich zum Kontrollklon mit unbeeinflusster – folglich höherer – SOX2-Expression.

Dem Transkriptionsfaktor SOX2 kommt eine Bedeutung in der Beibehaltung eines Stammzell-ähnlichen Status zu; erst im weiteren Verlauf neuraler Differenzierung wird die Expression herunter reguliert (110). Vor diesem Hintergrund ließe sich die beobachtete morphologische Vielfalt unter einem SOX2-Mangel *in vitro* so interpretieren, dass es in diesen Populationen vermehrt zu Differenzierungen in verschiedene neurale Zelltypen kommt.

Mit Hilfe der CASY-Technologie (s. Kapitel 2.2.1.8.) wurde die Zellgröße der Klone der U373MG- sowie der U87MG-Zelllinie bestimmt. Für die U373MG-Knockdownklone zeigte sich im Vergleich zum U373MG-Kontrollklon kein signifikanter Unterschied. Die Zellvolumina der U87MG-Überexpressionsklone waren im Vergleich zum U87MG-Kontrollklon geringer, bei drei von vier untersuchten Klonen war dies statistisch signifikant. Die Zunahme der Zellgröße wird als ein Zeichen für Seneszenz beschrieben (ref. in (111)). Die vorliegende Beobachtung, dass SOX2-exprimierende Zellen kleiner sind als nicht-SOX2-exprimierende untermauert in diesem Zusammenhang also die Hypothese, SOX2 sei Stammzell-spezifisch. Die Tatsache, dass dieser Effekt nicht in allen untersuchten Klonen und Zelllinien beobachtet werden konnte, macht die Komplexität der untersuchten Stoffwechselprozesse deutlich.

4.2. Einfluss von SOX2 auf Proliferationseigenschaften

In der vorliegenden Arbeit wurde in den untersuchten Zelllinien ein stimulierender Effekt des SOX2 auf die Proliferation *in vitro* beobachtet. So führte der SOX2-Knockdown in der U373MG-Zelllinie zu einer geringeren, die Überexpression in der U87MG-Zelllinie dagegen zu einer höheren relativen Proliferationsrate.

Dem SOX2 wird eine regulierende Rolle bei der Zelldifferenzierung in Form einer Hemmung der Neurogenese neuraler Vorläufer-Zellen, sowie einer Beibehaltung Stammzell-ähnlicher Eigenschaften glialer Progenitor-Zellen und differenzierter Astrozyten (im Neokortex der Maus) zugeschrieben (5). In diesem Zusammenhang wird seit einigen Jahren eine wesentliche Bedeutung derselben SOX2-kontrollierten Regulationsmechanismen des Zell-Zyklus für die Tumorgenese des malignen Glioms diskutiert.

Einen Beleg dieser Tumor-Stammzell-Theorie in der Tumorgenese von Gliomen lieferten Gangemi *et al.*. Sie generierten einen shRNA-induzierten SOX2-Knockdown in primären Kulturen von Gliomzellen, die anschließend unter Stammzell-Bedingungen kultiviert wurden. Dabei zeigte sich der komplette Austritt der SOX2-Knockdown-Zellen aus dem Zell-Zyklus in Form einer stetigen Reduktion der Zellzahl bis zu ihrem völligen Verschwinden innerhalb von fünf Wochen. Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten Gangemi *et al.*, dass eine regelrechte Expression und Funktion von SOX2 respektive dessen Downstream-Targets für die Proliferation von Tumor-Stammzellen von Gliomen von herausragender Bedeutung sei (28).

Die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit stützen die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Gangemi *et al.*. Da hier jedoch nicht mit primären Gliom-Zellkulturen, sondern mit etablierten, über viele Jahrzehnte kultivierten Zelllinien gearbeitet wurde, müssen weitere Aspekte bedacht werden.

Man geht gemeinhin davon aus, dass Stammzell-Eigenschaften durch die in der Arbeit mit Zellkulturen übliche Kultivierung (in der Regel mit Serum) verloren gehen – dies würde demnach auch für die verwendeten Zelllinien zutreffen. Geht man aber davon aus, dass SOX2 ein Stammzell-spezifisches Markerprotein ist, steht zu diesen Überlegungen in Widerspruch, dass sich sowohl in den

U373MG-Zellen als auch in mehreren anderen im Institut für Neuropathologie der Universität Münster untersuchten etablierten Gliomzelllinien trotz dieser Bedingungen hohe SOX2-Expressionlevel fanden. Während die U87MG-Zelllinie dagegen nach jahrzehntelanger Kultivierung keine SOX2-Expression aufweist, führt eine Überexpression des Transkriptionsfaktors auch hier zu einer Zunahme der Proliferationsrate.

Diese Sachverhalte stehen offensichtlich in Konflikt mit der weit verbreiteten Hypothese, die Expression von SOX2 sei Stammzell-spezifisch und damit als Marker eben dieser Zellen geeignet. Es muss erwogen werden, ob SOX2 möglicherweise nicht nur in der Tumor-Stammzell-Fraktion, sondern auch in solchen Tumorzellen ohne Stammzell-Eigenschaften das Proliferationsverhalten reguliert. Für diese Theorie spräche auch die Tatsache, dass in der Literatur zum Teil hohe prozentuale SOX2-Gehalte – bis 66% – in Gliomen beschrieben sind, während man von einem vergleichsweise geringen Anteil an Tumorstammzellen an der heterogenen Gesamtzellmasse eines Tumors ausgeht (89). Weiterhin böte das Modell eines Proliferation-regulierenden, aber nicht notwendigerweise Stammzell-spezifischen SOX2 so auch eine logische Erklärung für die in der Literatur beschriebene positive Korrelation zwischen SOX2-Expressionslevel und Malignität des Tumors (57).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass SOX2 an Proliferations-regulierenden Vorgängen sowohl in etablierten Gliom-Zelllinien als auch in primären Gliom-Zellkulturen maßgeblich beteiligt ist. Konkret hat SOX2 in diesem Zusammenhang eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation. Ob SOX2 dabei als Stammzell-spezifisch und damit als Marker für diese Zellfraktion gelten kann, erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen zweifelhaft.

4.3. Einfluss von SOX2 auf Koloniebildungseigenschaften

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein SOX2-Knockdown in der etablierten U373MG-Gliomzelllinie zu einer verminderten Koloniebildung *in vitro* führt.

Um zur Koloniebildung imstande zu sein, muss eine Zelle in der Lage sein, losgelöst von ihrem Zellverband nicht nur zu überleben, sondern zudem zu proliferieren und schließlich einen neuen Zellverband zu generieren. Dieses Potenzial zur Selbsterneuerung ist wesentlich und charakteristisch für Stammzellen. Obwohl berücksichtigt werden muss, dass über Jahrzehnte kultivierte etablierte Zelllinien – mit denen hier gearbeitet wurde – diese Fähigkeit unabhängig von einem Stammzell-Status erworben haben könnten, kann ein solcher Prozess dennoch als Indiz einer vorhandenen Tumorigenität gewertet werden. Wenn demnach also die Tumorigenität einer Zelle mit steigendem SOX2-Gehalt zunimmt, wäre dies eine weitere Erklärung für die positive Korrelation zwischen SOX2-Expressionslevel und Malignitätsgrad (57).

Jing *et al.* lieferten ähnliche Ergebnisse in ihrer Studie mit primären Zellkulturen von Zervix-Tumoren: eine SOX2-Überexpression mittels Einbringen rekombinanter DNA in die Zellen führte dort ebenfalls zu einer gesteigerten Koloniebildung (37).

4.4. Downstream-Target von SOX2: NOTCH1

Um festzustellen, ob der SOX2-Knockdown auf zelluläre Signaltransduktionen tatsächlich Effekte hat, wurden die Expressionslevel von *NOTCH1* sowohl in U373MG- als auch in U87MG-Zellen bestimmt. *NOTCH1* bot sich hier besonders an, da es in der Literatur bereits als SOX2-Downstream-Target beschrieben worden war (5).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des SOX2-Expressionslevels funktionelle Auswirkungen in den betroffenen Zellen hat. In den U373MG-Zellen führte der SOX2-Knockdown zu einer Herunter-Regulation der *NOTCH1*-Expression. Die SOX2-Überexpression in den U87MG-Zellklonen hatte denselben Effekt zur Folge.

Dem *NOTCH1* wird eine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung zugeschrieben, darunter auch derjenigen der Zellen des Nervensystems – in Form einer Inhibierung der Neurogenese (6,35). In neuronalen adulten Stammzellen, in Glioblastom-Zelllinien sowie in primären Zellkulturen humaner Gliome konnte eine *NOTCH1*-Überexpression nachgewiesen werden. Ein experimenteller *NOTCH1*-Knockdown führte in diesen Zelllinien zur Verringerung der Proliferationsrate und zur Apoptose (75,79). Bani-Yaghoub *et al.* postulierten in ihrer Studie, dass SOX2 über eine Regulierung der *NOTCH1*-Expression verantwortlich für die Aufrechterhaltung der proliferativen Fähigkeiten sowie der Multipotenz einer Zelle im sich entwickelnden Neokortex ist (5).

Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppen stehen in Einklang mit den Beobachtungen, die in vorliegender Arbeit an U373MG-Zellen gemacht wurden und sprechen dafür, dass SOX2 als die *NOTCH1*-Expression regulierendes Element in zellulären Signalwegen wirkt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich im Falle der SOX2-Überexpression ein spiegelbildlicher Effekt – nämlich in dem Falle eine *NOTCH1*-Heraufregulierung – eingestellt hätte. Dass dem offenbar nicht so ist, sondern auch in dieser Konstellation eine *NOTCH1*-Herunterregulierung beobachtet wurde, widerlegt allerdings nicht obligatorisch die oben erläuterten Hypothesen. So sind solch komplexe und sensible Vorgänge wie die Zellproliferation über das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert und kontrolliert. Auch für SOX2 sind verschiedenste

Funktionen, unter anderem auch in Abhängigkeit von verschiedenen Bindungspartnern, beschrieben (45,113). Natürlich werden durch einen Eingriff in den Zellstoffwechsel wie die hier induzierte SOX2-Überexpression in den U87MG-Zellen verschiedene Target-Gene beeinflusst. Das *NOTCH1* ist darunter lediglich ein Einziges, welches in der vorliegenden Arbeit zudem isoliert, nicht im Zusammenhang innerhalb eines gemeinsamen Signalweges, betrachtet wurde. Dieses eingeschränkte Blickfeld sollte man bei der Interpretation solcher Ergebnisse stets berücksichtigen. Theoretisch könnte die Verminderung der *NOTCH1*-Expressionsrate durch das Zusammenspiel weiterer, nicht untersuchter und somit unbemerkter, Faktoren in den U87MG-Zellen zustande gekommen sein.

4.5. Einfluss von SOX2 auf den Differenzierungsmarker GFAP

Die hier durchgeführten Versuche zum *GFAP*-Expressionslevel in Abhängigkeit vom *SOX2*-Status zeigten eine Reduzierung des *GFAP* in *SOX2*-depletierten U373MG-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene, sodass die beiden Proteine über Regulationsmechanismen funktionell miteinander verknüpft zu sein scheinen. In der U87MG-Zelllinie, in der sich im Kontrollklon wie auch in auswärtigen Studien (80) beschrieben nur eine geringe *GFAP*-Expression zeigte, hatte die *SOX2*-Überexpression wiederum keine messbaren Effekte.

Das *GFAP* ist ein Intermediärfilament, welches vornehmlich in Zellen glialen Ursprungs exprimiert wird und dort der Stabilisierung des Zytoskeletts dient. In neuropathologischen Untersuchungen wird dieses zytoplasmatische Protein üblicherweise als spezifischer Marker für Astrozyten – sowohl unter physiologischen als auch pathologischen (reaktive, z.B. nach Hypoxien, oder neoplastische Astrozyten) Bedingungen – verwendet. *GFAP* gilt überdies als Markerprotein für adulte neurale Stammzellen der subventrikulären Zone (zwischen Seitenventrikel und Striatum) (19). *SOX2* seinerseits wird verantwortlich gemacht für die Beibehaltung eines Stammzell-ähnlichen Status.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Studien an neuronalen Stamm- bzw. Progenitorzellen eine Koexpression der beiden Proteine beschreiben (47,54,94). Auch in verschiedenen zentralnervösen Tumoren fand man eine häufige Koexpression von *SOX2* und *GFAP*, vornehmlich bei Neoplasien glialen Ursprungs (74), wobei in diversen Studien in den vergangenen Jahren festgestellt wurde, dass die *GFAP*-Expression mit steigendem Malignitätsgrad von Astrozytomen abnimmt (21,72,80,83). Restrepo *et al.* stellten bei ihren Untersuchungen des *GFAP*-Status in fünf von sechs etablierten Gliom-Zelllinien (darunter U87MG mit niedrigem Expressionslevel; U373MG wurde nicht untersucht) sowie in primären Kulturen von Glioblastomen wiederum sehr niedrige Expressionslevel fest (80). Auch in weiteren Tumorentitäten wurde eine erhöhte *GFAP*-Expression nachgewiesen, beispielsweise in Oligodendrogliomen, Ependymomen, Primitiven Ektodermalen Tumoren und Plexus-Papillomen (14,59,63,64,83). Darüber hinaus konnten Mutationen im *GFAP*-Gen bei der

seltener Erkrankung Morbus Alexander nachgewiesen werden (12); außerdem wird eine Beteiligung der *GFAP*-Mutation an der Entstehung Gliom-ähnlicher Tumoren bei diesen Patienten diskutiert (61,104).

Das *GFAP* spielt demnach eine weiter zu ergründende Rolle in der Tumorbio-
logie verschiedener Tumorentitäten des ZNS; überdies scheint es nach den vor-
liegenden Ergebnissen mit der Funktion des *SOX2* in der U373MG-
Gliomzelllinie *in vitro* verknüpft zu sein. Dass die *SOX2*-Überexpression in
U87MG-Zellen dagegen keine Auswirkungen auf den *GFAP*-Status hatte, muss
wie bei den Untersuchungen zur *NOTCH1*-Expression in U87MG-Zellen daran
denken lassen, dass hier lediglich ein kleiner Ausschnitt zellulärer Signalwege
betrachtet werden konnte (s. auch unter 4.4.).

4.6. SOX2-Status in der C6TL-Zelllinie

Um die Funktion des SOX2 weitergehend erforschen zu können, werden künftig tierexperimentell gewonnene Daten von Interesse werden. Für die Hirntumorforschung hat sich diesbezüglich die Ratten-Gliomzelllinie C6 im Rahmen von Xenotransplantaten in das Gehirn von Nacktmäusen als geeignet erwiesen, da ihr Invasionsverhalten dem humaner Gliome ähnelt. Insbesondere böte sich in dieser Konstellation die C6TL-Zelllinie an. Diese ist ausgehend von der C6-Zelllinie genetisch modifiziert, sodass über ein Tetrazyklin/tTA-System die Transkription eines bestimmten zu untersuchenden Gens – in diesem Fall SOX2 – auch nach der Transplantation kontrolliert werden kann (71,90).

Vordringlich für eine sinnvolle Versuchsplanung ist zunächst das Wissen um den SOX2-Expressionsstatus in dieser Zelllinie. Die hier gewonnenen Daten belegen eine vorhandene SOX2-Expression der C6TL-Zelllinie auf mRNA- und Protein-Ebene. Zur endgültigen Verifizierung, dass es sich bei dem in der konventionellen RT-PCR amplifizierten Fragment tatsächlich um SOX2-DNA handelt, wäre eine Sequenzierung des PCR-Produkts im weiteren Verlauf gut geeignet.

Sollte sich das Ergebnis auch hier bestätigen, wäre es daher im Hinblick auf zukünftige tierexperimentelle Modelle zur weiteren Untersuchung der Effekte des SOX2 auf das Invasionsverhalten von Gliomen sinnvoll, einen SOX2-Knockdown in C6TL-Zellen zu generieren. Mit Hilfe dieser aus *in vivo*-Versuchen gewonnenen Erkenntnissen könnte die Bedeutung des SOX2 in Gliomen noch genauer erforscht werden.

4.7. Ausblick

Es lässt sich bei der Betrachtung der gewonnenen Erkenntnisse folglich festhalten, dass SOX2 in den humanen Glioblastom-Zelllinien U373MG und U87MG funktionelle Effekte hat. Diese äußern sich in einer Stimulation sowohl der Proliferation als auch der Koloniebildung *in vitro* bei steigendem SOX2-Expressionslevel. In zukünftigen *in vitro*-Studien könnte es von Interesse sein, die zellulären Mechanismen, die Interaktionen des SOX2 mit diversen Bindungspartnern und deren Bedeutung für den Zellstoffwechsel zu erforschen.

Im weiteren Verlauf müssten auch Daten aus *in vivo*-Versuchen gewonnen werden. Als geeignet für tierexperimentelle Studien an Nacktmäusen hat sich die Rattengliomzelllinie C6TL erwiesen, deren SOX2-Status bisher nicht untersucht worden war. In vorliegender Arbeit konnte hier eine SOX2-Expression nachgewiesen werden, so dass sich für künftige *in vivo*-Studien ein SOX2-Knockdown in diesen Zellen anbietet.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (7): 3983-3988
- (2) ALTMAN J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135: 1127-1128
- (3) Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat.Rev.Neurosci.* 2 (4): 287-293
- (4) Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17 (1): 126-140
- (5) Bani-Yaghoub M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK, et al. (2006) Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev.Biol.* 295 (1): 52-66
- (6) Beatus P, Lendahl U (1998) Notch and neurogenesis. *J.Neurosci.Res.* 54 (2): 125-136
- (7) Berlit P, Deuschl G, Elger C, Gold R, Hacke W, Hufschmidt A, et al. (2008) Gliome. In: Diener HC (Hrsg) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. überarbeitete Auflage. Aufl., S. 774-788
- (8) Berridge M, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* (4): 14-19
- (9) Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 94 (4): 303-309
- (10) Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ (1997) Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 89 (9): 3104-3112
- (11) Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122 (6): 947-956
- (12) Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat.Genet.* 27 (1): 117-120

(13) Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat.Neurosci.* 6 (11): 1162-1168

(14) Coffin CM, Mukai K, Dehner LP (1983) Glial differentiation in medulloblastomas. Histogenetic insight, glial reaction, or invasion of brain? *Am.J.Surg.Pathol.* 7 (6): 555-565

(15) Collins VP (2004) Brain tumours: classification and genes. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 75 Suppl 2: ii2-11

(16) Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, et al. (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128 (24): 5201-5212

(17) Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62 (10): 2152-2165

(18) Davis FG, McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML (1999) The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer* 85 (2): 485-491

(19) Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97 (6): 703-716

(20) Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat.Neurosci.* 6 (11): 1127-1134

(21) Duffy PE, Huang YY, Rapport MM (1982) The relationship of glial fibrillary acidic protein to the shape, motility, and differentiation of human astrocytoma cells. *Exp.Cell Res.* 139 (1): 145-157

(22) Ekonomou A, Kazanis I, Malas S, Wood H, Alifragis P, Denaxa M, et al. (2005) Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1. *PLoS Biol.* 3 (6): e186

(23) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.* 4 (11): 1313-1317

(24) Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, et al. (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat.Genet.* 33 (4): 461-463

(25) Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al. (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131 (15): 3805-3819

- (26) Gage FH (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J.Neurosci.* 22 (3): 612-613
- (27) Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64 (19): 7011-7021
- (28) Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al. (2009) SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27 (1): 40-48
- (29) Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80 (8): 2390-2394
- (30) Graham JD, Hunt SM, Tran N, Clarke CL (1999) Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators. *J.Mol.Endocrinol.* 22 (3): 295-304
- (31) Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39 (5): 749-765
- (32) Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jager D, Altorki NK, et al. (2000) Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (8): 4198-4203
- (33) Hagstrom SA, Pauer GJ, Reid J, Simpson E, Crowe S, Maumenee IH, et al. (2005) SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am.J.Med.Genet.A.* 138A (2): 95-98
- (34) Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (25): 15178-15183
- (35) Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, et al. (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 16 (7): 846-858
- (36) Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J.Neurooncol.* 70 (2): 137-160
- (37) Ji J, Zheng PS (2010) Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum.Pathol.* 41 (10): 1438-1447
- (38) Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16 (4): 182-187

- (39) Kamar FG, Posner JB (2010) Brain metastases. *Semin.Neurol.* 30 (3): 217-235
- (40) Katoh M (2002) Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors. *Int.J.Mol.Med.* 9 (4): 363-368
- (41) Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, et al. (2006) Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J.Clin.Invest.* 116 (9): 2442-2455
- (42) Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. (2010) Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am.J.Pathol.* 177 (6): 2708-2714
- (43) Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1 (1): 44-51
- (44) Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101 (3): 781-786
- (45) Kondoh H, Kamachi Y (2010) SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42 (3): 391-399
- (46) Kong DS, Kim MH, Park WY, Suh YL, Lee JI, Park K, et al. (2008) The progression of gliomas is associated with cancer stem cell phenotype. *Oncol.Rep.* 19 (3): 639-643
- (47) Lam CS, Marz M, Strahle U (2009) Gfap and Nestin Reporter Lines Reveal Characteristics of Neural Progenitors in the Adult Zebrafish Brain. *Dev.Dyn.* 238 (2): 475-486
- (48) Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics, 1999. *CA Cancer.J.Clin.* 49 (1): 8-31, 1
- (49) Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (25): 13883-13888
- (50) Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, Scotting PJ (2002) Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J.Neurooncol.* 57 (3): 201-214
- (51) Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Mendez A, Han Y, Pallavi B (2007) Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 39 (12): 2195-2214

(52) Lefebvre V (2010) The SoxD transcription factors--Sox5, Sox6, and Sox13--are key cell fate modulators. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42 (3): 429-432

(53) Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60 (4): 585-595

(54) Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience* 166 (1): 241-251

(55) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114 (2): 97-109

(56) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193 (1): 265-275

(57) Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008) Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J.Neurooncol.* 86 (1): 31-45

(58) Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15 (11): 1311-1333

(59) Maraziotis T, Perentes E, Karamitopoulou E, Nakagawa Y, Gessaga EC, Probst A, et al. (1992) Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, retinal S-antigen, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human medulloblastomas: a clinicopathological analysis of 36 cases. *Acta Neuropathol.* 84 (4): 355-363

(60) Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. (2004) Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 103 (6): 2332-2336

(61) Mignot C, Desguerre I, Burglen L, Hertz-Pannier L, Renaldo F, Gadisseux JF, et al. (2009) Tumor-like enlargement of the optic chiasm in an infant with Alexander disease. *Brain Dev.* 31 (3): 244-247

(62) Mishra NK, Ryan WL (1973) Effect of 3-methylcholanthrene and dimethylnitrosamine on anchorage dependence of rat fibroblasts chronically infected with Rauscher leukemia virus. *Int.J.Cancer* 11 (1): 123-130

(63) Molenaar WM, Jansson DS, Gould VE, Rorke LB, Franke WW, Lee VM, et al. (1989) Molecular markers of primitive neuroectodermal tumors and other pediatric central nervous system tumors. Monoclonal antibodies to neuronal and

- glial antigens distinguish subsets of primitive neuroectodermal tumors. *Lab.Invest.* 61 (6): 635-643
- (64) Nakagawa Y, Perentes E, Rubinstein LJ (1986) Immunohistochemical characterization of oligodendrogliomas: an analysis of multiple markers. *Acta Neuropathol.* 72 (1): 15-22
- (65) Nishikawa R (2010) Standard therapy for glioblastoma--a review of where we are. *Neurol.Med.Chir.(Tokyo)* 50 (9): 713-719
- (66) Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 109 (1): 93-108
- (67) Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 64 (6): 479-489
- (68) Okano H (2002) Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J.Med.* 51 (3): 115-128
- (69) Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 3 (12): 895-902
- (70) Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG (2005) Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* 65 (14): 6207-6219
- (71) Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab.Invest.* 75 (6): 819-826
- (72) Peraud A, Mondal S, Hawkins C, Mastronardi M, Bailey K, Rutka JT (2003) Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades. *Brain Tumor Pathol.* 20 (2): 53-58
- (73) Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1/04: 92-94
- (74) Phi JH, Park SH, Kim SK, Paek SH, Kim JH, Lee YJ, et al. (2008) Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am.J.Surg.Pathol.* 32 (1): 103-112
- (75) Pierfelice TJ, Schreck KC, Eberhart CG, Gaiano N (2008) Notch, neural stem cells, and brain tumors. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 73: 367-375
- (76) Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, et al. (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat.Genet.* 18 (2): 171-173

- (77) Polyak K, Hahn WC (2006) Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat.Med.* 12 (3): 296-300
- (78) Ponten J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 74 (4): 465-486
- (79) Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, et al. (2005) Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 65 (6): 2353-2363
- (80) Restrepo A, Smith CA, Agnihotri S, Shekarforoush M, Kongkham PN, Seol HJ, et al. (2010) Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. *Neuro Oncol.*
- (81) Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 (5052): 1707-1710
- (82) Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. (2005) Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J.Biol.Chem.* 280 (26): 24731-24737
- (83) Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, et al. (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J.Neurosurg.* 87 (3): 420-430
- (84) Sandberg M, Kallstrom M, Muhr J (2005) Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat.Neurosci.* 8 (8): 995-1001
- (85) Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, et al. (2000) Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* 45 (3): 207-215
- (86) Sauerzweig S (2009) Identifizierung einer Subpopulation von Stammzellen mit embryonalem und frühem neuralen Phänotyp aus dem Knochenmark der Ratte [zugl. Dissertation]. Digitale Hochschulbibliothek Sachsen-Anhalt, Magdeburg
- (87) Scaffidi P, Bianchi ME (2001) Spatially precise DNA bending is an essential activity of the sox2 transcription factor. *J.Biol.Chem.* 276 (50): 47296-47302
- (88) Schlierf B, Friedrich RP, Roerig P, Felsberg J, Reifenberger G, Wegner M (2007) Expression of SoxE and SoxD genes in human gliomas. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 33 (6): 621-630
- (89) Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, et al. (2007) Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br.J.Cancer* 96 (8): 1293-1301

- (90) Senner V, Sturm A, Hoess N, Wassmann H, Paulus W (2000) In vivo glioma model enabling regulated gene expression. *Acta Neuropathol.* 99 (6): 603-608
- (91) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63 (18): 5821-5828
- (92) Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23 (43): 7267-7273
- (93) Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum.Mol.Genet.* 12 (12): 1439-1447
- (94) Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54 (8): 805-814
- (95) Stolt CC, Schmitt S, Lommes P, Sock E, Wegner M (2005) Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Dev.Biol.* 281 (2): 309-317
- (96) Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, Werner T, Kosian T, et al. (2006) SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev.Cell.* 11 (5): 697-709
- (97) Stolt CC, Wegner M (2010) SoxE function in vertebrate nervous system development. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42 (3): 437-440
- (98) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N.Engl.J.Med.* 352 (10): 987-996
- (99) Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4): 663-676
- (100) Taylor LP (2010) Diagnosis, treatment, and prognosis of glioma: five new things. *Neurology* 75 (18 Suppl 1): S28-32
- (101) Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr.Opin.Neurobiol.* 9 (1): 135-141
- (102) Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (26): 14720-14725

- (103) Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H (1999) Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech.Dev.* 84 (1-2): 103-120
- (104) van der Knaap MS, Salomons GS, Li R, Franzoni E, Gutierrez-Solana LG, Smit LM, et al. (2005) Unusual variants of Alexander's disease. *Ann.Neurol.* 57 (3): 327-338
- (105) Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat.Rev.Cancer.* 6 (6): 425-436
- (106) Wakamatsu Y, Endo Y, Osumi N, Weston JA (2004) Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev.Dyn.* 229 (1): 74-86
- (107) Wang TW, Stromberg GP, Whitney JT, Brower NW, Klymkowsky MW, Parent JM (2006) Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *J.Comp.Neurol.* 497 (1): 88-100
- (108) Weber K, Paulus W, Senner V (2010) The side population of gliomas exhibits decreased cell migration. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 69 (6): 623-631
- (109) Wechsler-Reya R, Scott MP (2001) The developmental biology of brain tumors. *Annu.Rev.Neurosci.* 24: 385-428
- (110) Wegner M, Stolt CC (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28 (11): 583-588
- (111) Wiener M (2009) Plastizität von schnell teilenden humanen mesenchymalen Stammzellen auf Einzelzellebene [zugl. Dissertation]. Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- (112) Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, et al. (2006) Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 15 (9): 1413-1422
- (113) Wilson M, Koopman P (2002) Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12 (4): 441-446
- (114) Xia Y, Papalopulu N, Vogt PK, Li J (2000) The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer Res.* 60 (22): 6303-6306
- (115) Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9 (21): 2635-2645

(116) Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, et al. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23 (58): 9392-9400

(117) Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin.Cancer Res.* 14 (1): 123-129

6. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Werner Paulus bin ich für die Vergabe des Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit sehr dankbar.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Volker Senner für die überragende Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung der vorliegenden Arbeit bedanken. Als hilfsbereiter, interessierter Ansprechpartner war er für den erfolgreichen Fortgang der Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie der Universität Münster bedanke ich mich für die freundliche und kollegiale Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Kathrin Weber, die mir stets auf sehr angenehme und ruhige Art hilfreich zur Seite stand.

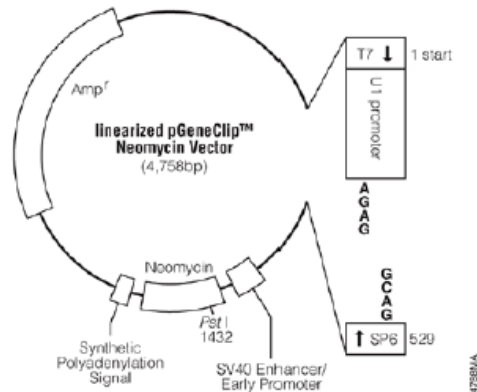
Meinem besonderen Freund Herrn Philipp Oecking danke ich für motivierenden Zuspruch, germanistischen Rat und die Durchsicht der Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die neben ihrem Interesse am Fortgang der Arbeit und motivierendem Zuspruch mir die Abfassung dieser Arbeit in jeder erdenklichen Hinsicht erst ermöglicht haben.

Diese Arbeit wurde gefördert durch das Projekt „Innovative medizinische Forschung“ an der Medizinischen Fakultät Münster (Förderkennzeichen SE 11 08 02).

7. Anhang

Vektorkarten



pGeneClip™ Neomycin Vector sequence reference points:

Base pairs	4758
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
U1 promoter (human, -392 to +1)	46-438
10bp spacer	439-448
U1 termination sequence	449-465
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	527-546
SP6 RNA polymerase promoter primer binding site	529-547
Binding region of pUC/M13 reverse sequencing primer	564-585
SV40 early enhancer/promoter	798-1216
SV40 minimum origin of replication	1114-1179
Coding region of neomycin phosphotransferase	1251-2045
Synthetic poly(A) signal	2080-2128
Beta-lactamase (Amp ^r) coding region	3080-3940
Binding region of pUC/M13 forward sequencing primer	4692-4715
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	4742-3

Abbildung 8.1: pGeneClip Neomycin Vector

Vektorkarte des zum SOX2-Knockdown in U373MG-Zellen verwendeten Vektors

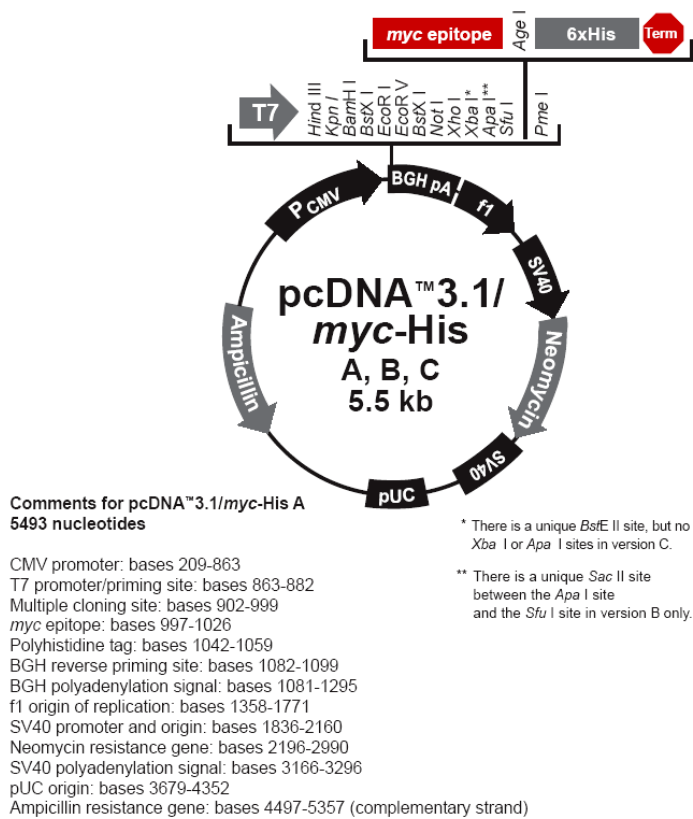


Abbildung 8.2: pcDNA 3.1/myc-His

Vektorkarte des zur SOX2-Überexpression in U87MG-Zellen verwendeten Vektors