







## **Biologie**

# **Interaktionsstudien und funktionelle Analysen des Transkriptionsfaktors SOX2 in Glioblastomzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat-  
im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

**Lars Rüter**

aus Coesfeld

- 2013 -

Dekanin/Dekan: .....  
(Prof. Dr. Dirk Prüfer)

Erste Gutachterin/  
Erster Gutachter:.....  
(Prof. Dr. Werner Paulus)

Zweite Gutachterin/  
Zweiter Gutachter:.....  
(Prof. Dr. Angelika Barnekow)

Tag der mündlichen Prüfung(en):...02.05.2013.....

Tag der Promotion: ..24.05.2013.....



***"O dulce nomen libertatis!"***

Marcus Tullius Cicero

*für meine Liebsten*

Diese Arbeit wurde durch die Initiative „Innovative medizinische Forschung“ (IMF) des Fachbereichs Medizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Förderkennzeichen SE 11 08 02, gefördert.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Das zentrale Nervensystem .....</i>	1
1.2	<i>Tumoren des ZNS .....</i>	3
1.3	<i>Astrozytäre Tumoren .....</i>	4
1.4	<i>Das Glioblastom .....</i>	5
1.5	<i>Pathogenese und molekulare Diversität von Glioblastomen .....</i>	6
1.5.1	<i>Ursprung von Glioblastomen .....</i>	10
1.6	<i>Migration und Invasion von Tumorzellen .....</i>	11
1.7	<i>Kandidatengene .....</i>	14
1.7.1	<i>SOX2 (Sry-related HMG-Box gene 2) .....</i>	14
1.7.2	<i>GFAP (glial fibrillary acidic protein) .....</i>	17
1.7.3	<i>RUNX1 (runt-related transcription factor 1) .....</i>	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Vorarbeiten .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>23</b>
4.1	<i>Arbeiten mit Zelllinien .....</i>	23
4.1.1	<i>Kultivierung und Passagieren .....</i>	23
4.1.2	<i>Kryokonservierung .....</i>	23
4.1.3	<i>Bestimmung der Zellzahl .....</i>	23
4.1.4	<i>Transiente Transfektion mit siRNA .....</i>	24
4.2	<i>Migrationsanalyse .....</i>	24
4.2.1	<i>Wundheilungsassay .....</i>	24
4.3	<i>Proliferationsanalyse .....</i>	25
4.3.1	<i>MTT-Assay .....</i>	25
4.4	<i>in vivo Versuche (Xenotransplantation) .....</i>	25
4.4.1	<i>Intrakraniale Implantation stabil transfizierter U87MG Zellen .....</i>	26
4.5	<i>Messung der Tumorprogression mittels MRT .....</i>	27
4.6	<i>Nukleinsäureanalytik .....</i>	27
4.6.1	<i>Plasmidpräparation .....</i>	28
4.6.2	<i>Amplifikation von DNA mittels PCR .....</i>	28
4.6.3	<i>Restriktion von DNA .....</i>	29
4.6.4	<i>Agarosegelelektrophorese .....</i>	30
4.6.5	<i>Elution von DNA aus Agarosegelen .....</i>	30
4.6.6	<i>Ligation von DNA .....</i>	30
4.6.7	<i>Sequenzierung .....</i>	31
4.6.8	<i>Arbeiten mit RNA .....</i>	32
4.7	<i>Proteinbiochemische Methoden .....</i>	35
4.7.1	<i>Herstellung von Proteinextrakten .....</i>	35
4.7.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry .....</i>	35
4.7.3	<i>Nachweis von Proteinen mittels Western Blot .....</i>	35
4.7.4	<i>Die SDS-PAGE .....</i>	35
4.7.5	<i>Transfer (blotting) .....</i>	36
4.7.6	<i>Immundetektion .....</i>	37

4.7.7	Densitometrie .....	37
4.8	Immunfluoreszenz.....	38
4.8.1	Immunfluoreszenz an Zellen .....	38
4.8.2	Immunfluoreszenz an Paraffinmaterial.....	38
4.9	Immunhistochemie an Paraffinmaterial.....	39
4.10	Methoden zum Nachweis von Protein-Proteininteraktionen.....	40
4.10.1	<i>In situ</i> Proximity Ligation assay (PLA).....	40
4.10.2	<i>In situ</i> PLA an Paraffinmaterial.....	43
4.11	Arbeiten mit Bakterien.....	43
4.11.1	Kultivierung.....	43
4.11.2	Lagerung und Anlegen einer Dauerkultur.....	44
4.11.3	Transformation von Bakterien.....	44
4.12	Arbeiten mit Hefen .....	44
4.12.1	Kultivierung.....	45
4.12.2	Lagerung und Anlegen einer Dauerkultur.....	45
4.12.3	Herstellen kompetenter Hefen und deren Transformation .....	45
4.12.4	Herstellen einer cDNA-Bibliothek.....	47
4.13	Das yeast two-hybrid System.....	47
4.13.1	Yeast two-hybrid screen.....	49
4.13.2	Analyse der <i>prey</i> Inserts.....	50
4.13.3	Plasmidisolierung aus Hefen.....	50
4.13.4	Proteinisolierung aus Hefen.....	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
5.1	SOX2-knockdown.....	57
5.1.1	Auswahl geeigneter Klone.....	57
5.1.2	Nachweis des SOX2-knockdowns auf mRNA-Ebene.....	57
5.1.3	Nachweis des SOX2-knockdowns auf Proteinebene .....	58
5.2	Funktionelle Analysen des SOX2-knockdowns.....	59
5.2.1	Proliferationsanalyse.....	59
5.2.2	Migrationsanalyse .....	60
5.3	SOX2 Überexpression.....	62
5.3.1	Auswahl geeigneter Klone.....	62
5.3.2	Nachweis der SOX2 Überexpression auf mRNA-Ebene.....	62
5.3.3	Nachweis der SOX2 Überexpression auf Proteinebene .....	63
5.4	Funktionelle Analysen der SOX2 Überexpression.....	64
5.4.1	Proliferationsanalyse.....	64
5.4.2	Migrationsanalyse .....	65
5.5	<i>In vivo</i> Analysen .....	66
5.5.1	Implantation der modifizierten U87MG-Zellen in <i>NOD/SCID</i> Mäuse.....	66
5.5.2	MRT-Messungen .....	66
5.5.3	Histologische Korrelation .....	68
5.6	Interaktionsstudien.....	75
5.6.1	Herstellen geeigneter SOX2 Deletionsmutanten .....	75
5.6.2	Autoaktivität, Zytotoxizität und Expressionsanalyse .....	76
5.6.3	Herstellen einer cDNA-Bibliothek .....	78
5.6.4	Komplexität der cDNA-Bibliothek .....	78
5.6.5	Yeast two-hybrid screens.....	79
5.6.6	Auswahl potentieller Interaktionspartner.....	83
5.6.7	<i>mapping</i> der Bindestelle .....	87
5.7	Interaktionsvalidierung mittels Proximity Ligation assay (PLA).....	88
5.7.1	Etablierung geeigneter Kontrollen .....	88

5.7.2	Interaktionsvalidierung SOX2 und RUNX1 .....	90
5.7.3	Interaktionsvalidierung SOX2 und GFAP $\delta$ .....	92
5.7.4	Interaktionsnachweise in humanem Tumormaterial .....	94
5.8	<i>Doppelknockdown Analysen von SOX2 und RUNX1</i> .....	97
5.8.1	<i>Knockdown</i> von SOX2 und RUNX1 .....	97
5.8.2	RUNX1 Expressionsanalyse .....	97
5.8.3	Etablierung des RUNX1- <i>knockdowns</i> .....	98
5.8.4	Nachweis des RUNX1- <i>knockdowns</i> auf mRNA-Ebene .....	99
5.8.5	Nachweis des RUNX1- <i>knockdowns</i> auf Proteinebene .....	100
5.9	<i>Funktionelle Analysen</i> .....	102
5.9.1	Proliferationsanalyse .....	102
5.9.2	Migrationsanalyse .....	105
5.10	<i>Doppelknockdown Analysen von SOX2 und GFAP<math>\delta</math></i> .....	107
5.10.1	<i>Knockdown</i> von SOX2 und GFAP $\delta$ .....	107
5.10.2	GFAP $\delta$ Expressionsanalyse .....	108
5.10.3	Etablierung des GFAP $\delta$ <i>knockdowns</i> .....	108
5.10.4	Nachweis des GFAP $\delta$ - <i>knockdowns</i> auf mRNA-Ebene .....	109
5.10.5	Nachweis des GFAP $\delta$ - <i>knockdowns</i> auf Proteinebene .....	109
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>111</b>
6.1	<i>Proliferationsanalyse mit SOX2-knockdown und Überexpressionsklonen</i> .....	112
6.2	<i>Migrationsanalyse mit SOX2-knockdown und Überexpressionsklonen</i> .....	116
6.3	<i>SOX2 im therapeutisch-relevanten Kontext</i> .....	120
6.4	<i>in vivo Analysen</i> .....	121
6.5	<i>Interaktionsanalysen</i> .....	124
6.5.1	<i>Yeast two-hybrid</i> Analysen .....	124
6.5.2	Validierung der Interaktionen mittels PLA .....	130
6.6	<i>Funktionelle Analysen nach (Doppel)-knockdown</i> .....	135
6.6.1	Funktionelle Analysen nach Modifikation der SOX2/RUNX1 Expression .....	135
6.6.2	Funktionelle Analysen nach Modifikation der SOX2/GFAP $\delta$ Expression .....	138
6.7	<i>Ausblick</i> .....	140
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>145</b>
8.1	<i>Material</i> .....	145
8.1.1	Zelllinien .....	145
8.1.2	Bakterien .....	145
8.1.3	Hefestämme .....	145
8.1.4	Versuchstiere .....	145
8.1.5	Reagenziensysteme & Kits .....	146
8.1.6	Lösungen, Medien und Antibiotika für die Zellkultur .....	146
8.1.7	Enzyme .....	147
8.1.8	Immunologische Reagenzien .....	147
8.1.9	Standards .....	148
8.1.10	<i>Primer</i> .....	148
8.1.11	Vektoren .....	149
8.1.12	Reaktionspuffer und Standardlösungen .....	150
8.1.13	Chemikalien .....	151
8.1.14	Geräte .....	153
8.1.15	verwendete Software .....	155
8.2	<i>Vektorkarten</i> .....	156

## INHALTSVERZEICHNIS

---

8.3	<i>Sequenzierungen/Blastanalysen</i> .....	164
<b>9</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>175</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>197</b>

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke.....	2
Abb. 1.2: Häufigkeit der in den USA diagnostizierten primären ZNS-Tumoren.....	3
Abb. 1.3: MRT-Bildgebung (Magnetresonanztomografie) eines Glioblastoms.....	6
Abb. 1.4: Übersicht der häufigsten genetischen Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Gliomen.....	7
Abb. 1.5: Die häufigsten betroffenen Signalwege bei der Entstehung von Glioblastomen.....	9
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Hirntumorstammzelltheorie.....	10
Abb. 1.7: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen der Gliominvasion.....	12
Abb. 1.8: Theoretisches Modell zur Funktionsweise von SOX-Proteinen.....	15
Abb. 3.1: SOX2-Expressionsanalyse in humanen Resektaten und Glioblastomzelllinien.....	22
Abb. 4.1: Implantationstechnik mittels eines stereotaktischen Rahmens.....	26
Abb. 4.2: Schematische Darstellung des <i>Proximity Ligation assay</i> .....	41
Abb. 4.3: Schematische Darstellung des <i>yeast two-hybrid Systems</i> .....	48
Abb. 5.1: Analyse des stabilen SOX2- <i>knockdowns</i> auf mRNA-Ebene.....	57
Abb. 5.2: Expressionsanalyse der ausgewählten SOX2- <i>knockdown</i> Klone.....	58
Abb. 5.3: Analyse des stabilen SOX2- <i>knockdowns</i> auf Proteinebene.....	59
Abb. 5.4: Proliferationsanalyse der stabilen SOX2- <i>knockdown</i> Klone.....	60
Abb. 5.5: Migrationsanalyse der stabilen SOX2- <i>knockdown</i> Klone.....	61
Abb. 5.6: SOX2-Expressionsnachweis in den Zelllinien U87MG und T98G.....	63
Abb. 5.7: Westernblotanalyse zur SOX2-Expression in den Glioblastomzelllinien U87MG und T98G.....	63
Abb. 5.8: Proliferationsanalyse der stabilen EGFP-SOX2-Überexpressionsklone.....	64
Abb. 5.9: Analyse des Migrationsverhaltens der SOX2-Überexpressionsklone.....	65
Abb. 5.10: T2-gewichtete MRT-Bildgebung zweier implantierter Mäuse, 7 und 14 Tage nach der Operation.....	67
Abb. 5.11: Korrelation der HE-Färbung der Mausgehirne mit den MRT-Messdaten.....	69
Abb. 5.12: Histologische Färbung der Mausgehirne 14 Tage nach der Implantation der U87MG-Zellen....	70
Abb. 5.13: Auszählung der Ki67-positiven Zellkerne der SOX2 <sup>+</sup> - und SOX2 <sup>-</sup> -Tumoren.....	72
Abb. 5.14: Histologische GFAP-Färbung und Vimentin/GFAP-Doppelimmunfluoreszenz zweier Maushirntumorpräparate.....	73
Abb. 5.15: Schematische Darstellung des humanen <i>full length</i> SOX2-Proteins sowie hergestellter Deletionsmutanten.....	75
Abb. 5.16: Repräsentative Darstellung des analytischen Verdau der generierten SOX2 Konstrukte.....	76
Abb. 5.17: Western Blot Analyse der SOX2-Expression im Hefestamm Y2HGold.....	77
Abb. 5.18: Darstellung der LD-PCR zur Vervielfältigung der generierten cDNA-Amplikons.....	78
Abb. 5.19: Exemplarische Darstellung einer Kolonie-PCR verschiedener Klone.....	80
Abb. 5.20: Exemplarische Darstellung der HaeIII-Restriktion ausgewählter Kandidaten des ersten Y2H- <i>screens</i> .....	81
Abb. 5.21: Schematische Darstellung von RUNX1.....	84
Abb. 5.22: Paarweiser Sequenzvergleich.....	84
Abb. 5.23: Analytischer Verdau der GFAP <i>full length</i> Konstrukte.....	85
Abb. 5.24: Western Blot Analyse zur Expression von humanem GFAP im Y2HGoldstamm.....	85
Abb. 5.25: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer SOX2/GFAP-Kotransformation im Hefestamm Y2H Gold nach 5 Tagen Inkubationszeit.....	86
Abb. 5.26: Etablierung geeigneter Kontrollen für den PLA.....	89
Abb. 5.27: Einzelnachweis von SOX2 und RUNX1 in U373MG-Zellen.....	90
Abb. 5.28: Interaktionsvalidierung zwischen SOX2 und RUNX1 mittels PLA in U373MG-Zellen.....	91
Abb. 5.29: Interaktionsvalidierung zwischen SOX2 und GFAP $\delta$ mittels PLA in U373MG-Zellen.....	93
Abb. 5.30: Expressionsnachweis von SOX2, RUNX1 und GFAP $\delta$ in einem humanen Glioblastom.....	95
Abb. 5.31: PLA-Analyse an einem <i>tissue array</i> .....	96
Abb. 5.32: RUNX1 Expressionsanalyse in den humanen Glioblastomzelllinien auf mRNA-Ebene.....	97
Abb. 5.33: RUNX1 Expressionsanalyse in den SOX2 Klonen auf mRNA-Ebene.....	98
Abb. 5.34: Etablierung des RUNX1- <i>knockdowns</i> .....	99
Abb. 5.35: Nachweis des RUNX1- <i>knockdowns</i> auf mRNA-Ebene.....	100
Abb. 5.36: Nachweis des RUNX1- <i>knockdowns</i> auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz.....	101
Abb. 5.37: Proliferationsanalyse nach RUNX1- <i>knockdown</i> in U373MG-Zellen.....	102

Abb. 5.38: Proliferationsanalyse nach RUNX1- <i>knockdown</i> in U87MG-Zellen.....	103
Abb. 5.39: Proliferationsanalyse nach RUNX1- <i>knockdown</i> in T98G-Zellen.....	104
Abb. 5.40: Bestimmung der Zellzahl nach RUNX1- <i>knockdown</i> mittels Hämocytometer.....	105
Abb. 5.41: Analyse des Migrationsverhaltens nach RUNX1- <i>knockdown</i> in U87MG-Zellen .....	106
Abb. 5.42: GFAP $\delta$ -Expressionsanalyse in den humanen Glioblastomzelllinien auf mRNA-Ebene.....	108
Abb. 5.43: Nachweis des GFAP $\delta$ - <i>knockdowns</i> auf mRNA-Ebene in der Zelllinie U373MG .....	109
Abb. 5.44: Nachweis des GFAP $\delta$ - <i>knockdowns</i> auf Proteinebene .....	110
Abb. 6.1: Theoretisches Modell des SOX2-Einflusses auf die G1/S-Phase Transition in Glioblastomzellen.....	115
Abb. 6.2: Theoretisches Modell des SOX2- <i>knockdown</i> Effektes auf den Migrationsmodus von Glioblastomzellen.....	119
Abb. 6.3: Theoretisches Modell der nukleären Funktion des SOX2/GFAP $\delta$ Komplexes .....	133



## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tab. 1.1: WHO-Gradierung astrozytärer Tumoren (Louis <i>et al.</i> , 2007) .....	4
Tab. 4.1: Ansatz zur transienten Transfektion von Zellen mit siRNA .....	24
Tab. 4.2: Reaktionsansatz der PCR .....	28
Tab. 4.3: Zyklusprotokoll für die Amplifikation .....	29
Tab. 4.4: Reaktionsansatz für eine Doppelrestriktion .....	29
Tab. 4.5: Reaktionsansatz einer Ligation.....	31
Tab. 4.6: Reaktionsansatz einer Sequenzierung.....	31
Tab. 4.7: Zyklusprotokoll der Sequenzierung .....	32
Tab. 4.8: Reaktionsansatz der qRT-PCR.....	33
Tab. 4.9: Zyklusprotokoll der qRT-PCR .....	33
Tab. 4.10: verwendete TaqMan® <i>assays</i> .....	34
Tab. 4.11: verwendete <i>primer</i> für den Nachweis von GFAP $\delta$ .....	34
Tab. 4.12: Zyklusprotokoll für den SYBR® Green Ansatz .....	34
Tab. 4.13: Zusammensetzung verschieden konzentrierter SDS-Gele .....	36
Tab. 4.14: Konzentrationen eingesetzter Primärantikörper .....	43
Tab. 4.15: Zyklusprotokoll der Kolonie-PCR .....	50
Tab. 5.1: Volumina [mm <sup>3</sup> ] der durch die implantierten U87MG-Zellen entstandenen Tumoren .....	68
Tab. 5.2: Berechnung der Zahl unabhängig <i>gescreeenter</i> Klone in den drei durchgeführten Y2H- <i>screens</i> ....	79
Tab. 5.3: Übersicht der potentiellen, glioblastomspezifischen SOX2-Interaktionspartner.....	82
Tab. 5.4: Zusammenfassung der <i>mapping</i> Experimente.....	87

## Abkürzungen

<b>A</b>	Adenosin	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
α	alpha	CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
AbA	Aureobasidin A	Cys	Cystein
Abb.	Abbildung	<b>Da</b>	Dalton
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	DAB	3,3',4,4'-Biphenyltetramine-tetrahydrochlorid
ad.	auffüllen mit	DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol, dilacetat
AKT	<i>Rac protein kinase alpha</i>	DDC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
Ala	Alanin	ddNTP	Didesoxynukleotid
Aldh1L1	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member 1</i>	DEPC	Diethylpyrocarbonat
Amp	Ampicillin	dest.	destilliert
APS	Ammoniumpersulfat	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
AS (aa)	Aminosäure / <i>amino acid</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat	dNTP	Desoxynukleotid
3-AT	3-amino-1,2,3-triazol	DTT	Dithiothreitol
<b>β</b>	beta	Δ/δ	Delta
β-Gal	β-Galaktosidase	<b>E. coli</b>	Escherichia coli
BMI1	<i>polycomb ring finger oncogene</i>	E2F	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
bp	Basenpaare	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BPB	Bromphenolblau	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>	EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	ER	endoplasmatisches Retikulum
BTSC	<i>brain tumor stem cell</i>	ERBB2	<i>neuro/glioblastoma derived oncogene homolog</i>
bzw.	beziehungsweise	<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
<b>C</b>	Cytosin	etc.	<i>et cetera</i>
°C	Grad Celsius	EZM	extrazelluläre Matrix
C-	Carboxy	<b>F</b>	Phenylalanin
ca.	circa	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium	FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
CaCl	Kalziumchlorid	FBS	fötales bovines Serum
CBB	<i>comassie brilliant blue</i>	ff.	folgende
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>	FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
CC	<i>coiled-coil</i>	FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
CCND	<i>Cyclin D (1/2/3)</i>	FOX	<i>forkhead box (O)</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>	<b>g</b>	Gramm
CDK	<i>cyclin dependent kinase (4/6)</i>	g <sub>n</sub>	Erdbeschleunigung
CDKN2	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (A/B/C)</i>	G	Guanosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>		
c-fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>		
cfu	<i>colony forming unit</i>		
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>		
cm	Zentimeter		

## ABKÜRZUNGEN

G418	Neomycin	<b>M</b>	mol pro Liter
GAL4-AD	GAL4-DNA- Aktivierungsdomäne	m	Meter
GAL4-BD	GAL4-DNA Bindungsdomäne	MCS	<i>multiple cloning site</i>
GAP	<i>GTPase-accelerating protein</i>	MDM	<i>mouse double minute (2/4)</i>
GBM	<i>glioblastoma multiforme</i>	MET	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
GDF	<i>GDI displacement factor</i>	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
GDP	Guanosindiphosphat	MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>	min	Methyltransferase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	ml	Minute
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	mM	Milliliter
ggf.	gegebenenfalls	mm	millimolar
Gly	Glycin	MMP	Millimeter
Golgi	Golgi-Apparat	mRNA	Matrix-Metalloproteinase
GST	Glutathion-S-Transferase	MRT	<i>messenger RNA</i>
GTP	Guanosintriphosphat	MTT	Magnetresonanztomografie
γ	gamma	MYC	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium- Bromid
<b>h</b>	Stunde		<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
HCL	Salzsäure	<b>N</b>	Asparagin
HE	Hämatoxylin Eosin (Färbung)	N-terminal	Aminoterminal
Hif1α	<i>hypoxia inducible factor 1α</i>	NaAc	Natriumacetat
His	Histidin	NaCl	Natriumchlorid
HMG	<i>high mobility group</i>	NaOH	Natriumhydroxid
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>	NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-(Phosphat)
Hsp	Hitzeschockprotein	NH <sub>4</sub> CL	Ammoniumchlorid
H <sub>2</sub> O	Wasser	NF1	Neurofibromin 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	nM	Nanometer
IDH1/2	Isocitrat Dehydrogenase 1/2	NOD/SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency/Non-Obese Diabetic</i>
IgG	Immunglobulin G	<b>OD</b>	optische Dichte
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas	OCT3/4	<i>Octamer-binding protein 4</i>
<i>in vivo</i>	im lebenden System	<b>p</b>	pico
<i>in silico</i>	<i>in Silicium</i> = computer- gestützte Simulationen	p27	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
<i>in situ</i>	am Ursprungsort	p53	Tumorsuppressorprotein 53
jun	<i>avian sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>	p.a.	<i>per analysis</i>
kDa	Kilodalton	PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese
Ki67	<i>proliferation-related Ki-67 antigen</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>L</b>	Leucin	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
l	Liter	PDGF(R)	<i>platelet-derived growth factor (receptor, α/β)</i>
LiAc	Lithiumacetat	PEG	Polyethylenglykol
Ly	Lysosom	pH	<i>pondus hydrogenii</i>
Lys	Lysin	PI-3K	<i>phosphoinositid-3-kinase</i>
λ	lambda	PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1</i>

## ABKÜRZUNGEN

---

PIK3CA	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	UAS	<i>upstream activating sequence</i>
PM	Plasmamembran	ÜN	über Nacht
pmol	picomol	uPA(R)	<i>urokinase-typ plasminogen activator (receptor)</i>
PNS	peripheries Nervensystem	UV	Ultravoilett
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>	<b>V</b>	Volt
PVDF	Polyvinylidendifluorid	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>Q</b>	Glutamin	vgl.	vergleiche
QDO	<i>Quadruple dropout</i>	VK	Verkürzungsmutante
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR	v/v	<i>volume per volume</i>
<b>R</b>	Arginin	<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
Rab	<i>ras analog in brain</i>	wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>	wt	Wildtyp
Rb	Retinoblastom-Protein	w/v	<i>weight per volume</i>
Rho	<i>ras homologous (A/B)</i>	w/w	<i>weight per weight</i>
RNA	Ribonukleinsäure	<b>x</b>	-fach
RNAi	<i>RNA interference</i>	x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
rpm	<i>rounds per minute</i>	x-a-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid
RT	Raumtemperatur	<b>Y2H</b>	<i>yeast two-hybrid</i>
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>	YPD	<i>yeast-peptone-dextrose</i>
<b>S1</b>	Sicherheitsstufe 1	YT	<i>yeast-trypton</i>
S100 $\beta$	<i>S100 calcium binding protein <math>\beta</math></i>	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
SD	<i>synthetic dropout</i>	ZNS	zentrales Nervensystem
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>	<b>weitere</b>	
sec	Sekunde	3D	3-dimensional
SGZ	subgranuläre Zone	$\mu$ g	mikrogramm
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	$\mu$ l	mikroliter
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	$\mu$ m	mikrometer
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>	$\mu$ M	mikromolar
SOX2	<i>SRY-related HMG-box gene 2</i>	&	und
SVZ	subventrikuläre Zone		
<b>T</b>	Threonin		
TBST	Tris-gefufferte Salzlösung mit Tween-20		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-Puffer		
TCGA	<i>The cancer genome Atlas</i>		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin		
TGN	trans-Golgi Netzwerk		
TP53	Tumorprotein <i>p53</i>		
Tris	Trishydroxyl-methylaminohexan		
Trp	Tryptophan		
<b>U</b>	Unit		

## Abstract

Glioblastomas are the most frequent and aggressive neoplasms of the brain. Despite continuously raising understanding of molecular characteristics and hence improved treatment strategies the prognosis still remains very unfavorable.

Recently it has been reported that the transcription factor SOX2, which plays a crucial role during embryogenesis, is overexpressed in glioblastomas. Furthermore it is hypothesized that SOX2 is a marker for brain tumor stem cells.

In this study we investigated cellular SOX2 functions focusing on migration and tumor growth. We established a stable SOX2-knockdown in the U373MG cell line as well as an overexpression of recombinant SOX2 in U87MG and T98G cell lines. We performed migration, proliferation, mouse xenotransplantation, double-knockdown and interaction analyses. We found a decrease of proliferation capacity paralleled by an increase of substrate independent cell migration in SOX2 depleted cells. In contrast overexpression of SOX2 leads to a reduction of migration and elevates the proliferation rate *in vitro*. Xenotransplantation of SOX2 overexpressing U87MG cells into the brain of NOD/SCID mice resulted in significantly larger tumors (compared to controls) confirming the SOX2 dependent proliferation effects *in vivo*. Furthermore we detected a modified growth pattern and morphological changes comparing SOX2 overexpressing with control U87MG cells, whereas no diffuse infiltration was observed.

Yeast two-hybrid screening using SOX2 as the bait revealed a subset of glioma-specific SOX2 interaction partners e.g. the transcription factor RUNX1 as well as an alternative splice variant of the GFAP gene known as isoform  $\delta$ . These interactions were validated in the U373MG cell line and paraffin embedded glioblastoma tissue utilizing the *in situ* proximity ligation assay. Interestingly some SOX2/GFAP $\delta$  complexes were found within the nucleus of tumor cells suggesting a direct or indirect gene regulatory role for GFAP $\delta$ .

When blocking the expression of RUNX1 using siRNA's, a reduction of proliferation was observed. In SOX2 depleted cells, which already exhibit an attenuated proliferation rate, an additional knockdown of RUNX1 results in an even stronger effect. Whereas the increased proliferation of the SOX2 overexpressing cells was diminished after RUNX1-knockdown. This leads to the assumption that SOX2 and RUNX1 act in concert (synergistically) to regulate proliferation of glioblastoma cells *in vitro*. In contrast the migration capacity of cells was unaffected after RUNX1-knockdown independent of SOX2 Expression levels.

In summary we propose that SOX2 regulates proliferation and migration of glioma cells in a diametral manner partially via interaction with RUNX1.



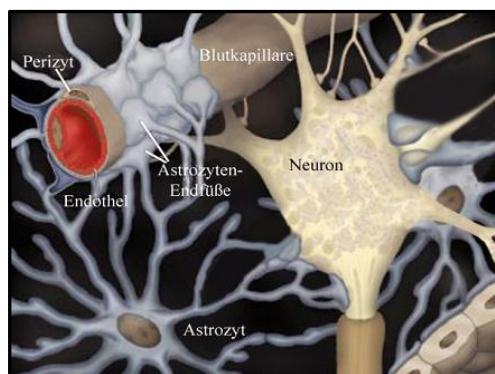
# 1 Einleitung

## 1.1 Das zentrale Nervensystem

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht bei Vertebraten aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Die Hauptaufgabe des ZNS liegt darin, jeden sensorischen Stimulus zu erfassen, zu integrieren, zu prozessieren und eine spezifische Reizantwort (stimulierend oder inhibierend) auszulösen. Strukturell stellt das ZNS ein hochdynamisches Netzwerk aus Neuronen (griech.: Neuron = Nerv) und Gliazellen (griech.: Glia = Leim) dar, welches in eine extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet ist. Man schätzt die Zahl der Nervenzellen im adulten menschlichen Organismus auf etwa  $10^{11}$ . Hinzu kommen 10 – 50 mal so viele Gliazellen (Wolburg, 2002; Vinters und Kleinschmidt-DeMasters, 2008). Ein Neuron besteht typischerweise aus dem Zellkörper, Dendriten sowie einem Axon. Das Axon ist häufig präterminal verzweigt und steht über Synapsen mit vielen weiteren Nervenzellen und anderen Empfängerzellen (Sinnes- Muskel- und Drüsenzellen) in Verbindung. Am synaptischen Endknöpfchen werden elektrische in chemische Signale (Neurotransmitter) umgewandelt und dadurch Informationen weitergeleitet. Neuronen sind demnach hochspezialisierte Zellen, die vor allem der schnellen, elektrochemischen Erregungsleitung im Organismus dienen.

Gliazellen hingegen galten seit ihrer Entdeckung lange Zeit nur als Ernährungszellen und Stützgerüst für Neuronen. Neuere Erkenntnisse belegen jedoch, dass Gliazellen am Flüssigkeits- und Stoffaustausch, der Informationsverarbeitung und Weiterleitung sowie an der Entstehung von Tumoren maßgeblich beteiligt sind (Kim *et al.*, 2006a; Kettenmann und Verkhratsky, 2011; Charles *et al.*, 2012; Requardt *et al.*, 2012). Gliazellen werden unterteilt in Neuroglia (z.B.: Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymozyten, Plexusepithelzellen), periphere Gliazellen (z.B.: Schwannzellen, Mantelzellen) und Mikroglia (Kimelberg, 2004; Kuchelmeister, 2012). Oligodendrozyten und Schwannzellen myelinisieren die Axone der Neuronen des ZNS respektive des peripheren Nervensystems (PNS) und ermöglichen damit die extrem schnelle saltatorische Reizweiterleitung. Mikrogliazellen werden als residente inflammatorische Zellen des ZNS angesehen (Kim und de Vellis, 2005; Hanisch und Kettenmann, 2007). Im Gegensatz zu Neuroglia, welche ektodermalen Ursprungs sind, verdichten sich die Hinweise, dass Mikroglia aus peripherem Mesoderm entstehen und während der Embryonalentwicklung das ZNS kolonisieren (Chan *et al.*, 2007). Mikrogliazellen scheinen durch ständige Neubildung von feinen Fortsätzen permanent die Integrität des Nervengewebes zu prüfen und werden im Falle von Veränderungen oder Schädigungen des ZNS aktiviert (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

Astrozyten sind eine morphologisch sehr heterogene Population, die die Mehrheit der glialen Zellen im ZNS repräsentiert. Man unterscheidet zwischen protoplasmatischen Astrozyten, welche hauptsächlich in der grauen Substanz vorkommen, sowie fibrillären Astrozyten, die sich vornehmlich in der weißen Substanz befinden (Sofroniew und Vinters, 2010; Kuchelmeister, 2012). Die protoplasmatischen Astrozyten bilden viele kleine und dicke Fortsätze mit denen sie sowohl mit Blutgefäßen als auch mit den Perikaryen der Neuronen interagieren. Dieser Zelltyp bedeckt den größten Anteil neuronaler Membranen der grauen Substanz. Die fibrillären Astrozyten besitzen sehr lange, dünne Ausläufer (bis 300 µm) welche weniger verzweigt sind. Sie bilden perivaskuläre Endfüße durch die sie einerseits mit Hirnkapillaren, andererseits mit myelinisierten Axonen der Neuronen in Verbindung stehen (Kuchelmeister, 2012). Beide Zelltypen haben somit Kontakt zum neurovaskulären System und gewährleisten die Versorgung der Nervenzellen mit Nährstoffen und Metaboliten. Zudem gelten Astrozyten als Hauptglykogenspeicher des Gehirns, da sie als einzige Zellen des ZNS zur Glykolyse befähigt sind (Trepel, 2008; Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Durch die Interaktion mit Perizyten, welche ihrerseits mit den Endothelzellen der Hirnkapillaren in Verbindung stehen, sind Astrozyten maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Ballabh *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2006; Araya *et al.*, 2008).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke**

Die Endothelzellen der Kapillaren, Perizyten und Astrozyten bilden die Blut-Hirn-Schranke. Die Astrozyten sind untereinander durch *gap junctions* eng verbunden, geben dem Blutgefäß dadurch mechanische Stabilität und vermitteln den Kontakt der Kapillare mit den Neuronen (mod. aus Dermietzel *et al.*, 2001).

Astrozyten wird außerdem eine wichtige Rolle bei der Reizweiterleitung an den Synapsen sowie der hohen Plastizität des ZNS zugeschrieben (Pfrieger und Barres, 1997; Ullian *et al.*, 2004; Cahoy *et al.*, 2008). Ferner sorgen sie für die Aufrechterhaltung der neurochemischen Homöostase des ZNS. So entfernen Astrozyten beispielsweise frei gewordenes, überschüssiges Glutamat (Neurotransmitter) aus dem synaptischen Spalt, welches in zu hohen Dosen neurotoxisch wirken und zum Absterben von Neuronen führen kann. Darüber hinaus regulieren sie den Kaliumspiegel des Gehirns (Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Untereinander stehen Astrozyten über *gap junctions* in Verbindung und bilden eine das gesamte Gehirn durchziehende Matrix hochstruktureller Ordnung. Durch die Ausbildung eines feinen Netzwerkes aus Füßchenartigen Fortsätzen bilden sie die so genannte *Membrana limitans gliae superficialis*, welche die Oberfläche des ZNS von der *Pia mater*

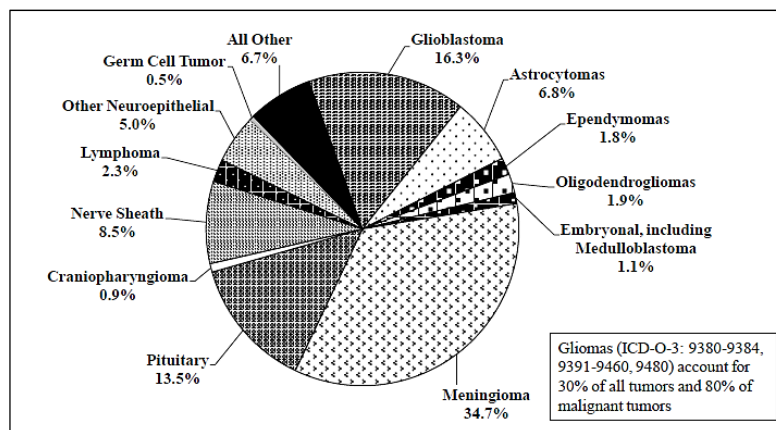


abgrenzt (Wolburg, 2002). Auf molekularer Ebene lassen sich Astrozyten immun-histochemisch durch die Markerproteine GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), S100 (*calcium binding protein*) und Aldh1L1 (*Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*) identifizieren, welche auch bei der Diagnostik von Tumoren astrozytären Ursprungs genutzt werden (Kettenmann und Ransom, 2005). Vor allem reaktive Astrozyten, die nach Schädigung des ZNS vermehrt auftreten (Astrogliose), weisen hohe GFAP Expressionsraten auf, wohingegen die Identifizierung von „ruhenden“ Astrozyten aufgrund der eher geringen GFAP Expression erschwert sein kann (Kuchelmeister, 2012).

Erst in den letzten Jahrzehnten intensivster Erforschung der Gliazellen wird die enorme Bedeutung für die strukturelle Integrität des Gehirns ersichtlich. Ohne das filigrane Zusammenspiel neuro-glialer Interaktionen wäre es dem Gehirn unmöglich seine vielfältigen Funktionen präzise auszuführen. Dies wird besonders bei den verschiedenen Erkrankungen des ZNS deutlich.

**1.2 Tumoren des ZNS**

Aufgrund der vielseitigen Interaktionen der einzelnen Zelltypen des ZNS untereinander als auch mit der EZM, können Störungen dieses Systems gravierende Folgen für den Organismus haben. Im Laufe der Zeit können sich genetische Mutationen manifestieren, die zur Entartung einzelner Zellen und somit zur Entstehung von Tumorerkrankungen führen. Prinzipiell kann jeder Zelltyp des ZNS entarten und zur Entstehung morphologisch sehr unterschiedlicher Tumoren führen, jedoch wird Astrozyten bei der Entstehung von Hirntumoren eine essentielle Rolle zugeschrieben (Ballabh *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2007; Nones *et al.*, 2010; Parpura *et al.*, 2012). ZNS-Tumoren treten relativ selten mit einer weltweiten Inzidenz von 3,8 (♂) und 3,2 (♀) Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf (Jemal *et al.*, 2011). Abbildung 1.2 gibt eine Übersicht der in den USA diagnostizierten primären ZNS-Tumorentitäten.



**Abb. 1.2: Häufigkeit der in den USA diagnostizierten primären ZNS-Tumoren**  
 Dargestellt sind die Häufigkeiten verschiedener ZNS-Tumorentitäten, welche im Zeitraum von 2004 – 2008 diagnostiziert worden sind (mod. aus CBTRUS Statistical Report, Februar 2012).

Meningeome stellen mit 34,7 % die am häufigsten diagnostizierte Tumorentität dar. Tumoren glialen Ursprungs wurden mit einer Häufigkeit von 26,8 % diagnostiziert, wobei das Glioblastom innerhalb der Astrozytome mit 60,8 % die häufigste Tumorerkrankung ist. Da in der vorliegenden Studie ausschließlich astrozytäre Tumoren, insbesondere Glioblastome, behandelt wurden, sollen diese im Folgenden genauer betrachtet werden.

### 1.3 Astrozytäre Tumoren

Von der World Health Organization (WHO) werden Tumoren anhand histologischer Merkmale klassifiziert. In der bisher neuesten Auflage aus dem Jahre 2007 werden 4 Malignitätsgrade (Grad I – IV) unter Berücksichtigung der jeweiligen Prognose unterschieden, wobei die Malignität von Grad I zu Grad IV zunimmt (Louis *et al.*, 2007). Tabelle 1.1 gibt eine kurze Übersicht astrozytärer Tumoren.

Tab. 1.1: WHO-Gradierung astrozytärer Tumoren (Louis *et al.*, 2007)

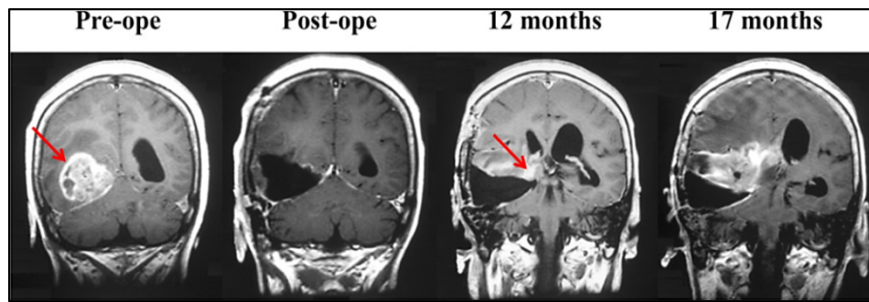
Tumorentität	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Pilozytisches Astrozytom	○			
Subependymales Riesenzell-Astrozytom	○			
Pilomyxoides Astrozytom		○		
Diffuses Astrozytom		○		
Pleomorphes Xanthoastrozytom		○		
Anaplastisches Astrozytom			○	
Glioblastom				○
Riesenzell-Glioblastom				○
Gliosarkom				○

Das pilozytische Astrozytom sowie das subependymale Riesenzell-Astrozytom, letzteres ist regelmäßig mit einer tuberösen Sklerose assoziiert, treten vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen auf. Sie zeigen kaum mitotische Aktivität und werden als benigne Grad I-Tumoren klassifiziert. Durch einen operativen Eingriff kann eine vollständige Resektion und somit eine dauerhafte Heilung erzielt werden (Louis *et al.*, 2007). Das pilomyxoide Astrozytom (Variante des pilozytischen Astrozytoms), das diffuse Astrozytom sowie das pleomorphe Xanthoastrozytom werden als Grad II-Tumoren eingeordnet. Diese zeigen bereits infiltratives Wachstum in das umgebende Hirnparenchym und können meist nicht vollständig reseziert werden, wodurch es zu Lokalrezidiven kommen kann. Aufgrund der geringen mitotischen Aktivität ist das Wachstum eher langsam, welches mit einer längeren Überlebensdauer der Patienten einhergeht, jedoch besteht die Gefahr der Progression zu

höhergradigen Gliomen (Louis *et al.*, 2007). Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) sind maligne Tumoren, die eine im Vergleich zu Grad II-Tumoren, höhere Zelldichte aufweisen. Sie infiltrieren das umgebende Hirngewebe, zeigen Kernatypien und weisen höhere mitotische Aktivität auf. Die 5 Jahres-Überlebensrate beträgt nur etwa 15 – 25 %. Zu den WHO Grad IV-Tumoren zählen das Riesenzell-Glioblastom, das Gliosarkom sowie das Glioblastom, welches im folgenden Kapitel gesondert betrachtet werden soll.

#### 1.4 Das Glioblastom

Das Glioblastom ist die häufigste und aggressivste, hirneigene maligne Neoplasie bei Erwachsenen, welche aufgrund der sehr schlechten Prognose von der WHO als Grad IV-Tumor eingestuft worden ist. Bei etwa 12 – 15 % aller Hirntumoren und 60 – 75 % aller astrozytären Tumoren handelt es sich um ein Glioblastom (Louis *et al.*, 2007). Die Inzidenz liegt bei 3 – 4 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer öfter betroffen sind als Frauen (1,3:1). Am häufigsten tritt diese Tumorentität im Alter zwischen 45 – 75 Jahren auf, wobei das mittlere Alter 61,3 +/- 14 Jahre beträgt. In sehr seltenen Fällen werden auch Glioblastome im Kindesalter diagnostiziert (Ohgaki und Kleihues, 2005). Die bevorzugte Lokalisation eines Glioblastoms ist die weiße Substanz (Marklager), von der aus es sich in die Stammganglien, den Kortex und über das *Corpus callosum* in die kontralaterale Hemisphäre ausbreiten kann (Schmetterlingsgliom) (Louis *et al.*, 2007). Histopathologisch betrachtet weisen Glioblastome eine sehr hohe Zelldichte mit wenig differenzierten, pleomorph erscheinenden Zellen astrozytären Ursprungs, nukleären Atypien sowie erhöhte mitotische Aktivität auf. Neben ausgeprägten Gefäßproliferaten (mikrovaskuläre Proliferation) findet man flächenhafte und strichförmige nekrotische Bereiche, die bis zu 80 % des Tumors ausmachen können und für die Diagnose (Abgrenzung vom anaplastischen Astrozytom) essentiell sind (Paulus und Hasselblatt, 2012). Mikroskopisch zeigen Glioblastome eine hohe intratumorale Heterogenität. Manche Tumoren zeichnen sich durch zahlreiche, mehrkernige Riesenzellen aus, wohingegen andere Bereiche zwar zell dicht sind, jedoch wesentlich homogener erscheinen (*Glioblastoma multiforme*, GBM). Ebenso sind oft Einblutungen und Zysten zu finden (Louis *et al.*, 2007). Zwar können Glioblastome die Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen, jedoch ist die Aussaat (Metastasierung) im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten eher selten (0,5 %) und würde die kurze Überlebenszeit der Patienten nicht wesentlich verringern (Schneider *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2008). Die hohe Malignität des Tumors liegt vor allem in der schnellen Infiltration einzelner Tumorzellen in benachbarte Hirnareale begründet, welches eine vollständige Resektion des Tumors nahezu unmöglich macht (Burger *et al.*, 1988; Giese *et al.*, 2003).



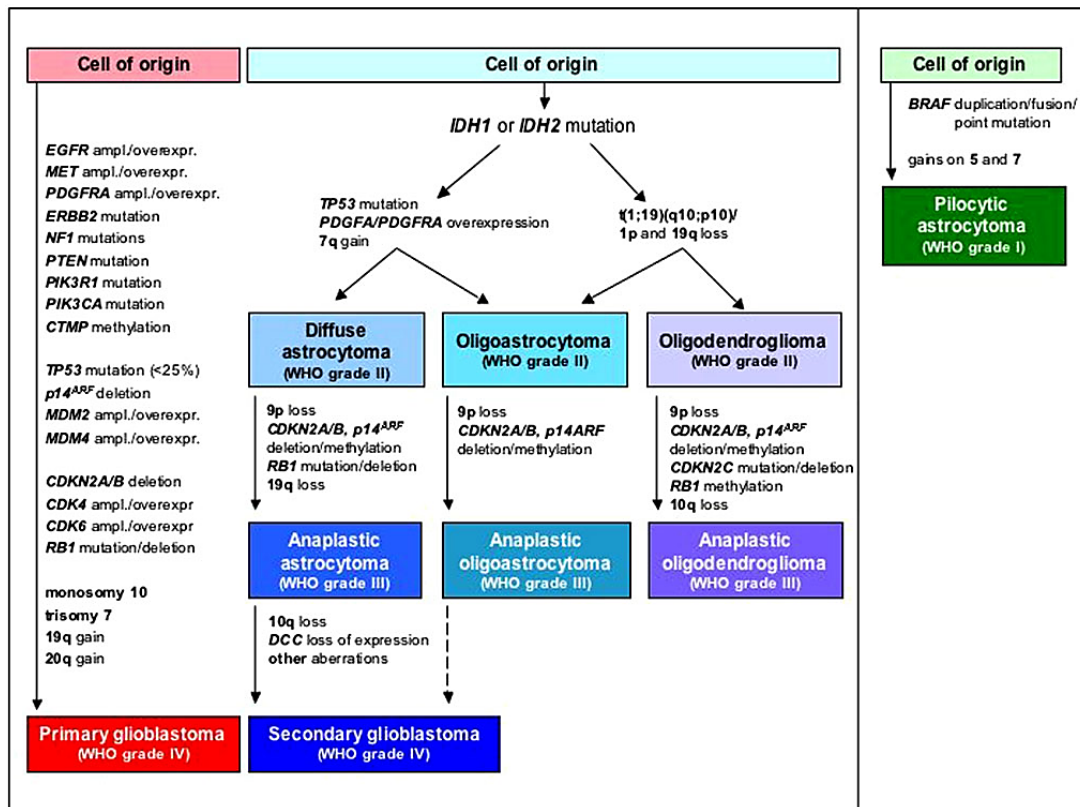
**Abb. 1.3: MRT-Bildgebung (Magnetresonanztomografie) eines Glioblastoms**

MRT gestützte Aufnahme eines okzipitalen Glioblastoms (links, roter Pfeil) vor der Operation. Bestätigung der kompletten Resektion des Tumors (Mitte, links). Rezidivbildung direkt am Resektionsrand 12 Monate nach der Operation (Mitte, rechts roter Pfeil). Infiltration des Tumors in das umgebende Hirnparenchym. 17 Monate nach der Operation verstarb der Patient (mod. aus Nakada *et al.*, 2007).

Auch die anschließende Bestrahlung und mittlerweile standardmäßige Temozolomid-Chemotherapie (alkylierendes Zytostatikum mit guter Penetration der Blut-Hirn-Schranke) sind durch das Vorhandensein chemo- und radioresistenter Tumorzellen nur bedingt erfolgreich (Bao *et al.*, 2006a; Stupp *et al.*, 2009). Durch verbesserte diagnostische Verfahren wie beispielsweise Methylierungsanalysen, können Chemotherapien individuell angepasst werden. Patienten, die einen hypermethylierten MGMT ( $O^6$ -Methylguanin-DNA Methyl-transferase) Promotor aufweisen sprechen besser auf diese Therapieform an und haben signifikant längere Überlebenszeiten als Patienten ohne epigenetische MGMT-Modifikationen (Hegi *et al.*, 2008; Weiler *et al.*, 2010). Trotz dieser Kombinationstherapie kommt es in über 90 % der Fälle bereits wenige Monate nach dem operativen Eingriff zur Rezidivbildung nahe des Resektionsrandes (vgl. Abb. 1.3) oder auch in weiter entfernt gelegenen Bereichen des Gehirns (Gaspar *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 2003; Lefranc *et al.*, 2005). Auch wenn neurochirurgisch, radiologisch und chemotherapeutisch in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht wurden und die mediane Überlebensrate von 3 – 4 auf 8 – 15 Monate gesteigert werden konnte (Stupp *et al.*, 2005), bleibt das Glioblastom bis heute unheilbar.

## 1.5 Pathogenese und molekulare Diversität von Glioblastomen

Glioblastome werden anhand genetischer Profile in primär und sekundär entstandene Tumoren unterteilt. Die Mehrheit (ca. 95 %) aller diagnostizierten Glioblastome entstehen *de novo* innerhalb weniger Monate, ohne erkennbare Anzeichen oder Symptome einer Erkrankung, vornehmlich bei älteren Patienten ( $\geq 60$  Jahre). Sekundäre Glioblastome hingegen entstehen aus der oft mehrjährigen Progression (5 – 10 Jahre) niedergradiger Astrozytome (WHO Grad II oder III), lassen sich histopathologisch kaum von primären unterscheiden und betreffen eher jüngere Patienten ( $\leq 45$  Jahre) (Ohgaki und Kleihues, 2007). Auf genetischer Ebene sind jedoch deutliche Unterschiede vorhanden (vgl. Abb. 1.4).



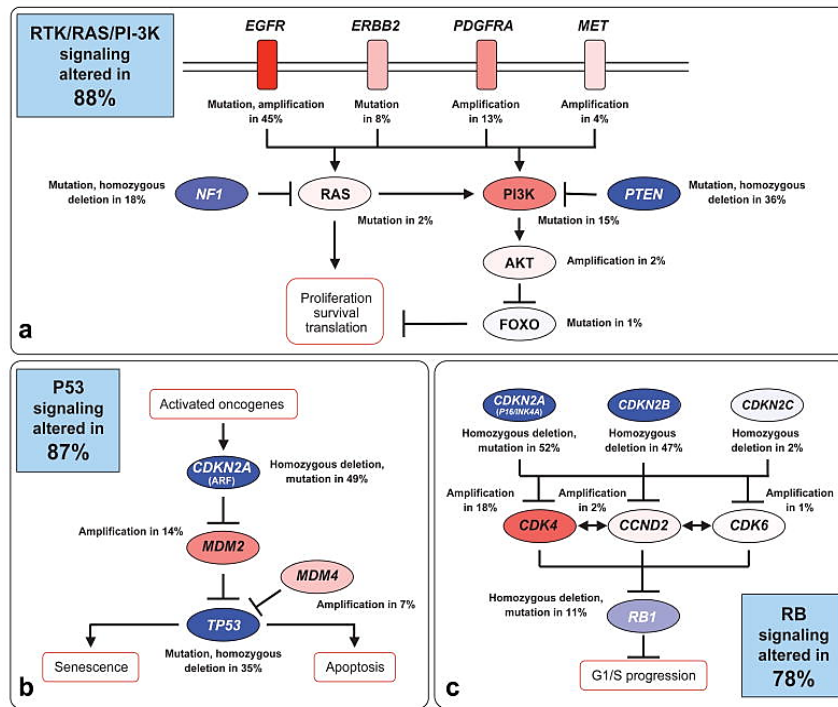
**Abb. 1.4: Übersicht der häufigsten genetischen Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Gliomen**  
 Bei der Entstehung primärer und sekundärer Glioblastome sind vor allem die Mitglieder der **PI-3K** (EGFR, MET, PDGFRA, ERBB2, NF1, PTEN, PIK3R1, CTMP), **P53** (TP53, p14<sup>Arf</sup>, MDM2, MDM4) und **RB** (CDKN2A, CDKN2B, CDK4, CDK6, RB1) Signalkaskaden mutiert. Hinzu kommen chromosomale Deletionen (1p/19q), Monosomie des Chromosoms 10 oder Trisomie des Chromosoms 7 sowie Amplifikationen (19q/20q). Diese Veränderungen führen zu fortschreitender genetischer Instabilität und zur Entstehung der Tumoren (aus Riemenschneider, M. J. et. al., 2010).

Bei der Entstehung dieser Neoplasien findet man multiple genetische Veränderungen wie Amplifikationen, Deletionen, Mutationen und chromosomale Aberrationen, die während der Progression des Tumors akkumulieren. Primäre Glioblastome sind vor allem charakterisiert durch eine Veränderung des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Gens. In etwa 40 – 50 % der Fälle liegt eine Amplifikation des EGFR vor, bei 60 % der Patienten ist eine Überexpression zu finden. Am Häufigsten kommt es zu einer Deletion der Exone 2 – 7, welches zu einer konstitutiv aktiven Form des EGF-Rezeptors (EGFRvIII) führt. Diese autophosphorylierte Variante steigert die Proliferation durch Aktivierung des PI-3K/Akt Signalweges und sorgt für die Inhibition der Apoptose (Narita *et al.*, 2002; Furnari *et al.*, 2007; Ohgaki und Kleihues, 2007). Diese Veränderung ist oft begleitet von einer Mutation oder epigenetischen Modifikation des PTEN (Phosphatase und Tensin homolog) Gens, welches als Tumorsuppressor fungiert. Die Inaktivierung von PTEN führt zu unkontrollierter PI-3K Aktivität und somit zur erhöhten Proliferation (Knobbe und Reifenberger, 2003). Ebenso wird eine PTEN-Inaktivierung mit vermehrter (pathologischer) Angiogenese sowie einer gesteigerten Invasion in Verbindung gebracht, welches die Prognose signifikant verschlechtert (Smith *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2005; Ohgaki und Kleihues, 2007). Zusätzliche

chromosomale Aberrationen sorgen für den Verlust weiterer Tumorsuppressoren und begünstigen die schnelle Pathogenese des primären Glioblastoms (Toedt *et al.*, 2011).

Während EGFR-Veränderungen bei der Entstehung sekundärer Glioblastome keine Rolle zu spielen scheinen (Ohgaki und Kleihues, 2007) zeigen neuere Erkenntnisse, dass die früheste erkennbare Mutation niedergradiger Astrozytome (WHO Grad II), welche sich zu sekundären Glioblastomen entwickeln können, die Gene IDH1 und IDH2 (Isocitratdehydrogenase 1 & 2) betrifft (Parsons *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009). Wesentlich häufiger ist IDH1 verändert und zwar ausschließlich die evolutionär konservierte AS-Position 132, welche in der Substrat-Bindedomäne liegt. IDH1 Mutationen werden mit einer besseren Prognose und einer längeren Überlebenszeit in Verbindung gebracht (Sanson *et al.*, 2009; Houillier *et al.*, 2010). Genetisch ist diese Veränderung streng korreliert mit einer TP53 Mutation oder Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q (Watanabe *et al.*, 2009; van den Bent *et al.*, 2010). Das Tumorsuppressorgen *P53* ist in elementare zelluläre Prozesse wie die Zellzyklus-Regulation, Antwort auf DNA-Schädigungen, Differenzierung und Apoptose involviert (Bogler *et al.*, 1995). So ist *P53* in der Lage die Proliferation von Zellen mit „instabilem Genom“ zu verhindern, indem es einen G1-Phase Zellzyklus-Arrest erzeugt oder die Apoptose einleitet (Balint und Vousden, 2001; Furnari *et al.*, 2007). In Verbindung mit weiteren Veränderungen wie *RB1* (Retinoblastom Protein 1) Mutation/Deletion, *PDGFRA* (*platelet derived growth factor receptor alpha*) Überexpression sowie chromosomalen Aberrationen (1p/19q) entsteht in einem mehrjährigen Prozess ein sekundäres Glioblastom (Wen und Kesari, 2008).

Anhand dieser Heterogenität wird ersichtlich, dass primäre und sekundäre Glioblastome, obwohl histologisch nicht unterscheidbar, genetisch distinkte Entitäten sind. Das *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) katalogisierte anhand von 206 Glioblastomen die spezifischen genetischen Veränderungen der Tumoren und ordnete diese den am häufigsten betroffenen Signalkaskaden zu (vgl. Abb. 1.5). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die drei Signalwege (RTK/RAS/PI-3K, *P53* und *RB*) eine zentrale Rolle bei der Onkogenese einnehmen.



**Abb. 1.5: Die häufigsten betroffenen Signalwege bei der Entstehung von Glioblastomen**

Mutationen oder Amplifikationen treten vorwiegend im RTK/RAS/PI-3K (88 %), p53 (87 %) und RB (78 %) Signalkaskaden auf. **rot**: aktivierende genetische Veränderungen, **blau**: Inaktivierende. Die Intensität der Farben korreliert mit der Häufigkeit der Alterationen (aus TCGA, 2008).

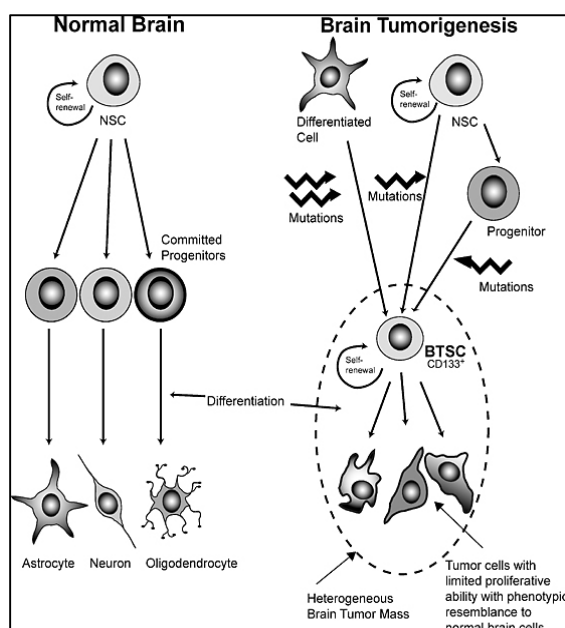
Eine weitergehende Klassifizierung erfolgte durch Phillips *et al.*, welche unter Einbeziehung der fehlregulierten Signalwege, Berücksichtigung der klinischen Prognose sowie spezifischen Genexpressionsmustern drei molekulare Subtypen identifizierten. Der proneurale Subtyp weist eine deutlich bessere Prognose verbunden mit längeren Überlebenszeiten auf. Wohingegen der proliferative- als auch der mesenchymale Subtyp hohe Proliferationsraten sowie starke Neovaskularisation zeigen, folglich eine schlechte Prognose und sehr kurze Überlebenszeiten (Phillips *et al.*, 2006). Die Daten des TCGA einbeziehend beschrieben Verhaak *et al.* einen vierten Subtyp, das klassische Glioblastom. Zur leichteren Differenzierung der einzelnen Klassen ordneten sie spezifische „Signaturgene“ zu, anhand derer subtypspezifische Therapieansätze entwickelt und angewandt werden können (Verhaak *et al.*, 2010).

In den letzten Jahren sind beträchtliche Daten über genetische Signaturen von Glioblastomen generiert worden, die durchaus in der Lage sind prognostische Informationen zu liefern. Aus diesen Informationen wird zudem ersichtlich, dass intrinsische Expressionsprofile prognostisch besser geeignet sind als die klassische Histologie (Gravendeel *et al.*, 2009). Therapeutisch wurden nur marginale Fortschritte erzielt. Vielversprechende Ansätze mit Kinaseinhibitoren oder Angiogenese-Antagonisten zeigten nur bedingten Erfolg (De Witt Hamer, 2010; Gilbert, 2011). Daher ist ein noch detaillierteres Verständnis der molekularen Zusammenhänge genetischer Veränderungen in Glioblastomen für die Entwicklung erfolgreicher Therapieansätze essentiell.



### 1.5.1 Ursprung von Glioblastomen

Die an der Pathogenese von Glioblastomen beteiligten Zelltypen sind bis heute nicht eindeutig identifiziert worden. Eine Theorie geht von der Tumorentstehung aus glialen Vorläuferzellen oder der Dedifferenzierung „reifer“ Astrozyten aus (Dai und Holland, 2001; Huse und Holland, 2010). Eine andere, weit verbreitete Hypothese, beschreibt die Entstehung der Tumoren durch BTSCs (*brain tumor stem cells*). Diese Zellen weisen stammzellähnliche Eigenschaften auf wie 1) die Fähigkeit der Selbsterneuerung 2) die Fähigkeit zur Differenzierung in neurale/gliale Zelltypen (Multipotenz) und 3) die Fähigkeit zur Tumorbildung nach orthotoper Implantation (Reya *et al.*, 2001; Vescovi *et al.*, 2006).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Hirntumorstammzelltheorie**

**Links:** aus neuronalen adulten Stammzellen (NSCs) entstehen zelltypspezifische Vorläuferzellen, welche in Astrozyten, Neuronen oder Oligodendrozyten differenzieren können. **Rechts:** Durch multiple Mutationen in differenzierten Zellen, Vorläuferzellen oder adulten neuronalen Stammzellen können Hirntumorstammzellen (BTSCs) entstehen. Diese weisen erhöhte Proliferations- und Selbst-erneuerungsfähigkeit ähnlich den adulten Stammzellen auf und sind in die Entstehung der Tumoren maßgeblich involviert (aus Singh *et al.*, 2004).

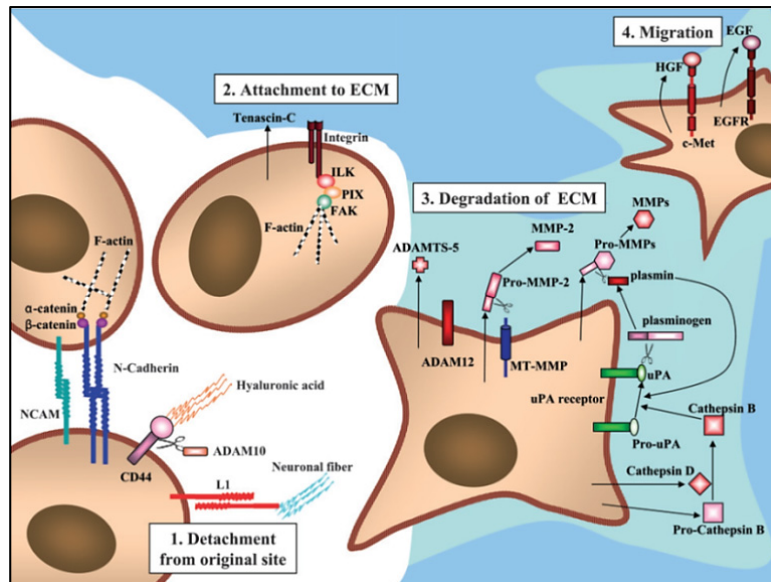
Hinreichende Belege über die Existenz solcher Tumorstammzellen existieren bereits seit längerem in nicht ZNS-assoziierten Entitäten, wie beispielsweise des hämatopoetischen Systems (Lapidot *et al.*, 1994; Bonnet und Dick, 1997). Singh *et al.* konnten 2003 erstmals zeigen, dass auch in Glioblastomen eine kleine Subpopulation tumorigener Zellen vorhanden ist. Sie isolierten mittels des Stammzellmarkers CD133 (*cluster of differentiation*) Zellen aus reseziertem, humanem Tumormaterial, welche nach orthotoper Transplantation in immun-supprimierte Mäuse fähig sind Tumoren zu initiieren, die histopathologisch den parentalen Neoplasien sehr ähneln (Singh *et al.*, 2004). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Yuan *et al.* die ebenfalls tumorinitierende Subpopulationen von Zellen aus 6 humanen GBM Proben identifizieren und isolieren konnten (Yuan *et al.*, 2004). BTSCs exprimieren Marker, wie sie auch in adulten neuronalen Stammzellen zu finden sind (Nestin, BMI1, Musashi1 und SOX2), welches die Hirntumorstammzellhypothese zusätzlich stützt (Galli *et al.*, 2004; Huse und Holland, 2010; Dimov *et al.*, 2011). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass das Genexpressionsmuster von CD133-positiven Tumorstammzellen dem Transkriptionsprofil embryonaler



Stammzellen sowie *in vitro* kultivierten Glioblastomstammzellen sehr ähnlich ist und CD133-positive Tumoren einen sehr aggressiven Subtyp darstellen (Yan *et al.*, 2011). Darüber hinaus zeigen BTSCs hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie und scheinen verantwortlich für die Entstehung von Rezidiven zu sein (Bao *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006). Ähnlich den neuralen adulten Stammzellen, welche sich im Gehirn ausschließlich in der SVZ (subventrikuläre Zone) und der SGZ (subgranuläre Zone) befinden, wird auch für BTSCs eine solche „Nische“ diskutiert. BTSCs sind intratumoral direkt an Hirnkapillaren lokalisiert und interagieren dort mit Endothelzellen, die ihrerseits Faktoren sezernieren welche für die Selbsterneuerung und den undifferenzierten Zustand der BTSCs essentiell sind (Calabrese *et al.*, 2007). In Transplantationsexperimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl von Endothelzellen eine Steigerung der Hirntumorstammzellanzahl zur Folge hat und dies wiederum das Tumorwachstum direkt stimuliert (Calabrese *et al.*, 2007). Die BTSCs selbst exprimieren und sezernieren hohe Mengen an VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und stimulieren ihrerseits die Angiogenese im Tumor (Bao *et al.*, 2006b). Zusammen mit weiteren Zelltypen (Mikroglia, Astrozyten, Fibroblasten, Perizyten) entsteht eine hochkomplexe Umgebung, die sogenannte perivaskuläre Nische, in der BTSC-Populationen im Tumor primär lokalisiert zu sein scheinen (Charles *et al.*, 2012). Therapeutische Strategien, welche die Integrität der perivaskulären Nische beeinflussen und die Versorgung der tumorinitiierenden Zellpopulationen (BTSCs) unterbrechen, sind Gegenstand aktueller klinischer Studien.

## 1.6 Migration und Invasion von Tumorzellen

Die hohe Malignität von Glioblastomen liegt vor allem in der frühen und diffusen Invasion von neoplastischen Zellen in umgebende Hirnareale begründet, welches eine komplette Resektion des Tumors verhindert (vgl. 1.3). Es wird angenommen, dass Tumorzellen aufgrund der ausgeprägten Hypoxie die nekrotischen Bereiche verlassen und diese Zellen äußerst aggressiv und resistent sind (Raza *et al.*, 2002; Brat *et al.*, 2004). Einzelne Gliomzellen migrieren dabei bevorzugt entlang von myelinisierten Faserbahnen der weißen Substanz oder den Basalmembranen der Blutgefäße (Giese und Westphal, 1996; Bellail *et al.*, 2004). Die aktive Invasion wird als ein vierstufiger Prozess angesehen und beginnt mit dem Ablösen einer Zelle von der primären Tumormasse. Es folgt die Polarisierung der Zelle sowie eine rezeptorvermittelte Interaktion mit der EZM (Adhäsion). Anschließend werden EZM-Komponenten lokal degradiert und remodeliert, um einen Migrationspfad in das umliegende Hirnparenchym zu generieren (vgl. Abb.1.7).



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen der Gliominvasion**

1. Ablösen einer Zelle von der Tumormasse (lösen der Zell-Zellkontakte). 2. Rezeptorvermittelte Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix 3. Degradation und Remodulation der EZM. 4. Migration in umgebende Hirnstrukturen (aus Nakada *et al.*, 2007).

Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transmembranglykoproteine, welche durch homophile Interaktion Zell-Zell-Adhäsionskomplexe, so genannte *adherens junctions* bilden. Es wird vermutet, dass eine Deregulation der Expression von Cadherinen zum Ablösen von Zellen aus der Tumormasse führt und zum invasiven Verhalten von Gliomen beiträgt (Demuth und Berens, 2004). So konnten Utsuki *et al.* zeigen, dass E-Cadherin in allen untersuchten Gliomen herunterreguliert ist, wohingegen die N-Cadherin Expression mit steigender Malignität zunimmt (Utsuki *et al.*, 2002). Die verringerte E-Cadherin und erhöhte N-Cadherin Expression, bekannt als Teil der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), könnte für die erhöhte Motilität der Tumorzellen verantwortlich sein (Wheelock *et al.*, 2008). Weitere invasionsrelevante Faktoren sind einige Mitglieder der IgG-Rezeptor Superfamilie (NCAM, L1 und AMOG). Für das Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression die Motilität von Gliomzellen signifikant reduziert (Owens *et al.*, 1998; Prag *et al.*, 2002).

Die transiente Adhäsion an die EZM ist ein essentieller Schritt bei der Migration von Zellen. Dieser Prozess wird durch Oberflächenproteine wie beispielsweise dem Glykoprotein CD44, welches als Rezeptor für Hyaluronsäure dient und in Glioblastomen verstärkt exprimiert wird (Kuppner *et al.*, 1992; Bellail *et al.*, 2004), vermittelt. Eine Schlüsselrolle beim Adhäsionsprozess wird den Integrinen, die als Rezeptoren für migrationsfördernde Matrixkomponenten wie Kollagene, Laminine, Fibronectin, Vitronectin und Tenascin-C fungieren, zugeschrieben (Tysnes *et al.*, 1996; Demuth und Berens, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die  $\beta 1$ -Untereinheit der Integrine in Glioblastomen stark exprimiert wird und für die Adhäsion sowie das invasive Verhalten von Gliomzellen essentiell ist (Paulus *et al.*, 1993; Paulus *et al.*, 1996; Tysnes *et al.*, 1996; Rooprai *et al.*, 1999). Integrine bilden als

heterodimere Transmembranglykoproteine eine Schnittstelle zwischen EZM und dem Aktinzytoskelett der Zelle. Sie leiten Signale bidirektional zwischen intra- und extrazellulärem Raum weiter und sorgen unter anderem für die Bildung fokaler Adhäsionen, welche durch Akkumulation kortikalen Aktins an bestimmten Bereichen der Plasmamembran charakterisiert sind. Die fokalen Adhäsionen bestehen aus Multiproteinkomplexen, die Adapter- und Strukturproteine, welche direkt an Aktinfasern binden (Paxillin, Talin, Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin, Tensin etc.), enthalten. Zudem sind wichtige Signalproteine (Rho-GTPasen und Tyrosinkinase), die die Integrinvermittelte, migrationsnotwendige Remodulation des Aktinzytoskeletts initiieren, an den fokalen Adhäsionen lokalisiert (Petit und Thiery, 2000; DeMali *et al.*, 2003; Lefranc *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2005).

Für die Invasion der Tumorzellen in das umliegende Hirngewebe wird die EZM partiell degradiert und remoduliert. Diese besteht zum Großteil aus Kollagenen, Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Tenascin, SPARC, Thrombospondin) und Proteoglykanen (hauptsächlich Hyaluronsäure) von denen einige in Glioblastomen hochreguliert vorliegen (Higuchi *et al.*, 1993; Gladson, 1999; Bellail *et al.*, 2004). Diese Komponenten werden teilweise von neoplastischen Zellen selbst synthetisiert und sezerniert, um eine migrationsfördernde Mikroumgebung zu generieren (Giese *et al.*, 1994; Paulus und Tonn, 1995; Senner *et al.*, 2008). Die Degradation der EZM-Komponenten geschieht durch proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP), Cystein- und Serinproteasen (Rao, 2003). Besonders die Gelatinasen MMP2 und MMP9, welche diverse Komponenten der EZM degradieren können, werden mit der hohen Invasivität von Gliomen in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel mit dem Tumorgrad korreliert (Forsyth *et al.*, 1999). Zudem beschrieben Lakka *et al.* sowie Veervalli *et al.*, dass die Inhibierung von MMP9 die Invasivität von Glioblastomzellen signifikant reduziert (Lakka *et al.*, 2002; Veeravalli *et al.*, 2010). Es wird ferner postuliert, dass die in primären Glioblastomen erhöhte MMP9-Expression eine Folge der konstitutiven Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFRvIII, vgl.1.5) ist (Choe *et al.*, 2002). Die am besten charakterisierte Serinprotease ist uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), welche an den Rezeptor uPAR bindet und inaktives Plasminogen in aktives Plasmin umwandelt. Dies führt einerseits zur Degradation von EZM-Komponenten wie Laminin oder Fibronectin, andererseits zur Aktivierung diverser MMPs (MMP2, 3, 9) (Bellail *et al.*, 2004). uPA/uPAR werden in Glioblastomen verstärkt exprimiert (Yamamoto *et al.*, 1994). Zudem konnte eine Assoziation mit Integrinen gezeigt werden, welches die Involvierung in die Migration von Tumorzellen untermauert (Ossowski und Aguirre-Ghiso, 2000). Des Weiteren sind verschiedene Cysteinproteasen, besonders Cathepsin B, mit der Invasion von Gliomen in Verbindung gebracht worden (Mikkelsen *et al.*, 1995; Mohanam *et al.*, 2001).

Die Degradation und Modifikation der EZM schafft den notwendigen Raum für die Tumorzellen, um in das umliegende Hirnparenchym migrieren zu können. Dabei bedienen sich Tumorzellen ähnlicher Mechanismen wie nicht-neoplastische, motile Zellen des Gehirns. Zu Beginn dieses hochkomplexen Prozesses findet eine Polarisation der Zelle durch Umlagerung der Zellorganellen sowie die Akkumulation von Aktinfilamenten statt. Dadurch werden am vorderen, richtungsweisenden Teil der Zelle (*leading edge*) Fortsätze ausgebildet, welche mit der EZM interagieren. An diesem Vorgang sind eine Reihe von Proteinkinasen beteiligt, von denen die FAK (*focal adhesion kinase*) eine zentrale Rolle einnimmt (Mitra *et al.*, 2005). Integrinvermittelte FAK-Aktivierung führt zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Signalproteine wie einigen GTPasen der Rho-Familie. RhoA reguliert die Formation und Kontraktion von Aktinstressfasern sowie die Bildung der bereits erwähnten fokalen Adhäsionen. Die Aktivierung von Rac1 resultiert in der Bildung von Lamellipodien während Cdc42 für die Formation von Filopodien essentiell ist (Petit und Thiery, 2000; Hall, 2005). Ein nächster Schritt besteht in der Bindung von Myosin II an die Aktinfilamente (Aktomyosin) und deren Kontraktion, was eine Tension zwischen *leading-* und *trailing edge* (Zellrückseite) zur Folge hat. Darauf folgt die durch verschiedene Mechanismen gesteuerte Disassemblierung der fokalen Kontakte an der hinteren Zellseite, in die diverse Phosphatasen und Proteasen (Calpain) involviert sind. Zudem werden gleichzeitig Integreine durch Endozytose internalisiert und „recycelt“ (Friedl und Wolf, 2003). Dieser Schritt hat letztlich die gerichtete Migration entlang von bevorzugten EZM-Substraten zur Folge.

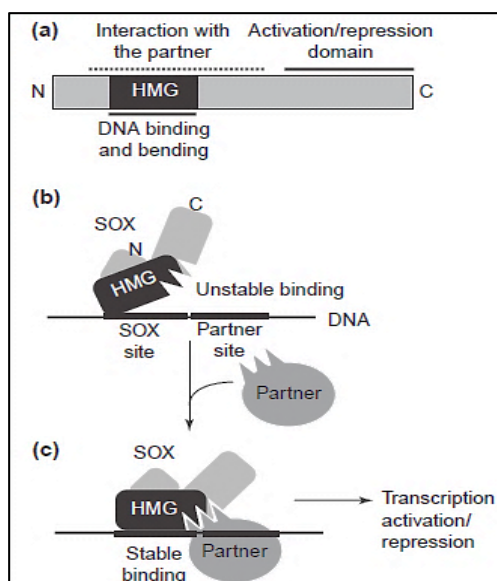
## 1.7 Kandidatengene

Um ein detaillierteres Verständnis molekularer Zusammenhänge bei der Pathogenese und Progression von Glioblastomen zu erhalten ist es essentiell involvierte Gene und Signalwege intensiv zu studieren sowie neue Gene zu identifizieren und deren Funktion zu entschlüsseln. Im Folgenden werden die in dieser Studie untersuchten Kandidaten genauer beschrieben.

### 1.7.1 SOX2 (*Sry-related HMG-Box gene 2*)

SOX2 gehört zu der *Sry-related HMG-Box* (SOX) Proteinfamilie, welche etwa 20 Mitglieder umfasst und anhand von Sequenzhomologien in 10 Gruppen (A-J) unterteilt wird (Bowles *et al.*, 2000). SOX2 bildet zusammen mit SOX1 und SOX3 die B1 Untergruppe. Charakteristisch für diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist die N-terminal gelegene, evolutionär hochkonservierte HMG-Box, welche die Bindung an die kleine Furche der DNA vermittelt sowie die anschließende Verformung dieser initiiert. Zudem enthält die HMG-Box

Kernimport- und Kernexport-Sequenzen und ist essentiell für Protein-Proteininteraktionen (Lefebvre *et al.*, 2007; Malki *et al.*, 2009). SOX Proteine erkennen ein 6 Basenpaar Motiv (5'-WWCAAW-3' mit W = A/T) der DNA, binden allerdings nur mit geringer Affinität an diesen Bereich. Es wird postuliert, dass erst die Wechselwirkung mit zelltypabhängigen Interaktionspartnern zu einem funktionellen Komplex führt, der die spezifische Transaktivierung oder Reprimierung einer Vielzahl von Genen reguliert. Die Tatsache, dass *upstream* oder *downstream* des SOX-Motivs eine Bindestelle für Partnerproteine innerhalb der DNA zu finden ist, untermauert diese Hypothese (Yuan *et al.*, 1995; Kamachi *et al.*, 2000; Kamachi *et al.*, 2001; Wilson und Koopman, 2002; Remenyi *et al.*, 2003; Kondoh und Kamachi, 2010) (vgl. Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Theoretisches Modell zur Funktionsweise von SOX Proteinen**

(a) schematische Darstellung eines typischen SOX Proteins (b) HMG-Box vermittelte Bindung an die Erkennungssequenz der DNA. (c) Erst durch die Kooperation mit einem Partnerprotein wird die SOX-DNA-Bindung verstärkt, welches zur Transaktivierung oder Reprimierung von Genen führt (aus Kamachi *et al.*, 2000).

SOX2 ist in der Lage Heterodimere mit diversen Kofaktoren zu bilden (Kondoh und Kamachi, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass SOX2 während der Embryogenese eine entscheidende Rolle spielt indem es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog die Fähigkeit zur Selbsterneuerung pluripotenter, embryonaler Stammzellen reguliert (Boyer *et al.*, 2005; Rodda *et al.*, 2005). Ähnliches konnte auch bei der Entwicklung des ZNS beobachtet werden. SOX2 sorgt für die Entstehung des Neuroektoderms, unterbindet die neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen durch Inhibierung proneuraler Gene, wie beispielsweise SOX21, und reguliert überdies den Erhalt des Stammzellstatus (Bylund *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Mit fortlaufender Entwicklung des Organismus wird die Expression von SOX2 weitestgehend herunterreguliert. Eine Ausnahme bildet die subventrikuläre sowie die subgranuläre Zone des Gehirns, in denen adulte neurale Stammzellen lokalisiert sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass SOX2 in die Neurogenese involviert ist (Ferri *et al.*, 2004; Wegner und Stolt, 2005; Suh *et al.*, 2007). Graham *et al.* konnten zeigen, dass eine Inhibierung von SOX2 zum Proliferationsstopp, zur Differenzierung neuraler Vorläuferzellen

und deren Migration aus der SVZ führt (Graham *et al.*, 2003). Favaro *et al.* beobachteten den postnatalen Verlust von neuronalen Vorläuferzellen sowie der Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus (SGZ), wenn SOX2 bereits im embryonalen Maushirn deletiert wird (Favaro *et al.*, 2009).

In diversen Tumorerkrankungen scheint es zu einer Reaktivierung der SOX2 Expression zu kommen, was die Vermutung nahe legt, dass SOX2 bei der Pathogenese und/oder Progression dieser Krankheiten eine Rolle spielt. Chen *et al.* konnten zeigen, dass SOX2 in Brustkrebszellen exprimiert wird und mit  $\beta$ -Catenin als spezifischen Interaktionspartner deren Proliferation und Tumorgenese durch Hochregulation von Cyclin D1 steuert (Chen *et al.*, 2008). Weitere Studien zeigen eine SOX2 Überexpression in Magenkrebszellen (Matsuoka *et al.*, 2010), Lungenkrebs (Gure *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2011) sowie Zervixkarzinomen (Ji und Zheng, 2010). Ferner wurde eine SOX2-Genamplifikation in Prostatakarzinomen identifiziert (Sattler *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird eine SOX2-Involvierung in die Metastasierung und Invasion von Pankreastumorzellen (Sanada *et al.*, 2006) und dem invasiven Verhalten von Melanomen (Girouard *et al.*, 2012) postuliert. Schmitz *et al.* konnten 2007 erstmals auch eine SOX2 Überexpression in Glioblastomen auf mRNA-Ebene und histologisch *in situ* nachweisen. Vor allem die Zellen im Tumorkern wiesen eine hohe immunologische SOX2-Positivität auf, welches vermuten lässt, dass SOX2 auch in Glioblastomen vorrangig in mitotisch aktiven Zellen exprimiert wird (Schmitz *et al.*, 2007). Phi *et al.* konnten diese Ergebnisse in einer weiteren Studie bestätigen und zusätzlich zeigen, dass SOX2 nur in Tumoren neuroepithelialen Ursprungs, nicht aber in neuronal differenzierten Tumoren exprimiert wird. Zudem stellten sie die Hypothese auf, dass SOX2 eher ein Marker für glial-differenzierte Tumoren (Koexpression mit GFAP), als einen universellen Marker für BTSCs darstellt (vgl. 1.5.1) (Phi *et al.*, 2008). Ma *et al.* berichteten, dass die SOX2 Expression mit dem Malignitätsgrad von Astrozytomen korreliert (Ma *et al.*, 2008), welches erst kürzlich von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte (Annovazzi *et al.*, 2011). Außerdem scheint zumindest in einem Anteil von Glioblastomen eine SOX2-Amplifikation vorzuliegen. Eine plausible Erklärung für die Überexpression in Glioblastomen liefert die Tatsache, dass in allen untersuchten Tumorproben eine Hypomethylierung des SOX2-Promotors vorliegt (Alonso *et al.*, 2011). Über die Rolle von SOX2 beim invasiven Verhalten von Glioblastomzellen ist bisher jedoch nur sehr wenig bekannt.

Die Tatsache, dass SOX2 in die Differenzierung neuraler adulter Stammzellen involviert ist und in Glioblastomen überexprimiert vorliegt, lässt vor dem Hintergrund der Tumorstammzellhypothese (vgl.1.5.1) vermuten, dass SOX2 ebenfalls bei der Pathogenese von Glioblastomen eine Rolle spielt. Ob die reaktivierte SOX2 Expression in den beschriebenen Neoplasien allerdings der Grund oder das Resultat der Tumorentstehung ist, wird kontrovers diskutiert und ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Es sind bereits eine Reihe von SOX2 spezifischen Interaktionspartnern in verschiedenen Zell- und Gewebetypen beschrieben worden (Kamachi *et al.*, 2001; Kondoh und Kamachi, 2010), jedoch ist über die Interaktionspartner von SOX2 in höhergradigen Astrozytomen nur sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem *yeast two-hybrid screen* mit einer Glioblastom-assoziierten cDNA-Bibliothek das Intermediärfilamentprotein GFAP und der Transkriptionsfaktor RUNX1 als SOX2-Interaktionspartner identifiziert, welche daher im Folgenden detaillierter betrachtet werden sollen.

### 1.7.2 GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)

GFAP stellt neben Vimentin und Nestin das Hauptintermediärfilamentprotein (Klasse III) von Astrozyten dar und wird in der Diagnostik als Marker für Tumoren glialen Ursprungs verwendet (vgl. 1.1). Bisher sind 8 Isoformen identifiziert worden, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Blechingberg *et al.*, 2007). Bis auf GFAP $\beta$  werden alle Isoformen im humanen Nervensystem exprimiert, wobei GFAP $\alpha$  die höchste Abundanz aufweist. Lange Zeit galt GFAP lediglich als ein Stützprotein, um die zelluläre Integrität aufrechtzuerhalten. Neuere Erkenntnisse belegen jedoch, dass GFAP in viele zelluläre Prozesse des ZNS involviert ist. Elobeid *et al.* beschrieben, dass eine induzierte GFAP Expression in GFAP-negativen Glioblastomzelllinien deren Motilität *in vitro* inhibiert (Elobeid *et al.*, 2000). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Yoshida *et al.* die zeigen konnten, dass eine Expression von mutiertem GFAP eine signifikante Steigerung der Migration von Gliomzellen zur Folge hat (Yoshida *et al.*, 2007). Gleiches gilt für GFAP und Vimentin-defiziente primäre Astrozyten aus Mausgehirnen, welche ebenfalls eine reduzierte Migrationsfähigkeit aufweisen (Lepekhin *et al.*, 2001). Trotz dieser Widersprüche liegt die Vermutung nahe, dass GFAP in die Motilität und Migration von Astrozyten involviert ist, jedoch sind die molekularen Mechanismen bisher ungeklärt.

Keine eindeutigen Daten liegen ebenso bezüglich der Rolle von GFAP bei der Proliferation vor. Pekny *et al.* konnten zeigen, dass GFAP-defiziente Mausastrozyten eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (Pekny *et al.*, 1998). Hingegen beschrieben Rutka und Smith, dass eine Überexpression in GFAP-negativen Glioblastomzelllinien die Proliferation signifikant reduziert sowie ein vermindertes Koloniebildungspotential zur Folge hat (Rutka und Smith, 1993). Im Gegensatz dazu zeigten Triolo *et al.*, dass GFAP-negative Schwannzellen des PNS eine deutlich niedrigere Proliferationsrate aufweisen (Triolo *et al.*, 2006). Ferner liegen einige Daten vor, die eine direkte Involvierung von GFAP in zytokinetische Prozesse belegen (Yasui *et al.*, 1998; Kawajiri *et al.*, 2003).

Welche Isoformen in den unterschiedlichen zellulären Prozessen eine essentielle Rolle spielen ist bis heute nur wenig untersucht worden.

Die Isoform GFAP $\delta$  wird in einer spezifischen Subpopulation von Astrozyten der SVZ exprimiert, in welcher ebenfalls adulte neurale Stamm- und wenig differenzierte Vorläuferzellen lokalisiert sind (Roelofs *et al.*, 2005; Leonard *et al.*, 2009; Middeldorp *et al.*, 2010; van den Berge *et al.*, 2010). Überdies wurde GFAP $\delta$  in Astrozytomen identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke direkt mit dem Malignitätsgrad korreliert (Choi *et al.*, 2009). Welche Rolle GFAP $\delta$  bei der Pathogenese oder Progression von Astrozytomen spielt ist jedoch ungeklärt.

Für die speziellen Funktionen von GFAP scheinen nicht nur Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, sondern auch Protein-Proteininteraktionen, welche über den C-terminalen Teil vermittelt werden, eine entscheidende Rolle zu spielen. Bisher ist mit Presinillin 1 nur ein GFAP $\delta$ -spezifischer Kooperationspartner publiziert worden (Nielsen *et al.*, 2002).

### **1.7.3 RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*)**

RUNX1 gehört zusammen mit RUNX2 und RUNX3 zu einer kleinen Familie von heterodimeren Transkriptionsfaktoren. Diese besitzen eine konservierte Runt-Domäne, welche die DNA-Bindung sowie Heterodimerisation mit der Untereinheit CBF $\beta$  (*core binding factor  $\beta$* ) vermittelt. Ähnlich den SOX-Proteinen binden RUNX-Transkriptionsfaktoren zwar sequenzspezifisch, aber relativ instabil an die DNA. Erst durch den Dimerisationspartner wird eine stabile Protein-DNA-Interaktion gewährleistet (Ogawa *et al.*, 1993; Kagoshima *et al.*, 1996). RUNX-Proteine können, abhängig von posttranslationalen Modifikationen, sowohl transaktivierend als auch reprimierend wirken, rekrutieren eine Vielzahl von spezifischen Kofaktoren und regulieren dadurch essentielle Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Selbsterneuerung (Lutterbach und Hiebert, 2000; Otto *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004). RUNX1 stellt ein Schlüsselprotein der „definitiven“ Hämatopoese dar. Es reguliert die Differenzierung von Vorläuferzellen sowie die Selbsterneuerungsfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen (Ross *et al.*, 2012). RUNX1 scheint bei der Proliferation den Übergang der G1 in die S-Phase zu beschleunigen und sorgt somit vermutlich für eine gesteigerte Proliferation (Strom *et al.*, 2000). RUNX1-defiziente Mausembryonen zeigen keine definitive Hämatopoese der fetalen Leber, sind unfähig Blutzellen aus Endothelzellen zu bilden (Yokomizo *et al.*, 2001) und weisen eine gestörte Angiogenese auf (Takakura *et al.*, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von RUNX1 embryonal letal (E12.5) ist (Okuda *et al.*, 1996). RUNX1 ist ebenfalls in die Entwicklung des Nervensystems involviert. Theriault *et al.* konnten zeigen, dass spezifische Motoneuronenvorläuferzellen in RUNX1-defizienten Mausembryonen keine terminale Differenzierung durchlaufen können



und vermehrt absterben (Theriault *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist RUNX1 an der Entstehung diverser Erkrankungen beteiligt. In humanen Leukämien stellt es eines der am Häufigsten mutierten Gene (Punkmutationen oder chromosomale Translokationen) dar. In etwa 30 % der Fälle akuter myeloischer Leukämie findet man eine genetische Veränderung von RUNX1 (vornehmlich Fusionstranskripte mit Onkogenen), wodurch es auch als AML1 (*acute myelogenous leukemia 1*) bekannt ist (Osato, 2004). Es wird postuliert, dass RUNX1 in Abhängigkeit des jeweiligen genetischen Kontext sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Onkogen fungieren kann (Blyth *et al.*, 2005). RUNX1 ist in der Lage, in Abwesenheit von intaktem P53, embryonale Mausfibroblasten zu transformieren. Des Weiteren zeigen RUNX1-positive / P53-negative Tumoren ein signifikant schnelleres Wachstum, welches das protoonkogene Potential von RUNX1 unterstreicht (Wotton *et al.*, 2004). Diese Effekte werden möglicherweise durch ein Zusammenspiel von RUNX1 und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) vermittelt, der einen in Glioblastomen bereits beschriebenen fehlregulierten Signalweg darstellt.

Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen der RUNX1-Expression und der Pathogenese und Progression von Astrozytomen zeigen. Carro *et al.* beschreiben, dass RUNX1 in ein komplexes transkriptionelles Netzwerk des hochmalignen, mesenchymalen Subtyps von Glioblastomen involviert ist und mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression mesenchymaler Markergene reguliert (Carro *et al.*, 2010). Eine RUNX1 Expression in permanenten Glioblastomzelllinien wurde ebenfalls gezeigt jedoch fehlen bislang funktionelle Untersuchungen zu RUNX1 in Glioblastomen (Vladimirova *et al.*, 2008).



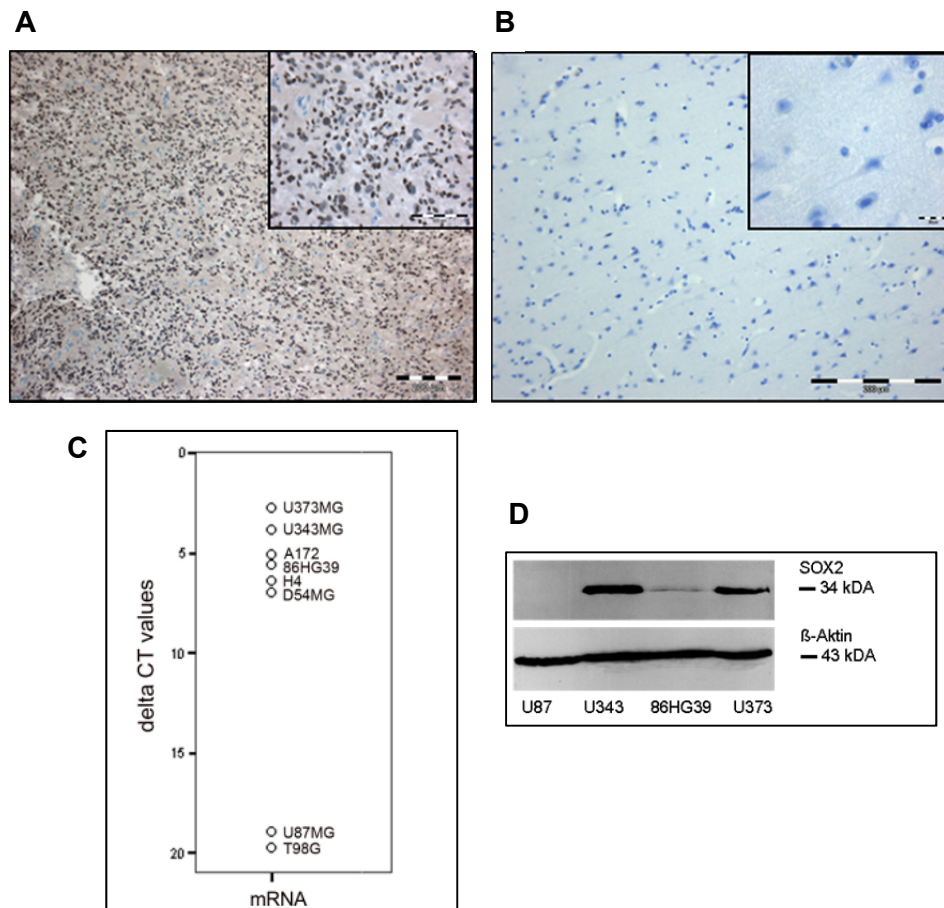
## 2 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute konnte trotz wachsenden Verständnisses der molekulargenetischen Zusammenhänge und der damit einhergehenden verbesserten Therapieansätze die Überlebensrate von Glioblastompatienten nur marginal verbessert werden. Die ausgeprägte proliferative Aktivität sowie hohe Aggressivität des Tumors durch massive Infiltration und Invasion in das umliegende Hirnparenchym machen eine vollständige Resektion nahezu unmöglich. Das Vorhandensein von Chemo- sowie strahlungsresistenten Zellpopulationen führt zwangsläufig zur Entstehung von Rezidiven. Folgerichtig ist ein umfassendes Verständnis fehlregulierter Signalwege sowie die Identifikation und funktionelle Charakterisierung an der Pathogenese und Progression dieser Entität beteiligter Faktoren für erfolgreiche Therapieansätze essentiell.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des Transkriptionsfaktors SOX2 bezüglich der klinisch relevanten Parameter Proliferation und Migration durch *Knockdown*- und Überexpressionsexperimente zunächst *in vitro* untersucht werden. Anschließend sollte durch Xenotransplantation in immunsupprimierte Mäuse die physiologische Relevanz der SOX2 Funktion *in vivo* untermauert werden. In einem zweiten Schritt sollten glioblastomspezifische SOX2-Interaktionspartner identifiziert werden. Hierzu wurde eine repräsentative cDNA-Bibliothek der permanenten Zelllinie U373MG im Rahmen dieser Arbeit generiert. Mittels des *yeast two-hybrid screening* Verfahrens sollten SOX2-Kooperationspartner identifiziert und die Protein-Proteininteraktionen ausgewählter Kandidaten mit einer weiteren, unabhängigen Methode (*Proximity ligation assay*, PLA) validiert werden. Durch stabile bzw. transiente *Doppelknockdown* Experimente sollten anschließend funktionelle Daten erhoben werden, die ein Zusammenspiel der Interaktionspartner mit SOX2 bezüglich veränderter Proliferation und/oder Migration von Tumorzellen vermuten lassen. Abschließend sollten Interaktionsstudien an primärem Tumormaterial erfolgen, um die physiologische Relevanz der Wechselwirkung verschiedener SOX2-assoziiierter Kooperationspartner zu untermauern. Die vorliegende Arbeit sollte somit einen Beitrag zum Verständnis molekulargenetischer Zusammenhänge in höhergradigen Astrozytomen liefern.

### 3 Vorarbeiten

Zu Beginn dieser Studie lagen bereits Daten zur Expressionsanalyse von SOX2 in humanem Tumormaterial, als auch in ausgewählten im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Münster vorhandenen, permanenten Glioblastomzelllinien vor.



**Abb. 3.1: SOX2 Expressionsanalyse in humanen Resektaten und Glioblastomzelllinien**

**A:** Immunhistochemische SOX2 Färbung eines humanen Glioblastoms. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Tumorgewebes. SOX2 positive Zellen weisen braun-schwarze Zellkerne auf. **B:** SOX2 Färbung eines unauffälligen humanen Kortex zeigt keine SOX2 Positivität **C:** SOX2 Expression auf mRNA-Ebene in diversen Glioblastomzelllinien. Angegeben sind die  $\Delta$ ct-Werte normiert anhand des *housekeeping* Gens GAPDH. Eine geringer  $\Delta$ ct-Wert bedeutet in diesem Fall eine relativ erhöhte SOX2 Expression und umgekehrt. **D:** SOX2-Immundefektion auf Proteinebene mittels Western Blotanalyse. Dargestellt sind die Zelllinien U87MG, U343MG, 86HG39 und U373MG. Als Auftragskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin detektiert (A + B von Dr. V. Senner, 2007, C + D von Dr. K. Weber, 2009, Institut für Neuropathologie, UKM).

Zur Durchführung der funktionellen Untersuchungen anhand von *knockdown* Experimenten wurde die Zelllinie U373MG ausgewählt, die die höchste SOX2 Expression aufweist (vgl. Abb. 3.1). Der shRNA-induzierte, stabile SOX2-*knockdown* wurde von Dr. K. Weber durchgeführt. Dazu wurden, neben einer Kontrollsequenz, 4 verschiedene SOX2-spezifische shRNA-Konstrukte transfiziert, die generierten Klone mittels Neomycinresistenz (G418) selektiert und expandiert (Rüther *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

## 4 Methoden

### 4.1 Arbeiten mit Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene humane Glioblastomzelllinien für funktionelle Analysen verwendet. Alle Experimente wurden mit geeigneten Medien und Zusätzen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank, welcher optimale Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, wasserdampfgesättigt) gewährleistet, kultiviert.

#### 4.1.1 Kultivierung und Passagieren

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, *high glucose*, 4,5 g/l), welchem 10 % FBS sowie Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) zugesetzt wurde (im Folgenden DMEM<sup>++</sup> genannt). Als Waschpuffer wurde PBS ohne Kalzium und Magnesium verwendet. Zur Selektionierung stabiltransfizierter Zelllinien wurde dem Medium entweder Gentamycin (G418, 1000 µg/ml, U373MG Zellen) oder Hygromycin B (200 – 600 µg/ml, T98G und U87MG Zellen) zugesetzt. Je nach Experiment erfolgte die Kultivierung der Zellen in 6-, 24- 48- oder 96 *well* Platten, 10 cm Petrischalen oder 75 – 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen. Das Passagieren der Zellen erfolgte abhängig der Zelllinie und der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit 1 - 2 x wöchentlich. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA verwendet.

#### 4.1.2 Kryokonservierung

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mittels Trypsin/EDTA gelöst, abzentrifugiert (1700 rpm, RT, 5 min), in DMSO haltigem DMEM<sup>++</sup> (10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Konservierung erfolgte zunächst für 24 h bei -80°C in einem geeigneten Gefrierbehälter. Danach wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank (-196°C) überführt.

#### 4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für Implantationsexperimente wurden die Zellen manuell mittels einer Neubauerkammer ausgezählt (Lindl, 1987). Diese Methode ermöglicht eine sehr genaue Bestimmung der Zellzahl, indem 4 Quadrate definierter Größe ausgezählt werden. Für die weiteren Versuche wurde die Zellzahl automatisiert mit dem CASY® 1 DT ermittelt.

#### 4.1.4 Transiente Transfektion mit siRNA

Für die transienten Transfektionen mit siRNA (*small interfering RNA*) Oligonukleotiden wurden die Zellen zunächst mit dem CASY® 1 DT ausgezählt und je nach Experiment in einer definierten Zellzahl gleichmäßig ausgesät. Anschließend wurde ein Transfektions-Mastermix hergestellt, der das Transfektionsreagenz (HiPerfect, Qiagen), die verwendeten siRNAs sowie DMEM (ohne FBS) enthielt. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Ausbildung der Transfektionskomplexe), und tropfenweise zu den noch nicht adhären Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung unter Standardbedingungen inkubiert.

Tab. 4.1: Ansatz zur transienten Transfektion von Zellen mit siRNA

	Zellzahl pro well	siRNA Menge	HiPerfect Volumen	DMEM Volumen
24 well	1 x 10 <sup>5</sup> in 500 µl DMEM <sup>++</sup>	200 ng	8 µl	100 µl

In der vorliegenden Arbeit wurden die siRNAs (Hs\_RUNX1\_8 und Hs\_RUNX1\_10; FlexiTube siRNA, Qiagen) für den spezifischen RUNX1-*knockdown* sowie die nichtbindende Kontroll-siRNA „AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT“ (Artikelnr. 1022076, Qiagen) verwendet.

## 4.2 Migrationsanalyse

### 4.2.1 Wundheilungsassay

Um das Migrationsverhalten von Zellen bestimmen zu können, wurde der Wundheilungsassay verwendet (Rodriguez *et al.*, 2005). Bei dieser Methode wird mittels der Rückseite einer sterilen Pipettenspitze mechanisch eine Wunde in einen konfluenten Zellrasen eingefügt. Das Einwachsen der Zellen in diese Wunde kann über einen Zeitraum von 72 h dokumentiert werden, wobei der Zeitpunkt der Verwundung als Nullstundenwert angesehen wurde (größte Fläche). Im Abstand von 24 h wurde das Migrationsverhalten der Zellen fotografisch an einer zuvor markierten Stelle festgehalten und mit der frei erhältlichen Software TScratch (<http://www.cse-lab.ethz.ch>) der relative Flächenzuwachs der Wunde und somit die relative Migration der Zellen ermittelt.

#### Durchführung:

Für jede zu testende Bedingung wurden je 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 500 µl DMEM<sup>++</sup> pro 24-well Vertiefung (4 – 12) ausgesät. Nachdem ein konfluenten Zellrasen ausgebildet war, wurde dieser verwundet und 2 x mit PBS gewaschen. An einer geeigneten Stelle wurde die

Verwundung an der Unterseite der Inkubationskammer mittels eines Stiftes markiert, um sicherzustellen, dass zu allen Zeitpunkten die identische Stelle fotografiert wurde. Die Dokumentation erfolgte im Abstand von 24 h (Mikroskop, Olympus BX50; Software, analySIS five, Olympus).

### 4.3 Proliferationsanalyse

#### 4.3.1 MTT-Assay

Mit diesem Test ist es in relativ kurzer Zeit auf kolorimetrischer Grundlage möglich, Parameter wie proliferative Aktivität, Zellvitalität sowie Zytotoxizität zu bestimmen (Mosmann, 1983). Der Test basiert auf der Spaltung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT), eines gelblichen Tetrazoliumsalzes, welches wasserunlösliche, dunkelblaue Formazankristalle bildet. Das MTT wird in den Zellen durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH reduziert. Da nur vitale Zellen stoffwechselaktiv sind und somit die notwendigen Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellen, ist die Bildung des Formazan direkt proportional zur Anzahl vorhandener, lebender Zellen und kann als Maß für die relative Proliferation angesehen werden. Die entstandenen Kristalle können mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol gelöst und die Absorption (570 nm) mit einem Plattenphotometer ermittelt werden.

#### Durchführung:

Nach Auszählung wurden je  $1 \times 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l DMEM<sup>++</sup> in je 12 *wells* pro Bedingung in einer 96 *well* Mikrotiter-Platte ausgesät. Nach dreistündiger Inkubationszeit (bzw. bis die Zellen adhären waren) im Brutschrank wurde eine 10 %ige MTT-Lösung in DMEM<sup>++</sup> zu den Zellen gegeben. Weitere 2 Stunden später wurde das Medium durch 200  $\mu$ l Isopropanol ersetzt und die Absorption bei 570 nm bestimmt. Die Proliferationsrate wurde für die Zeitpunkte 24 h, 48 h, 72 h bestimmt und anhand des 0 h Wertes normiert.

### 4.4 *in vivo* Versuche (Xenotransplantation)

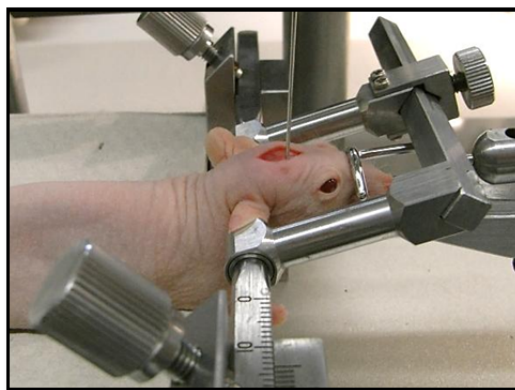
Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung der Richtlinien der örtlichen Ethikgesetze (Tierversuchsantragszeichen: 9.93.2.10.36.07.200 LANUV NRW). Die verwendeten U87MG Tumorzellen entsprechen der Risikogruppe 1.

#### 4.4.1 Intrakranielle Implantation stabil transfizierter U87MG Zellen

Für die *in vivo* Versuche wurden weibliche, 8 - 9 Wochen alte Mäuse des Stammes NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (Prochazka *et al.*, 1992) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 26 g verwendet. Die Versuchstiere wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hotfilder (Institut für Hämatologie und Onkologie, UKM) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse weisen eine schwere, kombinierte Immundefizienz (SCID) auf. Sie sind nicht in der Lage ihre Immunglobulin- sowie T-Zell Rezeptorgene zu rearrangieren. Dadurch besitzen sie keine funktionalen B- und T-Zellen (Bosma *et al.*, 1983). Ebenso ist die Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) extrem reduziert. Demzufolge kommt es bei der Xenotransplantation von Zellen (hier die humane Glioblastomzelllinie U87MG) nicht zu Abstoßungsreaktionen.

##### Durchführung:

Am Tag der Implantation wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst und mit Hilfe einer Neubauerkammer ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert (Endkonzentration  $1,25 \times 10^5/\mu\text{l}$ ) und auf Eis gelagert. Bevor die Zellen in das Gehirn der Mäuse injiziert wurden, wurde die Suspension erneut vorsichtig resuspendiert, um sicherzustellen jeweils die gleiche Zellzahl bei jedem Ansatz zu implantieren. Die Narkose der Tiere erfolgte intraperitoneal mit einem Gemisch aus 2 Anästhetika (Rompun und Ketanest) in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Nachdem die Versuchstiere narkotisiert waren, wurden sie an einem Ohr markiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (Senner *et al.*, 2000) (vgl. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Implantationstechnik mittels eines stereotaktischen Rahmens**

Exemplarische Darstellung der Xenotransplantation von Tumorzellen in das Gehirn von Versuchstieren mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens. Das Versuchstier ist mittels zweier Ohrstifte sowie einem Schneidezahnspanner fixiert. Die Implantationsnadel wurde 3 mm tief in die Stammganglien des Tieres eingeführt.

Anschließend wurde die Kopfhaut desinfiziert und mit einem sterilen Skalpell eröffnet. Die Implantation der Zellen erfolgte in die Stammganglien der rechten Hemisphäre des Mausgehirns. Diese befinden sich 1 mm hinter der *Sutura coronalis* sowie 2 mm rechts der *Sutura sagittalis*. Dazu wurde mit einer Kanüle ein Loch in die Kalotte gebohrt und die



Zellsuspension mittels einer Hamilton Spritze 3 mm tief in das Gehirn appliziert. Insgesamt wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 4  $\mu$ l und einem Zeitraum von 5 min implantiert. Das Herausziehen der Nadel erfolgte innerhalb weiterer 5 min. Bei schnellerem Herausziehen besteht die Gefahr, dass Zellen aufgrund des entstandenen Unterdrucks durch den Stichkanal zurückfließen. Nach erfolgter Implantation wurde die Einstichstelle in der Kalotte mit Knochenwachs versiegelt und die Kopfhaut mit 2 Stichen genäht. Die Tiere wurden in einen gesonderten Käfig mit Rotlicht überführt und bis zum Erwachen die Vitalfunktionen kontrolliert.

#### 4.5 Messung der Tumorprogression mittels MRT

Um den zeitlichen Verlauf, sowie das charakteristische Wachstum der Tumoren verfolgen zu können, wurden die Tiere 7 und 14 Tage post Implantation mittels MRT vermessen. Dies geschah im Institut für klinische Radiologie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Faber (Durchführung Dr. V. Hoerr). Die Aufnahmen wurden mit einem 9,4T Bruker BioSpec 94/20 USR (Ettlingen, Deutschland) präklinischen MRT-System, welches mit einem 660 mT/m Gradienten ausgestattet ist, um eine hohe Auflösung zu erreichen, durchgeführt. Die Tumoren wurden mittels der T2-gewichteten TurboRARE Sequenz mit folgenden Parametern sichtbar gemacht: 0,3 mm Schichtdicke, Matrixgröße 256 x 256, Betrachtungsfeld 20 x 20 mm<sup>2</sup>, RARE faktor 12, TE 42 ms, TR 5,4 s. Während der Messungen wurden die Versuchstiere in 2 %iger Isofluranatmosphäre anästhesiert und die Körpertemperatur sowie Respirationsrate mittels eines kompatiblen Monitoring Systems (SA Instruments, Stony Brook New York) überwacht. Die volumetrischen Messungen der Tumoren sowie des Gehirns wurden mittels der amira<sup>®</sup> Software, Version 5.4.0 (Visage Imaging GmbH, Berlin, Deutschland) ermittelt.

#### 4.6 Nukleinsäureanalytik

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene SOX2-Verkürzungsmutanten mittels PCR hergestellt und anschließend in spezifische Hefeexpressionsvektoren kloniert, um *yeast two-hybrid screens* durchzuführen. In den folgenden Abschnitten werden dementsprechend molekularbiologische Methoden und Techniken beim Arbeiten mit Nukleinsäuren näher beschrieben, die für die Herstellung der Konstrukte angewandt wurden. Alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten GVOs (gentechnisch veränderte Organismen) entsprechen der Risikogruppe 1.

#### 4.6.1 Plasmidpräparation

Zur Isolierung plasmidärer DNA aus Bakterienkulturen wurde ein *ready to use kit* (Roth) verwendet. Das System basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zunächst wurden 1- 3 ml einer frischen über Nacht Kultur abzentrifugiert und die Zellen durch Zugabe von NaOH sowie SDS aufgeschlossen. Anschließend wurde eine Neutralisationslösung (Eisessig und Kaliumacetat) hinzugegeben. Durch den stark basischen pH-Wert werden Proteine sowie chromosomale DNA denaturiert und durch das vorhandene Salz irreversibel ausgefällt. Zur Degradation von RNA wurde RNase H zugesetzt. Die niedermolekulare Plasmid DNA wird ebenfalls denaturiert, befindet sich jedoch im Überstand. Dieser Überstand wird auf eine Silikasäule überführt. Die Plasmid-DNA bindet mittels des negativ geladenen Phosphatrückgrates an die Matrix. Durch einen Waschschrift wurden Verunreinigungen wie Proteine, Membranbestandteile und Salze entfernt. Abschließend wurde die DNA mit einem spezifischen Puffer von der Säule eluiert.

#### 4.6.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit der nahezu exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren (Mullis *et al.*, 1986). Benötigt werden zwei spezifische Oligonukleotid-*primer*, eine hitzestabile Polymerase, spezifische Puffer sowie die 4 verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Mit Hilfe eines zyklischen Protokolls, bestehend aus Denaturierung, *Primerannealing* und Elongation können ausreichende Mengen an Nukleinsäuren für weiterführende Experimente hergestellt werden. Die in dieser Studie hergestellten SOX2-Verkürzungsmutanten wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert, um diese anschließend in Hefeexpressionvektoren zu klonieren. Durch spezifische *primer* wurde 5' die Schnittstelle für BamHI, sowie 3' die Schnittstelle für EcoRI eingefügt. Der Reaktionsansatz der PCR sowie das Zyklusprotokoll sind im Folgenden dargestellt.

Tab. 4.2: Reaktionsansatz der PCR

Komponente	Menge [ng] / Volumen [ $\mu$ l]
<i>template</i> DNA	10 – 30 ng
PFX-Polymerase	0,5 $\mu$ l
Reaktionspuffer 10 x	5 $\mu$ l
dNTP-Mix	1 $\mu$ l (25 mM)
MgSO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l (50 mM)

<i>forward primer</i>	0,75 µl (100 pmol/µl)
<i>reverse primer</i>	0,75 µl (100 pmol/µl)
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Tab. 4.3: Zyklusprotokoll für die Amplifikation

Schritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	15 sec
<i>annealing</i>	58 – 62 °C	30 sec
Elongation	68 °C	90 sec
finale Elongation	68 °C	5 min
Reaktionsstop	4 °C	halten

} 28 – 32 x

#### 4.6.3 Restriktion von DNA

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen des Typ II erkennen spezifische, meist palindromische Basensequenzen (4 – 8) innerhalb von DNA-Abschnitten und spalten die Phosphodiesterbindungen hydrolytisch. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei glatte oder kohäsive Enden. Restriktionsenzyme erlauben das Klonieren nahezu jedes DNA Fragmentes in beliebige Vektoren und stellen eines der wichtigsten Werkzeuge der Gentechnik dar. Ein typischer Restriktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 4.4: Reaktionsansatz für eine Doppelrestriktion

Komponente	Menge [ng] / Volumen [µl]
DNA	1 - 5 µg
Restriktionsendonuklease I	1 U
Restriktionsendonuklease II	1 U
Reaktionspuffer (10 x)	2 - 5 µl
A. bidest	ad 20 - 50 µl

Der Ansatz wird für 1 – 2 Stunden beim Temperaturoptimum der Enzyme (meist 37 °C) inkubiert. Bei der Restriktion eines Vektors mit nur einem Enzym müssen die 5´

Phosphatreste mittels einer Phosphatase entfernt werden (*cippen*), um die Re-Ligation des Vektors zu unterbinden. Der Erfolg der Restriktion kann anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft werden.

#### 4.6.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, DNA-Gemische der Länge nach aufzutrennen. Die DNA „wandert“ aufgrund des negativ-geladenen Phosphatrückgrats innerhalb eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Als Trägermaterial dient Agarose, ein aus mehreren Galaktoseeinheiten bestehendes Polymer. Es wurden 0,8 – 1,5 % Agarosegele sowohl zu Überprüfung eines Restriktionsansatzes, als auch zur Konzentrationsbestimmung von DNA eingesetzt. Hierzu wurde ein Marker (*smart ladder*) bekannter Konzentration verwendet und die Lichtintensität der Markerbande mit der der Probe verglichen. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 – 1,5 g Agarose mit 1 x TAE-Puffer (100 ml) versetzt und das Gemisch in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzer Abkühlung wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugesetzt. Das Ethidiumbromid dient der Sichtbarmachung (Anregung bei UV-Licht) der DNA, indem es aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen benachbarte Basen interkaliert. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und bei 100 V für 15 – 45 min aufgetrennt.

#### 4.6.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach der Trennung aus dem Agarosegel zu isolieren wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Die benötigten Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

#### 4.6.6 Ligation von DNA

Um ein Konstrukt aus restringiertem Vektor- und *insert*-DNA herstellen zu können wurde das Enzym T4-Ligase (Fermentas) verwendet. Die Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen freien 3' Hydroxyl- und 5' Phosphatgruppen unter Hydrolyse eines energieliefernden ATP-Moleküls. Als Kofaktor werden divalente Magnesiumionen benötigt. Die  $Mg^{2+}$  Ionen schirmen die negativen Ladungen der Phosphate des ATPs ab, welches die Spaltung der Anhydridbindung erleichtert. Ein typischer Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Tab. 4.5: Reaktionsansatz einer Ligation

Komponente	Menge [ng] / Volumen [µl]
restringiertes Akzeptorplasmid	50 ng
restringiertes <i>insert</i>	3 – 5 fach molarer Überschuss
T4 DNA-Ligase	1 µl
Reaktionspuffer (10 x)	1-2 µl
A. bidest	ad 10-20 µl

Für den Erfolg der Ligation ist ein spezifisches Verhältnis zwischen Vektor und *insert*-DNA elementar. Die *insert*-DNA sollte in 3 – 5 fach molarem Überschuss vorhanden sein. Die einzusetzende Menge [ng] wurde mit folgender Berechnung ermittelt.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 3 - 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte entweder für 1 – 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

#### 4.6.7 Sequenzierung

Die hergestellten SOX2-Konstrukte wurden im Zentrum für Laboratoriumsmedizin, Abteilung für Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Münster sequenziert. Dazu wurde ein nach F. Sanger modifiziertes Verfahren verwendet, bei dem als Terminatoren keine radioaktiv-, sondern fluoreszenz-markierte ddNTPs zum Einsatz kommen (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde mit Big Dye 3.1® (Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Auswertung der Sequenzierung wurde die Chromas Lite 2.1 (Technelysium PTY LTD.) Software verwendet. Das Schema der Sequenzierungs-PCR ist im Folgenden dargestellt.

Tab. 4.6: Reaktionsansatz einer Sequenzierung

Komponente	Menge [ng] / Volumen [µl]
Plasmid-DNA	150 – 400 ng
Big Dye 3.1®	2 µl
Big Dye 3.1® Reaktionspuffer	2 µl
spez. <i>primer</i>	1,5 µl (10 pmol)
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Tab. 4.7: Zyklusprotokoll der Sequenzierung

Temperatur	Dauer
96 °C	4 min
96 °C	20 sek
50 °C	10 sek
60 °C	2 min
4 °C	halten

} 35x

## 4.6.8 Arbeiten mit RNA

### 4.6.8.1 Isolierung von Gesamt RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem GeneElute™ Mammalian Total RNA Miniprep-Kit (Sigma-Aldrich). Alle Isolierungsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der Proben wurde mit dem NanoPhotometer (Implen) ermittelt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 4.6.8.2 Isolierung von mRNA

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde zunächst wie unter 4.6.8.1 angegeben Gesamt-RNA aus  $1 \times 10^7$  U373MG-Zellen isoliert. Die Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *Oligotex Direct mRNA Mini Kit* (Qiagen). Das System verwendet Polystyren-Latex-Partikel auf deren Oberfläche dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub> Oligonukleotide kovalent gebunden sind. Der Polyadenosylschwanz der mRNA Moleküle bindet an die Oligonukleotide. Dadurch wird die mRNA aus dem Gemisch separiert. Die Durchführung der mRNA Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration wurde durch ein NanoPhotometer (Implen) ermittelt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### 4.6.8.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase. Es wurden zwischen 0,1 – 1 µg denaturierter Gesamt-RNA je Probe eingesetzt und mit dem *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben in cDNA transkribiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

#### 4.6.8.4 qRT-PCR (quantitative *realtime* PCR)

Durch die quantitative *realtime* PCR ist es möglich, die Amplifikation eines *templates* in Echtzeit zu verfolgen. Das Prinzip beruht auf dem *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Mit Hilfe genspezifischer *primer* und fluoreszenzmarkierter Sonden, kann die Menge von Syntheseprodukten in der exponentiellen Amplifikationsphase quantifiziert werden. Die Auswertung der relativen Expressionen eines Gens erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Pfaffl, 2001). Dazu wurden die zuvor ermittelten  $C_T$ -Werte zunächst mit Hilfe der Expression des *housekeeping* Gens GAPDH, welches in allen verwendeten Zelllinien stabil exprimiert wird, normiert. Für alle Experimente (Ausnahme GFAP $\delta$ ) wurden TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ -assays (Applied Biosystems, vgl. Tab. 4.10) verwendet. Der Reaktionsansatz für die qRT-PCR, das Zyklusprotokoll sowie verwendete TaqMan $\text{\textcircled{R}}$  assays sind im Folgenden dargestellt.

Tab. 4.8: Reaktionsansatz der qRT-PCR

Ansatz für TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ assay	Ansatz für GAPDH
1 $\mu$ l cDNA	1 $\mu$ l cDNA
10 $\mu$ l TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ Universal PCR MasterMix	10 $\mu$ l TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ Universal PCR MasterMix
1 $\mu$ l TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ Gene Expression assay	0,83 $\mu$ l GAPDH forward primer
ad 20 $\mu$ l DEPC-H $_2$ O	0,83 $\mu$ l GAPDH reverse primer
	0,83 $\mu$ l GAPDH Sonde
	ad 20 $\mu$ l DEPC-H $_2$ O

Tab. 4.9: Zyklusprotokoll der qRT-PCR

Temperatur	Zeit
50 °C	2 min
95 °C	10 min
95 °C	15 sek
60 °C	1 min

} 40x

Tab. 4.10: verwendete TaqMan® assays

Gen	assay / primer
SOX2	Hs01053049_s1
RUNX1	Hs00231079_m1
GAPDH (Human) forward	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
GAPDH (Human) reverse	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'
GAPDH (Human) Sonde	5'-FAM-CTGGCATTGCCCTCAACGACCA-TAMRA-3'

Da für den Nachweis von GFAPdelta keine spezifische Sonde zur Verfügung stand wurde die Quantifizierung mittels SYBR® Green durchgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte analog zu dem TagMan® assay (vgl. Tab. 4.9). Es wurden folgende primer verwendet (je 0,14 µl (100 pmol)).

Tab. 4.11: verwendete primer für den Nachweis von GFAPδ

Gen	Primer Sequenz
GFAPδ	forward 5' TCCAACCTGCAGATTGAGG 3'
GFAPδ	reverse 5' TTGGTATAACTCGTATTGTGAGGCTT 3'

Um die Spezifität der verwendeten primer zu bestimmen, ist es notwendig bei der Verwendung von SYBR® Green eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Das Zyklusprotokoll wurde dementsprechend angepasst.

Tab. 4.12: Zyklusprotokoll für den SYBR® Green Ansatz

Temperatur	Zeit
95 °C	10 min
95 °C	15 sek
60 °C	1 min
95 °C	15 sek
60 °C	1min
95 °C	15 sek

} 40x  
 } 40x } Schmelzkurvenanalyse



## 4.7 Proteinbiochemische Methoden

### 4.7.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Isolierung von Proteinen wurden die Zellen zunächst 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsin (100x) behandelt, abzentrifugiert (1700 rpm, RT, 5 min) und anschließend mit spezifischen Puffern, welche Detergenzien wie SDS (Standardlysepuffer) oder NP-40 (RIPA) enthalten, auf Eis lysiert. Zum Schutz der Proteine vor Degradation durch Proteasen wurde den Lysepuffern vorher 1 mM PMSF sowie ein Protease Inhibitor Cocktail (1:1000; Sigma-Aldrich) frisch zugesetzt. Die bei der Lyse frei werdende genomische DNA wurde mechanisch fragmentiert, indem das Lysat mehrfach mittels einer 1 ml Spritze durch eine Kanüle (24 G) gesogen wurde. Abschließend wurden die Lysate für 20 – 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert um zelluläre Bestandteile zu pelletieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 4.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951) anhand einer BSA-Standardreihe definierter Konzentration (BioRad D<sub>c</sub> *Protein assay*) nach Angaben des Herstellers. Die Detektion erfolgte bei 750 nm mit einem Plattenphotometer.

### 4.7.3 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Um einzelne Proteine in einem Proteingemisch nachzuweisen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Zunächst wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (SDS-PAGE). Anschließend erfolgte der Transfer auf geeignete Membranen (PVDF oder Nitrocellulose) sowie die Detektion des Proteins mittels spezifischer Antikörper.

### 4.7.4 Die SDS-PAGE

Die elektrophoretische Mobilität von Proteinen hängt sowohl von der Größe als auch von ihrer Ladung ab. Bei der verwendeten SDS-Gelelektrophorese wird die Eigenladung der Proteine durch Zugabe des anionischen Tensids SDS (Verhältnis: 1,4 g SDS / g Protein) überdeckt, so dass diese nur ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Zudem wirkt SDS denaturierend da es die Wasserstoffbrückenbindungen angreift und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen zerstört. Zur Reduzierung von Disulfidbrücken wird dem Probenpuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt. Die Vorteile einer SDS-Page sind die

hohe Stabilität, ein guter Siebeffekt über große Trennbereiche sowie kaum vorhandene Elektroendosmose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet. Dabei werden Proteingemische zunächst in einem Sammelgel aufkonzentriert und anschließend mit einem Trenngel gleichmäßig separiert (Laemmli, 1970). Die zu analysierenden Proben wurden zunächst auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt, mit Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert (oder 10 min bei 70°C), zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der Proteine wurden verschiedene Gelkonzentrationen verwendet.

**Tab. 4.13: Zusammensetzung verschieden konzentrierter SDS-Gele**

Reagenzien	Trenngel			Sammelgel 5 %
	7,5 %	10 %	12,5 %	
Acrylamidlösung	1,75 ml	2,33 ml	2,90 ml	415 µl
Lower Tris	1,75 ml	1,75 ml	1,75 ml	-
Upper Tris	-	-	-	625 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 ml	2,92 ml	2,33 ml	1,46 ml
APS (10%)	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V für 1,5 h in 1 x SDS-Laufpuffer.

#### 4.7.5 Transfer (*blotting*)

Nach der Trennung durch die SDS-Page wurden die Proteine durch das sogenannte *Tank-Blot* Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran übertragen und immobilisiert. Die Membran wurde zunächst in Blotpuffer aktiviert und luftblasenfrei auf das SDS-GEL gelegt. Das Gel und die Membran werden von je einem *Whatmann*-Filterpapier sowie einem Schwamm flankiert. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels *Mini Trans-Blot Cell* System (BioRad) bei konstanter Spannung (100 V / 0,25 mA) bei 4°C für 1 h. Anschließend wurde die Membran reversibel mit Ponceau S (0,2 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure) für 5 min gefärbt. Durch Inkubation mit destilliertem Wasser wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht (Detektionsgrenze etwa 50 ng). Die vorhandene Trichlor-essigsäure immobilisiert zudem die Proteine auf der Membran. Abschließend wurde die Ponceau S Färbung durch Waschen mit TBST vollständig entfernt.

#### 4.7.6 Immundetektion

Die Visualisierung der Proteine erfolgte über spezifische Antikörper. Zunächst wurde die Membran für 30 – 60 min in Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in TBST oder 5 % BSA in TBST; TBST = Tris gepufferte Salzlösung mit Tween-20) inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper, entweder für 1 h – 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht, auf einem Schüttler.

##### Verdünnung der eingesetzten Primärantikörper

anti-SOX2	(Maus)	1:500
anti-c-MYC	(Maus)	1:3000
anti-GFAP	(Kaninchen)	1:20.000
anti-β-Aktin	(Kaninchen)	1:10.000

Anschließend wurde die Membran 6 x 5 min in 1 x TBST gewaschen um ungebunden Primärantikörper zu entfernen. Darauf folgte ein zweiter, 30minütiger Blockierungsschritt, sowie die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünntem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

##### Verdünnung der eingesetzten Sekundärantikörper

anti-Maus IgG (A3682)	1:10.000
anti-Kaninchen IgG (A2074)	1:10.000

Erneut wurde die Membran für 6 x 5 min in TBST gewaschen. Zur Detektion wurde Luminata™ Forte Western HRP *substrate* (Millipore) eingesetzt. Die Membran wurde mit 1 ml Reagenz benetzt und für 2 – 5 min inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Umsetzung des im Substrat vorhandenen Luminol. Bei der Reaktion entsteht ein energiereiches Intermediat, welches beim Rückgang in den Grundzustand Photonen spezifischer Wellenlänge emittiert. Diese als Chemilumineszenz bezeichnete Reaktion wurde genutzt, um Proteine auf einem Röntgenfilm (AGFA CRONEX 5 Medical X-Ray Film, Mortsel, Belgien) sichtbar zu machen. Die Expositionszeit variierte je nach verwendetem Antikörper zwischen 5 sek. und 30 min.

#### 4.7.7 Densitometrie

Um die Expression, bzw. Restexpression eines Proteins nach dessen *knockdown* zu quantifizieren, wurden die Westen Blots eingescannt und densitometrisch vermessen. Zur

Normierung der einzelnen Proben wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Alle densitometrischen Messungen wurden mit der Software Gel-Pro<sup>®</sup> Analyzer Version 3.0 (Media Cybernetics, USA) durchgeführt.

## 4.8 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz ist es möglich, Proteine und deren subzelluläre Lokalisation in Zellen sichtbar zu machen. Man unterscheidet zwischen direkter (fluorophor-gekoppelter Primärantikörper) und indirekter Fluoreszenz (fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper).

### 4.8.1 Immunfluoreszenz an Zellen

Zunächst wurden die Zellen durch Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst, ausgezählt, auf 10 mm<sup>2</sup>-Deckglässchen in 24 well-Platten ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 x PBS gewaschen und mit gepuffertem Formaldehyd (3,7 % in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Erneut wurden die Zellen in 1 x PBS gewaschen (3 x 5 min) sowie in 0,1 % Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 0,5 % - 1 % BSA / 10 % Ziegen Serum in PBS für 30 min. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in Blockierungsmedium bei 4°C über Nacht. Ungebundener Primärantikörper wurde anschließend durch Waschen mit PBS entfernt (3 x 5 min). Bevor die Zellen für 1 h mit einem fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper in einem abgedunkelten Gefäß inkubiert wurden, erfolgte ein weiterer Blockierungsschritt für 20 min. Wiederum wurde mit 1 x PBS gewaschen (3 x 5 min). Zur Färbung des Aktinzytoskeletts wurde AlexaFluor<sup>®</sup> 594 oder 488 gekoppeltes Phalloidin (Millipore, 1:50, 20 min, RT) eingesetzt. Der Zellkern wurde mit Hilfe des Hoechst 33258 Farbstoffes (1 µg/ml; 2 min) oder DAPI visualisiert (Life Technologies Corp.). Nach einem letzten Waschschrift mit A. bidest erfolgte das Eindecken der Zellen mit *Fluorescence-Mounting-Medium*, (Dako). Abschließend wurden die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack versiegelt, um dem Austrocknen sowie der Bildung von Luftblasen auf dem Präparat entgegenzuwirken.

### 4.8.2 Immunfluoreszenz an Paraffinmaterial

Um Immunfluoreszenzanalysen an Paraffinmaterial durchführen zu können, muss dieses zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurde das Präparat mit Xylol sowie einer absteigenden Ethanolreihe inkubiert. Anschließend folgte ein als HIER (*heat induced epitope*

*retrival*) bezeichneter Schritt, der die durch das Paraffin entstandene Maskierung der Epitope größtenteils aufhebt. Dazu wurden die Präparate in 0,2 % Citratpuffer pH 6,1 (oder pH 9,0) in einem Garkocher für 30 min erhitzt, 3mal mit TBS gewaschen und anschließend für 15 min auf Eis gekühlt. Da in Paraffin eingebettete Präparate zum autofluoreszieren neigen, wurden die Präparate zusätzlich mit 5 mM CuSO<sub>4</sub> und 50 mM NH<sub>4</sub>Cl jeweils in destilliertem Wasser oder mit Sudan Black (0,9 g / 300 ml 70 % Ethanol) für 10 - 20 min inkubiert. Dieses *quenching* sorgt für eine deutliche Reduktion des Hintergrundes. Sudan Black minimiert zusätzlich die durch akkumuliertes Lipofuscin entstehende Eigenfluoreszenz des verwendeten Gewebes.

#### Entparaffinierungsreihe:

Xylol	5 min
Xylol	10 min
Ethanol 99 %	5 min
Ethanol 96 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
A. dest	5 min

Anschließend wurden die Präparate mit 10 % Ziegen Serum / TBST für 45 min inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blocken. Darauf folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern in 0,5 % BSA / 3 % Ziegen Serum / TBS bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Präparate 3 x 5 min mit TBS gewaschen und mit 2 % BSA / TBS für 30 min geblockt. Anschließend wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung für 1 h behandelt, erneut gewaschen (3 x 5 min TBS) sowie die Kernfärbung mittels Hoechst-Farbstoff für 3 min durchgeführt. Nach einem abschließenden Waschschrift in A. bidest wurden die Proben mit Eindeckmedium (Fluoromount, Dako) eingedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt.

Die PLA-Experimente an Paraffinmaterial wurden analog durchgeführt, lediglich die Primärantikörper wurden in 0,5 % BSA / 20 % Ziegen Serum / TBS inkubiert. Die Sudan Black Behandlung erfolgte erst am Ende des Protokolls vor dem Eindecken der Präparate.

## **4.9 Immunhistochemie an Paraffinmaterial**

Ähnlich der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine auch mit Hilfe der Immunhistologie nachweisen. Allerdings wurden hierbei keine Fluorophorgekoppelten, sondern biotinylierte Sekundärantikörper eingesetzt. Die Färbung erfolgt dabei durch die Oxidation von AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) zu einem roten Farbstoff oder DAB (3,3',4,4-Biphenyltertamin-tetrahydrochlorid) zu einem braunen Farbstoff. Zusätzlich wurden die Präparate nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-

Kit, Vector Labs) für 30 min inkubiert. Diese Methode besitzt im Vergleich zu anderen (PAP oder APAAP) die höhere Sensitivität. Die Kernfärbung erfolgt bei diesem Protokoll mittels Hämatoxylin für 1 – 3 min und anschließendem Wässern für 5 min. Bei diesem Protokoll entfällt die Inkubation mit CuSO<sub>4</sub> und NH<sub>4</sub>Cl. Stattdessen wird anfangs (vor der Inkubation der Primärantikörpers) die endogene Peroxidase mittels 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / PBS blockiert. Alle anderen Schritte erfolgten analog zur Immunfluoreszenz an Paraffinmaterial.

#### Verdünnung der eingesetzten Primärantikörper:

anti-SOX2	(Maus)	1:100
anti-KI67	(Maus)	1:100
anti-Vimentin	(Maus)	1:100
anti-GFAP	(Kaninchen)	1:400

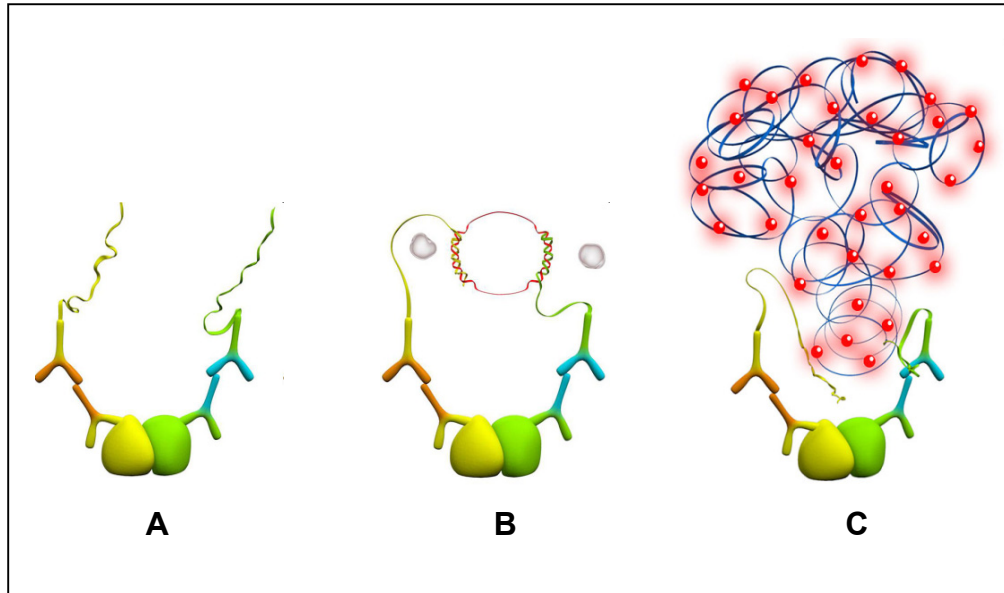
### **4.10 Methoden zum Nachweis von Protein-Proteininteraktionen**

Um die mit dem *yeast two-hybrid* System identifizierten Interaktionspartner von SOX2 zu validieren, wurden *in situ Proximity Ligation assays* (Duolink<sup>TM</sup>; Olink® Bioscience) durchgeführt.

#### **4.10.1 *In situ* Proximity Ligation assay (PLA)**

Im Gegensatz zu anderen Methoden zum Nachweis von Protein-Proteininteraktionen (Y2H-System, Ko-IP oder *pull-down* Analysen) ermöglicht diese Technologie die Visualisierung, Lokalisierung und Quantifizierung von spezifischen Protein-Proteininteraktionen oder Proteinmodifikationen direkt innerhalb von nativen Zellen oder Geweben (Soderberg *et al.*, 2006; Weibrecht *et al.*, 2010). Um Interaktionen mit Hilfe der PLA-Technik sichtbar zu machen, verwendet man zwei spezifische primäre Antikörper, die aus verschiedenen Spezies stammen müssen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Antikörper die in Maus und Kaninchen produziert wurden für die PLA-Experimente verwendet. An die Primärantikörper konjugieren speziesspezifische Sekundärantikörper (PLA *probes*), welche anstelle eines Fluorophors je einen kurzen DNA-Einzelstrang am Fc-Teil tragen. Befinden sich die beiden Sekundärantikörper (im Falle einer Interaktion) in räumlicher Nähe zueinander (2 – 40 nm) kommt es durch Zugabe von *cycle-forming* DNA Oligonukleotiden sowie einer Ligase zur Ausbildung eines geschlossenen Ringmoleküls. Dieses wird durch den Prozess der *rolling cycle* Amplifikation mit Hilfe einer Polymerase vervielfältigt, wobei eines der an die Sekundärantikörper gebundenen Oligonukleotide als initialer *primer* dient. Hierdurch entstehen mehrere hundert DNA-Einzelstränge an die komplementäre fluorophorgelabelte

Oligonukleotide spezifisch hybridisieren können. Im Gegensatz zu konventionellen Immunfluoreszenzprotokollen entsteht eine enorme Signalverstärkung (100 – 10.000fach). Diese Methode bietet erstmals die Möglichkeit sogar einzelne Moleküle innerhalb von Zellen zu detektieren und deren Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Proximity Ligation assay**

**A:** dargestellt sind zwei interagierende Proteine (gelb und grün) mit gebundenen Primärantikörpern (gelborange und blaugrün). Die Primärantikörper werden von den speziesspezifischen PLA *probes* (Sekundärantikörper), welche je ein kurzes einzelsträngiges DNA-Molekül tragen, gebunden. **B:** Durch die Zugabe von *cycle-forming* Oligonukleotiden (rot) sowie einer Ligase (weiß-grau) erfolgt der Ringschluß. **C:** Mittels einer Polymerase wird das DNA *template* per *rolling cycle* Mechanismus mehrere hundert Mal amplifiziert. Das Oligonukleotid eines Sekundärantikörpers (blaugrün) dient als *primer*. An die DNA binden schließlich fluorophor-gelabelte, komplementäre Oligonukleotide, durch die die Protein-Proteininteraktion mittels eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht wird (modifiziert nach [www.Olink.com](http://www.Olink.com)).

Ein weiterer Vorteil der PLA gegenüber anderen Methoden ist die Anwendung an klinischem Material. Es können sowohl paraffineingebettete Tumorproben, als auch tiefgefrorene Gewebepräparate verwendet werden.

#### Durchführung:

Die zu verwendenden Zellen (U373MG) wurden entweder auf *Chamberslides* (Lab-TEK™) oder Objektträgern mit einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd für 15 min fixiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 für 5 min permeabilisiert. Das Absättigen unspezifischer Bindestellen erfolgte mit 1 % BSA/PBS (und/oder mit 20 % Ziegen Serum) für 30 min. In dieser Lösung wurden ebenfalls die primären Antikörper verdünnt zu den Proben gegeben und diese über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit Waschpuffer A (Duolink Starterkit) oder PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen. Mit Hilfe eines Fettstiftes (Vectorshield, Image Edge Pen) wurde eine Fläche von 1 cm<sup>2</sup> auf

jedem Objektträger markiert. Diese Fläche ist vom Hersteller für ein Reaktionsvolumen von 40 µl (1 assay) definiert. Der Fettstift sorgt dafür, dass die Flüssigkeit mittels Oberflächenspannung auf den Zellen verbleibt und stellt somit einen Schutz vor Austrocknung (Bildung von Artefakten) des Präparates dar. Anschließend wurden beide PLA *probes* in 1 % BSA / PBS / 20 % Ziegen Serum verdünnt (Verhältnis 1:5) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Proben gegeben. Die Proben wurden in einer vorgewärmten feuchten Kammer für 1 h bei 37 °C in einen Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit Waschpuffer A in einem Volumen von 100 ml auf einem Schüttler. Danach wurden die Proben mit in Wasser (Milli Q) verdünnter Ligationslösung (1:5) sowie Ligase (1:40) für 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein 2 x 2 minütiger Waschschriff in 100 ml Puffer A. Anschließend wurde die Amplifikationslösung im Verhältnis 1:5, die Polymerase im Verhältnis 1:80 in Wasser (Milli Q) verdünnt und die Proben damit 100 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die anschließenden Waschschriffe für 2 x 10 min in 100 ml Puffer B und 1 min in 0,01 x Puffer B sowie die Trocknung der Proben wurden aufgrund der Lichtsensivität der fluorophorgelabelten Oligonukleotide im Dunkeln durchgeführt. Das Aktinzytoskelet wurde mit FITC-gelabeltem Phalloidin (1:50 in PBS, Life Technologies) für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt, um die zelluläre Lokalisation der Protein-Proteininteraktionen genauer bestimmen zu können. Nach 20minütiger Trocknungszeit wurden die Proben mit Duolink *mounting medium*, welches zur Kernfärbung DAPI enthält, eingedeckt und die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt. Nach einer Wartezeit von 20 min konnten die Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Um sicher gehen zu können, dass die detektierten Signale spezifisch sind, ist es notwendig die eingesetzten Primärantikörpern zu titrieren. Dazu lässt man bei einem PLA-Experiment einen der primären Antikörper weg und bestimmt die Menge an unspezifischen Signalen, die durch den vorhandenen Primärantikörper verursacht werden. Diese technische Kontrolle wurde für jeden verwendeten Antikörper durchgeführt. Die vom Hersteller angegebene Toleranzgrenze liegt bei etwa 3 zu 10 (3 unspezifische Signale pro 10 Zellen). Ist dieser Wert überschritten, sollte eine geringere Antikörperkonzentration eingesetzt oder die Verwendung eines spezifischeren Primärantikörpers in Betracht gezogen werden. Nach Etablierung der Primärantikörper wurden für die PLA Experimente folgende Konzentrationen eingesetzt.



**Tab. 4.14: Konzentrationen eingesetzter Primärantikörper**

Antikörper	Konzentration
SOX 2 (Maus)	1:1000
RUNX 1 (Kaninchen)	1:1000
GFAPdelta (Kaninchen)	1:1000
Twist1 (Kaninchen)	1:1000
Cadherin 11 (Maus)	1:250
β-Catenin (Kaninchen)	1:500

#### 4.10.2 *In situ* PLA an Paraffinmaterial

Für PLA-Experimente an Paraffinmaterial wurden die Proben zunächst gemäß 4.8.2 vorbehandelt. Anschließend wurden die Proben wie unter 4.8.1 beschrieben bis zur Inkubation mit den Primärantikörpern behandelt. Die PLA erfolgte analog zu Punkt 4.10.1.

#### 4.11 Arbeiten mit Bakterien

Einer der am besten charakterisierten Prokaryoten ist das gramnegative Proteobakterium *Escherichia coli*. Die biologischen Eigenschaften dieser Bakterien sind weitestgehend bekannt, daher werden sie in vielen Laboratorien seit Jahrzehnten als Modellorganismen für Mikro- und Molekularbiologische Studien eingesetzt. Durch die kostengünstige Kultivierung sowie kurzen Generationszeiten eignen sich *E.coli* Bakterien hervorragend für die Amplifikation von DNA sowie für die Expression rekombinanter Proteine. Da *E.coli* Bakterien als fakultativ pathogen einzustufen sind, werden genetisch modifizierte Sicherheitsstämme eingesetzt. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *E.coli* Stamm (DH5α) ist ein Derivat des K12-Sicherheitsstammes, bei dem die Toxingene sowie Invasions- und Adhäsionsfaktoren deletiert wurden. Dadurch können DH5α Bakterien der Risikogruppe 1 zugeordnet werden.

##### 4.11.1 Kultivierung

Die Kultivierung der DH5α Bakterien erfolgte sowohl in Form einer Flüssigkultur mit Bakterienröhrchen in einem Schüttler, als auch auf spezifischen Agarnährböden in einem Brutschrank bei jeweils 37°C. Zur Kultivierung wurde 2YT-Medium eingesetzt.

### **2YT-Medium**

16 g tryptisch verdautes Pepton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
15 g Agar (für feste Nährböden)  
ad 1 L A. bidest

Den Nährmedien wurden bedarfsweise die Antibiotika Ampicillin (100 µg/µL) oder Kanamycin (50 µg/µL) zum selektionieren zugesetzt.

#### **4.11.2 Lagerung und Anlegen einer Dauerkultur**

Bakterienkulturen sind auf Agarnährböden bei 4°C etwa 3 Monate nutzbar. Eine längere Lagerung erreicht man durch Anlegen einer Dauerkultur. Dazu wird einer Bakterien-suspension Glycerin mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) zugesetzt. Das Glycerin lagert sich in die bakterielle Membran und verhindert das Platzen der Zellen beim Gefriervorgang. Diese Kulturen lassen sich bei -80°C über Jahrzehnte hinweg problemlos lagern.

#### **4.11.3 Transformation von Bakterien**

Um für anschließende Experimente eine ausreichende Menge an DNA zu erhalten wurden Plasmide mit Hilfe von *E.coli* Bakterien amplifiziert. Zunächst werden die tiefgefrorenen, kompetenten Zellen (Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl kompetenter Bakterien-suspension wurden 10 – 30 ng Plasmid DNA pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Bei diesem Schritt wird die Membran temporär permeabel, wodurch die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurde die Suspension mit 950 µl 2YT-Medium ohne Antibiotikum versetzt und für 45 Minuten bei 37°C in einem Schüttler bei 150 - 200 rpm inkubiert. Auf einem vorgewärmten Agarnährboden wurden 100 µl der Bakterien ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### **4.12 Arbeiten mit Hefen**

*Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) stellt den ersten Eukaryoten dar, dessen Genom vollständig sequenziert worden ist. Ebenso wie Bakterien lassen sich Hefen einfach und kostengünstig kultivieren und zeigen, obgleich niederer Komplexität, große Analogien zellulärer und struktureller Organisation zu höheren eukaryotischen Organismen. Die

vielfältigen genetischen Manipulationsmöglichkeiten erlauben zudem ein großes Einsatzspektrum in der modernen Molekularbiologie.

#### **4.12.1 Kultivierung**

Die Anzucht der Hefen erfolgte entweder mittels einer Suspensionskultur oder auf festen Agarnährböden bei jeweils 30°C. Dazu wurde YPDA Medium folgender Zusammensetzung verwendet:

##### **YPDA Vollmedium**

20 g tryptisch verdautes Pepton  
10 g Hefeextrakt  
15 ml L-Adeninhemisulfat (0,2 %)  
20 g Agar (für feste Nährböden)  
ad 950 ml A. bidest  
pH-Wert auf 6,5 einstellen

Um mittels des *yeast two-hybrid* Systems Protein-Proteininteraktionen zu identifizieren, wurden Hefen auf spezifischen Selektionsnährböden kultiviert.

##### **SD Selektionsmedium**

6,7 g SD-Hefe-Basis-Medium  
20 g Agar (für feste Nährböden)  
ad 850 ml A. bidest  
pH-Wert auf 5,8 einstellen

Diesem Medium wurden alle essentiellen Aminosäuren, mit Ausnahme derer, die als Auxotrophiemarker dienen (Leucin, Tryptophan, Histidin, Adenin) zugesetzt.

#### **4.12.2 Lagerung und Anlegen einer Dauerkultur**

Hefekulturen auf festen Nährböden können bei 4°C etwa 4 - 6 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei einer längerfristigen Lagerung empfiehlt sich einer frischen Suspensionskultur Glycerin in einer finalen Konzentration von 25 % (v/v) zuzusetzen und diese bei -80 °C einzufrieren. Analog den Bakterien sind diese Kulturen über Jahre hinweg vital.

#### **4.12.3 Herstellen kompetenter Hefen und deren Transformation**

Die Kompetenzmachung von Hefen ähnelt der von Bakterien sehr. Durch die Behandlung mit einem Salz (Lithiumacetat) und einem anschließenden Hitzeschock wird die Zellmembran

der Hefen temporär permeabilisiert, um eine effektive Aufnahme von DNA zu gewährleisten (Gietz *et al.*, 1997) Für je 10 Transformationsansätze wurden 50 ml YPDA-Vollmedium mit einer frischen über Nacht Kultur bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,1 – 0,2 angeimpft und für 4 Stunden (2 Generationszeiten) bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei RT und 5000 x g zentrifugiert. Nach Resuspension mit 25 ml A. bidest wurde erneut zentrifugiert sowie in 3 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 30°C auf einem Schüttler. Die Zellen wurden wiederum zentrifugiert und in Transformationslösung vorsichtig resuspendiert:

<b><u>Transformationslösung</u></b>	2,4 ml 50 % Polyethylenglykol 3500 (v/v)
(10 Ansätze)	0,36 ml 1M LiAc
	50 µl <i>carrier</i> DNA (5mg/ml)
	690 µl A. bidest

Die Hefezellen sind nach diesem Schritt kompetent und können direkt für (Ko)-Transformationen eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Überprüfungen der potentiellen Interaktionen sowie Autoaktivitätsanalysen durch Kotransformationen sowohl im Y2HGold, als auch im Y190 Stamm durchgeführt. Diese Stämme sind nicht in der Lage die Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Histidin sowie Adenin (nur Y2HGold) zu synthetisieren. Adenin und Histidin dienen neben X-alpha-Gal (bei Y190 X-beta-Gal) und Aureobasidin A (nur Y2HGold) als Reportergene. Leucin und Tryptophan werden als Transformationsmarker benutzt. Die Transformationseffizienz wird demnach auf  $SD^{-Leu-Trp}$  Platten (*double dropout*) getestet (technische Kontrolle). Die Tryptohanauxotrophie wird durch Aufnahme des *bait*-Plasmides (enthält SOX2), die Leucinauxotrophie durch die Aufnahme des *prey*-Plasmides (enthält den potentiellen Interaktionspartner) egalisiert. Nur wenn Hefezellen beide Plasmide aufgenommen haben sind sie in der Lage auf den *double dropout* ( $SD^{-Leu-Trp}$ ) Nährböden zu wachsen. Die Interaktionskontrolle selbst erfolgte auf sogenannten QDO/X/A (*quadruple Dropout* mit X-alpha-Gal und Aureobasidin A, nur Y2HGoldstamm) Nährböden. Diesen Nährböden fehlen alle 4 Aminosäuren (*quadruple dropout*), wobei zwei (Adenin und Histidin) als Reportergene fungieren (bei Verwendung des Y190 Stammes wurden angepasste Nährböden verwendet). Nur im Falle einer Interaktion zwischen *bait*- und *prey* Protein werden die Reportergene transkribiert und es kommt zum Wachstum blauer Kolonien<sup>1</sup>. Die Autoaktivitätstests für die SOX2-Konstrukte sowie potentiellen Interaktionspartner wurden analog durchgeführt. Hierbei wird jedoch als Partner jeweils ein passendes Leerplasmid kotransformiert (pGADT7 bzw. pGBKT7). Kommt es auf den QDO/X/A Nährböden zum Wachstum so ist das getestete Konstrukt autoaktiv und die potentielle Interaktion falsch positiv.

<sup>1</sup>Zur Überprüfung der Interaktion/Autoaktivität mittels des Y190 Stammes wurden  $\beta$ -Gal-Tests, deren detaillierte Beschreibung der Diplomarbeit von L. Rütter (WWU-Münster, 2008) entnommen werden kann, durchgeführt.

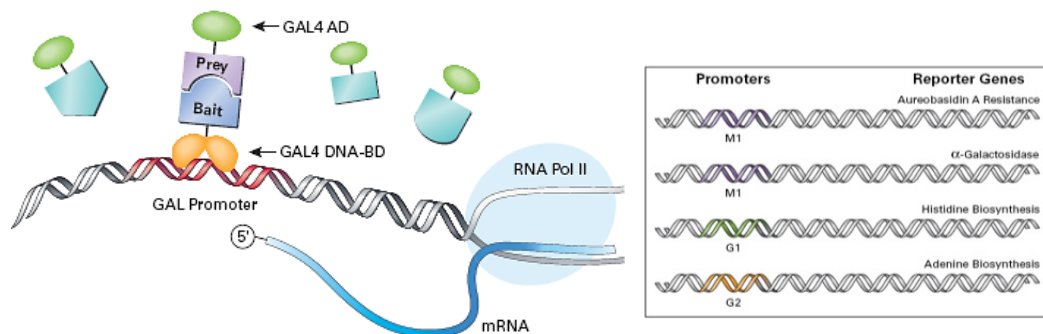
#### 4.12.4 Herstellen einer cDNA-Bibliothek

Um gliomspezifische Interaktionspartner für SOX2 zu identifizieren, wurde eine cDNA Bibliothek aus der Zelllinie U373MG hergestellt und in den Hefestamm Y187 transformiert. Die Generierung der Bibliothek erfolgte mit Hilfe des *Make Your Own Mate & Plate™ Library System* (Clontech) nach Angaben des Herstellers. Detaillierte Informationen können dem beiliegenden *instruction manual* entnommen werden, daher wird die Herstellung der cDNA Bibliothek hier nur kurz erläutert. Zunächst wurde aus  $1 \times 10^7$  U373MG Zellen Gesamt-RNA isoliert. Darauf folgte die Isolierung und Aufreinigung der mRNA (vgl. 4.6.8.2). Anschließend wurden 112 ng mRNA eingesetzt, um mittels spezifischer *primer* cDNA mit bekannten flankierenden Sequenzen herzustellen (SMART™ Technologie, Clontech). Diese cDNA wurde mit einer LD-PCR (*long distance*) amplifiziert und chromatographisch aufgereinigt, um PCR-Komponenten sowie Nukleinsäureabschnitte kleiner als 200 bp zu eliminieren. Abschließend erfolgte die Transformation der cDNA sowie des linearisierten *prey* Plasmides pGADT7-Rec in den Hefestamm Y187. Die cDNA Fragmente werden durch homologe Rekombination in der Hefe in den Vektor eingefügt. Anschließend wurden die Hefezellen auf SD-Nährböden ohne Leucin ausplattiert. Da der Y187 Stamm selbst nicht in der Lage ist Leucin zu synthetisieren, wachsen nur die Hefen, welche ein *prey*-Plasmid (kodiert die Aminosäure Leucin) aufgenommen haben. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurden die Hefekolonien in YPDA-Vollmedium aufgenommen, aliquotiert und die fertige cDNA-Bibliothek bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.13 Das yeast two-hybrid System

Beim Y2H-System handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, um potentielle Protein-Proteininteraktionen zu analysieren (Fields und Song, 1989). Mit Hilfe dieser Technik ist es sowohl möglich ganze cDNA-Bibliotheken auf potentielle Interaktionen mit bestimmten Proteinen hin zu untersuchen, als auch einzelne Protein-Proteininteraktionen zu bestätigen. Im Gegensatz zu klassischen *in vitro* Methoden arbeitet dieses System *in vivo* mit dem Eukaryot *Saccharomyces cerevisiae*, welches den Vorteil hat, dass die für Interaktionen oft essentiellen posttranslationalen Modifikationen vorhanden sind. Das *yeast two-hybrid* System nutzt das Prinzip modularer Transkriptionsfaktoren, beispielsweise Gal4 der Hefe. Das Gal4-Protein besitzt zwei funktionelle Domänen. Zum einen die DNA-Bindedomäne (BD), welche an eine cis-regulatorische UAS-Sequenz (*upstream activating sequence*)

bindet. Zum anderen die Aktivierungsdomäne (AD), welche einen basalen Transkriptionskomplex rekrutiert und die Transkription spezifischer Zielgene initiiert (Johnston, 1987). Fields und Song entdeckten, dass die Gene selbst dann transkribiert werden, wenn die beiden Domänen sich „nur“ in räumlicher Nähe zueinander befinden und nicht direkt miteinander verbunden sind (Fields und Song, 1989). Diese Erkenntnis macht man sich zu Nutze, indem man zu untersuchende Proteine als Fusionsproteine exprimiert. Dazu wird die cDNA potentieller Interaktionspartner in spezifische Hefe-Expressionsvektoren inseriert. Der Vektor der die DNA-BD kodiert wird als *bait*, derjenige der die AD trägt als *prey*-Vektor bezeichnet. Die Fusionsproteine werden exprimiert, modifiziert und in den Zellkern transportiert. Im Falle einer Interaktion zwischen *bait* und *prey* Proteinen kommt es zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors, wodurch spezifische Reportergene transkribiert werden, die je nach verwendetem Hefestamm variieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Matchmaker™ Gold System der Firma Clontech verwendet. Dieses System bietet zu den herkömmlichen Auxotrophiemarkern (Histidin und Adenin) und dem kolorimetrischen Marker (X-Gal) die Möglichkeit, ein hefespezifisches Antibiotikum (Aureobasidin A) als Reportergen einzusetzen. Durch die Verwendung dieser 4 spezifischen Reportergene, die unter der Kontrolle dreier unabhängiger Promotoren stehen, wird das System wesentlich stringenter als Vorangegangene.



**Abb. 4.3: Schematische Darstellung des yeast two-hybrid Systems**

Im Falle einer Interaktion zwischen *bait* und *prey*-Protein werden die Gal4-DNA-AD und Gal4-DNA-BD in räumliche Nähe zueinander gebracht und die Transkription der Reportergene initiiert. Das verwendete Matchmaker™ Gold System nutzt 2 nährstoffspezifische (Adenin & Histidin), einen kolorimetrisches (alpha-Galaktosidase) und ein antibiotisches Reportergen (Aureobasidin A) zur Analyse potentieller Protein-Proteininteraktionen (modifiziert aus [www.clontech.com](http://www.clontech.com))

Eine der Limitierungen des Systems ist, dass die Interaktion im Zellkern stattfinden muss. Dieser weist ein anderes Milieu auf als das Zytosol. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Proteine ihre Tertiärstruktur ändern und es zu falsch positiven oder auch falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Des Weiteren sind einige Proteine ohne die Hilfe eines Interaktionspartners selbständig in der Lage die Expression der Reportergene zu induzieren, wenn sie als DNA-BD Fusionsprotein genutzt werden (Ruden *et al.*, 1991). Alle im Y2H eingesetzten Konstrukte müssen daher zunächst auf diese Autoaktivität hin überprüft werden

(Kotransformation mit einem *prey*-Leervektor). Daten die mit dem Y2H-System erhoben wurden sind aus den genannten Gründen mit weiteren, unabhängigen Methoden zu validieren. Mittlerweile sind viele modifizierte Varianten des Systems auf dem kommerziellen Markt erhältlich, beispielsweise das Split-Ubiquitin System, welches sich im Besonderen für die Interaktionsanalyse membranständiger Proteine eignet.

#### 4.13.1 *Yeast two-hybrid screen*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor SOX2 als *bait*-Protein für *yeast two-hybrid screens* eingesetzt, um glioblastomspezifische Interaktionspartner zu identifizieren. Die für den *screen* verwendete *prey*-cDNA Bibliothek wurde in den Hefestamm Y187 (MAT $\alpha$ ) transformiert. Das SOX2-Konstrukt wurde in den Y2HGoldstamm (MAT $\alpha$ ) transformiert. Die *screens* wurden mittels *mating* durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass die verwendeten Hefestämme unterschiedliche Paarungstypen, sogenannte *mating types* (MAT) aufweisen. Die MAT Gene sind regulatorische Gene, die unter anderem an der Synthese von Pheromonen beteiligt sind. Diese als a-Faktor respektive  $\alpha$ -Faktor bezeichneten Peptidhormone binden an Hefezellen des jeweils anderen Paarungstypes und bewirken eine Fusion der beiden Zellen. Die daraus resultierende diploide Zygote trägt die genetische Information beider Ausgangszellen. Um einen *screen* mittels *mating* durchzuführen wurde zunächst eine konzentrierte *bait* Kultur (pGBKT7-SOX2<sub>175Δ</sub>) hergestellt. Dazu wurde eine 2 mm große Kolonie von einer Agarplatte in SD<sup>-TRP</sup> Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 30°C unter schütteln inkubiert (18 h). Die Suspension wurde zentrifugiert und in 4 ml frischem Medium resuspendiert. Die Hefezellen wurden anschließend zusammen mit 1 ml der hergestellten cDNA-Bibliothek in 45 ml 2 x YPDA Medium in einen 2 L Erlmeyerkolben überführt und für 22 h bei 30°C unter langsamen Schütteln (30 – 50 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, in 10 ml 0,5 x YPDA Medium resuspendiert und auf spezifischen Nährböden ausplattiert. Der *screen* wurde, wie vom Hersteller empfohlen, zunächst mit 2 Reportergenen (X-alpha-Gal und Aureobasidin A (100 ng/ml)) durchgeführt. Nach 4 Tagen Inkubationszeit im Brutschrank bei 30 °C wurden nur die blauen (X-a-Gal positiven) Kolonien auf hochstringente Nährböden (QDO / X / A), die alle 4 Reportergene (Histidin, Adenin, X-alpha-Gal und Aureobasidin A) enthalten überführt, um falsch positive Interaktionen zu eliminieren. Nur die Kolonien die auf diesen Nährböden wuchsen, wurden für weitere Analysen in Betracht gezogen.

Beim *screenen* der cDNA-Bibliothek mittels des Y190 Stammes wurde analog verfahren, lediglich die Nährböden wurden den entsprechenden Auxotrophien und Reportergenen des Stammes angepasst.

#### 4.13.2 Analyse der *prey* Inserts

Die Kolonie-PCR diente dazu, die *inserts* der *prey* Vektoren, demnach die potentiellen SOX2 Interaktionspartner zu amplifizieren, um sie anschließend mittels Sequenzierung identifizieren zu können. Ein Bruchteil jeder Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze vom Nährboden entfernt und in 25 µl PCR-H<sub>2</sub>O überführt. Dazu wurden 25 µl des *Matchmaker insert Check PCR 2 kits* (Clontech) pipettiert, kurz gevortext und die PCR mit folgendem Protokoll durchgeführt.

Tab. 4.15: Zyklusprotokoll der Kolonie-PCR

Temperatur	Dauer
94°C	1 min
98°C	10 sek
68°C	3 min

} 30x

Nach der PCR erfolgte die Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Gruppen sortiert und mittels des Restriktionsenzym *HaeIII* restringiert. Bei Klonen die dasselbe Restriktionsmuster aufweisen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass identische Inserts vorliegen. Daher wurden anschließend nur Klone ausgewählt und sequenziert, die unterschiedliche Restriktionsmuster aufwiesen. Die Sequenzen wurden mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI) verglichen, um die SOX2-Interaktionspartner zu identifizieren.

#### 4.13.3 Plasmidisolierung aus Hefen

Um Kotransformationen zur Bestätigung der Interaktionen durchzuführen, mussten die *prey*-Plasmide aus den Hefen isoliert werden. Dazu wurden die Klone in SD<sup>-Leu</sup> Medium auf einem Schüttler bei 30 °C über Nacht kultiviert und anschließend 5 ml pelletiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Roti®-Prep Plasmid Mini (Roth) analog zu der Plasmidpräparation aus Bakterien. Allerdings musste zunächst die Zellwand durch die Zugabe von rauen Glas *beads* (Sigma-Aldrich) durch 5minütiges vortexen mechanisch zerstört werden. Die Isolierten Plasmide wurden in Bakterien transformiert und aufgereinigt (vgl. 4.6.1). Anschließend erfolgten die Autoaktivitätstests und Interaktionsvalidierungen mittels Kotransformationen in Hefen (vgl. 4.12.3.).



#### **4.13.4 Proteinisolierung aus Hefen**

Um die Expression der SOX2-Verkürzungsmutanten sowie potentieller Interaktionskandidaten nachzuweisen, wurden die Proteine aus den Hefezellen extrahiert. Da Hefezellen eine Zellwand besitzen, können Proteine nicht wie aus Bakterien oder Säugerzellen isoliert werden. Zur Extraktion der Proteine aus Hefezellen wurde die Harnstoff/SDS Methode angewandt (Printen und Sprague, 1994). Ein detailliertes Protokoll zur Durchführung kann dem „*Yeast Protocols Handbook*“ von Clontech entnommen werden (S. 13 – 14).



## 5 Ergebnisse

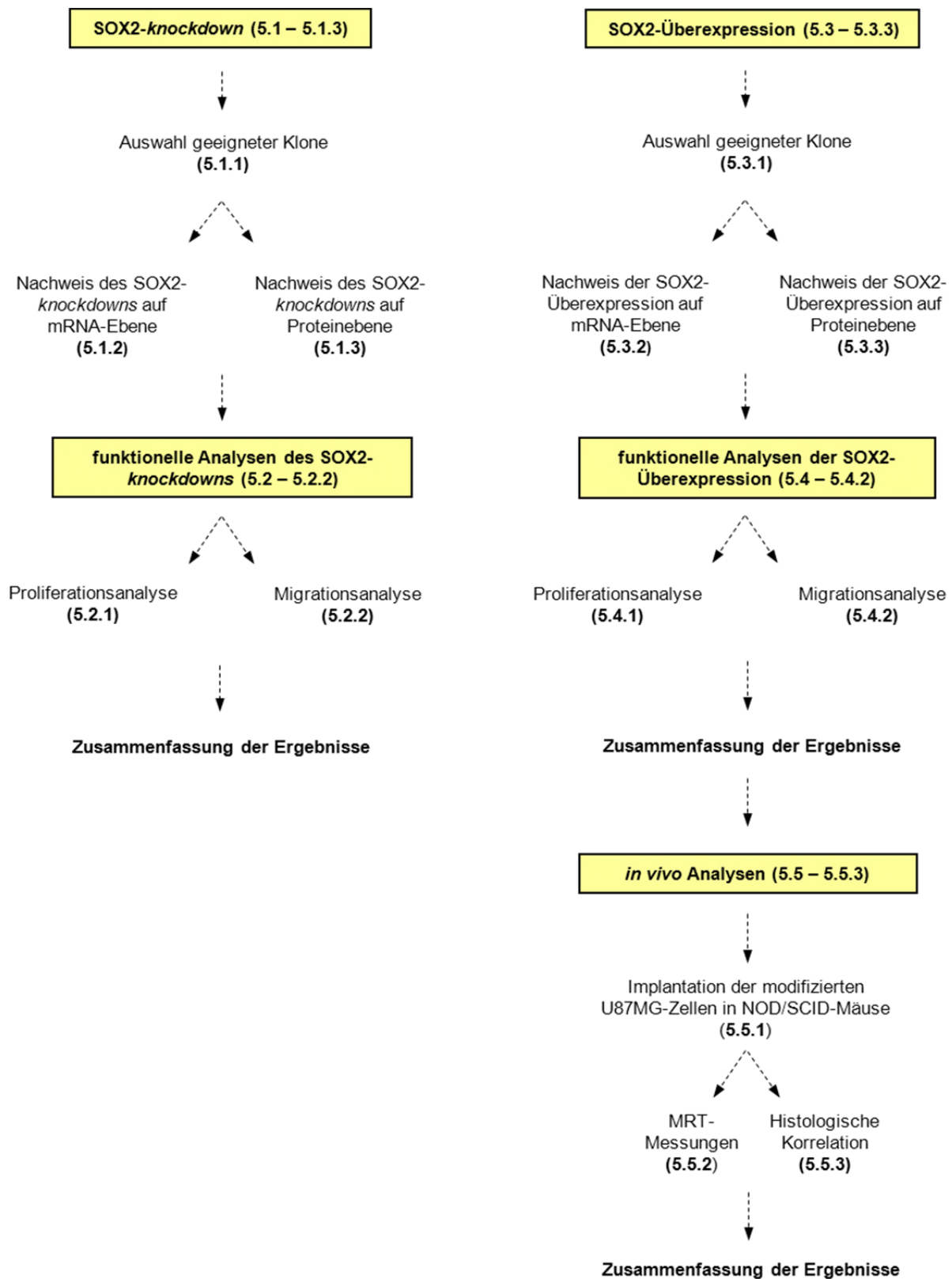
Zu Beginn dieser Studie lagen bereits Daten vor, die eine SOX2 Überexpression in Glioblastomen sowohl auf mRNA-Ebene als auch histologisch *in situ* an primärem, humanem Tumormaterial zeigen (Schmitz *et al.*, 2007). Zusätzlich wurden im Institut für Neuro-pathologie vorhandene, permanente Glioblastomzelllinien von Dr. K. Weber auf eine SOX2 Expression hin untersucht (vgl. 3). Ein primäres Ziel dieser Studie bestand darin zu analysieren, ob die SOX2 Expression in Glioblastomen funktionelle Auswirkungen bezüglich der klinisch relevanten Parameter Proliferation und Migration hat. Daher wurden die bereits vorliegenden SOX2-*knockdown* Klone zunächst auf die Restexpression hin überprüft und anschließend Proliferations- sowie Migrationsexperimente *in vitro* durchgeführt. Darauf folgend wurde untersucht, ob eine ektopische SOX2 Expression in SOX2 negativen Zelllinien ebenfalls funktionelle Auswirkungen zeigt. Die SOX2 defizienten Zelllinien U87MG sowie T98G wurden dazu mit einem EGFP-SOX2-Konstrukt von der Arbeitsgruppe Prof. A. H. Temme (Institut für experimentelle Neurochirurgie / Tumor-Immunologie, TU-Dresden) viral transduziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die *in vitro* erhobenen Daten wurden durch Xenotransplantation der SOX2 überexprimierenden Zellen im Mausmodell *in vivo* überprüft, um die physiologische Relevanz der SOX2 Funktion zu untermauern.

Darüber hinaus sollten Glioblastomspezifische SOX2-Interaktionspartner identifiziert werden. Hierzu wurde eine cDNA-Bibliothek aus der Glioblastomzelllinie U373MG generiert und anschließend mit SOX2 als *bait*-Protein mittels des *yeast two-hybrid* Systems mehrfach gescreent. Alle mit Hefezellen durchgeführten Experimente wurden im Institut für experimentelle Tumorbilogie der WWU-Münster, mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. A. Barnekow, durchgeführt.

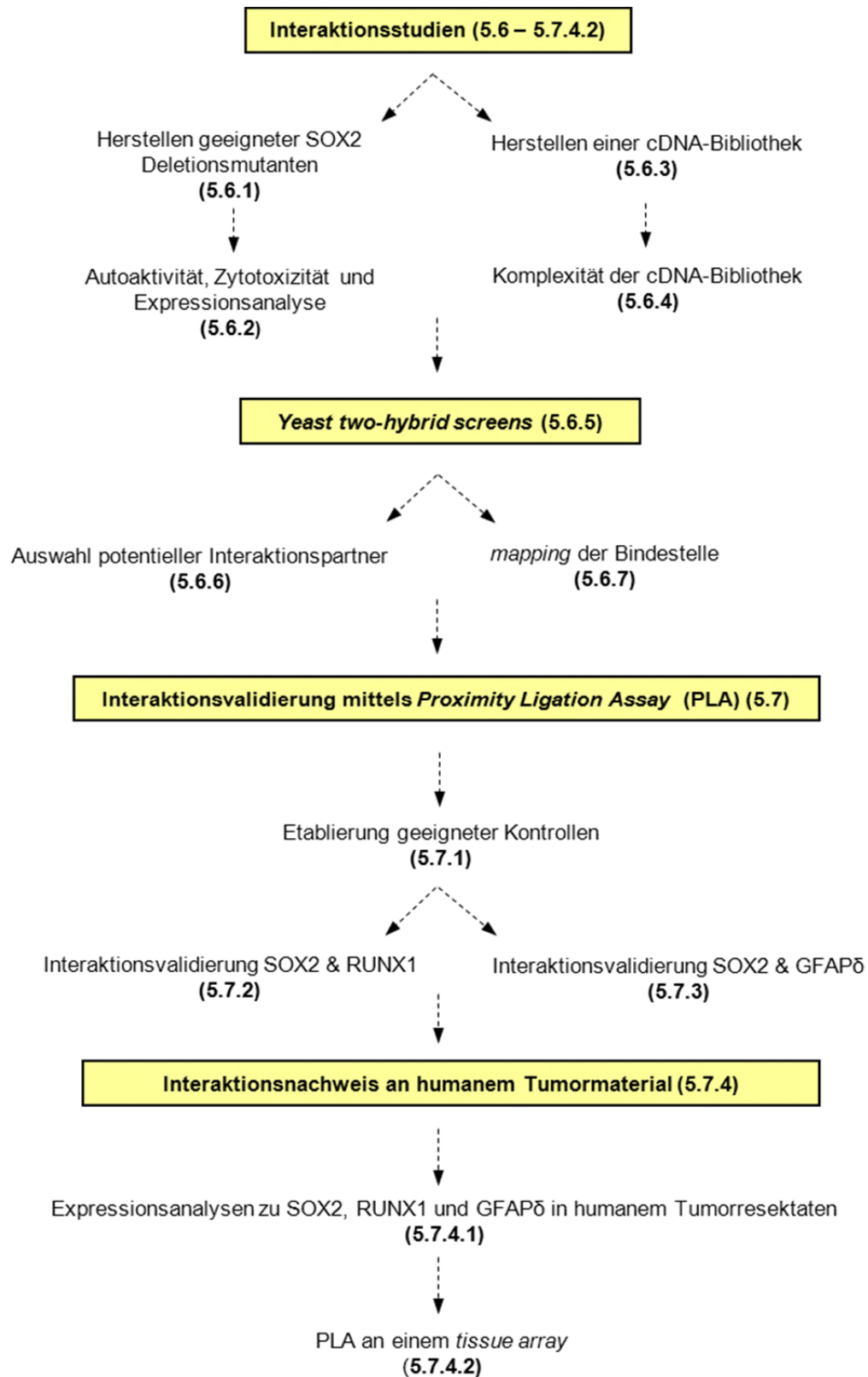
Im Anschluss an die *yeast two-hybrid* Analysen erfolgte die Validierung der Protein-Proteininteraktionen potentieller Kooperationspartner mittels des *Proximity ligation assays* (PLA). Abschließend wurden *Doppelknockdown* Experimente durchgeführt, um zu analysieren ob die funktionelle Rolle von SOX2 durch das Zusammenspiel mit den zuvor identifizierten Interaktionspartnern vermittelt wird.

Die auf den folgenden Seiten gezeigten Fließschemata geben einen Überblick der Konzeption sowie der durchgeführten Experimente der vorliegenden Arbeit.

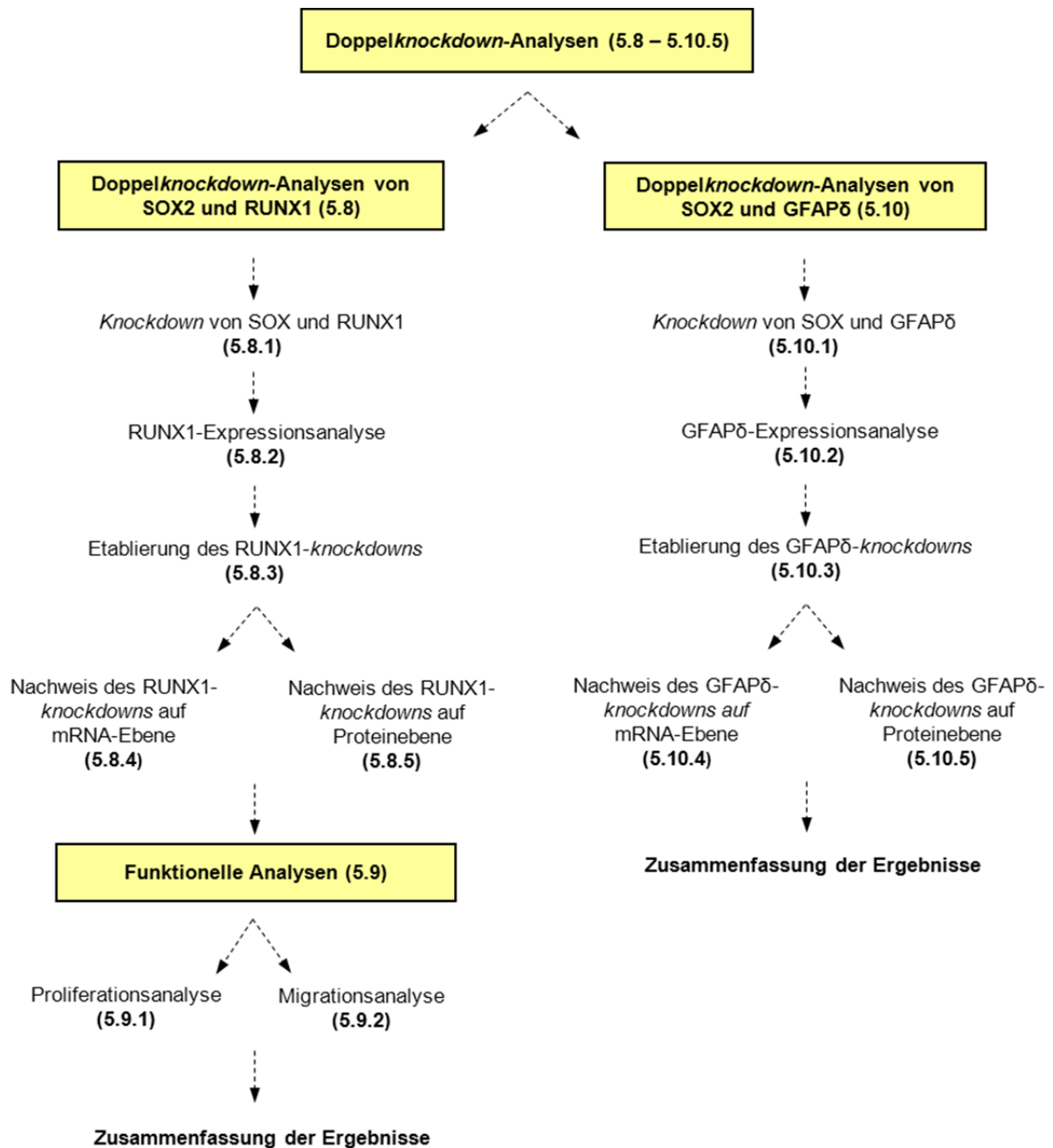
**Fließschema der Konzeption und durchgeführten Analysen dieser Studie Teil 1**



## Fließschema der Konzeption und durchgeführten Analysen dieser Studie Teil 2



**Fliessschema der Konzeption und durchgeführten Analysen dieser Studie Teil 3**



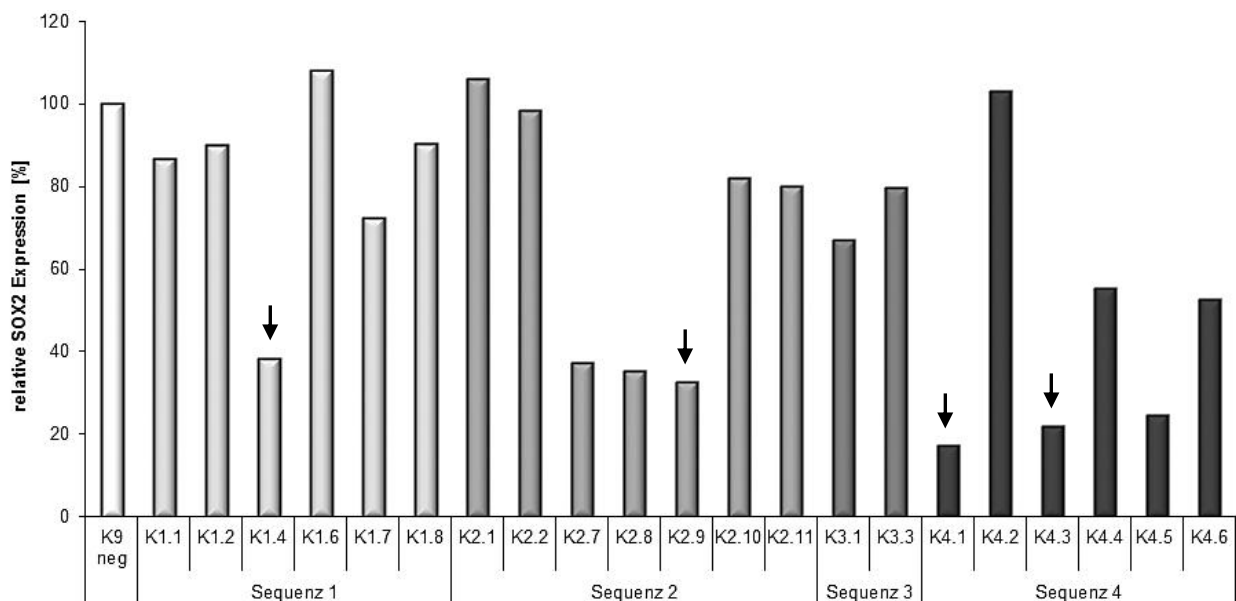
## 5.1 SOX2-knockdown

### 5.1.1 Auswahl geeigneter Klone

Ein Ziel dieser Studie war, die funktionelle Relevanz von SOX2 in Glioblastomzellen zu analysieren. Wie bereits in den Vorarbeiten (vgl. 3) erwähnt, wurde in der Zelllinie U373MG ein stabiler SOX2-knockdown etabliert. Die vorliegende Arbeit beginnt mit dem Nachweis der knockdown Effizienz sowie der Auswahl geeigneter Klone für die nach-folgenden funktionellen Analysen.

### 5.1.2 Nachweis des SOX2-knockdowns auf mRNA-Ebene

Zur Generierung des stabilen SOX2-knockdowns in der humanen Glioblastomzelllinie U373MG wurden shRNA-Vektoren mit 4 verschiedenen SOX2-spezifischen Sequenzen verwendet. Nach Selektion der zuvor gepickten Klone wurde die SOX2 Restexpression mittels quantitativer *realtime* PCR (qRT-PCR) ermittelt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse ausgewählter Klone sind in Abb. 5.1 zusammengefasst.

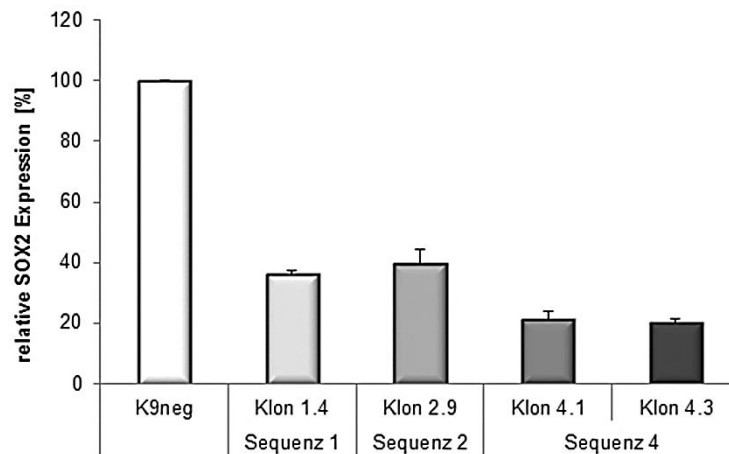


**Abb. 5.1: Analyse des stabilen SOX2-knockdowns auf mRNA-Ebene**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der relativen SOX2 Expression einiger ausgewählter Klone in der stabil transfizierten Gliomzelllinie U373MG. Die Expressionswerte beziehen sich auf Zellen, die mit einem Kontrollvektor (K9neg) transfiziert und deren Expression auf 100 % gesetzt wurde. Für den knockdown wurden 4 verschiedene SOX2 spezifische shRNA-Sequenzen verwendet. Die mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichneten Klone wurden für nachfolgende Analysen ausgewählt (K1.4, K2.9, K4.1 & K4.3). Als Kontrolle diente jeweils der Klon K9neg.

Um unspezifische Effekte der shRNA-Vektoren auszuschließen, wurden 4 verschiedene Sequenzen für den stabilen SOX2-knockdown, sowie eine nicht-bindende Sequenz als Kontrolle verwendet (Klon K9neg wurde für die weiteren Analysen immer als Kontrolle

verwendet). Wie aus Abb. 5.1 ersichtlich ist, war die *knockdown* Effizienz bei Verwendung der Sequenz 4 am Höchsten. So konnte eine SOX2 Herunterregulation von 82,9 % in Klon 4.1 (Restexpression 17,1 %) und 78,1 % in Klon 4.3 (Restexpression 21,9 %) generiert werden. Bei Verwendung von Sequenz 1 konnte nur im Klon 1.4 ein zufriedenstellender *knockdown* von 62,0 % (Restexpression 38,0 %) erreicht werden. Mit Sequenz 2 konnten drei Klone mit einer jeweiligen Restexpression von 37,1 % (Klon 2.7), 35,2 % (Klon 2.8) sowie 32,5 % (Klon 2.9) erzeugt werden. Bei Verwendung der Sequenz 3 konnten hingegen keine geeigneten Kandidaten identifiziert werden, die Restexpressionen waren mit 66,9 % im Klon 3.1 sowie 79,6 % in Klon 3.3 deutlich zu hoch, um weitere Untersuchungen durchzuführen. Aufgrund der Expressionsanalyse wurden die Klone K1.4, K2.9, K4.1 sowie K4.3, welche 3 der 4 verwendeten shRNA-Sequenzen repräsentieren, für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt. Diese Kandidaten wurden erneut auf die SOX2 Expression mittels qRT-PCR hin untersucht (vgl. Abb. 5.2).



**Abb. 5.2: Expressionsanalyse der ausgewählten SOX2 *knockdown* Klone**

Zur Bestätigung des stabilen *knockdowns* wurde die SOX2 Expression der ausgewählten Klone erneut auf mRNA-Ebene überprüft. Die Expression des Kontrollklons (K9neg) wurde auf 100 % gesetzt. Die Versuche wurden im Duplikat durchgeführt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=2).

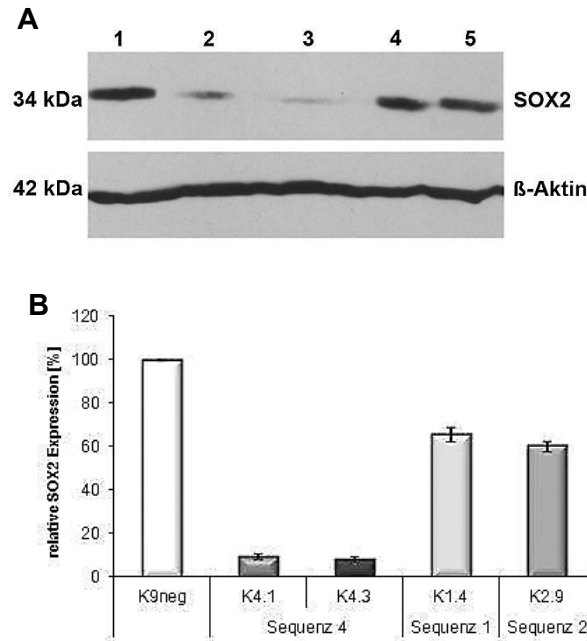
In dieser Analyse zeigte sich erneut, dass die SOX2 Expression im Vergleich zur Kontrolle (100 %) deutlich verringert war. Klon 1.4 zeigte eine Restexpression von 36,0 % ± 1,4 %. Die Restexpression des Klons 2.9 betrug 39,4 % ± 4,8 %, die von Klon 4.1 und Klon 4.3 21,1 % ± 2,9 % bzw. 19,9 % ± 1,4 %. Die Ergebnisse der vorangegangenen Expressionsuntersuchung konnten somit bestätigt werden.

### 5.1.3 Nachweis des SOX2-*knockdowns* auf Proteinebene

Die SOX2 Restexpression der einzelnen Kandidaten wurde anschließend auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft und eine relative Quantifizierung des vorhandenen Proteinlevels durchgeführt. Abb. 5.3 zeigt einen repräsentativen Western Blot der drei unabhängig



voneinander durchgeführten Experimente (**A**) sowie die densitometrische Vermessung der Blots (**B**).



**Abb. 5.3: Analyse des stabilen SOX2-knockdowns auf Proteinebene**

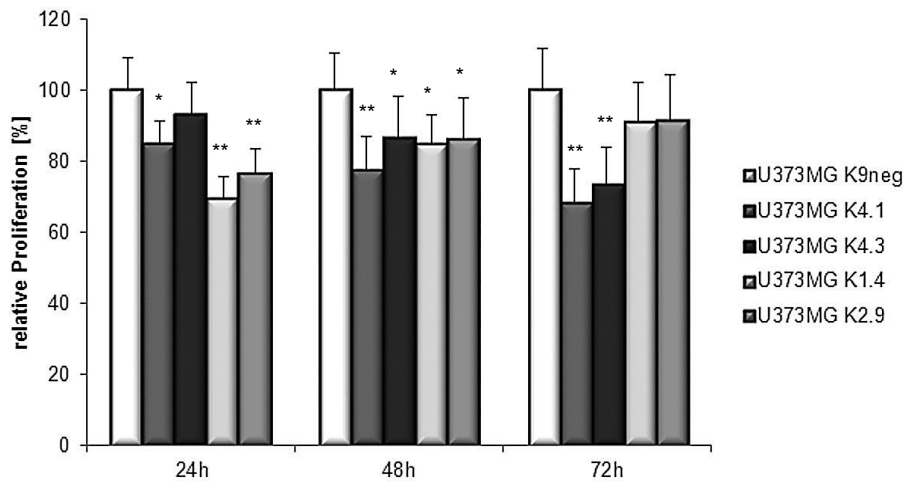
**A:** repräsentativer Western Blot der Klone K9neg (**1**), K4.1 (**2**), K4.3 (**3**), K1.4 (**4**) sowie K2.9 (**5**). Aufgetragen wurden je 50 µg Zelllysat pro Spur. Es ist eine deutliche Reduktion der SOX2 Expression auf Proteinebene zu sehen (vgl. Spuren 2 – 5 mit Spur 1). Als Auftragskontrolle wurde β-Aktin detektiert. **B:** densitometrische Vermessung der unabhängig durchgeführten Western Blot Triplikate. Die Expression wurde auf die Kontrolle K9neg (100 %) normiert. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3).

Anhand des Western Blots (**A**) ist ebenfalls eine Reduktion der SOX2 Expression auf Proteinebene in den ausgewählten *knockdown* Klonen (**2 - 5**) im Vergleich zur Kontrolle (**1**) zu sehen. Vergleichbar zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene zeigte sich die höchste *knockdown* Effizienz bei Sequenz 4 in den Klonen K4.1 (9,6 % ± 1,9 %) und K4.3 (8,1 % ± 1,4 %). Hingegen wiesen K1.4 mit 65,9 % ± 3,0 % und K2.9 mit 60,5 % ± 2,2 % eine deutlich höhere Restexpression auf Proteinebene auf (**B**), als die mRNA-Daten zunächst vermuten ließen (vgl. Abb. 5.2).

## 5.2 Funktionelle Analysen des SOX2-knockdowns

### 5.2.1 Proliferationsanalyse

Nach erfolgreicher Etablierung des stabilen SOX2-knockdowns und dessen Nachweis auf mRNA- und Proteinebene wurde nachfolgend der Einfluss auf das Verhalten der Zellen *in vitro* untersucht. Zur Analyse des Proliferationsverhaltens wurden MTT-Assays mit den Klonen K4.1 K4.3, K1.4 und K2.9 sowie dem Kontrollklon K9neg durchgeführt, welcher zur Normierung der Ergebnisse auf 100 % Proliferationsrate gesetzt wurde (vgl. Abb. 5.4).



**Abb. 5.4: Proliferationsanalyse der stabilen SOX2-knockdown Klone**

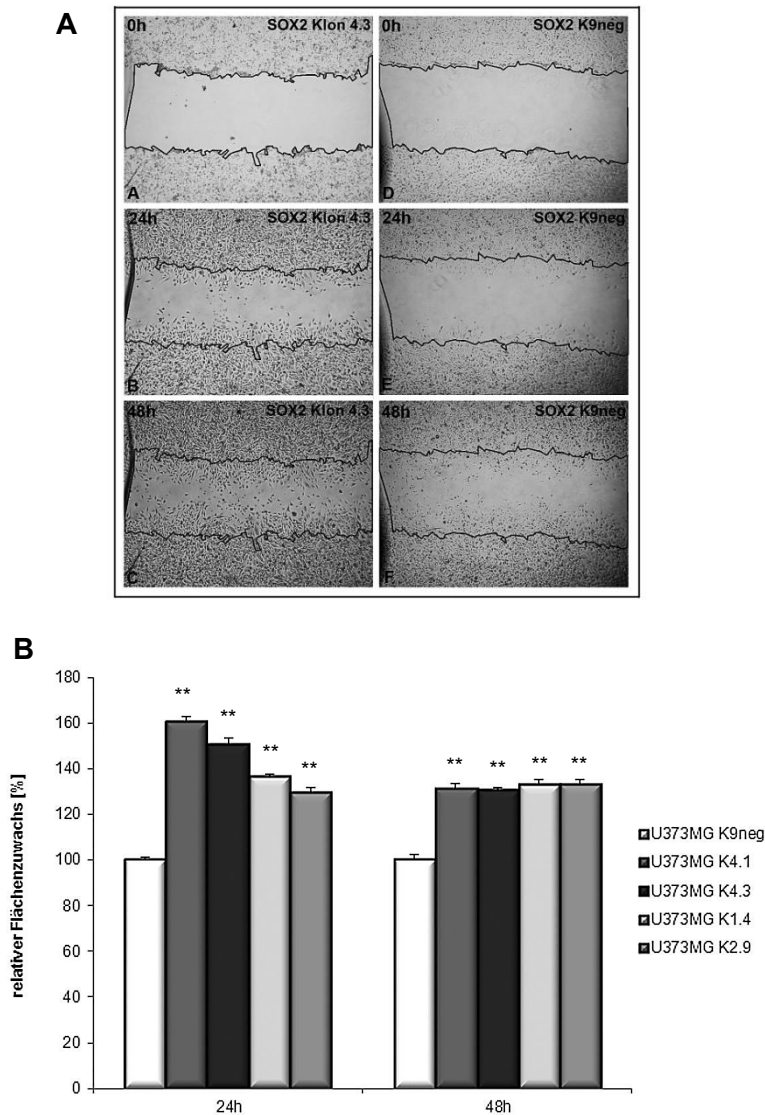
Die reduzierte SOX2 Expression zeigt, verglichen mit dem Kontrollklon K9neg (100 %), einen deutlichen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen. Mit Ausnahme von K4.3 (24 h) sowie K1.4 und K2.9 (72 h) konnte durchweg eine signifikant verringerte proliferative Aktivität in allen getesteten Klone zu allen Zeitpunkten der Messung detektiert werden. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

Mit Ausnahme des Klon 4.3 konnte bereits nach 24 h eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate in den SOX2-knockdown Klone detektiert werden, wobei Klon 1.4 und 2.9 mit 69,7 % ± 5,9 % bzw. 76,6 % ± 6,8 % den zu diesem Zeitpunkt größten Effekt, verglichen mit dem Kontrollklon, aufwiesen. Nach 48 h zeigten alle getesteten Klone eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate. Die Werte lagen für Klon 4.1 bei 77,6 % ± 9,3 %, für Klon 4.3 bei 86,8 % ± 11,5 % sowie 84,8 % ± 8,4 % und 86,1 % ± 11,7 % für Klon 1.4 bzw. Klon 2.9. Der deutlichste Effekt auf die Proliferation zeigte sich nach 72 h. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die SOX2-knockdown Klone K4.1 und K4.3 eine signifikante Reduktion der Proliferation auf 68,4 % ± 9,3 % bzw. 73,7 % ± 10,1 % auf. Wohingegen die Klone 1.4 und 2.9 nach 72 h zwar weiterhin eine reduzierte Proliferation zeigten, die verglichen mit der Kontrolle allerdings nicht mehr signifikant war.

### 5.2.2 Migrationsanalyse

Als zweiter Schritt der funktionellen Analysen des SOX2-knockdowns wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht. Für diesen Ansatz wurde der sogenannte Wundheilungsassay genutzt, bei welchem der relative Flächenzuwachs der Zellen über einen Zeitraum von 48 h gemessen wurde. Die Fläche der „Verwundung“ des Zellrasens wurde zur Normierung zum Startzeitpunkt (0 h) photographisch dokumentiert und der Zuwachs der folgenden Zeitpunkte (24 h und 48 h) auf den Startzeitpunkt normiert. Dadurch wurden Unterschiede in der Größe der Wunde beim Versuchsstart in die Berechnungen mit einbezogen. Wie schon bei den Proliferationsuntersuchungen wurde mit den SOX2-knockdown Klone K4.1, K4.3, K1.4 und K2.9 sowie dem Kontrollklon K9neg gearbeitet. In Abb. 5.5 sind exemplarisch die

Aufnahmen der Klone K4.3 und K9neg (Kontrolle) gezeigt. Zur visuellen Verdeutlichung wurde die Migrationsfront der Zellen zum Startzeitpunkt markiert und bei den folgenden Zeitpunkten ebenfalls dargestellt. Bereits nach 24 h ist ein deutlicher Unterschied in dem Migrationsverhalten sichtbar. Der Klon K4.3 (**A, B, C**) migriert zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant schneller in die Wunde als der Kontrollklon (**D, E, F**) (vgl. Abb. 5.5).



**Abb. 5.5: Migrationsanalyse der stabilen SOX2-knockdown Klone**

**A:** exemplarische Darstellung eines Wundheilungsassays des Klons K4.3 (**A, B, C**) und des Kontrollklons K9neg (**D, E, F**). Die Migrationsfront wurde zum Startzeitpunkt 0 h markiert und der Flächenzuwachs zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h gemessen. **B:** Ergebnis aller drei unabhängigen Wundheilungsassays mit den Klonen K4.1, K4.3, K1.4, K2.9 sowie K9neg (Kontrolle, 100 %). Zu allen Zeitpunkten zeigte sich für die getesteten Klone ein signifikant gesteigerter Flächenzuwachs im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3, \*p<0,05, \*\*p<0,01)

Wie aus Abb. 5.5 ersichtlich ist, zeigten alle getesteten Klone sowohl nach 24 h als auch 48 h, im Vergleich zur Kontrolle K9neg 100 % ± 1,4 % (24 h) und ± 2,3 % (48 h), einen signifikant gesteigerten Flächenzuwachs (**B**). Der Klon K4.1 wies einen Flächenzuwachs von 160,3 % ± 2,4 % (24 h) und 131,2 % ± 2,4 % (48 h) auf. Bei Klon K4.3 lagen die Werte

bei  $150,3 \% \pm 2,9 \%$  (24 h) und  $130,4 \% \pm 1,6 \%$  (48 h). Für Klon 1.4 wurden Werte von  $136,2 \% \pm 1,5 \%$  (24 h) und  $132,8 \% \pm 2,4 \%$  (48 h), sowie für Klon 2.9 von  $129,5 \% \pm 2,2 \%$  (24 h) und  $133,1 \% \pm 2,4 \%$  (48 h) gemessen.

## **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Durch die Transfektion mit 4 spezifischen shRNA-Vektoren konnten erfolgreich mehrere *SOX2-knockdown* Klone generiert werden. Diese Klone weisen eine signifikant verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen auf. Parallel konnte eine signifikant gesteigerte Migrationsgeschwindigkeit der neoplastischen Zellen beobachtet werden.

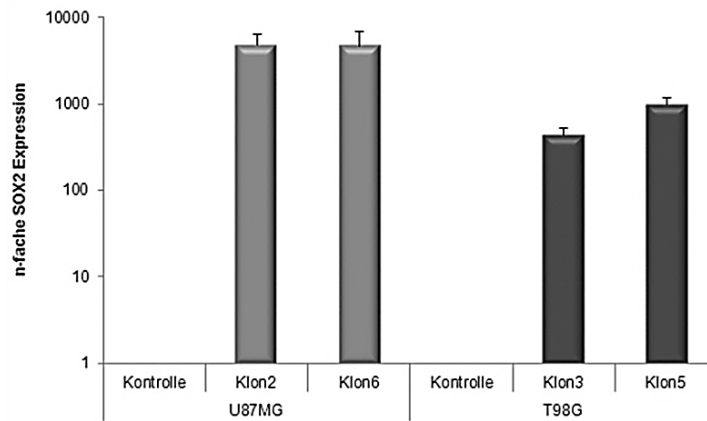
## **5.3 SOX2 Überexpression**

### **5.3.1 Auswahl geeigneter Klone**

Um die funktionelle Relevanz von SOX2 weitergehend zu charakterisieren, wurde nach *SOX2-knockdown* in der Zelllinie U373MG nachfolgend in den humanen Glioblastomzelllinien U87MG und T98G eine stabile SOX2 Überexpression generiert. Diese Zelllinien zeigten in den Voruntersuchungen eine sehr geringe bzw. keine SOX2 Expression (vgl. 3), weshalb sie für die Analysen geeignete Zelllinien darstellten. Die Überexpression wurde von der AG Prof. A. Temme (TU Dresden) durchgeführt und die Klone für diese Studie zur Verfügung gestellt (Rüther *et al.* zur Veröffentlichung eingereicht).

### **5.3.2 Nachweis der SOX2 Überexpression auf mRNA-Ebene**

Das SOX2 Expressionslevel in den humanen Glioblastomzelllinien U87MG und T98G wurde nach stabiler Transduktion (viral) zunächst mittels qRT-PCR überprüft. Um auszuschließen, dass der verwendete Vektor Einfluss auf das SOX2 Expressionslevel hatte, wurden als Kontrollen Klone verwendet, welche mit einem EGFP-Leerplasmid transduziert wurden. Von jeder Zelllinie wurden je zwei verschiedene Klone verwendet und analysiert.



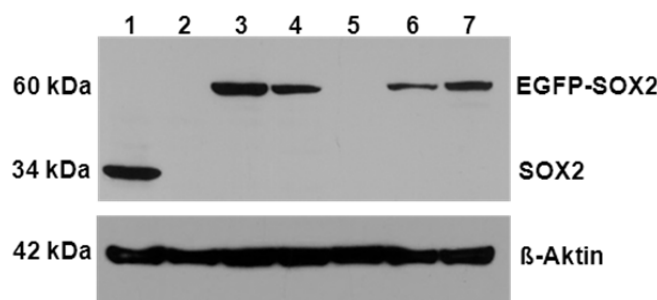
**Abb. 5.6: SOX2 Expressionsnachweis in den Zelllinien U87MG und T98G**

Logarithmische Darstellung des Ergebnisses zweier qRT-PCRs. Die Kontrollen der jeweiligen Zelllinien wurden auf 1-fache SOX2 Expression gesetzt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n = 2).

Beide Klone der Zelllinie U87MG zeigen, verglichen mit der Kontrolle (Leervektor), welche auf 1-fache Expression gesetzt wurde, eine deutlich erhöhte SOX2 Expression (Klon 2 = 4798 x ± 14 und Klon 6 = 4694 x ± 21). In der Zelllinie T98G konnte ebenfalls in beiden untersuchten Klonen mit Werten von 444 x ± 8 (Klon 3) sowie 973 x ± 6 (Klon 5) eine gesteigerte SOX2 Expression nachgewiesen werden.

### 5.3.3 Nachweis der SOX2 Überexpression auf Proteinebene

Für den Nachweis der SOX2 Expression auf Proteinebene wurde der Western Blot genutzt (vgl. Abb. 5.7).



**Abb. 5.7: Westernblotanalyse zur SOX2 Expression in den Glioblastomzelllinien U87MG und T98G**

Aufgetragen wurden 50 µg Zellysat je Spur. Als Positivkontrolle wurde endogenes SOX2 in U373MG Zellysat detektiert (1). 2: U87MG Kontrolle. 3: U87MG EGFP-SOX2 Klon 2. 4: U87MG EGFP-SOX2 Klon 6. 5: T98G Kontrolle. 6: T98G EGFP-SOX2 Klon 3. 7: T98G EGFP-SOX2 Klon 5. Als Ladekontrolle wurde endogenes β-Aktin detektiert. Die Expositionszeit für den SOX2 Nachweis betrug 15 min. Für den Aktinnachweis wurde 1 min exponiert (repräsentativer Blot, n=3).

Wie aus Abb. 5.7 ersichtlich ist, zeigten sowohl U87MG EGFP-SOX2 Klon 2 (3) und Klon 6 (4) als auch T98G Klon 3 (6) und Klon 5 (7) eine distinkte Bande bei 60 kDa, der zu erwartenden Größe des Fusionsproteins EGFP-SOX2. Wohingegen der mit dem Leervektor transfizierte U87MG Kontrollklon (2) sowie T98G Kontrollklon (5) kein Signal zeigten. Als Positivkontrolle wurde endogenes SOX2 in U373MG Zellysat detektiert (1). Als Lade-

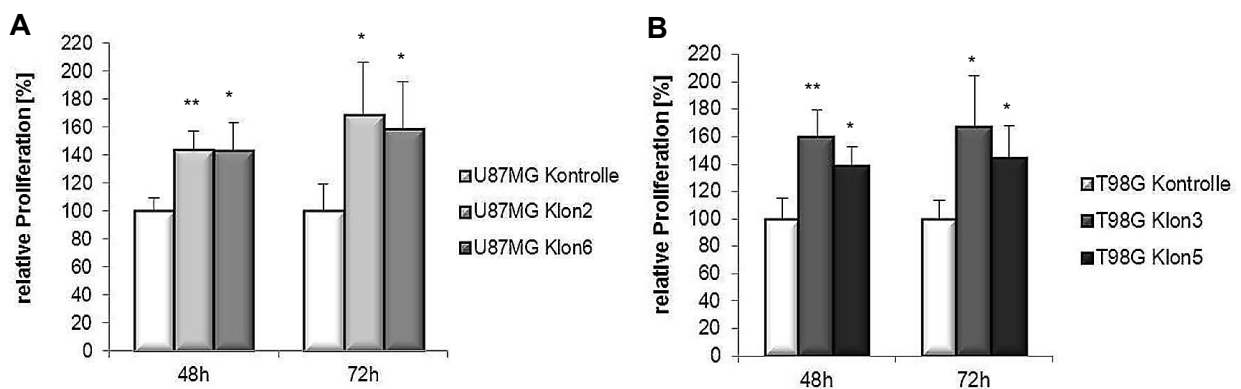
kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen (untere Darstellung Abb. 5.7). Die distinkte Bande bei 42 kDa zeigt den gleichmäßigen Proteinauftrag in allen Spuren. U87MG Klon 2 und T98G Klon 5 zeigen eine vergleichbare SOX2 Expressionsstärke wie die U373MG Zellen in denen der stabile SOX2-*knockdown* etabliert wurde (vgl. 5.1 ff.). U87MG Klon 6 und T98G Klon 3 weisen eine etwas schwächere EGFP-SOX2-Expression auf. Die Proteinexpression spiegelt jedoch in etwa die erhobenen Daten auf mRNA-Ebene wider (vgl. Abb. 5.6).

## 5.4 Funktionelle Analysen der SOX2 Überexpression

Wie zuvor bei dem stabilen SOX2-*knockdown* in U373MG-Zellen wurde nach erfolgreicher Bestätigung der SOX2 Überexpression in den Zelllinien U87MG und T98G das Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen analysiert.

### 5.4.1 Proliferationsanalyse

Die Analyse des Proliferationsverhaltens der Zelllinien U87MG und T98G mit modifizierter SOX2 Expression wurde erneut mittels MTT-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Klone U87MG Kontrolle, U87MG Klon 2 & 6, T98G Kontrolle, T98G Klon 3 & 5 verwendet. Alle Versuche wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt und je Versuch ein 12facher Ansatz eines jeden Klon verwendet.



**Abb. 5.8: Proliferationsanalyse der stabilen EGFP-SOX2-Überexpressionsklone**

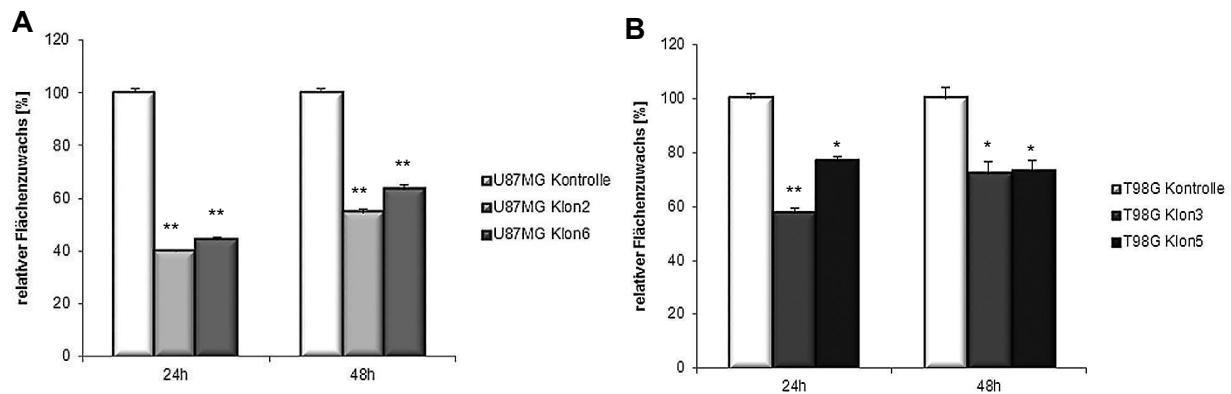
Die Proliferationsanalyse zeigte einen deutlichen Einfluss der erhöhten SOX2 Expression auf die Zellproliferation. Zu beiden untersuchten Zeitpunkten (48 h und 72 h) zeigten, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (100 %), sowohl die Klone der Zelllinie U87MG (A), als auch die Klone der Zelllinie T98G (B) eine signifikant gesteigerte Proliferation. Der Versuch wurde in unabhängigen Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

Die Proliferationsanalyse der SOX2 Überexpressionsklone zeigte eine signifikante Steigerung der Zellteilung zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Die Zelllinie U87MG zeigte dabei eine gesteigerte Proliferationsrate des Klons 2 von 144,1 % ± 13,1 % (48 h) und 168,5 % ± 37,5 % (72 h). Ein ähnliches Ergebnis lag für den Klon 6 dieser Zelllinie vor. Hier ist die

Proliferationsrate bei  $143,0 \% \pm 20,3 \%$  (48 h) sowie  $158,7 \% \pm 34,0 \%$  (72 h). Die T98G-Zellen wiesen ebenfalls eine signifikant gesteigerte Proliferation auf. Bei Klon 3 lag die Proliferation nach 48 h bei  $159,6 \% \pm 20,1 \%$  und nach 72 h bei  $167,4 \% \pm 37,4 \%$ . Klon 5 weist eine Zellteilungsrate von  $138,9 \% \pm 13,9 \%$  (48 h) und  $144,7 \% \pm 23,6 \%$  im Vergleich zur Kontrolle auf, welche in allen Fällen auf 100 % gesetzt wurde.

### 5.4.2 Migrationsanalyse

Analog zu den *knockdown* Klonen wurde bei den SOX2 Überexpressionsklonen das Migrationsverhalten mittels des Wundheilungsassays untersucht. Es wurden beide transduzierten Zelllinien und jeweils zwei Klone auf eine Veränderung der Migrationseigenschaften (in Vergleich zum Kontrollklon, 100 %) hin überprüft.



**Abb. 5.9: Analyse des Migrationsverhaltens der SOX2 Überexpressionsklone**

Bei der Migrationsanalyse konnte ein signifikant verringertes Migrationspotential der SOX2 Überexpressionsklone beider Zelllinien (**A**: U87MG, **B**: T98G) zu allen gemessenen Zeitpunkten (24 h und 48 h) im Vergleich zur Kontrolle (100 %) beobachtet werden. Die Wundheilungsassays wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gemessen wurde jeweils der relative Flächenzuwachs. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3; \*p< 0,05, \*\*p<0,01).

Bei der Analyse der Migrationseigenschaften der Zellen mit einer gesteigerten SOX2 Expression zeigte sich, dass die Erhöhung der Expression zu einer signifikanten Verringerung der Migration der Zellen führt. Der Effekt ist bei der Zelllinie U87MG ausgeprägter als bei der Zelllinie T98G. Nach 24 h zeigte sich ein Flächenzuwachs von  $40,0 \% \pm 0,6 \%$  für den Klon 2 und  $44,3 \% \pm 1,2 \%$  für den Klon 6 der U87MG-Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \% \pm 1,4 \%$ ). 48 h nach Versuchsstart lag der Flächenzuwachs des Klons 2 bei  $54,7 \% \pm 1,3 \%$  und für Klon 6 bei  $63,4 \% \pm 1,6 \%$  (Kontrolle  $100 \% \pm 1,4 \%$ ). Die Zelllinie T98G weist einen im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \% \pm 1,7 \%$  nach 24 h und  $\pm 4,0 \%$  nach 48 h) ebenfalls signifikant geringeren Flächenzuwachs von  $57,7 \% \pm 1,5 \%$  (24 h) und  $72,3 \% \pm 4,4 \%$  (48 h) bei Klon 3 und  $76,7 \% \pm 1,8 \%$  (24 h) und  $73,1 \% \pm 4,2 \%$  (48 h) bei Klon 5 auf.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die AG Prof. A. Temme (TU Dresden) wurden stabil exprimierende EGFP-SOX2 Klone der Zelllinien U87MG und T98G generiert. Die Expression des Transkriptionsfaktors wurde mittels qRT-PCR und Western Blot-Analysen überprüft und nachgewiesen. Die ektopische SOX2 Expression in den defizienten Zelllinien führte zu einer signifikant gesteigerten Proliferation gepaart mit einem reduzierten Migrationsverhalten der Zellen *in vitro*. Vor dem Hintergrund der SOX2-*knockdown* Daten legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass SOX2 die Proliferation und Migration von Glioblastomzelllinien diametral zu regulieren scheint.

## 5.5 *In vivo* Analysen

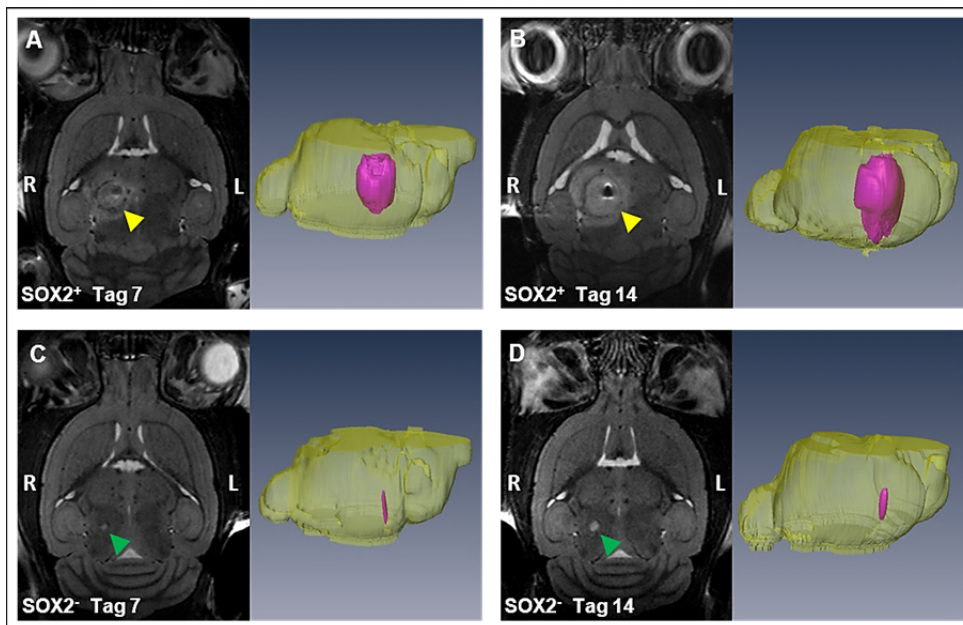
### 5.5.1 Implantation der modifizierten U87MG-Zellen in *NOD/SCID* Mäuse

Um die *in vitro* beobachteten, SOX2-abhängigen Proliferations- und Migrationseffekte *in vivo* zu überprüfen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen des U87MG-EGFP-SOX2 Klon 2 sowie  $5 \times 10^5$  U87MG-EGFP-Kontrollzellen in immunsupprimierte *NOD/SCID*-Mäuse mittels eines stereotaktischen Rahmens in das rechte Striatum (Stammganglien) der Versuchstiere implantiert (vgl. 4.4.1). Eine Applikation der modifizierten U373MG-Zellen, welche einen stabilen SOX2-*knockdown* aufwiesen war nicht möglich, da diese Zelllinie in dem verwendeten Mausstamm keinen Tumor erzeugte.

### 5.5.2 MRT-Messungen

Es wurden je 5 Tiere operiert und der zeitliche Verlauf des Tumorwachstums 7 bzw. 14 Tage nach der Operation mittels MRT-Messungen dokumentiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind für je ein Versuchstier exemplarisch in Abb. 5.10 dargestellt.





**Abb. 5.10: T<sub>2</sub>-gewichtete MRT-Bildgebung zweier implantierter Mäuse, 7 und 14 Tage nach der Operation**  
 Dargestellt ist die MRT-Bildgebung je eines Tieres, welches mit  $5 \times 10^5$  U87MG-EGFP-SOX2 Klon 2 exprimierenden Zellen (**A + B**) bzw. U87MG-EGFP-Kontrollzellen (**C + D**) implantiert wurde sowie die dazugehörige 3D-Rekonstruktion des Mausgehirns und Tumolvolumens zu den jeweiligen Messpunkten (jeweils die rechten Bildareale). Gemessen wurde 7 bzw. 14 Tage nach der Implantation der Zellen, um den zeitlichen Verlauf des Tumorwachstums *in vivo* zu dokumentieren und charakterisieren. Der entstandene Tumor ist sowohl mittels MRT (gelbe und grüne Pfeilspitzen) als auch in der 3D-Berechnung (violett) deutlich zu erkennen. (Kooperation mit AG Prof. Dr. K. Faber, Institut für klinische Radiologie, UKM).

In Abb. 5.10 sind exemplarisch die MRT-Messungen eines Tieres (Tier Nr. 651), welchem  $5 \times 10^5$  U87MG-EGFP-SOX2 (Klon 2) Zellen implantiert wurden (SOX2<sup>+</sup>, **A + B**), sowie einer Maus der dieselbe Anzahl U87MG-EGFP-Kontrollzellen appliziert wurden (Tier Nr. 658) (SOX2<sup>-</sup>, **C + D**) dargestellt. Wie bereits nach 7 Tagen mittels T<sub>2</sub>-gewichteter Bildgebung des MRTs zu sehen war, zeichnet sich die kontraststarke Tumorregion deutlich vom umliegenden Hirnparenchym ab. Zudem ist ersichtlich, dass der entstandene Tumor der SOX2<sup>+</sup>-Tiere deutlich größer war als der, der SOX2<sup>-</sup>-Tiere (**A + C**). Ferner wiesen die SOX2<sup>+</sup>-Tumoren hämorrhagische Läsionen auf (**A**, gelbe Pfeilspitze). Dieser periphere, kontrastärmere „Ring“ schloss den zentral gelegenen sehr kontraststarken Kerntumor weitgehend ein und lässt auf einen prägnanten Unterschied in der Tumorzellichte schließen. Hingegen konnte bei keinem der SOX2<sup>-</sup>-Tumoren eine derartige Gewebsveränderung beobachtet werden (**C + D**). Noch deutlicher ist der Unterschied der Tumolvolumina in der 3D-Approximation des Mausgehirns ersichtlich (jeweils rechter Bildabschnitt, violett). Diese Divergenz zeigte sich ebenso 14 Tage nach der Implantation der Zellen. Der Tumor der SOX2<sup>+</sup>-Tiere (**B**, gelber Pfeil) wuchs wesentlich schneller, als der Tumor der SOX2<sup>-</sup>-Tiere (**D**, grüner Pfeil). Das Volumen des SOX2<sup>+</sup>-Tumors war 14 Tage nach der OP ebenfalls deutlich höher als das der Kontrollen (SOX2<sup>-</sup>). Das Volumen der Tumoren wurde nach 7 bzw. 14 Tagen von allen implantierten Tieren vermessen und ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

**Tab. 5.1: Volumina [mm<sup>3</sup>] der durch die implantierten U87MG-Zellen entstandenen Tumoren**

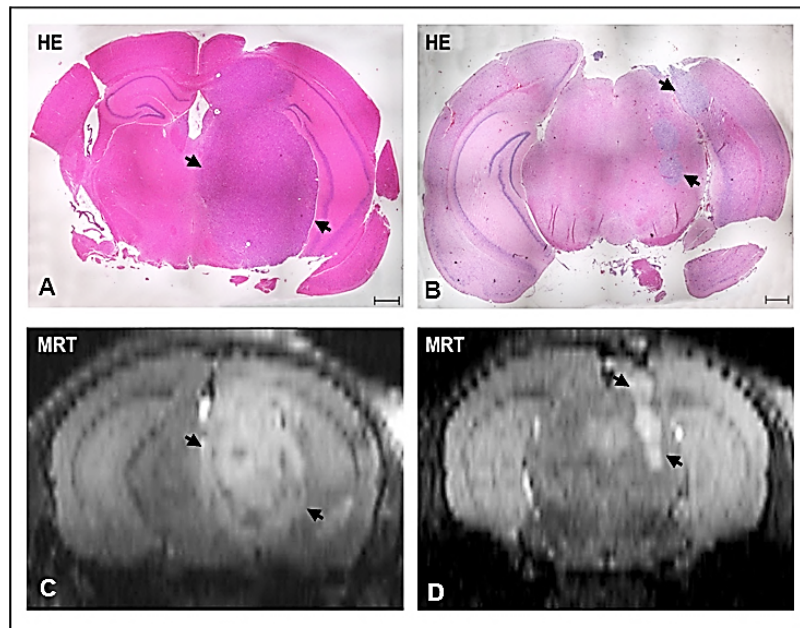
Gemessen wurde das Gesamtvolumen der entstandenen Tumoren 7 bzw. 14 Tage nach der Implantation der modifizierten Zellklone. Mit Ausnahme des U87MG-EGFP-SOX2 Klon2 an Tag 14 (4 Tiere) wurden an beiden Messzeitpunkten von jeder Gruppe jeweils 5 Tiere vermessen. (Kooperation mit AG Prof. Dr. K. Faber, Institut für klinische Radiologie, UKM) (\*p ≤ 0,02, \*\*p ≤ 0,005).

	Tag 7*	Tag14**
U87MG-EGFP-SOX2 Klon 2	9,81 ± 6,75 mm <sup>3</sup>	22,17 ± 11,97 mm <sup>3</sup>
U87MG-EGFP-Kontrolle	0,54 ± 0,36 mm <sup>3</sup>	1,21 ± 0,40 mm <sup>3</sup>

Tab. 5.1 zeigt die Ergebnisse der Vermessung des Tumorumfanges der durch die implantierten U87MG-Zellen entstandenen Tumoren, 7 bzw. 14 Tage nach der Operation. Die MRT-Messungen sowie volumetrischen Berechnungen der Neoplasien wurden in Kooperation mit der klinischen Radiologie des UKM (AG Prof. Dr. K. Faber) durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils 5 Tiere vermessen (Ausnahme: U87MG-EGFP-SOX2 Klon 2 Tag 14 = 4 Tiere). Wie der Tabelle zu entnehmen ist, waren die Tumorumfänge sowohl nach 7 als auch 14 Tagen zwischen den beiden Gruppen (SOX2<sup>+</sup> und SOX2<sup>-</sup>) signifikant unterschiedlich. Die Tiere, welche die U87MG-EGFP-SOX2 Klon 2 Zellen implantiert bekamen zeigten nach 7 Tagen im Mittel mit 9,81 ± 6,75 mm<sup>3</sup> ein signifikant größeres Tumorumfang als die Tiere, welche die Kontrollzellen erhalten hatten. Diese Tumoren maßen lediglich 0,54 ± 0,36 mm<sup>3</sup>. Dieser Unterschied war nach 14 Tagen noch deutlicher ausgeprägt. Die SOX2 positiven Tumoren maßen 22,17 ± 11,97 mm<sup>3</sup>, die Tumoren der SOX2 negativen Zellen waren nur 1,21 ± 0,40 mm<sup>3</sup> groß. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die SOX2 exprimierenden Zellen (Klon 2) ähnlich den Beobachtungen *in vitro*, ebenso *in vivo* eine deutlich höhere Proliferationsrate aufweisen.

### 5.5.3 Histologische Korrelation

Nach der zweiten MRT-Messung, 14 Tage nach Implantation der Zellen, wurden die Gehirne der Mäuse entnommen, fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5 µm dünne Präparate koronar geschnitten. Anschließend wurden an den Schnitten verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Abb. 5.11 sowie 5.12 geben einen Überblick der zu den MRT-Messungen gehörenden histologischen Korrelate.



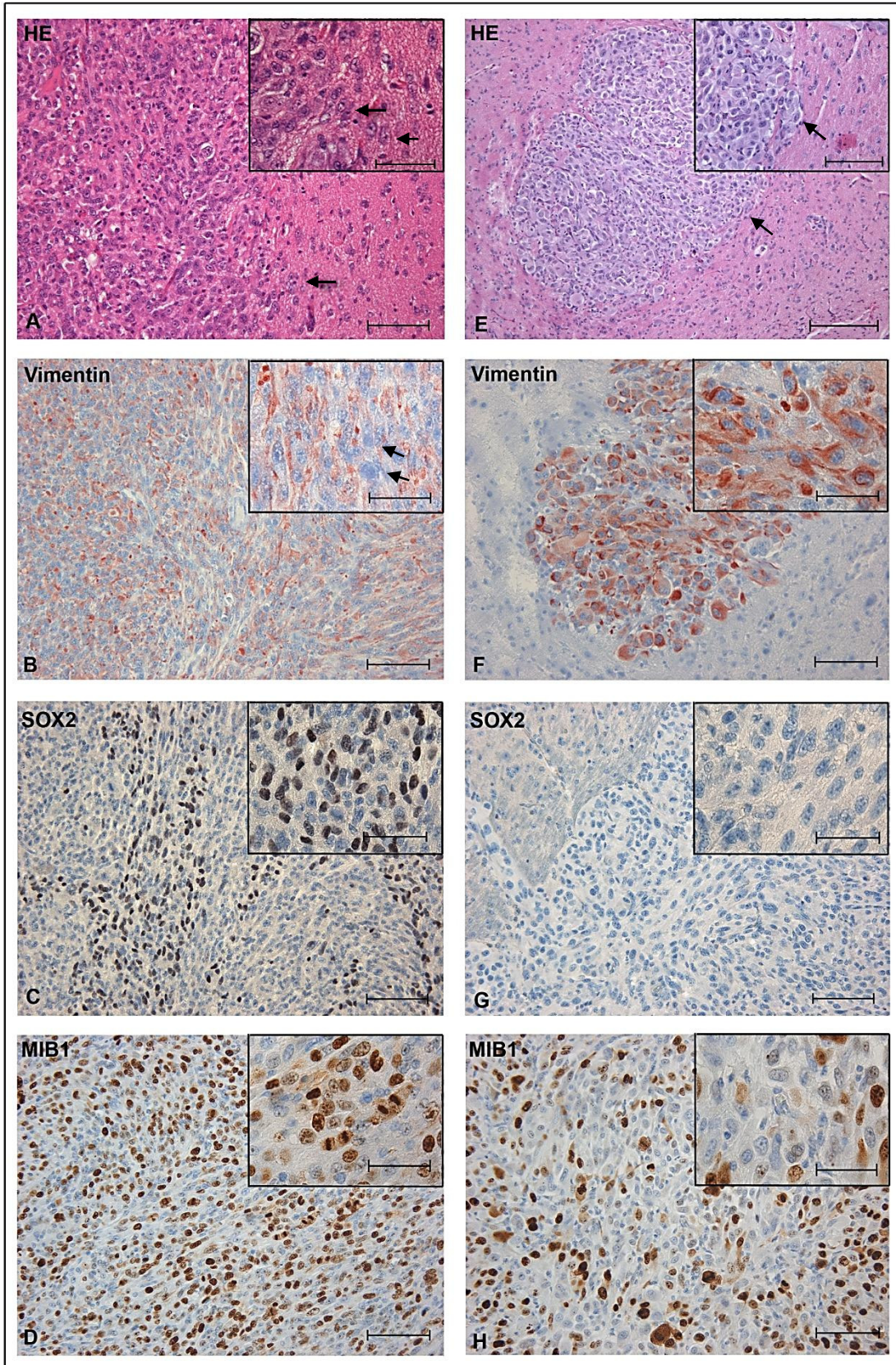
**Abb. 5.11: Korrelation der HE-Färbung der Mausgehirne mit den MRT-Messdaten**

Dargestellt ist eine Übersicht der HE-Färbung eines Mausgehirns, welchem SOX2<sup>+</sup>-Zellen implantiert wurden (Tier 651, **A**) sowie eines Gehirns, dem SOX2<sup>-</sup>-Zellen appliziert wurden (Tier 658, **B**). Die Schwarzen Pfeile zeigen die scharfe Abgrenzung des Tumors zum umliegenden, unauffälligen Mausgehirn. Messbalken entsprechen 50  $\mu\text{m}$ . **C** und **D** entsprechen der 3D-Kalkulation der MRT-Messungen in koronarer Ebene (Kooperation mit AG Prof. Dr. K. Faber, Institut für klinische Radiologie, UKM).

Wie in Abb. 5.11 deutlich zu sehen ist, konnten die MRT-Messdaten histologisch bestätigt werden. Der SOX2<sup>+</sup>-Tumor (**A**) ist auch hier wesentlich größer, als der, welcher durch die Implantation der SOX2<sup>-</sup>-Zellen entstanden ist (**B**). Die HE-Färbungen stimmen zudem mit der koronaren 3D-Approximation der MRT-Messdaten überein (vgl. **A + C** sowie **B + D**). Darüber hinaus ist auffällig, dass makroskopisch die Tumorregion und das umliegende Hirngewebe in beiden Fällen, unabhängig des SOX2 Expressionsstatus der implantierten Zellen, scharf abgegrenzt sind (schwarze Pfeile **A + B**). Für die Zelllinie U87MG ist bereits beschrieben worden, dass diese *in vivo* keinen infiltrativen Phänotyp zeigt (de Vries *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2011). Das *in vivo* Wachstumsmuster der U87MG-Zellen ist demnach für maligne Neoplasien des WHO-Grades IV eher untypisch, da eines der Kardinalmerkmale von Glioblastomen die diffuse Infiltration einzelner Zellen in das umgebene Hirnparenchym darstellt (vgl. 1.4). Aufgrund der Histologie der Tumoren liegt die Vermutung nahe, dass eine SOX2 Expression, den charakteristischen infiltrativen Phänotyp der Glioblastomzellen *in vivo* nicht wiederherstellt.

Um die Tumoren detaillierter zu charakterisieren wurden anschließend diverse immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zum einen sollte bestimmt werden, ob die Neoplasien ausschließlich aus den implantierten humanen U87MG-Zellen bestehen, zum anderen sollte das differentielle, SOX2-abhängige Wachstumsmuster genauer typisiert werden (vgl. Abb. 5.12).

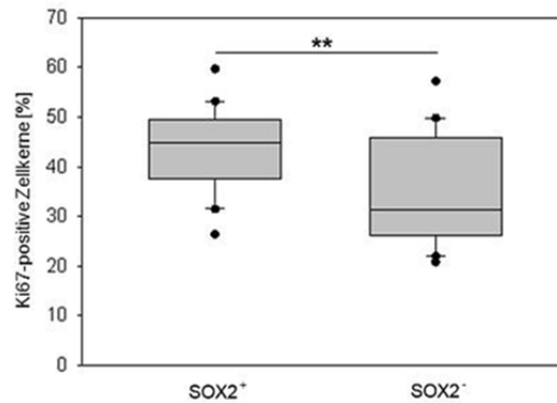




**Abb. 5.12: Histologische Färbung der Mausgehirne 14 Tage nach der Implantation der U87MG-Zellen**  
 Exemplarisch sind verschiedene Färbungen eines koronar geschnittenen Mausgehirns mit SOX2<sup>+</sup>-Zellen (**A - D**, Tier Nr.651) sowie eines SOX2<sup>-</sup>Gehirns (**E - H**, Tier 658) dargestellt. Gezeigt ist je eine Aufnahme in 20facher sowie 40facher Vergrößerung (kleiner Kasten). Messbalken entsprechen 100 bzw. 50 µm. **A + E**: Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung. **B + F**: Vimentinfärbung mit einem spezifischen Antikörper (Klon V9) welcher humanes, nicht aber mauseigenes Vimentin detektiert (1:100). **C + G**: Nachweis von humanem SOX2 (1:100). **D + H**: Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 mittels MIB1 Antikörper (1:100).

Wie in Abb. 5.12 zu sehen ist, wurden verschiedene histologische Nachweise an den Tumorpräparaten durchgeführt. Die Vergrößerungen entsprechen 20x bzw. 40x (umrandeter Kasten). **A – D** zeigen jeweils die Färbungen des SOX2<sup>+</sup>, **E – H** die des SOX2<sup>-</sup>-Tumors. In **A** und **E** ist nochmals die HE-Färbung gezeigt. Die Zellkerne sind blau-violett (Hämatoxylin), das Zytoplasma rosa-rötlich (Eosin) gefärbt. Deutlich zu erkennen ist die bereits erwähnte scharfe Abgrenzung zum umliegenden Hirngewebe (schwarze Pfeile, **E**). Mikroskopisch scheint das Gewebe des SOX2<sup>+</sup>-Tumors jedoch etwas „aufgelockerter“ zu sein, als der SOX2<sup>-</sup>-Tumor. Einzelne maligne Zellen beginnen in das umliegende Hirngewebe zu wachsen (schwarze Pfeile, **A**) wodurch der Tumorrand nicht so scharf abgegrenzt wirkt wie bei der SOX2<sup>-</sup>-Neoplasie. Die SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellfront scheint die umliegenden, hirneigenen Zellen vor sich „herzuschieben“, sodass das Gewebe etwas aufgetriebener wirkt. Zudem ist ersichtlich, dass die Zellen des SOX2<sup>-</sup>-Tumors gemästeter wirken (**E**), als die des SOX2<sup>+</sup>-Tumors (**A**), welcher morphologisch kleinere Zellen aufweist und wesentlich zellreicher erscheint. **B** und **F** zeigen den Nachweis humanen Vimentins, welcher mit einem spezifischen Antikörper durchgeführt wurde, der humanes, nicht aber murines Vimentin detektiert. Wie deutlich zu erkennen ist, besteht der SOX2<sup>-</sup>-Tumor ausschließlich aus Vimentin-positiven U87MG-Zellen (**F**), wohingegen innerhalb des SOX2<sup>+</sup>-Tumors auch Vimentin-negative Zellen vorhanden sind (**B**, schwarze Pfeile). Dies lässt darauf schließen, dass die SOX2<sup>+</sup>-Zellen ein anderes Wachstumsmuster aufweisen als die SOX2<sup>-</sup>-Zellen. Zudem wird hier deutlich, dass die Zellmorphologie zwischen SOX2<sup>+</sup> und SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellen prägnant unterschiedlich ist. In **C** und **G** wurde humanes SOX2 nachgewiesen. Wie zu erwarten war, zeigen die Zellen des SOX2<sup>+</sup>-Tumors ein distinktes Signal (**C**, braun-schwarze Kernfärbung) wohingegen die Zellkerne des SOX2<sup>-</sup>-Tumors kein Signal zeigen (**G**). Auffällig ist allerdings, dass nicht alle Zellen des Tumors SOX2 positiv sind. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die SOX2 Expression *in vivo* von den Tumorzellen „bedarfsabhängig“ modifiziert werden kann. Wenn die Zelle sich teilt wird SOX2 exprimiert, stoppt hingegen die proliferative Aktivität, wird die SOX2 Expression möglicherweise abgeschaltet. **D** und **H** zeigen einen repräsentativen Ausschnitt des Nachweises des Proliferationsmarkers Ki67 mittels des MIB1-Antikörpers. Wie zu erkennen ist, weist der SOX2<sup>+</sup>-Tumor deutlich mehr Ki67-positive Zellkerne auf, als der SOX2<sup>-</sup>-Tumor. Um diese Hypothese statistisch zu stützen wurden die Ki67-positiven Zellkerne aller implantierten Tiere beider Gruppen anschließend ausgezählt (vgl. Abb. 5.13).



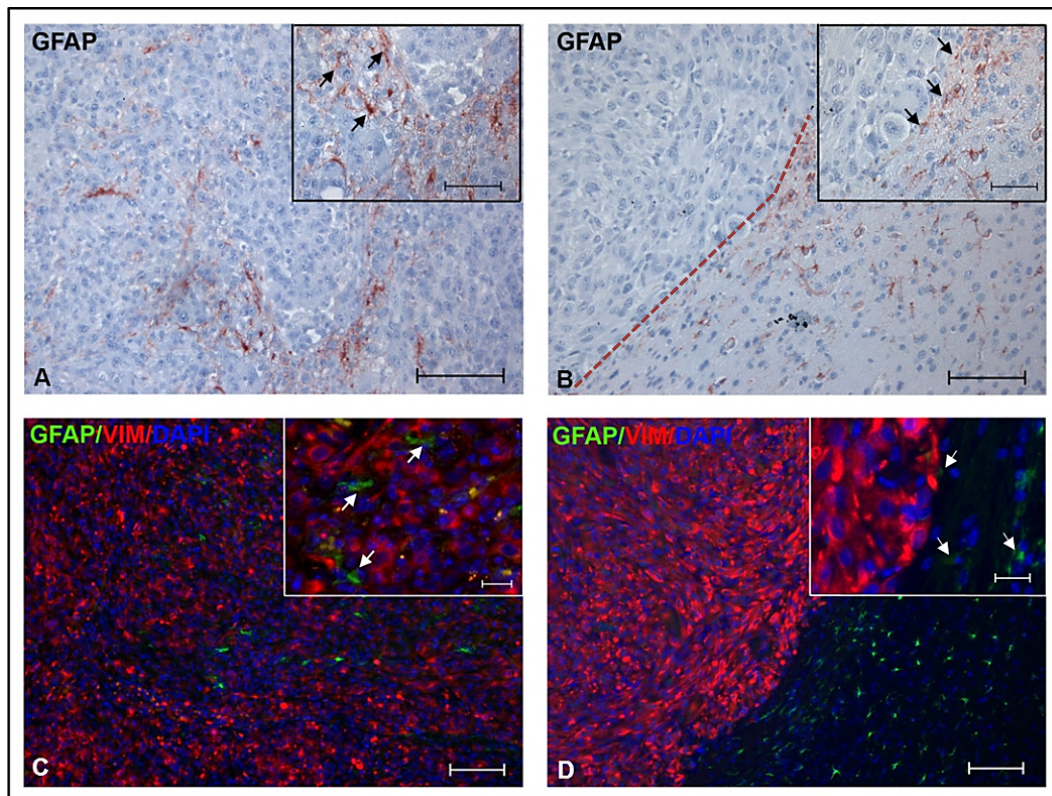


**Abb. 5.13: Auszählung der Ki67-positiven Zellkerne der SOX2<sup>+</sup>- und SOX2<sup>-</sup>-Tumoren**

Ausgezählt wurden mittels einer 100 Quadrate beinhaltenden Zählmatrix je 4 repräsentative Stellen der Tumoren aller 5 Tiere beider Gruppen (SOX2<sup>+</sup> und SOX2<sup>-</sup>). Die Anzahl Ki67-positiver Zellen wurde auf die Gesamtzellzahl normiert. Dargestellt sind prozentual die Ki67-positiven Zellkerne. (n=3, \*\*p ≤ 0,005). (Auszählungen wurden zusammen mit S. Reuter, Institut für Neuropathologie, durchgeführt.)

Abb. 5.13 zeigt die Auszählung der Ki67-positiven Zellkerne aller implantierten Tiere beider Gruppen (SOX2<sup>+</sup> und SOX2<sup>-</sup>). Ausgezählt wurden pro Tier vier repräsentative Bereiche des Tumors mittels eines Zählquadrates. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, gab es einen signifikanten Unterschied in der Anzahl proliferativer Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl zwischen SOX2<sup>+</sup>-Tumoren und SOX2<sup>-</sup>-Tumoren. Die SOX2<sup>+</sup>-Tumoren wiesen mit 44,8 % ± 8,3 % signifikant mehr Ki67-positive Zellen auf als die SOX2<sup>-</sup>-Tumoren mit 34,5 % ± 10,9 %. Somit ist nahezu die Hälfte aller SOX2<sup>+</sup>-Tumorzellen proliferativ aktiv, bei den SOX2<sup>-</sup>-Zellen lediglich ein Drittel. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren darstellen.

Um zu überprüfen, ob die Vimentin-negativen Zellen des SOX2<sup>+</sup>-Tumors (Abb. 5.12 B) die applizierten neoplastischen Zellen waren oder es sich um ortsständige, maushirneigene Zellen handelte, wurde eine GFAP Immunhistologie durchgeführt. Die implantierten U87MG-Zellen sind *in vitro* GFAP negativ. Jedoch wird postuliert, dass SOX2 GFAP regulieren kann und diverse SOX2 positive Tumorentitäten, abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen, ebenfalls GFAP koexprimieren (Cavallaro *et al.*, 2008; Phi *et al.*, 2008). Um dies im vorliegenden Fall zu evaluieren, wurde eine Vimentin/GFAP Doppelfärbung an den koronaren Präparaten durchgeführt (vgl. Abb. 5.14).



**Abb. 5.14: Histologische GFAP-Färbung und Vimentin/GFAP-Doppelimmunfluoreszenz zweier Maus-hirntumorpräparate**

Dargestellt sind die GFAP-Histologie sowie Vimentin/GFAP Doppelfluoreszenz eines SOX2<sup>+</sup>-Tumors (**A + C**, Versuchstier 649) sowie eines SOX2<sup>-</sup>-Tumors (**B + D**, Versuchstier 658). Die rote, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen neoplastischem Gewebe (oberhalb der Grenze) und unauffälligem Hirngewebe der Maus (unterhalb der Grenze). Vergrößerung entspricht in **A + B** 20x bzw. 40x (umrandeter Kasten). Vergrößerung **C + D** 10x bzw. 40x (umrandeter Kasten). Messbalken entsprechen 100 µm respektive 50 µm. **grün**: GFAP. **rot**: humanes Vimentin. **blau**: DAPI-Färbung.

Abb. 5.14 **A** zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des SOX2<sup>+</sup>-Tumors des Versuchstieres Nr. 649. Wie deutlich zu sehen ist, sind innerhalb des Tumors zahlreiche GFAP positive Zellen lokalisiert (**A**, schwarze Pfeile). Hingegen zeigte sich eine GFAP Reaktivität beim SOX2<sup>-</sup>-Tumor (Tier Nr. 658) nur an der Grenze zwischen der malignen Neoplasie und unauffälligem Hirngewebe (rote, gestrichelte Linie), nicht aber innerhalb der Tumorregion (**B**, schwarze Pfeile). Abbildung **C** zeigt eindeutig, dass es sich bei den GFAP positiven Zellen nicht um Vimentin-positive Tumorzellen handelt. Es konnte keine GFAP/Vimentin-Kolokalisation beobachtet werden. Die Vimentin-positiven Tumorzellen (**rot**) zeigen keine GFAP Reaktivität (**grün**) und umgekehrt sind die GFAP positiven Zellen alle Vimentin-negativ (**C**, weiße Pfeile). Es handelt sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um ortsständige, reaktive Astrozyten des Mausgehirns. Somit konnte eine durch SOX2 beeinflusste GFAP Reexpression der Tumorzellen *in vivo* im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden. Wie schon in den Paraffinschnitten zu sehen, fanden sich im SOX2<sup>-</sup>-Tumor keinerlei GFAP positive Zellen (**D**). Lediglich in angrenzenden Bereichen sind GFAP positive, reaktive Mausastrozyten lokalisiert (**D**, weiße Pfeile).

Die vorliegenden Daten weisen auf ein deutlich unterschiedliches Wachstumsmuster der SOX2<sup>+</sup>- und SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellen hin. Während die SOX2<sup>+</sup>-Tumorzellen die ortsständigen Zellen (Astrozyten, Neuronen etc.) vermutlich durch die hohe proliferative Aktivität und das damit einhergehende schnelle Wachstum regelrecht „überrennen“, wachsen die SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellen langsamer und kompakter und scheinen die hirneigenen Zellen lateral zu verdrängen, um der wachsenden Raumforderung des Tumors gerecht zu werden. Auch wenn *in vivo* kein invasives Verhalten der Zellen nach ektopischer SOX2 Expression zu beobachten war, weisen die Daten klar auf ein differentielles, SOX2-abhängiges Wachstumsmuster hin. Somit ist davon auszugehen, dass die *in vitro* beobachteten SOX2-abhängigen Proliferationseffekte *in vivo* bestätigt werden konnten.

### **Zusammenfassung der *in vivo* Daten**

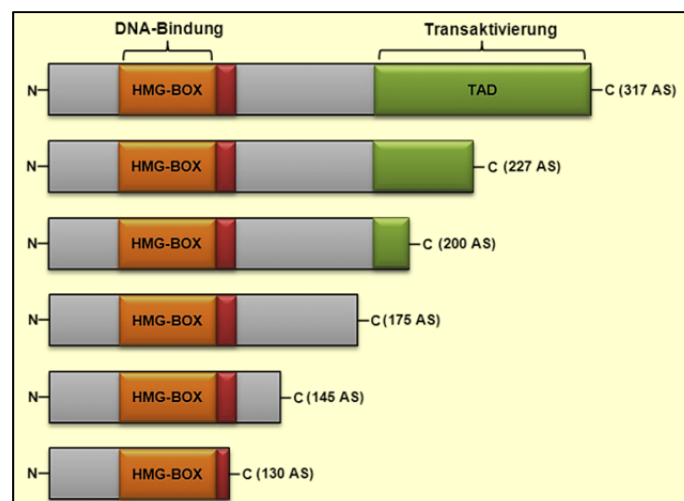
Bereits 7 Tage nach Implantation der U87MG Tumorzellen konnte mittels MRT-Messungen ein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate zwischen SOX2<sup>+</sup>- und SOX2<sup>-</sup>-Tumoren beobachtet werden. Dieser Effekt steigerte sich im Verlauf des Versuches zum zweiten Messpunkt 14 Tage nach der Operation deutlich. Die SOX2<sup>+</sup>-Tumorzellen wuchsen wesentlich schneller und erzeugten dementsprechend voluminösere Tumoren. Die MRT-Daten konnten durch Korrelation mit den histologischen Färbungen der Schnittpräparate bestätigt werden. Dabei fiel das unterschiedliche, SOX2-abhängige Wachstumsmuster der Tumorzellen auf. Die SOX2<sup>+</sup>-Zellen waren morphologisch kleiner und proliferativ signifikant aktiver als die wesentlich größer erscheinenden, gemästet wirkenden SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellen. Eine SOX2-abhängige GFAP Regulation konnte hingegen nicht beobachtet werden.



## 5.6 Interaktionsstudien

### 5.6.1 Herstellen geeigneter SOX2 Deletionsmutanten

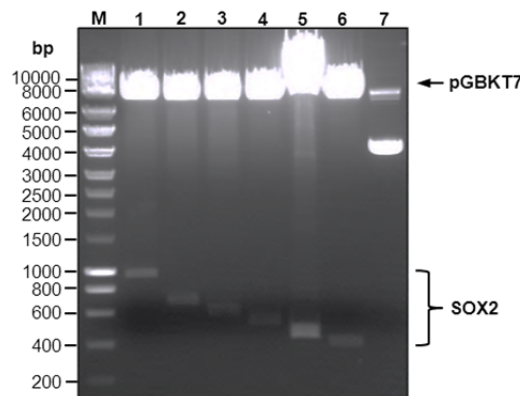
Nachdem SOX2-abhängige funktionelle Daten erhoben worden waren bestand ein weiteres Ziel der Arbeit darin Glioblastomspezifische SOX2-Interaktionspartner zu identifizieren. Dazu wurde das auf dem GAL4-Transkriptionsfaktor der Hefe (*Sachcharomyces cerevisiae*) basierende *yeast two-hybrid* (Y2H) System genutzt (vgl. 4.13). Mittels des *screening* Verfahrens können ganze cDNA-Bibliotheken (*prey*, engl. Beute) auf das Vorhandensein von Interaktionspartnern eines *bait* Proteins (engl. Köder) untersucht werden. Diese Methode ist sehr sensitiv und in der Lage sowohl schwache als auch kurzlebige Interaktionen aufzudecken. Zudem erfolgt der Nachweis *in vivo*, welches die physiologische Relevanz der Interaktionen untermauert und zusätzlich in Eukaryoten, wodurch die für Interaktionen oft essentiellen posttranskriptionalen Proteinmodifikationen vorhanden sind. Bei diesem System kann es vorkommen, dass eingesetzte Konstrukte autonom die Expression verwendeter Reportergene induzieren ohne dafür einen spezifischen Partner zu benötigen. Diese Autoaktivität führt zwangsläufig zu falsch positiven Ergebnissen. Da SOX2 selbst ein Transkriptionsfaktor mit intrinsischer Transaktivierungsdomäne ist und in der vorliegenden Arbeit als „Köderprotein“ (fusioniert mit der GAL4-Bindedomäne, BD) genutzt wurde, wurden neben dem *full length* Protein zunächst mehrere Deletionsmutanten generiert und in zwei kommerziellen Hefestämmen (Y2HGOLD + Y190) deren Fähigkeit zur autonomen Aktivierung der Reportergene getestet. (vgl. Abb. 5.15).



**Abb. 5.15: Schematische Darstellung des humanen *full length* SOX2-Proteins sowie hergestellter Deletionsmutanten**

**N:** Aminoterminus, **C:** Carboxyterminus, **orange:** HMG-BOX, welche die DNA-Bindung und Verformung initiiert. Zudem enthält diese Kernimport und -export-Sequenzen und ist für Protein-Proteininteraktionen essentiell, **rot:** *family motif* der B1 Untergruppe der SOX-Proteine, **grün:** Transaktivierungsdomäne, **grau:** Bereiche unbekannter Funktionen. Die Zahlen in den Klammern geben die Länge der jeweiligen Verkürzungsmutante in Aminosäuren (AS), respektive des *full length* Proteins an. Die Benennung der Mutanten erfolgte nach ihrer spezifischen Länge z.B. Länge 227 AS = SOX2<sub>227Δ</sub> etc.

Das humane SOX2 besteht aus nur einem Exon, welches in eine mRNA von 2518 Basenpaaren (bp) Länge transkribiert und in ein 317 Aminosäure großes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 34 kDa translatiert wird. Der transaktivierende, c-terminale Bereich umfasst die Aminosäuren 180 – 317 (Cox *et al.*, 2010). Neben der Klonierung des *full length* Proteins wurden fünf Deletionsmutanten generiert. Die anschließenden *screens* sollten mit der längsten, nicht autoaktiven Mutante durchgeführt werden. Diese Strategie gewährleistet möglichst viele potentielle SOX2-Interaktionspartner zu identifizieren. Die Herstellung der Verkürzungsmutanten erfolgte mittels PCR-Amplifikation anhand eines in der Arbeitsgruppe im Vektor pME18S vorliegenden SOX2 *full length* cDNA-templates (Tani *et al.*, 2007) (SOX2 *accession nr.*: NM\_003106.2). Hierzu wurden spezifische *primer* designt, welche die Restriktionsschnittstellen EcoRI/BamHI enthielten, die eine anschließende Klonierung der Amplifikate in den Hefeexpressionsvektor pGBKT7 (*bait*-Vektor) ermöglichten. Der Klonierungserfolg wurde durch einen analytischen Verdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese visuell überprüft (vgl. 5.16).



**Abb. 5.16: Repräsentative Darstellung des analytischen Verdauens der generierten SOX2 Konstrukte**

**M:** SMART DNA-Marker, diente als Längenstandard. Alle restringierten Fragmente entsprechen den zu erwartenden Größen. Der geschnittene Vektor zeigt jeweils eine distinkte Bande bei etwa 7300 bp. **1:** pGBKT7-SOX2 *full length* (317 AS = 951 bp), **2:** pGBKT7-SOX2<sub>227Δ</sub> (227 AS = 681 bp), **3:** pGBKT7-SOX2<sub>200Δ</sub> (200 AS = 600 bp), **4:** pGBKT7-SOX2<sub>175Δ</sub> (175 AS = 525 bp), **5:** pGBKT7-SOX2<sub>145Δ</sub> (145 AS = 435 bp), **6:** pGBKT7-SOX2<sub>130Δ</sub> (130 AS = 390 bp), **7:** pGBKT7-Leervektor ungeschnitten (Restriktionskontrolle).

Die in Abbildung 5.16 gezeigten Klone wurden mit spezifischen *primern* sequenziert. Die SOX2 *full length* cDNA (**1**) sowie alle hergestellten Verkürzungsmutanten (**2 – 6**) lagen im korrekten Leseraster (*in frame*) zur GAL4-DNA-BD vor (vgl. 8.2 & 8.3) und konnten für die folgenden Vorversuche eingesetzt werden.

### 5.6.2 Autoaktivität, Zytotoxizität und Expressionsanalyse

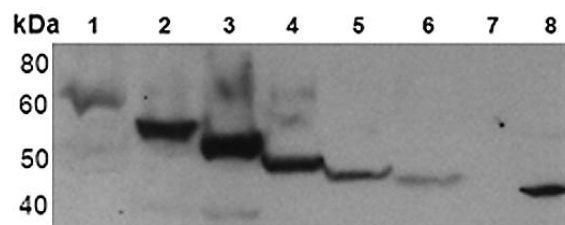
Für einen erfolgversprechenden Y2H-screen ist es notwendig, die zu verwendenden Konstrukte auf deren Autoaktivität sowie Zytotoxizität zu testen. Zudem sollte mittels

Western Blot gezeigt werden, dass sowohl das *full length* Protein als auch die Verkürzungsmutanten in den Hefezellen exprimiert werden.

Zur Kontrolle der Autoaktivität wurden die eingesetzten SOX2-*bait*-Konstrukte mit einem *prey*-Leerplasmid (pGADT7) in die Hefestämme Y2HGold und Y190 wie unter 4.12.3 angegeben kotransformiert und auf entsprechenden Selektionsnährböden kultiviert. Dabei zeigte sich, dass SOX2 *full length*, SOX2<sub>227Δ</sub> sowie SOX2<sub>200Δ</sub> die Expression der verwendeten Reportergene induzieren können, demnach autoaktiv sind und für einen Y2H-*screen* nicht genutzt werden konnten. Für die durchgeführten Y2H-*screens* wurde dementsprechend die Verkürzungsmutante SOX2<sub>175Δ</sub> verwendet, welche ebenso wie SOX2<sub>145Δ</sub> und SOX2<sub>130Δ</sub>, keine autonome Transaktivierungsfähigkeit aufwies.

Der Zytotoxizitätstest erfolgte anhand einer Wachstumskurve, wobei das Wachstum der Hefen über einen Zeitraum von 16 h (stündliche Messung der OD<sub>600</sub>) verfolgt wurde. Als Referenz wurde ein nicht-modifizierter Hefestamm (Y2HGold) eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass keines der untersuchten SOX2 Konstrukte zytotoxische Tendenzen hatte. Die Wachstumsgeschwindigkeit war in allen Fällen mit der der Referenz (Positivkontrolle) vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Für die Expressionsanalysen wurden die Proteine wie unter 4.13.4 beschrieben isoliert, die Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die SOX2 Expression mit Hilfe eines anti-c-MYC-Antikörpers (c-myc-tag im *bait*-Vektor pGBKT7 vorhanden) detektiert (vgl. Abb. 5.17).



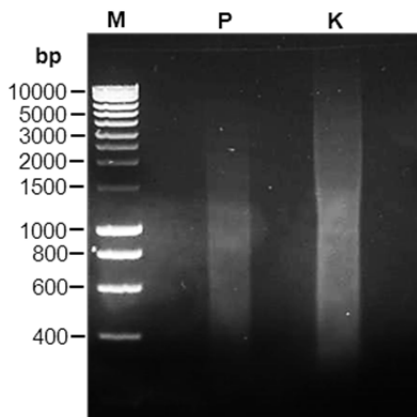
**Abb. 5.17: Western Blot Analyse der SOX2 Expression im Hefestamm Y2HGold**

1: SOX2 *full length*, 2: SOX2<sub>227Δ</sub>, 3: SOX2<sub>200Δ</sub>, 4: SOX2<sub>175Δ</sub>, 5: SOX2<sub>145Δ</sub>, 6: SOX2<sub>130Δ</sub>, 7: Y2HGold untransformiert (Negativkontrolle), 8: 30µg U373MG Proteinlysat (Positivkontrolle). Detektion mittels anti-c-MYC Antikörper (1:3000). Expositionszeit 5 min. (repräsentativer Blot, n=3).

Wie Abbildung 5.17 zu entnehmen ist, wurden alle getesteten SOX2 Konstrukte im Hefestamm Y2HGold als Fusionsproteine (GAL4-DNA-BD-SOX2-c-MYC-*tag*) exprimiert (1 – 6). Als Negativkontrolle dienten untransformierte Hefezellen des Goldstammes (7). Als Positivkontrolle wurde endogenes c-MYC in U373MG-Proteinlysat detektiert (8). Da in diesem Fall ausschließlich gezeigt werden sollte, dass die Proteine in den Hefezellen exprimiert werden, wurde keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt sowie auf eine Ladekontrolle verzichtet.

### 5.6.3 Herstellen einer cDNA-Bibliothek

Da kommerziell keine glioblastomspezifische cDNA-Bibliothek erhältlich war, wurde diese mittels des Make your own „Mate & Plate™ Library Systems“ (Clontech) im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Dazu wurde aus der permanenten U373MG Glioblastomzelllinie mRNA isoliert, in cDNA, mit bekannten flankierenden Bereichen, revers transkribiert und diese mittels LD-PCR (*long distance*) anschließend amplifiziert.



**Abb. 5.18: Darstellung der LD-PCR zur Vervielfältigung der generierten cDNA-Amplikons**

**M:** SMART DNA-Längenstandard, **P:** U373MG cDNA mit bekannten flankierenden Bereichen, **K:** cDNA aus einer Plazenta, welche vom Hersteller mitgeliefert und als Positivkontrolle genutzt wurde.

Wie aus Abb 5.18 ersichtlich ist, konnten cDNA-Fragmente mit einer Länge von 400 bp – ca. 5000 bp amplifiziert werden (**P**). Bei der Positivkontrolle (**K**) konnten Fragmente bis 10.000 bp generiert werden. Dies liegt zum einen an dem höheren Reinheitsgrad des Ausgangsmaterials, zum anderen konnte mit 1 µg mRNA eine deutlich höhere Konzentration, verglichen mit den 112 ng U373MG mRNA, für die Erstrangsynthese (cDNA) und folgende LD-PCR eingesetzt werden.

Abschließend wurde die cDNA zusammen mit dem *prey*-Vektor pGADT7-Rec (enthält die DNA-Aktivierungsdomäne, AD) in den Hefestamm Y187 kotransformiert. Das Akzeptorplasmid und die cDNA-Fragmente werden in der Hefe durch homologe Rekombination zu funktionellen *prey*-Konstrukten ligiert.

### 5.6.4 Komplexität der cDNA-Bibliothek

Vor jedem Y2H-*screen* ist es notwendig den Titer der verwendeten cDNA-Bibliothek zu bestimmen um sicherzugehen, dass ausreichend unabhängige Klone für die Detektion von potentiellen Interaktionspartnern vorhanden sind. Die Anzahl unabhängiger Klone gilt zudem als ein Maß für die Komplexität der eingesetzten cDNA-Bibliothek. Der Titer wurde entsprechend den Angaben des *user manual* (Make your own Mate & Plate™ Library System, S. 21) berechnet. Bei *screen 1* wurden 316 Kolonien, bei *screen 2* 279 und bei *screen 3* 143 Kolonien auf den entsprechenden Selektionsnährböden gezählt. Die Titerwerte lagen jeweils bei  $6,32 \times 10^7$  cfu/ml,  $5,58 \times 10^7$  cfu/ml bzw.  $2,86 \times 10^7$  cfu/ml. Alle Werte lagen

deutlich über dem geforderten Mindestmaß von  $1,0 \times 10^7$  cfu/ml. Somit war davon auszugehen, dass in jedem Versuchsansatz eine ausreichend große Anzahl unabhängiger Klone vorlag und die generierte cDNA-Bibliothek hinreichend komplex ist.

### 5.6.5 Yeast two-hybrid screens

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei *screens* durchgeführt um zu gewährleisten, dass möglichst viele unabhängige Klone der cDNA-Bibliothek auf eine potentielle Interaktion mit SOX2 untersucht werden konnten. Da bereits bekannt ist, dass einige Interaktionen nur mit bestimmten Hefestämmen oder Systemen detektiert und/oder validiert werden können, wurden zwei verschiedene Stämme zum *screenen* eingesetzt. Zunächst wurde die im Y187 Hefestamm vorhandene cDNA-Bibliothek zweimal mit dem Y2H Goldstamm und in einem dritten Ansatz mit dem Y190 Stamm *gescreent*. Die Versuche wurden wie unter 4.13.1 angegeben mittels *mating* durchgeführt. Beim Goldstamm wurden für die beiden *screens* die Reportergene X-alpha-Gal sowie Aureobasidin A (100 ng/ml) verwendet. Beim Y190 Stamm dienten Histidin und lacZ als Reportergene, zusätzlich wurden 33 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol, Hemmstoff der Histidinsynthese) verwendet, um das Hintergrundwachstum zu minimieren. Die Anzahl untersuchter Klone wurde berechnet und ist für jeden *screen* in Tabelle 5.2 angegeben. Sowohl bei den durchgeführten *screens*, als auch allen folgenden Kotransformationen wurden jeweils die vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle pGBKT7-53 (murines p53) + pGADT7-T (SV40 großes T-Antigen) und Negativkontrolle pGBKT7-53 + pGADT7-lam (Lamin) als technische Kontrollen mitgeführt. Verhielten sich die Kontrollen nicht wie erwartet, wurden die Versuche solange wiederholt, bis technische Probleme ausgeschlossen werden konnten.

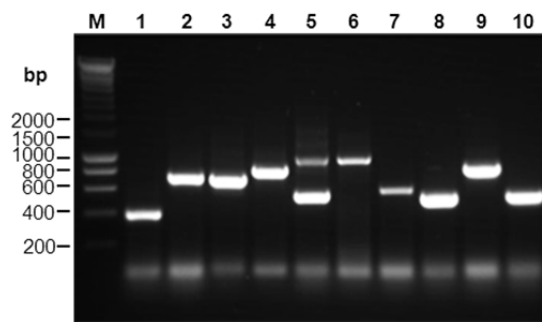
**Tab. 5.2: Berechnung der Zahl unabhängig *gescreenter* Klone in den drei durchgeführten Y2H-*screens***  
 Die Berechnung der in jedem *screen* untersuchten Klone erfolgte anhand der Angaben des *user manual* (Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System, S. 19).

<b>screen (Y187 prey- Stamm)</b>	<b>Resusp.- volumen (RV)</b>	<b>Plattierungs- volumen (PV)</b>	<b>Anzahl Klone (DDO- Platten)</b>	<b>Verdünnungs- faktor (VF)</b>	<b>Anzahl unabhängiger Klone</b>
1 Goldstamm	12 ml	0,1 ml	86	1:1000	$1,03 \times 10^7$
2 Goldstamm	25 ml	0,1 ml	35	1:1000	$8,75 \times 10^6$
3 Y190 Stamm	14 ml	0,1 ml	23	1:1000	$3,22 \times 10^6$

Wie Tabelle 5.2 entnommen werden kann, wurden bei den durchgeführten Versuchen  $1,03 \times 10^7$  (*screen 1*),  $8,75 \times 10^6$  (*screen 2*) sowie  $3,22 \times 10^6$  (*screen 3*) Klone auf eine Interaktion mit SOX2 hin untersucht. Die Werte liegen damit deutlich über der geforderten Mindestanzahl von  $1 \times 10^6$  unabhängigen Klonen, welche als notwendig angesehen wird, um

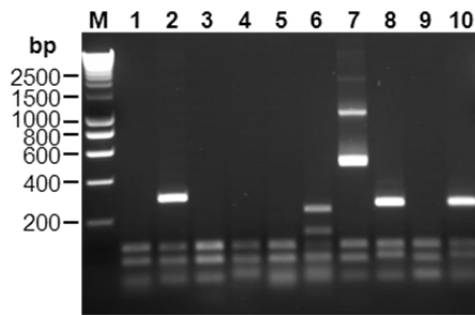
ausreichend potentiell positive Interaktionen zu identifizieren (Clontech, *user Manual*). Auffällig ist, dass die Anzahl der Klone bei den ersten beiden *screens* höher ist. Dies liegt wahrscheinlich an der geringeren *mating* Effizienz zwischen Y190 + Y187, die nur etwa 3 % betrug. Bei den *screens* mit dem Goldstamm lag die Effizienz bei 14 % bzw. 11 %, wodurch folgerichtig mehr Klone *gescreent* werden konnten.

Bei *screen 1* wurden insgesamt 247 Klone von den Selektionsnährböden gepickt und auf stringente QDO/X/A (125 ng/ml Aureobasidin A) Platten überführt. 83 Klone waren in der Lage alle 4 Reportergene (Adenin, Histidin, X-a-Gal und Aureobasidin A) zu aktivieren (33,6 %). Bei *screen 2* wurden 189 Klone auf identische Nährböden überführt, von denen 104 die Expression der Reportergene induzieren konnten (55 %). Bei *screen 3* wurden insgesamt 302 Klone gepickt und ein  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest (vgl. 4.12.3) durchgeführt. 217 waren positiv (Aktivierung des lacZ Reportergens) und diese wurden für weitere Studien eingesetzt (71,8 %). Von den insgesamt 404 potentiell positiven Klonen aller drei *screens* wurden anschließend Kolonie-PCRs durchgeführt (vgl. Abb. 5.19).



**Abb. 5.19: Exemplarische Darstellung einer Kolonie-PCR verschiedener Klone**  
M: SMART DNA-Marker diente als Längenstandard. 1 – 10: Entsprechen den ersten 10 analysierten Klonen aus *screen 1*.

Mittels der Kolonie-PCRs wurden die Größen der verschiedenen Inserts ermittelt. Diese repräsentieren die potentiellen SOX2-Interaktionspartner, welche aus der cDNA-Bibliothek identifiziert und selektioniert werden konnten. Abb. 5.19 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Kolonie-PCR der ersten 10 Klone aus *screen 1* (1 – 10). Die durchschnittliche Insertgröße lag bei etwa 770 bp, die aller *screens* bei etwa 550 bp. Anhand des unterschiedlichen Bandenmusters (verschiedene Insertgrößen) wurden die Klone anschließend in Gruppen unterteilt. Aus dem in Abb. 5.19 gezeigten Beispiel sind Klon 2, 3 sowie Klon 4, 9 oder auch Klon 8, 10 einer Gruppe zugeordnet worden. Klon 5 zeigte 2 distinkte Banden, was darauf schließen lässt, dass dieser Klon zwei Vektoren mit unterschiedlichen Inserts aufgenommen hatte. Solche Klone wurden zunächst auf QDO/X/A Nährböden mehrfach (4 – 6 mal) ausgestrichen und vereinzelt. Anschließend wurde erneut eine Kolonie-PCR durchgeführt. Nach Einteilung in Gruppen erfolgte ein Verdau mit dem *frequently cutting enzyme* HAEIII, welches eine 4 Basenpaar Erkennungssequenz hat und somit DNA statistisch alle 256 bp restringiert.



**Abb. 5.20: Exemplarische Darstellung der HAEIII-Restriktion ausgewählter Kandidaten des ersten Y2H-screens**  
**M:** SMART-DNA Marker, diente als Längenstandard. **1:** Klon 4, **2:** Klon 12, **3:** Klon 17, **4:** Klon 23, **5:** Klon 28, **6:** Klon 35, **7:** Klon 42, **8:** Klon 53, **9:** Klon 61: **10:** Klon 77.

Abb. 5.20 zeigt exemplarisch die Restriktion einiger im Y2H-screen gefundener potentieller SOX2-Interaktionskandidaten. Anhand des Restriktionsmusters kann auf das Vorhandensein identischer Inserts rückgeschlossen werden. Die Klone in den Spuren 1, 3, 4, 5 und 9 zeigten dasselbe Schnittmuster, demnach liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit identische Inserts vor. Gleiches gilt ebenso für die Klone in den Spuren 2, 8, 10. Von dem hier gezeigten Beispiel wurden dementsprechend nur die Klone 1, 2, 6, 7 sequenziert. Insgesamt wurden von den 404 untersuchten Kandidaten anhand des Restriktionsmusters 177 Klone (43,8 %) sequenziert. Dabei zeigte sich, dass 17 Kandidaten in reverser Orientierung inseriert waren. Weitere 42 lagen nicht im korrekten Leseraster vor und 14 ließen sich nicht sequenzieren. Anschließend wurden von ausgewählten Kandidaten die Plasmide isoliert, in *E.coli* Bakterien (DH5 $\alpha$ ) transformiert und mittels Ampicillinresistenz die *prey*-Konstrukte selektiert. Die Plasmide wurden isoliert und in die beiden verwendeten Hefestämme (Y2HGold + Y190) rücktransformiert, um die *prey*-Konstrukte auf autonome Transaktivierung der Reportergene zu testen. Die Kandidaten MGST2, ERGIC1, SRGAP3, METTL5, PSMA7, LARP3 sowie Galektin-1 waren in der Lage autonom die Expression der Reportergene zu induzieren und wurden daher nicht weiter berücksichtigt. Im Falle von Galektin-1 waren allerdings erst nach 5 – 7 Tagen blaue Kolonien auf den Selektionsnährböden (Goldstamm) zu finden, was für eine sehr geringe Autoaktivität spricht. Hingegen zeigten Kotransformationen mit SOX2<sub>175</sub> $\Delta$  bereits nach 2 – 4 Tagen große (>2 mm) und deutlich blau gefärbte Kolonien, welches auf eine solide Interaktion hinweist. Aufgrund der vorhandenen, wenn auch geringen Autoaktivität von Galektin-1, wurde jedoch auch diese potentielle Interaktion nicht weiter verfolgt.

Tabelle 5.3 gibt einen Überblick der in dieser Studie identifizierten potentiellen SOX2-Interaktionspartner aller 3 unabhängigen Y2H-screens. Der Sequenzvergleich erfolgte mittels BLAST (*basic local alignment search tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Tab. 5.3: Übersicht der potentiellen, glioblastomspezifischen SOX2-Interaktionspartner**

Gezeigt sind alle Kandidaten aus drei unabhängigen *yeast two-hybrid screens*. Angegeben ist jeweils ein repräsentativer Klon, mehrfach Detektionen wurden nicht angegeben. Nicht berücksichtigt wurden autoaktive Kandidaten sowie Konstrukte die nicht im korrekten Leseraster vorlagen oder in reverser Orientierung inseriert wurden. **Fettgedruckt:** Interaktionsvalidierung durch Kotransformationen mit SOX2<sub>175Δ</sub> in den Hefestämmen Y2HGold und Y190. Angegeben sind der Kandidatename und die Lokalisation des dazugehörigen Proteins. Die Genbanknummer (NCBI, *accession number*), der Anteil übereinstimmender Baasenpaare zwischen der identifizierten cDNA aus der verwendeten Bibliothek und der jeweiligen Referenzsequenz aus NCBI (Gesamtlänge in bp), sowie die *Screen*nummer in welcher der Kandidat jeweils identifiziert wurde.

Kandidat / Lokalisation	Genbank NCBI, ( <i>accession number</i> )	Konsens (min. 98%) der cDNA mit der Ref.sequenz, NCBI (bp)	Screen		
			1	2	3
<b>Nukleus</b>					
<b>RUNX1</b> ( <i>Runt related transcription factor-1</i> )	NM_001754.4	547 – 755 (208)		x	x
<b>H2AFZ</b> ( <i>H2A histone family member Z</i> )	NM_002106.3	367 – 919 (552)	x		x
H3F3B ( <i>H3 histone family 3B</i> )	NM_005324.3	1126 – 1666 (540)	x	x	
<b>USP16</b> ( <i>ubiquitin specific peptidase 16</i> )	NM_001032410.1	1813 – 2329 (516)	x		x
DDX11 ( <i>DEAD/H box helicase 11</i> )	NM_152438.1	2727 – 3093 (366)	x	x	
<b>NEDD9</b> ( <i>neural precursor cell expressed developmentally downregulated 9</i> )	NM_006403.3	2575 – 2995 (420)	x	x	
<b>WTAP</b> ( <i>Wilms tumor 1 associated protein</i> )	NM_152858.1	1116 - 1483 (367)		x	
<b>MRFAP1</b> ( <i>Morf 4 family assoc. Protein 1</i> )	NM_033296.1	356 – 1084 (728)	x		x
MDM2 ( <i>mouse double minute 2</i> )	BC013887.1	2337 – 2990 (653)			x
UBE2N ( <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2N</i> )	NM_003348.3	640 – 1095 (455)	x	x	
FAM96B ( <i>family sequence similarity 96 member B</i> )	NM_016062.3	227 – 716 (489)			x
<b>Zytoplasma</b>					
<b>GFAP</b> ( <i>Glial fibrillary acidic protein, isoform δ</i> )	NM_001131019.2	880 – 1544 (665)	x	x	x
ACTB ( <i>actin, beta</i> )	NM_001101.3	666 – 1004 (338)	x		
ACTG1 ( <i>actin, gamma 1</i> )	NM_001614.3	777 – 1512 (735)	x		x
<b>CDK5RAP1</b> ( <i>CDK5 reg. subunit as. Protein1</i> )	NM_016082.3	1323 – 1902 (579)		x	x
<b>EIF3L</b> ( <i>eukary. translation initiation factor 3L</i> )	NM_001242923.1	1347 – 1796 (449)	x		x
TUBA1C ( <i>tubulin alpha 1c</i> )	NM_032704.3	598 – 894 (296)			x
CAPNS1 ( <i>calpain small subunit 1</i> )	NM_001749	700 - 989 (289)		x	
Dystonin	NM_015548.4	16094 – 16391 (297)			x
NANS ( <i>N-acetylneuraminic acid synthase</i> )	NM_001131019.2	837 – 1257 (420)		x	
MT2A ( <i>metallothionein 2 A</i> )	NM_005953.3	34 – 446 (412)			x



Enolase1 ( <i>c-myc promotor binding protein 1</i> )	NM_001428.3	671 - 1324 (654)	x		
RPL6 ( <i>ribosomal protein L6</i> )	NM_000970.3	490 – 972 (482)	x		x
RPL12 ( <i>ribosomal protein L12</i> )	NM_000976.3	169 – 673 (504)	x		x
RPL41 ( <i>ribosomal protein L41</i> )	NM_001035267.1	242 – 593 (351)		x	
RPS2 ( <i>ribosomal protein S2</i> )	NM_002952.3	175 – 876 (701)	x		
RPS4X ( <i>ribosomal protein S4, X-linked</i> )	NM_001007.4	695 – 954 (259)		x	
RPS20 ( <i>ribosomal protein S20</i> )	NM_001023.3	161 – 593 (432)		x	x
PSMA7 ( <i>proteasome subunit alpha type 7</i> )	NM_002792.2	602 – 982 (380)	x	x	
<b>weitere</b>					
<b>Chromosom 14 ORF167</b>	BC062348.1	415 – 901 (487)	x	x	
<b>LOC286437</b> (uncharakterisierter LOCUS)	NR_039980.1	2147 – 2328 (181)			x
CLN5 ( <i>ceroid-lipofuscinosis neuronal 5</i> )	NM_006493.2	2252 – 2731 (479)	x		
WIPI2 ( <i>WD repeat domain phos. interacting 2</i> )	NM_016003.3	780 – 936 (156)	x		
VDAC2 ( <i>voltage dependent anion channel 2</i> )	NM_003375.3	916 – 1593 (677)			x

Von den 34 Kandidaten wurden 16 in mehreren *screens* gefunden (44,1 %), was für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse spricht. Interessanterweise konnte aber nur GFAP in allen drei *screens* gefunden werden. Insgesamt wurden 11 Interaktionspartner identifiziert die vornehmlich im Kern lokalisiert sind. Darunter befinden sich einige chromatinassoziierte- (Histone) sowie chromatinmodifizierende Proteine. 17 Kandidaten liegen prädominant zytosolisch vor. Bei diesen Proteinen ist eine Interaktion mit SOX2 als Transkriptionsfaktor jedoch nicht ausgeschlossen, da bereits bekannt ist, dass SOX2 zwischen Zytoplasma und Zellkern „shutteln“ kann (Malki *et al.*, 2009). Zudem wird postuliert, dass SOX-Proteine spezifische Interaktionspartner bereits im Zytosol binden und diese gemeinsam in den Zellkern transportiert werden können (Kondoh und Kamachi, 2010). Von 5 Kandidaten ist entweder die Lokalisation unbekannt, da es sich um nicht charakterisierte genomische Loci/Proteine handelt oder sie liegen als integrale bzw. periphere Membranproteine vor (vgl. „weitere“ Tab. 5.3).

### 5.6.6 Auswahl potentieller Interaktionspartner

Für anschließende Untersuchungen wurde der Transkriptionsfaktor RUNX1 ausgewählt, da die *screens* vornehmlich durchgeführt wurden, um Kandidaten zu identifizieren, welche zusammen mit SOX2 die Transkription spezifischer Gene in Glioblastomen regulieren

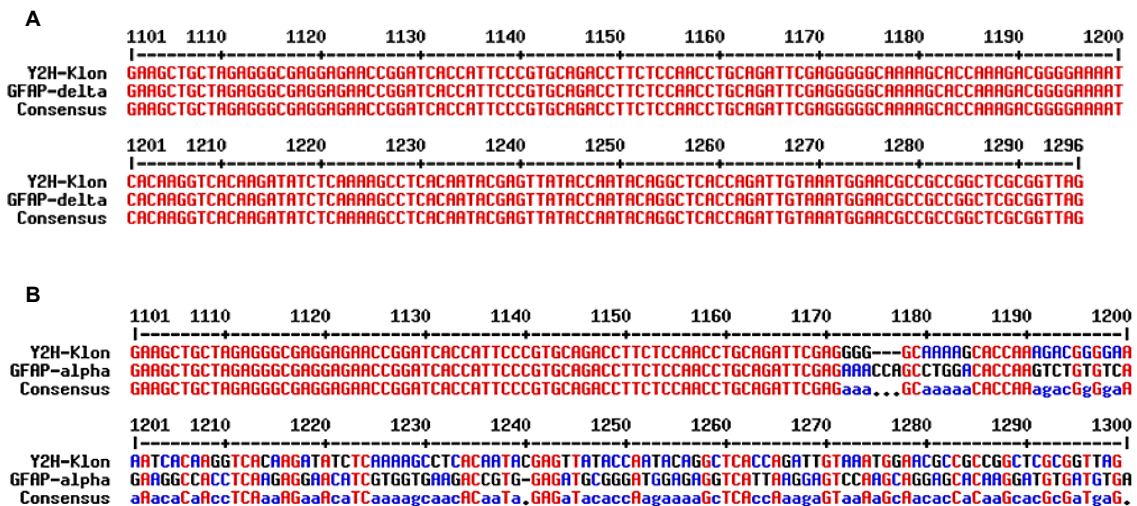
können. Zudem ist bisher ungeklärt, ob und welche Rolle RUNX1 bei der Entstehung und Progression von Glioblastomen spielt (vgl. 1.7.3). Es ist ratsam Kandidatengene, welche in einem *screen* nur als Fragmente gefunden wurden, zunächst als *full length* Konstrukte zu klonieren und erneut im Y2H-System auf die Interaktion mit dem verwendeten *bait*-Protein zu testen. Im Falle von RUNX1 war dies nicht möglich, da RUNX1 selbst ein Transkriptionsfaktor ist der sowohl eine DNA-BD als auch DNA-AD enthält (vgl. Abb. 5.21). Daher ist die Wahrscheinlichkeit einer autonomen Transaktivierung der Reportergene (wie für SOX2 gezeigt vgl. 5.6.2) sehr hoch. Die Interaktionsvalidierung erfolgte zusätzlich mit einer weiteren, unabhängigen Methode (vgl. 5.7 ff.).



**Abb. 5.21: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors RUNX1**

**RUNT:** DNA-Bindedomäne. **TAD:** Transaktivierungsdomäne. **ID:** inhibitorische Domäne. Der längste nicht autoaktive RUNX1 Klon (Y2H Klon) des Y2H-screens umfasst etwa die Hälfte der RUNT-Domäne (mod. nach Wang *et al.*, 2010).

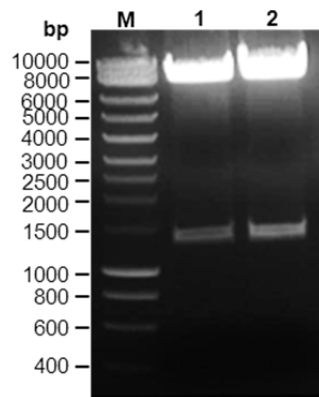
Als zweiter potentieller Interaktionskandidat wurde GFAP gewählt, da dieser als einziger in allen durchgeführten *screens* gefunden wurde. Zudem fiel bei den Sequenzvergleichen auf, dass ausschließlich Klone mit SOX2 interagieren, die eine Übereinstimmung zur Isoform delta ( $\delta$ ) von GFAP aufwiesen, nicht aber mit der hauptsächlich exprimierten alpha ( $\alpha$ ) Form (vgl. Abb. 5.22).



**Abb. 5.22: Paarweiser Sequenzvergleich**

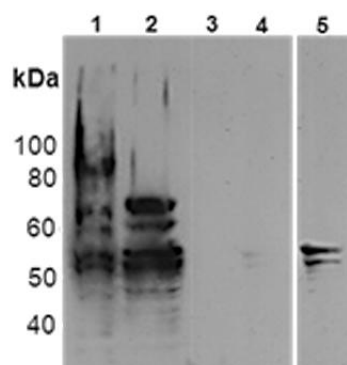
Dargestellt ist ein paarweiser Sequenzvergleich zwischen einem im Y2H-screen gefundenen Klon (Y2H Klon) und den letzten ca. 200 Basen (c-terminal) der *coding sequence* (cds) von GFAP-delta (*accession nr.* NM\_001131019) **(A)** und GFAP-alpha (*accession nr.* NM\_002055.4) **(B)**. Nur in diesem Bereich unterscheiden sich GFAP delta und alpha voneinander. **rot:** identische Basen. **schwarz/blau:** differierende Basen. (durchgeführt mittels *multalin*: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, *default settings*).

Wie Abb. 5.22 zu entnehmen ist, stimmen der im Y2H-screen gefundene Klon zu 100 % mit dem c-terminalen Bereich von GFAP $\delta$  überein (A). Wohingegen die letzten 127 Basen (1172 – 1299) zwischen dem Y2H Klon und GFAP $\alpha$  zum Großteil differieren (B). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Interaktion zwischen SOX2 und GFAP isoformspezifisch ist. Um dies zu testen, wurden GFAP alpha und delta mittels spezifischer *primer* aus einer „*brain-library*“ (zur Verfügung gestellt von Prof. Barnekow, Abteilung für experimentelle Tumorbologie, WWU-Münster) amplifiziert und mittels EcoRI/BamHI in den *prey*-Vektor pGADT7 inseriert. Abb. 5.23 zeigt den analytischen Verdau der hergestellten Konstrukte.



**Abb. 5.23: Analytischer Verdau der GFAP full length Konstrukte**  
**M:** Smart DNA Marker, diente als Längensstandard. **1:** pGADT7-GFAP $\alpha$  **2:** pGADT7-GFAP $\delta$ .

Die Klone wurden anschließend sequenziert und bestätigt, dass beide cDNAs im richtigen Leseraster vorlagen (vgl. 8.2). Die generierten Konstrukte wurden im Hefestamm Y2HGold auf Autoaktivität und Zytotoxizität getestet. Weder GFAP $\alpha$  noch GFAP $\delta$  waren in der Lage autonom die Expression der Reportergene zu induzieren. Zudem war keines der beiden *full length* Proteine toxisch für die Hefezellen, welches anhand einer Wachstumskurve getestet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Expression der beiden Konstrukte wurde im Y2H Goldstamm mittels Western Blot nachgewiesen.

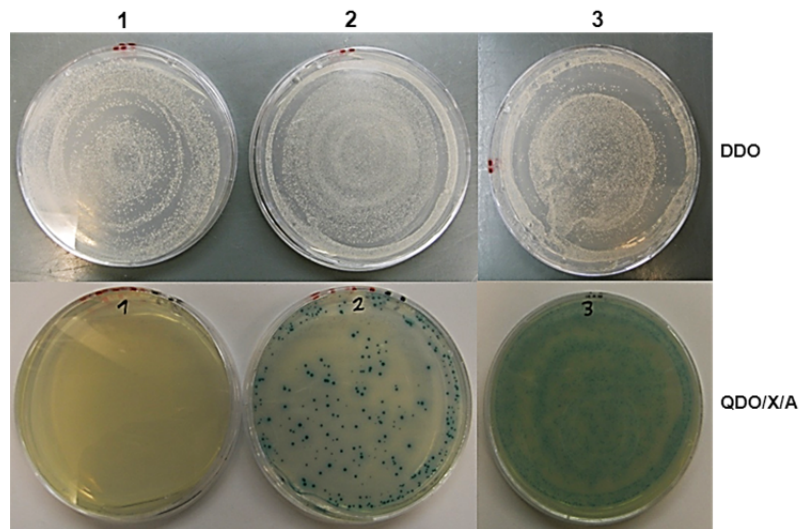


**Abb. 5.24: Western Blot Analyse zur Expression von humanem GFAP im Y2H Goldstamm**  
**1:** GFAP $\alpha$  *full length* **2:** GFAP $\delta$  *full length* **3:** Y2H Goldstammlysate (Negativkontrolle) **4:** 30  $\mu$ g U373MG-Zelllysate (Positivkontrolle) **5:** längere Expositionszeit von 4 (5min). Detektion von GFAP erfolgte mit dem Antikörper (Z0334, Dako, 1:20.000) Expositionszeit 1 min (repräsentativer Western-Blot, n=3).

Wie in Abb. 5.24 zu sehen ist, werden sowohl GFAP $\alpha$  (1) als auch GFAP $\delta$  (2) als *full length* Proteine im Y2H Goldstamm exprimiert. Untransformierte Hefen des Goldstammes dienten als Negativkontrolle (3). U373MG-Zelllysate wurde als Positivkontrolle genutzt, um endogenes GFAP zu detektieren (4), wobei der verwendete Antikörper (Dako) beide GFAP-Formen

(alpha und delta) erkennt (Roelofs *et al.*, 2005). Spur (5) dient der Verdeutlichung der Positivkontrolle und zeigt lediglich eine längere Expositionszeit von (4) (5 min) desselben Blots. Die detektierten Banden entsprechen in etwa dem kalkulierten Molekulargewicht der GAL4-AD-GFAP-Fusionsproteine (68 KDa). Die Banden unterhalb dieser könnten auf Proteindegradationen hinweisen. Welche Hefeproteine der Antikörper zusätzlich detektiert (Banden oberhalb) kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Da lediglich gezeigt werden sollte, dass beide Proteine exprimiert werden, wurde auf eine Konzentrationsbestimmung sowie Ladekontrolle verzichtet.

Anschließend wurden beide GFAP *full length* Konstrukte zusammen mit SOX2<sub>175Δ</sub> kotransformiert, um eine mögliche Isoformspezifität nachzuweisen (vgl. Abb. 5.25).



**Abb. 5.25: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer SOX2/GFAP-Kotransformation im Hefestamm Y2H Gold nach 5 Tagen Inkubationszeit**  
**1:** SOX2<sub>175Δ</sub> + GFAP $\alpha$  *full length* **2:** SOX2<sub>175Δ</sub> + GFAP $\delta$  *full length*. **3:** pGBKT7-53 + pGADT7-T (Positivkontrolle). **DDO:** Selektionsnährböden ohne Leucin und Tryptophan, dienen der Transformationskontrolle. **QDO/X/A:** Selektionsnährböden ohne die Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin + X- $\alpha$ -Gal + Aureobasidin A (100 ng/ml), dienen der Interaktionskontrolle (4 Reportergene) (repräsentatives Ergebnis, n=4).

Wie Abb. 5.25 zu entnehmen ist, war die Transformationseffizienz bei allen Kotransformationen vergleichbar (DDO-Nährböden, obere Reihe). Somit ist davon auszugehen, dass in allen Ansätzen genügend Hefezellen sowohl *bait*- als auch *prey*-Plasmid aufgenommen hatten, da nur dadurch die vorhandenen Auxotrophien kompensiert werden und die Zellen auf den spezifischen Nährböden wachsen können. Auf den stringenteren Nährböden (QDO/X/A, Interaktionskontrolle) konnte lediglich Wachstum auf den Nährböden beobachtet werden, auf denen die Kotransformation zwischen SOX2<sub>175Δ</sub> und GFAP $\delta$  ausplattiert wurde (2), nicht aber auf denen mit SOX2<sub>175Δ</sub> und GFAP $\alpha$  (1). Die Kotransformationen wurden viermal mit identischem Ergebnis wiederholt. Die mitgeführte Positivkontrolle (3) verhielt sich bei allen Versuchen den Erwartungen entsprechend. Die

erhobenen Daten lassen somit eine isoformspezifische Interaktion zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  vermuten.

### 5.6.7 mapping der Bindestelle

Abschließend wurde mit den vorhandenen Verkürzungsmutanten SOX2<sub>145 $\Delta$</sub>  und SOX2<sub>130 $\Delta$</sub>  ein grobes *mapping* der Bindestelle zwischen SOX2 und RUNX1 sowie SOX2 und GFAP $\delta$  durchgeführt. Dazu wurden wie bereits erwähnt Kotransformationen genutzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Tab. 5.4: Zusammenfassung der *mapping* Experimente**

Drei SOX2-Verkürzungsmutanten wurden als *bait*- Konstrukte jeweils mit RUNX1 oder GFAP $\delta$  *prey*-Plasmiden kotransformiert und auf spezifischen Selektionsnährböden (QDO/X/A) ausplattiert. +: Wachstum auf den Selektionsnährböden nach spätestens 5 Tagen. – kein Wachstum innerhalb von 5 Tagen beobachtbar.

<i>bait</i> -Plasmid	<i>prey</i> -Plasmid	Wachstum auf QDO/X/A
pGBKT7-SOX2 <sub>175<math>\Delta</math></sub>	pGADT7-RUNX1 (bp 547-755)	+
pGBKT7-SOX2 <sub>145<math>\Delta</math></sub>		+
pGBKT7-SOX2 <sub>130<math>\Delta</math></sub>		+
pGBKT7-SOX2 <sub>175<math>\Delta</math></sub>	pGADT7-GFAP $\delta$ <i>full length</i>	+
pGBKT7-SOX2 <sub>145<math>\Delta</math></sub>		+
pGBKT7-SOX2 <sub>130<math>\Delta</math></sub>		-

Wie aus Tabelle 5.4 ersichtlich ist, war das Fragment der RUNT-Domäne von RUNX1 in der Lage mit allen getesteten SOX2-*bait*-Konstrukten zu interagieren. Demnach scheint die HMG-Box von SOX2 für eine Interaktion mit der RUNT-Domäne von RUNX1 hinreichend zu sein. Möglicherweise wird die Interaktion sogar nur über die beiden DNA-Bindedomänen vermittelt. Da es sich jedoch nicht um das vollständige Protein handelte, sondern nur um ein Fragment der RUNT-Domäne von RUNX1, sollten die Daten vorsichtig interpretiert und zunächst mit einer weiteren Methode verifiziert werden.

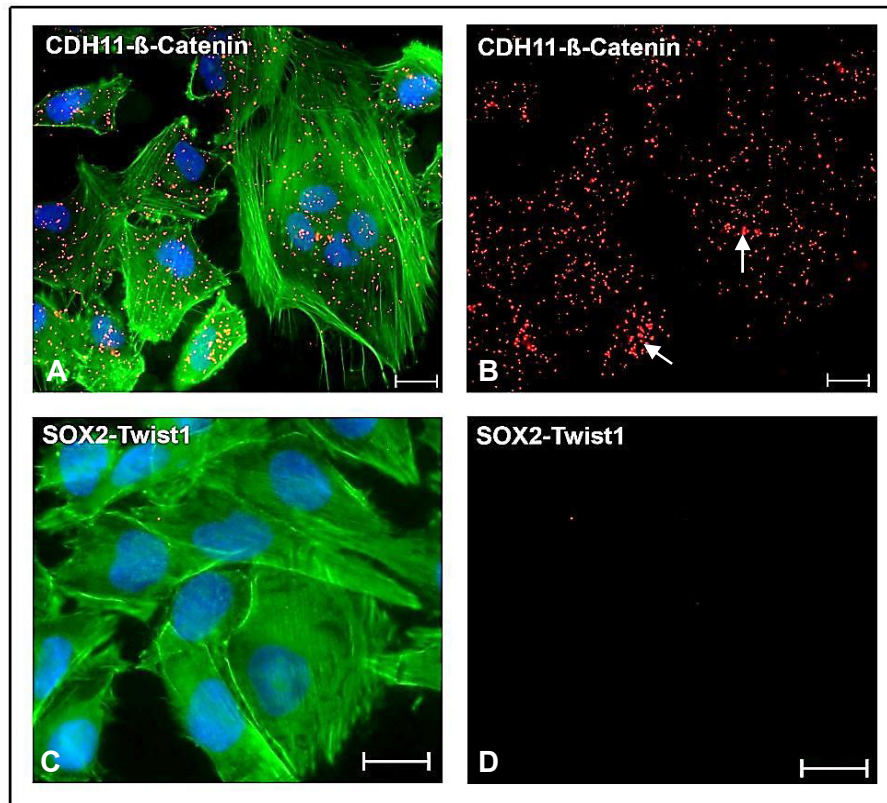
Im Fall von GFAP $\delta$  konnte nur eine Interaktion zwischen SOX2<sub>175 $\Delta$</sub>  und SOX2<sub>145 $\Delta$</sub>  beobachtet werden. Die kürzere Variante SOX2<sub>130 $\Delta$</sub>  zeigte keine Interaktion. Demnach scheint der zur HMG-Box c-terminal gelegene Bereich zwischen AS130 – AS145 für die Interaktion mit GFAP $\delta$  essentiell zu sein. Die Interaktion wird dementsprechend über die letzten 42 AS von GFAP $\delta$  und dem Bereich AS130 – AS145 von SOX2 vermittelt. Die Tatsache, dass RUNX1 und GFAP nicht dieselben Bindestellen mit SOX2 zu haben scheinen, könnte auf verschiedene Funktionen der Interaktion hinweisen.

## 5.7 Interaktionsvalidierung mittels *Proximity Ligation assay* (PLA)

Da Y2H-Systeme trotz aller Kontrollen fehleranfällig sein können, sollten die potentiellen Interaktionen mit einer weiteren, unabhängigen Methode verifizieren werden. Dazu wurde in dieser Studie der *Proximity ligation assay* (PLA) gewählt. Diese Methode bietet gegenüber anderen, wie beispielsweise der Ko-Immunpräzipitation oder *pulldown*-Analysen, den Vorteil Protein-Proteininteraktionen direkt *in situ* nachzuweisen und gegebenenfalls zu quantifizieren. Zudem ist der PLA sehr sensitiv, so dass auch einzelne Moleküle detektiert und deren subzelluläre Lokalisation exakt bestimmt werden kann. Benötigt werden zwei spezifische Primärantikörper aus verschiedenen Spezies (z.B. Maus und Kaninchen). Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten *probes* (spezielle Sekundärantikörper) und der Signalverstärkung durch die *rolling cycle amplification* (RCA) sowie fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden entstehen spezifische Signale, welche mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können (vgl. 4.10.1).

### 5.7.1 Etablierung geeigneter Kontrollen

Aufgrund der hohen Sensitivität des *assays* sowie der Abhängigkeit von spezifischen Antikörpern und deren eingesetzter Konzentration, ist die Etablierung geeigneter biologischer Kontrollen für die Interpretation nachfolgender Experimente obligat. Für die Etablierung der Kontrollen sowie Interaktionsvalidierungen wurde, wie für die Y2H-*screens*, die Glioblastomzelllinie U373MG verwendet. Bevor die Kontrollen etabliert werden konnten, mussten zunächst die verwendeten Antikörperkonzentrationen titriert werden (technische Kontrollen). Dazu führt man einen PLA durch, bei dem nur einer der beiden Primärantikörper genutzt wird (vgl. Abb. 5.26). Können dennoch PLA Signale detektiert werden, muss die eingesetzte Antikörperkonzentration angepasst werden, bis das Hintergrund-Signal-Verhältnis bei  $\leq 3$  „spots“ je 10 Zellen (Empfehlung des Herstellers, vgl. 4.10.1) liegt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden dementsprechend zunächst für die PLA Experimente austitriert.



**Abb. 5.26: Etablierung geeigneter Kontrollen für den PLA**

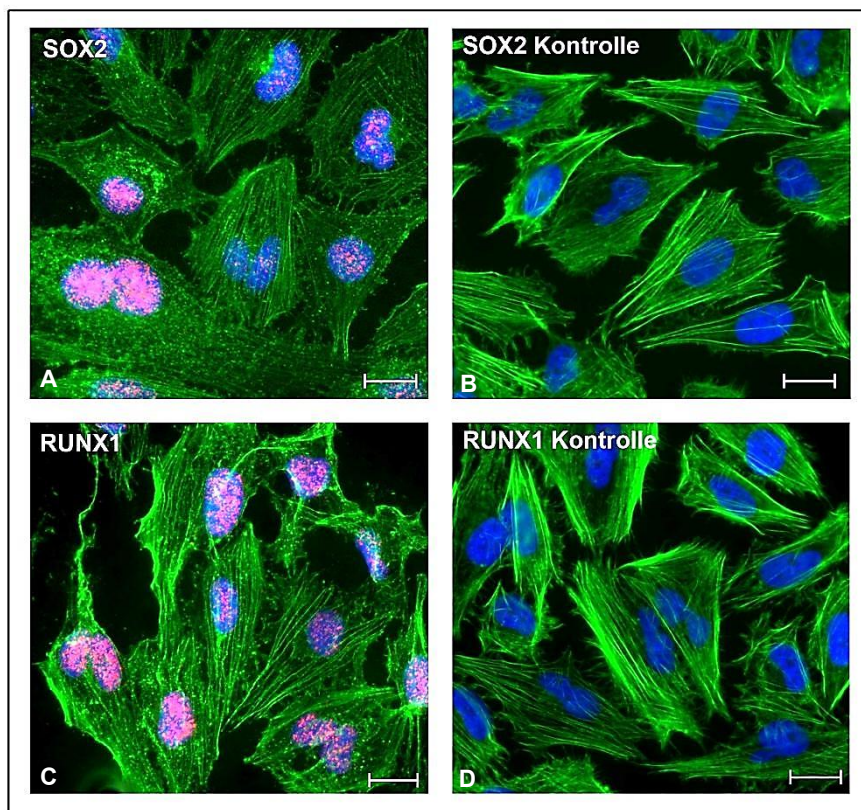
Dargestellt sind zwei PLA-Experimente zur Etablierung biologischer Kontrollen. **A:** Interaktion zwischen CDH11 und  $\beta$ -Catenin. Jeder rote Punkt entspricht einem PLA-Signal. (CDH11 = 1:250;  $\beta$ -Catenin = 1:500; Positivkontrolle). **B:** Übersicht der PLA-Signale. Überlappende Signale sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. **C:** PLA mit den Transkriptionsfaktoren SOX2 (1:1000) und Twist1 (1:1000; Negativkontrolle). **D:** Übersicht der PLA-Signale. **grün:** Färbung des Aktinzytoskeletts mittels FITC-konjugiertem Phalloidin (1:50). **blau:** DAPI-Färbung. **rot:** PLA-Signale (DuoLink II System, Olink Bioscience). Die Messbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Da für SOX2 keine Positivkontrolle zur Verfügung stand wurde auf die bereits publizierte Interaktion zwischen Cadherin11 (CDH11) und  $\beta$ -Catenin zurückgegriffen. Wie in Abbildung 5.26 zu sehen ist, konnte diese als Positivkontrolle erfolgreich etabliert werden (**A + B**). Jeder rote Punkt stellt ein PLA-Signal dar und kann als Protein-Proteininteraktion angesehen werden. Größere Cluster treten auf, wenn mehrere Interaktionen direkt nebeneinander liegen und durch die Bildgebung nicht mehr als einzelne Punkte dargestellt werden können (**B**, weiße Pfeile). Als biologische Negativkontrolle wurde der Transkriptionsfaktor Twist1 verwendet (**C + D**). Dieser wird ebenso wie SOX2 in der Zelllinie U373MG exprimiert (Elias *et al.*, 2005). Wie Abbildung **C** und **D** zeigen, findet keine Interaktion zwischen SOX2 und Twist1 in U373MG Zellen statt. Somit konnte auch die SOX2 Negativkontrolle erfolgreich etabliert werden.



### 5.7.2 Interaktionsvalidierung SOX2 und RUNX1

Da im *yeast two-hybrid* System lediglich ein Teilfragment der RUNT-Domäne von RUNX1 gefunden wurde, sollte mittels des PLA überprüft werden, ob endogenes SOX2 und RUNX1 ebenfalls als Kooperationspartner fungieren. Vor der Interaktionsvalidierung zwischen SOX2 und RUNX1 wurden zunächst „single Recognition“ Experimente sowie technische Kontrollen etabliert, um einerseits die verwendeten Antikörper zu titrieren und andererseits deren Spezifität zu überprüfen (vgl. Abb. 5.27).

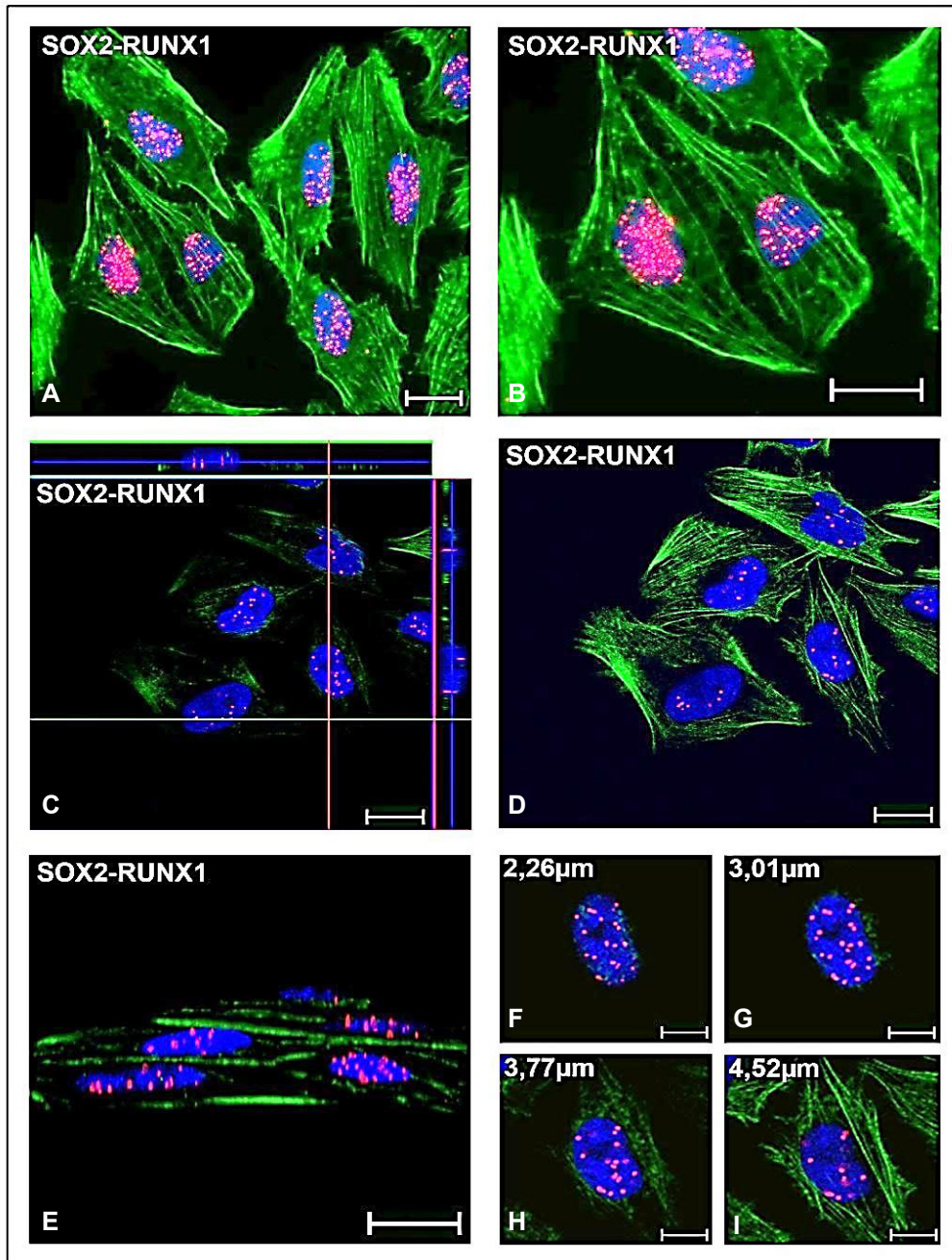


**Abb. 5.27: Einzelnachweis von SOX2 und RUNX1 in U373MG-Zellen**

Um die verwendeten Antikörper zu testen und deren Konzentration für den PLA zu titrieren wurden zunächst sowohl für SOX2 (**A** + **B**) als auch RUNX1 (**C** + **D**) „single Recognition“ PLA-Analysen sowie technische Kontrollen durchgeführt. (SOX2 Antikörper, 1:1000), (RUNX1 Antikörper, 1:1000). **grün**: Aktinzytoskelett angefärbt durch FITC-gekoppeltes Phalloidin (1:50). **blau**: DAPI-Färbung. **rot**: PLA-Signale. Messbalken entsprechen je 20µm.

Abb. 5.27 zeigt die Expressionsnachweise für SOX2 (**A**) und RUNX1 (**C**) in U373MG Zellen. Wie zu erwarten war, befinden sich beide Proteine nahezu ausschließlich im Zellkern, was die Spezifität der verwendeten Antikörper belegt. In **B** (SOX2) und **D** (RUNX1) sind die technischen Kontrollen dargestellt. Die verwendeten Antikörper wurden solange titriert, bis unspezifische Signale ausgeschlossen werden konnten. Im nachfolgenden Schritt konnte die Interaktion anhand der etablierten Parameter (Antikörperkonzentrationen je 1:1000) überprüft werden.





**Abb. 5.28: Interaktionsvalidierung zwischen SOX2 und RUNX1 mittels PLA**

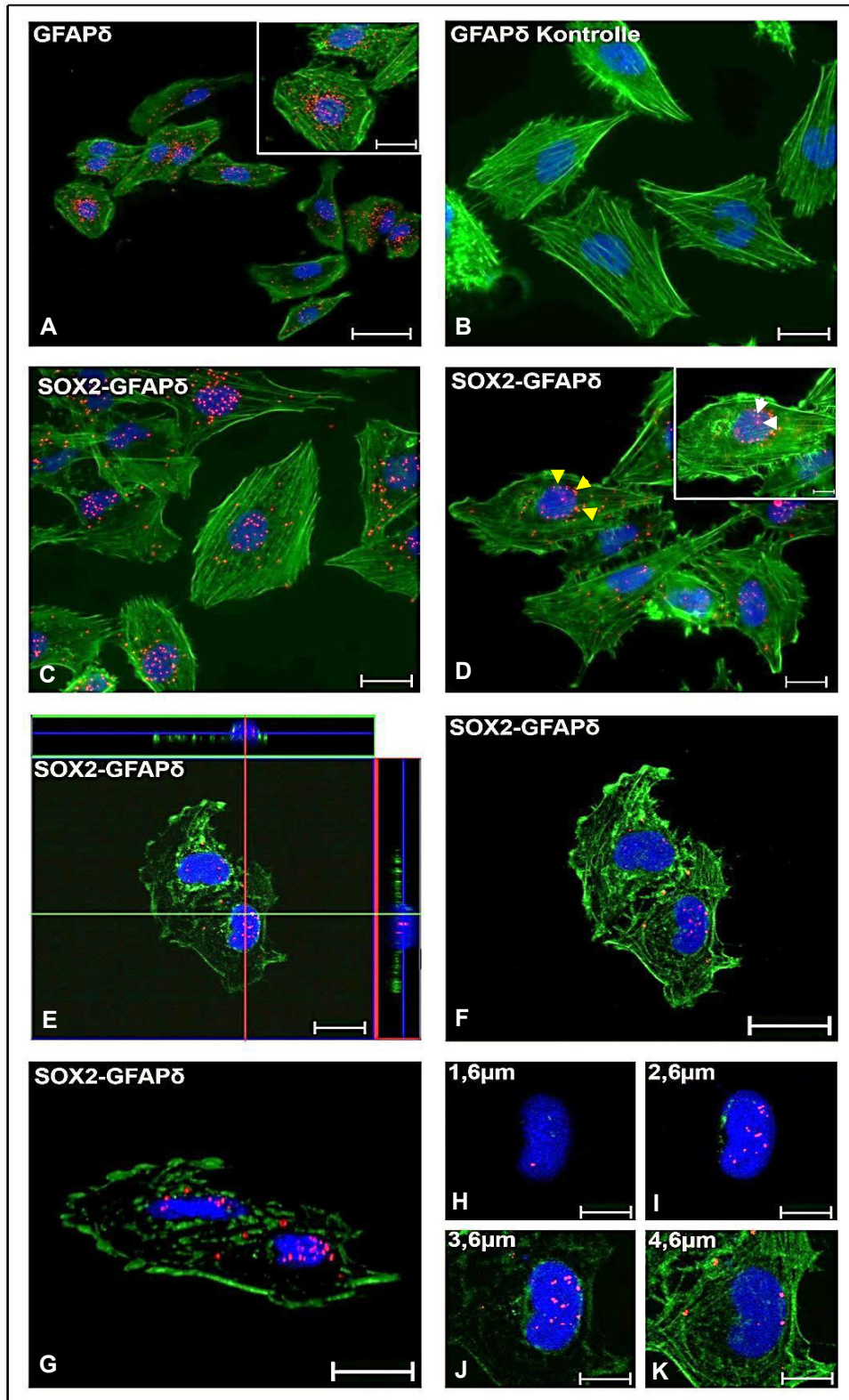
Exemplarische Darstellung der Protein-Proteininteraktion zwischen SOX2 und RUNX1 in U373MG Zellen. **A:** Übersicht der SOX2-RUNX1 Interaktion (40x). **B:** vergrößerter Ausschnitt von A. **C:** Orthogonale Ansicht eines aufgenommenen Z-Stapels (23 Schichten je 0,38  $\mu\text{m}$ ). **D:** Übersichtsebene von C. **E:** 3D-Approximation des Z-Stapels (Schicht 11). **F - I** Einzelaufnahmen des Z-Stapels (2,26  $\mu\text{m}$  – 4,52  $\mu\text{m}$ ). **grün:** Aktinzytoskelett angefärbt durch FITC-gekoppeltes Phalloidin (1:50). **blau:** DAPI-Färbung. **rot:** PLA-Signale. Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$  (F-I), 20  $\mu\text{m}$  (A -E).

Abbildung 5.28 zeigt die Interaktionsvalidierung zwischen den Transkriptionsfaktoren SOX2 und RUNX1 in der Glioblastomzelllinie U373MG. Wie in **A + B** deutlich zu erkennen ist, interagieren die beiden Proteine vornehmlich im Zellkern. Diese Beobachtung wurde durch die Aufnahme eines Z-Stapels (23 Schichten je 0,38  $\mu\text{m}$ ) bestätigt (**C – I**). Abbildung **C** zeigt eine orthogonale Ansicht des Z-Stapels aus welcher ersichtlich ist, dass die Interaktion innerhalb des Zellkerns stattfindet. Zur besseren Visualisierung wurde zusätzlich eine 3D-

Approximation (**E**) sowie Vergrößerungen eines Zellkerns in verschiedenen Ebenen (**F – I**, 2,26  $\mu\text{m}$  – 4,52  $\mu\text{m}$ ) dargestellt aus denen ebenfalls ersichtlich ist, dass die Protein-Proteininteraktion im Zellkern stattfindet. Betrachtet man die Daten der Y2H-screens, der Kotransformationen und der PLA-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass SOX2 und RUNX1 mit hoher Wahrscheinlichkeit Interaktionspartner darstellen.

### 5.7.3 Interaktionsvalidierung SOX2 und GFAP $\delta$

Als weiterer SOX2-Kooperationspartner wurde anschließend GFAP $\delta$  mittels PLA untersucht. Der GFAP $\delta$  spezifische Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. E. Hol vom *Netherlands Institute for Neuroscience* (NIN) zur Verfügung gestellt. Die Spezifität des Antikörpers für diese GFAP-Isoform wurde bereits publiziert (Roelofs *et al.*, 2005). Analog zu SOX2 wurde zunächst eine *single Recognition* PLA sowie die Titration des Antikörpers vorgenommen. Danach erfolgten die Interaktionsanalysen.



**Abb. 5.29: Interaktionsvalidierung zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  mittels PLA in U373MG Zellen**  
 Exemplarische Darstellung der Protein-Proteininteraktion zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  in U373MG Zellen. **A:** GFAP $\delta$  „single Recognition“ PLA-Analyse (Antikörper, 1:5000). **B:** technische Kontrolle (Antikörper, 1:1000). **C + D:** Übersicht der SOX2-GFAP $\delta$  Interaktion (40x). (Antikörper, SOX2 und GFAP $\delta$  je 1:1000). Die perinukleäre Lokalisation der Interaktion ist gekennzeichnet mit gelben Pfeilspitzen, die Signale im Zellkern mit weißen Pfeilspitzen. **E:** orthogonale Ansicht eines aufgenommenen Z-Stapels (24 Schichten je 0,38  $\mu$ m). **F:** Übersichtsaufnahme des Z-Stapels. **G:** 3D-Approximation des Z-Stapels (Schicht 14). **H – K:** Einzelaufnahmen des Z-Stapels (1,6  $\mu$ m – 4,6  $\mu$ m). **grün:** Aktinzytoskelett gefärbt durch FITC-konjugiertes Phalloidin (1:50). **blau:** DAPI-Färbung. **rot:** PLA-Signale. Messbalken entsprechen 50  $\mu$ m (A), 20  $\mu$ m (B - G), 10  $\mu$ m (H-K).

Wie in Abbildung 5.29 **A** ersichtlich ist, akkumulieren die PLA-Signale in direkter Nähe zum Nukleus (**A**, vergrößerter Ausschnitt), welches mit den Daten von Roelofs *et al.* übereinstimmt. Sie konnten ebenfalls eine vornehmlich perinukleäre Lokalisation von GFAP $\delta$  in der humanen SVZ mittels kommerzieller Immunfluoreszenz zeigen (Roelofs *et al.*, 2005). Abb. **B** zeigt die technische Kontrolle (Titration des Antikörpers). Für alle Interaktionsexperimente wurde der Antikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt. **C** + **D** zeigen je eine repräsentative Übersicht der Protein-Proteininteraktion zwischen SOX2 und GFAP $\delta$ . Wie in den Abbildungen zu sehen ist, scheinen die PLA-Signale sowohl perinukleär (**D**, gelbe Pfeile), als auch intranukleär (**D**, weiße Pfeile) zu sein. Um diese Beobachtung zu bestätigen wurde ein Z-Stapel eines Präparates aufgenommen, dessen orthogonale Ansicht in **E** gezeigt ist. Wie zu erkennen ist, liegen einige Signale innerhalb des Zellkerns. Zur besseren Visualisierung wurde zusätzlich eine 3D-Approximation (**G**) sowie Aufnahmen mit je 1  $\mu\text{m}$  Tiefe (**H** – **K**, 1,6  $\mu\text{m}$  – 4,6  $\mu\text{m}$ ) eines Zellkerns vergrößert dargestellt. Wie anhand dieser Darstellungen deutlich zu erkennen ist, befinden sich einige PLA-Signale innerhalb des Zellkerns (**H** - **K**).

Vor dem Hintergrund der Daten der *yeast two-hybrid screens* sowie der Kotransformationsexperimente ist davon auszugehen, dass SOX2 und GFAP $\delta$  in U373MG Zellen interagieren und dies zumindest partiell innerhalb des Zellkerns stattzufinden scheint. Ob GFAP $\delta$  und SOX2 als Komplex an genomische DNA binden und als Transkriptionsaktivatoren (Repressoren) fungieren, kann anhand dieser Daten jedoch nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

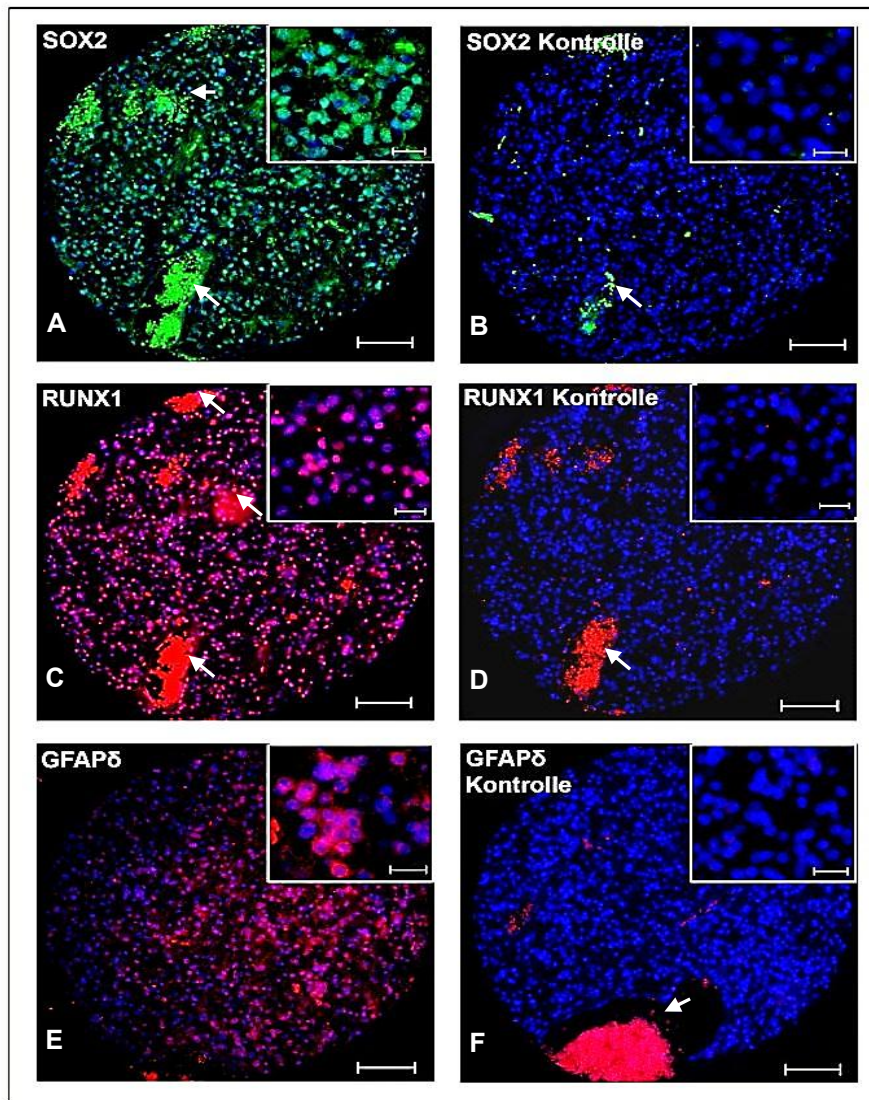
#### **5.7.4 Interaktionsnachweise in humanem Tumormaterial**

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die gezeigten Interaktionen zwischen SOX2 und RUNX1 bzw. GFAP $\delta$  ebenso in humanem Tumorsektaten nachweisbar sind, um Hinweise über eine physiologische Relevanz der Interaktionen zu erhalten.

##### **5.7.4.1 Expressionsanalyse zu SOX2, RUNX1 & GFAP $\delta$ in humanen Tumorsektaten**

Zunächst wurden astrozytäre Tumoren des WHO Grades I - IV mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von SOX2, RUNX1 und GFAP $\delta$  hin untersucht. Dabei richtete sich das Hauptaugenmerk auf die Expression der Proteine in Glioblastomen (WHO Grad-IV) (vgl. Abb. 5.30). Die in paraffin-eingebetteten Gewebepräparate (*tissue-array*) waren im Institut für Neuropathologie bereits vorhanden und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Paulus zur Verfügung gestellt.





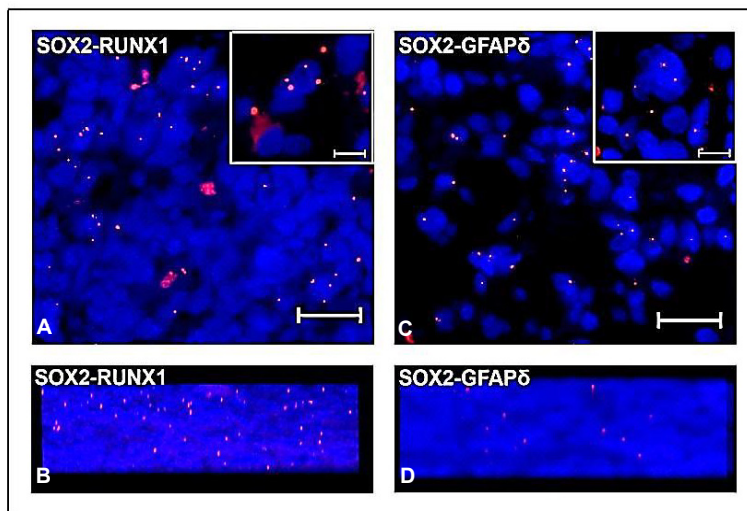
**Abb. 5.30: Expressionsnachweis von SOX2, RUNX1 und GFAP $\delta$  in einem humanen Glioblastom**  
 Dargestellt ist der Expressionsnachweis von SOX2, RUNX1 und GFAP $\delta$  in einem humanen Glioblastom (WHO-Grad IV). **A:** SOX2. **B:** IgG-Kontrolle. **C:** RUNX1. **D:** IgG-Kontrolle. **E:** GFAP $\delta$ . **F:** IgG-Kontrolle. Die Expressionsnachweise wurden einzeln an verschiedenen Dünnschnittpräparaten des *tissue-arrays* durchgeführt. Alle verwendeten Antikörper wurden 1:100 eingesetzt. Die Messbalken entsprechen 100  $\mu$ m bzw. 20  $\mu$ m (weißer Kasten). **grün:** SOX2 Nachweis. **rot:** Nachweis von RUNX1 (**C**) bzw. GFAP $\delta$  (**E**). **blau:** DAPI-Färbung. (weiße Pfeile: starke Eigenfluoreszenz der Erythrozyten angeschnittener Blutgefäße).

Wie Abb. 5.30 zu entnehmen ist, werden sowohl SOX2 (**A**), RUNX1 (**C**) als auch GFAP $\delta$  (**E**) im humanen Glioblastom (N84/04) koexprimiert, wohingegen die dazugehörigen IgG-Kontrollen negativ blieben (**B**, **D**, **F**). Somit wurde zum einen sichergestellt, dass die Färbungen spezifisch sind zum anderen, dass die verwendeten Antikörper die jeweiligen Epitope auch in Paraffinmaterial erkennen und somit für die nachfolgende PLA-Analyse verwendet werden konnten. Die weißen Pfeile in den Abbildungen weisen auf die unspezifische Eigenfluoreszenz der Erythrozyten (rote Blutkörperchen) angeschnittener Blutgefäße hin. Insgesamt wurden für die Expressionsanalysen 18 humane Glioblastome verwendet. Dabei zeigte sich, dass SOX2 in 14 (78 %), RUNX1 in 16 (89 %) und GFAP $\delta$  in

11 (61 %) Glioblastomen des *tissue arrays* exprimiert wurden. Eine Tumorprobe wurde als positiv angesehen, wenn  $\geq 25$  % der Zellen das jeweilige Protein exprimierten.

#### 5.7.4.2 PLA an einem *tissue array*

Anschließend wurde an dem *tissue array* eine PLA-Analyse durchgeführt, um die Interaktionen an humanen Tumorsektaten zu überprüfen.



**Abb. 5.31: PLA-Analyse an einem *tissue array***

Nachfolgend wurden Interaktionsstudien an in Paraffin-eingebetteten glialen Tumoren durchgeführt. **A:** SOX2-RUNX1 Interaktion in einem humanen Glioblastom. **B:** dazugehörige 3D-Berechnung eines Z-Stapels **C:** SOX2-GFAP $\delta$  Interaktion. **D:** dazugehörige 3D-Berechnung eines Z-Stapels. Alle Antikörper wurden 1:100 eingesetzt. **blau:** DAPI-Färbung. **rot:** PLA-Signale. Messbalken 50  $\mu$ m bzw. 20  $\mu$ m (weißer Kasten).

In Abb. 5.31 ist eine PLA-Analyse eines Glioblastoms zum physiologischen Interaktionsnachweis zwischen SOX2/RUNX1 (**A + B**) sowie SOX2/GFAP $\delta$  (**C + D**), dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, interagieren sowohl SOX2/RUNX1 als auch SOX2/GFAP $\delta$  innerhalb desselben Tumors. Jedoch fällt ebenso auf, dass die Anzahl der positiven Zellen eher gering ist. Da das Experiment nur einmal durchgeführt werden konnte, konnten die Antikörperkonzentrationen nicht für den PLA an Paraffinmaterial titriert werden, was nötig gewesen wäre, da die Paraffineinbettung des Tumormaterials die Epitope der Zielproteine „maskieren“ kann. Es wurden daher (wie vom Hersteller empfohlen) nur die Konzentrationen der kommerziellen Immunfärbungen (je 1:100, vgl. Abb. 5.30) verwendet. Da die technischen Kontrollen negativ waren (Daten nicht gezeigt), hätte die Antikörperkonzentration weiter angepasst werden müssen, um ein „realistisches“ Bild der Anzahl an Interaktionen zu erhalten. Da dies nicht möglich war, wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Jedoch kann festgehalten werden, dass die getesteten Interaktionen in humanen Tumoren *in situ* vorhanden sind und somit höchstwahrscheinlich eine physiologische Relevanz aufweisen. Um die Funktion der Interaktionen zu eruieren, wurden anschließend *Doppelknockdown*-Experimente *in vitro* durchgeführt.

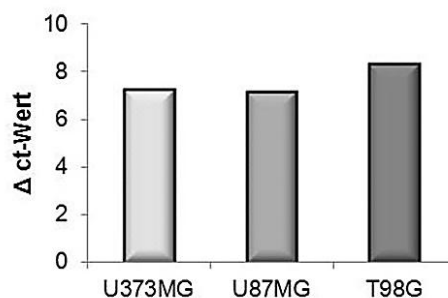
## 5.8 Doppelknockdown Analysen von SOX2 und RUNX1

### 5.8.1 Knockdown von SOX2 und RUNX1

In den vorausgegangenen *yeast two-hybrid screens* wurde RUNX1 als Kooperationspartner für SOX2 identifiziert und mittels PLA die Protein-Proteininteraktion validiert. Um Hinweise für eine funktionelle Relevanz dieses Komplexes zu erhalten, wurde ein transienter, siRNA vermittelter, RUNX1-*knockdown* in den bereits vorliegenden SOX2-*knockdown*- sowie Überexpressionsklonen generiert. Mit diesen Zellen, welche zur gesteigerten bzw. verringerten SOX2 Expression, zusätzlich eine reduzierte RUNX1 Expression aufwiesen, wurden anschließend funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Bei diesen Analysen wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten betrachtet. Es wurden jeweils der SOX2-*knockdown* Klon 4.1 sowie die passende Kontrolle K9neg der Zelllinie U373MG, der SOX2 Überexpressionsklon 2 mit Kontrollklon der Zelllinie U87MG und der Überexpressionsklon 5 plus Kontrolle der Zelllinie T98G für die Experimente verwendet.

### 5.8.2 RUNX1 Expressionsanalyse

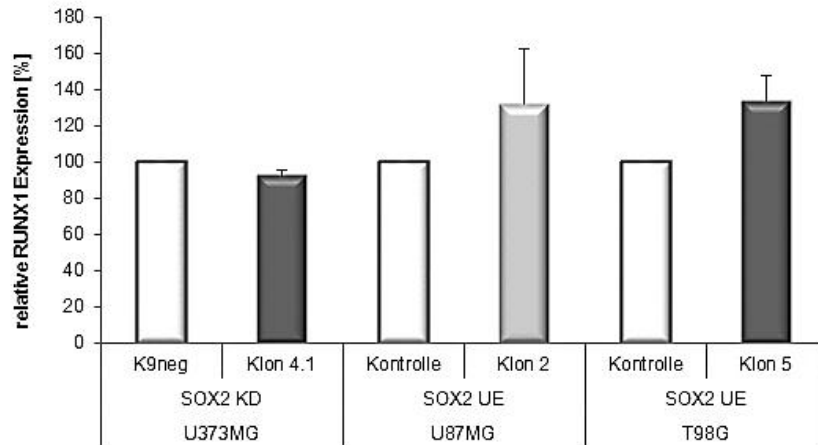
Zunächst wurde bei allen drei verwendeten Zelllinien sowie bei den vorhandenen SOX2 Klonen die RUNX1 Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen (vgl. Abb. 5.32 und 5.33).



**Abb. 5.32: RUNX1 Expressionsanalyse in den humanen Glioblastomzelllinien auf mRNA-Ebene**

Exemplarisch sind die  $\Delta$ ct-Werte einer repräsentativen qRT-PCR für die drei Zelllinien U373MG, U87MG und T98G dargestellt. Die Werte wurden anhand des *housekeeping* Gens GAPDH normiert. Ein niedriger  $\Delta$ ct-Wert spricht in diesem Beispiel für eine hohe Expression.

Die Analyse der RUNX1 Expression auf mRNA-Ebene zeigte, dass die unveränderten Zelllinien eine ähnliche Expressionsstärke von RUNX1 mit  $\Delta$ ct-Werten von 7,2 (U373MG), 7,1 (U87MG) und 8,3 (T98G) aufweisen. Anschließend wurde die RUNX1 Expression in den Klonen mit modifizierter SOX2 Expression ermittelt.



**Abb. 5.33: RUNX1 Expressionsanalyse in den SOX2 Klonen auf mRNA-Ebene**

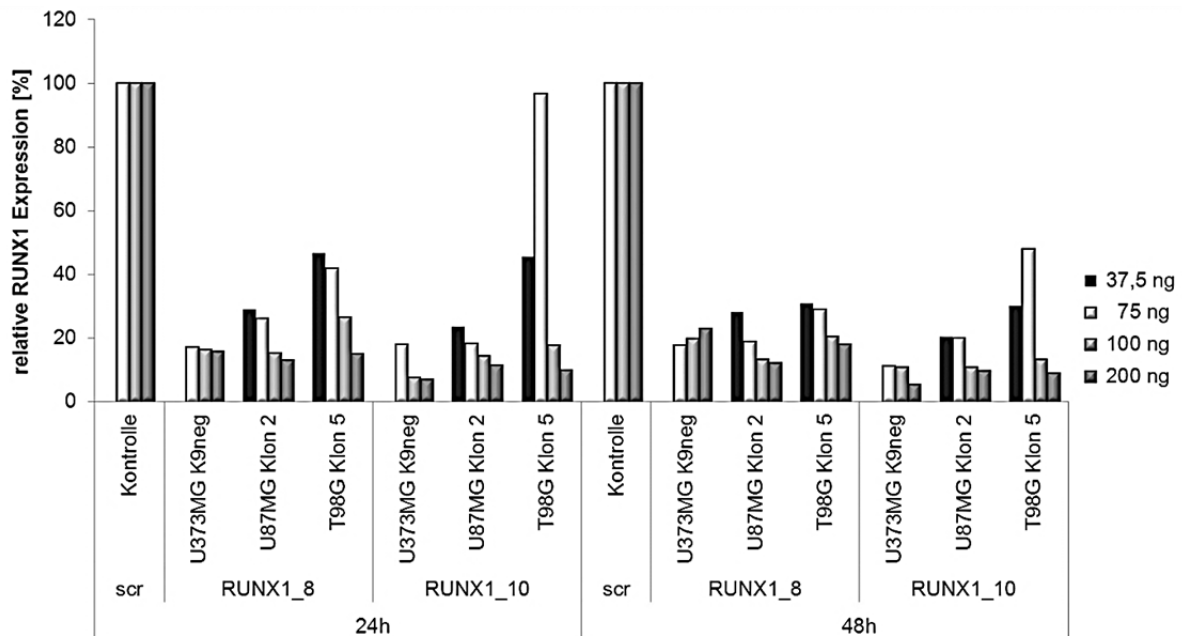
Für die Analyse der RUNX1 Expression in den Zelllinien mit bereits modifizierter SOX2 Expression wurde erneut die qRT-PCR genutzt. Bei einem SOX2-*knockdown* (Klon 4.1, U373MG) zeigte sich eine leicht reduzierte RUNX1 Expression im Vergleich zu der Kontrolle mit unveränderter SOX2 Expression (K9neg, 100 %). Im Gegensatz dazu weisen sowohl der Klon 2 der Zelllinie U87MG als auch Klon5 der T98G Zellen (beide mit SOX2 Überexpression) eine erhöhte RUNX1 Expression im Vergleich zur den jeweiligen Kontrollen (100 %) auf. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3).

Die Veränderung der SOX2 Expression zeigte interessanterweise einen direkten Einfluss auf die Expression von RUNX1. Der SOX2-*knockdown* Klon 4.1 weist eine reduzierte RUNX1 Expression mit 92,0 % ± 3,3 % auf. Hingegen führt eine SOX2 Überexpression in beiden verwendeten Zelllinien zu einer gesteigerten RUNX1 Expression (U87MG Klon 2 131,5 % ± 31,1 % und T98G Klon 5 134,2 % ± 14,0 %) im Vergleich zur Kontrolle mit unveränderter SOX2 Expression (100 %). Diese Daten sprechen für eine Regulation der RUNX1 Expression durch SOX2.

### 5.8.3 Etablierung des RUNX1-*knockdowns*

Für die Herunterregulation der RUNX1 Expression wurde ein transienter *knockdown* mittels spezifischer siRNAs genutzt. Mit den Klonen U373MG K9neg, U87MG Klon 2 und T98G Klon 5 wurde zunächst getestet bei welcher siRNA-Konzentration der RUNX1-*knockdown* am effektivsten ist. Für zwei Zeitpunkte (24 h und 48 h) wurden je vier verschiedene siRNA-Konzentrationen ausgetestet. Als Kontrolle wurde eine nichtbindende siRNA-Sequenz (*scrambled*, *scr*) genutzt, auf die die Expressionswerte jeweils bezogen wurden (100 %).





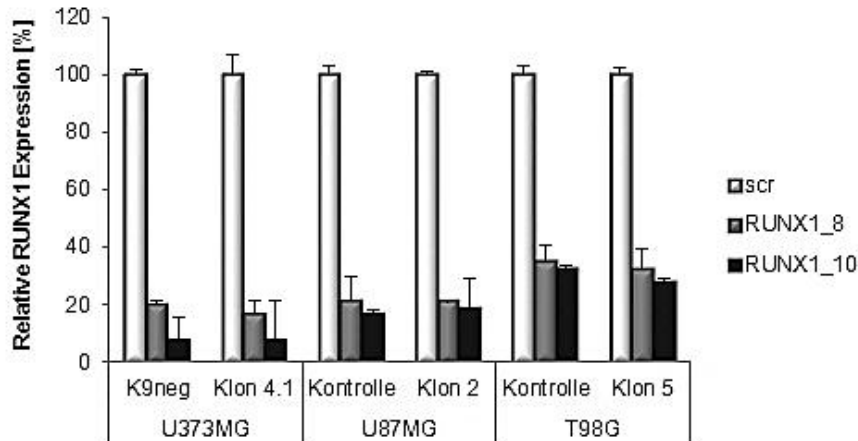
**Abb. 5.34: Etablierung des RUNX1-knockdowns**

Für die Etablierung des siRNA-basierten RUNX1-knockdowns wurden die Konzentrationen 37,5 ng, 75 ng, 100 ng und 200 ng getestet. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer repräsentativen qRT-PCR zur Bestimmung der Restexpression nach 24 bzw. 48 h. Die knockdown-Effizienz war bei allen verwendeten Klonen bei 200 ng siRNA am höchsten.

Die qRT-PCR-Ergebnisse des RUNX1-knockdowns zeigten deutlich, dass mittels der Standardkonzentration von 37,5 ng (5 µM) siRNA in den Zelllinien U87MG und T98G kein hinreichender knockdown generiert werden konnte. Die RUNX1 Restexpressionen lagen zwischen 42 - 47 % (RUNX1\_8) und 24 - 45 % (RUNX1\_10). Hingegen konnte durch die Verwendung von 200 ng siRNA eine Restexpression von lediglich 13 - 16 % (RUNX1\_8) sowie 7 - 12 % (RUNX1\_10) 24 h sowie 13 - 23 % (RUNX1\_8) bzw. 6 - 10 % (RUNX1\_10) 48 h nach Transfektion in allen Zelllinien (U373MG, U87MG und T98G) erreicht werden. Da noch höhere siRNA-Konzentrationen toxisch wirken können, wurden für alle nachfolgenden Analysen 200 ng siRNA für den RUNX1-knockdown verwendet.

#### 5.8.4 Nachweis des RUNX1-knockdowns auf mRNA-Ebene

Nach erfolgreicher Etablierung des RUNX1-knockdowns, wurde dieser in allen verwendeten Zelllinien (U373MG, U87MG und T98G) generiert und erneut überprüft. Dargestellt ist exemplarisch die Restexpression von RUNX1 48 h nach erfolgter Transfektion mit beiden verwendeten siRNA Sequenzen (RUNX1\_8 und RUNX1\_10) sowie der nichtbindenden Kontrollsequenz (scr), welche auf 100 % Expression gesetzt wurde.



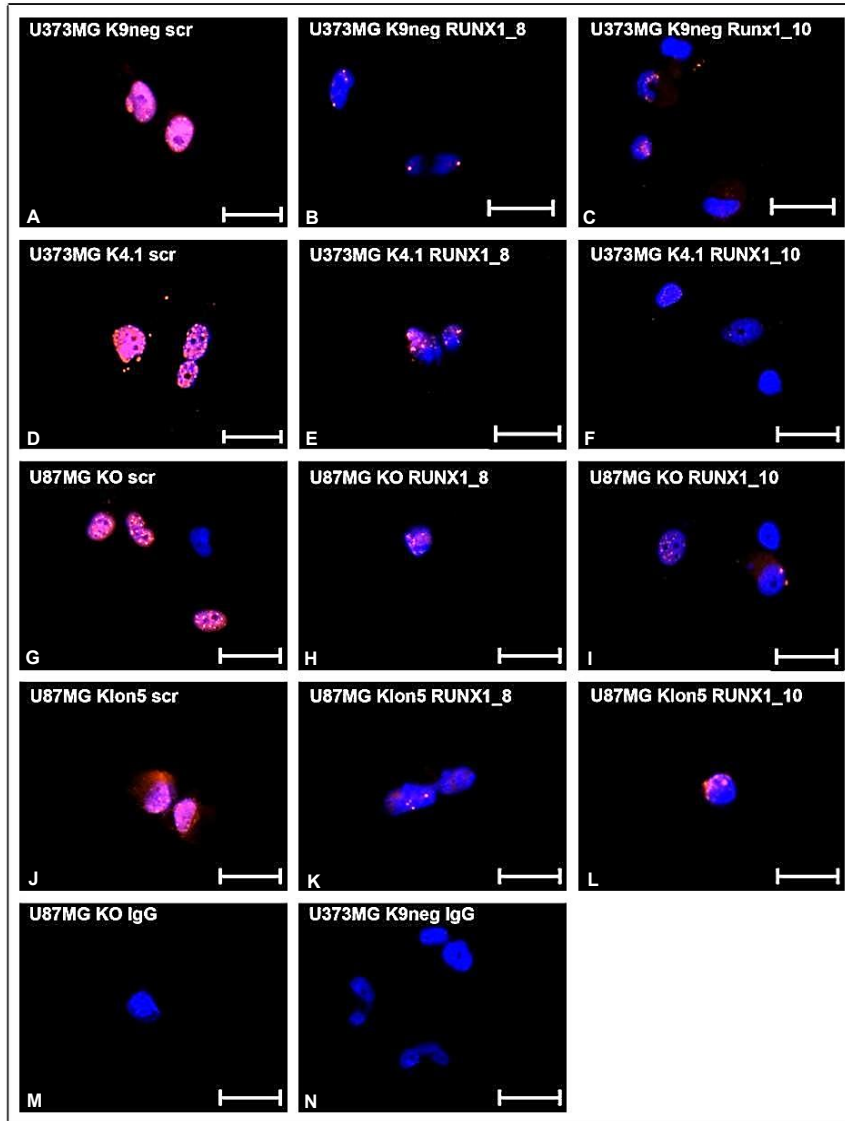
**Abb. 5.35: Nachweis des RUNX1-knockdowns auf mRNA-Ebene**

Exemplarisch sind drei unabhängige qRT-PCR Ergebnisse des RUNX1-knockdowns nach 48 h dargestellt. Bei allen verwendeten Zelllinien (U373MG, U87MG und T98G) wurden die siRNA-Sequenzen (RUNX1\_8 und RUNX1\_10) sowie die nichtbindende Kontrollsequenz (scr, 100 %) verwendet. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n=3).

Der RUNX1-knockdown in den SOX2-knockdown und SOX2 Überexpressionsklonen sowie den dazugehörigen Kontrollen (U373MG K9neg und U87MG Kontrolle) wurde exemplarisch 48 h nach erfolgter Transfektion überprüft. Wie in Abb. 5.35 ersichtlich ist, zeigte sich für die Zelllinie U373MG eine Restexpression von 20,2 % ± 1,1 % (RUNX1\_8) und 7,9 % ± 7,6 % (RUNX1\_10) für den Kontrollklon (K9neg). Der Klon 4.1 (stabiler SOX2-knockdown) wies Werte von 16,8 % ± 4,7 % sowie 7,5 % ± 14,0 % für die jeweiligen siRNA-Sequenzen auf. Bei den SOX2 Überexpressionsklonen der Zelllinien U87MG und T98G konnten RUNX1-Restexpressionswerte von 21,2 % ± 8,6 % und 16,6 % ± 1,8 % für den U87MG Kontrollklon, 20,9 % ± 0,4 % und 18,7 % ± 10,6 % für den U87MG Klon 2, 34,9 % ± 5,6 % sowie 31,9 % ± 5,6 % (T98G Kontrollklon) und 32,1 % ± 7,4 % und 27,3 % ± 1,6 % (T98G Klon 5) detektiert werden. Folglich konnte ein RUNX1-knockdown in allen verwendeten Zelllinien und Klonen erfolgreich etabliert werden.

**5.8.5 Nachweis des RUNX1-knockdowns auf Proteinebene**

Anschließend erfolgte der Nachweis des RUNX1-knockdowns in den U373MG Zellen (K9neg und Klon 4.1) sowie U87MG Zellen (Kontrolle und Klon 5) auf Proteinebene, welcher mittels Immunfluoreszenz überprüft wurde.



**Abb. 5.36: Nachweis des RUNX1-knockdowns auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz**

Der RUNX1-knockdown ist exemplarisch für die Zelllinien U373MG und U87MG nach 48 h dargestellt. Wie zu erkennen ist, war die RUNX1 Expression in den Zellen, welche mit den spezifischen siRNAs RUNX1\_8 (B, E, H, K) und RUNX1\_10 (C, F, I, L) transfiziert wurden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mit unveränderter RUNX1 Expression (scr, nichtbindende siRNA A, D, G, J) deutlich niedriger. A – C: RUNX1 Expression in U373MG K9neg Zellen. D – F: RUNX1 Expression in U373MG Klon 4.1 (stabiler SOX2-knockdown). G – I: RUNX1 Expression in U87MG Kontrollzellen. J – L: RUNX1 Expression in U87MG Klon5 (stabile SOX2 Überexpression). M + N: Isotypenkontrollen. (Messbalken entsprechen 20 μm). rot: Nachweis von RUNX1. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. KO = Kontrolle. (n=3).

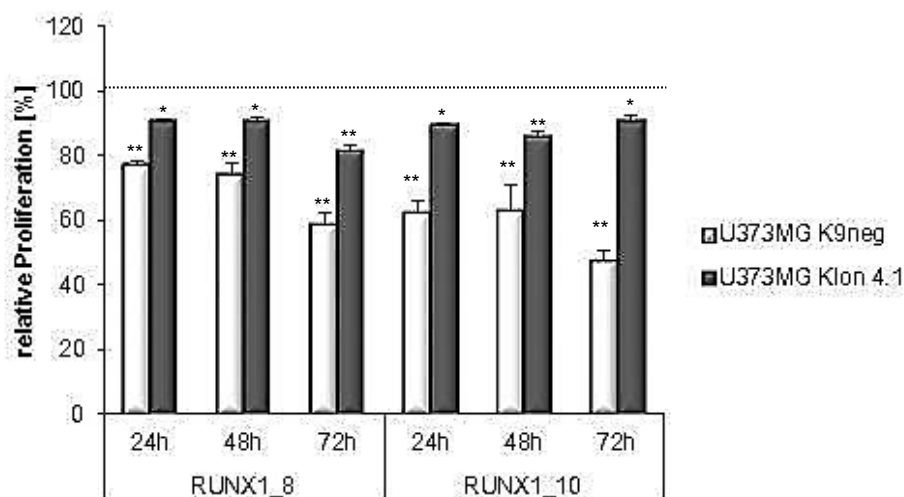
In Abb. 5.36 ist der RUNX1-knockdown auf Proteinebene 48 h nach der transienten Transfektion für die Zelllinien U373MG und U87MG dargestellt. Vergleicht man die jeweiligen kontrolltransfizierten Zellen (scr) (A, D, G, J), welche eine unveränderte RUNX1 Expression aufweisen, mit den dazugehörigen siRNA RUNX1\_8 (B, E, H, K) und RUNX1\_10 (C, F, I, L) transfizierten Zellen, so ist eine deutliche Reduktion des RUNX1 Proteinlevels zu erkennen. In M und N sind die jeweiligen Isotypenkontrollen gezeigt. Dementsprechend war davon auszugehen, dass der RUNX1-knockdown sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene erfolgreich etabliert werden konnte.

## 5.9 Funktionelle Analysen

Nach erfolgreicher Beeinflussung der RUNX1 Expression in den verwendeten Zellklonen mit stabil modifizierter SOX2 Expression, wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob der zuvor nachgewiesene Effekt von SOX2 bezüglich Proliferationsrate (vgl. 5.2.1 & 5.4.1) und Migrationsfähigkeit (vgl. 5.2.2 & 5.4.2) der Glioblastomzellen ebenfalls durch RUNX1 beeinflusst wird. Daher wurde sowohl die proliferative Aktivität, als auch die Migrationsfähigkeit der Zellen in Abhängigkeit der RUNX1 Expression analysiert.

### 5.9.1 Proliferationsanalyse

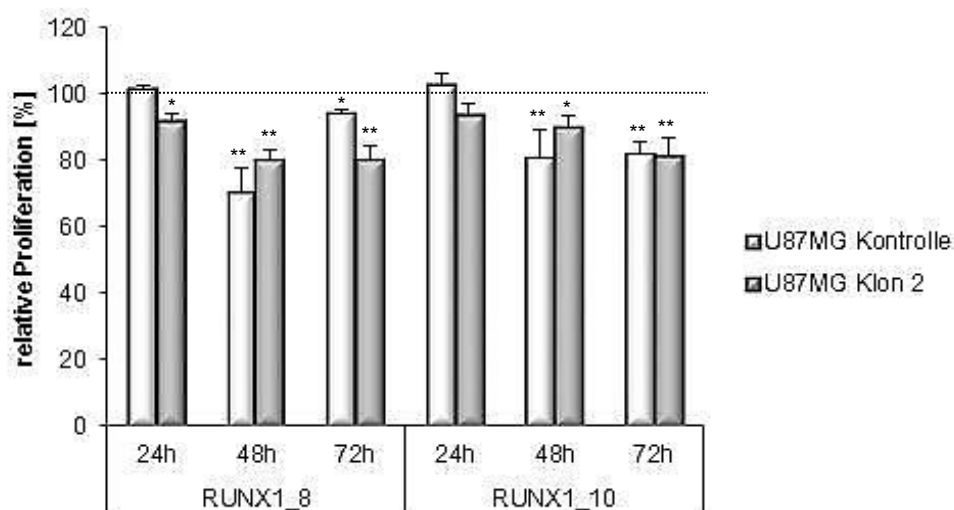
Um zu überprüfen, ob der SOX2-abhängige Proliferations-effekt in Zusammenhang mit der RUNX1 Expression steht, wurden MTT-Assays durchgeführt. Hierzu wurden der Klon 4.1 sowie die dazugehörige Kontrolle (K9neg) der Zelllinie U373MG, der Klon 2 und die Kontrolle der Zelllinie U87MG sowie Klon 5 mit Kontrolle der Zelllinie T98G verwendet. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und nach jedem Ansatz der RUNX1-*knockdown* erneut mittels qRT-PCR validiert. Die folgenden Abbildungen (5.38 – 5.40) zeigen die zusammengefassten Ergebnisse aller drei unabhängigen Experimente. Zur besseren Visualisierung wurden die Daten für jede Zelllinie getrennt dargestellt. Für die Auswertung wurde die Proliferationsrate der mit Kontroll siRNA-behandelten Zellen (*scr*) auf 100 % gesetzt (gestrichelte Linie). Dadurch wurde die Veränderung der Zellteilungsrate, welche durch den RUNX1-*knockdown* generiert wurde, sichtbar gemacht.



**Abb. 5.37: Proliferationsanalyse nach RUNX1-*knockdown* in U373MG Zellen**

Nach dem RUNX1-*knockdown* konnte zu allen Zeitpunkten in allen verwendeten Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. Alle Werte wurden auf die Kontrollsequenz (*scr*), welche auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie) bezogen. Der Effekt ist in den U373MG K9neg Zellen (normale SOX2 Expression) ausgeprägter als in den U373MG Klon 4.1 Zellen (SOX2-*knockdown*). Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler (SEM) ( $n=3$ ,  $*p < 0,05$   $**p < 0,01$ ).

Wie Abb. 5.37 zu entnehmen ist, zeigte die Reduktion der RUNX1 Expression einen signifikanten Unterschied in der proliferativen Aktivität sowohl in den Kontrollzellen (U373MG K9neg), als auch in den Zellen mit bereits verringerter SOX2 Expression (Klon 4.1). Die Zellteilungsrate lag bei den Kontrollzellen bei 77,0 % ± 0,9 % (24 h), 74,3 % ± 3,3 % (48 h) und 58,2 % ± 3,6 % (72 h) für die siRNA RUNX1\_8 sowie bei 62,1 % ± 3,8 % (24 h), 63,3 % ± 7,7 % (48 h), 48,5 % ± 3,2 % (72 h) bei Verwendung der RUNX1\_10 siRNA. Da diese Kontrollzellen eine unveränderte SOX2 Expression aufwiesen, konnte der beobachtete Effekt allein auf die reduzierte RUNX1 Expression zurückgeführt werden. Bei dem SOX2-*knockdown* Klon 4.1 resultierte der RUNX1-*knockdown* ebenfalls in einer signifikant verringerten proliferativen Aktivität der Zellen. Jedoch war dieser Effekt nicht so ausgeprägt wie bei den Kontrollzellen. Hier konnten Werte von 91,0 % ± 0,6 % (24 h), 91,2 % ± 1,3 % (48 h), 82,3 % ± 1,3 % (72 h) für die RUNX1\_8 Sequenz, sowie 89,1 % ± 0,7 % (24 h), 86,1 % ± 2,0 % (48 h), 91,3 % ± 1,7 % (72 h) bei Verwendung der siRNA RUNX1\_10 gemessen werden.

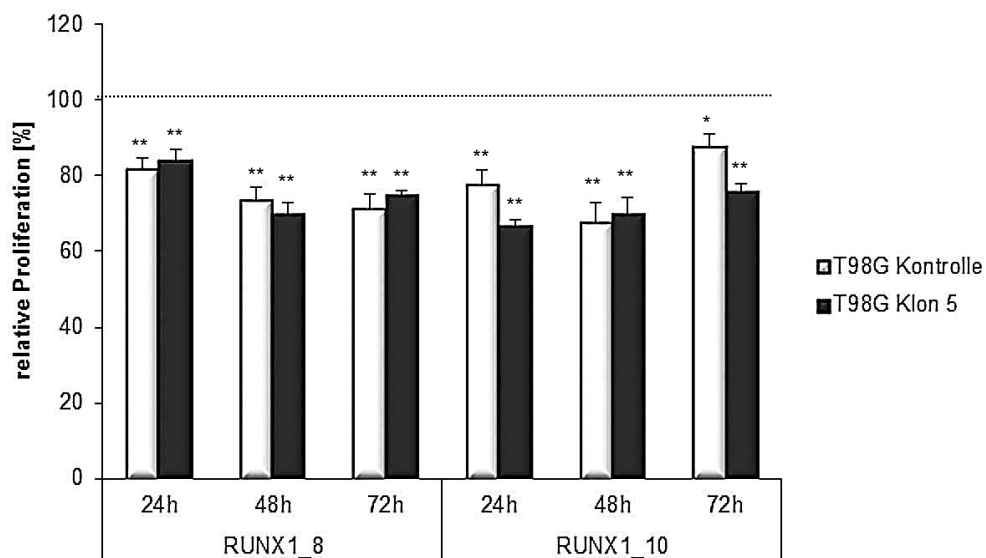


**Abb. 5.38: Proliferationsanalyse nach RUNX1-*knockdown* in U87MG-Zellen**

Die Analyse der Proliferation nach RUNX1-*knockdown* zeigte in der Zelllinie U87MG ebenfalls eine signifikante Reduktion der proliferativen Aktivität. Alle Werte wurden auf die Kontrollsequenz (*scr*), welche auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie) bezogen. Bei beiden siRNAs (RUNX1\_8 und RUNX1\_10) konnte in den Kontrollzellen erst 48 h nach der Transfektion ein signifikanter Effekt beobachtet werden. Hingegen zeigen die Zellen mit SOX2 Überexpression (Klon 2) (mit Ausnahme der siRNA RUNX1\_10, 24 h) eine, verglichen mit der Kontrolle (*scr*), zu allen Zeitpunkten signifikant reduzierte Zellteilungsrate. Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler (SEM) (n=3, \*p<0,05 \*\*p<0,01).

Wie in Abb. 5.38 dargestellt ist, konnte auch in der Zelllinie U87MG sowohl für die eingesetzte Kontrolle, als auch für die SOX2 überexprimierenden Zellen (Klon 2) nach dem *knockdown* von RUNX1 eine verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen (*scr*, 100 %, gestrichelte Linie), signifikant verringerte Proliferationsrate beobachtet werden. Der Kontrollklon zeigte nach 24 h bei beiden siRNAs noch keinen Effekt. Allerdings sank die Zellteilungsrate nach 48 h auf 70,8 % ± 6,6 % (RUNX1\_8) und 80,9 % ± 8,2 % (RUNX1\_10). Nach 72 h lagen die Werte bei 94,1 % ± 1,3 % (RUNX1\_8) sowie 82,9 % ± 5,5 %

(RUNX1\_10). Da die Kontrollzellen SOX2 negativ sind, konnten die beobachteten Effekte allein auf die reduzierte RUNX1 Expression zurückgeführt werden. Der Effekt des RUNX1-*knockdowns* auf die proliferative Aktivität war in dem SOX2 Überexpressionsklon U87MG Klon 2 partiell ausgeprägter. Hier zeigte sich bereits nach 24 h ein signifikanter Effekt für die siRNA (RUNX1\_8) mit einem Wert von 91,6 % ± 2,3 %. Nach 48 h konnte eine signifikante Reduktion der Zellteilungsrate auf 80,2 % ± 2,6 % (RUNX1\_8) und 89,6 % ± 3,7 % (RUNX1\_10) sowie 80,3 % ± 3,7 % (RUNX1\_8) und 81,3 % ± 5,5 % (RUNX1\_10) nach 72 h beobachtet werden.

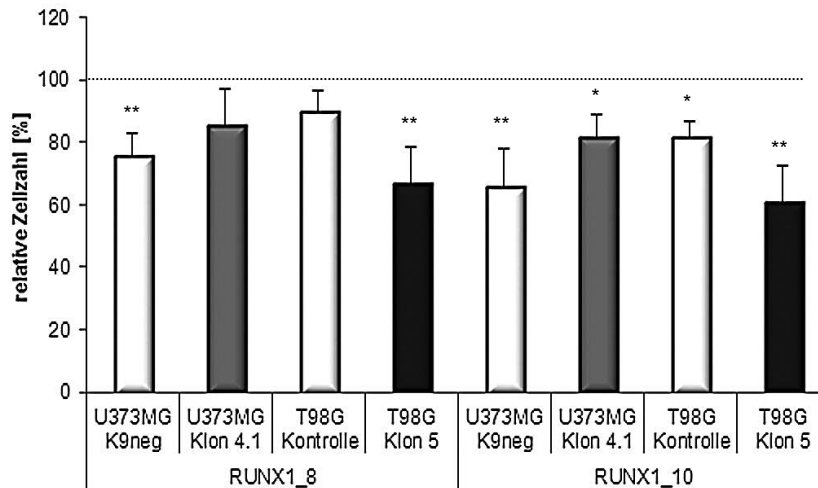


**Abb. 5.39: Proliferationsanalyse nach RUNX1-*knockdown* in T98G-Zellen**

Analog zu der SOX2 Überexpressionszelllinie U87MG konnte bei der Zelllinie T98G (ebenfalls mit SOX2 Überexpression) nach einem RUNX1-*knockdown* eine signifikante Reduktion der Proliferation beobachtet werden. Alle Werte wurden auf die Kontrollsequenz (*scr*), welche auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie), bezogen. Es wurde zu allen Zeitpunkten mit beiden siRNAs (RUNX1\_8 und RUNX1\_10) in allen verwendeten Zellen (T98G Kontrolle und T98G SOX2 Überexpression Klon 5) eine signifikante Reduktion der Zellteilungsrate, verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen (*scr*) beobachtet. Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler (SEM) (n=3, \*p<0,05 \*\*p<0,01).

Wie in Abb. 5.39 ersichtlich ist, konnte für die Zelllinie T98G (analog zu U87MG, vgl. 5.38) eine verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen (*scr*, 100 %, gestrichelte Linie) ebenfalls reduzierte proliferative Aktivität nach einem RUNX1-*knockdown* beobachtet werden. Die T98G Kontrollzellen wiesen eine Proliferationsrate von 81,6 % ± 2,9 % (RUNX1\_8) und 77,8 % ± 3,5 % (RUNX1\_10) nach 24 h, 73,5 % ± 3,6 % (RUNX1\_8) und 67,8 % ± 4,9 % (RUNX1\_10) nach 48 h sowie 71,3 % ± 1,5 % (RUNX1\_8) und 87,5 % ± 2,2 % (RUNX1\_10) nach 72 h auf. Da die Zellen SOX2 negativ sind, konnte der beobachtete Effekt allein auf die Reduktion der RUNX1 Expression zurückgeführt werden. Für den SOX2 Überexpressionsklon 5 konnten Werte von 84,9 % ± 3,0 % (RUNX1\_8, 24 h) und 66,7 % ± 1,7 % (RUNX1\_10, 24 h), 69,7 % ± 3,0 % (RUNX1\_8, 48 h) und 69,8 % ± 4,6 % (RUNX1\_10, 48 h) sowie 74,7 % ± 1,5 % (RUNX1\_8, 72 h) und 75,7 % ± 2,2 % (RUNX1\_10) detektiert werden.

Um die beobachteten Proliferationseffekte mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde erneut ein *RUNX1-knockdown* durchgeführt und die Zellen nach 48 h mittels eines Hämozytometers manuell ausgezählt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Proliferationsrate der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen erneut auf 100 % gesetzt (gestrichelte Linie).



**Abb. 5.40: Bestimmung der Zellzahl nach *RUNX1-knockdown* mittels Hämozytometer**

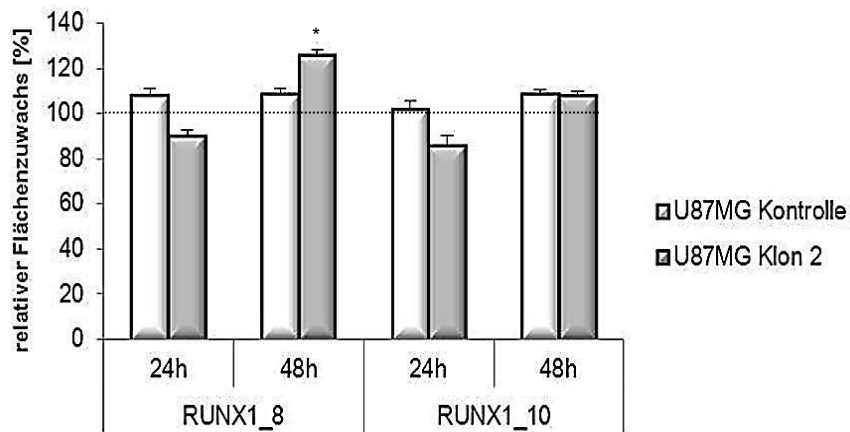
Um die mittels MTT-Assay gemessenen Proliferationseffekte zu validieren, wurde erneut in allen verwendeten Zelllinien ein *RUNX1-knockdown* durchgeführt und die Zellzahl nach 48 h manuell ermittelt (Auszählung mittels Neubauerkammer). Die Werte wurden jeweils auf die kontrolltransfizierten Zellen (*scr*), welche auf 100 % gesetzt wurden (gestrichelte Linie), bezogen. Wie bereits zuvor, konnte auch mit dieser Methode, mit Ausnahme der U373MG Klon 4.1 sowie T98G Kontrollzellen (siRNA *RUNX1\_8*), eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung (n = 2, \*p<0,05 \*\*p<0,01).

Wie in Abb. 5.40 zu erkennen ist, konnten mittels manueller Auszählung die Proliferations-effekte, welche zuvor durch den MTT-Assay gemessen wurden (vgl. Abb. 5.37 und 5.39), bestätigt werden. Mit Ausnahme des U373MG Klon 4.1 (*RUNX1\_8*) sowie des Kontrollklons der T98G-Zellen (*RUNX1\_8*), waren alle Werte (bezogen auf die *scr*-Kontrolle 100 %, gestrichelte Linie) signifikant reduziert. Den größten Effekt zeigten die T98G-Zellen (Klon 5) bei der siRNA *RUNX1\_8* mit einem Wert von 66,8 % ± 11,5 %. Bei der siRNA *RUNX1\_10* konnte die größte Auswirkung des *RUNX1-knockdown* bei den U373MG-Zellen (K9neg) mit einem Wert von 65,8 % ± 12,1 % beobachtet werden. Die Zellzahl war dementsprechend nach 48 h, im Vergleich zur *scr*-Kontrolle, um etwa ein Drittel reduziert.

### 5.9.2 Migrationsanalyse

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der reduzierten *RUNX1* Expression auf das Migrationsverhalten der Zellen mit Hilfe des Wundheilungsassays untersucht. Hierzu wurden analog zu den Proliferationsanalysen sowohl die *SOX2-knockdown* (U373MG) als auch die *SOX2* Überexpressionszelllinien (U87MG und T98G) verwendet. Es wurden je drei unab-

hängige Migrationsversuche mit jeweils 4 - 8 Ansätzen je Zelllinie und siRNA durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Flächenzuwachs der Verwundung der einzelnen Klone auf die dazugehörige kontrolltransfizierte Zelllinie (*scr*) bezogen (100 %, gestrichelte Linie). Abbildung 5.41 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Migrationsversuche für die Zelllinie U87MG.



**Abb. 5.41: Analyse des Migrationsverhaltens nach RUNX1-knockdown in U87MG Zellen**

Bei der Analyse der Zellmigration (gemessen anhand des Flächenzuwachses) konnte lediglich bei U87MG Klon 2 nach 48 h (siRNA RUNX1\_8) eine signifikant gesteigerte Migration der Zellen beobachtet werden. Zu allen anderen Zeitpunkten konnte, verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen (*scr*, 100 %, gestrichelte Linie), keine signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens gemessen werden. Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler (SEM) (n=3, \*p< 0,05).

Wie in Abb. 5.41 dargestellt ist, konnte mit Ausnahme von U87MG Klon 2 nach 48 h bei Verwendung der siRNA RUNX1\_8 (126 % ± 2,2 %), zu keinem Zeitpunkt und unabhängig von der SOX2 Expression (Kontrolle und SOX2 Überexpression) sowie der verwendeten siRNAs ein, verglichen mit der Kontrolle (*scr*, 100 %, gestrichelte Linie), signifikant verändertes Migrationsverhalten der Zellen beobachtet werden. Bei den U87MG Kontrollzellen wurde ein relativer Flächenzuwachs von 108,3 % ± 2,6 % (RUNX1\_8) und 101,7 % ± 3,8 % (RUNX1\_10) nach 24 h und 108,8 % ± 2,3 % (RUNX1\_8) und 108,5 % ± 2,2 % (RUNX1\_10) nach 48 h beobachtet werden. Der SOX2 Überexpressionsklon 2 zeigte nach 24 h eine Reduktion des Flächenzuwachses auf 90,4 % ± 4,6 % (RUNX1\_8) und 86,2 % ± 5,3 % (RUNX1\_10). Nach 48 h hingegen konnte eine Steigerung des Flächenzuwachses auf 107,8 % ± 1,8 % (RUNX1\_10), verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bestätigten sich ebenfalls für die Zelllinien U373MG und T98G (Daten nicht gezeigt). Folgerichtig scheint RUNX1 (unabhängig vom SOX2 Expressionsstatus der Zellen) keinen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten der drei verwendeten Zelllinien auszuüben.



## Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in allen drei untersuchten Zelllinien (U373MG, U87MG und T98G) durch die Herunterregulation von RUNX1 eine Reduktion der proliferativen Aktivität beobachtet werden konnte. In den Zellen mit unveränderter SOX2 Expression (Kontrollen) konnte dieser Effekt direkt auf die reduzierte RUNX1 Expression zurückgeführt werden (vgl. Abb. 5.37 – 5.39). Darüber hinaus konnte bei den Zellen, welche bereits durch den SOX2-*knockdown* langsamer proliferieren (U373MG Klon 4.1 vgl. 5.2.1), eine zusätzliche Reduktion der Zellteilungsrate durch die Herunterregulation von RUNX1 beobachtet werden (vgl. 5.9.1). Ferner resultiert der RUNX1-*knockdown* in den SOX2 Überexpressionklonen (U87MG Klon 2 und T98G Klon 5) in einer Verringerung der durch die ektopische SOX2 Expression zuvor gesteigerten Proliferation dieser Zellen (vgl. 5.4.1). Vor dem Hintergrund der physiologischen SOX2/RUNX1 Interaktion liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen synergistischen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren bezüglich der proliferativen Aktivität von Glioblastomzellen *in vitro* handelt.

Hingegen konnte für die Migrationseigenschaften der Zellen ein derartiger Zusammenhang nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zum migrationshemmenden SOX2 Effekt (vgl. 5.2.2 & 5.4.2) konnte durch eine Reduktion der RUNX1 Expression in keiner verwendeten Zelllinie eine signifikante Änderung des Migrationsverhaltens beobachtet werden. Da ebenso die Kontrollen mit unveränderter SOX2 Expression keinen RUNX1-abhängigen Effekt zeigten ist davon auszugehen, dass RUNX1 die Migration von Glioblastomzellen, unabhängig vom SOX2 Expressionsstatus, nicht beeinflusst.

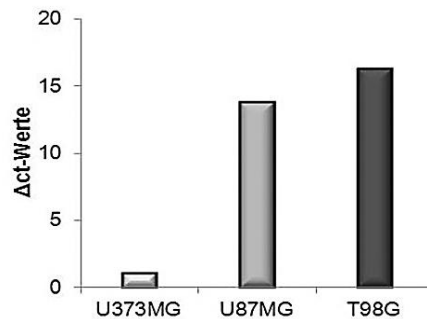
## 5.10 Doppelknockdown Analysen von SOX2 und GFAP $\delta$

### 5.10.1 *Knockdown* von SOX2 und GFAP $\delta$

Analog zu den durchgeführten Experimenten mit RUNX1 sollten funktionelle Analysen mit GFAP $\delta$  folgen. Dazu wurde ein GFAP $\delta$ -spezifischer *knockdown* in den vorliegenden SOX2-*knockdown* Klonen (U373MG) etabliert. Anschließend sollte das Proliferations- und Migrationsverhalten der modifizierten Zellen analysiert werden. Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass GFAP eine relativ hohe Halbwertszeit von 7 - 8 Tagen aufweist (Chiu und Goldman, 1984), konnte ein siRNA-vermittelter *knockdown* nicht durchgeführt werden. Zudem erschwert die starke Homologie zwischen GFAP $\alpha$  und GFAP $\delta$  (vgl. Abb. 5.22) den spezifischen *knockdown* immens. Aufgrund dessen wurden die GFAP $\delta$  *knockdown* Klone in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Hol (*Netherlands Institute of Neuroscience*, NIN, Amsterdam) generiert.

### 5.10.2 GFAP $\delta$ Expressionsanalyse

Zunächst wurden die schon zuvor verwendeten Zelllinien (U373MG, U87MG und T98G) auf den Expressionsstatus von GFAP $\delta$  hin überprüft (vgl. Abb. 5.42).



**Abb. 5.42: GFAP $\delta$  Expressionsanalyse in den humanen Glioblastomzelllinien auf mRNA-Ebene**

Exemplarisch sind die  $\Delta$ ct-Werte einer repräsentativen qRT-PCR für die drei Zelllinien U373MG, U87MG und T98G, welche anhand des *housekeeping* Gens GAPDH normiert wurden, dargestellt. Ein niedriger  $\Delta$ ct-Wert spricht in diesem Beispiel für eine relativ hohe GFAP $\delta$  Expression. Ein hoher  $\Delta$ ct-Wert dementsprechend für eine niedrige GFAP $\delta$  mRNA-Expression.

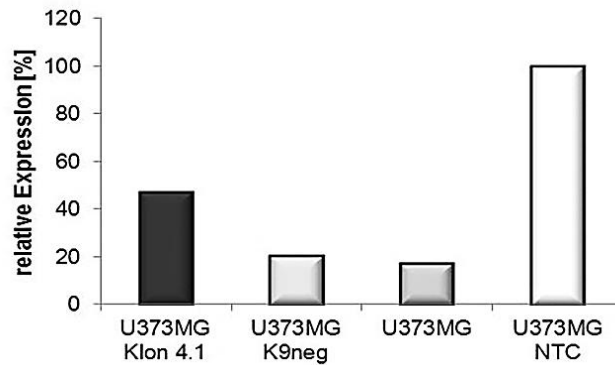
Wie aus Abb. 5.42 ersichtlich ist, weisen die U373MG Zellen eine relativ hohe GFAP $\delta$  Expression mit einem  $\Delta$ ct-Wert von 1,1 auf. Wohingegen sowohl die U87MG als auch die T98G sehr geringe Expressionslevel mit Werten von 13,8 respektive 16,3 zeigten. Da bei diesen Werten (U87MG & T98G) eine äußerst geringe Expression anzunehmen ist, war die Wahrscheinlichkeit einen hinreichenden *knockdown* für die funktionellen Analysen generieren zu können sehr gering. Dementsprechend wurde für die weiteren Versuche nur die Zelllinie U373MG berücksichtigt.

### 5.10.3 Etablierung des GFAP $\delta$ *knockdowns*

Der GFAP $\delta$ -*knockdown* wurde in unveränderten U373MG-Zellen (Wildtyp, WT), dem SOX2 *knockdown* Klon 4.1 sowie der dazugehörigen Kontrolle (K9neg) durchgeführt. Dazu wurden GFAP $\delta$  spezifische shRNA-Sequenzen mittels eines Lentiviralen-Systems in die U373MG-Zellen eingeschleust (virale Transduktion). Als Kontrolle diente eine nichtbindende shRNA-Sequenz (NTC, *no targeting control*). Zur visuellen Kontrolle der Transduktionseffizienz wurde ein GFP-exprimierender Vektor verwendet. Zur Etablierung des *knockdowns* wurden zudem verschiedene MOI's (*multiplicity of infection*) ausgetestet. Dabei war zu beobachten, dass die GFAP $\delta$  transduzierten Zellen bei einem MOI von  $\geq 10$  bereits 5 Tage nach der Transduktion aufhörten zu wachsen und starben, wohingegen die Kontrollzellen (NTC) diesen Effekt nicht zeigten. Aufgrund dieser Tatsache konnten die Transduktionen nur mit einem MOI  $\leq 10$  durchgeführt werden.

#### 5.10.4 Nachweis des GFAP $\delta$ -*knockdowns* auf mRNA-Ebene

Fünf Tage nach der Transduktion wurde zur Überprüfung der *knockdown* Effizienz eine qRT-PCR durchgeführt (vgl. Abb. 5.43).



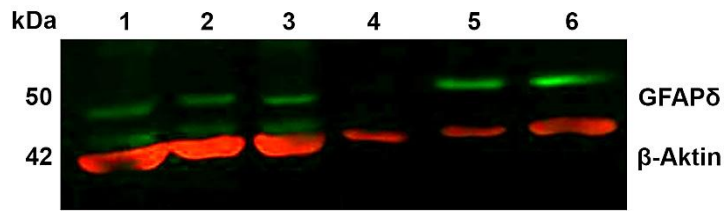
**Abb. 5.43: Nachweis des GFAP $\delta$ -*knockdowns* auf mRNA-Ebene in der Zelllinie U373MG**

Zur Überprüfung des *knockdowns* wurde eine qRT-PCR 5 Tage nach der Transduktion (MOI = 8) durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Restexpression von GFAP $\delta$  in den verwendeten Zelllinien U373MG Klon 4.1 (SOX2-*knockdown*), U373MG K9neg (Kontrolle) und U373MG (Wildtyp). Die Werte wurden auf den jeweiligen Kontrollklon (NTC, *no targeting control*) bezogen, welcher auf 100 % Expression gesetzt wurde. (GFAP $\delta$ -*knockdown* und qRT-PCR Experimente wurden in Kooperation mit M. Moeton, NIN, Amsterdam, durchgeführt).

Wie in Abb. 5.43 zu sehen ist, konnte in allen generierten Klonen ein *knockdown* auf mRNA-Ebene erzielt werden. Die Restexpression wurde jeweils auf die passende Kontrolle (NTC, 100 %) bezogen und betrug für den Klon K4.1 47,3 %, für den Klon K9neg 20,7 % sowie 17,5 % für die unmodifizierte Zelllinie U373MG.

#### 5.10.5 Nachweis des GFAP $\delta$ -*knockdowns* auf Proteinebene

Nach erfolgreichem Nachweis des GFAP $\delta$ -*knockdowns* auf mRNA-Ebene wurde dieser auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft. Dabei zeigte sich, dass zwischen den kontrolltransduzierten Zellen (NTC) und GFAP $\delta$ -*knockdown* Klonen kein Unterschied in der Proteinexpression zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Da dies ein Effekt der relativ geringen MOI, welche bei der Transduktion verwendet werden musste, sein könnte, wurden die Zellen anhand von GFP mittels FACS sortiert. Es wurde damit überprüft, ob die stark GFP-positiven Zellen (*high*, H) (vermeintlich hohe Transduktionsrate) einen effizienteren *knockdown* aufweisen (mehrere stabile Insertionen der sh-RNA in das Genom) als die gering GFP-exprimierenden Zellen (*low*, L). Nach der Sortierung in H- und L-Zellen wurden diese rekultiviert und das GFAP $\delta$  Expressionslevel mittels Western Blot erneut überprüft (vgl. Abb. 5.44).



**Abb. 5.44: Nachweis des GFAP $\delta$ -knockdowns auf Proteinebene**

Exemplarisch ist ein Western Blot zur Überprüfung des GFAP $\delta$ -knockdowns in den verwendeten U373MG Zellen dargestellt. **1:** U373MG Klon 4.1 – GFAP $\delta$ -knockdown (H) **2:** U373MG Klon 4.1 – GFAP $\delta$ -knockdown (L). **3:** U373MG Klon 4.1 NTC (H). **4:** U373MG Klon 4.1 NTC (L). **5:** U373MG Wildtyp – GFAP $\delta$ -knockdown (H) **6:** U373MG Wildtyp NTC (H). **rot:**  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle. **grün:** Nachweis von GFAP $\delta$  (50 kDa). (Western Blotanalysen wurden in Kooperation mit M. Moeton (NIN), durchgeführt).

Wie aus Abb. 5.44 ersichtlich ist, konnte sowohl in den sortierten H- als auch L-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (NTC) kein *knockdown* auf Proteinebene nachgewiesen werden (vgl. Spuren **1 + 3** u. **2 + 4** sowie **5 + 6**). Da die Beladung des Gels nicht gleichmäßig erfolgte (vgl. Intensität der roten Banden) wurde der Blot densitometrisch vermessen. Auch hierbei zeigte sich nur ein minimaler Expressionsunterschied. Die erneute Transduktion mit einer alternativen Viruscharge ergab analoge Ergebnisse. Auch hier konnte auf mRNA Ebene ein spezifischer GFAP $\delta$ -knockdown generiert werden, welcher sich jedoch nicht auf Proteinebene validieren ließ.

Aufgrund des nahezu unveränderten GFAP $\delta$  Proteinlevels konnten keine funktionellen Analysen des Proliferations- bzw. Migrationsverhaltens, welche möglicherweise Einblicke in das Zusammenspiel zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  in Glioblastomzellen ermöglicht hätten, durchgeführt werden.

**Zusammenfassung der Ergebnisse**

Auf mRNA Ebene konnte erfolgreich ein spezifischer GFAP $\delta$ -knockdown generiert und etabliert werden, welcher sich jedoch auch durch mehrfache Transduktionen sowie Variation diverser Parameter nicht auf Proteinebene validieren ließ. So konnte nur eine minimale Veränderung des GFAP $\delta$  Proteinlevels gemessen werden. Diese Daten lassen entweder eine sehr hohe Halbwertszeit von GFAP $\delta$  vermuten oder die Restexpression auf mRNA Ebene zwischen 17 % - 47 % (vgl. Abb. 5.43) ist ausreichend, um genügend Protein zu synthetisieren. Ebenso könnte es zu unbekanntem kompensatorischen Effekten kommen, um das GFAP $\delta$  Level auf Proteinebene konstant zu halten. Zudem bleibt anzumerken, dass es nach einem potentiell starken GFAP $\delta$ -knockdown (hohe Transduktionsrate, MOI > 10) bereits 5 Tage nach der Transduktion in den Zellen zu einem Wachstumsstopp mit anschließender Apoptose kam, wohingegen die kontrolltransfizierten Zellen (NTC) diesen Phänotyp nicht zeigten. Demnach war dieser Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den spezifischen GFAP $\delta$ -knockdown zurückzuführen. Demzufolge scheint GFAP $\delta$  streng reguliert zu werden und für U373MG Zellen zumindest *in vitro* essentiell zu sein.

## 6 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor SOX2, auf welchem das Hauptaugenmerk der vorliegenden Studie liegt, gilt als einer der Schlüsselfaktoren zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit embryonaler Stammzellen sowie adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen (Graham *et al.*, 2003; Bani-Yaghoub *et al.*, 2006; Favaro *et al.*, 2009; Adachi *et al.*, 2010). Mit fortschreitender Embryogenese wird die SOX2 Expression in den meisten Zellen des Organismus herunterreguliert. Lediglich im adulten Gehirn wird SOX2, und hier fast ausschließlich in Arealen in denen neurale Stammzellen lokalisiert sind (subventrikuläre Zone sowie *Gyrus dentatus* des Hippocampus), weiterhin exprimiert (Graham *et al.*, 2003; Ferri *et al.*, 2004). In den letzten Jahren erschienen zunehmend Veröffentlichungen, in denen SOX2 vermehrt mit der Pathogenese und/oder Progression verschiedener Tumorentitäten in Verbindung gebracht wurde (Comtesse *et al.*, 2005; Rodriguez-Pinilla *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Schmitz *et al.* beschrieben 2007 erstmals eine SOX2 Überexpression in Glioblastomen sowohl auf mRNA-Ebene als auch histologisch *in situ* (Schmitz *et al.*, 2007). Phi und Mitarbeiter bestätigten diese Ergebnisse und zeigen außerdem, dass SOX2 eher in glial-differenzierten, als in Tumoren neuronalen Ursprungs exprimiert wird (Phi *et al.*, 2008). Ferner ist die SOX2 Expression in den hyperzellulären sowie hyperproliferativen Bereichen von Glioblastomen konzentriert und korreliert überdies mit dem Malignitätsgrad der Tumoren (Annovazzi *et al.*, 2011). Während SOX2-Genamplifikationen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen, könnte die Tatsache, dass in 100 % der untersuchten humanen Glioblastomresektaten eine Hypomethylierung des SOX2 Promotors vorliegt eine plausible Erklärung für die SOX2 Überexpression in Glioblastomen darstellen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgedeckt werden konnten (Alonso *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass SOX2 auch in die Pathogenese und/oder Progression dieser malignen Neoplasie involviert ist.

Um ein detaillierteres Verständnis der durch SOX2 regulierten Mechanismen in Glioblastomen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Studie Proliferations- und Migrationsanalysen mit permanenten Glioblastomzelllinien durchgeführt. Dabei sollte die Auswirkung eines SOX2-*knockdowns* (*loss of function*) sowie einer SOX2 Überexpression (*gain of function*) zunächst *in vitro* analysiert und anschließend im Mausmodell *in vivo* überprüft werden. Da bereits bekannt ist, dass die durch SOX Proteine vermittelten Funktionen von zelltyp-spezifischen Interaktionspartnern abhängig sind (Kondoh und Kamachi, 2010), wurden Glioblastomspezifische SOX2-Interaktionspartner identifiziert, ausgewählte Kandidaten validiert und abschließend durch *Doppelknockdown*-Experimente sowie funktionelle Analysen die physiologische Relevanz der Interaktionen *in situ* untermauert.

## 6.1 Proliferationsanalyse mit SOX2-*knockdown* und Überexpressionsklonen

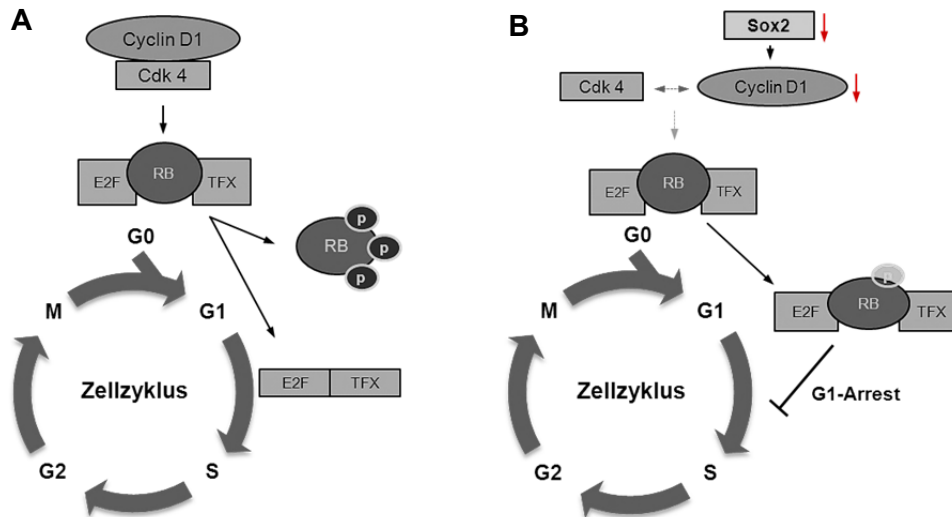
Der stabile SOX2-*knockdown* konnte mittels 4 spezifischer shRNA-Konstrukte erfolgreich in der Glioblastomzelllinie U373MG etabliert werden. Die Restexpression der für die funktionellen Analysen ausgewählten Klone variierte zwischen 19 % - 39 % auf mRNA-Ebene sowie 8 % - 65 % auf Proteinebene. Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde in der vorliegenden Studie anhand der respiratorischen Aktivität (Stoffwechselrate), welche proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist, analysiert. Einhergehend mit dem SOX2-*knockdown* kann eine in allen verwendeten Klonen signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation nachgewiesen werden (vgl. 5.2.1). Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine stabile Überexpression in den beiden SOX2-defizienten Glioblastomzelllinien U87MG sowie T98G in Kooperation mit Prof. Dr. A. Temme (TU-Dresden) generiert. In diesen Zellen ist der genau gegenteilige Effekt zu beobachten. So konnte durch die ektopische SOX2 Expression eine in allen getesteten Klonen signifikante Steigerung der Zellteilungsrate detektiert werden (vgl. 5.4.1). Es ist jedoch kein Unterschied in der Intensität des SOX2 vermittelten Effektes zwischen den verschiedenen Klonen derselben Zelllinie, als auch zwischen den beiden Zelllinien selbst zu beobachten, welches einen dosisabhängigen Effekt unwahrscheinlich macht. Aufgrund dieser Daten liegt jedoch die Vermutung nahe, dass SOX2 in Glioblastomzellen ein essentieller Faktor zur Regulation der proliferativen Aktivität ist. Interessanterweise exprimieren die T98G-Zellen eine mutierte Form des Tumorsuppressorproteins 53, die U87MG-Zellen hingegen Wildtyp p53. Dies führt zu der Annahme, dass der durch SOX2 vermittelte Proliferationseffekt unabhängig der p53-Signalkaskade verläuft. Ebenso ist eine SOX2-abhängige Inhibition von p53 vorstellbar. Es stellt sich folgerichtig die Frage, in welche molekularen Mechanismen SOX2 involviert ist, respektive welche Signalwege durch SOX2 reguliert/kontrolliert werden, um die Proliferation der Glioblastomzellen *in vitro* entscheidend zu beeinflussen. Es konnte bereits in Mammakarzinomzellen gezeigt werden, dass ein siRNA vermittelter SOX2-*knockdown* zu einer spezifischen Akkumulation der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und somit zu einer verminderten Proliferationsrate führt (Chen *et al.*, 2008). Wohingegen die SOX2 Überexpression in MCF-7 Zellen, bei welchen zuvor SOX2 ausgeschaltet wurde (*rescue*), in einem Übergang der Zellen von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus resultiert und eine erhöhte proliferative Aktivität zur Folge hat (Chen *et al.*, 2008). Zusätzlich führt der SOX2-*knockdown* zu einem verminderten Koloniebildungspotential sowohl in Brustkrebszellen (Chen *et al.*, 2008; Stolzenburg *et al.*, 2012), als auch in Glioblastomzellen (Oppel *et al.*, 2011; Rüter *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht), welches sowohl ein Merkmal für eine reduzierte Tumorgenität, als auch eine verminderte proliferative Aktivität der Zellen darstellt. Die ersten Hinweise, dass analoge SOX2 kontrollierte Mechanismen auch für die Deregulation des Zellzyklus in Glioblastomen und somit die Steuerung des Wachstums

verantwortlich sein könnten stammen von Gangemi *et al.* Sie kultivierten BTSCs aus humanen Glioblastomresektaten unter stammzellerhaltenden Bedingungen (serumfreie Kultivierung) und konnten zeigen, dass ein SOX2-*knockdown* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer fortschreitenden Reduktion der Proliferation der primären Tumorstammzellen führt und diese nach etwa 5 Wochen fast vollständig aus der *in vitro* Kultur „verschwinden“. Sie postulierten daraufhin, dass SOX2-defiziente Tumorzellen nicht mehr in der Lage sind sich unbegrenzt zu teilen, den Zellzyklus allmählich verlassen, terminal differenzieren und vermutlich sterben (Gangemi *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit ein fortschreitender „Exit“ aus dem Zellzyklus in der permanenten Glioblastomzelllinie U373MG nicht beobachtet werden. Wenngleich durch den SOX2-*knockdown* die Proliferationsrate in den U373MG Zellen signifikant reduziert wird, sind die Zellen weiterhin in der Lage sich unbegrenzt, allerdings wesentlich langsamer zu teilen, was eher eine „Verlangsamung“ bzw. „Verlängerung“ des Zellzyklus als einen Zellzyklusarrest vermuten lässt. Dementsprechend scheint es einen Unterschied in der SOX2-abhängigen Regulation der Proliferation zwischen primären Tumorstammzellen (BTSCs) und permanent kultivierten Glioblastomzelllinien zu geben. Eine triviale Erklärung hierfür wäre, dass selbst eine geringe SOX2 Expression ausreicht, um einen vollständigen Zellzyklusarrest zu verhindern, wohingegen der SOX2-*knockout* zum Zellzyklus-Exit führt. Dies legt einen dosisabhängigen SOX2 Effekt zu Grunde, welcher bereits in anderen Zusammenhängen beschrieben worden ist (Ferri *et al.*, 2004; Taranova *et al.*, 2006). Eine derartige Auswirkung bezüglich der Proliferation konnte jedoch in den drei verwendeten Zelllinien mit modifizierter SOX2 Expression (*knockdown* und Überexpression) in dieser Studie nicht beobachtet werden (vgl. 5.2.1 & 5.4.1). Der Unterschied könnte auch dadurch erklärbar sein, dass die permanenten Tumorzelllinien durch die Langzeitkultivierung ihr Genexpressionsprofil der veränderten Umgebung (2D-Matrix) angepasst haben. Wohingegen primäre Zellen unter alternativen Bedingungen kultiviert werden und direkt aus der physiologischen 3D-Umgebung des Gehirns stammen, somit differentielle Expressionsprofile aufweisen, welches eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt. Zusätzlich sind primäre Tumoren, im Gegensatz zu permanenten Zelllinien, sehr heterogen und weisen Zellpopulationen in verschiedenen Differenzierungsstadien auf (Lee *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2007). Ferner könnten die unterschiedlichen genetischen Hintergründe zwischen primären BTSCs und Glioblastomzelllinien sowie distinkten Mutationen, die im Laufe der Tumorentstehung akkumulieren, eine sinnvolle Erklärung darstellen. Es wird bereits seit längerem diskutiert, ob primäre, aus Glioblastompatienten gewonnene und entsprechend kultivierte Tumorzellpopulationen ein im Gegensatz zu etablierten Zelllinien geeigneteres Modellsystem darstellen, die Biologie dieser Tumoren widerzuspiegeln (Lee *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund sind möglicherweise die Daten von Gangemi den im Glioblastom

vorherrschenden Prozessen physiologisch „näher“ und zeigen in SOX2 einen noch essentielleren Faktor für die Regulation der proliferativen Aktivität in Tumorzellen, als die Daten, welche aus permanenten Zelllinien gewonnen werden können. Nichtsdestotrotz scheint SOX2 die proliferative Aktivität nicht nur von Hirntumorstammzellen, sondern auch von Tumorzellen die keine stammzellähnlichen Eigenschaften aufweisen (permanente Zelllinien), wenn auch in unterschiedlich stark ausgeprägter Weise, entscheidend zu beeinflussen.

Eine Analyse der molekularen Mechanismen sowie der an der SOX2 kontrollierten Zellzyklusregulation beteiligten Faktoren und *downstream*-Effektoren in Glioblastomen wurde kürzlich von Oppel *et al.* vorgestellt. So geht der SOX2-*knockdown* mit einer deutlich reduzierten Expression von CCND1 (Cyclin D1) einher, wohingegen die Cyclin E Expression unverändert bleibt (Oppel *et al.*, 2011). Diese SOX2-abhängige Reduktion der Cyclin D1 Expression konnte auf mRNA-Ebene (U373MG-Zellen) auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden (Rüther *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Ob die erhöhte Proliferationsrate in den SOX2 Überexpressionsklonen ebenfalls mit einer gesteigerten Expression von Cyclin D1 einhergeht oder über andere Mechanismen reguliert wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht evaluiert werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Cyclin D1 stellt einen bereits seit langem gut charakterisierten Schlüsselfaktor bei der G<sub>1</sub>/S-Phase Transition des Zellzykluses dar (Sherr, 1994). Es bildet zusammen mit CDK4 oder CDK6 (*cyclin-dependent kinase 4/6*) funktionelle Komplexe, welche Mitglieder der RB-Proteinfamilie (Retinoblastom) phosphorylieren können. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aktiviert und diese leiten über weitere Effektoren die S-Phase des Zellzykluses ein (Kato *et al.*, 1993; Musgrove *et al.*, 2011). Ein analoger SOX2 kontrollierter Mechanismus scheint in gleicher Weise in Brustkrebszellen vorzuliegen. Auch hier konnte eine SOX2-abhängige Cyclin D1 Regulation gezeigt werden, wohingegen die Expression anderer wichtiger Zellzyklusproteine (Cyclin E, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>) von SOX2 nicht beeinflusst zu werden scheint (Chen *et al.*, 2008). Neben der verminderten Cyclin D1 Expression konnte in Glioblastomzellen zusätzlich eine reduzierte Phosphorylierung des Retinoblastomproteins an Threoninrest 356, welcher durch den Cyclin D1-CDK4-Komplex phosphoryliert wird, gezeigt werden, wobei die Expression des RB-Proteins an sich unverändert bleibt (Oppel *et al.*, 2011). Dies stützt die Hypothese, dass die SOX2-abhängige Reduktion der Cyclin D1 Expression die Ausbildung des Cyclin D1-CDK4-Komplexes erheblich beeinflusst. Dies führt zu einer Hypophosphorylierung des RB-Proteins, welches die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie unterbindet und letztendlich in einem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Zellzyklusarrest der Zelle resultiert (vgl. Abb. 6.1).





**Abb. 6.1: Theoretisches Modell des SOX2 Einflusses auf die G<sub>1</sub>/S-Phase Transition in Glioblastomzellen**  
 Dargestellt ist ein stark vereinfachtes Modell des Zellzyklus (A), sowie die Auswirkungen eines SOX2-*knockdowns* auf den Übergang der G<sub>1</sub>/S-Phase (B). **A:** zeigt den eigentlichen Ablauf der G<sub>1</sub>/S-Phase Transition des Zellzyklus. Cyclin D1 bindet und aktiviert CDK4. Dieser funktionelle Komplex phosphoryliert ein RB-Protein, welches dadurch den inhibitorischen Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren E2F und TFX (TFX = weitere Zellzyklus regulierende Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-fos, jun etc.) verliert. Die so freigesetzten und aktivierten Transkriptionsfaktoren sorgen ihrerseits durch weitere Effektoren für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus. **B:** durch einen SOX2-*knockout* in Glioblastomzellen (roter Pfeil) kommt es zu einer stark reduzierten Cyclin D1 Expression (roter Pfeil). Dadurch wird die Ausbildung des Cyclin D1/CDK4 Komplexes beeinträchtigt (graue Pfeile), welcher anschließend nicht mehr in der Lage ist eine hinreichende Phosphorylierung des RB-Proteins zu gewährleisten. Dieses komplexiert dadurch die für den Übergang in die S-Phase notwendigen Transkriptionsfaktoren E2F + TFX, wodurch es zu einem putativen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase kommt. (Das Modell fasst die derzeit bekannten und nachgewiesenen molekularen Effekte von SOX2 in Glioblastomzellen zusammen und dient lediglich der Veranschaulichung.

Gegensätzliche Daten wurden kürzlich in humanen Magenkrebszellen erhoben, welche den Anschein erwecken, dass eine SOX2 Expression eine proliferationshemmende Wirkung zu haben scheint (Otsubo *et al.*, 2008). Interessanterweise geht eine SOX2 Überexpression in Magenkrebszelllinien mit einer reduzierten Cyclin D1 Expression sowie einer Hypophosphorylierung des Retinoblastomproteins einher. Ebenso kommt es zu einer SOX2 vermittelten Erhöhung der p27<sup>Kip1</sup> Expression, einem Inhibitor von CDK4 und somit zu einem SOX2-abhängigen Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Otsubo *et al.*, 2008). Außerdem scheint SOX2 die Apoptose dieser arretierten Zellen durch Aktivierung von Caspase 3 (Prozessierung von Pro-Caspase 3) zu steuern. Dies legt die Vermutung nahe, dass SOX2 in Magenkarzinomen sogar als Tumorsuppressor fungieren könnte und somit in diversen Tumorentitäten analoge molekulare Mechanismen ambivalent zu regulieren vermag. Diese Hypothese wird durch eine kürzlich erschienene Studie von Zhang *et al.* gestützt, welche eine erhöhte SOX2 Expression in Magenkrebspatienten mit einem längeren Überleben in Verbindung bringt (Zhang *et al.*, 2010). Ebenso konnten Wilbertz *et al.* zeigen, dass eine SOX2-Genamplifikation und Überexpression mit einer besseren Prognose sowie signifikant längeren Überlebenszeiten von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge korreliert (Wilbertz *et al.*, 2011). Eine SOX2-Involvierung in apoptotische Prozesse, wie sie für

Magenkrebszellen beschrieben wurde, konnte jedoch weder in Glioblastomzellen, welche keinerlei SOX2-abhängige Caspase 3 Aktivität zeigen (Oppel *et al.*, 2011), noch in Brustkrebszellen beobachtet werden (Chen *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Studie sind makroskopisch keinerlei apoptotische Anzeichen nach einem SOX2-*knockdown* respektive einer SOX2 Überexpression in den drei verwendeten Zelllinien beobachtet worden.

Vor dem Hintergrund der proliferationsstimulierenden Wirkung sowohl in Mammakarziomen als auch Glioblastomen scheint SOX2 in diesen Neoplasien eher onkogene Eigenschaften aufzuweisen. Die augenscheinliche Diskrepanz der differierenden SOX2-Funktion in verschiedenen Tumorentitäten könnte damit erklärt werden, dass SOX2 gewebe- oder sogar zelltypabhängige Interaktionspartner aufweist, wodurch die Spezifität erst vermittelt zu werden scheint (Kamachi *et al.*, 2000; Kondoh und Kamachi, 2010). Es ist durchaus vorstellbar, dass SOX2 in Abhängigkeit des jeweiligen genetischen Kontextes in einigen Tumorentitäten onkogene und somit progressionsfördernde Eigenschaften hat, in anderen Neoplasien hingegen als Tumorsuppressor fungiert, je nach Beteiligung der unterschiedlichen Kofaktoren und Signalkaskaden. Dementsprechend sollte der Fokus weiterführender Studien verstärkt auf die Identifikation der Tumorentitätsspezifischen SOX2 Interaktionspartner gerichtet werden, um die durch SOX2 regulierten molekularen Mechanismen im Detail noch besser verstehen zu können.

## 6.2 Migrationsanalyse mit SOX2-*knockdown* und Überexpressionsklonen

Ein entscheidender Faktor für die hohe Malignität von Glioblastomen ist die frühe und diffuse Invasion einzelner Tumorzellen in das umliegende Hirngewebe, welches eine komplette Resektion der Neoplasie nahezu ausschließt und erfolgreiche Therapien extrem erschwert. Infolgedessen ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Tumorzellmigration und Invasion von enormer klinischer Bedeutung.

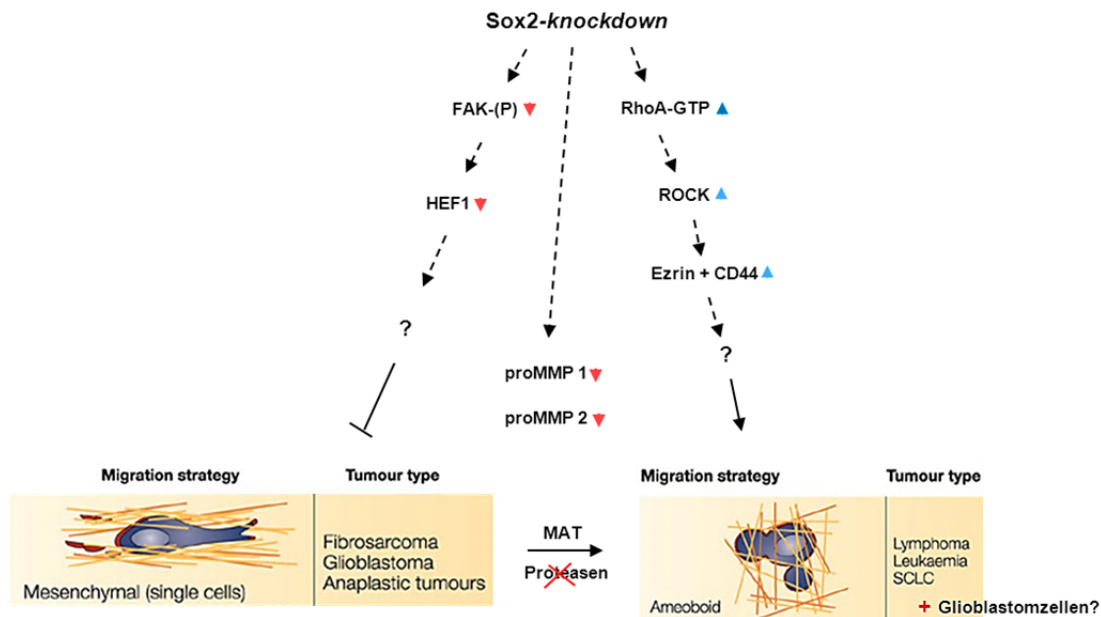
Die in der vorliegenden Studie durchgeführten Migrationsanalysen zeigen eine signifikante Steigerung der Tumorzellmigration in den SOX2-*knockdown* Zellen. In Konsens zu den Proliferationsexperimenten kann auch hier kein dosisabhängiger SOX2-Effekt beobachtet werden (Abb. 5.5). Zwar zeigen die Klone mit dem effizienteren SOX2-*knockdown* (K4.1 & K4.3) in den U373MG-Zellen nach 24 h einen deutlich ausgeprägteren Effekt, der aber bereits nach 48 h den Klonen mit höherer SOX2 Restexpression (K1.4 & K2.9) angeglichen ist. In den SOX2 Überexpressionsklonen zeigen sich erneut entgegengesetzte Auswirkungen. Die SOX2 Überexpression geht mit einer reduzierten Migration einher, wobei es zwischen den beiden Zelllinien einen Unterschied in der Intensität zu geben scheint (Abb. 5.9). So zeigen die U87MG Klone einen stärker ausgeprägten Effekt als die T98G-Zellen. Dies könnte einerseits damit erklärt werden, dass die T98G-Zellen, im Gegensatz zu den

U87MG, sehr konfluent wachsen und nach der Verwundung des Zellrasens beim Wundheilungsassay eine längere „Regenerationszeit“ benötigen, als die U87MG-Zellen. Andererseits könnten ebenso differentielle Mechanismen involviert sein, da beide Zelllinien distinkte genetische Unterschiede und Expressionsmuster aufweisen (Ishii *et al.*, 1999; Demuth *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz ist hier ebenfalls zwischen den einzelnen Klonen derselben Zelllinie (mit unterschiedlich ausgeprägter SOX2 Expression) kein dosisabhängiger Effekt erkennbar. Interessanterweise scheint die erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der Zellen nach SOX2-*knockdown* unabhängig vom extrazellulären Milieu (EZM) zu sein und somit zellautonom reguliert zu werden, da die Migrationsexperimente (Wundheilungsassays) auf unbeschichteten Oberflächen durchgeführt worden sind.

Bisher wurden nur wenige Studien veröffentlicht, welche SOX2 mit der Steuerung der Migration in Verbindung bringen und diese zeigen zudem gegensätzliche Ergebnisse. Graham *et al.* berichteten, dass eine Inhibierung von SOX2 in neuralen Vorläuferzellen zum Mitose-exit, den Beginn der Differenzierung sowie die Migration der Zellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) zur Folge hat (Graham *et al.*, 2003). Eine Herunterregulation von SOX2 wurde außerdem in migrierenden Neuralleistenzellen des sich entwickelnden Embryos beobachtet, welches ebenso einen inhibitorischen Einfluss von SOX2 auf die Zellmigration vermuten lässt (Wakamatsu *et al.*, 2004). In neoplastischen Lungenepithelzelllinien wurde erst kürzlich gezeigt, dass eine SOX2 Überexpression mit einer gesteigerten Zellmigration einhergeht, wohingegen das Invasionsverhalten der Zellen unverändert bleibt (Hussenet *et al.*, 2010). Gestützt werden diese Daten durch die Beobachtung, dass die Herunterregulation von SOX2 in einer murinen Lungenkarzinomzelllinie eine verminderte Migrationsfähigkeit *in vitro* sowie ein reduziertes Metastasierungspotential *in vivo* zur Folge hat (Xiang *et al.*, 2011). Weitere Hinweise, welche SOX2 mit der Zellmigration in Verbindung bringen stammen von Han *et al.* Sie konnten zeigen, dass der SOX2-*knockdown* mit einer reduzierten Migrations- und Invasionsfähigkeit von kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* sowie einer geringeren Metastasierungsfähigkeit *in vivo* einhergeht. Dieser Effekt ist möglicherweise das Resultat einer verminderten Aktivität der Gelatinase MMP2, wohingegen die MMP9-Aktivität durch den SOX2-*knockdown* nicht beeinflusst zu werden scheint (Han *et al.*, 2012). Beide Matrix-Metalloproteinasen sind bereits mehrfach auch mit dem invasiven Verhalten von Glioblastomzellen in Verbindung gebracht worden (Levicar *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Tumorzellen nach dem SOX2-*knockdown* ihre eher mesenchymale (spindelartige) Morphologie hin zu einer epithelialen (rundlichen) Form (MET, mesenchymal-epitheliale-Transition) ändern. Die molekularen Analysen zeigen, dass der SOX2-*knockdown* mit einer reduzierten Expression von Vimentin, einem Marker für mesenchymale Zellen, und den Transkriptionsfaktoren Snail

und Slug sowie einer erhöhten E-Cadherin Expression einhergeht, was eine Involvierung von SOX2 in die epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) vermuten lässt (Han *et al.*, 2012). Dieser Prozess scheint über die WNT-Signalkaskade reguliert zu werden, deren Aktivität nach SOX2-*knockdown* ebenfalls reduziert ist, welches möglicherweise durch eine Re-Lokalisation von nukleärem zu membranassoziierten  $\beta$ -Catenin nach SOX2-*knockdown* verursacht wird (Han *et al.*, 2012). Diese Beobachtung stellt eine Parallele zu den Daten von Chen *et al.* dar, welche eine direkte physikalische Interaktion zwischen SOX2 und  $\beta$ -Catenin, bereits zuvor in Brustkrebszellen zeigen konnten (Chen *et al.*, 2008).

Änderungen der Zellmorphologie sowie eine Reorganisation des Zytoskelettes mit einer Akkumulation von kortikalem Aktin und einer Reduktion von Stressfasern nach *knockdown* von SOX2 kann ebenso in den U373MG-Zellen beobachtet werden, jedoch gibt es makroskopisch keine Tendenzen einer mesenchymal-epithelialen-Transition (MET) der Glioblastomzellen *in vitro* (Rüther *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Neben den Daten, die in der vorliegenden Studie erhoben wurden, gibt es bis heute lediglich eine weitere Veröffentlichung, die SOX2 mit der Migration von Glioblastomzellen in Verbindung bringt. So beobachteten Oppel *et al.* ebenfalls morphologische Veränderungen, eine Remodulation des Aktinnetzwerkes an der Plasmamembran sowie eine verminderte Adhäsionsfähigkeit nach SOX2-*knockdown* in U343MG und U373MG Glioblastomzellen. Auf molekularer Ebene zeigt sich eine reduzierte Phosphorylierung von FAK (*focal adhesion kinase*), eine Herunterregulation von NEDD9 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9*), einem *downstream* Effektor von FAK, sowie von pro-MMP1 und pro-MMP2 (inaktive Form der Matrix-Metalloproteinasen 1 und 2). Gleichzeitig konnte eine Erhöhung von GTP-gebundenem RhoA (aktive Form) detektiert sowie eine Anreicherung von Ezrin und CD44 in den einzelnen Membranfortsätzen beobachtet werden, welches für eine Veränderung des Migrationsphänotyps der SOX2-*knockdown* Zellen spricht (Oppel *et al.*, 2011). Oppel *et al.* postulierten daraufhin, dass die Glioblastomzellen nach einem SOX2-*knockdown* die Fähigkeit der proteolytisch-abhängigen, mesenchymalen Migration verlieren und dies durch einen *switch* zum amöboiden Migrationsmodus (mesenchymal-amöboide-Transition, MAT) kompensieren. Dass die amöboide Migration vornehmlich durch RhoA und seinen *downstream* Effektoren ROCK 1 & 2 (*RhoA-associated coiled-coil containing protein kinase*) im Zusammenspiel mit Ezrin reguliert wird (Sahai und Marshall, 2003; Parri und Chiarugi, 2010), stützt diese Hypothese. Darüber hinaus ist ein derartiger kompensatorischer Mechanismus seit längerem auch für Fibrosarkom- sowie Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* beschrieben worden. Die malignen Zellen scheinen dabei vom Proteolyse-abhängigen „path-generating“ (mesenchymalen) in den Proteolyse-unabhängigen „path-finding“ (amöboiden) Migrationsmodus zu wechseln (Wolf *et al.*, 2003).



**Abb. 6.2: Theoretisches Modell des SOX2-knockdown Effektes auf den Migrationsmodus von Glioblastomzellen**

Schematische Darstellung der molekularen Veränderungen durch den SOX2-knockdown. Nach dem SOX2-knockdown kommt es möglicherweise zur Hypophosphorylierung von FAK (FAK-P) sowie zu einer Herunterregulation von NEDD9, proMMP1 und proMMP2. Gleichzeitig führt dies zu einer Erhöhung des RhoA-GTP Levels (aktive Form), einer Anreicherung von Ezrin und CD44 an den Zellfortsätzen sowie einer Aktivierung von ROCK2, downstream von RhoA. Der SOX2-knockdown könnte somit in der mesenchymal-amöboiden-Transition (MAT) resultieren, welche charakterisiert ist durch eine Veränderung der Zellmorphologie sowie einer Proteolyse-unabhängigen, schnelleren Migration der Tumorzellen. **rote Pfeile:** Herunterregulation/geringere Aktivität. **blaue Pfeile:** erhöhte Aktivität/Anreicherung. **?:** bisher nicht untersuchte, möglicherweise involvierte Faktoren/Mechanismen. SCLC = *small cell lung cancer*. (mod. nach Oppel *et al.*, 2011; Friedl *et al.*, 2003).

Demgegenüber stehen die Daten von Han *et al.*, welche eine MET nach SOX2-knockdown in kolorektalen Karzinomzellen vermuten lassen (Han *et al.*, 2012). Analog zu den differentiellen SOX2 vermittelten Proliferationseffekten in diversen Tumorentitäten, scheint SOX2 auch bei der Steuerung der Migration zelltypspezifische Funktionen auszuüben und differenzielle, oder dieselben Signalwege in unterschiedlicher Weise zu beeinflussen (Lungentumoren = MET, Glioblastome = MAT). Ob daran ebenfalls verschiedene SOX2-Kofaktoren beteiligt sind, muss noch untersucht werden, erscheint aufgrund der bisher beschriebenen Veröffentlichungen jedoch mehr als wahrscheinlich.

Zudem stellen die Postulate von Oppel *et al.* ein Novum dar, weil für Gliomzellen bisher lediglich der mesenchymale Migrationsphänotyp beschrieben wurde (Paulus *et al.*, 1996). Trotzdem können sie einen Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Studie beobachteten Migrationsunterschiede liefern. Die amöboide Migration ist charakterisiert durch wenige und relativ schwach ausgeprägte Fokaladhäsionen, welche Integrin-unabhängig sein können und gleicht eher einem „Gleiten“ der Zellen mit einer hohen Migrationsgeschwindigkeit (Friedl *et al.*, 2001; Huttenlocher und Horwitz, 2011). Dieser Migrationsmodus wird vornehmlich von sehr motilen Zellen favorisiert. Die mesenchymale Migration hingegen ist gekennzeichnet durch Integrin vermittelte, stark ausgeprägte Interaktionen mit der EZM, der durch Proteasen katalysierten Degradation sowie Remodulation dieser und verläuft eher mit

einer langsameren Geschwindigkeit (Friedl und Wolf, 2003). Vor dem Hintergrund der Daten von Oppel *et al.* liegt die Vermutung nahe, dass die U373MG-Zellen nach SOX2-*knockdown* amöboid und dementsprechend schneller migrieren. Wohingegen die T98G und U87MG-Zellen nach ektoptischer SOX2 Expression vom amöboiden in den mesenchymalen Migrationsmodus wechseln könnten und folgerichtig langsamer migrieren. Dies impliziert jedoch, dass die SOX2 Expression in SOX2-defizienten Zelllinien hinreichend ist, die amöboid-mesenchymale-Transition (AMT) zu initiieren. Eine derartige Regulation wurde für Glioblastomzellen bis heute jedoch nicht beschrieben. Die Tatsache, dass sowohl die T98G als auch die U87MG-Zellen durch eine SOX2 Überexpression langsamer migrieren, stützt jedoch diese Hypothese. Ebenso wäre auch denkbar, dass SOX2 nur an der Aufrechterhaltung des mesenchymalen Status der Zellen beteiligt ist. Allerdings darf bei der Interpretation nicht vernachlässigt werden, dass die Migrationsexperimente in einer 2D-Umgebung *in vitro* und auf unbeschichteten Oberflächen durchgeführt worden sind und daher kritisch betrachtet werden sollten. Wahrscheinlich ist das Migrationsverhalten der neoplastischen Zellen in einer *in vivo* Umgebung (3D-Matrix) mit vorhandenen EZM-Komponenten differentiell zu bewerten und zeigt wohlmöglich alternative Strategien auf (Friedl *et al.*, 1998). Um darüber Aussagen treffen zu können, bedarf es allerdings weiterführender Analysen. Dennoch können die Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass SOX2 nicht zwangsläufig inhibierend auf die Zellmigration wirkt, sondern möglicherweise einen „switch“ im Migrationsmodus zur Folge hat, aufgrund dessen die Zellen unterschiedlich schnell migrieren.

### 6.3 SOX2 im therapeutisch-relevanten Kontext

In Anbetracht der vorhandenen Daten ist ersichtlich, dass der Transkriptionsfaktor SOX2 in Glioblastomzellen pleiotrope Funktionen und onkogene Eigenschaften aufweist. Darüber hinaus legen sie die Vermutung nahe, dass SOX2 bei der Genese von Glioblastomen und/oder deren Progression einen wichtigen Faktor darstellen könnte. Dementsprechend stellt SOX2 ein mögliches Ziel für neue Therapiestrategien dar, welche jedoch aufgrund der ambivalenten Funktionen kritisch zu betrachten sind. Eine Inhibition von SOX2 könnte zwar zu einer geringeren proliferativen Aktivität der malignen Zellen führen und somit zu einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit der Neoplasie beitragen, hätte jedoch möglicherweise ein erhöhtes Migrationspotential und infolgedessen die schnellere und vermehrte Dissemination der Tumorzellen in umgebende Hirnstrukturen zur Folge, welches unter Umständen zu zahlreichen Tumorherden führen könnte. Daher müssten Kombinationstherapien eingesetzt werden, welche einerseits die proliferationsstimulierende Wirkung von SOX2 inhibieren und gleichzeitig die Migration der Zellen aus dem Primärtumor zu unterbinden vermögen und/oder die Apoptose induzieren. Eine erfolgreiche SOX2-Inhibition

auf transkriptioneller Ebene konnte bereits durch die Applikation von Arsen(III)oxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) in permanenten Glioblastomzelllinien beobachtet werden (Sun und Zhang, 2011). Auch die Inhibition von Faktoren, welche „upstream“ von SOX2 agieren, könnte ein vielversprechender Ansatz sein. So konnte gezeigt werden, dass der TGF- $\beta$   $\rightarrow$  SOX4  $\rightarrow$  SOX2 Signalweg essentiell für die Tumorgenität von GICs (*glioblastoma initiating cells*) ist (Ikushima *et al.*, 2009). Demnach könnte die Beeinflussung von TGF- $\beta$  und/oder SOX4 erfolgversprechend sein. Des Weiteren bieten die zelltypspezifischen SOX2-Interaktionspartner einen sinnvollen Therapieansatz. Möglicherweise ist es sogar effektiver nicht SOX2 direkt „anzugreifen“, sondern die für die SOX2 vermittelten Proliferations- und Migrationseffekte essentiellen Kooperationspartner. Um erfolgversprechende Kombinationstherapien entwickeln zu können, müssen jedoch die zu Grunde liegenden molekulargenetischen Mechanismen im Detail noch besser verstanden sein, um für Glioblastompatienten tatsächlich therapeutisch relevant werden zu können.

#### 6.4 *in vivo* Analysen

Die SOX2-abhängigen Proliferations- und Migrationseffekte wurden durch intrakranielle Xenotransplantation der Tumorzellen in NOD/SCID-Mäuse *in vivo* überprüft. Da durch die Implantation der U373MG-Zellen (SOX2-*knockdown*) keine Tumoren erzeugt werden konnten, wurden nur die U87MG-EGFP-SOX2-Zellen (Klon 2, SOX2 Überexpression) sowie die dazugehörige Kontrolle verwendet. Das Tumorstadium wurde 7 bzw. 14 Tage nach Implantation mittels MRT verfolgt und anschließend mit den histologisch erhobenen Daten korreliert.

Zu den bei den MRT-Messungen beobachteten hämorrhagischen Läsionen der SOX2-positiven (SOX2<sup>+</sup>) Tumoren (vgl. 5.5.2 & Abb. 5.10) konnte kein histologisches Korrelat identifiziert werden. Es können weder vermehrt nekrotische Bereiche noch eine erhöhte mikrovaskuläre Proliferation oder Einblutungen in den immunhistochemisch gefärbten Präparaten beobachtet werden. Auch die zusätzlich durchgeführten CD31 & CD34 sowie EvG-Färbungen (Elastica-van-Gieson, Daten nicht gezeigt) gaben keinerlei zusätzliche Hinweise oder Anhaltspunkte. Bisher ist ein solches Phänomen nach orthotoper Implantation von U87MG-Zellen in der Literatur nicht beschrieben worden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Messartefakte handeln könnte. Da jedoch ausschließlich die SOX2<sup>+</sup>-Tumoren diese Gewebsveränderungen in den MRT-Messungen zeigen, ist dies eher unwahrscheinlich. Es könnte sich auch lediglich um eine veränderte Zelldichte in diesen Bereichen des Tumors handeln. Ob die Läsionen tatsächlich das Resultat der ektopischen SOX2 Expression in den U87MG-Zellen sind, kann anhand der momentanen Datenlage nicht evaluiert werden, ist für weiterführende Experimente jedoch sehr interessant.

Dessenungeachtet korrelieren die MRT-Messungen mit den histologischen Daten. So kann ein wesentlich schnelleres Wachstum der SOX2<sup>+</sup>, verglichen mit den SOX2-negativen (SOX2<sup>-</sup>) Tumoren beobachtet werden. Sowohl nach 7 als auch 14 Tagen ist das Volumen der SOX2<sup>+</sup>-Neoplasie signifikant höher, als das des SOX2<sup>-</sup>-Tumors (vgl. Tab. 5.1), was auf eine gesteigerte Proliferationsrate der SOX2<sup>+</sup>-Zellen schließen lässt und die *in vitro* Beobachtungen untermauert. Diese Ergebnisse werden durch die Daten der Ki67-Immunhistochemie zusätzlich gestützt. So sind etwa die Hälfte der Zellen des SOX2<sup>+</sup>-Tumors proliferativ aktiv (Ki67-positiv), hingegen bei der SOX2<sup>-</sup>-Neoplasie nur etwa ein Drittel (vgl. Abb. 5.12 D + H). Auch in den H&E-gefärbten Schnittpräparaten zeigt der SOX2<sup>+</sup>-Tumor eine größere Fläche und ist wesentlich zellreicher. Dies scheint jedoch einen Widerspruch zu den Daten von Oppel *et al.* darzustellen, welche größere Tumoren durch den SOX2-*knockdown* in U343MG-Zellen beobachten konnten. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass die größeren SOX2-*knockdown* Tumoren nicht so zelldicht sind, wie die, die durch die SOX2 Überexpression in dieser Studie entstanden sind. Zudem wurden in der Studie von Oppel *et al.* keine Volumina, sondern lediglich Tumorfleichen anhand eines „scoring“ Systems vermessen. Die größere Fläche der Tumoren resultiert dabei wahrscheinlich aus der höheren Infiltrationsrate der U343MG-Zellen nach SOX2-*knockdown* (Oppel *et al.*, 2011), welche im Gegensatz zu den hier verwendeten U87MG-Zellen ein ausgeprägteres Migrationsverhalten *in vivo* zeigen. Die Beobachtungen dieser Studie stehen dagegen im Einklang mit den Ergebnissen von Chen *et al.* in Brustkrebszellen. So konnten größere Tumoren durch eine SOX2 Überexpression, sowie wesentlich kleinere durch einen SOX2-*knockdown in vivo* beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dies auf eine erhöhte Proliferationsrate der SOX2 überexprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der apoptotischen Aktivität, welches das kleinere Volumen des SOX2-*knockdown* Tumors ebenfalls hätte erklären können. Demnach scheint SOX2 auch in Brustkrebszellen *in vivo* proliferationsfördernd und darüber hinaus tumorigen zu wirken (Chen *et al.*, 2008).

Bei der SOX2-Immunhistologie fiel auf, dass nicht alle Zellen des SOX2<sup>+</sup>-Tumors tatsächlich SOX2-reaktiv sind (vgl. Abb. 5.12). Es kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass auch SOX2-negative Zellen implantiert wurden, da diese vor der orthotopen Implantation mittels GFP sortiert (FACS) wurden. Außerdem wird ein Fusionstranskript (EGFP-SOX2) synthetisiert, dessen Expression zuvor visuell in den verwendeten Zellen überprüft wurde. Dementsprechend scheinen die Zellen bedarfsabhängig die SOX2 Expression *in vivo* regulieren zu können. Vor dem Hintergrund der in Abschnitt 6.1 diskutierten Daten ist durchaus vorstellbar, dass die Zellen solange sie mitotisch aktiv sind SOX2 exprimieren und beim Zellzyklusexit dieses möglicherweise herunterregulieren. Dies müsste in Anbetracht der *in vitro* Daten jedoch zu einer erhöhten Migration der Tumorzellen führen. Allerdings konnte weder ein



Anzeichen einer vermehrten Migration, noch der diffusen Infiltration *in vivo* beobachtet werden. Unabhängig des SOX2 Expressionsstatus zeigen beide Neoplasien relativ scharf abgegrenzte Tumorrandbereiche ohne klar ersichtliche Infiltrationszone. Lediglich die vergrößerte Darstellung der H&E-Färbung des SOX2<sup>+</sup>-Tumors lässt vermuten, dass einige Tumorzellen ins umliegende Hirnparenchym hineinwachsen (vgl. Abb. 5.12 A), welches jedoch keinen Beweis für eine erhöhte migratorische Aktivität darstellt. Auch diese Beobachtungen widersprechen den Daten von Oppel *et al.*, welche eine erhöhte Invasion der U343MG-Zellen nach SOX2-*knockdown* beobachten konnten. Dies liegt jedoch wahrscheinlich an der Verwendung zweier vollkommen unterschiedlicher Glioblastomzelllinien für die *in vivo* Versuche (Oppel: U343MG, diese Studie: U87MG), welche distinkte Expressionsprofile und differentielle Wachstumseigenschaften aufweisen. Es ist bereits bekannt, dass die U87MG-Zellen die charakteristischen, histopathologischen Merkmale von Glioblastomen, wie diffuse Infiltration, Nekrosen etc., *in vivo* per se nicht widerspiegeln (de Vries *et al.*, 2009; Radaelli *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Tatsache scheint die ektopische SOX2 Expression allein nicht auszureichen den infiltrativen Migrationsphänotyp der U87MG-Zellen *in vivo* zu rekonstituieren und es bedarf demnach zusätzlicher Faktoren. Folgerichtig darf angezweifelt werden, dass die *in vitro* durch den SOX2-*knockdown* initiierte mesenchymal-amöboide-Transition durch eine SOX2 Überexpression *in vivo* revertiert werden kann. Dies kann jedoch nur für die in dieser Studie verwendete Zelllinie U87MG ausgeschlossen werden, und bedarf für alternative Glioblastomzelllinien weiterer Klärung. Auch das zur *in vitro* Situation deutlich veränderte *in vivo* Expressionsmuster der U87MG-Zellen sollte dabei nicht außer Acht gelassen werden, welches unter Umständen einen erheblichen Einfluss auf die SOX2 vermittelten Migrationseffekte ausüben könnte (Camphausen *et al.*, 2005).

Es kann jedoch zwischen den beiden Tumoren ein Unterschied im Wachstumsmuster beobachtet werden. Der SOX2<sup>-</sup>-Tumor ist stark abgegrenzt und weist ein kompaktes Wachstumsverhalten auf. Die Tumorzellen scheinen die residenten, hirneigenen Zellen lateral zu verdrängen, um der steigenden Raumforderung der Neoplasie gerecht zu werden, wodurch das Gewebe aufgetriebener wirkt. Hingegen erscheint der SOX2<sup>+</sup>-Tumor wesentlich zellreicher, jedoch aufgelockerter und nicht so kompakt. Innerhalb des SOX2<sup>+</sup>-Tumors konnten einige reaktive maushirneigene Astrozyten detektiert werden, wohingegen der SOX2<sup>-</sup>-Tumor ausschließlich aus den implantierten malignen Zellen bestand (vgl. Abb. 5.14). Dies spricht dafür, dass die SOX2<sup>+</sup>-Zellen die hirneigenen Zellen nicht verdrängen, sondern diese beim schnellen Wachstum „überrennen“. Darüber hinaus gibt es deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen U87MG-SOX2<sup>+</sup> und SOX2<sup>-</sup>-Tumorzellen. Letztere sind wesentlich größer und wirken gemästet, wohingegen die SOX2<sup>+</sup>-Zellen kleiner sind und eine eher spindelförmige Morphologie aufweisen. Diese könnte als ein Hinweis für eine Remodulation des Zytoskeletts gewertet werden, wie es bereits für SOX2-*knockdown*

Zellen *in vitro* beobachtet werden konnte und zeigt möglicherweise doch Anzeichen einer amöboid-mesenchymalen-Transition.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch SOX2 vermittelte gesteigerte Proliferation der Tumorzellen *in vitro* ebenfalls *in vivo* bestätigt werden kann. Die Migrationseffekte sollten sowohl anhand einer alternativen Zelllinie als auch mit primären Zellen erneut untersucht werden, da hier keine klaren Tendenzen auszumachen sind und die U87MG-Zellen durch ihr nicht invasives Wachstumsverhalten ein für Migrationsexperimente nur bedingt geeignetes Xenograftmodell darstellen (de Vries *et al.*, 2009).

## 6.5 Interaktionsanalysen

Ein entscheidender Faktor der den Transkriptionsfaktoren der SOX-Familie ihre funktionelle Spezifität in verschiedenen Geweben und Zelltypen ermöglicht, ist das präzise Zusammenspiel mit unterschiedlichen Partnerproteinen (Wilson und Koopman, 2002; Kondoh und Kamachi, 2010). Um detailliertere Hinweise über die pathophysiologische Funktion von SOX2 in Glioblastomen zu erhalten, wurden potentielle Interaktionspartner identifiziert, die einen Einblick in die durch SOX2 regulierten Mechanismen liefern können.

### 6.5.1 *Yeast two-hybrid* Analysen

Zur Identifikation glioblastomspezifischer SOX2-Interaktionspartner wurde das *yeast two-hybrid* System genutzt. Dieses ermöglicht es, cDNA Bibliotheken auf potentielle Kooperationspartner hin zu untersuchen. Da keine kommerziell erhältliche Glioblastombibliothek zur Verfügung stand, wurde diese im Rahmen der vorliegenden Studie mittels der SOX2-positiven Zelllinie U373MG hergestellt. Bei der Verwendung primärer Glioblastomresektate hätte nicht sichergestellt werden können ausschließlich neoplastische Zellen einzusetzen. In der sehr heterogenen Primärkultur befinden sich verschiedene Zelltypen (Perizyten, Endothelzellen, Astro- sowie Oligodendrozyten etc.), welche SOX2 unter Umständen nicht exprimieren. Bei Gebrauch solchen Materials kann es demzufolge zu verfälschten Ergebnissen kommen. Auch die Möglichkeit der Lasermikrodissektion bietet hierbei keinen hinreichenden Lösungsansatz. Mittels dieser Methode können zwar gezielt maligne Zellen eines Tumors mit Hilfe eines Lasers extrahiert werden, allerdings ist sowohl die Quantität als auch Qualität der für die Herstellung der cDNA-Bibliothek benötigten RNA (mRNA) solcher Zellen eher schlecht und für die Generierung einer repräsentativen cDNA-Bibliothek nicht ausreichend. Auch wenn die Verwendung der Glioblastomzelllinie U373MG das Risiko von Artefakten, bedingt durch die jahrelange Kultivierung und die damit einhergehenden

differentiellen Expressionsmuster beinhaltet, werden dennoch wichtige Hinweise auf das SOX2-Protein-Protein Interaktoms in Glioblastomen erworben.

Bei der Herstellung der cDNA Bibliothek konnten DNA Abschnitte von 400 – 5000 bp Länge durch die LD-PCR amplifiziert und zu *prey*-Konstrukten direkt in Hefezellen rekombiniert werden (vgl. 4.12.4). Wie gezeigt werden konnte, ist die Bibliothek hinreichend komplex, um für Y2H-*screens* Verwendung zu finden (vgl. 5.6.4). Bei den insgesamt drei durchgeführten *screens* mit der SOX2 $\Delta$ 175-Deletionsmutante konnten nach stringentem Ausschluss 34 potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (vgl. Tab. 5.3). Davon wurden 16 Kandidaten in mehreren *screens* gefunden, welches für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse spricht. Insgesamt wurden 11 Proteine identifiziert, die prädominant kernständig vorliegen. Weitere 18 sind vorwiegend, aber nicht ausschließlich, zytoplasmatisch lokalisiert. Von den restlichen 5 ist die Lokalisation entweder unbekannt oder es handelt sich um membranassoziierte Proteine (vgl. 5.6.5).

Unter den identifizierten Kandidaten sind sowohl Chromatin-assoziierte (H2AFZ, H3F3B) als auch einige Chromatin-modulierende Proteine (USP16, FAM96B) zu finden. USP16 konnte bereits mit der De-Ubiqitinierung von H2A in Verbindung gebracht werden. Diese posttranslationale Histonmodifikation scheint ein wichtiger Faktor für die Progression des Zellzyklus sowie der Regulation der Genexpression, hauptsächlich von Genen der *HOX*-Familie darzustellen (Joo *et al.*, 2007). Neun Mitglieder der *HOX*-Gene (A6 - 9, A13, B13, D4, D9, D10, D13) sind bereits sowohl in Astrozytomen des WHO Grades II und III als auch in Glioblastomen als überexprimiert beschrieben worden. Es wird postuliert, dass diese mit der Genese von Hirntumoren in Verbindung stehen könnten (Abdel-Fattah *et al.*, 2006). Ferner korreliert die Expression *HOX*-dominierter Genkluster mit der Chemoresistenz von Glioblastomzellen (Murat *et al.*, 2008). Die potentielle Interaktion mit USP16 lässt vermuten, dass SOX2 an der transkriptionellen Regulation von *HOX*-Genen in Glioblastomen und demzufolge an deren Pathogenese und/oder Chemoresistenz der Tumorzellen beteiligt sein könnte.

Ein weiterer potentieller Interaktionskandidat ist DDX11, ein Mitglied der DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box Proteinfamilie. Diese Familie von RNA-Helikasen ist beteiligt an der Transkription, Translation und an Splicingprozessen sowie der strukturellen Modulation von RNA-Molekülen (Abdelhaleem, 2005). Die Bindung an mRNA sowie eine Beteiligung an alternativen Splicingprozessen ist für SOX2 in Karzinomzellen erst kürzlich beschrieben worden (Tung *et al.*, 2010). Über RNA-Helikasen ist bezüglich der Pathogenese und Progression von Tumoren sehr wenig bekannt. Möglicherweise stellt DDX11 zusammen mit

SOX2 für die oben beschriebenen Prozesse einen regulatorischen Komplex in Glioblastomen dar.

Des Weiteren finden sich unter den potentiellen Interaktionskandidaten einige Zellzyklus assoziierte Proteine wie beispielsweise WTAP, CDK5RAP1 und MDM2. Vor dem Hintergrund der proliferationsstimulierenden Wirkung von SOX2 (vgl. 5.4.1) könnte die potentielle Interaktion mit MDM2 einen interessanten Zusammenhang darstellen. MDM2 ist als ein negativer Regulator des Tumorsuppressorproteins 53 (p53) bekannt und gilt zudem als Protoonkogen (Wang und Jiang, 2012). Durch die Funktion einer E3-Ubiquitin-Ligase sorgt MDM2 für die Proteasom-abhängige Degradation von p53 und reguliert dadurch dessen intrazelluläre Konzentration (Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Die Inhibierung des p53-Signalweges in Glioblastomen konnte unter anderem bereits mit der Genamplifikation von *MDM2* in Verbindung gebracht werden (TCGA, 2008). P53 gilt als Schlüsselfaktor für die Regulation des Zellzyklus indem es stressabhängig einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch die Expression von p21<sup>Cip1</sup> induziert und/oder die Apoptose einleiten kann (Vogelstein *et al.*, 2000). Überdies sind in fast 50 % aller diagnostizierten Tumoren p53 Mutationen zu finden. Auch in Glioblastomen findet man häufig p53 Mutationen sowohl in primären als auch sekundär entstandenen Tumoren (Furnari *et al.*, 2007; TCGA, 2008). Die SOX2/MDM2 Interaktion könnte dementsprechend Hinweise über die proliferationsstimulierende Wirkung von SOX2 in Glioblastomzellen liefern. Möglicherweise ist SOX2 sogar in die Inhibierung von p53 durch MDM2 direkt involviert. Es ist ebenso vorstellbar, dass SOX2 durch die Bindung an MDM2 dessen Inhibierung durch p14<sup>ARF</sup> verhindert und somit indirekt p53 inhibiert. Weiterführende Analysen sollten zunächst die Interaktion validieren und anschließend deren Funktion in Glioblastomen detailliert charakterisieren.

NEDD9/HEF1 ist ein weiterer interessanter Interaktionskandidat von SOX2. NEDD9 kann zellzyklusabhängig in vier Proteine unterschiedlicher Größe (p115, p105, p65, p55), welche verschiedene subzelluläre Lokalisationen (zytoplasmatisch, membranassoziiert und nukleär) aufweisen, prozessiert werden (Law *et al.*, 1998). NEDD9 gehört zu der CAS (*crk-associated substrate*) Proteinfamilie und stellt ein Adapterprotein dar, welches in die dynamische Regulation von Fokalkontakten involviert ist (O'Neill und Golemis, 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass NEDD9 ein spezifischer Faktor für die FAK-vermittelte Signalweiterleitung an Fokaladhäsionen in Glioblastomzellen ist (Natarajan *et al.*, 2006). Zudem wurde NEDD9 bereits in verschiedenen Tumorentitäten mit der Invasion und Metastasierung von malignen Zellen in Verbindung gebracht (Kim *et al.*, 2006b; Kong *et al.*, 2012). Es scheint ebenso für die Migration und Invasion von Glioblastomzellen essentiell zu sein (Natarajan *et al.*, 2006). Darüber hinaus korreliert die NEDD9 Expression mit einer

geringeren Überlebensrate von Gliompatienten (Speranza *et al.*, 2012). Wie bereits in Abschnitt 6.2 beschrieben wird NEDD9 nach einem SOX2-*knockdown* herunterreguliert, welches eine transkriptionelle Regulation durch SOX2 vermuten lässt. In dieser Studie konnte überdies eine potentielle Interaktion zwischen SOX2 und NEDD9 im Y2H-System detektiert werden. Diese Entdeckungen führen zu der Annahme, dass die potentielle SOX2/NEDD9 Kooperation beim invasiven Verhalten von Glioblastomen eine Rolle spielen könnte und möglicherweise sogar die mesenchymale Migration von Gliomzellen reguliert oder an der Aufrechterhaltung des mesenchymalen Status der Tumorzellen beteiligt ist (vgl. 6.2). Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass NEDD9 die mesenchymale Migration von Melanomzellen stimuliert, wohingegen es die amöboide Migration inhibiert (Ahn *et al.*, 2012). Um die Hypothese zu überprüfen, müsste jedoch zunächst evaluiert werden mit welchem der 4 NEDD9-Proteine SOX2 in Glioblastomzellen interagiert. Außerdem sollten in *Doppelknockdown* Experimenten anschließend funktionelle Analysen, welche die physiologische Relevanz und Funktion der Interaktion zeigen können, folgen.

Neben der vorliegenden Studie gibt es bis heute lediglich eine weitere Veröffentlichung, welche SOX2-spezifische Interaktionspartner in Glioblastomzellen untersucht hat. Fang *et al.* beschrieben erst kürzlich die Identifikation von 144 putativen SOX2-Interaktionspartnern durch IP/MS/MS-Analysen in der Glioblastomzelllinie LN229 (Fang *et al.*, 2011a). Es konnten dabei vornehmlich Mitglieder der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine, ribosomale Proteine, Helikasen, RNA-bindende, sowie Strukturproteine als Interaktionspartner ermittelt werden. Darüber hinaus sind einige Zellzyklus-assoziierte Faktoren sowie Transporter- und GTP-bindende Proteine unter den potentiellen Kooperationspartnern vorhanden (Fang *et al.*, 2011a). Scheinbar ist SOX2 prädominant in Ribonukleoproteinkomplexen lokalisiert, welches neben der Funktion als Transkriptionsfaktor eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation vermuten lässt (Fang *et al.*, 2011a). Ferner konnten 11 Proteine identifiziert werden, welche auch mit SOX2 in embryonalen Stammzellen (ESC's) zu interagieren scheinen (Mallanna *et al.*, 2010). Darunter befindet sich auch Histon2A, welches ebenso in der vorliegenden Studie als SOX2-Partner in U373MG Zellen detektiert wurde. Dementsprechend scheint Histon2A bei der SOX2-abhängigen Genregulation sowohl in ESC's als auch Glioblastomzellen eine essentielle Rolle einzunehmen. Andererseits stützt die relativ geringe Übereinstimmung von nur 11 Proteinen bei 60 Kandidaten aus der Mallanna Studie sowie 144 aus der Veröffentlichung von Fang *et al.* die Vermutung, dass SOX2 mit zelltypspezifischen Interaktionspartnern kooperiert. Es sind lediglich 5 der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionspartner mit denen von Fang vergleichbar (RPL12, RPS20, RPS4X, H2A und Galektin-1). Dies könnte einerseits damit erklärt werden, dass eine alternative Glioblastomzelllinie mit einem distinkten genetischen Hintergrund sowie

einem differentiellen Expressionsmuster verwendet wurde. Andererseits fand eine vollkommen andere, mit dem Y2H-System nicht vergleichbare Methode in der Studie von Fang und Mitarbeitern Anwendung. Bei der IP/MS/MS kann nicht unterschieden werden, ob die Interaktionen direkt oder indirekt stattfinden. Demgegenüber können mit dem *yeast two-hybrid* System keine Multiproteinkomplexe, wie sie mit der IP/MS/MS identifiziert werden können, entschlüsselt werden. Möglicherweise kann die Summe der Kandidaten der vorliegenden Studie, als auch der Fang-Publikation ein repräsentatives Bild des SOX2-Protein-Protein-Interaktoms in Glioblastomzellen liefern.

Interessanterweise konnte von Fang *et al.* ebenfalls eine Interaktion zwischen SOX2 und Galektin-1 (LGALS1) beobachtet werden. Galektin-1 ist auch in der vorliegenden Studie als SOX2-Bindungspartner identifiziert worden, allerdings zeigte das *full length* Protein leichte Tendenzen zur autonomen Transaktivierung der Reportergene im Y2H-System. Die Kotransformationen mit SOX2 $\Delta_{175}$  wiesen dennoch auf eine Interaktion mit LGALS1 hin (vgl. 5.6.5). Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Galektin-1 in Astrozytomen und Glioblastomzelllinien differentiell exprimiert wird und das Expressionslevel mit der Malignität der Tumoren korreliert (Yamaoka *et al.*, 2000; Camby *et al.*, 2001). LGALS1 stimuliert die Migration von Glioblastomzellen *in vitro* (Camby *et al.*, 2002) sowie deren Invasionsfähigkeit *in vivo* (Toussaint *et al.*, 2012). Diese Daten sind im Einklang mit der Beobachtung, dass Galektin-1 in Xenograftmodellen vornehmlich in den hochinvasiven Arealen exprimiert wird (Rorive *et al.*, 2001). Galektin-1 interagiert zudem mit der  $\beta$ 1-Untereinheit der Integrine, induziert dadurch die Phosphorylierung von FAK, welches letztlich zur Migration von vaskulären Zellen der glatten Muskulatur führt (Moiseeva *et al.*, 2003). In Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 in den Transport der Integrin  $\beta$ 1-Untereinheit involviert ist (Fortin *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt, könnte SOX2 via NEDD9 auch in die FAK-vermittelte Migration von Glioblastomzellen involviert sein. Vor diesem Hintergrund lässt sich vermuten, dass die potentielle SOX2/LGALS1 Interaktion eine Rolle in der Migration von Glioblastomzellen spielen könnte. Möglicherweise sind sogar SOX2, NEDD9 und LGALS1 in einem Netzwerk organisiert und in die Regulation der mesenchymalen Migration involviert. Darüber hinaus scheint es einen Zusammenhang zwischen der Expression von p53 und Galektin-1 zu geben. Es konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 in U87MG Zellen, durch die Expression von exogenem Wildtyp p53 herunterreguliert wird (Puchades *et al.*, 2007). Ferner sind Gliomzellen mit einer reduzierten Expression von LGALS1 sensitiver gegen Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* (Le Mercier *et al.*, 2008). Hingegen hat ein *knockdown* von Galektin-1 eine erhöhte Expression von p53 zur Folge (Camby *et al.*, 2005). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang ungeklärt. Möglicherweise gibt es auch einen Zusammenhang zwischen der SOX2/MDM2 und SOX2/LGALS1 Interaktion bei der Inhibition der p53-Signalkaskade.

Die Interaktionsanalysen der vorliegenden Arbeit wurden durchgeführt, um Faktoren zu identifizieren, welche im Zusammenspiel mit SOX2 die Genexpression in Glioblastomen regulieren. Neben den bereits diskutierten Kandidaten wurde dabei besonderes Augenmerk auf den Transkriptionsfaktor RUNX1 gelegt, welcher zusammen mit WTAP (*Wilms tumor associated protein*) in den drei durchgeführten *screens* als einziger Transkriptionsfaktor ermittelt werden konnte. Auch in der Studie von Fang *et al.* sind bei den 144 potentiellen Interaktionspartnern lediglich zwei Proteine (*SAFB-like* und *BCL2-associated transcription factor-1*) aus der Klasse der Transkriptionsfaktoren identifiziert worden. RUNX1 stellt einen essentiellen Faktor der definitiven Hämatopoese dar, indem es die Selbsterneuerungsfähigkeit sowie Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen reguliert (Dowdy *et al.*, 2010; Mangan und Speck, 2011; Ross *et al.*, 2012). Wie gezeigt werden konnte steigert RUNX1 die Proliferationsrate von myeloiden Vorläuferzellen durch eine beschleunigte G<sub>1</sub>/S-Phase Transition (Strom *et al.*, 2000). Ferner wird RUNX1 mit Tumorerkrankungen des hämatopoetischen Systems (Moosavi *et al.*, 2009; Lam und Zhang, 2012) sowie Tumorentitäten außerhalb dessen (z.B. Ovarial-, Kolorektalkarzinomen) in Verbindung gebracht (Planaguma *et al.*, 2011; Slattery *et al.*, 2011; Scheitz *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass RUNX1 auch in Glioblastomzellen differentiell exprimiert wird (Vladimirova *et al.*, 2008), lässt auf eine Beteiligung bei der Pathogenese und/oder Progression, möglicherweise sogar in Kooperation mit SOX2, schließen.

Neben RUNX1 wurde GFAP als weiterer potentieller Interaktionspartner näher betrachtet. Zum einen ist GFAP als einziger Kandidat in allen drei *screens* gefunden worden, zum anderen sind bereits Publikationen erschienen, welche SOX2 mit der Expression von GFAP in Gliomzellen direkt in Verbindung bringen (Ferletta *et al.*, 2011) oder eine Ko-Expression beider Proteine in distinkten Regionen des Gehirns beschreiben (van den Berge *et al.*, 2010). Interessanterweise konnte bei den *yeast two-hybrid* Analysen eine Interaktion mit *full length* GFAP $\delta$ , nicht aber zwischen SOX2 und GFAP $\alpha$  beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine isoformspezifische Interaktion zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  hin (vgl. Abb. 5.25). Bis heute ist mit Presinillin-1 lediglich ein GFAP $\delta$  spezifischer Interaktionspartner beschrieben worden (Nielsen *et al.*, 2002). Darüber hinaus scheinen die SOX2-Bindestellen für RUNX1 und GFAP $\delta$  nicht identisch zu sein. Bei den *mapping* Experimenten (vgl. 5.6.7) konnte beobachtet werden, dass für die Interaktion mit RUNX1 die HMG-Box von SOX2 auszureichen scheint. Da hierbei jedoch nicht das *full length* RUNX1, sondern lediglich ein Teil der RUNT-Domäne eingesetzt werden konnte, sind diese Ergebnisse mit Bedacht zu interpretieren und sollten mit einer weiteren, unabhängigen Methode validiert werden. Im Fall der Interaktion mit *full length* GFAP $\delta$  hingegen reicht die HMG-Box allein nicht aus. Es kann keine Interaktion mit der SOX2 $\Delta_{130}$  Verkürzungsmutante, welche nur die

Hälfte des für Interaktionen oft essentiellen SOX-B1-Familien-Motivs beinhaltet, beobachtet werden (vgl. Tab. 5.4). Dies lässt darauf schließen, dass für die Interaktion mit GFAP $\delta$  der weiter c-terminal gelegene Teil von SOX2 essentiell ist. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits für die Interaktion zwischen SOX2 und SALL4 in 293T-Zellen gemacht werden (Cox *et al.*, 2010). Zudem wird postuliert, dass die Regionen außerhalb der HMG-Box für die Spezifität und Selektion der Interaktionspartner wichtig sind. Diese Daten lassen vermuten, dass RUNX1 und GFAP verschiedene SOX2-Bindestellen aufweisen, welches entweder auf eine unterschiedliche zelluläre Funktion der Interaktionen oder auch einen ternären Komplex hinweisen könnte.

### 6.5.2 Validierung der Interaktionen mittels PLA

Nach der Überprüfung der Interaktionen zwischen SOX2/RUNX1 sowie SOX2/GFAP $\delta$  durch Kotransformationsexperimente im Hefesystem, wurden die Interaktionen mittels einer zweiten, unabhängigen Methode validiert. Mit Hilfe des *Proximity ligation assays* (PLA) kann die „räumliche Nähe“ zweier Proteine sowie deren subzelluläre Lokalisation direkt innerhalb von Zellen detektiert werden. Somit kann diese Methode Informationen über Protein-Proteininteraktionen oder auch Proteinkomplexe *in situ* liefern (Soderberg *et al.*, 2006; Soderberg *et al.*, 2008; Weibrecht *et al.*, 2010; Leuchowius *et al.*, 2011). Aufgrund der hohen Sensitivität des PLA mussten zunächst die verwendeten Antikörper titriert werden, um unspezifische Signale zu minimieren. Darüber hinaus sind geeignete biologische Kontrollen etabliert worden, um die Interpretation der eigentlichen Interaktionsanalysen zu erleichtern (vgl. 5.7). Bei dem PLA liegt die theoretische Maximaldistanz um ein Signal zu erhalten bei 40 nm. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass eine Interaktion zweier Proteine nicht direkt erfolgt, sondern über ein oder mehrere Adapterproteine vermittelt wird. Tatsächlich ist die gemessene Distanz zwischen den untersuchten Proteinen jedoch mit der von FRET-Analysen (5 – 10 nm) vergleichbar (Weibrecht *et al.*, 2010). Eine Möglichkeit die Spezifität der PLA zu erhöhen und gleichzeitig die maximal „zulässige“ Distanz zwischen zwei Bindungspartnern zu verringern, ist das direkte Konjugieren der Primärantikörper (statt Sekundärantikörper) mit den Oligonukleotidsequenzen. Diese können ebenfalls bis zu einem gewissen Grad verkürzt, also mit weniger Basenpaaren konzipiert werden, welches die maximal mögliche Distanz zwischen den beiden potentiellen Bindungspartnern weiter reduziert. Dabei besteht jedoch das Risiko falsch negative Ergebnisse zu erhalten. Momentan steht keine zuverlässige Technologie zur Verfügung mit der eine physikalische Protein-Proteininteraktion *in situ* visualisiert werden könnte. Möglicherweise kann mit Hilfe von hochauflösenden Elektronenmikroskopen dies an fixierten Zellen tatsächlich nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass Adapterproteine eine Rolle spielen oder die zu untersuchenden



Partnerproteine sich tatsächlich nur räumlich nahe sind, sollte der PLA lediglich als Validierung in Betracht gezogen werden und nicht die Methode der Wahl sein um Protein-Proteininteraktionen zu identifizieren.

Rein theoretisch besteht die Möglichkeit, dass auch im Y2H-System ein Adapterprotein die Interaktion zweier Proteine vermittelt und diese somit nicht direkt erfolgt (Zhang und Lautar, 1996). Dies könnte allerdings nur im Falle der *screening* Prozedur stattfinden, da hierbei willkürlich nach potentiellen Interaktionspartnern gesucht wird und Hefezellen mehrere Plasmide gleichzeitig aufnehmen können. Bei den eigentlichen *yeast two-hybrid* Analysen werden jedoch selektiv nur die beiden potentiellen Interaktionspartner in die Hefezellen kotransformiert, so dass das „bridging“ durch ein hefeeigenes Adapterprotein vermittelt werden müsste, welches zwar nicht unmöglich jedoch äußerst unwahrscheinlich ist. Außerdem müsste das hefeeigene Adapterprotein eine nicht zu vernachlässigende Homologie zur jeweils verwendeten Spezies, aus der die potentiellen Interaktionspartner stammen, aufweisen, um diese Funktion ausüben zu können.

Der *Proximity ligation assay* diente in der vorliegenden Studie lediglich zur Validierung der potentiellen SOX2 Kooperationspartner sowie zur Detektion der subzellulären Lokalisation der Interaktionen *in situ*. Da diese jedoch durch *yeast two-hybrid screens* identifiziert sowie durch Kotransformationen überprüft wurden, wird in dieser Arbeit der Terminus Interaktion anstatt räumliche Nähe zueinander verwendet.

#### 6.5.2.1 Die SOX2/RUNX1 Interaktion

Da bei den Analysen im Y2H-System RUNX1 nicht als *full length* Konstrukt verwendet werden konnte, erfolgte die Verifizierung der Interaktion mit endogenen Proteinen direkt in U373MG-Zellen. Dies hat den Vorteil, dass beide Proteine in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen, wodurch alle eventuell notwendigen postranskriptionellen- sowie posttranslationalen Modifikationen vorhanden sind. Ferner findet der Nachweis, im Gegensatz zu einigen anderen Methoden, unter physiologischen Bedingungen statt.

Wie zu erwarten war, zeigen sowohl SOX2 als auch RUNX1 bei den *single recognition* Analysen eine fast ausschließlich kernständige Lokalisation, was darauf schließen lässt, dass die verwendeten Antikörper spezifisch sind (vgl. Abb. 5.27). Bei den Interaktionsanalysen wurden zusätzlich Z-Stapel (LSM) aufgenommen um zu belegen, dass die Interaktion tatsächlich innerhalb des Zellkerns stattfindet (vgl. Abb. 5.28). Wie sowohl aus der orthogonalen Ansicht, als auch aus den vergrößerten Aufnahmen eines Zellkerns ersichtlich ist, interagieren SOX2 und RUNX1 an distinkten Positionen innerhalb des Nukleus. Auch wenn der PLA streng genommen nur die räumliche Nähe zweier Proteine zueinander widerspiegelt, kann in Anbetracht der Daten aus dem *yeast two-hybrid* System

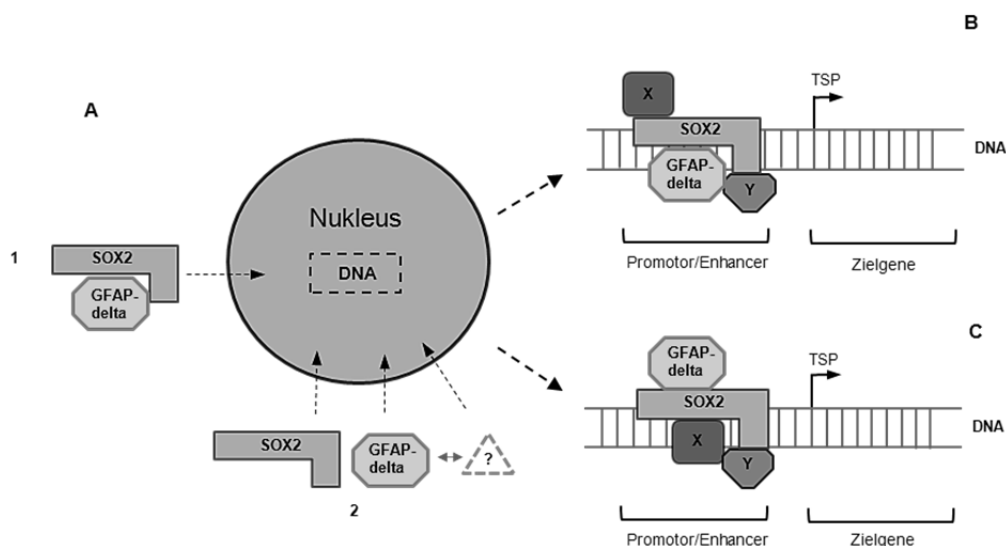
davon ausgegangen werden, dass es sich um eine physiologische Interaktion zwischen SOX2 und RUNX1 in U373MG-Zellen handelt.

### 6.5.2.2 Die SOX2/GFAP $\delta$ Interaktion

Um die Interaktion zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  verifizieren zu können, müssen isoform-spezifische Antikörper eingesetzt werden. Ein Antikörper der ausschließlich das prädominant vorliegende GFAP $\alpha$  detektiert, stand nicht zur Verfügung. Für die Isoform  $\delta$  ist ein solcher Antikörper hingegen publiziert worden der freundlicherweise von Prof. E. Hol für die Interaktionsstudien zur Verfügung gestellt wurde (Roelofs *et al.*, 2005).

Bei der *single recognition* Analyse fiel auf, dass GFAP $\delta$  in U373MG-Zellen vornehmlich perinukleär lokalisiert ist (vgl. Abb. 5.29). Dies ist im Einklang mit den Daten von Roelofs *et al.*, welche in Astrozyten der adulten humanen SVZ ebenfalls eine kernnahe Lokalisation von GFAP $\delta$  zeigen (Roelofs *et al.*, 2005). Auch die Interaktionsstudien zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  spiegeln dieses Muster wider (vgl. Abb. 5.29). So interagieren SOX2 und GFAP $\delta$  nahe dem Nukleus. Diese Lokalisation stellt für SOX2 als Transkriptionsfaktor jedoch keinen Widerspruch dar. Es wurde bereits gezeigt, dass SOX2 bedarfsabhängig zwischen Zellkern und Zytoplasma „shutteln“ kann (Avilion *et al.*, 2003; Malki *et al.*, 2009). Interessanterweise konnten einige SOX2/GFAP $\delta$ -Komplexe im Nukleus beobachtet werden. Wie in der orthogonalen Ansicht erkennbar ist und durch die Vergrößerung eines Zellkerns verdeutlicht wird, befinden sich distinkte PLA-Signale innerhalb des Zellkerns (vgl. Abb. 5.29). Bisher ist eine kernständige Lokalisation für GFAP nicht nachgewiesen worden, postuliert wurde jedoch bereits, dass ein geringer Anteil von GFAP nukleär vorliegen könnte (Paulus und Roggendorf, 1988). Es ist gut vorstellbar, dass bisher angewandte Methoden und Technologien nicht sensitiv genug waren, sehr geringe Proteinmengen innerhalb von Zellen oder Geweben zu detektieren. Mittels des PLA ist es nun möglich einzelne Moleküle *in situ* nachzuweisen, daher ist eine kernständige Lokalisation von einzelnen GFAP $\delta$ -Molekülen keinesfalls abwegig. Die intranukleäre Lokalisation von Klasse III Intermediärfilamentproteinen (IF) ist zwar eher untypisch, aber für Vimentin beispielsweise schon mehrfach nachgewiesen worden (Hartig *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2012). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie GFAP $\delta$  in den Zellkern gelangen könnte. Möglicherweise befindet sich ein bisher nicht identifiziertes Kernlokalisationsignal innerhalb der GFAP $\delta$  Sequenz. Sollte sich herausstellen, dass GFAP $\alpha$  nicht im Kern lokalisiert ist, so müsste sich diese im C-Terminus von GFAP $\delta$  befinden, da nur hier die beiden Isoformen in ihrer Sequenz variieren. Ein durch extrachromosomale DNA-Moleküle vermittelter Transport, welcher für Vimentin *in vitro* beschrieben wurde (Hartig *et al.*, 1998), ist ebenso denkbar. Eine andere Möglichkeit wäre, dass SOX2 GFAP $\delta$  bereits im Zytoplasma bindet und dieser Komplex zusammen in den Nukleus transportiert wird. Da SOX-Transkriptionsfaktoren in der

Lage sind unabhängig von DNA mit Partnerproteinen zu interagieren und in der HMG-Box mehrere Kernimportsignale vorhanden sind, wurde eine derartige Funktion bereits postuliert (Kondoh und Kamachi, 2010). Darüber hinaus stellt sich die Frage der funktionellen Relevanz von GFAP $\delta$  im Zellkern. Es ist durchaus vorstellbar, dass GFAP $\delta$  als Kofaktor agiert und SOX2 bei genregulatorischen Prozessen unterstützt, beispielsweise durch Stabilisierung der SOX2-DNA-Bindung. Ebenso könnte GFAP $\delta$  selbst, neben der Funktion als Strukturprotein, einen Transkriptionsfaktor darstellen. Es wird schon seit langem vermutet, dass IF-Proteine an der Genregulation direkt beteiligt sind (Traub, 1985). So konnte gezeigt werden, dass sowohl Vimentin, GFAP als auch Desmin DNA-Moleküle *in vitro* binden können (Vorgias und Traub, 1986; Tolstonog *et al.*, 2000; Tolstonog *et al.*, 2005). Zudem sind in diesen die für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäuren bereits identifiziert worden (Wang *et al.*, 2001). Ferner wurde erst kürzlich beschrieben, dass Vimentin die Expression von p21<sup>Waf1</sup> in Neuroblastomen reguliert, ob dies allerdings direkt oder indirekt erfolgt muss noch eingehender untersucht werden (Mergui *et al.*, 2010). Überdies konnte für einige Strukturproteine eine duale Funktion bereits nachgewiesen werden. So fungieren Aktin, und auch einige Lamine, einerseits als Strukturproteine, um die Architektur des Zytoskeletts (oder des Zellkerns) zu modulieren und aufrechtzuerhalten, andererseits sind sie direkt beteiligt an genregulatorischen Prozessen (Miralles und Visa, 2006; Lee *et al.*, 2009). Es wird sogar eine generelle Rolle von Typ III Intermediärfilamentproteinen bei elementaren nukleären Prozessen wie DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur sowie Transkription vermutet (Li *et al.*, 2003).



**Abb. 6.3: Theoretisches Modell der nukleären Funktion des SOX2/GFAP $\delta$  Komplexes**

**A<sub>1</sub>:** SOX2 bindet GFAP $\delta$  bereits im Zytosol, woraufhin der Komplex durch das Kernimportsignal der HMG Box von SOX2 in den Nukleus transferiert wird. **A<sub>2</sub>:** SOX2 und GFAP $\delta$  werden separat in den Kern transportiert und interagieren erst innerhalb des Nukleus, wobei ein unbekannter Faktor (?) GFAP $\delta$  im Zytosol binden und in den Zellkern transportieren könnte. **B:** sowohl SOX2 als auch GFAP $\delta$  binden an Promotor oder Enhancer Sequenzen spezifischer Zielgene. **C:** nur SOX2 bindet direkt an die DNA-Sequenzen spezifischer Gene wobei GFAP $\delta$  als Kofaktor fungiert. Hierbei könnte ein alternativer SOX2 Partner an eine „partner binding site“ binden. X und Y stellen exemplarisch weitere Kofaktoren dar. **TSP:** Transkriptionsstartpunkt der Zielgene.

Für GFAP $\delta$  sind ebenfalls zusätzliche Funktionen nachgewiesen worden. Es koordiniert die GFAP-Filament-Filament Interaktionen sowie die Assoziation zytoplasmatischer Proteine mit diesen, bildet selbst jedoch keine Filamente *in vitro* aus (Perng *et al.*, 2008). Eine Involvierung in nukleäre Prozesse ist bisher nicht beschrieben worden. Zusammenfassend ist jedoch durchaus vorstellbar, dass SOX2 und GFAP $\delta$  bereits im Zytosol interagieren, dieser Komplex in den Nukleus transferiert wird, dort an Promoter und/oder Enhancer spezifischer Zielgene bindet und deren Expression initiiert oder reprimiert (vgl. Abb. 6.3).

Interessanterweise wird GFAP $\delta$  vornehmlich in neurogenen Regionen des Gehirns (SVZ sowie im *gyrus dentatus* der SGZ), in denen adulte neurale Stammzellen lokalisiert sind, exprimiert (Roelofs *et al.*, 2005; van den Berge *et al.*, 2010; Kamphuis *et al.*, 2012). Ein analoges Expressionsmuster ist ebenso für SOX2 beschrieben worden (Ellis *et al.*, 2004; Ferri *et al.*, 2004). Ferner wurde eine Koexpression von SOX2 und GFAP $\delta$  in proliferierenden radialen Gliazellen sowie neuronalen Vorläuferzellen der humanen SVZ beschrieben (Baer *et al.*, 2007; Middeldorp *et al.*, 2010). Eine relativ neue, aber allgemein akzeptierte, Theorie geht von der Entstehung von Glioblastomen aus neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen in der SVZ aus (Zhu *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Schiffer *et al.*, 2010). In Anbetracht dieser Erkenntnisse sowie der SOX2/GFAP $\delta$  Interaktion in Glioblastomzellen *in vitro* und *in situ*, lässt vor dem Hintergrund der Tumorstammzellhypothese vermuten, dass SOX2 und GFAP $\delta$  in die Pathogenese von Glioblastomen involviert sein könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass SOX2 an der malignen Transformation nicht-neoplastischer Zellen beteiligt ist, für diesen Prozess allein jedoch nicht auszureichen scheint (Hussenet *et al.*, 2010). Möglicherweise stellt GFAP $\delta$  diesbezüglich einen interessanten Kandidaten dar. Die Beobachtung, dass sowohl SOX2 (Ma *et al.*, 2008) als auch GFAP $\delta$  (Andreiulo *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2012) in niedergradigen Astrozytomen exprimiert werden, könnte demzufolge als weiterer Hinweis interpretiert werden.

### 6.5.2.3 Interaktionsvalidierung an klinischem Material

Um die physiologische Relevanz der Interaktionen zu überprüfen wurden PLA Analysen an einem *tissue array* mit Tumorsektaten von 18 Glioblastompatienten durchgeführt. Zunächst wurde die Expression aller drei Proteine (SOX2, RUNX1 und GFAP $\delta$ ) untersucht. SOX2 wird in 78 % (14/18), RUNX1 in 89 % (16/18) und GFAP $\delta$  in 61 % (11/18) der Tumoren exprimiert, somit im überwiegenden Teil der untersuchten Präparate (vgl. 5.7.4.1). Die Interaktionsanalyse wurde anschließend mittels des PLA durchgeführt. Beide Interaktionen konnten in den Tumoren *in situ* nachgewiesen werden. Wie exemplarisch an einem Glioblastom dargestellt wurde (vgl. Abb. 5.31), sind die Interaktionen zwischen SOX2/RUNX1 und SOX2/GFAP $\delta$  sogar in demselben Tumor vorhanden, wobei nicht mit Sicherheit bestätigt

werden kann, dass auch dieselben Zellen des Tumors positiv für beide Interaktionen sind. In einem solchen Fall wäre denkbar, dass die drei Kandidaten einen ternären Komplex bilden. Dass RUNX1 und GFAP $\delta$  verschiedene SOX2 Bindestellen zu haben scheinen (vgl. 5.6.7), könnte diesbezüglich einen zusätzlichen Hinweis liefern. Andererseits ist auch eine simultane Regulation verschiedener Zielgene möglich. Dazu müsste jedoch überprüft werden, ob nahe der SOX2, auch eine DNA-Bindestelle für RUNX1 respektive GFAP $\delta$  lokalisiert ist. Das Vorhandensein solcher *partner binding sites* wurde bereits im Falle der SOX2/ $\delta$ EF3 Kooperation (spezifisch in Linsenzellen) sowie der SOX2/OCT4 Bindung nahe des Fgf4 Enhancers in embryonalen Stammzellen beschrieben (Kamachi *et al.*, 2000). Einige potentielle Bindestellen sowie durch SOX2 regulierte Gene sind in der Glioblastomzelllinie LN229 erst kürzlich publiziert worden. Es konnten 4714 SOX2-Bindestellen innerhalb 3420 bekannter Gene im Genom dieser Zelllinie identifiziert werden (Fang *et al.*, 2011b). Weiterführende Studien sollten sich verstärkt auf die DNA-Bindestellen der SOX2 Interaktionspartner in Glioblastomen konzentrieren.

Da die PLA Analysen an den Tumorpräparaten im vorgegebenen Zeitrahmen nur einmal durchgeführt werden konnten, weshalb auf eine Quantifizierung verzichtet wurde, sollten die Ergebnisse mit der nötigen Vorsicht interpretiert werden. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die Interaktionen *in situ* stattfinden und demzufolge physiologische Relevanz aufweisen.

## 6.6 Funktionelle Analysen nach (Doppel)-*knockdown*

Um zu überprüfen, ob die Interaktionen zwischen SOX2/RUNX1 sowie SOX2/GFAP $\delta$  funktionelle Relevanz aufweisen, wurden sowohl *knockdown*-, Doppel*knockdown* als auch Überexpressionsklone *in vitro* auf ein verändertes Proliferations- und Migrationsverhalten hin untersucht.

### 6.6.1 Funktionelle Analysen nach Modifikation der SOX2/RUNX1 Expression

In der Zelllinie U373MG, welche einen stabilen SOX2-*knockdown* aufweist, wurde zusätzlich RUNX1 temporär ausgeschaltet. In den Zelllinien U87MG sowie T98G, in denen eine stabile SOX2 Überexpression etabliert ist, wurde RUNX1 ebenfalls transient herunterreguliert. Bei den initialen RUNX1 Expressionsanalysen fiel auf, dass SOX2 RUNX1 zu regulieren scheint. So konnte in den stabilen SOX2-*knockdown* Klonen eine leicht verringerte, sowie in den SOX2 Überexpressionsklonen eine gesteigerte RUNX1 Expression beobachtet werden (vgl. Abb. 5.33). Die durch SOX2 regulierte RUNX1 Expression wurde bereits in der Zelllinie LN229 beschrieben (Fang *et al.*, 2011b) und scheint ebenso für die Zelllinien U373MG,

U87MG und T98G zuzutreffen. Demzufolge stellt dies eine mögliche Erklärung für die differentielle RUNX1 Expression zumindest in Glioblastomzelllinien dar.

Wie anhand der Proliferationsanalysen ersichtlich ist, führt der RUNX1-*knockdown* in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer reduzierten proliferativen Aktivität der Tumorzellen (vgl. 5.9.1). Diese Daten wurden zusätzlich durch eine zweite Methode überprüft und validiert (vgl. Abb. 5.40). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass RUNX1 einen proliferationsstimulierenden Einfluss auf die Glioblastomzellen *in vitro* ausübt. Zusätzlich konnte eine signifikante Reduktion der Zellteilungsrate nach Herunterregulation von RUNX1 auch in den SOX2-*knockdown* sowie SOX2 Überexpressionsklonen beobachtet werden. Wie bereits gezeigt wurde, weist SOX2 selbst eine proliferationsstimulierende Funktion in diesen Zelllinien auf. So konnte eine Reduktion der Proliferation nach einem SOX2-*knockdown* in U373MG Zellen (vgl. 5.2.1) sowie eine Steigerung dieser nach ektopischer SOX2 Expression in U87MG und T98G Zellen beobachtet werden (vgl. 5.4.1). Dass die proliferative Aktivität nach dem RUNX1-*knockdown* in den U373MG Zellen (SOX2-*knockdown*) noch stärker reduziert vorliegt und die durch die SOX2 Expression in den U87MG- sowie T98G-Zellen erhöhte Zellteilungsrate verringert wird, lässt vor dem Hintergrund der SOX2/RUNX1 Interaktion einen synergistischen Effekt und somit eine funktionelle Assoziation der beiden Transkriptionsfaktoren bezüglich der Proliferationsregulation in Glioblastomzellen vermuten. Überdies ist auch ein „crosstalk“ zwischen SOX2 und RUNX1 regulierten Signalwegen vorstellbar. RUNX1 ist vornehmlich als Regulator für die definitive Hämatopoese sowie als Schlüsselfaktor der akuten myeloischen Leukämie (AML) bekannt (Blyth *et al.*, 2005). Jedoch wurde ebenfalls eine differentielle RUNX1 Expression in Glioblastomzelllinien beschrieben (Vladimirova *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RUNX1 mit 5 weiteren essentiellen Transkriptionsfaktoren ein regulatorisches Netzwerk bildet, welches den mesenchymalen Subtyp von Glioblastomen charakterisiert (Carro *et al.*, 2010). Allerdings liefern die Ergebnisse der vorliegenden Studie erstmals funktionell relevante Daten, welche RUNX1 direkt mit der Regulation der proliferativen Aktivität in Glioblastomen in Verbindung bringen. Folgerichtig stellt sich die Frage, wie die SOX2/RUNX1 Kooperation die Proliferation von Glioblastomzellen reguliert. Wie bereits beschrieben wurde resultiert ein SOX2-*knockdown* in einer verringerten Expression von Cyclin D1 (vgl. 6.1). Ferner ist bekannt, dass RUNX1 die Expression von Cyclin D3 reguliert und den Übergang der  $G_1 \rightarrow S$ -Phase des Zellzyklus in myeloiden Zellen stimuliert (Bernardin-Fried *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass RUNX1 den Cyclin D2 Promotor binden kann und die  $G_1/S$ -Phase Transition signifikant beschleunigt (Strom *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Tatsachen lässt sich vermuten, dass SOX2 und RUNX1 zusammen Cyclin D1 und/oder Cyclin D2/D3 auch in Glioblastomzellen regulieren könnten, diese Kooperation die  $G_1/S$ -Phase Transition stimuliert und/oder beschleunigt und somit die Proliferationsrate der Zellen

steigert. Außerdem steuert RUNX1 die Proliferation muriner neuronaler Vorläuferzellen durch Repression der Transkription von p21<sup>CIP</sup> (Theriault *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde bereits eine Inhibition der Expression des Tumorsuppressorproteins p14<sup>ARF</sup> in Leukämiezellen durch RUNX1 (AML1-ETO) beschrieben (Linggi *et al.*, 2002). Da p14<sup>ARF</sup> als p53 assoziiertes Protein eine Art „checkpoint“ des Zellzyklus darstellt, könnte dies als zusätzlicher Hinweis interpretiert werden, wie die Kooperation zwischen SOX2/RUNX1 den p53-Signalweg beeinflusst und die Proliferation von Glioblastomzellen kontrolliert (vgl. 6.1). Welche weiteren Zellzyklus-assoziierten Gene tatsächlich durch die SOX2/RUNX1 Interaktion in Glioblastomen reguliert werden, sollte durch *microarray* Expressionsanalysen mit Doppelknockdown Klonen evaluiert werden. Diese Daten könnten ein vollständigeres Bild der SOX2/RUNX1-abhängigen Regulation der Proliferation liefern sowie weitere beteiligte Faktoren identifizieren.

Die Migrationsexperimente hingegen zeigen keinerlei Einfluss der RUNX1 Expression auf das Migrationspotential der Tumorzellen *in vitro*. Weder ein RUNX1-*knockdown* allein, noch in Kombination mit einem SOX2-*knockdown* oder einer SOX2-Überexpression lässt auf eine Involvierung von RUNX1 in migratorische Prozesse in Glioblastomzellen schließen. Obwohl für RUNX1 ein inhibitorischer Einfluss auf die Zellmigration in Leukämiezellen (Yang *et al.*, 2009) sowie ein stimulierender Effekt in Epithelzellen des Hautgewebes postuliert wird (Osorio *et al.*, 2011), scheinen in Glioblastomzellen differentielle Mechanismen und alternative SOX2 Interaktionspartner (z.B. NEDD9 und Galektin-1, vgl. 6.5.1) diesen Prozess zu beeinflussen.

Es wird bereits seit längerem diskutiert, dass RUNX-Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des jeweiligen genetischen Kontextes sowohl Tumorsuppressor- als auch protoonkogene Eigenschaften aufweisen können, welches die Entschlüsselung der genauen Funktionen zusätzlich erschwert (Blyth *et al.*, 2005). Aufgrund der in dieser Studie erhobenen Daten sowie den bisher erschienenen Glioblastom-assoziierten Publikationen lässt sich schlussfolgern, dass RUNX1 in dieser Tumorentität eher protoonkogene Eigenschaften zeigt. Dass sowohl SOX2 (Hussenet *et al.*, 2010) als auch RUNX1 (Kurokawa *et al.*, 1996) bereits mit der neoplastischen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht worden sind führt zu der Annahme, dass diese auch an der Pathogenese und/oder Progression von Glioblastomen beteiligt sein könnten. Da sich wie bereits erwähnt potentielle therapeutische Ansätze auf die SOX2 Interaktionspartner anstatt auf SOX2 selbst konzentrieren sollten, stellt RUNX1 ein vielversprechendes Ziel dar. Vor dem Hintergrund, dass ein RUNX1-*knockdown* das Migrationsverhalten der Glioblastomzellen *in vitro* nicht beeinflusst, die Proliferation hingegen signifikant zu verringern scheint, könnte eine spezifische Inhibition von

RUNX1 dazu beitragen, die Progressionsgeschwindigkeit des Tumors zu verlangsamen. Dies würde jedoch nur im Falle von Patienten deren Tumorzellen SOX2/RUNX1 positiv sind erfolgversprechend sein. Da jedoch die in dieser Studie untersuchten Tumoren in nahezu 80 % der Fälle positiv für SOX2 und in ca. 90 % reaktiv für RUNX1 sind, könnte dies für einen Großteil der Glioblastompatienten in Frage kommen. Ob sich eine RUNX1 Inhibition tatsächlich als therapeutisch effektiv und sinnvoll erweist, muss jedoch zunächst in Xenograftmodellen *in vivo* überprüft werden. Aufgrund der beschriebenen Tatsachen sollten zukünftige Studien darauf gerichtet sein, die funktionelle Rolle von RUNX1 in Glioblastomen detaillierter zu charakterisieren.

### 6.6.2 Funktionelle Analysen nach Modifikation der SOX2/GFAP $\delta$ Expression

Analog zu den Analysen mit veränderter SOX2/RUNX1 Expression sollten ebenfalls funktionelle Daten nach GFAP $\delta$ -*knockdown* erhoben werden. Wie in Abschnitt 5.10 beschrieben, liegt die Halbwertszeit für GFAP bei etwa 7 Tagen (Chiu und Goldman, 1984), welches den Einsatz spezifischer siRNA Moleküle nahezu ausschließt. Hinzu kommt, dass die GFAP $\alpha$  und GFAP $\delta$  Sequenzen sich lediglich in den letzten 123 Basen des C-Terminus, und dort auch nur partiell, unterscheiden, welches das Konzipieren spezifischer siRNAs stark limitiert. Auf Grund dieser Tatsachen sollte ein stabiler GFAP $\delta$ -*knockdown* mit shRNA-Konstrukten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Hol etabliert werden. Bei den viralen Transduktionen zeigte sich jedoch, dass ein eine hohe MOI (potentiell effizienterer *knockdown*) nach 5 Tagen zum Wachstumsstop sowie zur Apoptose der Zellen führt. Da dieser Effekt nicht bei den kontrolltransduzierten Zellen auftrat, kann dies auf die Herunterregulation von GFAP $\delta$  zurückgeführt werden und lässt demzufolge auf eine essentielle Rolle dieser Isoform in U373MG Zellen schließen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine GFAP $\delta$  Überexpression in einem Kollaps des hauptsächlich aus GFAP $\alpha$  bestehenden Filamentnetzwerkes in U373MG Zellen resultiert. Dabei scheint ein dosisabhängiger Effekt vorzuliegen, jedoch zeigen die Zellen keine apoptotischen Tendenzen (Perng *et al.*, 2008).

Ein potentiell moderater GFAP $\delta$ -*knockdown* auf mRNA-Ebene durch Verwendung einer geringeren MOI zeigte keinen Effekt auf Proteinebene. Dies lässt vermuten, dass durch die mRNA Restexpression entweder ausreichend Protein synthetisiert werden kann oder GFAP $\delta$  eine höhere Halbwertszeit aufweist als bisher angenommen. Es ist ebenso eine Entkopplung zwischen mRNA- und Proteinexpression denkbar sowie unbekannte kompensatorische Mechanismen, welche das Proteinlevel konstant halten. Möglich ist zudem eine posttranslationale Stabilisierung von GFAP $\delta$  bei zu niedrigen Konzentrationen.

Aufgrund der Tatsache, dass keine Reduktion des Proteinlevels erzielt werden konnte, war es nicht möglich funktionelle Daten bezüglich Proliferation und Migration zu generieren.



Dementsprechend kann über ein Zusammenspiel von SOX2 und GFAP $\delta$  bei der Regulation dieser Prozesse zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden. Welche zellulären Vorgänge durch die SOX2/GFAP $\delta$  Interaktion beeinflusst werden sollte jedoch das Ziel zukünftiger Studien sein.

## 6.7 Ausblick

Die proliferationsstimulierende Funktion von SOX2 in Glioblastomzellen konnte in der vorliegenden Studie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Im nächsten Schritt sollte daher auf molekularer Ebene, beispielsweise durch Signalweganalysen, detailliert untersucht werden, welche *upstream* Faktoren sowie *downstream* Effektoren zusätzlich involviert sind. Ferner bieten sich *microarray* Analysen mit den bereits vorliegenden *knockdown*- sowie Überexpressionsklonen an, um durch SOX2 regulierte Gene zu identifizieren, welches einen tieferen Einblick in beteiligte Mechanismen liefern kann. Hierzu könnte auch die Lasermikrodissektion genutzt werden, um SOX2-abhängige Genexpressionsmuster in primären Tumorzellen zu untersuchen. Die Analysen sollten ebenfalls auf den Interaktionspartner RUNX1 ausgeweitet werden. Anhand von *mircoarrays* könnte eruiert werden, welche Gene durch die SOX2/RUNX1 Interaktion reguliert werden. Die Validierung der Interaktion muss zudem an einer höheren Anzahl von Glioblastomresektaten erfolgen, um Aussagen über deren klinische Bedeutung treffen zu können. Des Weiteren sollten Xenograft-Experimente (Mausmodell) mit SOX2/RUNX1 Doppel*knockdown* Klonen durchgeführt werden, um den potentiell synergistischen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren *in vivo* zu überprüfen und somit deren physiologische Relevanz zu evaluieren.

Die *in vitro* beobachteten Migrationseffekte konnten *in vivo* nicht bestätigt, respektive anhand der Zelllinie U87MG nicht evaluiert werden. Zur Überprüfung des SOX2-abhängigen Migrationsverhaltens *in vivo* sollte daher sowohl eine alternative Zelllinie, als auch die Verwendung primärer Tumorzellen in Betracht gezogen werden, bei denen endogenes SOX2 (z.B. durch Arsentrioxid) transkriptionell inhibiert werden könnte. Außerdem könnten die vorliegenden SOX2-*knockdown* Klone der Zelllinie U373MG durch subkutane Applikation in die Flanke der Versuchstiere an die 3D-Umgebung des Wirtsgewebes adaptiert werden. Nach Resektion der Neoplasie und Rekultivierung der Tumorzellen, können diese anschließend intrakraniell implantiert werden, um deren Wachstumsmuster sowie Migrationsverhalten *in vivo* zu untersuchen. Falls sich die *in vitro* Beobachtungen im Mausmodell bestätigen, sollten zwingend die daran beteiligten Signalwege und Faktoren identifiziert werden, weil die diffuse Infiltration einzelner Tumorzellen eine der Hauptursachen der hohen Malignität, sowie die größte therapeutische Herausforderung bei der Behandlung von Glioblastomen darstellt. Um Aussagen über die Funktion von GFAP $\delta$  in Glioblastomzellen treffen zu können, müsste die Effizienz des GFAP $\delta$ -*knockdowns* optimiert werden. Alternativ könnte GFAP $\delta$  auch auf Proteinebene entweder durch einen spezifischen Inhibitor oder modifizierte Antikörper inaktiviert werden. Mittels funktioneller Analysen könnte dann die Relevanz der SOX2/GFAP $\delta$  Interaktion bezüglich der proliferativen Aktivität sowie des Migrationsverhaltens überprüft werden. Falls kein hinreichender *knockdown* erzielt werden kann, sollte eine

GFAP $\delta$  Überexpression in Betracht gezogen werden, anhand derer sich eine funktionelle Assoziation zwischen SOX2 und GFAP $\delta$  ebenso ableiten ließe.

Die kernständige Lokalisation von GFAP $\delta$  sollte ebenfalls mit einer weiteren Methode (z.B. fraktionierter Western Blot) bestätigt werden. Darüber hinaus könnte mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie oder Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung (Chip-Seq) evaluiert werden, ob GFAP $\delta$  direkt mit DNA interagiert und an welchen Abschnitten dies erfolgt. In einem solchen Fall wäre es interessant zu erfahren, ob GFAP $\delta$  an der Genregulation direkt oder indirekt beteiligt ist. Andernfalls bliebe zu klären, welche nukleären Funktionen GFAP $\delta$  stattdessen ausüben könnte.

Auch die nähere Charakterisierung weiterer potentieller SOX2 Interaktionspartner sollte das Ziel zukünftiger Studien sein. Neben den bereits mit Glioblastomen in Verbindung gebrachten Kandidaten wie beispielsweise NEDD9 oder Galektin-1 sind möglicherweise die Genprodukte des validierten ORF167 auf Chromosom 14 sowie der bislang nicht charakterisierte Locus 286437 von Interesse. Eventuell können bisher vollkommen unbekannte Faktoren identifiziert werden, die noch nicht mit der Pathogenese/Progression von Glioblastomen in Verbindung gebracht wurden. Womöglich können dadurch zusätzliche Informationen gewonnen werden, welche eine noch detailliertere Einsicht in die Biologie dieser Tumorentität ermöglichen.

Insgesamt ist ein noch umfassenderes Verständnis der durch SOX2 beeinflussten molekulargenetischen Mechanismen notwendig, um für eine therapeutische Intervention in Betracht gezogen zu werden, welches allerdings das langfristige Ziel darstellen sollte.



## 7 Zusammenfassung

Glioblastome sind hochmaligne Neoplasien des Gehirns, die von der WHO als Grad IV-Tumoren klassifiziert werden. Die Überlebensrate von Glioblastompatienten liegt trotz verbesserter Therapien nur bei 12 – 15 Monaten. Die Malignität liegt vor allem in der frühen und diffusen Infiltration einzelner Tumorzellen in umgebende Hirnareale begründet, wodurch es nach einer Resektion in über 90 % der Fälle zur Entstehung von Rezidiven kommt. Molekulargenetisch zeichnen sich diese Tumoren durch die Akkumulation multipler Mutationen, Translokationen und/oder chromosomale Aberrationen sowie zahlreiche fehlregulierte Signalkaskaden aus, welches mit der differentiellen Expression essentieller regulatorischer Faktoren einhergeht. Vor einiger Zeit wurde eine Überexpression in Glioblastomen auch für den Transkriptionsfaktor SOX2 beschrieben, auf dem das Hauptaugenmerk der vorliegenden Studie liegt. Anhand von *knockdown*- und Überexpressionsexperimenten konnte die proliferationsstimulierende Wirkung von SOX2 in Glioblastomzellen *in vitro* gezeigt und im Mausmodell *in vivo* bestätigt werden. Durch funktionelle Analysen wurde zudem ein inhibitorischer Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit der Tumorzellen *in vitro* beobachtet, welcher zellautonom reguliert zu werden scheint. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse *in vivo* steht allerdings noch aus.

Mittels *yeast two-hybrid screens*, mit einer aus der Glioblastomzelllinie U373MG generierten cDNA Bibliothek, konnten nach stringentem Ausschlussverfahren 34 potentielle, SOX2-spezifische Interaktionspartner identifiziert werden. Unter den Kandidaten befinden sich sowohl Zellzyklus assoziierte Proteine (WTAP, CDK5RAP1, MDM2) als auch migrationsrelevante Faktoren wie beispielsweise NEDD9. Zudem konnte eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RUNX1/AML1 sowie eine isoformspezifische Interaktion mit GFAP $\delta$  detektiert werden. Mit Hilfe des *proximity ligation assay* wurden diese Kooperationen in der Zelllinie U373MG *in situ* überprüft sowie deren physiologische Relevanz an in paraffin-eingebetteten Glioblastomresektaten validiert. Interessanterweise konnte eine kernständige Lokalisation einiger SOX2/GFAP $\delta$  Komplexe beobachtet werden, welches eine Beteiligung von GFAP $\delta$  bei genregulatorischen Prozessen vermuten lässt.

Ferner wurde die Funktion von RUNX1 sowie die Wechselwirkung mit SOX2 durch siRNA vermittelte, transiente RUNX1 Herunterregulation in den SOX2-*knockdown*- und Überexpressionsklonen evaluiert. Dabei konnte einerseits gezeigt werden, dass RUNX1 ebenfalls proliferationsfördernde Eigenschaften in Glioblastomzelllinien aufweist, andererseits lassen die Daten einen synergistischen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren bezüglich der Regulation der Tumorzellproliferation vermuten. Wohingegen die Migrationsfähigkeit, unabhängig des SOX2 Expressionsstatus, von RUNX1 nicht entscheidend beeinflusst zu werden scheint.

Die vorliegende Studie leistet somit einen Beitrag zum besseren Verständnis der durch SOX2 beeinflussten zellulären Prozesse in Glioblastomen und liefert zudem Hinweise über zusätzlich involvierte Faktoren. Zusammengenommen können die Informationen helfen, die Biologie dieser Tumoren im Detail noch besser zu verstehen.

## 8 Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Referenz
T98G	Dr. Hotfilder, Institut für Hämatologie und Onkologie, UKM	(Stein, 1979)
U373MG	<i>European Collection of Cell Cultures</i>	(Ponten und Macintyre, 1968)
U87MG	ATCC	(Ponten und Macintyre, 1968)

#### 8.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Echerichia coli</i> DH5 $\alpha$	F- supE44 $\Delta$ lac169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1relA1	(Hanahan, 1983); (Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

#### 8.1.3 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Reportergene
Y187	MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met-, gal80 $\Delta$ , URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ, MEL1.	(Harper <i>et al.</i> , 1993)	HIS3 MEL1 (lacZ)
Y190	MAT $\alpha$ ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3 112, gal4 $\Delta$ met-, gal80 $\Delta$ , cyh <sup>2</sup> , LYS2: GAL1 <sub>UAS</sub> -HIS3 <sub>TATA</sub> -HIS3, URA3: Gal1 <sub>UAS</sub> - GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	(Flick und Johnston, 1990); (Harper <i>et al.</i> , 1993)	HIS3 MEL1 (lacZ)
Y2H-Gold	MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::, GAL1 <sub>UAS</sub> -Gal1 <sub>TATA</sub> -His3, GAL2 <sub>UAS</sub> -Gal2 <sub>TATA</sub> -Ade2 URA3:: MEL1 <sub>UAS</sub> -Mel1 <sub>TATA</sub> AUR1-C MEL1	Nguyen, <i>unpublished</i>	ADE2 HIS-3 MEL1 AUR1-C (Aureobasidin A)

#### 8.1.4 Versuchstiere

Für die intrakranielle Transplantation (Xenografttransplantation) von Tumorzellen wurden ausschließlich weibliche, 9 Wochen alte NOD/SCID Mäuse verwendet, die von Herrn Dr. Hotfilder (Institut für Hämatologie und Onkologie, UKM) zur Verfügung gestellt wurden.

Genotyp	Referenz
NOD.CB17-Prkdc <sup>scid</sup> /J	(Prochazka <i>et al.</i> , 1992)

### 8.1.5 Reagenziensysteme & Kits

Name	Hersteller
Advantage® 2 PCR Kit	Clontech, Heidelberg
BioRad DC Protein assay	BioRad, München
DNA Clean & Concentrator™-25	Zymo Research, Irvine, CA 92614, USA
Duolink II Orange Starter kit	Olink Biosciences, Upsala, Schweden
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Genelute® Mammalian Total RNA Miniprep kit	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Luminata™ Forte Western HRP substrate	Millipore, Billerica, USA
Make Your Own "Mate & Plate™" Library System	Clontech, Heidelberg
Matchmaker® AD LD-Insert Screening Amplimer Set	Clontech, Heidelberg
Matchmaker® Insert Check PCR Mix 2	Clontech, Heidelberg
Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System	Clontech, Heidelberg
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Prep Plasmid Mini	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
TaqMan® Gene expression assays	Life Technologies Corp. Carlsbad, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	Life Technologies Corp. Carlsbad, USA
Uptilight™HRP blot substrate	Interchim, Montiucon Cedex, Frankreich
Yeast Media Set 2 Plus	Clontech, Heidelberg

### 8.1.6 Lösungen, Medien und Antibiotika für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high Glucose 4,5 g/L + L-Glutamin (E15-810)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Dulbecco's PBS (1 x) without Ca & Mg (H15-002)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FBS Gold (A15-151)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
G418 Sulfat (100 mg/ml Stocklösung)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Hygromycin B (100 mg/ml Stocklösung)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100 x) (P11-010)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin EDTA (1:250) (L11-004)	PAA Laboratories, Linz, Österreich



### 8.1.7 Enzyme

Die im Folgenden aufgeführten Enzyme werden mit optimierten Reaktionspuffern geliefert. Die spezifische Zusammensetzung kann den Datenblättern der Hersteller entnommen werden.

Name	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Alkaline Phosphatase, Calf intestinal	New England Biolabs, Frankfurt
BamHI	New England Biolabs, Frankfurt
BigDye® Terminator v3.1	Life Technologies Corp., Carlsbad USA
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt
HaeIII	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Platinum PFX DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

### 8.1.8 Immunologische Reagenzien

#### 8.1.8.1 primäre Antikörper

Name	Hersteller / Bezugsquelle
anti $\beta$ -Catenin (AP00511PU-N)	Acris Antibodies, San Diego, USA
anti Cadherin 11 (C0107-07)	USBiological, Massachusetts, USA
anti c-myc	Prof. Dr. A. Barnekow, Institut für experimentelle Tumorbologie, WWU-Münster
anti GFAP (Z0334)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
anti GFAPdelta ( $\delta$ )	Prof. Dr. E. Hol, Netherlands Institute of Neuroscience, Amsterdam
anti-Ki67 (M7240)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
anti RUNX1 (ab23980)	Abcam, Cambridge, UK
anti RUNX1 (ab92336)	Abcam, Cambridge, UK
anti SOX2 (MO15040)	Neuromics, Minneapolis, USA
anti Twist 1 (ab50581)	Abcam, Cambridge, UK
anti Vimentin (KlonV9, M072529-2)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

### 8.1.8.2 Isotypenkontrollen

Name	Hersteller
IgG mouse (X0931)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
IgG rabbit (X0936)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

### 8.1.8.3 sekundäre Antikörper

Name	Hersteller
<b>fluoreszenzgekoppelt</b>	
AlexaFluor® 488 goat anti-mouse IgG (A-11001)	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (711-165-152)	Dianova, Hamburg
<b>HRP (<i>horse radisch peroxidase</i>) gekoppelt</b>	
Monoklonal Anti-Rabbit IgG1 (A2074)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-Mouse IgG (Fab specific) (A3682)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<b>biotinylierte Antikörper</b>	
Biotinylated anti-mouse IgG (BA-2001)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Biotinylated anti-rabbit IgG (Ba-1000)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

### 8.1.9 Standards

Name	Hersteller
BSA Standard für BioRad D <sub>C</sub> Protein Assay (500-0007)	BioRad, München
Prestained Protein Ladder, Broad Range (P7710S) (10 – 230 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
Smart Ladder (DNA-Größenmarker; 200 – 10.000 bp) (Mw-1700-10)	Eurogentec GmbH, Köln

### 8.1.10 Primer

#### 8.1.10.1 Klonierungsprimer

Im Folgenden sind die *Primer*, die für die Klonierung der Deletionsmutaten von SOX2 verwendet wurden dargestellt. Als Referenzsequenz für das humane SOX2 wurde die *ACCESSION NUMBER* NM\_003106 (NCBI) verwendet. Die *primer* sind jeweils in 5'- 3' Richtung angegeben. Die Restriktionsschnittstelle ist in Fettschrift dargestellt. Für alle Konstrukte wurde derselbe *forward primer* benutzt.

SOX2 <i>full length</i>	forward: 5'-TC <b>GAATTC</b> ATGTACAACATGATGGAGACG-3' reverse: 5'-ATC <b>GGATCC</b> TCACATGTGTGAGAGGGGC-3'
SOX2 <sub>227Δ</sub>	reverse: 5'-ATC <b>GGATCC</b> GTAGGACATGCTGTAGGTG-3'
SOX2 <sub>200Δ</sub>	reverse: 5'-ATC <b>GGATCC</b> GTAGCGGTGCATGGGCTG-3'
SOX2 <sub>175Δ</sub>	reverse: 5'-ATC <b>GGATCC</b> CTGCATCATGCTGTAGCTGC-3'
SOX2 <sub>145Δ</sub>	reverse 5'-ATC <b>GGATCC</b> CACCCCGACCCCGCTCGC-3'
SOX2 <sub>130Δ</sub>	reverse: 5'-ATC <b>GGATCC</b> CCCGCCGGGCAGCGTGAC-3'

### 8.1.10.2 Sequenzierungsprimer

Für die Sequenzierung der erzeugten SOX2-Konstrukte sowie für die aus den *yeast two-hybrid screens* erhaltenen Klone wurden folgende *Primer* verwendet:

<b>Primer zum seq. des pGBKT7-Vektors</b>	<b>Sequenz</b>
T7 ( <i>forward</i> )	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
<i>bait4R</i> ( <i>reverse</i> )	5'-TAAAAATCATAAATCATAAG-3'
<b>Primer zum seq. des pGADT7-Rec-Vektors</b>	
<i>fish3M</i> ( <i>forward</i> )	5'-CTATTTCGATGGAGATAC-3'
<i>fish2R</i> ( <i>reverse</i> )	5'-AGATGGTGCACGGATGCACAG-3'

### 8.1.11 Vektoren

Im Folgenden sind die Ausgangsvektoren für das Klonieren der SOX2-Konstrukte (pGBKT7) und der *yeast two-hybrid screens* (pGADT7-Rec) dargestellt. Detaillierte Vektorkarten befinden sich im Anhang (vgl. 8.2).

<b>Vektor</b>	<b>Hersteller / Referenz</b>
( <i>bait</i> ) pGBKT7 DNA-Bindedomäne	Clontech, Heidelberg (Louvét <i>et al.</i> , 1997)
( <i>prey</i> ) pGADT7-Rec DNA-Aktivierungsdomäne	Clontech, Heidelberg (Chien <i>et al.</i> , 1991)

## 8.1.12 Reaktionspuffer und Standardlösungen

Reaktionspuffer	Herstellung
0,5 % BSA/PBS	0,5 % (w/v) BSA in PBS (pH 7,4)
5 × Laemmli-Auftragspuffer (Western Blot)	0,3125 M Tris-HCl, pH6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (w/v) Glycerin 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
10 x Dye (DNA Auftragspuffer)	6,25 mM Bromphenolblau in A. bidest 1:1 mit Glycerin versetzen, steril filtrieren (0,22 µm)
10 x TST	100 mM Tris/HCL pH 8,0 1,5 M NaCl 1 % (w/v) Tween 20
10 x TBS	100 mM Tris HCL (pH 7,5) 150 mM NaCl
10 x TBST	200 mM Tris HCL (pH 7,5) 500 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 0,2 % (v/v) Triton X-100
50 x TAE	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA, pH 8,0
Blockierungspuffer I für Western Blot	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBST
Blockierungspuffer II für Western Blot	5 % (w/v) BSA, Biotin frei in 1 x TBST
Blockierungspuffer III für Western Blot	3 % (w/v) Casein in Maleinsäurepuffer
Blotpuffer (1 x)	25 mM Tris 191,8 mM Glycin 20 % (w/v) Methanol pH 8,3
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest 24 h Inkubation bei RT, autoklavieren
Lower-Tris	1,5 mM Tris-HCl, pH8,8 0,4 % (w/v) SDS
PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 1,66 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 9,58 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4 einstellen
Ponceau-S-Lösung (10 x)	2 % (w/v) Ponceau-S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure
Puffer A (1 x) für PLA	8,8 g NaCl 1,2 g Tris 0,5 ml Tween 20 800 ml Aqua bidest pH 7,4 einstellen ad 1 L Aqua bidest steril filtrieren
Puffer B (1 x) für PLA	5,84 g NaCl 4,24 g Tris 26,0 g Tris-HCl 500 ml Aqua bidest pH 7,5 einstellen ad 1 L Aqua bidest

	steril filtrieren (0,22 µm)
Tris-HCl (1 M)	121,1 g Tris Base ad 1 L Aqua bidest mit HCl pH 7,6 einstellen
MTT-Stocklösung (12 mM)	5 mg MTT ad 1 ml PBS steril filtrieren (0,22 µm)
RIPA (Lysepuffer für Proteinbestimmungen)	150 mM NaCl 50 mM Tris (pH 8,0) 1 % (w/v) NP-40 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % (w/v) SDS
DAB	10 mg DAB ad 20 ml 35 mM Tris pH 7,4 40 µl 30 %iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> steril filtrieren (0,22 µm) 8 % (v/v) NiCl
Upper-Tris	0,5 M Tris·HCl, pH8,8 0,4 % (w/v) SDS

### 8.1.13 Chemikalien

Falls nicht anderweitig vermerkt, entsprechen alle Chemikalien dem Reinheitsgrad p.a.

3-Amino-1,2,3-triazol (3AT)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D galaktopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
α-D(+) Glukose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Acrylamid / Bisacrylamid (37.5:1)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Aureobasidin A	Clontech, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
CasyTon-Lösung	Innovatis AG, Reutlingen
Carrier-DNA	Clontech, Frankreich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Fluka-Chemie GmbH, Buchs

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
dNTP <i>nucleotide</i> Mix	Bioline, Luckenwalde
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Fluoromount	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Formaldehyd 37 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hoechst Farbstoff 33258	Life Technologies Corp., Carlsbad USA
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Argininhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Histidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Isoleucin	Merck, Darmstadt
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Lysinmonochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Phenylalanin	Merck, Darmstadt
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
PCR-Wasser	Merck, Darmstadt
Pepton, tryptisch verdaut	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Salzsäure (konzentriert)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
SD-Hefe-Basis-Medium	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminohexan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tween 20	Merck, Darmstadt

#### 8.1.14 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav HIClave HV-85	HMC, Tüßling
Autostainer Link 48	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Blot-Apparatur Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Digitalkamera für BX50 Colorview II	Soft Imaging, Münster
Feinwaage ED 124S-OCE	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskope (BX50 und IX50)	Olympus, Tokyo, Japan
Geldokumentationsanlage Dual Intensity UV Transiluminator	UVP, Cambridge UK
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Inverse Mikroskope CK30 und BX51	Olympus, Tokyo, Japan

Konfokalmikroskop 510 Meta Laser Scanning Mikroskop	Zeiss, Jena
LabelGuard-Küvette LabelGuard Microliter Cell	Implen, München
Magnetrührer mit Heizplatte RET basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Cell-Apparatur	Bio-Rad, München
MRT 9,4T BioSpec 94/20 USR	Bruker, Ettlingen
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-mV Meter pH526	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer Multiscan Ex	MTX Lab Systems Inc., Vienna, USA
Reagenzglasschüttler, Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Reinstwasseranlage MilliQ	Millipore, Billerica, USA
Research Pipetten (2,5, 10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
RTq-PCR Gerät Gene Amp 5700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
RTq-PCR Gerät Step One Plus	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Schüttler Unitwist	Uni Equip, Martinsried
Spannungsquelle Power Pac 200	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München
Steril Bank Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
ThermoCykler PTC 200	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Tischzentrifuge Sprout	Kisker Biotech, Steinfurt
Trockenschrank Heraeus Funktion Line	Thermo Scientific, Waltham, USA
UV/Vis-Spektrophotometer NanoPhotometer	Implen, München
Wasserbad	Fisherbrand, Schwerte
Zellkulturinkubator Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellzählapparatur CASY® 1 DT	Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 Rotor SS34	Heraeus, Hanau



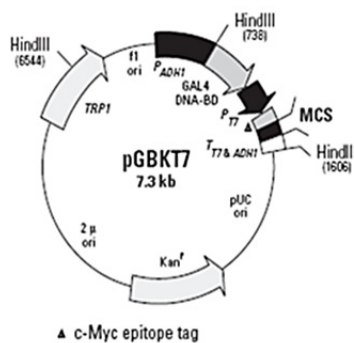
**8.1.15 verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
analySIS five	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
AxioVision 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
cell <sup>^</sup> F	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Chromas Lite 2.1	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien
Clone Manager 4.1	Scientific & Educational Software, USA
Gel-Pro <sup>®</sup> Analyzer 3.0	Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA
GeneAMP <sup>®</sup> 5700	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
ImageJ	National Institutes of Health, USA
MS-Office 2003, 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
StepOne v2.2.2	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
TScratch	ETH, Zürich (cse-lab.ethz.ch)
Zen light 2009	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen

8.2 Vektorkarten

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2-full length (human; 954bp; 317 aa)  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)

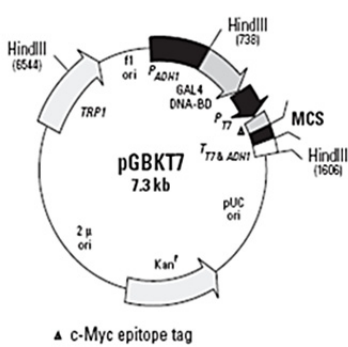


**Insert:** SOX2 full length (human; 954bp; 317aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) insertiert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2 full length liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E.coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2<sub>227Δ</sub> (human; 681bp; aa1 - aa227 )  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)

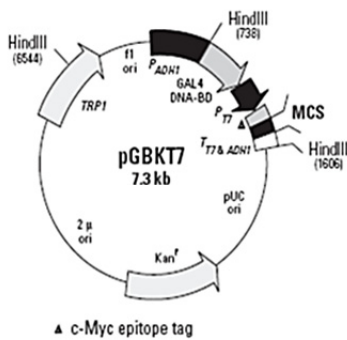


**Insert:** SOX2<sub>227Δ</sub> (human; 681bp; 227aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) inseriert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2<sub>227Δ</sub> liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E.coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rüter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2<sub>200Δ</sub> (human; 600 bp; aa1 - aa200)  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)

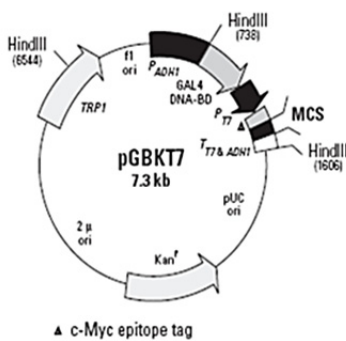


**Insert:** SOX2<sub>200Δ</sub> (human; 600 bp; 200aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) insertiert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2<sub>200Δ</sub> liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E.coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rüter

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2<sub>175Δ</sub> (human; 525 bp; aa1 – aa175)  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)

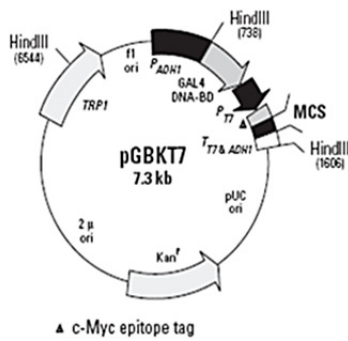


**Insert:** SOX2<sub>175Δ</sub> (human; 525 bp; 175aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) inseriert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2<sub>175Δ</sub> liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E. coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2<sub>145Δ</sub> (human; 435 bp; aa1 – aa145 )  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)

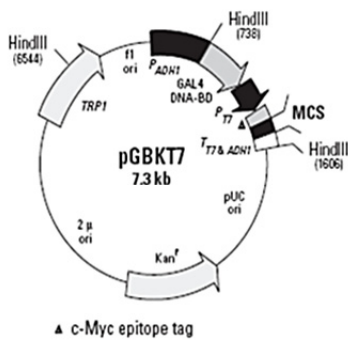


**Insert:** SOX2<sub>145Δ</sub> (human; 435 bp; 145aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) inseriert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2<sub>145Δ</sub> liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E. coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter

Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 08.2009  
 Plasmid: pGBKT7-DNA-BD-SOX2<sub>130Δ</sub> (human; 390 bp; aa1 – aa130 )  
 Ausgangsvektor: pGBKT7-DNA-BD (Clontech)



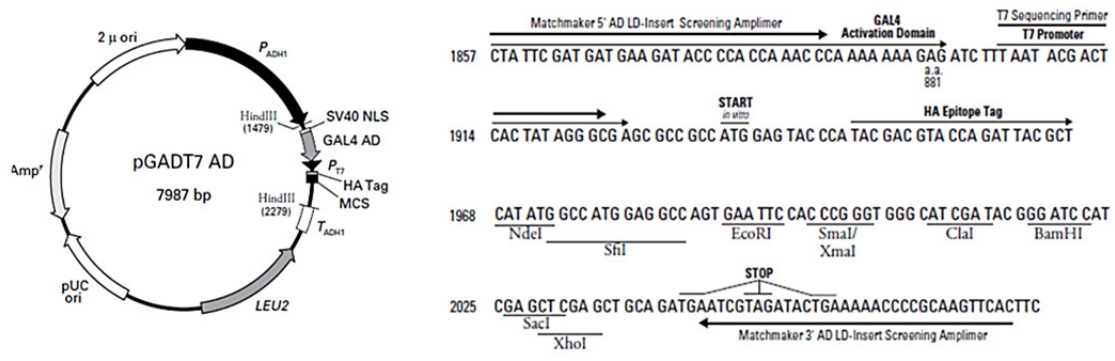
**Insert:** SOX2<sub>130Δ</sub> (human; 390 bp; 130aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGBKT7-DNA-BD (Hefeexpressionsvektor) insertiert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 22.01.10). SOX2<sub>130Δ</sub> liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E.coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter



Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 11.2010  
 Plasmid: pGADT7-DNA-AD-GFAP $\alpha$  *full length* (human; 1296 bp; 432aa)  
 Ausgangsvektor: pGADT7-DNA-AD (Clontech)



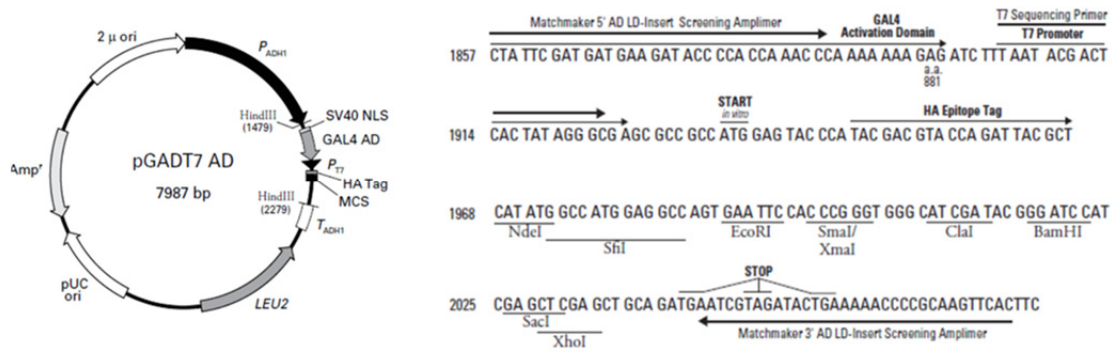
**Insert:** GFAP $\alpha$  *full length* (human; 1296 bp; 432 aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGADT7-DNA-AD (Hefeexpressionsvektor) inseriert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 15.01.11). GFAP $\alpha$  liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E.coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter



Universitätsklinikum Münster (WWU)  
**Institut für Neuropathologie**  
 Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A7  
 48149 Münster  
 Leiter: Prof. Dr. W.Paulus

Erzeuger/Datum: Lars Rütter 11.2010  
 Plasmid: pGADT7-DNA-AD-GFAP $\delta$  *full length* (human; 1293 bp; 431aa)  
 Ausgangsvektor: pGADT7-DNA-AD (Clontech)



**Insert:** GFAP $\delta$  *full length* (human; 1293 bp; 431 aa) wurde über EcoRI / BamHI in den pGADT7-DNA-AD (Hefeexpressionsvektor) inseriert. Das Konstrukt wurde sequenziert (UKM 15.01.11). GFAP $\delta$  liegt "in frame" zur DNA-BD vor.

*E. coli* Stamm: DH5  
 Sicherheitsstufe: S1  
 Antibiotika Resistenz: Kanamycin  
 Referenz: Laborjournal L.Rütter

## 8.3 Sequenzierungen/Blastanalysen

## pGBKT7-SOX2-full length forward (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)

Score = 1397 bits (756), Expect = 0.0	
Identities = 756/756 (100%), Gaps = 0/756 (0%)	
Strand=Plus/Plus	
Query 1	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTcgggggggc 60
Sbjct 438	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTCGGGGGGC 497
Query 61	ggcggggcggcaactccaccgcgggcggggcggcggcggcAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 120
Sbjct 498	GGCGGGCGCAACTCCACCGGCGGGCGGGCGGGCGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 557
Query 121	GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCAGGGGCGAGCGGCGCAAGATGGCC 180
Sbjct 558	GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCAGGGGCGAGCGGCGCAAGATGGCC 617
Query 181	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 240
Sbjct 618	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 677
Query 241	CTTTTGTTCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 300
Sbjct 678	CTTTTGTTCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 737
Query 301	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGGCCCGCGGAAAAACCAAGACGCTCATG 360
Sbjct 738	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGGCCCGCGGAAAAACCAAGACGCTCATG 797
Query 361	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGGGCGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGGCAATAGCATGGCG 420
Sbjct 798	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGGGCGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGGCAATAGCATGGCG 857
Query 421	AGCGGGGTTCGGGGTGGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC 480
Sbjct 858	AGCGGGGTTCGGGGTGGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC 917
Query 481	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC 540
Sbjct 918	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC 977
Query 541	CCGCAGCACCCGGGCCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC 600
Sbjct 978	CCGCAGCACCCGGGCCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC 1037
Query 601	GACGTGAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCG 660
Sbjct 1038	GACGTGAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCG 1097
Query 661	CCCACCTACAGCATGTCCTACTCGCAGCAGGGCACCCCTGGCATGGCTCTTGGCTCCATG 720
Sbjct 1098	CCCACCTACAGCATGTCCTACTCGCAGCAGGGCACCCCTGGCATGGCTCTTGGCTCCATG 1157
Query 721	GGTTCGGTGGTCAAGTCCGAGGCCAGCTCCAGCCCC 756
Sbjct 1158	GGTTCGGTGGTCAAGTCCGAGGCCAGCTCCAGCCCC 1193

**pGBKT7-SOX2 full length reverse (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)**

Score = 1275 bits (690), Expect = 0.0	
Identities = 690/690 (100%), Gaps = 0/690 (0%)	
Strand=Plus/Minus	
Query	92 CCTCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGCCGTTAATGGCCGTGCCGGGCACCGGGCCGCTC 151
Sbjct	1393 CCTCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGCCGTTAATGGCCGTGCCGGGCACCGGGCCGCTC 1334
Query	152 TGGTAGTGCTGGGACATGTGAAGTCTGTGGGGGGCGGCGGTTCCGGCACCTCGGCGCCG 211
Sbjct	1333 TGGTAGTGCTGGGACATGTGAAGTCTGTGGGGGGCGGCGGTTCCGGCACCTCGGCGCCG 1274
Query	212 GGGAGATACATGCTGATCATGTCCCAGGAGTCCCAGGCTGGCAGGGCGCCCTGGAGTGG 271
Sbjct	1273 GGGAGATACATGCTGATCATGTCCCAGGAGTCCCAGGCTGGCAGGGCGCCCTGGAGTGG 1214
Query	272 GAGGAAGAGGTAACCACAGGGGGGCTGGAGCTGGCCTCGGACTTGACCACCGAACCCATG 331
Sbjct	1213 GAGGAAGAGGTAACCACAGGGGGGCTGGAGCTGGCCTCGGACTTGACCACCGAACCCATG 1154
Query	332 GAGCCAAGAGCCATGCCAGGGGTGCCCTGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGGTGGGCGAG 391
Sbjct	1153 GAGCCAAGAGCCATGCCAGGGGTGCCCTGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGGTGGGCGAG 1094
Query	392 CCGTTCATGTAGGTCTGCGAGCTGGTTCATGGAGTTGACTGCAGGGCGCTCACGTCGTAG 451
Sbjct	1093 CCGTTCATGTAGGTCTGCGAGCTGGTTCATGGAGTTGACTGCAGGGCGCTCACGTCGTAG 1034
Query	452 CGGTGCATGGGCTGCATCTGCGCTGCGCCGTGCGCATTGAGGCCCGGGTGCTGCCGGTAG 511
Sbjct	1033 CGGTGCATGGGCTGCATCTGCGCTGCGCCGTGCGCATTGAGGCCCGGGTGCTGCCGGTAG 974
Query	512 CCCAGCTGGTCCCTGCATCATGCTGTAGCTGCCGTTGCTCCAGCCGTTTCATGTGCCGTAA 571
Sbjct	973 CCCAGCTGGTCCCTGCATCATGCTGTAGCTGCCGTTGCTCCAGCCGTTTCATGTGCCGTAA 914
Query	572 CTGTCCATGCGCTGGTTTCACGCCCGCGCCAGGCCGGCGCCACCCCGACCCCGCTCGCC 631
Sbjct	913 CTGTCCATGCGCTGGTTTCACGCCCGCGCCAGGCCGGCGCCACCCCGACCCCGCTCGCC 854
Query	632 ATGCTATTGCCGCCGGGGGCCAGCAGCCCGCCGGGCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCATG 691
Sbjct	853 ATGCTATTGCCGCCGGGGGCCAGCAGCCCGCCGGGCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCATG 794
Query	692 AGCGTCTTGGTTTTCCGCCGGGGCCGGTATTTATAATCCGGGTGCTCCTTCATGTGCAGC 751
Sbjct	793 AGCGTCTTGGTTTTCCGCCGGGGCCGGTATTTATAATCCGGGTGCTCCTTCATGTGCAGC 734
Query	752 GCTCGCAGCCGCTTAGCCTCGTCGATGAAC 781
Sbjct	733 GCTCGCAGCCGCTTAGCCTCGTCGATGAAC 704

**pGBKT7-SOX2<sub>227Δ</sub> forward (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)**

Query	1	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTcgggggggc	60
Sbjct	438	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTCGGGGGGC	497
Query	61	ggcggcggaactccaccgcgggcgggcgggcAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC	120
Sbjct	498	GGCGGGGCAACTCCACCgCGGGCGGGCGGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC	557
Query	121	GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC	180
Sbjct	558	GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC	617
Query	181	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA	240
Sbjct	618	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA	677
Query	241	CTTTTGTGCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG	300
Sbjct	678	CTTTTGTGCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG	737
Query	301	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGGCCCGGGCGGAAAAACCAAGACGCTCATG	360
Sbjct	738	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGGCCCGGGCGGAAAAACCAAGACGCTCATG	797
Query	361	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGGGGGCTGCTGGCCCCGGCGGCAATAGCATGGCG	420
Sbjct	798	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGGGGGCTGCTGGCCCCGGCGGCAATAGCATGGCG	857
Query	421	AGCGGGGTGCGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGGGGCTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC	480
Sbjct	858	AGCGGGGTGCGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGGGGCTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC	917
Query	481	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC	540
Sbjct	918	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC	977
Query	541	CCGCAGCACCCGGGCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC	600
Sbjct	978	CCGCAGCACCCGGGCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC	1037
Query	601	GACGTGAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCG	660
Sbjct	1038	GACGTGAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCG	1097
Query	661	CCCACCTACAGCATGTCCTAC	681
Sbjct	1098	CCCACCTACAGCATGTCCTAC	1118

**pGBKT7-SOX2<sub>200Δ</sub> forward (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)**

Query	1	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTcgggggggc	60
Sbjct	438	ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTCGGGGGGC	497
Query	61	ggcggcggcgaactccaccgcgggcgggcgggcggcggcAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC	120
Sbjct	498	GGCGGCGGCAACTCCACCgCGGCGGCGGCCGGCGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC	557
Query	121	GTC AAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGC CAAGATGGCC	180
Sbjct	558	GTC AAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGC CAAGATGGCC	617
Query	181	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA	240
Sbjct	618	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA	677
Query	241	CTTTTGTGCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG	300
Sbjct	678	CTTTTGTGCGGAGACGGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG	737
Query	301	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGGAAAACCAAGACGCTCATG	360
Sbjct	738	CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGGAAAACCAAGACGCTCATG	797
Query	361	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCGGCGGCAATAGCATGGCG	420
Sbjct	798	AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCGGCGGCAATAGCATGGCG	857
Query	421	AGCGGGGTGCGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC	480
Sbjct	858	AGCGGGGTGCGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC	917
Query	481	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC	540
Sbjct	918	GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTAC	977
Query	541	CCGCAGCACCCGGGCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC	600
Sbjct	978	CCGCAGCACCCGGGCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTAC	1037
Query	601	G 601	
Sbjct	1038	G 1038	

**pGBKT7-SOX2<sub>175Δ</sub> forward (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)**

```

Score = 972 bits (526), Expect = 0.0
Identities = 526/526 (100%), Gaps = 0/526 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTcgggggggc 60
      |||
Sbjct 438 ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTCGGGGGGC 497

Query 61 ggcggcgggcaactccaccggcgggcgggcgggcgggcAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 120
      |||
Sbjct 498 GGCGCGGGCAACTCCACCGGCGGGCGGGCGGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 557

Query 121 GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC 180
      |||
Sbjct 558 GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC 617

Query 181 CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 240
      |||
Sbjct 618 CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 677

Query 241 CTTTTGTCTGGAGACGGAGAAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 300
      |||
Sbjct 678 CTTTTGTCTGGAGACGGAGAAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 737

Query 301 CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGAAAAACCAAGACGCTCATG 360
      |||
Sbjct 738 CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGAAAAACCAAGACGCTCATG 797

Query 361 AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGCAATAGCATGGCG 420
      |||
Sbjct 798 AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGCAATAGCATGGCG 857

Query 421 AGCGGGGTCTGGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC 480
      |||
Sbjct 858 AGCGGGGTCTGGGGTGGGCGCCGGCCTGGGCGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGTTAC 917

Query 481 GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGG 526
      |||
Sbjct 918 GCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGG 963
    
```

**pGBKT7-SOX2<sub>145Δ</sub> forward (Referenzsequenz: NM\_003106.3, cds)**

```

Score = 808 bits (437), Expect = 0.0
Identities = 437/437 (100%), Gaps = 0/437 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTcgggggggc 60
      |||
Sbjct 438 ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTTCGGGGGGC 497

Query 61 ggcggcgggcaactccaccggcgggcgggcgggcgggcAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 120
      |||
Sbjct 498 GGCGCGGGCAACTCCACCGGCGGGCGGGCGGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGC 557

Query 121 GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC 180
      |||
Sbjct 558 GTCAAGCGGCCCATGAATGCCTTCATGGTGTGGTCCCGCGGGCAGCGGCGCAAGATGGCC 617

Query 181 CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 240
      |||
Sbjct 618 CAGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAAA 677

Query 241 CTTTTGTCTGGAGACGGAGAAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 300
      |||
Sbjct 678 CTTTTGTCTGGAGACGGAGAAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTG 737

Query 301 CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGAAAAACCAAGACGCTCATG 360
      |||
Sbjct 738 CACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAAATACCGGCCCGGGCGAAAAACCAAGACGCTCATG 797

Query 361 AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGCAATAGCATGGCG 420
      |||
Sbjct 798 AAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGCGGGGCTGCTGGCCCCCGGGCGCAATAGCATGGCG 857

Query 421 AGCGGGGTCTGGGGTGGG 437
      |||
Sbjct 858 AGCGGGGTCTGGGGTGGG 874
    
```



**pGADT7-GFAP $\alpha$  full length forward (Referenzsequenz: NM\_002055.4, cds)**

Score = 1522 bits (824), Expect = 0.0	
Identities = 824/824 (100%), Gaps = 0/824 (0%)	
Strand=Plus/Plus	
Query	1 ATGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCCGCTCCTACGTCTCCTCAGGGGAGATG 60
Sbjct	67 ATGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCCGCTCCTACGTCTCCTCAGGGGAGATG 126
Query	61 ATGGTGGGGGGCCTGGCTCCTGGCCGCCGCTCGGGTCTGGCACCCGCCTCTCCCTGGCT 120
Sbjct	127 ATGGTGGGGGGCCTGGCTCCTGGCCGCCGCTCGGGTCTGGCACCCGCCTCTCCCTGGCT 186
Query	121 CGAATGCCCCCTCCACTCCCGACCCGGGTGGATTTCTCCCTGGCTGGGGCACTCAATGCT 180
Sbjct	187 CGAATGCCCCCTCCACTCCCGACCCGGGTGGATTTCTCCCTGGCTGGGGCACTCAATGCT 246
Query	181 GGCTTCAAGGAGACCCGGGCCAGTGAGCGGGCAGAGATGATGGAGCTCAATGACCGCTTT 240
Sbjct	247 GGCTTCAAGGAGACCCGGGCCAGTGAGCGGGCAGAGATGATGGAGCTCAATGACCGCTTT 306
Query	241 GCCAGCTACATCGAGAAGGTTTCGCTTCTGGAACAGCAAAAACAAGGCGCTGGCTGCTGAG 300
Sbjct	307 GCCAGCTACATCGAGAAGGTTTCGCTTCTGGAACAGCAAAAACAAGGCGCTGGCTGCTGAG 366
Query	301 CTGAACCAGCTGCGGGCCAAGGAGCCACCAAGCTGGCAGACGTCTACCAGGCTGAGCTG 360
Sbjct	367 CTGAACCAGCTGCGGGCCAAGGAGCCACCAAGCTGGCAGACGTCTACCAGGCTGAGCTG 426
Query	361 CGAGAGCTGCGGGCTGCGGCTCGATCAACTCACCGCCAACAGCGCCCGGCTGGAGGTTGAG 420
Sbjct	427 CGAGAGCTGCGGGCTGCGGCTCGATCAACTCACCGCCAACAGCGCCCGGCTGGAGGTTGAG 486
Query	421 AGGGACAATCTGGCACAGGACCTGGCCACTGTGAGGCAGAAGCTCCAGGATGAAACCAAC 480
Sbjct	487 AGGGACAATCTGGCACAGGACCTGGCCACTGTGAGGCAGAAGCTCCAGGATGAAACCAAC 546
Query	481 CTGAGGCTGGAAGCCGAGAACAACCTGGCTGCCTATAGACAGGAAGCAGATGAAGCCACC 540
Sbjct	547 CTGAGGCTGGAAGCCGAGAACAACCTGGCTGCCTATAGACAGGAAGCAGATGAAGCCACC 606
Query	541 CTGGCCCGTCTGGATCTGGAGAGGAAGATTGAGTCGCTGGAGGAGGAGATCCGGTTCTTG 600
Sbjct	607 CTGGCCCGTCTGGATCTGGAGAGGAAGATTGAGTCGCTGGAGGAGGAGATCCGGTTCTTG 666
Query	601 AGGAAGATCCACGAGGAGGAGGTTTCGGGAACTCCAGGAGCAGCTGGCCCGACAGCAGGTC 660
Sbjct	667 AGGAAGATCCACGAGGAGGAGGTTTCGGGAACTCCAGGAGCAGCTGGCCCGACAGCAGGTC 726
Query	661 CATGTGGAGCTTGACGTGGCCAAGCCAGACCTCACCGCAGCCCTGAAAGAGATCCGCACG 720
Sbjct	727 CATGTGGAGCTTGACGTGGCCAAGCCAGACCTCACCGCAGCCCTGAAAGAGATCCGCACG 786
Query	721 CAGTATGAGGCAATGGCGTCCAGCAACATGCATGAAGCCGAAGAGTGGTACCGCTCCAAG 780
Sbjct	787 CAGTATGAGGCAATGGCGTCCAGCAACATGCATGAAGCCGAAGAGTGGTACCGCTCCAAG 846
Query	781 TTTGCAGACCTGACAGACGCTGCTGCCCGCAACGCGGAGCTGCT 824
Sbjct	847 TTTGCAGACCTGACAGACGCTGCTGCCCGCAACGCGGAGCTGCT 890



**pGADT7-GFAP $\alpha$  full length reverse (Referenzsequenz: NM\_002055.4, cds)**

Score = 1476 bits (799), Expect = 0.0		Identities = 799/799 (100%), Gaps = 0/799 (0%)	
Strand=Plus/Minus			
Query	50	CCTCACATCACATCCTTGTGCTCCTGCTTGGACTCCTTAATGACCTCTCCATCCCGCATC	109
Sbjct	1367		1308
Query	110	TCCACGGTCTTCACCACGATGTTCTCTTGAGGTGGCCTTCTGACACAGACTTGGTGTCC	169
Sbjct	1307		1248
Query	170	AGGCTGGTTTCTCGAATCTGCAGGTTGGAGAAGGTCTGCACGGGAATGGTGTATCCGGTTC	229
Sbjct	1247		1188
Query	230	TCCTCGCCCTCTAGCAGCTTCTGTAGGTGGCGATCTCGATGTCCAGGGCCAGCTTGACA	289
Sbjct	1187		1128
Query	290	TTGAGCAGGTCTGGTACTCCTGCAAGTGGCGGGCCATCTCGTCTTGAGGCTCTGCCCC	349
Sbjct	1127		1068
Query	350	TCTTCCTCCAGCCGCGCCAGCGCCTCCTGATAACTGGCCGCCTCCCGCACGTGCCGCTCC	409
Sbjct	1067		1008
Query	410	TCCTGCTCGCGCATCTGCCTCTCCAGGGACTCGTTTCGTGCCGCGCAGAGACTCCAGGTCCG	469
Sbjct	1007		948
Query	470	CAGGTCAAGGACTGCAACTGGCGCCGGTAGTCGTTGGCTTCGTGCTTGGCCTGGCGGAGC	529
Sbjct	947		888
Query	530	AGCTCCGCGTTGCGGGCAGCAGCGTCTGTCAAGTCTGCAAACTTGGAGCGGTACCACTCT	589
Sbjct	887		828
Query	590	TCGGCTTCATGCATGTTGCTGGACGCCATTGCCTCATACTGCGTGCCGATCTCTTTCAGG	649
Sbjct	827		768
Query	650	GCTGCGGTGAGGTCTGGCTTGGCCACGTCAAGCTCCACATGGACCTGCTGTGGGCCAGC	709
Sbjct	767		708
Query	710	TGCTCCTGGAGTTCCCGAACCTCCTCCTCGTGGATCTTCTCAAGAACC GGATCTCCTCC	769
Sbjct	707		648
Query	770	TCCAGCGACTCAATCTTCTCTCCAGATCCAGACGGGCCAGGGTGGCTTCATCTGCTTCC	829
Sbjct	647		588
Query	830	TGTCTATAGGCAGCCAGGT	848
Sbjct	587		569

**pGADT7-GFAP $\delta$  full length forward (Referenzsequenz: NM\_001131019.2, cds)**

Score = 1485 bits (804), Expect = 0.0			
Identities = 804/804 (100%), Gaps = 0/804 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
Query	1	ATGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCCGCTCCTACGTCTCCTCAGGGGAGATG	60
Sbjct	67	ATGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCCGCTCCTACGTCTCCTCAGGGGAGATG	126
Query	61	ATGGTGGGGGGCTGGCTCCTGGCCGCCGTCTGGGTCTGGCACCCGCTCTCCCTGGCT	120
Sbjct	127	ATGGTGGGGGGCTGGCTCCTGGCCGCCGTCTGGGTCTGGCACCCGCTCTCCCTGGCT	186
Query	121	CGAATGCCCCCTCCACTCCCGACCCGGGTGGATTTCTCCCTGGCTGGGGCACTCAATGCT	180
Sbjct	187	CGAATGCCCCCTCCACTCCCGACCCGGGTGGATTTCTCCCTGGCTGGGGCACTCAATGCT	246
Query	181	GGCTTCAAGGAGACCCGGGCCAGTGAGCGGGCAGAGATGATGGAGCTCAATGACCGCTTT	240
Sbjct	247	GGCTTCAAGGAGACCCGGGCCAGTGAGCGGGCAGAGATGATGGAGCTCAATGACCGCTTT	306
Query	241	GCCAGCTACATCGAGAAGGTTTCGCTTCTGGAACAGCAAAACAAGGCGCTGGCTGCTGAG	300
Sbjct	307	GCCAGCTACATCGAGAAGGTTTCGCTTCTGGAACAGCAAAACAAGGCGCTGGCTGCTGAG	366
Query	301	CTGAACCAGCTGCGGGCCAAGGAGCCACCAAGCTGGCAGACGTCTACCAGGCTGAGCTG	360
Sbjct	367	CTGAACCAGCTGCGGGCCAAGGAGCCACCAAGCTGGCAGACGTCTACCAGGCTGAGCTG	426
Query	361	CGAGAGCTGCGGCTGCGGCTCGATCAACTCACCGCCAACAGCGCCCGCTGGAGGTTGAG	420
Sbjct	427	CGAGAGCTGCGGCTGCGGCTCGATCAACTCACCGCCAACAGCGCCCGCTGGAGGTTGAG	486
Query	421	AGGGACAATCTGGCACAGGACCTGGCCACTGTGAGGCAGAAGCTCCAGGATGAAACCAAC	480
Sbjct	487	AGGGACAATCTGGCACAGGACCTGGCCACTGTGAGGCAGAAGCTCCAGGATGAAACCAAC	546
Query	481	CTGAGGCTGGAAGCCGAGAACAACCTGGCTGCCTATAGACAGGAAGCAGATGAAGCCACC	540
Sbjct	547	CTGAGGCTGGAAGCCGAGAACAACCTGGCTGCCTATAGACAGGAAGCAGATGAAGCCACC	606
Query	541	CTGGCCCGTCTGGATCTGGAGAGGAAGATTGAGTCGCTGGAGGAGGAGATCCGGTCTTG	600
Sbjct	607	CTGGCCCGTCTGGATCTGGAGAGGAAGATTGAGTCGCTGGAGGAGGAGATCCGGTCTTG	666
Query	601	AGGAAGATCCACGAGGAGGAGGTTTCGGGAACTCCAGGAGCAGCTGGCCCGACAGCAGGTC	660
Sbjct	667	AGGAAGATCCACGAGGAGGAGGTTTCGGGAACTCCAGGAGCAGCTGGCCCGACAGCAGGTC	726
Query	661	CATGTGGAGCTTGACGTGGCCAAGCCAGACCTCACCGCAGCCCTGAAAAGAGATCCGCACG	720
Sbjct	727	CATGTGGAGCTTGACGTGGCCAAGCCAGACCTCACCGCAGCCCTGAAAAGAGATCCGCACG	786
Query	721	CAGTATGAGGCAATGGCGTCCAGCAACATGCATGAAGCCGAAGAGTGGTACCGCTCCAAG	780
Sbjct	787	CAGTATGAGGCAATGGCGTCCAGCAACATGCATGAAGCCGAAGAGTGGTACCGCTCCAAG	846
Query	781	TTTGCAGACCTGACAGACGCTGCT	804
Sbjct	847	TTTGCAGACCTGACAGACGCTGCT	870

**pGADT7-GFAP $\delta$  full length reverse (Referenzsequenz: NM\_001131019.2, cds)**

		Score = 1471 bits (796), Expect = 0.0	
		Identities = 796/796 (100%), Gaps = 0/796 (0%)	
		Strand=Plus/Minus	
Query	56	CTAACCGCGAGCCGGCGGCGTTCCATTTACAATCTGGTGAGCCTGTATTGGTATAACTCG	115
Sbjct	1362	CTAACCGCGAGCCGGCGGCGTTCCATTTACAATCTGGTGAGCCTGTATTGGTATAACTCG	1303
Query	116	TATTGTGAGGCTTTTGAGATATCTTGTGACCTTGTGATTTTCCCCGTCTTTGGTGCTTTT	175
Sbjct	1302	TATTGTGAGGCTTTTGAGATATCTTGTGACCTTGTGATTTTCCCCGTCTTTGGTGCTTTT	1243
Query	176	GCCCCCTCGAATCTGCAGGTTGGAGAAGGTCTGCACGGGAATGGTGATCCGGTTCTCCTC	235
Sbjct	1242	GCCCCCTCGAATCTGCAGGTTGGAGAAGGTCTGCACGGGAATGGTGATCCGGTTCTCCTC	1183
Query	236	GCCCTCTAGCAGCTTCTGTAGGTGGCGATCTCGATGTCCAGGGCCAGCTTGACATTGAG	295
Sbjct	1182	GCCCTCTAGCAGCTTCTGTAGGTGGCGATCTCGATGTCCAGGGCCAGCTTGACATTGAG	1123
Query	296	CAGGTCCTGGTACTCCTGCAAGTGGCGGGCCATCTCGTCCCTTGAGGCTCTGCCCCCTTTC	355
Sbjct	1122	CAGGTCCTGGTACTCCTGCAAGTGGCGGGCCATCTCGTCCCTTGAGGCTCTGCCCCCTTTC	1063
Query	356	CTCCAGCCGCGCCAGCGCCTCCTGATAACTGGCCGCCTCCCGCACGTGCCGCTCCTCCTG	415
Sbjct	1062	CTCCAGCCGCGCCAGCGCCTCCTGATAACTGGCCGCCTCCCGCACGTGCCGCTCCTCCTG	1003
Query	416	CTCGCGCATCTGCCTTCCAGGGACTCGTTTCGTGCCGCGCAGAGACTCCAGGTGCGAGGT	475
Sbjct	1002	CTCGCGCATCTGCCTTCCAGGGACTCGTTTCGTGCCGCGCAGAGACTCCAGGTGCGAGGT	943
Query	476	CAAGGACTGCAACTGGCGCCGGTAGTCGTTGGCTTCGTGCTTGGCCTGGCGGAGCAGCTC	535
Sbjct	942	CAAGGACTGCAACTGGCGCCGGTAGTCGTTGGCTTCGTGCTTGGCCTGGCGGAGCAGCTC	883
Query	536	CGCGTTGCGGGCAGCAGCGTCTGTGAGGCTGCAAACTTGGAGCGGTACCACTCTTCGGC	595
Sbjct	882	CGCGTTGCGGGCAGCAGCGTCTGTGAGGCTGCAAACTTGGAGCGGTACCACTCTTCGGC	823
Query	596	TTCATGCATGTTGCTGGACGCCATTGCCTCATACTGCGTGCGGATCTCTTTCAGGGCTGC	655
Sbjct	822	TTCATGCATGTTGCTGGACGCCATTGCCTCATACTGCGTGCGGATCTCTTTCAGGGCTGC	763
Query	656	GGTGAGGTCTGGCTTGGCCACGTCAAGCTCCACATGGACCTGCTGTGGGCCAGCTGCTC	715
Sbjct	762	GGTGAGGTCTGGCTTGGCCACGTCAAGCTCCACATGGACCTGCTGTGGGCCAGCTGCTC	703
Query	716	CTGGAGTTCCCGAACCTCCTCCTCGTGGATCTTCTCAAGAACC GGATCTCCTCCTCCAG	775
Sbjct	702	CTGGAGTTCCCGAACCTCCTCCTCGTGGATCTTCTCAAGAACC GGATCTCCTCCTCCAG	643
Query	776	CGACTCAATCTTCTCCTCCAGATCCAGACGGGCCAGGGTGGCTTCATCTGCTTCTGTCT	835
Sbjct	642	CGACTCAATCTTCTCCTCCTCCAGATCCAGACGGGCCAGGGTGGCTTCATCTGCTTCTGTCT	583
Query	836	ATAGGCAGCCAGGTTG	851
Sbjct	582	ATAGGCAGCCAGGTTG	567



## 9 Referenzen

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**: 41-53.

Abdel-Fattah R, Xiao A, Bomgardner D, Pease CS, Lopes MB, Hussaini IM (2006). Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *J Pathol* **209**: 15-24.

Abdelhaleem M (2005). RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin Biochem* **38**: 499-503.

Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells* **15**: 455-70.

Ahn J, Sanz-Moreno V, Marshall CJ (2012). The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* **125**: 1814-26.

Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, Urquiza L, Jauregi P, Lopez de Munain A, Sampron N, Aramburu A, Tejada-Solis S, Vicente C, Odero MD, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Idoate MA, Lang FF, Fueyo J, Gomez-Manzano C (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* **6**: e26740.

Andrieuolo F, Junier MP, Hol EM, Miquel C, Chimelli L, Leonard N, Chneiweiss H, Daumas-Duport C, Varlet P (2009). GFAPdelta immunostaining improves visualization of normal and pathologic astrocytic heterogeneity. *Neuropathology* **29**: 31-9.

Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* **8**: 139-47.

Araya R, Kudo M, Kawano M, Ishii K, Hashikawa T, Iwasato T, Itohara S, Terasaki T, Oohira A, Mishina Y, Yamada M (2008). BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier. *Mol Cell Neurosci* **38**: 417-30.

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**: 126-40.

Baer K, Eriksson PS, Faull RL, Rees MI, Curtis MA (2007). Sox-2 is expressed by glial and progenitor cells and Pax-6 is expressed by neuroblasts in the human subventricular zone. *Exp Neurol* **204**: 828-31.

Balint EE, Vousden KH (2001). Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* **85**: 1813-23.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* **16**: 1-13.

Bani-Yaghoob M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK, Smith B, Ribocco-Lutkiewicz M, Kennedy J, Walker PR, Sikorska M (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* **295**: 52-66.

- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**: 756-60.
- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**: 7843-8.
- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 1046-69.
- Bernardin-Fried F, Kummalue T, Leijen S, Collector MI, Ravid K, Friedman AD (2004). AML1/RUNX1 increases during G1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces cyclin D3 gene expression. *J Biol Chem* **279**: 15678-87.
- Blechingberg J, Lykke-Andersen S, Jensen TH, Jorgensen AL, Nielsen AL (2007). Regulatory mechanisms for 3'-end alternative splicing and polyadenylation of the Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP, transcript. *Nucleic Acids Res* **35**: 7636-50.
- Blyth K, Cameron ER, Neil JC (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* **5**: 376-87.
- Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995). The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* **15**: 308-27.
- Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-7.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**: 527-30.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* **227**: 239-55.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-56.
- Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **64**: 920-7.
- Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P (1988). Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* **68**: 698-704.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* **6**: 1162-8.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**: 264-78.

- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**: 69-82.
- Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, Musette S, Darro F, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R (2002). Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**: 585-96.
- Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Maurage CA, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Ruchoux MM, Brotchi J, Zick Y, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R (2001). Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol* **11**: 12-26.
- Camby I, Decaestecker C, Lefranc F, Kaltner H, Gabius HJ, Kiss R (2005). Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 27-35.
- Camphausen K, Purow B, Sproull M, Scott T, Ozawa T, Deen DF, Tofilon PJ (2005). Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8287-92.
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**: 318-25.
- Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, Valotta M, DeBiasi S, Spinardi L, Ronchi A, Wanke E, Brunelli S, Favaro R, Ottolenghi S, Nicolis SK (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* **135**: 541-57.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* **53**: 344-54.
- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H (2012). The brain tumor microenvironment. *Glia* **60**: 502-14.
- Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* **283**: 17969-78.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9578-82.
- Chiu F, Goldman J (1984). Synthesis and turnover of cytoskeletal proteins in cultured astrocytes. *J Neurochem*. **42**:166-174.
- Choe G, Park JK, Jouben-Steele L, Kremen TJ, Liau LM, Vinters HV, Cloughesy TF, Mischel PS (2002). Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin Cancer Res* **8**: 2894-901.
- Choi KC, Kwak SE, Kim JE, Sheen SH, Kang TC (2009). Enhanced glial fibrillary acidic protein-delta expression in human astrocytic tumor. *Neurosci Lett* **463**: 182-7.

- Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig N, Hildebrandt A, Keller A, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2005). Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9601-6.
- Cox JL, Mallanna SK, Luo X, Rizzino A (2010). Sox2 uses multiple domains to associate with proteins present in Sox2-protein complexes. *PLoS One* **5**: e15486.
- Dai C, Holland EC (2001). Glioma models. *Biochim Biophys Acta* **1551**: M19-27.
- de Vries NA, Beijnen JH, van Tellingen O (2009). High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing. *Cancer Treat Rev* **35**: 714-23.
- De Witt Hamer PC (2010). Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro Oncol* **12**: 304-16.
- DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K (2003). Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 572-82.
- Demuth T, Berens ME (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* **70**: 217-28.
- Demuth T, Rennert JL, Hoelzinger DB, Reavie LB, Nakada M, Beaudry C, Nakada S, Anderson EM, Henrichs AN, McDonough WS, Holz D, Joy A, Lin R, Pan KH, Lih CJ, Cohen SN, Berens ME (2008). Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics* **9**: 54.
- Dermietzel R, Finkeldey-Krause D, Faustmann P (2001). Checkpoint im Gehirn: Jetzt in der Kulturschale. *RUBIN* **1/01**: 1-2.
- Dimov I, Tasic-Dimov D, Conic I, Stefanovic V (2011). Glioblastoma multiforme stem cells. *ScientificWorldJournal* **11**: 930-58.
- Dowdy CR, Xie R, Frederick D, Hussain S, Zaidi SK, Vradii D, Javed A, Li X, Jones SN, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS (2010). Definitive hematopoiesis requires Runx1 C-terminal-mediated subnuclear targeting and transactivation. *Hum Mol Genet* **19**: 1048-57.
- Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, Manning TC, Silbergeld DL, Glackin CA, Reh TA, Rostomily RC (2005). TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* **7**: 824-37.
- Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* **26**: 148-65.
- Elobeid A, Bongcam-Rudloff E, Westermarck B, Nister M (2000). Effects of inducible glial fibrillary acidic protein on glioma cell motility and proliferation. *J Neurosci Res* **60**: 245-56.
- Fang X, Yoon JG, Li L, Tsai YS, Zheng S, Hood L, Goodlett DR, Foltz G, Lin B (2011a). Landscape of the SOX2 protein-protein interactome. *Proteomics* **11**: 921-34.
- Fang X, Yoon JG, Li L, Yu W, Shao J, Hua D, Zheng S, Hood L, Goodlett DR, Foltz G, Lin B (2011b). The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics* **12**: 11.



- Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* **12**: 1248-56.
- Ferletta M, Caglayan D, Mokvist L, Jiang Y, Kastemar M, Uhrbom L, Westermark B (2011). Forced expression of Sox21 inhibits Sox2 and induces apoptosis in human glioma cells. *Int J Cancer* **129**: 45-60.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131**: 3805-19.
- Fields S, Song O (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-6.
- Flick JS, Johnston M (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 4757-69.
- Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR (1999). Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* **79**: 1828-35.
- Fortin S, Le Mercier M, Camby I, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Lefranc F, Kiss R (2010). Galectin-1 is implicated in the protein kinase C epsilon/vimentin-controlled trafficking of integrin-beta1 in glioblastoma cells. *Brain Pathol* **20**: 39-49.
- Friedl P, Borgmann S, Brocker EB (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* **70**: 491-509.
- Friedl P, Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362-74.
- Friedl P, Zanker KS, Brocker EB (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* **43**: 369-78.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**: 2683-710.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**: 7011-21.
- Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* **27**: 40-8.
- Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, LeBer DV, Halperin EC, Schold SC, Jr., Cairncross JG (1992). Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **24**: 55-7.
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* **21**: 1624-36.

- Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME (1994). Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res* **54**: 3897-904.
- Giese A, Westphal M (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* **39**: 235-50; discussion 250-2.
- Gietz RD, Triggs-Raine B, Robbins A, Graham KC, Woods RA (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biochem* **172**: 67-79.
- Gilbert MR (2011). Recurrent glioblastoma: a fresh look at current therapies and emerging novel approaches. *Semin Oncol* **38 Suppl 4**: S21-33.
- Girouard SD, Laga AC, Mihm MC, Scolyer RA, Thompson JF, Zhan Q, Widlund HR, Lee CW, Murphy GF (2012). SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab Invest* **92**: 362-70.
- Gladson CL (1999). The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 1029-40.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**: 749-65.
- Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooi JJ, Stubbs AP, Duijm JE, Daemen A, Bleeker FE, Bralten LB, Kloosterhof NK, De Moor B, Eilers PH, van der Spek PJ, Kros JM, Sillevius Smitt PA, van den Bent MJ, French PJ (2009). Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* **69**: 9065-72.
- Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jager D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT (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**: 4198-203.
- Hall A (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**: 891-5.
- Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, Hood L, Yuan Y, Lin B (2012). Silencing SOX2 Induced Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Expression Predicts Liver and Lymph Node Metastasis of CRC Patients. *PLoS One* **7**: e41335.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**: 1387-94.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-16.
- Hartig R, Shoeman RL, Janetzko A, Tolstonog G, Traub P (1998). DNA-mediated transport of the intermediate filament protein vimentin into the nucleus of cultured cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 24)**: 3573-84.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* **26**: 4189-99.

- Heo DH, Kim SH, Yang KM, Cho YJ, Kim KN, Yoon do H, Kang TC (2012). A histopathological diagnostic marker for human spinal astrocytoma: expression of glial fibrillary acidic protein-delta. *J Neurooncol* **108**: 45-52.
- Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T (1993). Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta Neuropathol* **85**: 481-7.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**: 25-7.
- Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillevin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbaih A, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY (2010). IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **75**: 1560-6.
- Huse JT, Holland EC (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* **10**: 319-31.
- Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E, du Manoir S (2010). SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One* **5**: e8960.
- Huttenlocher A, Horwitz AR (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a005074.
- Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* **5**: 504-14.
- Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H (2004). The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* **24**: 1033-43.
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* **9**: 469-79.
- Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA (2011). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* **3**: e00063.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69-90.
- Ji J, Zheng PS (2010). Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum Pathol* **41**: 1438-47.
- Johnston M (1987). Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein. *Nature* **328**: 353-5.
- Joo HY, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chang C, Wang H (2007). Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* **449**: 1068-72.

- Kagoshima H, Akamatsu Y, Ito Y, Shigesada K (1996). Functional dissection of the alpha and beta subunits of transcription factor PEBP2 and the redox susceptibility of its DNA binding activity. *J Biol Chem* **271**: 33074-82.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* **16**: 182-7.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* **15**: 1272-86.
- Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AH, Verveer M, de Groot LR, Smith VD, Rangarajan S, Rodriguez JJ, Orre M, Hol EM (2012). GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astrogliosis in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLoS One* **7**: e42823.
- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* **7**: 331-42.
- Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, Tatsuka M, Takahashi M, Nagata K, Inagaki M (2003). Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol Biol Cell* **14**: 1489-500.
- Kettenmann H, Ransom BR (2005). Neuroglia, 2nd edn. Oxford University Press, USA.
- Kettenmann H, Verkhratsky A (2011). [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr* **79**: 588-97.
- Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW (2006a). Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol* **39**: 339-45.
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, Brennan C, Hahn WC, Cordon-Cardo C, Wagner SN, Flotte TJ, Duncan LM, Granter SR, Chin L (2006b). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* **125**: 1269-81.
- Kim SU, de Vellis J (2005). Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* **81**: 302-13.
- Kimelberg HK (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* **45**: 191-202.
- Knobbe CB, Reifenberger G (2003). Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* **13**: 507-18.
- Kondoh H, Kamachi Y (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 391-9.
- Kong C, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X, Du J, Dong Z, Zhu S, Lu J, Huang B (2012). NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS One* **6**: e22666.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303.

- Kuchelmeister K (2012). Zellen des Zentralnervensystems und ihre Reaktionsformen In: Schröder JM., Paulus W (Hrsg) Neuropathologie. 3 Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 3 - 29
- Kuppner MC, Van Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de Tribolet N (1992). Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer* **50**: 572-7.
- Kurokawa M, Tanaka T, Tanaka K, Hirano N, Ogawa S, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H (1996). A conserved cysteine residue in the runt homology domain of AML1 is required for the DNA binding ability and the transforming activity on fibroblasts. *J Biol Chem* **271**: 16870-6.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lakka SS, Rajan M, Gondi C, Yanamandra N, Chandrasekar N, Jasti SL, Adachi Y, Siddique K, Gujrati M, Olivero W, Dinh DH, Kouraklis G, Kyritsis AP, Rao JS (2002). Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. *Oncogene* **21**: 8011-9.
- Lam K, Zhang DE (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci* **17**: 1120-39.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645-8.
- Law SF, Zhang YZ, Klein-Szanto AJ, Golemis EA (1998). Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol Cell Biol* **18**: 3540-51.
- Le Mercier M, Lefranc F, Mijatovic T, Debeir O, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Kiss R, Mathieu V (2008). Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicol Appl Pharmacol* **229**: 172-83.
- Lee DC, Welton KL, Smith ED, Kennedy BK (2009). A-type nuclear lamins act as transcriptional repressors when targeted to promoters. *Exp Cell Res* **315**: 996-1007.
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**: 391-403.
- 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**: 2195-214.
- Lefranc F, Brotchi J, Kiss R (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* **23**: 2411-22.
- Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berge SA, Hol EM, Rogers J (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* **515**: 269-94.

- Lepekhn EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E, Pekny M (2001). Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* **79**: 617-25.
- Leuchowius KJ, Weibrecht I, Soderberg O (2011). In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 9**: Unit 9 36.
- Levicar N, Nuttall RK, Lah TT (2003). Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir (Wien)* **145**: 825-38.
- Li G, Tolstonog GV, Traub P (2003). Interaction in vitro of type III intermediate filament proteins with Z-DNA and B-Z-DNA junctions. *DNA Cell Biol* **22**: 141-69.
- Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, Qin S, Wang Q (2012). Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci* **13**: 7663-75.
- Lim DA, Cha S, Mayo MC, Chen MH, Keles E, VandenBerg S, Berger MS (2007). Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro Oncol* **9**: 424-9.
- Lindl T (1987). Zell- und Gewebekultur. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York*: 76 - 80.
- Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP, Hiebert SW (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* **8**: 743-50.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* **5**: 67.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, VandenBerg SR, Burger PC, Giannini C, Paulus W, Liberski P, Deimling A, von, Nakazato Y, Kleihues P, Rosenblum MK, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, Plate KH, Giangaspero F, Fuller GN, Kros JM (eds) (2007) *Astrocytic Tumors*. In: Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D. und Cavenee, W. K. (Hrsg.): *WHO classification of tumours of the central nervous system. 4. Auflage. IARC, Lyon, 13 - 52.*
- Louvet O, Doignon F, Crouzet M (1997). Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques* **23**: 816-8, 820.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-75.
- Luo W, Fang W, Li S, Yao K (2012). Aberrant expression of nuclear vimentin and related epithelial-mesenchymal transition markers in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **131**: 1863-73.
- Lutterbach B, Hiebert SW (2000). Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* **245**: 223-35.
- 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**: 31-45.

- Malki S, Boizet-Bonhoure B, Poulat F (2009). Shuttling of SOX proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 411-6.
- Mallanna SK, Ormsbee BD, Iacovino M, Gilmore JM, Cox JL, Kyba M, Washburn MP, Rizzino A (2010). Proteomic analysis of Sox2-associated proteins during early stages of mouse embryonic stem cell differentiation identifies Sox21 as a novel regulator of stem cell fate. *Stem Cells* **28**: 1715-27.
- Mangan JK, Speck NA (2011). RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncog* **16**: 77-91.
- Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K (2010). Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *J Surg Res* **174**: 130-5.
- Mergui X, Puiffe ML, Valteau-Couanet D, Lipinski M, Benard J, Amor-Gueret M (2010). p21Waf1 expression is regulated by nuclear intermediate filament vimentin in neuroblastoma. *BMC Cancer* **10**: 473.
- Middeldorp J, Boer K, Sluijs JA, De Filippis L, Encha-Razavi F, Vescovi AL, Swaab DF, Aronica E, Hol EM (2010). GFAPdelta in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex. *Development* **137**: 313-21.
- Mikkelsen T, Yan PS, Ho KL, Sameni M, Sloane BF, Rosenblum ML (1995). Immunolocalization of cathepsin B in human glioma: implications for tumor invasion and angiogenesis. *J Neurosurg* **83**: 285-90.
- Miralles F, Visa N (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 261-6.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 56-68.
- Mohanam S, Jasti SL, Kondraganti SR, Chandrasekar N, Lakka SS, Kin Y, Fuller GN, Yung AW, Kyritsis AP, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Ali-Osman F, Rao JS (2001). Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene* **20**: 3665-73.
- Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ (2003). Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 1010-6.
- Moosavi SA, Sanchez J, Adeyinka A (2009). Marker chromosomes are a significant mechanism of high-level RUNX1 gene amplification in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **189**: 24-8.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME (2008). Stem cell-related "self-

renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* **26**: 3015-24.

Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 558-72.

Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* **62**: 6764-9.

Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, Wang W, Grammer JR, Gladson CL (2006). HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* **25**: 1721-32.

Nielsen AL, Holm IE, Johansen M, Bonven B, Jorgensen P, Jorgensen AL (2002). A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J Biol Chem* **277**: 29983-91.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**: 1314-8.

Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FC (2010). Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. *Neurochem Res* **35**: 955-66.

O'Neill GM, Golemis EA (2001). Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol Cell Biol* **21**: 5094-108.

Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K (1993). Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* **194**: 314-31.

Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**: 1445-53.

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**: 479-89.

Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**: 321-30.

Oppel F, Muller N, Schackert G, Hendrusch S, Martin D, Geiger KD, Temme A (2011). SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. *Mol Cancer* **10**: 137.

Osato M (2004). Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* **23**: 4284-96.

Osorio KM, Lilja KC, Tumber T (2011). Runx1 modulates adult hair follicle stem cell emergence and maintenance from distinct embryonic skin compartments. *J Cell Biol* **193**: 235-50.

Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA (2000). Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 613-20.



- Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y (2008). SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* **98**: 824-31.
- Otto F, Lubbert M, Stock M (2003). Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* **89**: 9-18.
- Owens GC, Orr EA, DeMasters BK, Muschel RJ, Berens ME, Kruse CA (1998). Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res* **58**: 2020-8.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF, Jr., Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* **121**: 4-27.
- Parri M, Chiarugi P (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal* **8**: 23.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**: 1807-12.
- Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA (1996). Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest* **75**: 819-26.
- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W (1993). Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* **143**: 154-63.
- Paulus W, Hasselblatt M (2012). Tumoren In: Schröder J. M., Paulus W (Hrsg) Neuropathologie. 3 Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 481 - 549.
- Paulus W, Roggendorf W (1988). Vimentin and glial fibrillary acidic protein are codistributed in the same intermediate filament system of malignant glioma cells in vivo. A double-labeling immunoelectron-microscopical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **56**: 67-70.
- Paulus W, Tonn JC (1995). Interactions of glioma cells and extracellular matrix. *J Neurooncol* **24**: 87-91.
- Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C (1998). GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res* **239**: 332-43.
- Perng MD, Wen SF, Gibbon T, Middeldorp J, Sluijs J, Hol EM, Quinlan RA (2008). Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP-delta, but with consequences for filament organization and alphaB-crystallin association. *Mol Biol Cell* **19**: 4521-33.
- Petit V, Thiery JP (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* **92**: 477-94.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.

- Pfrieger FW, Barres BA (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* **277**: 1684-7.
- Phi JH, Park SH, Kim SK, Paek SH, Kim JH, Lee YJ, Cho BK, Park CK, Lee DH, Wang KC (2008). Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol* **32**: 103-12.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**: 157-73.
- Planaguma J, Liljestrom M, Alameda F, Butzow R, Virtanen I, Reventos J, Hukkanen M (2011). Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Hum Pathol* **42**: 57-67.
- Ponten J, Macintyre EH (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**: 465-86.
- Prag S, Lepekhin EA, Kolkova K, Hartmann-Petersen R, Kawa A, Walmod PS, Belman V, Gallagher HC, Berezin V, Bock E, Pedersen N (2002). NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci* **115**: 283-92.
- Printen JA, Sprague GF, Jr. (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-19.
- Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3290-4.
- Puchades M, Nilsson CL, Emmett MR, Aldape KD, Ji Y, Lang FF, Liu TJ, Conrad CA (2007). Proteomic investigation of glioblastoma cell lines treated with wild-type p53 and cytotoxic chemotherapy demonstrates an association between galectin-1 and p53 expression. *J Proteome Res* **6**: 869-75.
- Radaelli E, Ceruti R, Patton V, Russo M, Degrassi A, Croci V, Caprera F, Stortini G, Scanziani E, Pesenti E, Alzani R (2009). Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol Histopathol* **24**: 879-91.
- Rao JS (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* **3**: 489-501.
- Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R (2002). Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* **51**: 2-12; discussion 12-3.
- Remenyi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Scholer HR, Wilmanns M (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* **17**: 2048-59.
- Requardt RP, Hirrlinger PG, Wilhelm F, Winkler U, Besser S, Hirrlinger J (2012). Ca(2+) signals of astrocytes are modulated by the NAD(+)/NADH redox state. *J Neurochem* **120**: 1014-25.

- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-11.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* **280**: 24731-7.
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrío D, Moreno-Bueno G, Rodríguez-Gil Y, Martínez MA, Hernández L, Hardisson D, Reis-Filho JS, Palacios J (2007). Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol* **20**: 474-81.
- Rodríguez LG, Wu X, Guan JL (2005). Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* **294**: 23-9.
- Roelofs RF, Fischer DF, Houtman SH, Sluijs JA, Van Haren W, Van Leeuwen FW, Hol EM (2005). Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia* **52**: 289-300.
- Rooprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnull S, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ (1999). The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* **17**: 613-23.
- Rorive S, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, Gordower L, Micik S, Maurage CA, Kaltner H, Ruchoux MM, Danguy A, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R, Camby I (2001). Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia* **33**: 241-55.
- Ross K, Sedello AK, Todd GP, Paszkowski-Rogacz M, Bird AW, Ding L, Grinenko T, Behrens K, Hubner N, Mann M, Waskow C, Stocking C, Buchholz F (2012). Polycomb group ring finger 1 cooperates with Runx1 in regulating differentiation and self-renewal of hematopoietic cells. *Blood*.
- Ruden DM, Ma J, Li Y, Wood K, Ptashne M (1991). Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**: 250-2.
- Rutka JT, Smith SL (1993). Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res* **53**: 3624-31.
- Sahai E, Marshall CJ (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**: 711-9.
- Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y (2006). Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. *Pancreas* **32**: 164-70.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**: 104-8.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* **27**: 4150-4.
- Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M, Wullich B (2000). Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* **45**: 207-15.

Scheitz CJ, Lee TS, McDermitt DJ, Tumber T (2012). Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *EMBO J*.

Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M (2010). On the origin and growth of gliomas. *Anticancer Res* **30**: 1977-98.

Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, Wehner R, Schackert G, Schackert HK, Fussel M, Bachmann M, Rieber EP, Weigle B (2007). Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer* **96**: 1293-301.

Schneider SW, Ludwig T, Tatenhorst L, Braune S, Oberleithner H, Senner V, Paulus W (2004). Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol* **107**: 272-6.

Senner V, Ratzinger S, Mertsch S, Grassel S, Paulus W (2008). Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion. *FEBS Lett* **582**: 3293-300.

Senner V, Sturm A, Hoess N, Wassmann H, Paulus W (2000). In vivo glioma model enabling regulated gene expression. *Acta Neuropathol* **99**: 603-8.

Sherr CJ (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-5.

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

Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD, Wolff RK (2011). Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF-beta-signaling pathway. *Carcinogenesis* **32**: 318-26.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB (2001). PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* **93**: 1246-56.

Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* **3**: 995-1000.

Soderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, Landegren U (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* **45**: 227-32.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**: 7-35.

Speranza MC, Frattini V, Pisati F, Kapetis D, Porrati P, Eoli M, Pellegatta S, Finocchiaro G (2012). NEDD9, a novel target of miR-145, increases the invasiveness of glioblastoma. *Oncotarget* **3**: 723-34.

Stein GH (1979). T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol* **99**: 43-54.

- Stolzenburg S, Rots MG, Beltran AS, Rivenbark AG, Yuan X, Qian H, Strahl BD, Blancafort P (2012). Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. *Nucleic Acids Res* **40**: 6725-6740.
- Strom DK, Nip J, Westendorf JJ, Linggi B, Lutterbach B, Downing JR, Lenny N, Hiebert SW (2000). Expression of the AML-1 oncogene shortens the G(1) phase of the cell cycle. *J Biol Chem* **275**: 3438-45.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**: 459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 987-96.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **1**: 515-28.
- Sun H, Zhang S (2011). Arsenic trioxide regulates the apoptosis of glioma cell and glioma stem cell via down-regulation of stem cell marker Sox2. *Biochem Biophys Res Commun* **410**: 692-7.
- Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T (2000). A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* **102**: 199-209.
- Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Yuasa Y (2007). Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**: 263-9.
- Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, Wu Y, Surzenko N, Hutton SR, Pevny LH (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* **20**: 1187-202.
- TCGA (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**: 1061-8.
- Templeton A, Hofer S, Topfer M, Sommacal A, Fretz C, Cerny T, Gillessen S (2008). Extraneural spread of glioblastoma--report of two cases. *Onkologie* **31**: 192-4.
- Theriault FM, Nuthall HN, Dong Z, Lo R, Barnabe-Heider F, Miller FD, Stifani S (2005). Role for Runx1 in the proliferation and neuronal differentiation of selected progenitor cells in the mammalian nervous system. *J Neurosci* **25**: 2050-61.
- Theriault FM, Roy P, Stifani S (2004). AML1/Runx1 is important for the development of hindbrain cholinergic branchiovisceral motor neurons and selected cranial sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10343-8.
- Toedt G, Barbus S, Wolter M, Felsberg J, Tews B, Blond F, Sabel MC, Hofmann S, Becker N, Hartmann C, Ohgaki H, von Deimling A, Wiestler OD, Hahn M, Lichter P, Reifenberger G,

Radlwimmer B (2011). Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int J Cancer* **128**: 1095-103.

Tolstonog GV, Li G, Shoeman RL, Traub P (2005). Interaction in vitro of type III intermediate filament proteins with higher order structures of single-stranded DNA, particularly with G-quadruplex DNA. *DNA Cell Biol* **24**: 85-110.

Tolstonog GV, Wang X, Shoeman R, Traub P (2000). Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments. *DNA Cell Biol* **19**: 647-77.

Toussaint LG, 3rd, Nilson AE, Goble JM, Ballman KV, James CD, Lefranc F, Kiss R, Uhm JH (2012). Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer* **11**: 32.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-9.

Traub P (1985). Are intermediate filament proteins involved in gene expression? *Ann N Y Acad Sci* **455**: 68-78.

Trepel M (2008). Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 4.Aufl. Urban & Fischer, München Jena.

Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Comi G, Messing A, Quattrini A, Previtalli SC (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci* **119**: 3981-93.

Tung CL, Hou PH, Kao YL, Huang YW, Shen CC, Cheng YH, Wu SF, Lee MS, Li C (2010). SOX2 modulates alternative splicing in transitional cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **393**: 420-5.

Tysnes BB, Larsen LF, Ness GO, Mahesparan R, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Bjerkvig R (1996). Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer* **67**: 777-84.

Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004). Role for glia in synaptogenesis. *Glia* **47**: 209-16.

Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K (2002). Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol* **57**: 187-92.

van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idbaih A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M (2010). IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res* **16**: 1597-604.

van den Berge SA, Middeldorp J, Zhang CE, Curtis MA, Leonard BW, Mastroeni D, Voorn P, van de Berg WD, Huitinga I, Hol EM (2010). Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta. *Aging Cell* **9**: 313-26.

- Veeravalli KK, Chetty C, Ponnala S, Gondi CS, Lakka SS, Fassett D, Klopfenstein JD, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS (2010). MMP-9, uPAR and cathepsin B silencing downregulate integrins in human glioma xenograft cells in vitro and in vivo in nude mice. *PLoS One* **5**: e11583.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**: 98-110.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**: 425-36.
- Vinters HV, Kleinschmidt-DeMasters BK (2008). General pathology of the central nervous system. In: Love S, Louis DN, Ellison DW (eds) *Greenfield's Neuropathology* 8th edn. Hodder Arnold, London, pp 1 - 62.
- Vladimirova V, Waha A, Luckerath K, Pesheva P, Probstmeier R (2008). Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J Neurosci Res* **86**: 2450-61.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-10.
- Vorgias CE, Traub P (1986). Nucleic acid-binding activities of the intermediate filament subunit proteins desmin and glial fibrillary acidic protein. *Z Naturforsch C* **41**: 897-909.
- 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**: 74-86.
- Wang Q, Tolstonog GV, Shoeman R, Traub P (2001). Sites of nucleic acid binding in type I-IV intermediate filament subunit proteins. *Biochemistry* **40**: 10342-9.
- Wang X, Jiang X (2012). Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Lett* **586**: 1390-6.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* **174**: 1149-53.
- Wegner M, Stolt CC (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* **28**: 583-8.
- Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Soderberg O (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics* **7**: 401-9.
- Weiler M, Hartmann C, Wiewrodt D, Herrlinger U, Gorlia T, Bahr O, Meyermann R, Bamberg M, Tatagiba M, von Deimling A, Weller M, Wick W (2010). Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **77**: 670-6.
- Wen PY, Kesari S (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**: 492-507.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008). Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**: 727-35.

- Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki NK, Moch H, Fend F, Staebler A, Bass AJ, Meyerson M, Rubin MA, Soltermann A, Lengerke C, Perner S (2011). SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* **24**: 944-53.
- Wilson M, Koopman P (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 441-6.
- Wolburg H (2002). Die Zellen des Nervensystems und ihre Verknüpfungen. In: Pfeiffer J., Schröder JM., Paulus W (Hrsg) Neuropathologie. Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur. 3 Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 3 - 20.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker EB, Friedl P (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* **160**: 267-77.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989). Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-78.
- Wotton SF, Blyth K, Kilbey A, Jenkins A, Terry A, Bernardin-Fried F, Friedman AD, Baxter EW, Neil JC, Cameron ER (2004). RUNX1 transformation of primary embryonic fibroblasts is revealed in the absence of p53. *Oncogene* **23**: 5476-86.
- Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, Markowitz D, Reisfeld RA, Luo Y (2011). Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer* **104**: 1410-7.
- Xiao A, Yin C, Yang C, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Van Dyke T (2005). Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation. *Cancer Res* **65**: 5172-80.
- Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S, Bindal AK, Bruner JM, Oka K, Rao VH, Tomonaga M, Nicolson GL, Rao JS (1994). Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator in human astrocytomas in vivo. *Cancer Res* **54**: 3656-61.
- Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T (2000). Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* **59**: 722-30.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**: 765-73.
- Yan X, Ma L, Yi D, Yoon JG, Diercks A, Foltz G, Price ND, Hood LE, Tian Q (2011). A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1591-6.
- Yang LJ, Yu WD, Du JB, Chao S, Chen MX, Zhao HH, Guo JZ (2009). Overexpression or knock-down of runt-related transcription factor 1 affects BCR-ABL-induced proliferation and migration in vitro and leukemogenesis in vivo in mice. *Chin Med J (Engl)* **122**: 331-7.



- Yasui Y, Amano M, Nagata K, Inagaki N, Nakamura H, Saya H, Kaibuchi K, Inagaki M (1998). Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. *J Cell Biol* **143**: 1249-58.
- Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, Kanno T, Yoshida H, Fujimoto T, Fraser S, Nishikawa S, Okada H, Satake M, Noda T, Ito Y (2001). Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* **6**: 13-23.
- Yoshida T, Tomozawa Y, Arisato T, Okamoto Y, Hirano H, Nakagawa M (2007). The functional alteration of mutant GFAP depends on the location of the domain: morphological and functional studies using astrocytoma-derived cells. *J Hum Genet* **52**: 362-9.
- 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**: 2635-45.
- Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, Huang J, Spinola M, Dong W, Yin G, Fujimoto J, Kim E, Xie Y, Girard L, Moran C, Hong WK, Minna JD, Wistuba, II (2011). Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One* **5**: e9112.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**: 9392-400.
- Zhang X, Yu H, Yang Y, Zhu R, Bai J, Peng Z, He Y, Chen L, Chen W, Fang D, Bian X, Wang R (2010). SOX2 in gastric carcinoma, but not Hath1, is related to patients' clinicopathological features and prognosis. *J Gastrointest Surg* **14**: 1220-6.
- Zhang J, Lautar, S (1996). A yeast three hybrid-method to clone ternary complex components. *Anal Biochem.* **1**: 68 - 72.
- Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci* **27**: 332-42.
- Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* **8**: 119-30.



## 10 Publikationen

Teile der in der vorliegenden Studie gezeigten Daten wurden in folgenden Manuskripten zur Veröffentlichung eingereicht.

### Originalarbeiten

**Rüther L.**, Hörr V., Müller N., Mertsch S., Becker M., Collet C., Weber K., Hotfilder M., Faber C., Temme A., Paulus W., Senner V.: *SOX2 regulates migration and proliferation but not diffuse invasion in gliomas.*

Zur Veröffentlichung eingereicht beim *Journal of Neurooncology*.

**Rüther L.**, Moeton M., Mertsch S., Hol E., Paulus W., Barnekow A., Senner V.: *The Transcriptionfactor RUNX1 and the intermediate filament protein GFAP are new SOX2 interacting partners to regulate cell functions in gliomas.*

in Vorbereitung

### Posterpräsentationen

Weber K., **Rüther L.**, Collet C., Paulus W., Senner V.: *SOX2 promotes proliferation and inhibits migration in U373MG glioma cells.* DGNN, Düsseldorf (2009).

**Rüther L.**, Mertsch S., Becker M., Collet C., Paulus W., Barnekow A., Senner V.: *SOX2 Partners in glioma Invasion and Proliferation.* DGZ, Bonn (2011).



















