

**Tumorstammzellen aus malignen  
Nervenscheidentumoren bei Neurofibromatose Typ 1:  
Anreicherung und Charakterisierung**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie,  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der

Universität Hamburg

vorgelegt von

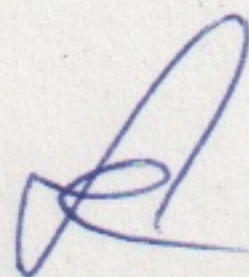
**Melanie Spyra**

aus Bremen

Hamburg 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. med. V.-F. MAUTNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. T. DOBNER  
Tag der Disputation: 05. Juli 2013

Hamburg, den 06. Juni 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

*Für meine Eltern und meinen Bruder*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 NF1 .....</b>	<b>10</b>
<i>1.1.1 Neurofibromin.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.2 NF1 Klinik .....</i>	<i>12</i>
<b>1.2 MPNST .....</b>	<b>13</b>
<i>1.2.1 MPNST Klinik.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2 MPNST Tumorgenese .....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.3 Therapie von MPNST Patienten .....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.4 MPNST in vitro Modelle .....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.5 MPNST in vivo Modelle.....</i>	<i>19</i>
<b>1.3 Tumor-initiiierende Zellen .....</b>	<b>21</b>
<i>1.3.1 Stammzellen .....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2 Stammzellen der Neuralleiste .....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.3 Modell der Tumorstammzellen .....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.4 Tumorstammzellmarker .....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.5 Multi Drug Resistence .....</i>	<i>31</i>
<b>1.4 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>34</b>
<b>2 Material .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Tumore .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Zellen .....</b>	<b>36</b>
<i>2.2.1 Humane Zelllinien .....</i>	<i>36</i>
<i>2.2.2 Primärkulturen .....</i>	<i>37</i>
<b>2.3 Kommerzielle Systeme.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Software und Datenbanken.....</b>	<b>38</b>
<i>2.4.1 Kriterien der Signalweg-Analyse von Micro-Array Daten.....</i>	<i>38</i>
<b>3 Methoden.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Zellkultivierung.....</b>	<b>40</b>
<i>3.1.1 Dissoziation von Tumorfrischmaterial .....</i>	<i>40</i>
<i>3.1.2 Zellkultivierung unter adhärenenten Standardbedingungen.....</i>	<i>41</i>

3.1.3 Zellkultivierung unter Schwann-Zellbedingungen.....	42
3.1.4 Fibroblasteneliminierung .....	42
3.1.5 Zellkultivierung unter Stammzellbedingungen .....	43
<b>3.2 Proliferations- und Viabilitätsassays.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Immunfärbungen .....</b>	<b>45</b>
3.3.1 Immunzytochemie .....	45
3.3.2 Immunhistochemie .....	46
<b>3.4 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>48</b>
3.4.1 Extrazelluläre Färbung zur Analyse am Durchflusszytometer.....	48
3.4.2 Intrazelluläre Färbung zur Analyse am Durchflusszytometer.....	50
<b>3.5 Side Population-Analyse mittels Durchflusszytometrie .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Mikrosatellitenanalyse.....</b>	<b>52</b>
3.6.1 Mikrosatellitenanalyse an NF1, p53 und p16.....	52
3.6.2 Metastasennachweis mittels Mikrosatelliten-PCR .....	54
<b>3.7 Methylierungs-PCR.....</b>	<b>55</b>
3.7.1 CT Conversion .....	55
3.7.2 Flankierende PCR .....	56
3.7.3 Gelelektrophorese.....	57
3.7.4 PCR zum Methylierungsnachweis .....	57
<b>3.8 Genexpressionsanalysen .....</b>	<b>58</b>
3.8.1 RNA Isolierung und Quantifizierung .....	58
3.8.2 cDNA Synthese.....	58
3.8.3 Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR (relative Quantifizierung).....	59
3.8.4 Beeinflussung der Genexpression durch Kultivierungsbedingungen .....	62
<b>3.9 Micro-Arrayanalyse.....</b>	<b>62</b>
3.9.1 Poly-A Verdünnung .....	63
3.9.2 First-Strand cDNA.....	64
3.9.3 Second-Strand cDNA .....	64
3.9.4 In vitro Transkription (IVT) für die Synthese gelabelter aRNA .....	64
3.9.5 aRNA Aufreinigung.....	64
3.9.6 aRNA Quantifizierung .....	65
3.9.7 aRNA Fragmentierung.....	65
3.9.8 GeneChip Hybridisierung.....	65
3.9.9 Setup des Experiments und der Flüssigkeitsstation .....	66
3.9.10 Array-Waschung und Färbung .....	66
3.9.11 Array Scan .....	67

<b>3.10 In Vivo Studien</b> .....	<b>67</b>
3.10.1 Tumorigenität der S462 Sphären.....	67
3.10.2 Tumorigenität CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>-</sup> sphäroider S462 Zellen.....	68
3.10.3 Tumorigenität etablierter Zelllinien.....	68
3.10.4 Biolumineszenz-Imaging zur Detektion der Metastasierung.....	69
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>72</b>
<b>4.1 Tumorstammzellen</b> .....	<b>72</b>
4.1.1 Sphären-Formation.....	72
4.1.2 Genexpression von Sphären.....	79
4.1.3 Whole Genome Expressionsprofiling der S462 Sphären.....	90
4.1.4 Differenzielle Wirkung von Zytostatika an adhärenenten und sphäroiden S462 Zellen.....	96
4.1.5 Side Population an S462.....	103
<b>4.2 Neue MPNST-Zelllinie</b> .....	<b>104</b>
4.2.1 Etablierung neuer MPNST-Zelllinie.....	104
4.2.2 Tumorigenität in vivo.....	105
4.2.3 Stammzellmarkerexpression etablierter MPNST Zelllinien.....	106
<b>4.3 Tumorigenität von MPNST Tumorstammzellen in vivo</b> .....	<b>108</b>
<b>4.3 in vivo Modell für die Metastasierung von MPNSTs</b> .....	<b>109</b>
4.3.1 Genetischer Nachweis.....	110
4.3.2 Bioimaging als Nachweis der Tumorformierung in Mäusen.....	115
4.3.3 Bioimaging als Nachweis der Metastasierung.....	117
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>119</b>
<b>5.1 Sphären-Formation</b> .....	<b>119</b>
<b>5.2 Stammzellmarker-Expression</b> .....	<b>121</b>
<b>5.3 Multipotenz und Tumorigenität der S462 Sphären</b> .....	<b>123</b>
<b>5.4 Globale Expressionsprofile</b> .....	<b>124</b>
<b>5.5 Tumorstammzellresistenzen</b> .....	<b>128</b>
<b>5.6 Etablierung von MPNST-Zelllinien</b> .....	<b>135</b>
<b>5.7 Metastasierungsmodelle</b> .....	<b>136</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>140</b>
<b>7. Publikationen</b> .....	<b>171</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>172</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Zeichen:</b>	<b>Bedeutung:</b>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ABCB1	<i>ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member 1</i>
ABCB5	<i>ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member 5</i>
ABCG2	<i>ATP-Binding Cassette Sub-Family G Member 2</i>
adh.	adhärent
AKT	Protein Kinase B
AML	Akute myeloische Leukämie
aRNA	amplifizierte RNA
ATP	Adenosintriphosphat
atyp.	atypisch
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCL9L	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 9-like</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BLI	<i>Bioluminescence Imaging</i>
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	<i>Cyclic AMP Response Element Binding Protein</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTNNB1	<i>Catenin (Cadherin-Associated Protein) Beta 1</i>
DKK	Dickkopf Homolog
DKKL1	<i>Dickkopf-like 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-Triphosphat
DR5	<i>Death Receptor 5</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	epidermale Wachstumsfaktor
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERK1/2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase1/2
F	<i>Forward Primer</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal bovine serum</i> )
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Paris</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GGFb3	<i>Glial Growth Factor Receptor b3</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IE	internationale Einheit
ID	<i>Identity</i>
IgG	Immunglobulin G
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
IWP	<i>Inhibitor of Wnt Production</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kg	Kilogramm
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-binding Factor</i>
LK	Lymphknoten
Log	Logarithmus
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
LUC	Luciferase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP3K7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 7



MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase /extrazelluläre Signal-regulierte Kinase Kinase
met	methyliert
mg	Milligramm
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
MMP	kurzzeit-multipotente Progenitorzelle
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	messenger RNA
MRP	<i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MYC	<i>v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (avian)</i>
n	Menge
n.c.	keine Veränderung
n.d.	nicht durchgeführt
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NF1	Neurofibromatose 1
ng	Nanogramm
NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOD/SCID	<i>Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
P	Passage
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDGFR	Plättchenwachstumsfaktor Rezeptor
PET	Positronen-Emissionstomographie
Pgp	P-Glycoprotein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PNF	plexiformes Neurofibrom
PRKC <sub>ι</sub>	Proteinkinase C, iota
RPL13a	ribosomales Protein L13a
Pten	Phosphatase und Tensin Homolog
R	<i>Reverse Primer</i>
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RAC	<i>RAS-related C3 Botulinum Toxin Substrate</i>

Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RalA	<i>Ras related Protein RalA</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
ROI	<i>Region Of Interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
sec	Sekunde
shRNA	<i>small/short hairpin RNA</i>
SLR	Signal Log Ratio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Sph.	Sphären
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
TP53	Tumor Protein 53
TRAMP	<i>Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate</i>
U	Unit
unmet	unmethyliert
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) werden den Weichteilsarkomen zugeordnet und treten zu 0,001% in der Gesamtbevölkerung auf. Bei etwa der Hälfte der Patienten mit MPNSTs liegt gleichzeitig eine Neurofibromatose Typ 1 vor. MPNSTs sind eine der aggressivsten Tumorentitäten und gehen mit einer extrem schlechten Prognose einher. Außer der chirurgischen Resektion bestehen zurzeit keine effektiven Therapien.

Tumorstammzellen wurden bei einer Vielzahl von malignen Tumoren beschrieben und als „Wurzel des Übels“ diskutiert. In der vorliegenden Studie konnten erstmalig solche Zellen auch in MPNSTs identifiziert werden. Unter serumfreien neuronalen Stammzellbedingungen mit Wachstumsfaktoren wie u.a. EGF und FGF, konnten Sphären aus der MPNST Zelllinie S462 selektiv angereichert und über 40 Passagen erhalten werden. Real-Time PCR Analysen der S462 Sphären zeigten eine erhöhte Expression für neuronale und Tumorstammzellmarker, wie CD34, CD133, Sox2 und Oct4 im Vergleich zu den ursprünglichen S462 Zellen. Einige dieser erhöhten Expressionen konnten auf Proteinebene mittels FACS bestätigt werden. Globale Genexpressionsprofile wiesen zudem über 15.000 differentiell regulierte Gene der S462 Sphären auf. Die funktionale Gruppierung bestätigte tendenziell die stammzellähnlichen Eigenschaften der Sphären. Eine Vielzahl von differentiell regulierten Genen konnte dabei unterschiedlichen Signaltransduktionswegen zugeordnet werden. Besonders hervorzuheben waren hierbei Komponenten in der Signalkaskade des Wnt-Signalweges. Für einige dieser Kandidaten konnte bereits eine kanzerogene Rolle beschrieben werden. Ferner fand die vorliegende Studie veränderte Wirksamkeiten der Zytostatikaresistenz an der sphäroiden S462 Kultur im Vergleich zu den parentalen S462 Zellen. Die Sphären wiesen gegenüber Doxorubicin und Ifosfamid Resistenzen auf wohingegen sie bei einer Behandlung mit Temozolomid und Plerixafor sensitiver reagierten als die dazugehörige parentale, adhärente Kultur.

Ein weiterer Fokus der Studie waren die Etablierung und Optimierung von *in vitro* und *in vivo* Modellen für MPNSTs und für deren Metastasierung. Die MPNST Zelllinie S1844,1 konnte etabliert und genetisch verifiziert werden. Die Metastasierung von MPNST Zellen *in vivo* wurde mit Hilfe zweier Methoden untersucht. Mittels der sog. Mikrosatellitenmarkeranalyse, die eine Unterscheidung humaner und muriner Zellen erlaubte, konnte gezeigt werden, dass

die metastasierenden Zellen der Zelllinie S462 in verschiedenen Organen der Mäuse bereits in frühen Phasen sicher nachgewiesen werden können. Ferner wurde eine weitere Vorgehensweise erprobt, um Metastasen zu verfolgen. Dabei wurden MPNST Zellen mit Luciferase transduziert, um sie anschließend in Mäusen mittels einer lichtempfindlichen CCD Kamera zu visualisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lieferten erstmalig solide Beweise für stammzellähnliche Zellen in MPNSTs und eröffnen somit neue Perspektiven in der Forschung und Therapie-Entwicklung für diese malignen Tumore. Wie einige Komponenten des Wnt-Signalweges, deren veränderte Expression in den MPNST Sphären bereits in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurde, sind weitere Studien geplant um therapeutisch relevante Targets zu charakterisieren. Die unterschiedlichen Wirksamkeiten der getesteten Zytostatika in der parentalen Zelllinie versus der sphäroiden Kultur könnten zudem ermöglichen, zielgerichtete Therapien zu entwickeln, die Tumorstammzellen bzw. stammzellähnliche Zellen zum Ziel haben. Die Etablierung einer neuen genetisch verifizierten MPNST Zelllinie ist eine bedeutende Bereicherung zu den bisher sehr rar etablierten Zelllinien, da die meisten nicht genetisch verifiziert sind. Mausmodelle für die Metastasierung von MPNSTs sowie eine sichere Nachweisemethode sind von essentieller Bedeutung, um den Prozess der Metastasierung zu untersuchen und Gegenstrategien entwickeln zu können.

# 1 Einleitung

## 1.1 NF1

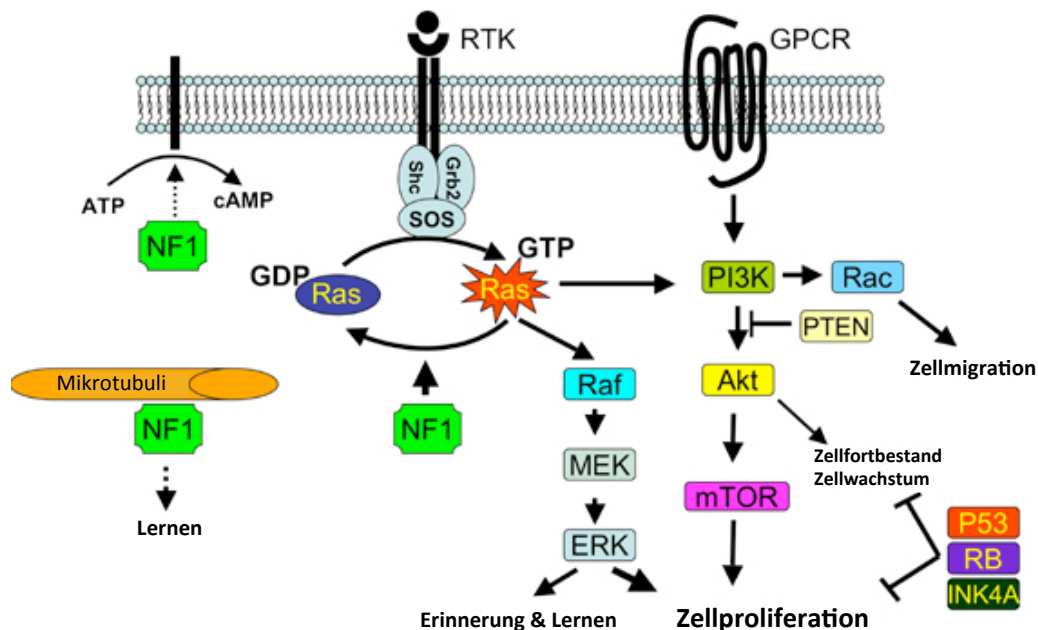
Neurofibromatose Typ 1 (NF1), auch bekannt als Morbus Recklinghausen, ist eine autosomal dominante Erkrankung mit einer Häufigkeit von 1:3000 Lebendgeburten bei voller Penetranz. Die Wahrscheinlichkeit für eine Vererbung liegt bei 50%, wenn ein Elternteil heterozygot betroffen ist. Die Hälfte aller NF1 Patienten tragen Neumutationen. Verursacht wird NF1 durch eine Mutation des NF1-Gens lokalisiert auf Chromosom 17q11.2 (Huson, 1989; Riccardi, 1992; Huson & Hughes, 1994; Gutmann *et al.*, 1997).

### 1.1.1 Neurofibromin

Das Genprodukt von *NF1* ist das zytoplasmatische Protein Neurofibromin, welches am häufigsten im Nervensystem exprimiert wird. Immunhistologische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass Neurofibromin vor allem in Neuronen, Oligodendrozyten und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen vorkommt, jedoch nicht in Astrozyten und myelinisierenden Schwann-Zellen (Daston *et al.*, 1992). Die einzig bislang bekannte Funktion von Neurofibromin ist seine Interaktion mit RAS, einem negativen Regulator des RAS/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweges (Viskochil, 1999; Weiss *et al.*, 1999). Neurofibromin fungiert als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und erleichtert die Umwandlung des aktiv GTP-gebundenen RAS zu seiner inaktiven GDP-gebundenen Form. Durch die resultierende Inaktivierung von RAS wird die RAS-vermittelte Signalkaskade reduziert. Bei einer nicht aberranten intrinsischen GTPase Aktivität kann RAS durch die *GAP-related* Domäne von Neurofibromin stimuliert werden. Kommt es zu einem Verlust von Neurofibromin, resultiert dies in einer unkontrollierten Hyperaktivierung von RAS (Xu *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Basu *et al.*, 1992; DeClue *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1995; Bollag *et al.*, 1996; Rubin & Gutmann, 2005).

In Maus-Fibroblasten konnte beobachtet werden, dass zu den normalen Funktionen von Neurofibromin neben der Regulation von RAS auch nachfolgende Effektoren wie AKT (Proteinkinase B) und ERK1/2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase1/2) gehören sowie die mitogene Antwort von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und gekoppelten G-Protein-Rezeptoren (GPCR) (Cichowski *et al.*, 2001; Rubin & Gutmann, 2005). Eine erhöhte Aktivität von RAS in Neurofibromin-defizienten Zellen führt zu einer verstärkten Aktivierung von RAS Effektoren wie Raf, ERK1/2, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und p21-

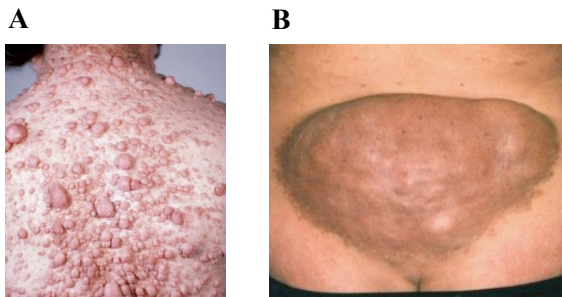
aktivierten Kinasen (PAK) (Tang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2000; Ingram *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Rubin & Gutmann, 2005). Die Aktivität der Signalwege resultiert in einer verstärkten Proliferation von NF1<sup>-/-</sup> Schwann-Zellen und Astrozyten sowie einer erhöhten Proliferation und Motalität von NF1<sup>+/-</sup> Mastzellen, Schwann-Zellen und Astrozyten (Bajenaru *et al.*, 2001; Gutmann *et al.*, 2001; Ingram *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Rubin & Gutmann, 2005). Eine erhöhte Aktivierung von PI3K kann zusätzlich in einer verstärkten Aktivität von AKT resultieren. Dies konnte an hämatopoetischen Zellen gezeigt werden. Zudem besteht eine Hyperaktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) durch eine Erhöhung von PAK (Rubin & Gutmann, 2005). Der Verlust des NF1-Gens in Astrozyten führt weiter zu einer Hyperaktivierung des „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR)-S6-Kinase-Signalweges (Dasgupta *et al.*, 2005a & b; Rubin & Gutmann, 2005). Ein Teil der Signaltransmission reguliert die Genexpression von Genen, die an der Zellproliferation, am Zelltod sowie an der Zelldifferenzierung und der Migration beteiligt sind (Abb. 1.1) (Weiss *et al.*, 1999; Le & Parada, 2007).



**Abbildung 1.1:** Neurofibromin (NF1) - regulierte Signaltransduktionswege. Dargestellt ist die RTK und GPCR -vermittelte Signaltransduktionskaskade, welche regulatorisch mit RAS interagiert. NF1 wirkt hierbei inhibierend auf RAS sowie aktivierend auf die Adenylyl-Cyclase und die Umsetzung von ATP zu cAMP. Der Verlust von NF1 führt zu einer erhöhten Aktivität von RAS und seinen folgenden Effektoren wie PI3K, AKT, mTOR sowie auf Raf, MEK, ERK1/2. Zudem besteht eine Aktivierung von RAC und PAK (PAK hier nicht dargestellt) (Rubin & Gutmann, 2005; Abbildung aus Le & Parada, 2007).

### 1.1.2 NF1 Klinik

NF1 ist eine Multisystemerkrankung mit einer variablen klinischen Symptomatik. Es besteht eine 100%ige Penetranz und variable Expressivität. Zu den charakteristischsten Merkmalen von NF1 Patienten zählen Café-au-lait Flecken, die zu den ersten Symptomen gehören, axilläres und inguinales Freckling (Hyperpigmentierung), Lisch-Knötchen (Iris-Hamartome) und Neurofibrome (Statement Bethesda, 1988; Huson & Hughes, 1994). Annähernd alle NF1 Patienten entwickeln benigne Neurofibrome. Hierbei werden kutane (Abb. 1.2A), subkutane und plexiforme Neurofibrome (PNF, Abb. 1.2B) unterschieden. Als sogenannte Mischtumoren setzen sich Neurofibrome aus Schwann-Zellen, Fibroblasten, Perineuralzellen und Mastzellen zusammen (Rubin & Gutmann, 2005), wobei Schwann-Zellen die primären Tumorzellen darstellen (Kluwe *et al.*, 1999b).



**Abbildung 1.2:** (A) multiple kutane Neurofibrome (B) plexiformes Neurofibrom (Aufnahmen von Herrn Prof. Dr. med. Mautner, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg)

Die Art, Lokalisation und Anzahl von Neurofibromen kann sehr unterschiedlich sein. In der Adoleszenz treten kutane Neurofibrome auf und nehmen mit dem Alter zu, wohingegen plexiforme Neurofibrome häufig von Geburt an vorliegen, entlang der Nerven wachsen sowie das umliegende Gewebe infiltrieren oder aber verdrängen und zu Knochenhypertrophien führen können. Sie können zu Schmerzen, neurologischen Defiziten und motorischen Fehlfunktionen führen (Evans *et al.*, 2002; Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009). Das Wachstum von plexiformen Neurofibromen ist umgekehrt proportional zum Lebensalter (Dombi *et al.*, 2007; Tucker *et al.*, 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009; Nguyen *et al.*, 2012). Im Vergleich zu gutartigen kutanen und subkutanen Neurofibromen können PNFs, welche intern bei 50% sowie extern bei 30% aller NF1 Patienten auftreten, zu malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) entarten (Mautner *et al.*, 2008; Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009). Das Auftreten von intern wachsenden plexiformen Neurofibromen scheint zudem häufiger im Zusammenhang mit funktionalen Defiziten und einer malignen Transformation zu stehen (Mautner *et al.*, 2006; Mautner *et al.*, 2007; Friedrich *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2012). Zu

den prämaligen Vorstufen eines MPNST werden auch die sogenannten atypischen plexiformen Neurofibrome gezählt. Auch wenn sie wie typische benigne Neurofibrome pathologisch gesehen wenige Mitosen aufweisen, unterscheiden sie sich durch eine erhöhte variable Zellularität sowie einen hyperchromatischen Zellkern (Beert *et al.*, 2011). Atypische PNFs können zudem zu Schmerzen führen (Ferner *et al.*, 2008) und werden als eine Art von Transitform zwischen Neurofibromen und MPNSTs beschrieben (Nielsen *et al.*, 1999; Brems *et al.*, 2009; Beert *et al.*, 2011). Eine Studie von Beert *et al.* konnte des Weiteren den Verlust des Zellzyklus Regulators CDKN2A als wichtiges Merkmal atypischer PNFs identifizieren (Beerts *et al.*, 2011).

## 1.2 MPNST

### 1.2.1 MPNST Klinik

MPNSTs machen ca. 5-10% aller Weichteilsarkome aus und entwickeln sich aus peripheren Nerven, Zellen der Nervenscheide wie Schwann-Zellen, Perineuralzellen sowie aus Fibroblasten (Weiss & Goldblum, 2008). Circa die Hälfte aller MPNSTs treten bei NF1 Patienten auf, die wiederum ein 8-13%iges Lebensrisiko haben einen MPNST (Abb. 1.3) zu entwickeln (Evans *et al.*, 2002) wovon hingegen sporadische MPNSTs zu 0,001% in der Gesamtbevölkerung auftreten (Ducatman *et al.*, 1986).



**Abbildung 1.3:** hyperzellulärer maligner peripherer Nervenscheidentumor der rechten Hüfte (Mautner *et al.*, 2003)

NF1 Patienten mit einem MPNST sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung deutlich jünger als Patienten mit einem sporadischen Tumor (Hagel *et al.*, 2007; Weiss & Goldblum, 2008). Häufig wird klinisch eine nicht lineare Progression des Tumors beobachtet, die Anlass zur Verdachtsdiagnose gibt. Die Entwicklung von MPNSTs aus peripheren Nerven kann u.a. zu radikulären Schmerzen, Parästhesien und motorischen Schwächen führen. Häufig treten



MPNSTs unter anderem an großen peripheren Nerven wie dem Nervus ischiadicus, Plexus brachialis und sacralis auf, wobei sie tief gelegen sind und oft die proximalen unteren und oberen Extremitäten sowie den Nervenstamm involvieren (Geller & Gebhardt, 2006; Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009).

Patienten mit internen PNFs scheinen ein 20-fach höheres Risiko zu haben einen MPNST zu entwickeln, verglichen zu Patienten ohne PNF (Tucker *et al.*, 2005). Sie weisen häufig Metastasen in der Lunge, in Weichgeweben, Knochen, Leber, im intra-abdominalen Hohlraum, in den Nebennierendrüssen, im Zwerchfell, Mittelfell, Gehirn, Nieren, an den Ovarien und dem Retroperitoneum auf (Ducatman *et al.*, 1986; Carroll & Ratner, 2008). NF1 Patienten mit MPNSTs haben eine Überlebensrate von 21% fünf Jahre nach Diagnosestellung (Rasmussen *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2002; Mautner *et al.*, 2003). Sporadische MPNSTs entstehen nicht aus vorbestehenden Neurofibromgeweben und werden als *de novo* Malignitäten beschrieben. Signifikant ist auch die frühere Entwicklung von Rezurrenzen und Metastasen bei NF1-assoziierten MPNSTs vergleichsweise zu Sporadischen (Hagel *et al.*, 2007). NF1-assoziierte MPNST Patienten zeigen kürzere Überlebenszeiten als Patienten mit sporadischen MPNSTs (Evans *et al.*, 2002), so dass davon auszugehen ist, dass grundsätzliche Unterschiede in der Biologie bestehen, begründet durch unterschiedliche Mutationen und Pathomechanismen (Hagel *et al.*, 2007). Hagel *et al.* zeigten weiter in ihrer Studie, dass Männer und Frauen fast gleichhäufig MPNSTs entwickelten, jedoch männliche Patienten sowohl deutlich früher rezidierten und deutlich früher Metastasen aufwiesen als auch häufiger verstarben. Des Weiteren wiesen Patienten mit einer späten Rezurrenz auch später Metastasen auf sowie eine längere Überlebensdauer. Größere Primärtumore waren zudem mit der Entwicklung von Metastasen assoziiert. Peripher lokalisierte MPNSTs zeichneten sich durch eine geringere Rezidivneigung und längere Überlebensrate aus (Hagel *et al.*, 2007).

Die Erfassung der Transmission von PNF zu MPNST ist eine klinische Herausforderung. Erst das Auftreten von Schmerzen und neurologischen Defiziten gibt Anlass die Verdachtsdiagnose zu stellen. Dabei ist eine Abgrenzung gegen progressive PNFs zu treffen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissionstomographie (PET) sind bildgebende Verfahren, die hilfreich, aber nicht immer zuverlässig sind. Surrogate Parameter sind derzeit noch nicht bekannt (Mautner *et al.*, 2007).

### **1.2.2 MPNST Tumorgenese**

Das NF1-Gen gehört in die Gruppe der sog. Tumorsuppressorgene, welche beispielsweise an der Kontrolle des Zellzyklus oder an mitogenen Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Sherr, 2004). Für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten konnte bereits beschrieben werden, dass Mutationen von RAS eine permanente Stimulierung des Raf-MAPK- und/oder des PI3K-Signalweges unter anderem ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen hervorruft (Weiss *et al.*, 1999; Le & Parada, 2007).

Verantwortlich für die Entstehung von Neurofibromen ist, wie das von Knudson beschriebene 2-Treffer Model (*Two-Hit Model*) für Tumorsuppressorgene, der sog. Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heterozygosity*, LOH). Demnach enthält ein Allel eine konstitutionelle inaktivierende Mutationen. Das zweite Allel kompensiert diesen Verlust solange bis ein zweiter „Hit“ den vollständigen Genverlust nach sich zieht und dann zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt (Knudson, 1971).

Ein Allelverlust von Chromosom 17 inkl. des *NF1* Locus wurde bereits in NF1-assoziierten MPNSTs gefunden (Skuse *et al.*, 1989; Legius *et al.*, 1993). Mit Hilfe von multiplen *NF1* Markern konnten auch in benignen Neurofibromen Allelverluste sowie verschiedene somatische Mutationen detektiert werden (Colman *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1996; Däschner *et al.*, 1997; Serra *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2010; Garcia-Linares *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2012). Eine biallelische Inaktivierung des NF1-Gens in benignen Tumoren deutet darauf hin, dass die somatische Geninaktivierung eines der initiiierenden Ereignisse für die Entwicklung von Neurofibromen zu sein scheint. Für die Entwicklung von MPNSTs dürften jedoch weitere genetische Veränderungen nötig zu sein (Upadhyaya *et al.*, 2008). So wurden neben dem Verlust von *NF1* in MPNSTs weitere Aberrationen mittels Zytogenetik (Glover *et al.*, 1991), CGH-Analysen (Lothe *et al.*, 1996; Mechttersheimer *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2000) sowie Untersuchungen von *TP53* (Nigro *et al.*, 1989; Legius *et al.*, 1994; Kluwe *et al.*, 1999a; Rasmussen *et al.*, 2000) und *CDKN2A/p16* bestätigt (Nielsen *et al.*, 1999; Frahm *et al.*, 2004b; Upadhyaya *et al.*, 2008).

*In vivo* Studien deuten darauf hin, dass hinsichtlich der Entwicklung von MPNSTs ein synergistischer Effekt bei einem Verlust von *NF1* und *TP53* besteht (Cichowski *et al.*, 1999; Vogel *et al.*, 1999). Eine Studie von Upadhyaya *et al.* (2008) zeigt zudem signifikante Unterschiede bei der somatischen *NF1*-Inaktivierung bei MPNSTs und dermalen Neurofibromen. MPNSTs weisen hier deutlich gehäuft große genomische Deletionen im

Vergleich zu benignen Neurofibromen auf. Verschiedene somatische und Keimbahn-Mutationsspektren deuten darauf hin, dass unterschiedliche Mechanismen bestehen. Zusätzlich konnte *TP53* als wichtiger Faktor für die Progression der Malignität bestätigt werden (Upadhyaya *et al.*, 2008).

### **1.2.3 Therapie von MPNST Patienten**

Eine Therapie von MPNST Patienten, insbesondere NF1-assoziiert, ist limitiert. Die vollständige chirurgische Resektion des Tumors mit weitem Resektionsradius im gesunden Gewebe ist prognostisch entscheidend und geht mit einer besseren Prognose einher. Bei der Majorität der Patienten ist eine derartige Operation nicht möglich, sodass der Großteil der Patienten auf Grund der ungewöhnlichen Aggressivität der Tumore verstirbt (Wong *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2001; Friedrich RE *et al.*, 2005). Häufig zeichnen sich Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapien ab. Zu den gängigen Zytostatika zählen Doxorubicin und Ifosfamid. Die Therapie von MPNSTs mit Imatinib (Glivec) zeigte keine signifikante Wirksamkeit (Posterpräsentation, 30. Deutscher Krebskongress, 2012). Postoperative Strahlentherapien verbessern nicht das Langzeitüberleben, jedoch verzögert es die Tumorrekurrenz (Gachiani *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009). Eine Reihe verschiedener Substanzen befinden sich für plexiforme Neurofibrome, die Vorstufen des MPNST sein können, und MPNSTs in präklinischen oder klinischen Studien, zu denen Farnesyl-Transferase-Inhibitoren gegen RAS, Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und des Plättchenwachstumsfaktor Rezeptor (PDGFR) gehören (Upadhyaya *et al.*, 2008).

Abgesehen von der Tumorsektion im Gesunden, bestehen für MPNST Patienten derzeit keine ausreichenden Therapieoptionen, die langfristig eine Überlebenschance bieten. Die Aggressivität und häufige Therapieresistenz der Tumore erschwert die Etablierung von adäquaten Behandlungsmethoden, die beispielsweise spezifische und zielgerichtete Medikationen einschließen.

### **1.2.4 MPNST *in vitro* Modelle**

Die Entwicklung von *in vitro* und *in vivo* Modellen ist unerlässlich für das Verständnis der Biologie der Tumorgenese und der Untersuchung geeigneter Therapiemöglichkeiten.

Im Allgemeinen erfolgt die Etablierung adhärenter MPNST Zelllinien aus Patiententumorproben durch enzymatische Vereinzelung von Tumorzellen der heterogenen Gewebeprobe. Kommt es zu einem Anwachsen von Tumorzellen mit begrenzter Lebensdauer

wird diese Kultur als Primärkultur bezeichnet, wohin gegen sich etablierte Zelllinien durch ein unbegrenztes, immortales Wachstum auszeichnen. Nichtsdestoweniger erschwert die Heterogenität der Tumore die Etablierung von MPNST Zelllinien, so dass eine genetische Verifikation von MPNST Zelllinien von großer Bedeutung ist. Bis dato stehen nur wenig etablierte Zelllinien zur Verfügung, die einer kontinuierlichen (genetischen) Kontrolle unterzogen werden (Frahm *et al.*, 2004a & b).

Zu den häufig verwendeten MPNST Zelllinien (Tab. 1.1) gehören die Linien ST88-14 (Fletcher *et al.*, 1991; Reynolds JE *et al.*, 1992), STS26T und NF90-8 (Glover *et al.*, 1991; Dahlberg *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1999b; Miller *et al.*, 2006). Die Zelllinie NMS-2PC zeichnet sich im Vergleich zu NMS-2 durch eine höhere Chemosensitivität aus (Imaizumi *et al.*, 1998). FMS-1 konnte bereits über einen Zeitraum von mehr als 24 Monaten über 100 Passagen kultiviert werden und zeigte in heterotransplantierten Tumoren Fibrosarkom-ähnliche oder epitheloide Eigenschaften verglichen mit faszikulären Wachstumseigenschaften kurzer, spindelartiger Tumorzellen des Primärtumors (Hakozaki *et al.*, 2009). Die Zelllinien FU-SFT8611 und FU-SFT9817 zeichnen sich durch ihre Tumorigenität *in vivo* aus jedoch wiesen CGH-Analysen allerdings nur Ähnlichkeiten zum jeweiligen Originaltumor auf (Aoki *et al.*, 2006). Heterotransplantierte Tumore der Zelllinie HS-Sch-2 deuteten *in vivo* ebenfalls immunhistologisch auf Ähnlichkeiten mit dem Originaltumor hin (Sonobe *et al.*, 2000). Gleiches gilt auch für die Zelllinie YST-1 bei Xeno-transplantierten Tumoren (Nagashima *et al.*, 1990). Für einige Zelllinien konnten umfangreiche genetische Verifikationen durchgeführt werden (Tab. 1.1), dennoch steht für eine Vielzahl von Linien eine vollständige genetische Charakterisierung aus. Genetische Kontrollen der verwendeten Zelllinien stellen zurzeit keine Routinemethode dar, die den Nachweis erbringen, dass es sich bei den verwendeten Tumorzellen um Zellen des Ursprungstumors handelt. So können beispielweise Kreuzkontaminationen häufig unentdeckt bleiben.

Um derartige Probleme zu vermeiden, wurden aufwendige regelmäßige genetische Verifikationen der Tumorzellen eingeführt (Frahm *et al.*, 2004b), so dass die MPNST Zelllinien S462 und S520 (Frahm *et al.*, 2004a & b) sowie S805, S1507,2 und S1844,1, die in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Mautner und Dr. Kluwe etabliert wurden, einer regelmäßigen genetischen Kontrolle zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen unterliegen (Tab. 1.1).

**Tabelle 1.1:** etablierte MPNST Zelllinien

<b>NF1-assoziiert</b>	
<b>Zelllinie</b>	<b>Genetik/(klinische) Eigenschaften</b>
<b>etablierte Zelllinien der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mautner und Dr. Kluwe</b>	
S462	LOH in <i>NF1</i> & <i>TP53</i> , Nonsense-Mutation in <i>NF1</i> (Frahm <i>et al.</i> , 2004b), Missense-Mutation in <i>TP53</i> , <i>in vivo</i> tumorigen
S520	LOH in <i>NF1</i> (Frahm <i>et al.</i> , 2004b)
S805	LOH in <i>NF1</i>
S1507,2	LOH in <i>TP53</i>
S1844,1	LOH in <i>NF1</i>
<b>Zelllinien anderer Arbeitsgruppen</b>	
NMS-2	Primärtumor; Translokation t(1;2); epitheloide Zellen, S100 <sup>+</sup> , <i>in vivo</i> tumorigen (Imaizumi <i>et al.</i> , 1998)
NMS-2PC	Metastase von Patient mit Primärtumor NMS-2; Fibroblasten-ähnliche Zellen, S100 <sup>+</sup> , <i>in vivo</i> tumorigen (Imaizumi <i>et al.</i> , 1998)
FU-SFT8710	Rezidiv, komplexer Karyotyp (Aoki <i>et al.</i> , 2006)
FMS-1	Deletion in <i>TP53</i> ; EGFR & COX-2-Expression (Hakozaki <i>et al.</i> , 2009)
MPNST-14	<i>TP53</i> -Wildtyp in Exon 4-10 (Subramanian <i>et al.</i> , 2010)
ST88-14	LOH in <i>NF1</i> , Translokation in 17q11.2 (Fletcher <i>et al.</i> , 1991; Reynolds JE <i>et al.</i> , 1992 )
ST88-3	LOH in <i>NF1</i> (Glover <i>et al.</i> , 1991; Miller <i>et al.</i> , 2006)
NF90-8	LOH sowie Mikrodeletion in <i>NF1</i> (Glover <i>et al.</i> , 1991; Miller <i>et al.</i> , 2006)
T265.p21	<i>PDGFRA</i> & <i>B</i> Überexpression (Badache & De Vries, 1998; Miller <i>et al.</i> , 2006)
sNF96.2	Rezidiv, LOH in <i>NF1</i> , abnormaler Karyotyp (Li <i>et al.</i> , 2004; Sun <i>et al.</i> , 2012)
sNF02.2	Lungenmetastase (Li <i>et al.</i> , 2004; Sun <i>et al.</i> , 2012)
<b>sporadisch</b>	
FU-SFT8611	Metastase, komplexer Karyotyp, <i>in vivo</i> tumorigen (Aoki <i>et al.</i> , 2006)
FU-SFT9817	<i>in vivo</i> tumorigen, komplexer Karyotyp (Aoki <i>et al.</i> , 2006)
YST-1	<i>NF1</i> -Wildtyp, <i>in vivo</i> tumorigen, epitheloides malignes Schwannom (Nagashima <i>et al.</i> , 1990)
MPNST-724	<i>TP53</i> Mutation (Subramanian <i>et al.</i> , 2010)
STS26T	<i>NF1</i> -Wildtyp (Dahlberg <i>et al.</i> , 1993; Miller <i>et al.</i> , 2006)
HS-Sch-2	Punktmutation in <i>TP53</i> , hypotriploider Karyotyp (Sonobe <i>et al.</i> , 2000)

Auf Grund der Tumorheterogenität dient die genetische Verifikation ebenso dem Nachweis von reinen Tumorzellen in Kultur, um ein Wachstum von beispielsweise Fibroblasten rechtzeitig vorzubeugen. Die Linie S462 steht mittlerweile weltweit verschiedenen Laboratorien zur Verfügung (Friedrich C *et al.*, 2005; Holtkamp *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006; Johansson *et al.*, 2008; Byer *et al.*, 2011; Borrego-Diaz *et al.*, 2012; Ghadimi *et al.*, 2012).

### 1.2.5 MPNST *in vivo* Modelle

Um den Prozess der Transition von Hyperplasien zu Neoplasien zu verstehen, wurden eine Reihe verschiedener Mausmodelle generiert, die dazu beitragen sollen, vor allem die Ursachen für die Entwicklung von plexiformen Neurofibromen sowie deren Transformation zu MPNSTs zu verstehen. Die meisten bislang bestehenden Mausmodelle orientieren sich an der Entstehung plexiformer Neurofibrome. Erste transgene Mausmodelle richteten sich vor allem auf die Bedeutsamkeit des NF1-Gens, jedoch führten beispielsweise homozygote Nullmutationen ( $NF1^{\Delta 31/\Delta 31}$ ) zum Tode am Mausembryonen-Tag E13.5 (Brannan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1994; Brossier & Carroll, 2012). Die Etablierung von MPNST-Mausmodellen wird vor allem durch die kurze Lebensdauer der Modellorganismen oder die Akkumulationsdauer weiterer Tumorsuppressor-Mutationen erschwert. Zusätzlich können sich Zellen, die eine zweite Mutation benötigen, in der latenten Phase der malignen Tumorprogression befinden, sodass Mäuse aufgrund anderer Ursachen versterben (Brossier & Carroll, 2012). Das MPNST-Tumormodell mit einem Verlust zweier Tumorsuppressorgene,  $NF1$  und  $TP53$ , zeigte in trans  $NF1^{+/-}/p53^{+/-}$ -Mäusen keine MPNST-Entwicklung. Vielmehr verstarben die Tiere nach 10 Monaten, an nicht-MPNST Weichteilsarkomen, wohingegen 30% der cis-linked  $NF1^{+/-}/p53^{+/-}$ -generierten Mäuse an einem MPNST verstarben, allerdings ohne ein zuvor bestehendes plexiformes Neurofibrom zu entwickeln (Cichowski *et al.*, 1999; Brossier & Carroll, 2012). 26% von  $NF1^{+/-}$ -Mäusen mit gleichzeitiger homozygoter  $CDKN2A$  Deletion ( $NF1^{+/-}; p16^{Ink4a-/-}/p19^{Arf-/-}$ ) zeigten eine MPNST-Entwicklung. Heterozygote Deletionen beider Loci führten jedoch zu einer geringeren MPNST-Frequenz (Joseph *et al.*, 2008; Brossier & Carroll, 2012).  $NF1^{+/-}; p16^{Ink4a-/-}/p19^{Arf-/-}$  Tiere wiesen ebenfalls kein bereits existierendes plexiformes Neurofibrom auf.  $NF1^{+/-}; p16^{Ink4a-/-}$  (Joseph *et al.*, 2008) sowie  $NF1^{+/-}; p19^{Arf-/-}$  (King *et al.*, 2002) Tiere entwickelten keine MPNSTs (Brossier & Carroll, 2012). Der Einfluss von  $Ras$ -Isoformen konnte am  $LSLKras2B^{G12D/+}; mGFAP-Cre$  Mausmodell näher untersucht werden wobei sich keine Tumore auf Wildtyp-Hintergrund, jedoch auf  $Pten^{flox/+} (LSLKras2B^{G12D/+} Pten^{flox/+}; mGFAP-Cre)$  plexiforme

Neurofibrome entwickelten. Eine Progression zu MPNSTs war nach sieben Monaten zu beobachten (Gregorian *et al.*, 2009; Brossier & Carroll, 2012).  $NF1^{flox/+} Pten^{flox/+}; mGFAP-Cre$  Mäuse entwickelten keinen MPNST vermutlich durch ein fehlendes LOH in *NF1* als auch *Pten* derselben Zelle (Brossier & Carroll, 2012). Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Tumorformation des peripheren Nervensystems wurde unter anderem mit Hilfe der Expression von *GGFβ3* (*Glial Growth Factor Receptor β3*), einer Neuregulin-Isoform, welche durch einen Schwann-Zell spezifischen Myelin-Protein-Zero ( $P_0$ ) Promoter reguliert wird, untersucht ( $P_0-GGFβ3$ ). Diese transgenen Tiere entwickelten Schwann-Zellhyperplasien, die sich über Neurofibrome nach 6-10 Monaten zu MPNSTs entwickelten (Huijbregts *et al.*, 2003; Brossier & Carroll, 2012). Zusätzlich traten additive Tumor-Suppressor Mutationen auf (Brossier & Carroll, 2012). Auch wenn die beschriebenen Modelle erste Erkenntnisse zur Entwicklung von MPNSTs liefern, so deuten diese die bisher wenig verstandene Komplexität der MPNST-Tumorentstehung an.

Neben verschiedenen Knock-Out Mausmodellen konnten vereinzelt Xenograft-Mausmodelle etabliert werden, die vor allem präklinischen Studien dienen. Subkutane Implantationen humaner MPNST Zelllinien, wie STS26T (Johansson *et al.*, 2008) und ST88-14 (Slomiany *et al.*, 2009), in die Flanke immunsupprimierter Tiere führten zu einer soliden Tumorformierung. Zwei weitere Xenograftmodelle stellen die Zellimplantation in den Nervus ischadicus dar. Byer *et al.* konnten so  $5 \times 10^5$  Zellen Luciferase-transduzierter MPNST-Zellen ST88-14 in NIHIII Mäuse applizieren. Drei Tage post Implantation konnten erste Signale der Zellen *in vivo* detektiert werden (Byer *et al.*, 2011). Perrin *et al.* verwendeten mit selbiger Zellzahl sNF96.2 Zellen für erwachsene weibliche SCID Mäuse, wobei eine Tumorformierungsrate von 88% erreicht wurde. Histologische Untersuchungen bestätigten typische Merkmale eines MPNSTs, wie unter anderem eine Hyperzellularität und verlängerte spindelartige Zellstrukturen (Perrin *et al.*, 2007). Für ein weiteres Explant-Modell wurden von Bhola *et al.* zwei Monate alte männliche NOD/SCID Mäuse subkutan an der rechten Flanke mit  $1 \text{ mm}^3$  großen humanen MPNSTs eines operierten NF1-Patienten implantiert, die eine *in vivo* Behandlung (mit Rapamycin) bei einem Tumolvolumen von  $200 \text{ mm}^3$  ermöglichte (Bhola *et al.*, 2010).

Die Limitierung von etablierten, genetisch verifizierten MPNST Zelllinien und MPNST-Mausmodellen, die nahe an humanen Tumoren orientiert sind, erschweren jedoch die Durchführung von präklinischen Therapiestudien.

## 1.3 Tumor-initiiierende Zellen

### 1.3.1 Stammzellen

Stammzellen sind nicht nur die Grundlage für die Entwicklung von Organismen, sondern lassen sich auch in einer Reihe verschiedener somatischer Gewebe wiederfinden, wo sie eine wichtige physiologische Rolle einnehmen. Dabei stehen differenzierte Zellen und Stammzellen in einer hierarchischen Beziehung zueinander. Demnach gehen differenzierte Zellen aus Stammzellen hervor, wobei noch verschiedene Entwicklungsstufen, sog. Progenitorzellen, unterschieden werden können. Zu den charakteristischen Eigenschaften von Stammzellen, die nur für diese Form von Zellen beschrieben werden konnte, gehören folgende Hauptkriterien (Jordan *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007):

1. Differenzierungspotential: sie besitzen die Möglichkeit der heterogenen Differenzierung zu spezifischen Zelltypen, um beispielsweise Gewebe zu erhalten.
2. Selbsterneuerung: sie dient dem Erhalt der Stammzellen. Dabei erfolgt die Formierung von identischen Zellen mit der Fähigkeit der Proliferation, Expansion und Differenzierung.
3. Homöostatische Kontrolle: sie haben die Fähigkeit zur Kontrolle und Modulation des Gleichgewichtes von Differenzierung und Selbsterneuerung.
4. Ihr Potential des extensiven Wachstums (Jordan *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007).

Stammzellen lassen sich zudem nach ihrer Differenzierungsfähigkeit klassifizieren. So sind beispielsweise totipotente embryonale Stammzellen dazu befähigt in alle Zelltypen zu differenzieren (Martin, 1975; Dewey *et al.*, 1977; Evans & Kaufman, 1981; Guo *et al.*, 2006), während pluripotente somatische adulte Stammzellen an der Geweberegenerierung und Reparatur beteiligt sind (Weissman, 2000; Blau *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2006). In einer Vielzahl von gesundem Gewebe wie beispielsweise der Haut, Hauptbestandteilen des Gastrointestinaltraktes, des hämatopoetischen Systems oder der Keimzellen kann eine kontinuierliche oder zyklische Zellerneuerung, beobachtet werden. Es wird angenommen, dass auch hier ein hierarchisches System besteht, welches adulte Stammzellen enthält (Potten, 1998; Bach *et al.*, 2000; Watt, 2001; Sancho, 2003; Alonso & Fuchs, 2003; Brittan & Wright, 2004; Gargett, 2004). Andere Organe wie Muskeln oder das Gehirn zeigen nur sehr langsame oder minimale Zellerneuerungen, die nur in bestimmten Situationen stattfinden (Collins *et al.*, 2005; Ming & Song, 2005; Dalerba *et al.*, 2007).



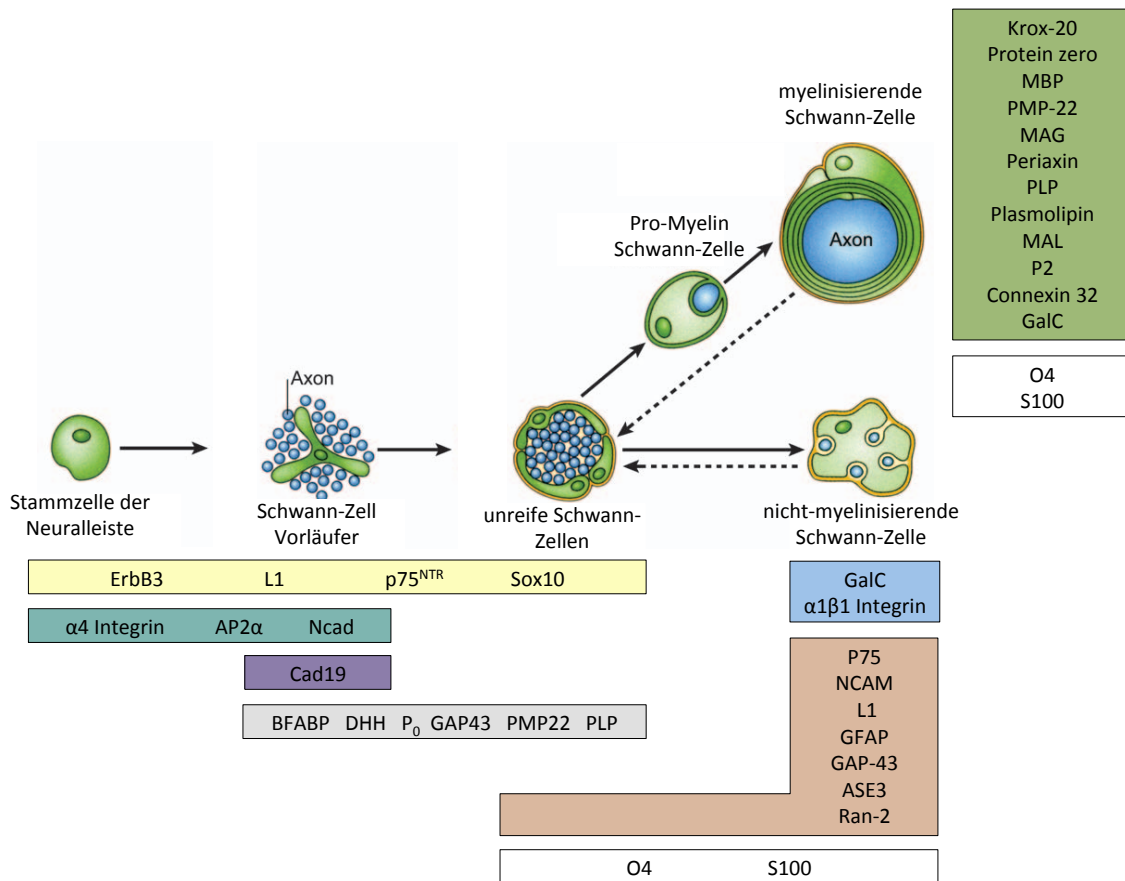
### ***1.3.2 Stammzellen der Neuralleiste***

Schwann-Zellen stellen die LOH tragenden Tumorzellen bei NF1-assoziierten Tumoren dar (Kluwe *et al.*, 1999b). Die Differenzierung von Schwann-Zellen resultiert aus Stammzellen der Neuralleiste (Mirsky *et al.*, 2008), was für die Charakterisierung von malignen peripheren Nervenscheidentumoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen ist.

Bei der Neuralleiste handelt es sich um eine einzigartige transiente embryonale Zellpopulation, die erstmals 1868 bei Vertebratenembryonen als eine Gruppe von Zellen zwischen dem Neuralrohr und der Epidermis beschrieben wurde (Horstadius, 1950; Shakhova & Sommer, 2010). Zellen der Neuralleiste entstehen im Ektoderm an den Grenzbereichen des Neuralrohrs und setzen sich nach der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT) und Migration in verschiedenen Bereichen des Körpers fest, um an der Formierung des Blutandrangs an verschiedenen Geweben und Organen mitzuwirken. Abkömmlinge der Neuralleiste entspringen vier großen Segmenten der Neuralachse, der kranialen, vagalen, kardialen und trunkalen. Die kraniale Neuralleiste bildet den Hauptteil von Kopfverbindung und skeletalen Strukturen, Nerven und Pigmentzellen. Kardiale Zellen der Neuralleiste tragen zur Herzentwicklung bei, während enterische Ganglien als Derivat der Neuralleiste dem N. Vagus zugeordnet werden müssen. Es bestehen grundsätzlich zwei Migrationswege der Stammzellen der Neuralleiste: die Migration des dorsalen Weges resultiert in einer Ansiedlung von Zellen der Haut als Melanozyten sowie die Migration des lateralen Weges, die zur Bildung von sensorischen und sympathischen Ganglien sowie unter anderem adrenalen Chromaffinzellen führt (Le Douarin & Dupin, 2003; Shakhova & Sommer, 2010). *In vivo* Experimente weisen darauf hin, dass Zellen der Neuralleiste zu Neuronen, Gliazellen, glatten Muskelzellen und Melanozyten differenzieren können; so sind multipotente Zellen relativ häufig vertreten (Sommer, 2001; Shakhova & Sommer, 2010).

Bei genauerer Betrachtung der Differenzierung von Stammzellen der Neuralleiste zu Schwann-Zellen lassen sich verschiedene Stadien abgrenzen (Abb. 1.4). Zunächst entwickeln sich aus migrierenden Stammzellen der Neuralleiste Schwann-Zell-Vorläufer, die zu unreifen Schwann-Zellen transformieren. Letztendlich findet eine finale (reversible) Differenzierung zu myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen statt. Alle Prozesse unterliegen einer strikten Regulierung, da neben der Differenzierung zu Gliazellen beispielsweise eine Differenzierung zu endoneuralen Fibroblasten aus Schwann-Zell-Vorläufern hervorgehen kann (Jessen & Mirsky, 2005). Die Differenzierungsprozesse werden durch eine Vielzahl ver-

schiedener Faktoren reguliert und gelenkt. Vor allem die Transkriptionsfaktoren Sox10 und KROX-20 nehmen eine wichtige Funktion ein (Abb. 1.4). So ist Sox10 vor allem an der Entwicklung früher, undifferenzierter Zellen sowie an Myelinisierungsprozessen beteiligt (Britsch *et al.*, 2001; Jessen & Mirsky, 2005; Schreiner *et al.*, 2007; Mirsky *et al.*, 2008). Auch KROX-20 ist essentiell für den Prozess der Myelinisierung (Topilko *et al.*, 1994; Topilko & Meijer, 2001). Unreife Schwann-Zellen exprimieren außerdem S100 $\beta$ , GFAP und O4, ein Glykolipid-Antigen, während ihre Expression in Schwann-Zell-Vorläufern nicht vorliegt oder deutlich geringer ausfällt (Jessen & Mirsky, 2005). Die Entwicklung zu myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen ist durch die Expression weiterer Markermoleküle gekennzeichnet, wobei eine stetige Expression von S100 $\beta$  und O4 gegeben ist (O4 ist in Abwesenheit von Axonen herunterreguliert) (Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4:** Differenzierungslinie von Schwann-Zellen aus Stammzellen der Neuralleiste über Schwann-Zell-Vorläufer, unreifen Schwann-Zellen zu myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen. Dargestellt ist die Expression von Markermolekülen während der embryonalen Entwicklungsphase sowie zu den Zeitpunkten der Differenzierung zu myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen (verändert nach Mirsky *et al.*, 2008).

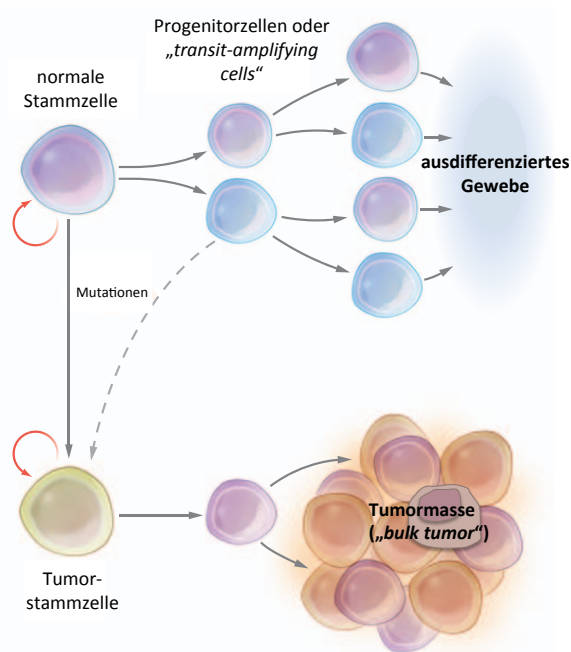
### ***1.3.3 Modell der Tumorstammzellen***

In den letzten Jahren hat sich der Fokus der Tumorbiologie verändert und sich zunehmend auf die Rolle sog. Tumorstammzellen verlagert. Für eine Reihe verschiedener solider Tumoren (Ailles & Weissman, 2007) aber auch spezieller Formen der Leukämie wurden Subpopulationen von Zellen beschrieben, die stammzellcharakteristische Eigenschaften besitzen (Bonnet & Dick, 1997; Holyoake *et al.*, 2002). Dabei wird vor allem ihre Rolle bei der Tumorentstehung als auch ihr Metastasierungspotential diskutiert. Es wird vermutet, dass Tumorstammzellen für Neoplasien verantwortlich sein können (Brabletz *et al.*, 2001 & 2005; Clarke & Fuller, 2006b; Dalerba *et al.*, 2007).

Eines der ersten Modelle für Tumorstammzellen ist die Beschreibung der Differenzierung von Zellen des blutbildenden Systems, nachdem langzeit-multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) und kurzzeit-multipotente Progenitorzellen (MMP) als grundlegende Elemente unterschieden werden können. Beide Zelltypen stehen in einer hierarchischen Beziehung zueinander, wobei die MMPs aus den HSCs hervorgehen. Die MMPs gewährleisten die Differenzierung des vollen Spektrums des Blutsystems (Morrison & Weissmann, 1994; Morrison *et al.*, 1997; Dalerba *et al.*, 2007). Das hierarchische System konnte auf das Beispiel bestimmter Formen der akuten myeloischen Leukämie (AML) übertragen werden. So zeigte sich, dass nur eine Minderheit an Zellen mit einem spezifischen Phänotyp in der Lage ist *in vivo* eine AML auszulösen, den sog. leukämischen Stammzellen. Diese Subpopulation besitzt wiederum das Potential zu einer weiteren Population zu differenzieren (Lapidot *et al.*, 1994; Bonnet & Dick, 1997). Auch für die chronische myeloische Leukämie konnten Tumorstammzellen beschrieben werden (Holyoake *et al.*, 2002).

Bislang ist unklar aus welchen Zelltypen sich Tumorstammzellen entwickeln. So werden eine aberrante Selbsterneuerung sowie ein intrinsisches Wachstumspotential häufig für maligne Tumore in Betracht gezogen (Jordan *et al.*, 2006). Neben der Möglichkeit, dass sich Tumorstammzellen aus normalen Stammzellen über verschiedene Mutationsprozesse entwickelt haben können, besteht die alternative Hypothese, dass diese Zellen nicht aus normalen Stammzellen, sondern aus Progenitorzellen hervorgegangen sind und Mutationen erst dort stattgefunden haben (Cozzio *et al.*, 2003; Huntly *et al.*, 2004; Jamieson *et al.*, 2004; Krivtsov *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2006). Diese Form der Vorläuferzellen (*transit-amplifying cells*) können sich durch ihre Replikationsfähigkeit auszeichnen, zeigen jedoch in der Regel kein Selbsterneuerungspotential. Um dem Phänotyp einer Stammzelle zu entsprechen, müssen

Mutationsprozesse in der Progenitorzelle ablaufen, die die Zelle zum Selbsterneuerungspotential befähigt. Abbildung 1.5 weist beide Hypothesen auf: so könnten zum einen Mutationen eine normale Stammzelle zu einer Tumorstammzelle oder zum anderen eine Vorläuferzelle transformieren (Jordan *et al.*, 2006).



**Abbildung 1.5:** Modelle der Entstehung von Tumorstammzellen. Normal differenzierte Gewebszellen entstehen durch die Entwicklung von Stammzellen über Progenitorzellen. Tumorstammzellen könnten sich zum einen durch Mutationen aus normalen Stammzellen, oder zum anderen aus Progenitorzellen (gestrichelter Pfeil) entwickelt haben (aus Jordan *et al.*, 2006).

Die molekularen Mechanismen, die eine Transformation von einer normalen Stammzelle oder Progenitorzelle zu einer Tumorstammzelle beeinflussen, werden offensichtlich durch intrinsische und umgebende Faktoren bestimmt. Dabei können mehrstufige Mutationsmechanismen für die Formierung von Tumorstammzellen nötig sein (Guo *et al.*, 2006). Veränderungen von Selbsterneuerungssignalwegen scheinen zusätzlich die Formierung von Tumorstammzellen zu beeinflussen. So sind die Signalwege der Hox-Gene, Wnt, Sonic Hedgehog und Notch nicht nur an der Selbsterneuerung von Stammzellen beteiligt, sondern auch an der Karzinogenese (Miller *et al.*, 2005; Woodward *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorgen Pten die Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen negativ durch die Modulation des G0-G1 Zellzykluseintritts reguliert (Groszer *et al.*, 2001 & 2006; Guo *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass das Selbsterneuerungspotential und die Differenzierungsfähigkeit durch eine asymmetrische Zellteilung erhalten bleibt. Somit kann sich eine Stammzelle zu einer neuen Stammzelle und einer differenzierten Zelle teilen. Eine veränderte Kontrolle der asymmetrischen Zellteilung kann ein aberrantes Selbsterneuerungspotential verursachen (Causinus & Gonzalez, 2005; Guo *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass das Tumorsuppressorgen LKB1 für die Regulation

der Polarität der Zellen verantwortlich ist und bei Verlust, wie beim Peutz-Jeghers Syndrom zur Tumorgenese beiträgt (Clevers, 2005; Guo *et al.*, 2006). Zwei weitere wichtige regulatorische Faktoren des Selbsterneuerungspotentials von Tumorstammzellen sind der Repressor Bmi-1- und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Lessard & Sauvageau, 2003; Jamieson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006). Studien zeigen, dass neben hämatopoetischen Stammzellen auch neuronale Stammzellen von Bmi-1 abhängig sind, jedoch nicht neuronale Progenitorzellen (Molofsky *et al.*, 2003 & 2005; Park *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006). Außer Bmi-1, reguliert Wnt/ $\beta$ -Catenin HoxB4 und Notch1, zwei wichtige Faktoren, die ihrerseits die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen regulieren (Reya *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006).

Für die Erhaltung des Gewebegleichgewichts wird Stammzellen im Allgemeinen eine sog. biologische Nische zugesprochen, in der unter anderem das Selbsterneuerungspotential sowie die Differenzierung von Stammzellen reguliert wird und diese als Mikroumgebung fungiert (Rizo *et al.*, 2006; Scadden, 2006; Natarajan & FitzGerald, 2007). Stammzellnischen konnten bereits für das hämatopoetische System, den Darm, die Haut, das Gehirn, die Brust und für die Prostata, beschrieben werden (Fuchs *et al.*, 2004; Natarajan & FitzGerald, 2007). Für Tumorstammzellen ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob sie aus normalen Stammzellen durch eine unkontrollierte Kommunikation mit der Nische generiert werden oder ob fehlerhaft regulierte Faktoren der Nische zu einer andauernden Stammzellproliferation und Tumorentstehung führen (Bao *et al.*, 2006b; Calabrese *et al.*, 2007; Natarajan & FitzGerald, 2007).

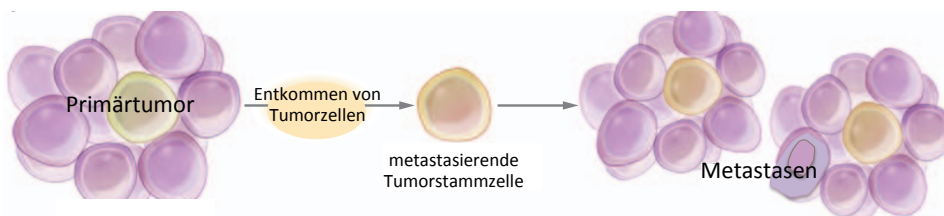
Tumore weisen zudem Akkumulationen von Mutationen auf, die auch über einen längeren Zeitraum entstanden sein können. Aufgrund der Langlebigkeit von Stammzellen könnten diese gehäuft bei diesen Zelltypen auftreten (Fearon & Vogelstein, 1990; Dalerba *et al.*, 2007). Eine wichtige Prüfung der Hypothese von Tumorstammzellen waren *in vivo* Versuche, die belegen konnten, dass nur eine bestimmte Fraktion von Zellen mit der Expression von spezifischen Oberflächenmarkern in der Lage ist die Tumorformierung zu initiieren, differenzierte Tumorzellen jedoch nicht (Clarke, 2005; Dalerba *et al.*, 2007). Drei wichtige Eigenschaften von Tumorstammzellen konnten dabei zusammengefasst werden (Dalerba *et al.*, 2007):

1. nur eine kleine Subpopulation an Zellen ist in der Lage die Tumorgenese in immunsupprimierten Mäusen zu initiieren. Tumore, welche aus tumorigenen Zellen hervorgegangen sind, enthalten sowohl tumorigene als auch nicht-tumorigene Zellen,

die in der Lage sind den vollen Phänotyp des ursprünglichen Tumors hervorzurufen (Dalerba *et al.*, 2007).

2. tumorigene Zellen sind durch die Expression spezifischer Oberflächenproteine charakterisiert und können durch differentielle und reproduzierbare Methoden aus nicht tumorigenen Zellen isoliert werden (Dalerba *et al.*, 2007).
3. Tumorstammzellen zeichnen sich durch Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzen aus (Dean *et al.*, 2005).

Die Metastasierung (Abb. 1.6) von malignen Tumoren wird häufig in den Zusammenhang mit Tumorstammzellen gebracht. Das ursprüngliche Modell der Metastasierung besagt, dass nur ein bestimmter Subklon des Tumors in der Lage ist zu metastasieren. Dieser Subklon zeigt wiederum eine homogene monoklonale Expansion und kann zudem auch additive genetische Mutationen tragen. Primärtumor und Metastase sind nach diesem Modell jedoch substantiell unterschiedlich (Dalerba *et al.*, 2007). Für das Modell der Tumorstammzellen konnte gezeigt werden, dass Primärtumor und Metastase deutliche Ähnlichkeiten beispielsweise hinsichtlich der Gewebestrukturen (Brabletz *et al.*, 2001 & 2005; Dalerba *et al.* 2007), genetischen Mutationen (Losi *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 2000; Zauber *et al.*, 2003; Dalerba *et al.*, 2007), Expressionen von Tumorsuppressor- und immunmodulatorischen Proteinen (Menon *et al.*, 2004; Dalerba *et al.*, 2007) oder der Expression epigenetisch kontrollierter Gene aufweisen (Dalerba *et al.*, 1998 & 2007). Das Modell der Tumorstammzellen besagt somit, dass nur Tumorstammzellen metastasieren und die anschließende Differenzierung dem Primärtumor sehr ähnelt (Dalerba *et al.*, 2007).



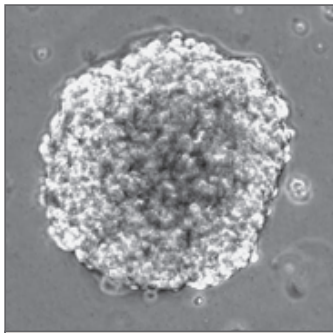
**Abbildung 1.6:** Die Metastasierung könnte durch die Sezernierung von Tumorstammzellen aus dem Primärtumor in distale Bereiche des Organismus zur Bildung von Metastasen hervorgerufen werden (Teilabbildung aus Jordan *et al.*, 2006).

Die Signalwege Bmi-1 und Wnt/ $\beta$ -Catenin spielen vermutlich auch hier eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Metastasierung. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Menge von  $\beta$ -Catenin in mesenchym-ähnlichen kolorektalen Tumorzellen an der invasiven Front

vorlag, so dass vermutet wird, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg an der EMT oder am Disseminierungsprozess des Primärtumors beteiligt ist. Eine niedrige Aktivierung von  $\beta$ -Catenin im Nukleus sorgt für die Erhaltung des Selbsterneuerungspotentials während eine erhöhte Aktivität die EMT auslöst, welche einen wichtigen Faktor der Metastasierung darstellt (Brabletz *et al.*, 2001 & 2005; Guo *et al.*, 2006). Bei einem Vergleich von Prostatametastasen und Primärtumoren von Patienten und dem transgenen TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*)-Mausmodell wies Bmi-1 eine deutliche Erhöhung und eine Gen-Signatur auf, die für metastasierende Tumore beschrieben wurde (Glinsky *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006).

### **Neuronale Tumorstammzellen**

Für Stammzellen des zentralen Nervensystems konnten erstmals 1992 nicht-adhärenente Zellen beobachtet werden, die als sog. Neurosphären (Abb. 1.7) wachsen, ein Selbsterneuerungspotential besitzen und zu grundsätzlichen Zelltypen des Gehirns, wie Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten, differenzieren können (Reynolds *et al.*, 1992a; Reynolds & Weiss, 1992b; Jordan *et al.*, 2006). Weiter zeigen Neurosphären, dass sie als Einzelzellen passagiert werden können und neue Sphären bilden. Die Passagierung und Ausbildung von Neurosphären wird als Ausdruck des Selbsterneuerungspotentials beschrieben (Chiasson *et al.*, 1999; Seaberg & van der Kooy, 2003; Jordan *et al.*, 2006; Gilbert & Ross, 2009). 2003 konnte erstmals die Isolierung und das Wachstum von Neurosphären aus pädiatrischen Gehirntumoren und Glioblastomen beschrieben werden. Diese Neurosphären sind heterogene Aggregate welche sich aus einer einzelnen Tumorstammzelle oder Progenitorzelle gebildet haben. Einige dieser Zellen sind zur multilinearen Zelldifferenzierung der Linie von Neuronen und Gliazellen sowie einem gemischten abnormalen Phänotyp befähigt (Singh *et al.*, 2003; Gilbert & Ross, 2009). Eine Differenzierung zu Astrogliazellen kann bei neuronalen Stammzellen und neuronalen Glioblastom-Tumorstammzellen durch die Gabe von Serum ausgelöst werden. Die umgekehrte Kultivierung von adhärenenten Glioblastomzellen in serumhaltigen Medium führte in serumfreiem Medium zur Bildung von Neurosphären (Gilbert & Ross, 2009; Qiang *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.7:** Wachstum humaner neuronaler Stammzellen als Neurosphären (aus Jordan *et al.*, 2006)

Es ist offenbar nicht zwingend erforderlich, dass Zellen aus Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS), mit der Expression stammzellähnlicher Eigenschaften, aus Stammzellen hervorgehen. So zeigen experimentelle Systeme, dass die Expression von kooperierenden Onkogenen in Progenitorzellen des Nervensystems zu einer Tumorformierung führen kann. Dabei gleichen die zytopathologischen Strukturen der Tumore denen von hoch malignen Tumoren des ZNS, wie multiforme Glioblastome (Jordan *et al.*, 2006). Bei einer Expression von beispielsweise RAS- und MYC-Onkogenen in Progenitorzellen der Oligodendrozyten kommt es zu einer Tumorformierung *in vivo* (Barnett *et al.*, 1998; Jordan *et al.*, 2006). So gilt auch für Tumore des ZNS, dass sie nicht zwangsläufig aus einer gewebsspezifischen Stammzelle hervorgehen müssen, sondern auch durch verschiedene Formen von Progenitorzellen, die eine onkogene Transformation erfahren haben (Jordan *et al.*, 2006).

### **1.3.4 Tumorstammzellmarker**

Für die Identifizierung von sowohl Stammzellen als auch Tumorstammzellen werden sog. Markermoleküle eingesetzt.

#### ***Notch4 & Sox2***

Einige Marker können unter anderem auch eine onkogene Rolle einnehmen, wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor Notch4, welcher als Anti-Differenzierungsmarker identifiziert wurde (Hochedlinger *et al.*, 2005; Natarajan & FitzGerald, 2007). Oder aber sie werden sowohl in normalen Stammzellen als auch in Tumorstammzellen exprimiert, wie beispielweise Sox2, einem *High Mobility Group-Box* Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt und für die Beibehaltung von Stammzeleigenschaften und die Regulation der Neurogenese verantwortlich ist (Ellis *et al.*, 2004; Episkopou, 2005; Natarajan & FitzGerald, 2007).



### **CD34**

CD34 wird vorrangig als hämatopoetischer Stammzellmarker verwendet; er wird jedoch auch in malignen peripheren Nervenscheidentumoren exprimiert (Satterthwaite *et al.*, 1992; Naber *et al.*, 2011).

### **CD133**

Der transmembrane Oberflächenmarker AC133 (CD133) konnte als neuronaler Stammzellmarker und Marker für Progenitorzellen identifiziert werden (Uchida *et al.*, 2000; Shmelkov *et al.*, 2005; Jordan *et al.*, 2006). CD133 wurde erstmals als Marker für hämatopoetische Stammzellen verwendet (Horn *et al.*, 1999). CD133<sup>+</sup> Zellen aus Glioblastomen zeigen eine multilineare Differenzierung sowie höhere Sphärenformationsraten (Liu *et al.*, 2006). Die Isolierung von Tumorstammzellen aus Hirntumoren bzw. die selektive Isolierung CD133<sup>+</sup> Zellen zeigte das Wachstum von Tumorstammzellen *in vitro*. Die Durchführung von *in vivo* Studien zeigte außerdem, dass die Implantation von CD133<sup>+</sup> Zellen zu einer Tumorformierung führte, jedoch nicht die der CD133<sup>-</sup> Zellen (Singh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2006).

### **Nestin**

Das Intermediärfilamentprotein Nestin wird in neuronalen Stammzellen, wie z.B. neuroektodermalen Stammzellen, exprimiert und diente als erster Marker neuronaler Stammzellen (Hockfield & McKay, 1985; Lendahl *et al.*, 1990; Natarajan & FitzGerald, 2007). Vorrangig ist es an der zytoskeletalen Organisation beteiligt (Fuchs & Weber, 1994), jedoch auch an der Zellsignalisierung sowie am Stoffwechsel (Natarajan & FitzGerald, 2007). Eine erhöhte Expression von Nestin korreliert mit der Metastasierung von Tumoren der Gliazellen, Astrozyten und Melanome (Dahlstrand *et al.*, 1992; Flørenes *et al.*, 1994; Duggal *et al.*, 1997; Natarajan & FitzGerald, 2007).

### **Oct4**

Oct4 wird als Transkriptionsfaktor und Regulator der Selbsterneuerung und Differenzierung sowie als Tumorstammzellmarker beschrieben. So korreliert eine erhöhte Oct4-Expression mit der Tumorprogression, den höheren Metastasierungsraten sowie einer kürzeren Überlebensrate im Vergleich zu einer moderaten oder geringen Oct4-Expression (Hu *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Kim & Nam, 2011).

### ***Sox9***

Sox9 beispielsweise dient zur Erhaltung multipotenter neuronaler Stammzellen (Scott *et al.*, 2010).

### ***EGFR***

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, ist an der Expansion von Vorläuferzellen des ZNS beteiligt. Der EGFR-Signalweg hat Einfluss auf die Entscheidung der Differenzierung sowie auf die Chemotaxis neuronaler Progenitorzellen (Burrows *et al.*, 1997; Lillien & Wancio, 1998; Aguirre *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008) und wird beispielsweise dem Kultivierungsmedium von dermalen Progenitorzellen der Neuralleiste zugesetzt (Fernandes *et al.*, 2004; Sieber-Blum *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008).

### ***NCAM***

Das neurale Zelladhäsionsmolekül, NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*, auch CD56) gehört der Superfamilie der Immunglobuline an (Jorgensen & Bock, 1974; Rutishauser *et al.*, 1976; Yang *et al.*, 2011). NCAM wird auf neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert (Cunningham *et al.*, 1987; Schmid *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2011) und ist außerdem am Auswuchs von Neuriten, Zell-Zell-Adhäsionen, an der synaptischen Plastizität und an Lern- und Erinnerungsprozessen beteiligt (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004; Weinhold *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011).

### ***NGFR***

Der *Nerve Growth Factor Receptor* (NGFR) wird vor allem auf Schwann-Zellen und Neuronen exprimiert und dient als Marker neuronaler Zellen (Allendoerfer *et al.*, 1990; DiStefano *et al.*, 1993)

### ***1.3.5 Multi Drug Resistance***

Die sog. *Multidrug Resistance* (MDR) von Tumorzellen beschreibt die Resistenz von Tumorstammzellen gegenüber einer Reihe verschiedener Medikamente, die sich grundsätzlich in ihrer Struktur und dem Einfluss auf die Zelle unterscheiden können. Es bestehen drei wesentliche Mechanismen der Zelle, Resistenzen gegen Chemotherapeutika auszubilden und somit deren Unwirksamkeit zu bewirken (Stavrovskaya, 2000):

1. Die Aktivierung von transmembranen Effluxtransportern: Zu diesen Transportern gehört beispielsweise das transmembrane P-Glycoprotein (Pgp) der Superfamilie ABC (*ATP-Binding Cassette*). Das kodierende Gen ist *MDR1*. Eine Multiresistenz kann durch eine Veränderung der *MDR1*-Expression hervorgerufen werden oder durch die Erhöhung der Genamplifikation des Genabschnittsbereiches, welcher das *MDR1*-Gen kodiert sowie fünf oder sechs daran geknüpfte Gene (Borst, 1991; Stavrovskaya, 2000). Auch durch die Stabilisierung der *MDR1*-mRNA, deren Syntheseregulierung und Veränderungen der Proteinprozessierung können Resistenzen gebildet werden. Die Aktivität von Pgp kann auch selbst durch das Substrat reguliert werden oder aber durch eine Vielzahl weiterer Faktoren, zu denen beispielsweise die Proteinkinasen A und C gehören (Chaudhary & Roninson, 1992; Bosch & Croop, 1996; Stavrovskaya, 2000). Für verschiedene Entitäten konnte das Vorhandensein einer sog. *Side Population* beschrieben werden. Diese Zellpopulation zeichnet sich dadurch aus, dass sie den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 aktiv entlang eines Konzentrationsgefälles ausschleusen kann, während alle weiteren Zellen dazu nicht befähigt sind. Ermöglicht wird dies durch Transporter wie *MDR1* (*ABCB1*) und *BCRP* (*ABCG2*) (Gottesmann *et al.*, 2002; Hadnagy *et al.*, 2006; Gilbert & Ross, 2009). Die Färbung der Zellen resultiert in einer separierten Population, der *Side Population*, als eine Art Seitenprofil am Durchflusszytometer, gekennzeichnet durch eine niedrige Farbstoffaufnahme (verursacht durch die Hoechst-Ausschleusung). Die Behandlung von Zellen mit dem Calcium Kanal Blocker Verapamil resultiert in einem Verlust dieser Population (Zhou *et al.*, 2001; Yano *et al.*, 2005; Komuro *et al.*, 2007). Mit Hilfe dieser durchflusszytometrischen Messungen konnten erstmals murine hämatopoetische Tumorstammzellen isoliert bzw. identifiziert werden (Goodell *et al.*, 1996; Gilbert & Ross, 2009). Die eigentliche Funktion des Transporters besteht in der Ausschleusung von Xenobiotika und endogenen Komponenten, um die Zelle vor Toxinen zu schützen und zu zellulären Signalprozessen beizutragen. In einer Reihe humaner Zelllinien wurde die Expression von *ABCG2* nachgewiesen, wie u.a. in humanen Zelllinien von Brustkrebs (Maliapaard *et al.*, 2001) und des Gehirns sowie Hirntumoren (Zhang *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2009b). Postuliert wird eine Überexpression des Effluxtransporters, in Tumorzellen, unter anderem mit einem tumorstammzellähnlichen Phänotyp, die zu einer Chemoresistenz führt, da die Medikamente nicht mehr an ihren Wirkungsort innerhalb der Zelle gelangen (Robey *et al.*, 2007; An & Ongkeko, 2009). Das *Multidrug Resistance-associated Protein* (*MRP*) gehört auch zur Gruppe der ABC-Transporter und ist ebenso an Resistenzen und am energieabhängigen Transport von

toxischen Stoffen aus der Zelle beteiligt, wobei zelluläres Glutathion benötigt wird (GS-X Pumpe) (Loe *et al.*, 1996; Borst *et al.*, 1997; Deeley & Cole, 1997; Stavrovskaya, 2000). Ein weiteres MDR-Protein ist das *Lung-Resistance-related Protein* (Stavrovskaya, 2000).

2. Die Aktivierung von Enzymen des Glutathion-Detoxifikations-Systems. Glutathion interagiert über seine Thiol-Gruppe mit der reaktiven Seite des Medikamentes, so dass eine Konjugation aus Glutathion und Medikamentenmolekül entsteht. Dies führt zur Aktivitätsverminderung des Medikamentes und zu einer höheren Wasserlöslichkeit. Das Konjugat wird mittels GS-X Transportern, wie MRP, aus der Zelle gepumpt. Katalysiert wird dieser Prozess durch die Glutathion S-Transferase, so dass dessen Aktivität die Detoxifikation bestimmt und Resistenzen verursacht (Tew, 1994; Stavrovskaya, 2000).

3. Die Veränderung von Genen und Proteinen, die an der Apoptose-Kontrolle beteiligt sind (so z.B. p53). Das TP53-Gen gehört zur Gruppe der Tumorsuppressorgene und reguliert bei Zellschäden bzw. DNA-Schäden die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest), Apoptoseinduktion oder an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind. Veränderungen von p53 sind häufig bei verschiedenen Tumorentitäten wiederzufinden, so auch bei MPNSTs (Brekke *et al.*, 2009), wodurch diese Zellen keine Apoptose einleiten oder Kontrollpunkte des Zellzyklus nach Beschädigungen nicht eingehalten werden können. Aufgrund dieser Veränderungen der p53-Funktion kann es zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Medikamenten kommen. So zeigen Zellen mit mutiertem *TP53* häufiger Resistenzen als der Wildtyp (Cho *et al.*, 1994; Götz & Montenarh, 1996; O'Connor *et al.*, 1997; Stavrovskaya, 2000). Auch *Pten*-defiziente Zellen sind durch eine Medikamentenresistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen gekennzeichnet (Stambolic *et al.*, 1998; Stavrovskaya, 2000). Das Onkogen *BCL-2* (*B-Cell Lymphoma 2*) gehört zur Gruppe anti- und pro-apoptotischer Proteine. Eine *BCL-2* (anti-apoptotische)-Überexpression zeigte eine Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten (Dive, 1997; Adams & Cory, 1998; Stavrovskaya, 2000).

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Es wird vermutet, dass Tumorstammzellen oder stammzellähnliche Zellen für die Rekurrenz, Metastasierung sowie Therapieresistenz von malignen peripheren Nervenscheidentumoren verantwortlich sind. Auch bei MPNSTs häufen sich Hinweise für die Existenz dieses Zelltyps. Studien zur möglichen Remission von MPNSTs unter medikamentöser Therapie stehen aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Existenz und Rolle von Tumorstammzellen bzw. Zellen mit Stammzellcharakter in der Entwicklung von malignen peripheren Nervenscheidentumoren zu untersuchen. Dabei sollen zum einen die charakteristischen Eigenschaften von Tumorstammzellen von NF1-assoziierten MPNSTs beschrieben werden. Zum anderen gilt es zu prüfen, ob diese Zellen als Zielstruktur innerhalb dieser Tumorentität einer medikamentösen Behandlung zugänglich sind.

Es werden etablierte Zellkulturmethoden für Tumorstammzellen, die in der Literatur beschrieben sind, verwendet, um dissoziierte Zellen aus Tumorfrischmaterial, Primärkulturen sowie aus etablierten MPNST Zelllinien auf Sphärenbildung zu untersuchen. Darüber hinaus sollen Genexpressionsanalysen und Proteinanalysen Aufschluss über die differenzielle Expression von Stammzellmarkern geben. Globale Genexpressionsprofile sollen dazu beitragen differenzierte Tumorzellen und dazu gehörige Tumorstammzellen voneinander zu unterscheiden und näher zu charakterisieren. In Zellkultur-basierten Resistenzprüfungen wird schließlich das potentielle Ansprechen von Tumorstammzellen auf konventionelle Chemotherapeutika geprüft.

Einen weiteren Schwerpunkt der Doktorarbeit bildet die Etablierung von *in vitro* und *in vivo* Modellen. Etablierte Zelllinien sind nicht nur die Grundlage für *in vitro* Studien sondern schaffen auch vielmehr die Möglichkeit der Etablierung geeigneter Mausmodelle beispielsweise zur Prüfung verschiedener Medikamente. Es soll das tumorigene Potential verschiedener etablierter Zelllinien *in vivo* geprüft werden. Dabei soll durch Implantation von Tumorzellen in Mäuse das Wachstumsverhalten sowie das Metastasierungspotential von etablierten Zelllinien, auch unter Berücksichtigung des Stammzellmodells, untersucht werden. Mittels PCR von humanen Markern sowie Biolumineszenz-basierten Methoden soll die Detektion zum Nachweis der Metastasierung von humanen Tumorzellen im *in vivo* Modell etabliert werden.

Ein profunderes Verständnis der molekularen Grundlagen der Tumorbiologie sowie die Klärung der Rolle von Tumorstammzellen stellen wichtige Schritte in Richtung einer gezielten Therapie maligner Neoplasien dar. Die Identifikation potentieller Zielstrukturen und Charakterisierung ihrer Wertigkeit innerhalb des komplexen Gefüges aus Tumor und Umgebungsfaktoren, stellt die Grundlage einer *targeted therapy* dar, die angesichts der infausten Prognose fortgeschrittener MPNSTs notwendig scheint. Darüber hinaus gilt es, einfache Methoden der Detektion von Tumorzellen *in vivo* zu entwickeln, um differenziertere Aussagen über die Subentität und die Prognose von MPNSTs treffen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Tumore

Das verwendete Tumormaterial stammte vorrangig aus dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Eine Einverständniserklärung zur Nutzung des Materials wurde von den betroffenen Patienten eingeholt. Für die Untersuchungen standen 37 Frischgewebeproben zur Verfügung. Eine histopathologische Untersuchung der Proben erfolgte in aller Regel durch die Neuropathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Für die Dignitätseinstufung wurde zum einen das französische Grading-System FNCLCC (*La Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer*) zur Klassifizierung von Weichteilsarkomen herangezogen welches im Wesentlichen auf drei Parametern beruht: der Tumordifferenzierung, dem mitotischen Index und der Tumornekrose (Coindre, 2006) oder zum anderen das Grading-System der *World Health Organization* (WHO) für Weichteilsarkome in Analogie zur FNCLCC Klassifikation.

Die Untersuchung von MPNST Proben schloss auch sog. Triton Tumore mit ein. Triton Tumore werden auch als maligne periphere Nervenscheidentumore mit einer rhabdomyosarkomartigen Differenzierung beschrieben. Drei Kriterien nach Woodruff sollten demnach zutreffen: (1) der Tumor entspringt entlang eines peripheren Nervens, einem Neurofibromatose Typ 1 Patienten, weist eine Lokalisation, welche typisch für einen peripheren Nerventumor ist auf, oder einer Metastase eines solchen Tumors. (2) Wachstumseigenschaften von Schwann-Zellen. (3) Rhabdomyoblasten, die innerhalb des Tumors entspringen aber nicht einer Verlängerung oder Metastase eines extrinsischen Rhabdomyosarkom zugeschrieben werden können (Woodruff *et al.*, 1973; Stasik & Tawfik, 2006). Rhabdomyosarkome gehören zu den häufigsten Beispielen für divergent, differenzierte MPNSTs (Scheithauer *et al.*, 2000; Stasik & Tawfik, 2006).

### 2.2 Zellen

#### 2.2.1 Humane Zelllinien

Folgende Zelllinien sind im Labor der Neurologie/Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bereits etabliert worden:

**Tabelle 2.1:** etablierte MPNST Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaft
S462	etablierte Linie aus einem humanen malignen Nervenscheidentumor; genetisch verifiziert: LOH in <i>NF1</i> & <i>TP53</i> , Nonsense-Mutation in <i>NF1</i> (Frahm <i>et al.</i> , 2004b) sowie Missense-Mutation in <i>TP53</i>
S1507,2	etablierte Linie aus einem humanen malignen Nervenscheidentumor; genetisch verifiziert: LOH in <i>TP53</i>
S1844,1	etablierte Linie aus einem humanen malignen Nervenscheidentumor; genetisch verifiziert: LOH in <i>NF1</i>

### 2.2.2 Primärkulturen

Für die Untersuchung der Sphären-Formation wurden zusätzlich 20 Primärkulturen aus den verwendeten Tumorfrischmaterialien und weitere Kulturen aus der Zellkulturbank in den Passagen 0-11 verwendet.

### 2.3 Kommerzielle Systeme

Kommerzielle Systeme wurden entsprechend den Anleitungen der Herstellerprotokolle angewendet.

**Tabelle 2.2:** Kommerzielle Systeme

Kit	Hersteller
CD133 MicroBead Kit	Milteny Biotec
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
Cell Proliferation XTT	Roche
EZ DNA Methylation Gold Kit	Zymo Research
Fix and Perm Kit	ADG
GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix
GeneChip IVT Express Kit	Affymetrix
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
NucleoSpin RNA XS Kit	Macherey&Nagel
Puregene DNA Isolation Kit	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ventana Roche	Ventana



## 2.4 Software und Datenbanken

Für die Auswertung der Versuche wurden verschiedenste Softwareprogramme verwendet.

Zur Verfassung der Doktorarbeit wurde die *Microsoft Office Mac 2011* Software sowie *Windows Office 2003* verwendet. Für die Erstellung von Diagrammen und Abbildungen wurde *Sigma Plot*, alternativ *Microsoft Office Mac 2011*, verwendet. Statistische Analysen, im Besonderen dem ungepaarten t-Test, erfolgten ebenfalls mit Hilfe von *Sigma Plot*. Die Aufnahme von Zellkulturen wurde mit Hilfe der *Axiovision AC Rel. 4.1 Software* dokumentiert. Für die Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen zur gleichzeitigen Darstellung mehrerer Fluoreszenzebenen diente *Photoshop* als Mac-Version. Die Auswertung der Mikrosatelliten-Analyse wurde mit Hilfe der *GeneScan Analysis Software* durchgeführt. Die Auswertung der globalen Micro-Array Daten wurde durch die klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf ausgeführt. Verwendet wurden die Programme *GeneChip Operating Software* für eine Steuerung der Analyse des Array-Chips sowie anschließend die *GCOS1.4 Software*, um eine erste Sortierung der Daten vorzunehmen (durchgeführt von Kristin Klätschke, klinische Chemie). Weiterführende funktionale Gruppierungen der Micro-Array Daten erfolgten anhand der integrativen *EXPANDER Software* sowie anschließende Signalweganalysen mittels *GenMAPP* (siehe Hinweise 2.4.1) durch Dr. Benjamin Otto, klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Für die Analyse und Auswertung der Durchflusszytometrie stand die Software *BD CellQuest Pro* zur Verfügung sowie die Analyse am *PAS Particle Analyzing System* von Partec. Die Aufnahmen des Biolumineszenz-Imaging wurden mit Hilfe des *IVIS Imaging System 200* durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Sonja Schrepfer ausgewertet. Die Literaturrecherche erfolgte mit Hilfe der Datenbank *National Library of Medicine* unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Weitere Online-Hilfen waren <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> sowie <http://www.genecards.org>, <http://www.affymetrix.com> und [http://www.genmapp.org/tutorial\\_v2.html](http://www.genmapp.org/tutorial_v2.html).

### 2.4.1 Kriterien der Signalweg-Analyse von Micro-Array Daten

Mit Hilfe der *GenMAPP Software* wurden alle differenziell regulierten Gene einer Signalweganalyse unterzogen. Tabelle 2.3 zeigt zunächst die festgelegten Kriterien für die Analyse der Daten. Eine Einteilung der Kandidaten erfolgt anhand der Signal Log Ratio (SLR) und wurde in der Darstellung des Signalweges farblich markiert. So entsprechen rot und rosa markierte Felder hochregulierten Genen, grün und hellgrün markierte Felder herunterregulierten Genen. Blaue Felder zeigen keine veränderte Genexpression auf.

**Tabelle 2.3:** Einteilung der Kandidaten in verschiedene Gruppen entsprechend ihrer SLR.

Farbe	Bedingungen	Kriterium
	SLR > 0,8	(462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Signal Log Ratio) $\geq 0,8$ AND (462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\leq 0,003$
	SLR > 0,01	(462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Signal Log Ratio) $\geq 0,01$ AND (462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\leq 0,003$
	SLR < -0,8	(462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Signal Log Ratio) $\leq -0,8$ AND (462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\geq 0,997$
	SLR < -0,01	(462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Signal Log Ratio) $\leq -0,01$ AND (462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\geq 0,997$
	NC (no change)	(462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\geq 0,003$ AND (462 Sphären P16 vs 462 adhären 16h Change p-Wert) $\leq 0,997$
	No criteria met	

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultivierung

#### 3.1.1 Dissoziation von Tumorfrischmaterial

Frisches Tumorgewebe, transportiert in 1xHBSS (Gibco), wurde nach Erhalt aus dem Operationssaal in einer sterilen Petrischale (Sarstedt) mit sterilem Besteck für die Zellkultivierung vorbereitet. Hierfür wurde überschüssiges Gewebe sowie gesundes, angrenzendes Gewebe vom Tumorgewebe entfernt. Das reine Tumorgewebe wurde in ca. 5x5 mm große Stücke zerkleinert, wobei ein Stück für DNA Analysen bei -80 °C tiefgefroren und ein Stück in 3,5%igem Formaldehyd (BÜFA Chemikalien) für immunhistochemische Analysen fixiert wurde. Das zu kultivierende Gewebe wurde mit Standardkulturmedium (Tab. 3.1) überdeckt und für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator (Heraeus) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch ein Gemisch aus Standardkulturmedium, Collagenase (*Clostridium histolyticum*, Typ 1, Sigma) und Dispase (Bacillus Polymyxa, Gibco) in einer finalen Konzentration von 160 U/ml bzw. 0,8 U/ml ersetzt. Hierfür wurden die Lösungen Collagenase und Dispase zuvor mittels eines Sterilfilters (Sarstedt) sterilisiert. Eine weitere Inkubation erfolgte für ca. 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator. Anschließend wurde das Tumormaterial durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Grundsätzlich erfolgte vor dem Ausplattieren der Zellen eine Filtrierung der Zellsuspension über zwei Filter. Zunächst wurde die Suspension über einen 100 µm Filter (Partec) filtriert, um anschließend über einen engmaschigeren Filter, 50 µm (Partec), aufgereinigt zu werden. Ein Teil der Suspension wurde in Zellkulturflaschen (T25 oder T75, Sarstedt) überführt und durch Kulturmedium ergänzt. Für die Standardkultivierung wurde Standardkulturmedium verwendet, für eine Kultivierung von Schwann-Zellen wurde Schwann-Zellmedium (Tab. 3.2) verwendet. Ein weiterer Teil der Zellsuspension wurde für die Kultivierung unter serumfreien Bedingungen (Tab. 3.3) in 6 Well Ultra Low Attachment Plates (Costar) ausplattiert. Der Rest der Suspension wurde bei 1500 rpm für 5-10 min zentrifugiert (Hettich Rotanta) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Einfriermedium (Standardmedium mit 10% DMSO (Sigma)) vorsichtig gelöst und bei -80°C in Cryogefäßen (Sarstedt) eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in einem Einfriergefäß (Nalgene Cryo 1 C Freezing Container), welches 2-Propanol (Sigma-Aldrich) enthielt.

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung des Standardmediums.

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Endkonzentration/Menge</b>
DMEM (Gibco)	1x
Fötale Kälberserum (FBS) (Gibco)	10%
Fungizone (Gibco)	2,5 µg/ml
L-Glutamin (Gibco)	2 mM
Natriumpyruvate (Biochrom)	1 mM
Penicillin (Gibco)	100 U/ml
Streptomycin (Gibco)	100 µg/ml

Die angesetzten Kulturen wurden dann bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> kultiviert (Heracell 240i, Thermo Scientific). Für die Kultivierung von adhärennten Zellen erfolgte 24 h später der Austausch des Kulturmediums, um verbliebenen Zellschrott zu beseitigen. Bei Bedarf wurde die Flasche mit 1xPBS (Gibco) gewaschen.

### ***3.1.2 Zellkultivierung unter adhärennten Standardbedingungen***

Alle verwendeten Kulturen wurden in T25 oder T75 Zellkulturflaschen angesetzt. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80% erfolgte die Passagierung in neue Zellkulturflaschen. Hierfür wurde das vorhandene, verbrauchte Kulturmedium mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, der Zellrasen mit 1xPBS gewaschen und ebenfalls abgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,05%igem Trypsin (Gibco). Für T25er Kulturflaschen erfolgte die Zugabe von 2-3 ml, für T75er Kulturflaschen die Zugabe von 5 ml Trypsin. Die Flasche wurde für 2-3 min bei Raumtemperatur (RT) oder im Zellinkubator bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes vorsichtiges Abklopfen lösten sich die adhärennten Zellen vom Kulturboden und lagen in Suspension vor. Durch die zusätzliche Zugabe von 3-4 ml bzw. 7-8 ml Standardmedium und dem darin enthaltenen Serum wurde die enzymatische Aktivität des Trypsin aufgehoben und das Suspensionsgemisch mittels einer sterilen Pipette (Falcon) über den Zellrasen gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1500 rpm für 5-10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in einem variablen Volumen resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde in neu vorbereiteten Zellkulturflaschen mit frischem Kulturmedium ausplattiert und bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> kultiviert (Heracell 240i, Thermo Scientific).

### 3.1.3 Zellkultivierung unter Schwann-Zellbedingungen

Die Kultivierung der Schwann-Zellen in Schwann-Zellmedium (Tab. 3.2) erfolgte analog zu den Kultivierungsmethoden unter Standardbedingungen (3.1.2), jedoch mit einigen Modifikationen. Für die Kultivierung von Schwann-Zellen wurden laminierte Zellkulturflaschen (Größe T25, Sarstedt) verwendet. Die vorbehandelten Flaschen wurden nicht kommerziell erworben, sondern selbst hergestellt. Hierfür wurden zunächst 0,5 ml Poly-L-Lysin (1 mg/ml; 0,01% Solution; Sigma) in den Flaschen durch Schwenken für 5 min vorgelegt. Anschließend wurden die Flaschen mit sterilem, destilliertem Wasser (Baxter) drei Mal gespült, das Wasser abgesaugt und die Flaschen mit leicht angeschraubten Deckeln getrocknet (über Nacht). Am darauffolgenden Tag wurden pro Flasche 1,5 ml Laminin (*Natural-Mouse Laminin*, Invitrogen) in einer finalen Konzentration von 4 µg/ml, verdünnt in 1xPBS, hinzugegeben und für mindestens 2 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Laminin abgesaugt und die Flaschen drei Mal mit 1xPBS gewaschen. Die Flaschen standen dann für die Kultivierung von Schwann-Zellen aus plexiformen Neurofibromen oder malignen Nervenscheidentumoren zur Verfügung. Eine Lagerung der Flaschen konnte durch Zugabe von 4 ml 1xPBS pro Flasche für max. 2 Wochen bei 4°C erfolgen.

**Tabelle 3.2:** Zusammensetzung des Schwann-Zellmediums.

Inhaltsstoffe	Endkonzentration
Standardmedium (Tab. 3.1)	1x
Heregulin (zur Verfügung gestellt von Steven Caroll)	50 nM
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) (Sigma)	0,5 mM
Insulin (Sigma)	2,5 µM

### 3.1.4 Fibroblasteneliminierung

Da eine Kultivierung von Schwann-Zellen oft mit dem Wachstum von Fibroblasten einhergeht, können diese mittels einer Fibroblasteneliminierung aus der Primärkultur beseitigt werden. Hierfür wurden die Zellen für die Passagierung entsprechend den Angaben unter 3.1.2 trypsiniert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 4-5 ml Schwann-Zellmedium aufgenommen und die Zellsuspension in eine nicht-laminierte Flasche übertragen (meist T25). Die Flasche wurde für 30-45 min in den Inkubator zurückgestellt (37°C, 10% CO<sub>2</sub>) und so lange inkubiert bis die Fibroblasten anfangen zu adhären (Beobachtung alle

15-20 min am Mikroskop). Anschließend wurde das Medium mit den darin enthaltenen Schwann-Zellen wieder abgenommen und die Suspension für eine fortlaufende Kultivierung in eine frisch laminierte Flasche umgesetzt.

### ***3.1.5 Zellkultivierung unter Stammzellbedingungen***

Die Kultivierung unter Stammzellbedingungen diente zur Prüfung des Vorhandenseins von Tumorstammzellen oder stammzellähnlichen Zellen aus Tumorfrischmaterial, Primärkulturen und etablierten Zelllinien. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen in 6 Well Ultra Low Attachment Platten in einem Kultivierungsvolumen von 2 ml pro Well. Für das Wachstum der Zellen als sog. Sphären wurde eine definierte Zellzahl mittels Zählung im Hämocytometer (Carl Roth) bestimmt und anschließend eine Zelldichte zwischen 100 und 1.000-10.000 Zellen pro Well je nach Abhängigkeit der Zellprobe pro Well ausplattiert. Für die etablierte Zelllinie S462 wurde eine Zelldichte von 100 Zellen pro Well gewählt. Alle weiteren Kulturen wurden zu 1.000-10.000 Zellen pro Well bzw. zu Beginn der Kultivierung in den ersten Passagen ohne Bestimmung der Zellzahl ausplattiert.

Eine Versorgung mit frischem Medium erfolgte zweimal wöchentlich durch Zugabe von 200-300 µl Stammzellmedium. Eine Passagierung der Zellen erfolgte durch Überführung der Zellsuspension aus den Wells in ein 15 ml Gefäß (Falcon). Die Suspension wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde anschließend in 1-2 ml Stammzellmedium resuspendiert. Hierbei erfolgte die mechanische Dissoziation der Sphären durch Auf- und Abpipettieren. Falls eine mechanische Dissoziation nicht möglich war und die Sphären mikro- und makroskopisch noch sichtbar waren, wurden die Proben erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1-2 ml 0,05%igem Trypsin gelöst. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2-3 min bei 37°C im Wasserbad wurde die Suspension erneut durch mechanisches Auf- und Abpipettieren dissoziiert und die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Standardmedium aufgehoben. Die dissoziierten Sphären wurden erneut zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1-2 ml Stammzellmedium (Tab. 3.3) gelöst, die Zellzahl mittels eines Hämocytometers bestimmt oder aber eine unbestimmte Zellzahl in neu vorbereitete 6 Well Ultra Low Attachment Platten in einem Volumen von 2 ml pro Well ausplattiert. Ein Teil der Einzelzellsuspension wurde gegebenenfalls bei -80°C in Cryogefäßen eingefroren (siehe 3.1.1). Vor jeder Passagierung der Sphären erfolgte eine digitale Fotoaufnahme der Zellen. Hinweis: Initial wurde zum Nachweis von Tumorstammzellen als Grund-

medium DMEM/F12 (Gibco) ohne N2 Supplement und L-Glutamin verwendet und letztlich durch die Zusammensetzung in Tabelle 3.3 ersetzt.

**Tabelle 3.3:** Zusammensetzung des Stammzellmediums.

Inhaltsstoffe	Endkonzentration
B-27 Supplement (Gibco)	1%
Epidermal Growth Factor (EGF) (R&D)	20 ng/ml
Fibroblast Growth Factor (FGF-2) (PeproTech)	20 ng/ml
Fungizone (Gibco)	2,5 µg/ml
Heparin (Ratiopharm)	32 IE/ml
L-Glutamin (Gibco)	2 mM
N2 Supplement (Gibco)	1%
Neurobasalmedium (Gibco)	1x
Penicillin (Gibco)	100 U/ml
Streptomycin (Gibco)	100 µg/ml

### 3.2 Proliferations- und Viabilitätsassays

Alle Proliferations- und Viabilitätsassays wurden in 96 Multiwell-Platten (Sarstedt) durchgeführt. Sie dienen zur Bestimmung der Proliferationsinhibition nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen. Verwendet wurden hierfür der BrdU Incorporationsassay (Roche) sowie der XTT Assay (Roche).

Für die Durchführung von Proliferations- und Viabilitätsassays an adhärenen S462 Zellen und S462 Sphären wurden zwischen 250 und 500 Zellen pro Well ausplattiert und in einem Volumen von 100 µl Standardmedium bzw. Stammzellmedium über Nacht bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator inkubiert. Die Zellen aus der adhärenen S462 Kultur wurden hierfür zuvor mittels 0,05%igem Trypsin vom Zellkulturboden gelöst, für 2-3 min bei 37°C im Inkubator inkubiert und anschließend die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Standardmedium inaktiviert. Die Suspension wurde in ein 15 ml Gefäß überführt, für 5-10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen zur Zellzahlbestimmung im Hämocytometer gelöst. Die S462 Sphären wurden ebenfalls in ein 15 ml Gefäß überführt, zentrifugiert und anschließend das Pellet in Stammzellmedium gelöst. Für die Ausplattierung wurden die Sphären mechanisch dissoziiert und nach erfolgter Zellzahlbestimmung auf Multiwell-Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Hierbei wurden dem Medium die ent-

sprechend zu testenden Substanzen zugefügt. Die getesteten Substanzen sind in den verwendeten Konzentrationen nachstehend in der Tabelle 3.4 aufgezeigt. Jede zu testende Konzentration wurde in der Regel zu je 12 Replikaten ausplattiert.

**Tabelle 3.4:** Verwendete Substanzen der Proliferations- und Viabilitätsassays

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Doxorubicin (Hydroxyldaunorubicin)	0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 (ng/ml)
Ifosfamid (HoloXan)	0,25; 0,5; 0,75; 1,0 (mg/ml)
Plerixafor (AMD3100)	0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 (µg/ml)
Temozolomid (Temodal)	1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 30,0 (µg/ml)

Ein weiterer vollständiger Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Nach einer Inkubationszeit von 9-12 Tagen, in Abhängigkeit der Zelldichte auf den einzelnen Wells erfolgte, die Auswertung der Multiwell-Platten. Die Durchführung der Proliferations- und Viabilitätsassays entsprach dabei den Angaben aus den Herstellerprotokollen. Die Auswertung der Platten erfolgte am ELISA Reader (Bio-Rad).

### 3.3 Immunfärbungen

#### 3.3.1 Immunzytochemie

*Verwendete Antikörper: NGFR (p75) und S100*

Die Zellen wurden in einer 8 Well-Kammer (Nunc) mit 0,5 ml Medium ausgesät und kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen drei Mal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd (Sigma) für 10 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 1xPBS erneut drei Mal gewaschen und mit 10% Goat Serum (Dako) in 1xPBS für 15-30 min geblockt. Die Blockierung mit Serum diente zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des spezifischen Antikörpers. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten primären Antikörpers NGFR (Mouse anti-human NGFR, monoklonal, BD Pharmingen) in einer Verdünnung von 1:200 für 2 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C). Nach der Inkubation des ersten primären Antikörpers wurden die Zellen erneut drei Mal mit 1xPBS gewaschen und der erste sekundäre Antikörper Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor 568 Goat anti-Mouse IgG, Invitrogen), 1:1000 verdünnt in Standardmedium und unter Lichtschutz auf die Zellen gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 1xPBS gewaschen und in absolutem, eiskalten Methanol für 7 Minuten zur Permeabilisierung für den zytoplasmatischen Antikörper S100



(Schwanzzell-Marker, Scarpini *et al.*, 1986) fixiert. Anschließend wurden die Zellen abermals gewaschen (1xPBS, drei Mal) und mit einer serumfreien Proteinblocker-Lösung (ready-to-use, Dako) für 15-30 min geblockt. Daraufhin wurde der zweite primäre Antikörper S100 (Rabbit anti-human S100, polyklonal, Dako) in einer Verdünnung von 1:500 hinzupipettiert und für 2 h bei RT inkubiert sowie gewaschen (1xPBS, drei Mal). Des Weiteren erfolgte die Zugabe des zweiten sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG, Invitrogen), 1:1000 verdünnt in Standardmedium und unter Lichtschutz mit anschließender Inkubation für 2 h bei RT. Nach erfolgter Antikörperinkubation wurden die Zellen erneut gewaschen (1xPBS, drei Mal). Die Zugabe des Mounting Mediums ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) erfolgte durch Tröpfchenzugabe. Hierfür wurde zunächst das Kammerkonstrukt entfernt. Fixiert wurde die Färbung zusätzlich durch das Abdecken des Präparates mit einem Deckglas. Alle Arbeitsschritte ab Zugabe des sek. Antikörpers erfolgten im Dunkeln bzw. ohne direkte Lichteinstrahlung. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Mikroskop Axioskop (AxioCam MRc 5) von Zeiss mit Hilfe des Programms *Axiovision AC Rel. 4.1*.

### **3.3.2 Immunhistochemie**

Verwendet wurden für die Färbung Paraffinschnitte gesammelter Gewebeproben von Patienten mit plexiformen Neurofibromen bzw. malignen Nervenscheidentumoren. Die Tumorproben wurden in der Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf bei Herrn Prof. Dr. Hagel in Paraffinblöcke gegossen. Das Anfertigen der Paraffinschnitte erfolgte auch in der bzw. durch die Neuropathologie. Die Färbungen der histologischen Schnitte wurden in automatisierten Systemen durch Mitarbeiter von Prof. Dr. Hagel der Neuropathologie durchgeführt. Vorteil der automatisierten Färbung ist die Standardisierung der Färbung an mehreren Schnitten gleichzeitig und die Einsparung von Reagenzien, wie bei beispielsweise Antikörpern.

Verwendet wurde das automatisierte Färbesystem Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) für die aufgeführten Antikörper (Tab. 3.5). Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Ventana Detection Kits (Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ventana Roche 760 500) nach Angaben des Herstellerprotokolls. Einige Proben wurden einer Vorbehandlung unterzogen, die zusammen mit den Antikörperverdünnungen nachstehend in der Tabelle 3.5 aufgeführt sind. Die Vorbehandlungen sind Standardbehandlungen in der

Ventana. Die Hämatoxylin-Eosin Färbungen wurden ebenfalls in der Neuropathologie durchgeführt. Verwendet wurden hierfür Standardprotokolle.

**Tabelle 3.5:** monoklonale Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antikörper/ Reaktivität	Spezies	Quelle	Target	Referenz	Vor- behandlung	Ver- dünnung
Human Anti-CD34 Class 2	Maus IgG1, mono- klonal	Dako	Marker für Beispiels- weise hämatopoeti- sche Stammzellen, MPNSTs	Nielsen & McNagny, 2008; Naber <i>et al.</i> , 2011	30 min Citratpuffer	1:100
Human Anti- NCAM (CD56)	Maus IgG1, mono- klonal	Zyteded	Marker für natürliche Killerzellen, neuro- nale Zellen, Muskel- zellen sowie Tumore	Jensen & Berthold, 2007; Battula, 2009	60 min Citratpuffer	1:2000
Human Anti-CD133/1	Maus IgG1, mono- klonal	Miltenyi Biotec	Marker für hämatopo- etische Stammzellen, Vorläuferzellen des Knochenmarks u.a. oder neuronale Stammzellen	Singh <i>et al.</i> , 2003; Kania <i>et al.</i> , 2005	60 min EDTA	1:100
Human Anti- EGFR	Maus IgG1, mono- klonal	Dako	reguliert Proliferation und Migration von neuronalen Vorläufer- zellen	Aguirre <i>et al.</i> , 2010	8 min Protease	1:100
Anti-Nestin	Maus IgG1, mono- klonal	Millipore	Marker für multipo- tente neuronale Stammzellen	Park <i>et al.</i> , 2010	30 min Citratpuffer	1:50
Anti-NGFR (p75)	Maus IgG1, mono- klonal	Santa Cruz	Marker für Schwann- Zellen und Neuronen	DiStefano <i>et al.</i> , 1993	keine	1:100
Human Anti- Sox9	Maus IgG2a, mono- klonal	Abnova	potentieller Biomar- ker für MPNST und Marker für neuronale Stammzellen	Miller <i>et al.</i> , 2009; Scott <i>et al.</i> , 2010	60 min Citratpuffer	1:200

### 3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Immunphänotypisierung, die auf einer extra- und intrazellulären Färbung der zu untersuchenden Zellen mit direkt oder indirekt markierten Antikörpern basiert. Die so markierten Zellen können am Durchflusszytometer analysiert werden. Das Gerät detektiert mit Hilfe eines Lasers die zuvor vorgegebene Fluoreszenz des Antikörpers, ferner wird über ein Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) und ein Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) die Größe und Granularität der zu untersuchenden Zellen dargestellt, so dass Zellpopulationen erkennbar werden können. Analysiert werden kann so unter anderem, ob die jeweilige Expression für das zu untersuchende Protein vorliegt. Weiter kann so für verschiedene Zellproben dargestellt werden, wie hoch der Anteil für das entsprechende Protein ist.

#### 3.4.1 Extrazelluläre Färbung zur Analyse am Durchflusszytometer

Für die Färbung der Zellen mit extrazellulären Markern wurden jene zunächst trypsiniert (3.1.2) und in ein 15 ml Reagiergefäß pipettiert. Die S462 Sphären wurden aus den 6 Well Ultra Low Attachment Platten entnommen und ebenfalls in ein vorbereitetes 15 ml Reagiergefäß überführt. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 1xPBS gewaschen und erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1xPBS mit 2% FBS gelöst und zu je 100 µl Aliquots in 15 ml Reagiergefäße mit je  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen aliquotiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen Antikörper für extrazelluläre Proteine. In der nachstehenden Tabelle 3.6 sind die jeweils verwendeten Oberflächenmarker und deren zu pipettierenden Volumina pro 100 µl Aliquot wiedergegeben. Zusätzlich sind die Isotypen Kontrollen aufgelistet, die es ermöglichen unspezifische Bindungen aufzuzeigen. Es wurden Einzelfärbungen angesetzt. Die Messungen der Proben erfolgten am Durchflusszytometer BD Bioscience FACS Calibur (Becton Dickinson).

**Tabelle 3.6:** Direkt konjugierte extrazelluläre Antikörper der Durchflusszytometrie.

Antikörper/ Reaktivität	Spezies	Quelle	Target	Referenz	Volumen ( $\mu$ l)
Human CD24 Phycoerythrin	Maus IgG1, mono- klonal	Beckman Coulter	Marker unreifer Zellen oder entwickelnder Neuronen	Rougon <i>et al.</i> , 1991; Nedelec <i>et al.</i> , 1992; Shirasawa <i>et al.</i> , 1993	10
Human CD34 Phycoerythrin	Maus IgG1, mono- klonal	BD	Marker für hämatopoetische Stammzellen, MPNSTs u.a.	Nielsen & McNagny, 2008; Naber <i>et al.</i> , 2011	10
Human CD34 Fluorescein Isothiocyanat	Maus IgG1, mono- klonal	BD			10
Human NCAM Fluorescein Isothiocyanat	Maus IgG2b, mono- klonal	BD	Marker für natürliche Killerzellen, neuronale Zellen und Muskelzellen	Jensen & Berthold, 2007; Battula, 2009	10
Human NCAM Phycoerythrin- Cyanin 5	Maus IgG1, mono- klonal	BD			5
Human NCAM Phycoerythrin- Cyanin 7	Maus IgG1, mono- klonal	BD			5
Human CD90 Phycoerythrin- Cyanin 5	Maus IgG1, mono- klonal	Beckman Coulter	Marker für verschiedene Stammzellen oder Neuronen und Fibroblasten	Kisselbach <i>et al.</i> , 2009; True <i>et al.</i> , 2010	5
Human CD133/2 Phycoerythrin	Maus IgG2b, mono- klonal	Miltenyi Biotec	Marker für hämatopoetische Stammzellen, Vorläuferzellen des Knochenmarks u.a. oder neuronale Stammzellen	Singh <i>et al.</i> , 2003; Kania <i>et al.</i> , 2005	10
Human NGFR Fluorescein Isothiocyanat	Maus IgG1, mono- klonal	Miltenyi Biotec	Marker für Schwannzellen und Neuronen	DiStefano <i>et al.</i> , 1993	10
Human ABCG2 Phycoerythrin	Maus IgG2b, mono- klonal	eBio- science	Marker für Tumorstammzellen	Dean <i>et al.</i> , 2005; Abbott, 2006	10

Fortsetzung Tabelle 3.6:

Antikörper	Spezies	Quelle	Volumen (µl)
Isotyp Kontrolle Fluorescein Isothiocyanat	Maus IgG1	Beckman Coulter	10
Isotyp Kontrolle Phycoerythrin	Maus IgG1	Beckman Coulter	10
Isotyp Kontrolle Phycoerythrin- Cyanin 5	Maus IgG1	Beckman Coulter	5
Isotyp Kontrolle Phycoerythrin- Cyanin 7	Maus IgG1	Beckman Coulter	5

### 3.4.2 Intrazelluläre Färbung zur Analyse am Durchflusszytometer

Für die Färbung der Zellen mit intrazellulären Markern wurde das Fix&Perm Kit von ADG verwendet. Dabei wurden die Zellen zunächst trypsiniert (3.1.2). Die S462 Sphären wurden aus den 6 Well Ultra Low Attachment Platten entnommen und ebenfalls in ein 15 ml Reagiergefäß überführt. Die Zentrifugation der Proben erfolgte bei 1500 rpm für 5-10 min. Anschließend wurden die Pellets in 1xPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Pellet in 100 µl Fixierungslösung A fixiert (entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls). Die Fixierung erfolgte bei RT für 15 min. Anschließend wurden 5 ml 1xPBS hinzugegeben und die Zellen erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in der Permeabilisierungslösung B resuspendiert. Das Volumen ist dabei abhängig von der Anzahl der anzusetzenden Färbungen. Pro Probe wurden 100 µl gelöst. Die Suspension wurde somit zu je 100 µl Ansätzen ( $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen) aliquotiert und der entsprechende Antikörper hinzugegeben. Nach der Inkubation mit dem jeweils konjugierten Antikörper (Angaben Hersteller) wurden die Zellen mittels 1xPBS gewaschen und im Puffer für die Durchflusszytometrie nach Zentrifugation (1500 rpm, 5-10 min) gelöst. Die entsprechenden Volumina der intrazellulären Antikörper sowie die Isotypen Kontrollen sind in der nachstehenden Tabelle 3.7 aufgeführt. Alle Messungen erfolgten am BD Bioscience FACS Calibur (Becton Dickinson).

**Tabelle 3.7:** Direkt konjugierte intrazelluläre Antikörper der Durchflusszytometrie.

Antikörper/ Reaktivität	Spezies	Quelle	Target	Referenz	Volumen ( $\mu$ l)
Human/Mouse Oct-3/4 Fluorescein	Ratte IgG2b, mono- klonal	R&D Systems	Marker für multi- potente neuronale Stammzellen	Rosner <i>et al.</i> , 1990; Park <i>et al.</i> , 2010	10
Human/Mouse Sox2 Phyco- erythrin	Maus IgG2a, mono- klonal	R&D Systems	Marker pluripotenter Stammzellen sowie Tumorstammzellen; Marker für neuronale Vorläuferzellen	Graham <i>et al.</i> , 2003; Ellis <i>et al.</i> , 2004; Leis <i>et al.</i> , 2012	10
Human Nestin Fluorescein	Maus IgG1, mono- klonal	R&D Systems	Marker für neuronale Stammzellen	Park <i>et al.</i> , 2010	10
Isotyp Kontrolle Fluorescein Isothiocyanat	Maus IgG1	Beckman Coulter			10
Isotyp Kontrolle Phycoerythrin	Maus IgG1	Beckman Coulter			10

### 3.5 Side Population-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Analyse der *Side Population* wurde eine Zellfärbung mittels Hoechst 33324 Dye (1 mg/ml, Sigma) in Kombination mit und ohne Verapamil hydrochlorid (Sigma), einem Blocker gegen den Effluxtransporter ABCG2, durchgeführt. Neben seiner charakteristischen Eigenschaft eines Effluxtransporters für spezifische Zytostatika schleust ABCG2 den Farbstoff Hoechst 33324 aus der Zelle hinaus. Um das Vorhandensein einer *Side Population* zu prüfen, wurden hierfür die adhärenenten S462 Zellen zunächst trypsiniert (3.1.2). Es wurde anschließend eine Zelldichte von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml DMEM/2% FBS/10 mM HEPES (Gibco) mittels Zellzahlzählung im Hämocytometer eingestellt. Das Suspensionsmedium muss auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt sein sowie das Wasserbad eine konstante Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  aufweisen sollte. Zunächst erfolgte die Zugabe von Verapamil zu einer Endkonzentration von  $50 \mu\text{M}$ . Es wurde anschließend zu den einzelnen Proben Hoechst 33324 zu einer Endkonzentration von 5 und  $10 \mu\text{g/ml}$  mit und ohne Verapamil hinzu pipettiert. Die Zellsuspension wurde für 15-20 min im Wasserbad inkubiert, anschließend erfolgte die weitere Zugabe von Hoechst 33324 in den

angegebenen Mengen. Die Proben wurden nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren in das Wasserbad bei 37°C zurückgestellt. Ein erneutes Auf- und Abpipettieren erfolgte alle 15-20 min für 120 min. Anschließend wurden die Proben bei 4°C für 5-10 min bei 1500 rpm zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in kaltem HBSS/2% FBS/10 mM HEPES resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend gefiltert (30 µm, Partec) und sofort am Durchflusszytometer (PAS Particle Analyzing System, Partec) gemessen. Für die Messung von Hoechst 33324 wurde ein DAPI Filter ausgewählt.

### **3.6 Mikrosatellitenanalyse**

Mikrosatellitenmarker sind kurze repetitive Sequenzen, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Eine große Vielzahl dieser repetitiven Sequenzen ist über das gesamte Genom verteilt und macht eine Unterscheidung beider Allele möglich (Kluwe, 2006). Ein Mikrosatellitenmarker kann mit flankierenden Primern mittels PCR amplifiziert und untersucht werden.

#### **3.6.1 Mikrosatellitenanalyse an *NF1*, *p53* und *p16***

In dieser Studie wurden Marker für die Tumorsuppressorgene *NF1*, *TP53* und *CDKN2A* verwendet (Tab. 3.8). Aus Leukozyten-, Tumor- und Zellproben wurde DNA präpariert (Gentra Puregene DNA Isolation Kit, Angaben Herstellerprotokoll). Der PCR-Ansatz für einen Marker wurde in 0,5 ml Microtube 96er PCR-Multiwell-Platten (Biozym) wie in Tabelle 3.9 beschrieben zusammengesetzt. Die verwendeten Primerpaare trugen eine einseitige Fluoreszenzmarkierung, die eine Detektion der PCR-Produkte mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers (*ABI Prism 310 Genetic Analyzer*) ermöglichte. Die Größe eines amplifizierten Markers wurde anhand eines internen Größenstandards ermittelt und dargestellt (*GeneScan Analysis Software*). Die unterschiedlichen Fluoreszenzfarben und Größen der PCR-Produkte ermöglichten Untersuchungen von mehreren Produkten in einem Lauf.

**Tabelle 3.8:** Mikrosatellitenmarker

Marker	Größenbereich (bp)	Label	PCR Annealing Temp.	Lokalisation	Primersequenz
M98509	235-266	6-Fam	60	NF1-IVS27a, 17q	TGAGAGGCCAAGGTGAGAAATTG CCTCCCAAAATGCTGGGATTACAG
IVS27AAAT2.1	367-383	6-Fam	60	NF1-IVS27b, 17q	GCATGGTGGCACATACCTGT GTCAGCACCTGGAACATATCAA
IVS27TG24.8	236-258	Tamra	60	NF1-IVS38, 17q	TAATCCGAGCTACTTGAGAGGC TCTAACCCTGTTGCTACATAGGGAAT
IVS27CA28.4	199-211	Hex	60	NF1-IVS27b, 17q	TCAGTTCAGCTTGCCTTAGAAA CAAGCAGGTGAGACAGGGAGAA
IVS27AC33.1	129-163	6-Fam	62	NF1-IVS27b, 17q	CAGAAAATGCTTTCGTGTGGTG CCGTGTTTACGCCATACCTAGT
IVS38GT53.0	166-182	Hex	61	NF1-Intron 38	AGAGCAAGACCCTGTCTCCAAAAA AACATTTATTAACCTTAATTGGAGTTGGA
NF-3'-1	184-198	Fam	62	NF1 distal, 17q	AAGCTTCCATGGCTGCTAACAT GGCAGTTGGAAGTAGAGGCTTG
D17S520	130-144	Joe	55	17p	GGAGAAAGTGATACAAGGGA TAGTTAGATTAATACCCACC
D17S796	144-174	6-Fam	55	17p	CAATGGAACCAAATGTGGTC AGTCCGATAATGCCAGGATG
D17S804	156-170	Joe	55	17p	GCCTGTGCTGCTGATAACC CACTGTGATGAGATGTCATTCC
P53ivs1	ca. 400	Tamra	55	17p	AACAGCTCCTTTAATGGCAG GCACTTTCCTCAACTCTACA
D9S168	227-247	Tamra	55	9p	GGTTTGTGGTCTTTGTAAGG TGGTTTGTGGTATAACTATCATTG
D9S171	157-179	6-Fam	55	9p	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT
D9S157	120-135	6-Fam	55	9p	AGCAAGGCAAGCCACATTTCT TGGGGATGCCAGATAACTATATC
GAPDH-like Isoform 2	207	6-Fam	60	Chr. Y	AAGGGCTCATGACCACAGTC ACACATTGGGGGTAGGAACA



**Tabelle 3.9:** Zusammensetzung der Mikrosatelliten-PCR

Zusammensetzung der Mikrosatelliten-PCR	Volumen ( $\mu$ l)
AccuPrime Supermix II (Invitrogen)	5
<b>Primer (Invitrogen):</b>	<b><u>0.5 - 2</u></b>
DNA Template	2
H <sub>2</sub> O	auf 10

PCR-Programm:

1. Initiale Denaturierung	94°C	2 min		
2. Denaturierung	94°C	30 sec	}	30 sec    30 Zyklen
<b>3. Annealing</b>	<b>55-62°C</b>			
4. Extension	68°C	1 min		
5. finale Extension	68°C	10 min		
6. Pause	10°C	$\infty$		

Die gepoolten PCR-Produkte wurden in 30  $\mu$ l Formamid (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) und 0,2  $\mu$ l Standard (GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) in einer 96 Multiwell-Platte (96 Multiply PCR Platte, natur, Sarstedt) pro Ansatz vorgelegt. Nach 2 min Erhitzung bei 90°C im Thermocycler (T Gradient oder T3 Thermocycler, Biometra) zur Denaturierung und einer sofortigen Kühlung auf Eis wurden die Proben im Sequenzierer untersucht.

**3.6.2 Metastasennachweis mittels Mikrosatelliten-PCR**

Für den Nachweis von metastasierenden Zellen in Mäusen wurden den Tieren Gewebeproben wie Lymphknoten, Milz, Niere oder Leber nach der Euthanisierung entnommen. Um das Vorhandensein von humanen Zellen in den Mausgewebeproben als Nachweis der Metastasierung von humanen Tumorzellen zu prüfen, erfolgte eine PCR Amplifikation mittels humaner Mikrosatelliten (siehe Tab. 3.8).

Zur Verfügung standen die NF1 Mikrosatellitenmarker welche humane DNA amplifizieren, jedoch keine Maus-DNA. Da die Gewebeproben aus Tierversuchen stammten für die ausschließlich die etablierte Zelllinie S462 verwendet wurde, konnte anhand der Mikrosatelliten-

PCR nicht nur der Nachweis von humanen Zellen, sondern speziell auch der Nachweis der Zelllinie S462 erfolgen, da auch originale Tumorproben-DNA sowie Zell-DNA zur Verfügung standen. Als Kontrolle der DNA-Qualität sowie als Nachweis von muriner DNA wurde ein mausspezifischer Marker für das Haushaltsgen GAPDH verwendet (Tab. 3.8). Für die Analyse wurden die NF1 Marker IVS27TG24.8, M98509 und NF-3'-1 verwendet (Mikrosatelliten-PCR-Zusammensetzung und PCR-Programm siehe Tab. 3.9).

### 3.7 Methylierungs-PCR

Die Methylierungs-PCR diente zum Nachweis unmethylierter oder methylierter Genabschnitte. Dabei setzte sich der Nachweis aus mehreren Umwandlungs- und Amplifikationschritten zusammen. Um einen Nachweis von methylierten oder unmethylierten Regionen zu bestimmen, wurde die zu untersuchende DNA zunächst denaturiert und anschließend einer Bisulfit Conversionsreaktion unterzogen. Hierbei wurden unmethylierte Cytosin-Reste zu Uracil umgewandelt, methylierte Cytosinreste blieben unverändert. Verwendet wurde das EZ DNA Methylation Gold Kit von Zymo Research. Die Primer (Tab. 3.10) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Leticia Oliveira-Ferrer aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3.10:** Verwendete Methylierungs-Primer.

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz</b>
MGMT flank F	GYGTTTYGGATATGTTGGGATAGTT
MGMT flank R	AAACTCCRCACTCTTCCRAAAAC
MGMT unmet-F	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT
MGMT unmet-R	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAAACA
MGMT met-F	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC
MGMT met-R	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG

#### 3.7.1 CT Conversion

500 ng genomische DNA wurden in einem Volumen von 20 µl mit 130 µl CT Conversion Reagenz (Zymo Research) vermischt und für 10 min bei 98°C sowie anschließend für 2,5 h bei 64°C inkubiert. Fortlaufend wurde die Probe auf eine mit 600 µl M-Binding Buffer (Zymo Research) vorgelegte Zymo-Spin IC Säule aufgetragen und durch Invertieren vermischt. Die Probe wurde bei 10.000 x g für 30 sec zentrifugiert (Hettich Mikro 200R) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 100 µl M-Wash Buffer (Zymo Research) hinzugegeben und erneut für 30 sec zentrifugiert. Die Probe wurde danach einer Desulphonierung unterzogen.

Hierfür wurden je 200 µl M-Desulphonation Buffer (Zymo Research) auf die Säule gegeben und bei RT für 15-20 min inkubiert. Die Säule wurde erneut für 30 sec zentrifugiert und zweimal mit M-Wash Buffer gewaschen und jeweils für 30 sec zentrifugiert. Zuletzt wurde die Zyto-Spin IC Säule in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt und durch Zentrifugation für 30 sec mittels 10 µl M-Elution Buffer (Zymo Research) eluiert.

### 3.7.2 Flankierende PCR

Das Eluat wurde in eine flankierende PCR eingesetzt, um den zu analysierenden Bereich näher einzugrenzen. Verwendet wurde die Zymo Taq DNA Polymerase (Zymo Research) in einem 50 µl Ansatz (Tab. 3.11).

**Tabelle 3.11:** Zusammensetzung der flankierenden PCR

Zusammensetzung	Volumen (µl)
2x Reaction Buffer	25
dNTP Mix (0,25 mM je dNTP)	0,5
MGMT flank F Primer (10 µM)	5
MGMT flank R Primer (10 µM)	5
Eluat (DNA Template)	1
Zymo Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,4
ddH <sub>2</sub> O	auf 50

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation im Thermocycler (Biometra) gewählt:

#### PCR-Programm:

1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
2. Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 Zyklen
3. Annealing	56°C	30 sec	
4. Extension	72°C	45 sec	
5. finale Extension	72°C	7 min	

Für die erste flankierende PCR wurde der Genabschnitt um die Promoterregion des O-6-Methylguanin-Methyltransferase-Gens amplifiziert. An die flankierende PCR schloss sich die Aufreinigung der PCR-Produkte an. Verwendet wurde das Aufreinigungskit Illustra GFX

PCR DNA and Gel Band Purification von GE Healthcare entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls.

### 3.7.3 Gelelektrophorese

Eine Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Die DNA-Moleküle wurden hierbei in einem 2%igem Agarosegel (Invitrogen) entsprechend ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt (iMy Run, Cosmo Bio; Helixx Technologies). Dabei "wandert" die negativ geladene DNA in einem gepufferten System (0,5 x TBE, Gibco) zur positiv geladenen Anode. Eine anschließende Färbung des Agarosegels mit dem DNA-interkalierenden Stoff Ethidiumbromid (1%, 10 mg/ml, Carl Roth) ermöglichte unter dem UV-Licht (Model TM-20, San Gabriel) die Visualisierung der PCR-Produkte. Für die Größenbestimmung der Produkte wurde eine DNA Leiter verwendet (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche).

### 3.7.4 PCR zum Methylierungsnachweis

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in eine weitere PCR mit Primern des Methylierungsnachweises eingesetzt (Tab. 3.10 & 3.12). Die Primer wurden auch hier freundlicherweise von Frau Dr. Leticia Oliveira-Ferrer aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3.12:** Zusammensetzung der Methylierungs-PCR

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Volumen (µl)</b>
2x Reaction Buffer	25
dNTP Mix (0,25 mM je dNTP)	0,5
MGMT unmet /met F Primer (10 µM)	5
MGMT unmet/met R Primer (10 µM)	5
Eluat (DNA Template)	2
Zymo Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,4
ddH <sub>2</sub> O	auf 50

PCR-Programm:

1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
2. Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 Zyklen
3. Annealing	59°C	30 sec	
4. Extension	72°C	45 sec	
5. finale Extension	72°C	7 min	

Die PCR-Produkte wurden für die Versuchsauswertung anschließend wieder in einem 2%igem Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid visualisiert und dokumentiert.

### 3.8 Genexpressionsanalysen

Genexpressionsanalysen wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob sich Sphären in ihrer Expression von Stammzellmarkern von differenzierten Tumorzellen unterscheiden. Verwendet wurden hierfür effiziente und validierte Genexpressionsassays der Firma Applied Biosystems. Zellen unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen wurden hierfür geerntet und gegebenenfalls direkt einer RNA Isolierung unterzogen oder das Zellpellet zunächst bei -80°C asserviert.

#### 3.8.1 RNA Isolierung und Quantifizierung

Die RNA Isolierung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey & Nagel). Die Durchführung entsprach dabei den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Elutionsvolumina betragen 10 µl. Die anschließende RNA Quantifizierung wurde anhand des Qubit Fluorometers (Invitrogen) oder mittels NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) durchgeführt. Auch hier erfolgte die Bestimmung je nach Angaben des Herstellerprotokolls.

#### 3.8.2 cDNA Synthese

Für die anschließende cDNA Synthese wurde eine RNA Menge zwischen 50-500 ng verwendet. Durchgeführt wurde die cDNA Synthese unter der Sterilbank, wobei das RevertAid First Strand Synthese Kit von Fermentas verwendet wurde (Tab. 3.13 & 3.14). Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Verwendet wurden die beigefügten Random Hexamer Primer.

**Tabelle 3.13:** Zusammensetzung der cDNA Synthese, 1. Schritt

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
RNA	50-500 ng
Random Hexamer Primer	1
H <sub>2</sub> O (DEPC behandelt)	auf 12

Die Proben wurden für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

**Tabelle 3.14:** Zusammensetzung der cDNA Synthese, 2. Schritt

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
5x Reaction Buffer	4
10 mM dNTP Mix	2
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	1
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)	1

Anschließend erfolgte das cDNA Synthese Programm des Herstellerprotokolls. Die Proben wurden für 5 min bei 25°C inkubiert und anschließend für 60 min bei 42°C. Eine Termination der Reaktion erfolgte durch Inkubation für 5 min bei 70°C. Die anschließende Lagerung bis zur Analyse wurde bei -80°C vorgenommen.

### **3.8.3 Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR (relative Quantifizierung)**

Die durchgeführten Genexpressionsanalysen dienen zur Bestimmung der Expression allgemeiner und neuronaler Stammzellmarker. Um einen Einfluss des serumhaltigen Mediums auf die Expression für verschiedene Stammzellmarker auszuschließen, wurde die adhärente Kultur S462 für einen Teil der Versuch (siehe Ergebnisteil und jeweilige Anmerkung) in der Regel unter serumfreien Bedingungen in Stammzellmedium für einen Zeitraum von 14-16 h kultiviert und als Kontrolle für die Expression der Sphären eingesetzt.

Die Real-Time PCR ist eine Quantifizierungsmethode, welche es ermöglicht die Expression von Genen aus beispielsweise Zellen oder Geweben zu analysieren. Sie basiert auf der traditionellen PCR, kann jedoch zusätzlich die Amplifikation des Targets während eines Zyklus darstellen, die traditionelle PCR jedoch nur das Endprodukt. Ermöglicht wird dies beispielsweise durch die Verwendung von sog. TaqMan-Sonden. Diese Sonden binden zusätzlich zu den Primern sequenzspezifisch den zu amplifizierenden Genabschnitt. Am 5' Ende der Oligo-

sonde befindet sich ein Reporterfarbstoff (Fluorophor wie z.B. FAM) sowie am 3' Ende ein Quencher. Solange die Oligosonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch den Quencher gemindert. Durch die zusätzliche 5'Nuklease-Aktivität der Taq Polymerase wird die Sonde im Verlauf der Amplifikation des DNA-Stranges abgebaut. Der Reporterfarbstoff und der Quencher verlieren ihre Nähe zueinander was zu einer messbaren Steigerung des Fluoreszenzsignals führt. Während jedes Zyklus kommt es zur Spaltung der Sonden, wobei die Steigerung des Fluoreszenzsignals proportional zum PCR-Produkt steht. Dieser Amplifikationsverlauf kann dargestellt und quantifiziert werden.

Bei der Real-Time PCR werden die absolute und die relative Quantifizierung unterschieden. Die absolute Quantifizierung ermöglicht die Bestimmung der genauen Transkript-Kopienzahl, die mit Hilfe einer Standardkurve errechnet werden kann. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpressionsveränderung im relativen Verhältnis zu einer Kontrolle, beispielsweise einer unbehandelten Gruppe, dargestellt (Livak & Schmittgen, 2001). Für die Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung gewählt, da für die Prüfung der Genexpression der verwendeten Marker die verhältnismäßige Zu- oder Abnahme von Bedeutung war und weniger die exakte Kopienzahl.

Die Real-Time PCR wurde am Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR Cycler der Neurochirurgie am Universitätsklinikum Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lamszus durchgeführt. Verwendet wurde der TaqMan Universal PCR Master Mix sowie validierte kommerziell erwerbbar TaqMan Assays (Tab. 3.15). Alle Proben wurden als Triplicate pipettiert (96er Multiply Fast PCR Platte & Klebefolie optisch klar, beides Sarstedt) und anschließend für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810, Eppendorf).

**Tabelle 3.15:** Verwendete TaqMan Assays.

Taq-Man Assay	Assay-Nr.	Target	Bindung an Exon
ABCG2	Hs01053790_m1	ABCG2 Transporter	3-4
CD34	Hs00990732_m1	Glykoprotein, Zell-Zell Adhensionsfaktor	3-4
CD133 (PROM1)	Hs01009257_m1	Transmembranes Glykoprotein	4-5
EGFRex1	Hs01076078_m1	Epidermal growth factor receptor	1-2
LEF1	Hs01547250_m1	Lymphoid Enhancer Binding Factor-1	7-8
MAP3K7 (TAK1)	Hs01105682_m1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7	9-10
NCAM (CD56)	Hs00941830_m1	Neural Cell Adhesion Molecule	3-4
Nestin	Hs00707120_s1	Intermediärfilament Protein Typ VI	4-4
NGFR	Hs00609976_m1	Nerve Growth Factor Receptor	2-3
Notch4	Hs00965897_m1	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 4	3-4
Oct4	Hs00742896_s1	Octamer Binding Transcription Factor 4	1-1
PRKCI	Hs00702254_s1	Proteinkinase C iota	1-1
RPL13a	Hs01578912_m1	Ribosomales Protein L13a	1-2
Sox2	Hs00602736_s1	(Sex Determining Region Y)-Box 2	1-1
Sox9	Hs00165814_m1	(Sex Determining Region Y)-Box 9	2-3
Wnt4	Hs00229142_m1	Wingless-Related MMTV Integration Site 4	4-5

Nachstehend in Tabelle 3.16 ist das verwendete und zugleich empfohlene Pipettierschema von Applied Biosystems wiedergegeben. Als endogene Kontrolle wurde das Haushaltsgen RPL13a verwendet.

**Tabelle 3.16:** Zusammensetzung der Real-Time PCR.

Zusammensetzung	Volumen ( $\mu$ l)
TaqMan Assay, diverse	1
TaqMan Fast Universal Mastermix (2x)	10
cDNA	1
H <sub>2</sub> O	8

Die Durchführung der Real-Time PCR mit den dazugehörigen Standardeinstellungen entsprach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Auswertung der Daten wurde anhand der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode vorgenommen. Die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode zeigt die vielfache Verände-



nung der Genexpression normalisiert gegen ein endogenes Referenzgen und eine unbehandelte Kontrolle (Kalibrator). Die unbehandelte Kontrolle,  $\Delta\Delta Ct$ , entspricht 0 sowie  $2_0$  einer 1. Die vielfache Veränderung der Genexpression, relativ betrachtet zur unbehandelten Kontrolle, entspricht dabei 1. Für die behandelte Probe zeigt die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Gleichung die vielfache Änderung der Genexpression im relativen Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Livak & Schmittgen, 2001).

#### **3.8.4 Beeinflussung der Genexpression durch Kultivierungsbedingungen**

Um einen Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die differenzierten Tumorzellen und Sphären der Zelllinien S462 hinsichtlich der Expression verschiedener Stammzellmarker zu prüfen, wurden Zeitreihen angesetzt. Die differenzierten Tumorzellen der Zelllinie S462 wurden unter Stammzellbedingungen in Stammzellmedium kultiviert sowie die Sphären der Zelllinie S462 unter Standardkulturbedingungen in Standardmedium in 6 Well Platten. Ausgesät wurden pro Well  $2 \times 10^4$  Zellen in einem Kultivierungsvolumen von 2 ml (die adhärenen Zellen S462 mussten hierfür zunächst mit 0,05%igen Trypsin vom Kulturboden gelöst werden; siehe dazu auch 3.1.2). Für die Messungen wurden die Zeiträume 0 h, 6 h, 16 h und 26 h gewählt. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden die Zellen aus den Wells entnommen und in ein 15 ml Gefäß überführt. Die Zellen wurden für 5-10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Sobald alle Proben der Messungen vorlagen, wurde aus diesen RNA isoliert (Durchführung siehe 3.8.1); anschließend erfolgte die cDNA Synthese (Durchführung siehe 3.8.2) sowie die Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR (relative Quantifizierung, Durchführung siehe 3.8.3). Verwendet wurde ein Set bestehend aus verschiedenen Stammzellmarkern.

### **3.9 Micro-Arrayanalyse**

Die Micro-Arrayanalyse wurde in der klinischen Chemie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf von Kristin Klätschke in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Streichert durchgeführt. Verwendet wurde der GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array der Firma Affymetrix. Die Micro-Arrayanalyse diente zum Vergleich der adhärenen Zelllinie S462 und den S462 Sphären hinsichtlich der Prüfung differentiell exprimierter Gene. Die Analyse sollte Aufschluss über die Expression von Markern geben, die eine Differenzierung der adhärenen Zellen von den Sphären ermöglichen. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Otto aus der klinischen Chemie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Im Allgemeinen ermöglichen Micro-Arrayanalysen die Darstellung von Genexpressionsprofilen von beispielsweise unterschiedlichen Zelltypen, wobei nicht ein spezifisches Target-Gen untersucht wird, sondern ein Set aus einer Vielzahl von Genen. Es ermöglicht so die Identifizierung von Biomarkern oder die genauere Analyse von Stoffwechselwegen. Grundlage für die Analyse ist die Bindung repräsentativer, genspezifischer Oligonukleotide an eine Matrix, die einer sehr großen Anzahl an Genen entsprechen. Für die Analyse wird jeweils gesamt RNA der zu untersuchenden Proben isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf die Matrix hybridisiert. Die fluoreszenz-gelabelten cDNA Proben können je nach vorhandener Expression an die Oligonukleotidsonden binden. Je stärker die Expression für ein bestimmtes Gen, desto intensiver das zu detektierende Signal auf dem verwendeten Chip. Die Signalstärke kann somit als Maß für die Expression eines Gens verwendet und mit anderen Proben verglichen werden. Der verwendete GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array repräsentiert mehr als 47.000 Transkripte, wobei über 38.500 gut charakterisierte Gene enthalten sind. Die Oligonukleotide haben eine Länge von 25 bp. Es befinden sich auf dem Chip über 54.000 Sonden-Sets. Hybridisierungskontrollen sind die Gene *bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre*. Poly-A Kontrollen sind *dap*, *lys*, *phe*, *thr*; Haushaltsgene bzw. Kontrollgene sind *GAPDH*, *beta-Actin*, *ISGF-3 (STAT1)*. Das Normalisierungskontrollset besteht aus 100 Sonden.

Für die Analyse wurden pro Probe 100 ng RNA (isoliert mit dem NucleoSpin RNA XS Kit, siehe 3.8.1) eingesetzt. Als Proben dienten adhärente S462 Zellen, die zuvor für 16 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden sowie S462 Sphären Passage 16. Eine Quantifizierung der RNA erfolgte am Photometer (NanoDrop ND-1000, PeqLab). Es wurde ein Volumen von weniger als 3 µl verwendet. Hierfür wurde die einzusetzende RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen auf 3 µl eingestellt. Die Durchführung des Arrays entsprach den Angaben des Herstellerprotokolls. Verwendet wurden das GeneChip 3'IVT Express und das GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit von Affymetrix.

### **3.9.1 Poly-A Verdünnung**

Zunächst wurden Poly-A Kontrollen als exogene Positivkontrollen angesetzt, um den eukaryotischen Target-Labeling Prozess zu beobachten. Entsprechend der eingesetzten RNA Mengen wurden Verdünnungsreihen der Poly-A Kontrollen erstellt. Die Verdünnungen wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls für 100 ng in non-stick RNase freie Gefäße pipettiert. Anschließend wurde ein total RNA/Poly-A RNA Kontrollansatz bestehend aus 100 ng RNA,

2 µl verdünnte Poly-A Kontrolle und Nuklease freiem Wasser in einem Volumen von 5 µl pipettiert.

### **3.9.2 First-Strand cDNA**

Alle Reagenzien wurden auf Eis gehalten und in Nuklease freie Gefäße pipettiert. Der Mastermix für die First-Strand cDNA Synthese bestand entsprechend den Angaben des Hersteller-Kits für je eine Probe aus dem First-Strand Buffer Mix (4 µl) und dem First-Strand Enzyme Mix (1 µl). Zu diesem Gemisch wurde der RNA/Poly-A Kontrollansatz in einem finalen Volumen von 10 µl hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 42°C im Thermal Cycler (MJ Research PTC-200, Bio-Rad) inkubiert, danach auf Eis inkubiert und für die Second-Strand cDNA Synthese verwendet.

### **3.9.3 Second-Strand cDNA**

Alle Reagenzien wurden auf Eis gehalten und in Nuklease freie Gefäße pipettiert. Der Second-Strand cDNA Master Mix bestand für je eine Probe aus Nuklease freiem Wasser (13 µl), Second-Strand Buffer (5 µl) und dem Second-Strand Enzyme Mix (2 µl). Der 20 µl Ansatz wurde zu den 10 µl cDNA pipettiert und vorsichtig vermengt. Die Probe wurde anschließend bei 16°C in den Thermal Cycler gestellt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt und sofort mit der *in vitro* Transkription (IVT) fortgeföhren.

### **3.9.4 In vitro Transkription (IVT) für die Synthese gelabelter aRNA**

Alle Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gehalten und in Nuklease freie Gefäße pipettiert. Der IVT Mastermix setzte sich für je eine Probe aus IVT Biotin Label (4 µl), IVT Labeling Buffer (20 µl) und IVT Enzyme Mix (6 µl) zusammen. Die 30 µl IVT Mastermix wurden mit dem Produkt der Second-Strand cDNA vermengt und für 16 h bei 40°C im Thermal Cycler inkubiert.

### **3.9.5 aRNA Aufreinigung**

Um die amplifizierte RNA (aRNA) von Enzymen, Salzen und Nukleotiden zu befreien, wurde diese aufgereinigt. Hierfür wurde die aRNA auf 55°C für 10 min erhitzt (Thermostat Plus, Eppendorf) und der aRNA Binding Mix vorbereitet. Der aRNA Binding Mix setzte sich aus RNA Binding Beads (10 µl) und aRNA Binding Buffer Konzentrat (50 µl) zusammen. Der aRNA Binding Mix wurde mit dem IVT Produkt vermengt und weitere 120 µl 100%iges Ethanol hinzugefügt. Die Probe wurde 5 min im Thermomixer (Thermomixer Comfort,

Eppendorf) bei 22°C (1400 rpm) gemischt und anschließend einem magnetischen Feld in Form eines Racks (Dyna) für ca. 5 min ausgesetzt, welches eine Pelletierung der Beads verursachte. Vorsichtig wurde der Überstand abgenommen ohne die Beads zu beschädigen. Zu den Beads wurden 100 µl angesetzte aRNA Wash Solution hinzugegeben und der Ansatz für 2 min bei 22°C (1400 rpm) im Thermomixer gemischt. Der Ansatz wurde erneut für 5 min dem magnetischen Feld ausgesetzt, der Überstand abgenommen und die Beads mit 100 µl aRNA Wash Solution gewaschen. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt und der Ansatz anschließend im Thermomixer für 1 min bei 22°C (1000 rpm) getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen. Die Probe wurde nochmals dem magnetischen Feld ausgesetzt und für 5 min bei RT ohne Schütteln inkubiert, um weitere Ethanolreste von den Beads zu entfernen. Um die aRNA zu eluieren, wurden 50 µl aRNA Elution Solution (auf 50-60°C vorgewärmt) hinzupipettiert und die Probe bei 22°C für 5 min im Thermomixer (1000 rpm) geschüttelt bis sich die Beads auflösten. Die aRNA wurde erneut dem magnetischen Feld ausgesetzt (5 min) und der Überstand, welcher die gelöste aRNA enthielt, in ein Nuklease freies Gefäß überführt (Lagerung bei -20°C).

### ***3.9.6 aRNA Quantifizierung***

Die aRNA Quantifizierung erfolgte erneut mit dem NanoDrop, wobei direkt 2 µl jeder Probe verwendet wurden ohne diese zu verdünnen. Eine zusätzliche Qualitätsprobe wurde mit Hilfe des Bioanalyzers (Agilent) durchgeführt. Geprüft wurde hier ob stabile aRNA vorlag oder ob diese im Verlauf des Aufreinigungsprozesses degradiert war. Die Kontrolle erfolgte durch die Prüfung der 18S und 28S rRNA.

### ***3.9.7 aRNA Fragmentierung***

Für eine optimale Assay Sensitivität wurde die aRNA fragmentiert bevor sie auf dem GeneChip hybridisiert wurde. Für ein GeneChip Array Format von 49/64 wurde 15 µg aRNA eingesetzt. Für die Fragmentierung wurden 15 µg aRNA, 8 µl 5xArray Fragmentation Buffer und Nuklease freies Wasser auf ein Volumen von 40 µl pipettiert, der Ansatz bei 94°C für 35 min inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach der Fragmentierung schloss sich nochmals eine Analyse der Probe am Bioanalyser an, wie sie unter Punkt 3.9.6 aufgeführt ist.

### ***3.9.8 GeneChip Hybridisierung***

Verwendet wurde das GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit von Affymetrix. Für das 49 (Standard)/64-Format wurden für den Hybridisierungscocktail 33 µl fragmentierte aRNA (12,5 µg), 4,2 µl Control Oligonukleotide B2 (3 nM), 12,5 µl 20 x Hybridisierungskontrollen

(zur vollständigen Resuspendierung zuvor auf 65°C für 5 min erhitzt), 125 µl 2 x Hybridisierungsmix, 25 µl DMSO und 50 µl Nuklease freies Wasser zusammen pipettiert.

Der Array musste auf RT equilibriert werden bevor er verwendet wurde. Der Hybridisierungscocktail wurde für 5 min auf 99°C sowie anschließend auf 45°C für 5 min im Thermal Cycler erhitzt. Während der Inkubationszeit wurde der Array mit 200 µl Pre-Hybridisierungsmix befeuchtet (durch Zugabe der Lösung in eines der Septa) und für 10 min bei 45°C im Hybridisierungsöfen (GeneChip Hybridization Oven 640, Affymetrix) durch Rotieren inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungscocktail für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge (MiniSpin, Eppendorf) zentrifugiert. Der Array wurde aus dem Ofen entnommen, mit einer Pipettenspitze belüftet und der Pre-Hybridisierungsmix mit Hilfe einer Pipette (200 µl, Eppendorf) entnommen. Der Array wurde anschließend mit dem Hybridisierungscocktail und den Septa verschlossen, um ein Auslaufen des Mixes zu vermeiden. Der Array wurde erneut für die Hybridisierung 16 h bei 45°C in den Ofen gestellt. Die Platte wurde mittig der Rotationsachse gestellt und bei 60 rpm rotiert.

### ***3.9.9 Setup des Experiments und der Flüssigkeitsstation***

Das Setup entsprach den Angaben des Herstellerprotokolls Affymetrix inkl. des Setups der *GeneChip Operating Software (GCOS)*. Verwendet wurde eine Flüssigkeitsstation (GeneChip Fluidics Station 450, Affymetrix), um den Array zu waschen und färben. Die Steuerung erfolgte über die *GCOS* (siehe Herstellerprotokoll für genaue Angaben zur Befüllung der Tanks mit Puffern, Durchführung des Priming-Programms etc.).

### ***3.9.10 Array-Waschung und Färbung***

Nach der 16-stündigen Hybridisierung wurde der Array aus dem Ofen entnommen und mittels einer Pipettenspitze durch eines der Septa belüftet. Am anderen Septa wurde mit Hilfe einer Pipette der Hybridisierungsmix dem Array entnommen. Der Array wurde anschließend mit Waschlösung A befüllt (250 µl).

Die Färbereagenzien wurden angesetzt: Der Färbecocktail 1 (600 µl, lichtgeschützt), Färbecocktail 2 (600 µl) und der Array Holding Buffer (800 µl) wurden aus der Färbemodul-Box 1 entnommen (genauere Angaben siehe Herstellerprotokoll) und in Mikrozentrifugengefäße überführt.

Für das Wasch- und Färbeprogramm wurde das Programm FS450\_0001 verwendet. Der Array wurde in die Färbestation eingelegt, sowie die Mikrozentrifugengefäße mit den vorberei-

teten Lösungen in die Halterungen gebracht (genauere Beschreibung siehe Herstellerprotokoll). Nach Beendigung des Programms konnte der Array, wenn keine Luftblasen oder Luftteinschlüsse vorhanden waren, im Scanner (Probe Array Scan; GeneChip Scanner 7G, Affymetrix) gelesen werden (bei der Bildung von Luftblasen siehe Protokoll der Hersteller).

### **3.9.11 Array Scan**

Für das Scannen des Arrays sollte der Laser mindestens 10 min vorgewärmt werden. Um ein optimales Scannen zu ermöglichen, sollte die Glasoberfläche des Arrays sauber sein und die Septa mittels eines Tapes (Tough Spots, Diversified Biotech) verschlossen werden, um ein Flüssigkeitsaustritt aus dem Array zu vermeiden. Die Rückseite der Arraykassette sollte zudem trocken sein. Es muss sichergestellt werden, dass durch das Abkleben der Septa sich keine Luftblasen, Beulen etc. bilden. Der Array konnte anschließend gescannt werden. Hierfür wurde zunächst der Autofokus getestet, um sicherzustellen, dass das Abkleben der Kassette nicht den Fokus störte (genauere Anweisungen dazu siehe Herstellerprotokoll). Die Daten wurden geladen und das Array-Bild wurde sichtbar.

## **3.10 In Vivo Studien**

Alle Tierversuche wurden im Rahmen des Projektes „Tyrosin-Kinase-Rezeptor Inhibitoren für die Behandlung von Tumoren des peripheren Nerven bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1)“ mit der Projektnummer 68/06 durchgeführt und entsprechend den Vorgaben des Amtes für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Hamburg. In der Regel waren alle verwendeten Tiere ca. 6-7 Wochen alt.

### **3.10.1 Tumorigenität der S462 Sphären**

Die Durchführung der *in vivo* Studien unter 3.10.1 & 3.10.2 wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Demestre vorgenommen.

Für den Versuch wurden weibliche athymische NMRI Nude Mäuse (Charles River) verwendet. Zur Prüfung der Tumorigenität der S462 Sphären wurden subkutan in die rechte Flanke der Maus  $2,5 \times 10^5$  adhärenente (n=10, Passage 35) oder sphäroide S462 (n=9, Passage 8-13) Zellen implantiert. Für die Implantation wurden die Tiere kurzzeitig mit einem Gemisch aus CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> betäubt. Die Zellen wurden in einer Matrix, bestehend aus gleichen Mengen Zellkulturmedium und Matrigel (Basement Membran Mix, BD), aufgenommen. Die Tiere wurden anschließend für einen Zeitraum von 8-12 Wochen hinsichtlich des Tumorwachstums regelmäßig geprüft und die Tumore gegebenenfalls mit einem Messschieber (Fine Science Tools)

vermessen. Bei der Entwicklung von Tumoren wurden diese nach Euthanisierung (durch ein Gemisch aus CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> mit anschließendem reinen CO<sub>2</sub>) der Maus entnommen und histologisch in Paraffin konserviert und ein Teil des Frischgewebes bei -80°C für spätere DNA Analysen eingefroren.

### **3.10.2 Tumorigenität CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup> sphäroider S462 Zellen**

Für die Implantation CD133<sup>+</sup> (n=9) bzw. CD133<sup>-</sup> (n=5) Zellen wurden diese mittels CD133-Microbeads (Miltenyi Biotech) selektiv aus den S462 Sphären (Passage 8-13) angereichert. Die Durchführung der Isolierung durch Frau Dr. Maria Demestre entsprach dabei den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Zellen ( $2,5 \times 10^5$ ) wurden für die subkutane Implantation in einer Matrix bestehend aus Neurobasalmedium und Matrigel zu gleichen Mengen aufgenommen und in einem Volumen von 200 µl implantiert. Die Durchführung der Implantation und anschließenden Kontrolle entsprach den Angaben unter 3.10.1.

### **3.10.3 Tumorigenität etablierter Zelllinien**

Die etablierten Zelllinien S1507,2 und S1844,1 wurden *in vivo* hinsichtlich ihrer Tumorigenität geprüft. Für die Versuche standen weibliche athymische NMRI Nude Mäuse (Charles River) sowie Pfp/Rag2 Mäuse des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zur Verfügung. Die genannten Zelllinien wurden entsprechend in T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt) expandiert. Bei genügend hohen Zellzahlen wurden pro Maus  $4-6 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 200 µl implantiert (Durchführung der Implantation siehe 3.10.1).

Für die Zelllinie S1507,2 erfolgte die subkutane Injektion in die rechte Flanke bei insgesamt 15 NMRI Nude Mäusen ( $4-5 \times 10^6$ , P50-67), wobei für 5 dieser Tiere eine Reinjektion von  $4 \times 10^6$  Tumorzellen nach ca. 5 Monaten erfolgte. Zusätzlich wurden bei 7 Pfp/Rag2 Mäuse je  $4 \times 10^6$  S1507,2 Zellen in den Nackenbereich (rechts) implantiert.

Für die Zelllinie S1844,1 erfolgte die Injektion ( $4,5 \times 10^6$ ) zum einen in die rechte Flanke und zum anderen im Nackenbereich bei jeweils 5 Tieren (NMRI nude). Eine weitere Injektion erfolgte von  $5 \times 10^6$  Zellen subkutan am Nacken bei 5 NMRI nude Mäusen sowie in die Flanke bei 5 weiteren NMRI nude Mäusen ( $6 \times 10^6$ , P23). Die Zellen wurden jeweils in einer Matrix bestehend aus gleichen Mengen Standardmedium und Matrigel aufgenommen. Für die Injektion wurden die Tiere kurzzeitig mit CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> betäubt.

Nach erfolgter Injektion der Zellen wurden die Tiere in der Regel für einen Zeitraum von mindestens 3 Monate bis maximal 14 Monate hinsichtlich des Tumorwachstums regelmäßig

geprüft und die Tumore gegebenenfalls mit einem Messschieber (Fine Science Tools) vermessen. Bei der Entwicklung von Tumoren wurden diese nach Euthanisierung den Mäusen entnommen und histologisch in Paraffin konserviert und ein Teil des Frischgewebes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für spätere DNA Analysen eingefroren.

#### **3.10.4 Biolumineszenz-Imaging zur Detektion der Metastasierung**

Das Biolumineszenz Imaging ermöglicht die nicht invasive Detektion und Quantifizierung von Xenografts *in vivo*. Somit kann zum Beispiel die Beobachtung des kinetischen Verlaufes des Tumorwachstums, der Metastasierung oder aber auch die medikamentöse Behandlung von Tumoren über längere Zeiträume verfolgt werden. Die Messungen beruhen auf der Detektion von Lichtsignalen, die durch die Umsetzung eines Substrates, hier Luciferin, freigesetzt werden. Die implantierten Zellen wurden genetisch modifiziert und tragen im vorliegenden Fall das Enzym Luciferase, welches für die Umsetzung des Substrates verantwortlich ist. Vorteil der angewandten Methode besteht in der Stabilität des Signals: Wenn die implantierten Zellen *in vivo* absterben, kann das Substrat nicht mehr umgesetzt werden, woraus folglich keine Emission hervorgeht. Das Signal wird schwächer oder tritt nicht auf, so dass sich falsch-positive Messungen vermeiden lassen. Die Methode ermöglicht die hoch sensitive Visualisierung der implantierten Zellen innerhalb der ganzen Maus.

##### **3.10.4.1 Puromycin Killing Curve**

Für die Transduktion der Zellen mit dem Plasmid pLenti CMV Puro LUC (w168-1) wurden zunächst Verdünnungsreihen unterschiedlicher Puromycinkonzentrationen an der Zelllinie S462 durchgeführt, da Puromycin als Selektionsmarker für die transduzierten Zellen eingesetzt wurde. Die Verdünnungsreihen dienten zur Bestimmung der minimalsten Konzentration des Antibiotikums um 50% der Zellen nach 3 Tagen Inkubation zu töten. Nach erfolgreicher Transduktion der Zellen sollten alle Zellen nach Ermittlung der geeigneten Konzentration resistent gegenüber Puromycin sein, da das zu transduzierende DNA Plasmid eine Puromycinresistenz beinhaltet.

Für den Versuch wurden auf 24 Multiwell-Platten (Sarstedt) parallel 2000 und 4000 Zellen pro Well in 2 ml Kulturmedium (Standardmedium) ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  (Heracell 240i, Thermo Scientific) inkubiert. Nachdem die Zellen vollständig sedimentierten, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch frisches, mit Puromycin (InvivoGen, Stock: 10 mg/ml) versetztes Standardmedium ersetzt. Dabei wurden folgende Konzentrationen gewählt:



0,05 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,6 µg/ml; 0,7 µg/ml; 0,8 µg/ml; 0,9 µg/ml; 1,0 µg/ml; 2,0 µg/ml; Kontrolle: 0 µg/ml

Die Zellen wurden fortlaufend bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert und die Konfluenz der Zellen am Mikroskop (Telaval 31, Zeiss) Täglich beobachtet. Die Konzentration, die nach 3-tägiger Inkubation mit Puromycin eine 50%ige Konfluenz zeigte, wurde als Richtwert für die Selektion der zu transduzierenden Zellen genommen.

#### **3.10.4.2 Transduktion der Zelllinie S462 mit Luciferase**

Die Transduktion der S462 Zelllinie erfolgte im Labor für Transplantations- und Stammzellimmunbiologie am Universitätsklinikum Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sonja Schrepfer. Für die Transduktion wurde das lentivirale Plasmid pLenti CMV Puro LUC (w168-1, Addgene) mit CMV Promoter und Puromycin Resistenz verwendet.

$5 \times 10^4$  Zellen der Zelllinien S462 wurden pro Well in einem 24 Well-Format in 500 µl Standardmedium kultiviert. Die Zellen wurden 2-5 Stunden nach dem Aussähen, bis sie adhärirten, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Heracell 240, Thermo Scientific) inkubiert. Anschließend wurde das kationische Polymer Polybrene (Sigma) in einer finalen Konzentration von 8 µg/ml hinzugegeben, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl des virusenthaltenen Überstandes auf die Zellen. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches Standardmedium, versetzt mit Puromycin, ersetzt. Eine Kontrolle der Transduktionseffizienz erfolgte durch Zugabe des Substrat D-Luciferin (Biosynth) zu den Zellen. Durch die transduzierte Luciferase kann das D-Luciferin in Oxyluciferin verstoffwechselt werden. Die Umsetzung des Substrats verursacht die Emission von Licht bei einer Wellenlänge von 572 nm, welches mit Hilfe einer sensitiven CCD Kamera (IVIS Imaging System 200) detektiert werden kann.

#### **3.10.4.3 *In vivo* Biolumineszenz-Imaging (BLI)**

Alle Tierversuche wurden im Rahmen des Projektes 68/06 „Tyrosin-Kinase-Rezeptor Inhibitoren für die Behandlung von Tumoren des peripheren Nerven bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1)“ durchgeführt und entsprechen den Vorgaben des Amtes für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Hamburg. Für das *in vivo* Biolumineszenz-Imaging wurde ebenfalls das IVIS Imaging System 200 verwendet. Das System ermöglicht ein *in vivo* Imaging durch die Verwendung von Begasungsvorrichtungen mit Isofluran (Abbott). Für die Lumineszenz-Messung wurden 5 weibliche NMRI Nude Mäuse (Charles River) verwendet. Pro Maus wurden  $6 \times 10^6$  Zellen der transduzierten Zelllinie

S462 subkutan an der rechten Flanke subkutan injiziert. Die Zellen wurden hierfür in einem Volumen von 200 µl bestehend aus Standardmedium und Matrigel in einem Verhältnis von 1:1 angesetzt. Für die Injektion wurden die Tiere kurzzeitig mit einem Gemisch aus CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> narkotisiert. Anschließend erfolgte die Messung des Signals. Die Tiere wurden für die Messung zunächst in einem Käfig mit Isofluran begast, aus welchem kein Gas entweichen konnte. Sobald die Tiere vollständig schliefen, wurden pro Maus intraperitoneal 200 µl D-Luciferin (375 mg/kg Körpergewicht, Biosynth) appliziert. Anschließend wurden die Tiere in das Imaging Gerät überführt und über Steckvorrichtungen fortlaufend für die Messung mit Isofluran begast. Die Tiere wurden für die Aufnahmen der Bilder auf den Bauch gedreht. Die Messungen erfolgten so lange bis das Signal sein Maximum erreicht hat. Bei einer Signalstärke, die dem Hintergrundsignal glich, wurde die Injektion des Luciferin wiederholt und die Tiere erneut gemessen. Angegeben wurden die Messeinheiten als „Region of Interest“ (ROI). Das BLI ermöglicht die Messung der implantierten Zellen über einen längeren Zeitraum ohne die Tiere zu euthanisieren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tumorstammzellen

#### 4.1.1 Sphären-Formation

Ein wichtiges Charakteristikum von Tumorstammzellen oder stammzellähnlichen Zellen ist die Proliferation unter serumfreien Bedingungen. Möglich ist dabei die Formation von Sphären bzw. das klonale Wachstum als Sphäre (Singh *et al.*, 2003). Untersucht wurden insgesamt 60 Proben, darunter etablierte MPNST Zelllinien, Primärkulturen und dissoziierte Zellen aus Tumorfrischmaterial von MPNSTs sowie plexiforme Neurofibrome sowie atypische plexiforme Neurofibrome (Tab. 4.1 & 4.2).

#### Stammzeleigenschaften aus PNF

Neun der untersuchten Proben (Frischgewebe sowie Primärkultur) stammten aus plexiformen Neurofibromen bzw. atypischen plexiformen Neurofibromen. Bei 8 Proben konnte eine Sphären-ähnliche irreguläre Aggregation beobachtet werden, wobei viele Proben nur zwei bis drei Mal passagiert werden konnten und es sich wahrscheinlich um nicht spezifische Aggregate handelte. Bei 2 atypischen PNF überlebten Sphären jedoch bis 7 und 8 Passagen (Tab. 4.1). Somit zeigte sich tendenziell eine längere Passagierung von atypischen PNF zu PNF. Ein Unterschied bezüglich der Form der Sphären konnte zwischen den atypischen PNF und PNF jedoch nicht festgestellt werden. Zu berücksichtigen ist die Tumorprobe 2273,2, die nach pathologischem Bericht ein plexiformes Neurofibrom mit äußerem Randbereich eines malignen Nervenscheidentumors darstellt. Somit könnte die Kultur anteilig maligne Zellen enthalten. Eine Sphären-Formation von dissoziierten Zellen aus Tumorfrischmaterial war bis Passage 6 zu beobachten. Die Zellen der Primärkultur von diesem Tumor aus Passage 5 ergaben Sphären, die drei Mal passagiert werden konnten.

#### Stammzeleigenschaften aus MPNST

Insgesamt konnten aus 30 MPNST Tumorproben die dissoziierten Zellen direkt bezüglich einer Sphären-Formation untersucht werden. Dabei konnte für 25 Proben (83%) eine Sphären-Formation beschrieben werden (Tab. 4.2). Eine Passagierung der Sphären war dabei zwischen 1 und 8 Passagen möglich. Ein Zusammenhang mit der histopathologischen Dignitätseinstufung des jeweiligen Tumors und der Anzahl der möglichen Passagen der Sphären konnte nicht

eindeutig hergestellt werden. So zeigten die Tumorproben 2209,1 und 2209,2 mit hoher Malignitätsstufe eine Sphären-Formation von 8 Passagen (Abb. 4.2), dennoch war für einige andere hochgradige Tumore (z.B. 2302) oder Rezidivtumore wie 2306 oder 2336 eine Passagierung nur zwei bzw. drei Mal möglich. Für einen Großteil der untersuchten MPNST Proben konnte dennoch eine erhöhte Passagierung zwischen fünf und acht Mal im Vergleich zu PNF Proben beobachtet werden. Tumor 2140 konnte sieben Mal passagiert werden wobei sich im histologischen Bericht positive Zellen für den Stammzellmarker CD34 wiederfanden. Fünf Tumorproben der FNCLCC-Klassifikation (*La Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer*) Grad I bis III zeigten keine Sphären-Bildung unter serumfreien Bedingungen. 2231 entspricht einem Triton-Tumor, zeigte jedoch bei direkter Kultivierung von dissoziierten Zellen aus Tumorfrischgewebe eine Sphären-Formation über 7 Passagen. Der pathologische Bericht zu Tumor 2231 entsprach dem FNCLCC Grad III und könnte somit gegebenenfalls als Erklärung für eine erhöhte Passagenanzahl dienen. Die isolierten Zellen aus Tumorfrischmaterial zweier MPNST-Proben aus einem nicht-NF1 assoziierten Patienten proliferierten 5 bzw. 6 Passagen.

Weiter konnte für 18 MPNST Primärkulturen, die zunächst als adhärente Zellen in serumhaltigem Medium kultiviert wurden (Passage 0 bis 11), eine Sphären-Formation für 14 Proben (78%) unter Stammzellbedingungen beobachtet werden (Tab. 4.2). Dabei wiesen die meisten Kulturen Sphären-Formationen zwischen 1 bis 5 Passagen auf, hauptsächlich jedoch 2 Passagen. Die Primärkulturen 2140 (Abb. 4.3), 2004 und 1878 zeigten Sphären-Formationen von 16 bzw. je 12 Passagen und setzten sich deutlich von den anderen Kulturen ab. Der Tumor 2140 zeigte auch in der direkten Kultivierung aus dissoziierten Zellen des Tumorfrischmaterials eine Sphären-Formation über 7 Passagen sowie 1878 über 6 Passagen, Tumor 2004 jedoch nur über 3 Passagen. Ein Zusammenhang mit der histopathologischen Dignität des Tumors und der Kultivierung unter serumfreien Bedingungen der entsprechenden Primärkultur konnte nicht gezogen werden.

Die Untersuchung der drei etablierten MPNST Zelllinien S462, S1507,2 und S1844,1 zeigte für die Linien S1507,2 und S1844,1 eine Sphären-Formation von 2 Passagen. Für die Zelllinie S462 konnte eine Sphären-Formation beobachtet werden. S462 wies eine deutliche Proliferation von mehr als 40 Passagen unter serumfreien Bedingung sowie ein klonales Wachstum (Spyra *et al.*, 2011) auf (Abb. 4.4). S462 und S1507,2 entstammten einem rezidiven malignen Nervenscheidentumor, beide FNCLCC Grad III. Jedoch verhielten sich die Zellen aus diesen

beiden MPNSTs deutlich unterschiedlich unter Stammzellbedingungen. S1884,1 gehört zur Gruppe der sog. Triton-Tumore und wies einen Schweregrad von FNCLCC II auf.

**Tabelle 4.1:** Sphären-Formation von dissoziierten Zellen aus atypischen und typischen PNF Tumorfriechmaterial sowie von PNF Primärkulturen. Gelistet sind die verwendeten Materialien angegeben mit pathologischen Befunden und der maximalen Passagierung.

<b>Tumor ID</b>	<b>Sphären-Formation bis Passage (P)</b>	<b>Ausgangszellen/Proben und dazu gehörige pathologische Befunde</b>
<b>dissoziierte Zellen aus PNF Tumorfriechmaterial</b>		
2273,2	6	PNF, S100 positiv, äußerer Randbereich S100 negativ, MPNST; FNCLCC Grad III
2273,1	2	überwiegend dermal-diffuses, fokal auch PNF, S100 positiv, WHO Grad I
<b>Zellen aus PNF Primärkulturen</b>		
2273,2	3	PNF, S100 positiv, äußerer Randbereich S100 negativ, MPNST; FNCLCC Grad III
1701,3	keine	PNF
<b>dissoziierte Zellen aus atypischem PNF Tumorfriechmaterial</b>		
1970,1	8	atypisches plexiformes Neurofibrom
1970,2	7	atypisches plexiformes Neurofibrom
2248	4	atyp. PNF, S100 positiv, erhöhte proliferative Aktivität; WHO Grad I
2174,2	2	atyp. PNF, S100 positiv; WHO Grad I
2174,1	2	atyp. PNF, S100 positiv; WHO Grad I

**Tabelle 4.2:** Sphären-Formation von dissoziierten Zellen aus MPNST Tumorfriechmaterial, Zellen von MPNST Primärkulturen sowie Zellen etablierter MPNST Zelllinien. Gelistet sind die verwendeten Materialien angegeben mit pathologischen Befunden und der maximalen Passagierung.

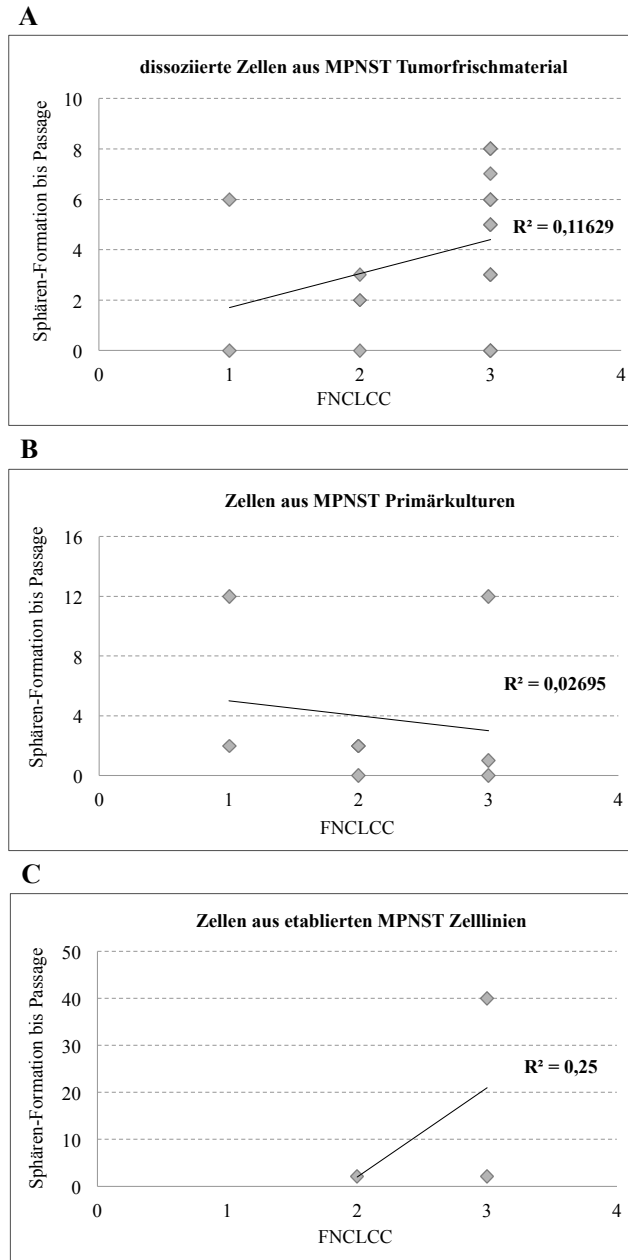
<b>Tumor ID</b>	<b>Sphären-Formation bis Passage (P)</b>	<b>Ausgangszellen/Proben und dazu gehörige pathologische Befunde</b>
<b>dissoziierte Zellen aus MPNST Tumorfriechmaterial</b>		
2209,1	8	Sarkom, S100 negativ, epitheloides MPNST möglich; FNCLCC Grad III
2209,2	8	Sarkom, S100 negativ, epitheloides MPNST möglich; FNCLCC Grad III
2231	7	Triton-Tumor, S100 positiv fokal; FNCLCC Grad III, WHO Grad IV
2140	7	MPNST, S100 negativ, CD34 positiv
2256,2	6	MPNST, FNCLCC Grad III
2256,1	6	MPNST, FNCLCC Grad III
1878	6	MPNST (Rezidiv), inhomogen S100 positiv; FNCLCC Grad I
2233	5	MPNST, spindelzellig; FNCLCC III
2131,2	5	MPNST, Metastase, keine weiteren Angaben
2005,2	5	MPNST, keine weiteren Angaben
2005,1	5	MPNST, keine weiteren Angaben
2300	5	MPNST, schwach S100 positiv; FNCLCC Grad III
2284	3	MPNST, Metastase; FNCLCC Grad III
2004	3	MPNST; FNCLCC Grad III
1794	3	MPNST, WHO Grad IV, FNCLCC Grad II
2336	3	MPNST, Rezidiv; keine weiteren Angaben
2306	2	MPNST, Rezidiv; keine weiteren Angaben

Fortsetzung Tabelle 4.2:

<b>Tumor ID</b>	<b>Sphären-Formation bis Passage (P)</b>	<b>Ausgangszellen/Proben und dazu gehörige pathologische Befunde</b>
<b>dissoziierte Zellen aus MPNST Tumorfrischmaterial</b>		
2302	2	MPNST; WHO Grad IV
1916	2	MPNST, keine weiteren Angaben
1844,1	2	Triton-Tumor, FNCLCC Grad II
1797	2	MPNST; FNCLCC Grad II
1905	1	MPNST; keine Gradierung (Lungenbiopsie)
1825	1	MPNST, keine weiteren Angaben
1950,2	6	nicht-NF1 assoziierter MPNST, keine weiteren Angaben
1950,1	5	nicht-NF1 assoziierter MPNST, keine weiteren Angaben
2250	keine	MPNST; FNCLCC Grad III
1907	keine	MPNST; FNCLCC Grad III
1882	keine	MPNST; FNCLCC Grad II
1810	keine	MPNST, Rezidiv
1729	keine	MPNST; FNCLCC Grad I
<b>Zellen aus MPNST Primärkulturen</b>		
2140	16	MPNST, S100 negativ, CD34 positiv
1878	12	MPNST (Rezidiv), inhomogen S100 positiv; FNCLCC Grad I
2004	12	MPNST; FNCLCC Grad III
1905	5	MPNST; keine Gradierung (Lungenbiopsie)
1916	3	MPNST, keine weiteren Angaben
2302	2	MPNST; WHO Grad IV
1797	2	MPNST; FNCLCC Grad II
1794	2	MPNST, WHO Grad IV, FNCLCC Grad II
1729	2	MPNST; FNCLCC Grad I
1639	2	MPNST, keine weiteren Angaben
2300	1	MPNST, schwach S100 positiv; FNCLCC Grad III
1825	1	MPNST, keine weiteren Angaben
1810	1	MPNST, Rezidiv
1602	2	nicht-NF1 assoziierter MPNST, diffus, S100 positiv
1907	keine	MPNST; FNCLCC Grad III
1882	keine	MPNST; FNCLCC Grad II
1771	keine	MPNST, keine weiteren Angaben
1640	keine	nicht-NF1 assoziierter MPNST, keine weiteren Angaben
<b>Zellen aus etablierten MPNST Zelllinien</b>		
<b>462</b>	<b>über 40</b>	<b>MPNST, Rezidiv, FNCLCC Grad III</b>
1844,1	2	Triton-Tumor, FNCLCC Grad II
1507,2	2	MPNST, Rezidiv, FNCLCC Grad III

Eine Regressionsanalyse, aller Proben mit FNCLCC Klassifikation, überprüfte die Korrelation zwischen Dignität des Tumors und Anzahl der Passagen der Sphären-Formation. Für dissoziierte Zellen aus MPNST Tumorfrischmaterial (Abb. 4.1A), Zellen aus Primärkulturen (Abb. 4.1B) sowie Zellen aus etablierten MPNST Zelllinien (Abb. 4.1C) konnte keine eindeutige Korrelation zwischen der Sphären-Passage und dem Grad des Tumors festgestellt werden.

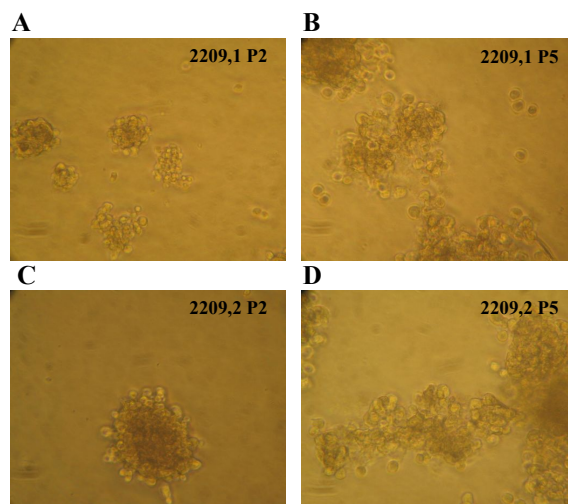
Dennoch kann, trotz des geringen Probenumfanges, eine Tendenz aufgezeigt werden, dass je höher die Klassifizierung des Tumors ausfiel, im Besonderen für Sphären aus Tumorfrischmaterial, umso mehr Passagierungen der Sphären möglich waren.



**Abbildung 4.1:** Regressionsanalyse von (A) dissoziierten Zellen aus MPNST Tumorfrischmaterial, (B) Zellen aus Primärkulturen sowie (C) Zellen aus etablierten MPNST Zelllinien für alle Proben mit FNCLCC Klassifikation.  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß

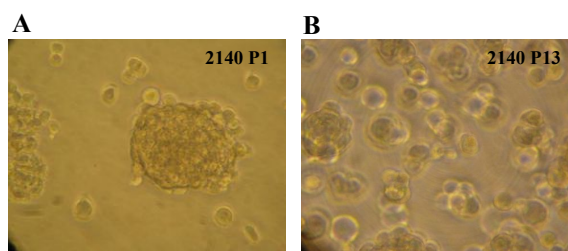
Nachstehend aufgeführt sind beispielhafte Abbildungen für das Wachstum von Sphären unter Stammzellbedingungen für dissoziierte Zellen aus Tumorfrischmaterial, Primärkulturen und etablierte MPNST Zelllinien.

Die Sphären des Tumorfrischmaterials 2209,1 und 2209,2 wiesen ein eher langsames Wachstum auf. Zu beobachten war zudem, dass die Wachstumsgeschwindigkeit abgenommen hat. Nachstehend abgebildet (Abb. 4.2) sind beispielhaft die Kulturen 2209,1 und 2209,2 als Sphären in den Passagen 2 und 5. Sphären aus Tumorfrischmaterial wiesen eine heterogene Sphären-Struktur auf, so dass häufig sowohl reguläre als auch (unspezifische) irreguläre Formen zu erkennen waren. Abbildung 4.2A und C deutet auf ein sphärenhaftes Wachstum hin wobei Abbildung 4.2B und D unter anderem auch irreguläre unspezifische Aggregationen aufweisen könnte.



**Abbildung 4.2:** Sphären-Formation aus Tumorfrischmaterial 2209,1 in den Passagen (A) 2 und (B) 5 sowie aus 2209,2 dargestellt für die Passagen (C) 2 und (D) 5.

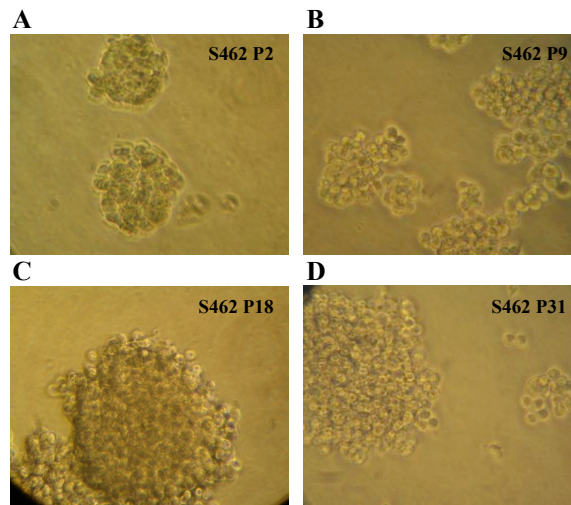
Folgend abgebildet (Abb. 4.3) ist die Primärkultur 2140 in Stammzellmedium. 2140 zeichnete sich vor allem durch das Wachstum als Einzelsuspension aus. Eine Sphären-Formation war zudem deutlich zu erkennen. Im Vergleich zu S462 wies 2140 unter Stammzellbedingungen eine langsamere Proliferation auf, so dass eine Passagierung häufig erst nach ca. 3 Wochen möglich war. Grundsätzlich war für MPNST Primärkulturen das Wachstum auch hier sowohl als reguläre und auch als irreguläre Sphären zu beobachten. Eine unspezifische Aggregation war nicht auszuschließen.



**Abbildung 4.3:** Sphären-Formation der Primärkultur 2140 dargestellt für die Passagen (A) 1 und (B) 13.



Für die meisten Sphären-Kulturen konnte beobachtet werden, dass die Proliferation und Vitalität der Zellen mit erhöhter Passage abnahm. Ein klonales Wachstum konnte nur für die Zelllinie S462 (Spyra *et al.*, 2011) gezeigt werden. Zu erkennen ist das Wachstum der Zellen in Suspension unter Stammzellbedingungen als reguläre Sphären (Abb. 4.4A und C) sowie als irreguläre Sphären (Abb. 4.4B und D). Häufig zu beobachten war das Wachstum als Einzelsuspension vor allem mit erhöhter Passage.



**Abbildung 4.4:** Sphären der etablierten Zelllinie S462 in Stammzellmedium in den Passagen (A) 2, (B) 9, (C) 18 und (D) 31.

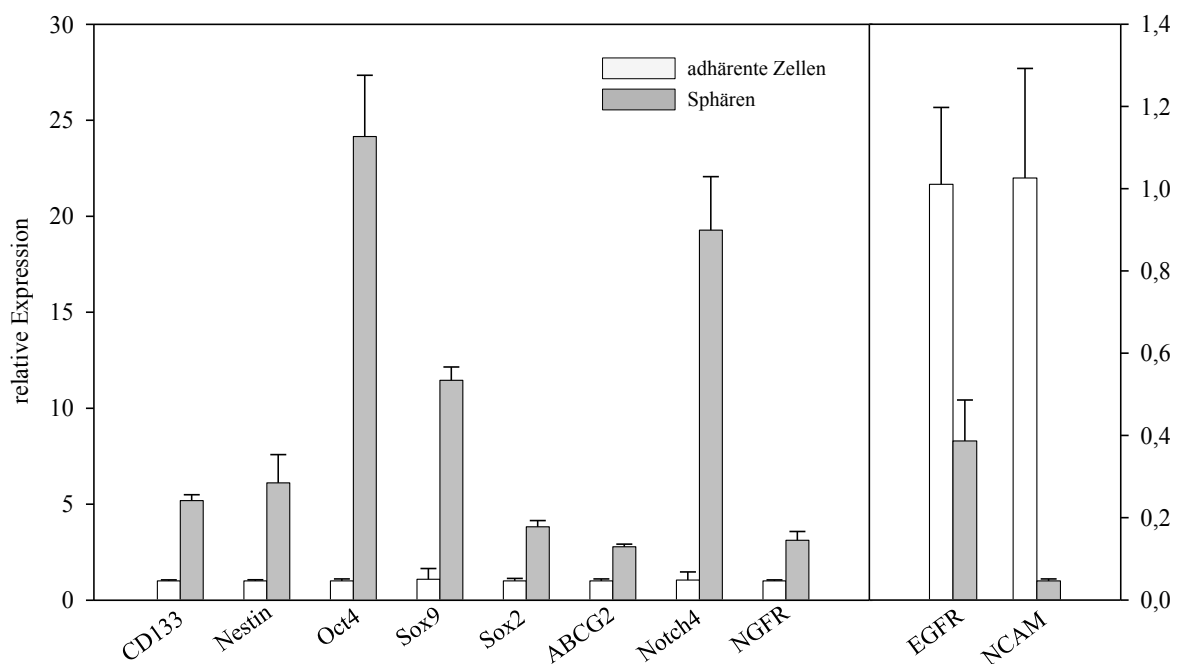
Zellen der etablierten MPNST Zelllinie S462 formten Sphären unter serumfreien Bedingungen über eine Vielzahl von Passagen. Sie setzte sich damit deutlich von den Zellen anderen Proben und Linien ab. Eine weitere Charakterisierung hinsichtlich stammzell- oder stammzellähnlicher Eigenschaften bezog sich daher auf diese Zellen.

### 4.1.2 Genexpression von Sphären

#### a) Genexpression (Real-Time PCR)

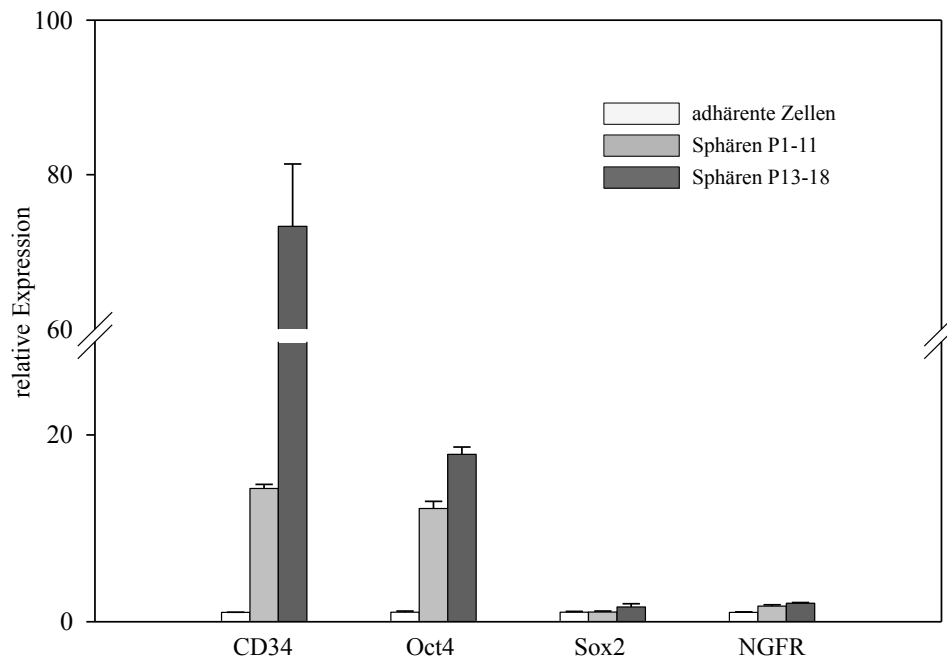
Zunächst wurde die Expression verschiedener neuronaler oder allgemeiner Stammzellmarker untersucht. Um einen Einfluss des serumhaltigen Mediums auf die Expression für verschiedene Stammzellmarker auszuschließen, wurde die adhärente Kultur unter serumfreien Bedingungen in Stammzellmedium für einen Zeitraum von 14-16 h kultiviert und als Kontrolle für die Expression der Sphären eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.5 gezeigt, ist eine erhöhte Expression für den Stammzellmarker CD133 in S462 Sphären zu erkennen. Des Weiteren wiesen S462 Sphären eine erhöhte Expression für die neuronalen Stammzellmarker Nestin, Oct4 und Sox9 auf. Auch die Marker für Tumorstammzellen Notch4 und ABCG2 zeigten eine erhöhte Expression. Sox2, ein Marker für sowohl Tumorstammzellen als auch für neuronale Vorläuferzellen, zeigte eine erhöhte Expression. Der Marker für Schwann-Zellen und Neuronen, NGFR, wies ebenfalls eine erhöhte Expression auf. Dagegen ist eine verringerte Expression für die Marker EGFR (neuronale Vorläuferzellen) und NCAM (neuronale Zellen & Schwann-Zellen) bei S462 Sphären in den Passagen 13 bis 16 zu erkennen (Abb. 4.5)



**Abbildung 4.5:** Relative Genexpression der S462 Sphären in den Passagen 13-16 im Vergleich zu adhärenen S462 Zellen, die für 14-16 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Alle gemessenen Werte zeigten signifikante Unterschiede.

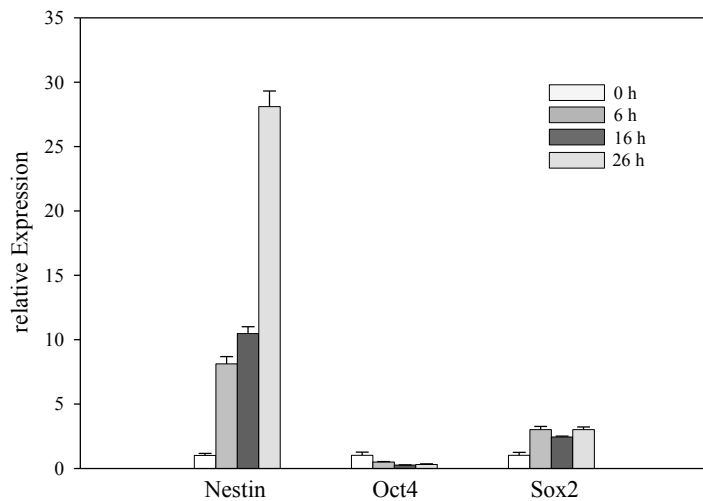
Um eine kontinuierliche Anreicherung der Tumorstammzellen in der sphäroiden S462 Kultur zu prüfen, wurde die Expression von CD34, Oct4, Sox2 und NGFR in verschiedenen Passagen der Sphären untersucht. Für alle vier Marker konnte ein Anstieg der Expression von junger (P1-11) zur älteren (P13-18) Passage der sphäroiden Kultur beobachtet werden. Besonders bei CD34 und Oct4 ist die Zunahme der Expression erheblich bzw. deutlich (Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6:** Anstieg der Expression einiger Marker von junger (1-11) zur älteren (13-18) Passage der S462 Sphären (adhärente S462 16-18 h). Bis auf die Expression von Sox2, für adhärente S462 Zellen gegen S462 Sphären P1-11 und S462 Sphären P1-11 gegen Sphären P13-18, ist der Unterschied der Genexpression in den verschiedenen Passagen signifikant.

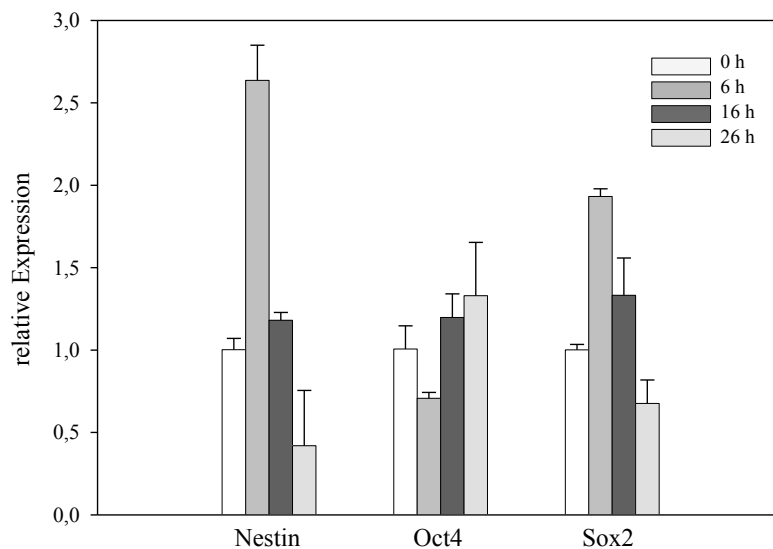
### ***b) Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf die Genexpression***

Um den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Genexpression zu prüfen, wurde die adhärente Zelllinie S462 für verschiedene Inkubationszeiten unter serumfreien Bedingungen kultiviert, wobei ein Anstieg der Expression für Nestin und Sox2 zu beobachten war. Die Expression von Nestin stieg kontinuierlich, während die Expression von Sox2 bereits nach 6 Stunden den maximalen Wert erreicht hat (Abb. 4.7). Eine Abnahme der Expression lag beim neuronalen Stammzellmarker Oct4 vor.



**Abbildung 4.7:** Genexpression der adhärenenten Kultur S462 (P35) unter Stammzellbedingungen für 0 - 26 h. Alle gemessenen Werte zeigten einen signifikanten Unterschied bis auf die Probe 16 h gegen 26 h für Oct4 und 6 h gegen 26 h für Sox2.

Weiter wurden S462 Sphären für 0 - 26 h unter serumhaltigen Standardbedingungen kultiviert und anschließend die Expression für Nestin, Oct4 und Sox2 gemessen, wobei ein Anstieg der Expression für Nestin und Sox2 nach 6 h, gefolgt von einer Abnahme nach 16 h sowie 26 h zu beobachten war. Die Expression von Oct4 wies zunächst einen Abfall der Expression nach 6 h auf, gefolgt von einem Anstieg der Expression nach 16 h sowie 26 h (Abb. 4.8).



**Abbildung 4.8:** Genexpression von S462 Sphären (P19) unter serumhaltigen Standardbedingungen für einen Zeitraum von 0 - 26 h. Alle gemessenen Werte zeigten einen signifikanten Unterschied bis auf 0 h gegen 16 h bzw. 26 h sowie 16 h gegen 26 h für Oct4 und 0 h gegen 16 h für Sox2.

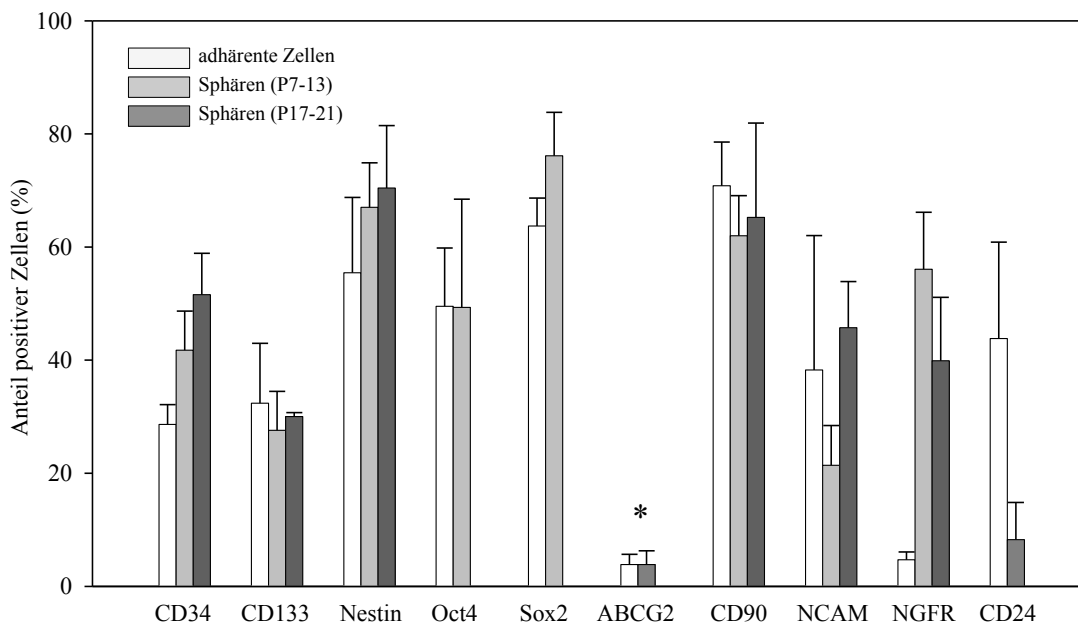
Die Überprüfung der Kultivierungsbedingungen auf die Expression verschiedenster Marker zeigte somit einen deutlichen Einfluss auf dessen Expression und sollte für weitere Versuche berücksichtigt werden.

### ***c) Proteinexpression (Durchflusszytometrie)***

Für die Validierung der Daten aus der Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine absolute Messung auf Proteinebene vorgenommen. Hierfür wurde erneut ein Vergleich von S462 Sphären zu deren adhärenenten Kultur gezogen. Für einen Teil der Marker wurden zusätzlich zwei verschiedene Passagen der S462 Sphären miteinbezogen und vergleichend zur adhärenenten Kultur aufgestellt. Neben den Markern aus der Genexpressionsanalyse wurden noch weitere Marker wie CD24 als Marker neuronaler Vorläuferzellen sowie CD90 als Fibroblastenmarker bzw. Differenzierungsmarker hinzugezogen. Abbildung 4.9 zeigt den Vergleich von S462 Sphären zur adhärenenten S462 Kultur. Sox2 wies einen leicht erhöhten Anteil positiver Zellen der S462 Sphären auf und stimmt somit mit den Ergebnissen aus der Genexpressionsanalyse überein. Für den Stammzellmarker CD34 konnte ebenfalls eine Zunahme positiver Zellen von adhärenenter Kultur zu S462 Sphären beobachtet werden. Ferner zeigte sich bei einem Vergleich der sphäroiden Kultur S426 von Passage 7 zu Passage 20 eine Zunahme positiver Zellen für CD34. Die Ergebnisse stimmen zudem mit den Ergebnissen aus der Expressionsanalyse überein (siehe Abb. 4.6). Für den Stammzellmarker Nestin konnte auch eine Zunahme an Nestin-positiven Zellen von adhärenenter S462 Kultur zu S462 Sphären beobachtet werden. Zudem zeigte auch hier ein Vergleich von junger zu älterer Sphären-Passage eine Zunahme positiver Zellen. Auf Genexpressionsanalyse konnte dies nicht reproduzierbar bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Für den Differenzierungsmarker CD24 ist ein deutlich geringerer Anteil an CD24 positiven Zellen in der sphäroiden S462 Kultur zu erkennen, so dass diese Kultur einer undifferenzierten Kultur entsprechen könnte. Der Marker NGFR wies wie auf Genexpressionsebene eine Zunahme positiver Zellen in der jüngeren sphäroiden S462 Passage auf. Bei Passage 20 der S462 Sphären zeigte sich im Gegensatz zur Expressionsanalyse eine Abnahme positiver Zellen für NGFR. Eventuell besteht hier eine veränderte post-transkriptionale Regulierung. NCAM wies in der adhärenenten Kultur einen höheren (nicht signifikanten) Anteil positiver Zellen auf. Dieser Anteil nahm in der jüngeren sphäroiden S462 Kultur zunächst ab, stieg jedoch wieder in höheren Passagen an. Auf Genexpressionsebene konnte zunächst auch eine verringerte Expression beobachtet werden (siehe Abb. 4.5). Ein anschließender Anstieg der Expression in einer höheren Passage konnte nicht

bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Anteil CD90 positiver Zellen hat in den jüngeren Passagen der S462 Sphären tendenziell zunächst abgenommen, stieg jedoch bei höheren Passagen tendenziell wieder an.

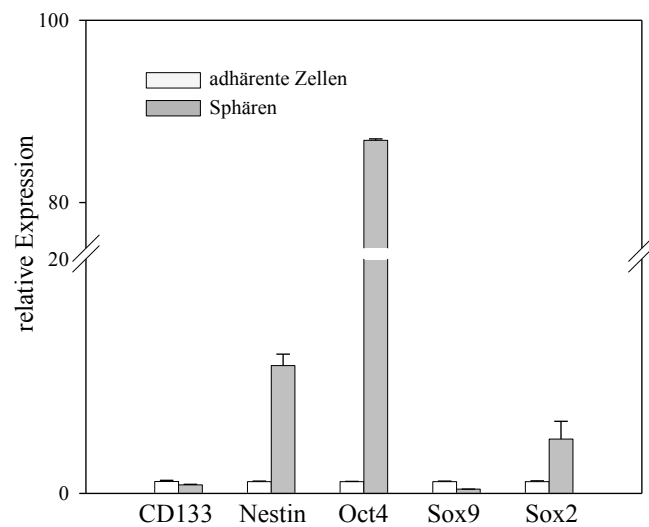
Für CD133 konnte keine Zunahme beschrieben werden. Für den neuronalen Stammzellmarker Oct4 ist bei einem Vergleich auf Proteinebene kein Unterschied von adhärenter zur sphäroiden S462 Kultur zu erkennen, wohingegen die Genexpressionsanalyse (siehe Abb. 4.5) eine deutlich erhöhte Expression in den Sphären aufwies. Für den Marker des ABCG2-Transporters ist kein Unterschied bei der Betrachtung beider Kulturen zu beobachten. Der Anteil an positiven Zellen lag um 1%. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine erhöhte Expression für S462 Sphären.



**Abbildung 4.9:** absolute Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie: Vergleich von adhärennten S462 Zellen und S462 Sphären; für einige Marker sind zusätzlich zwei verschiedene Passagen (P7-13 bzw. P17-21) gemessen worden. Signifikante Unterschiede bestehen nur für die adhärennte Kultur im Vergleich zu beiden sphäroiden Kulturen für die Marker CD34 und NGFR sowie für die Sphären-Kulturen (P7 vs. P20) für NCAM. Die Marker CD24 und Sox2 sind auch signifikant unterschiedlich; \* die real gemessenen Werte entsprechen 1/10 der oben dargestellten Balken.

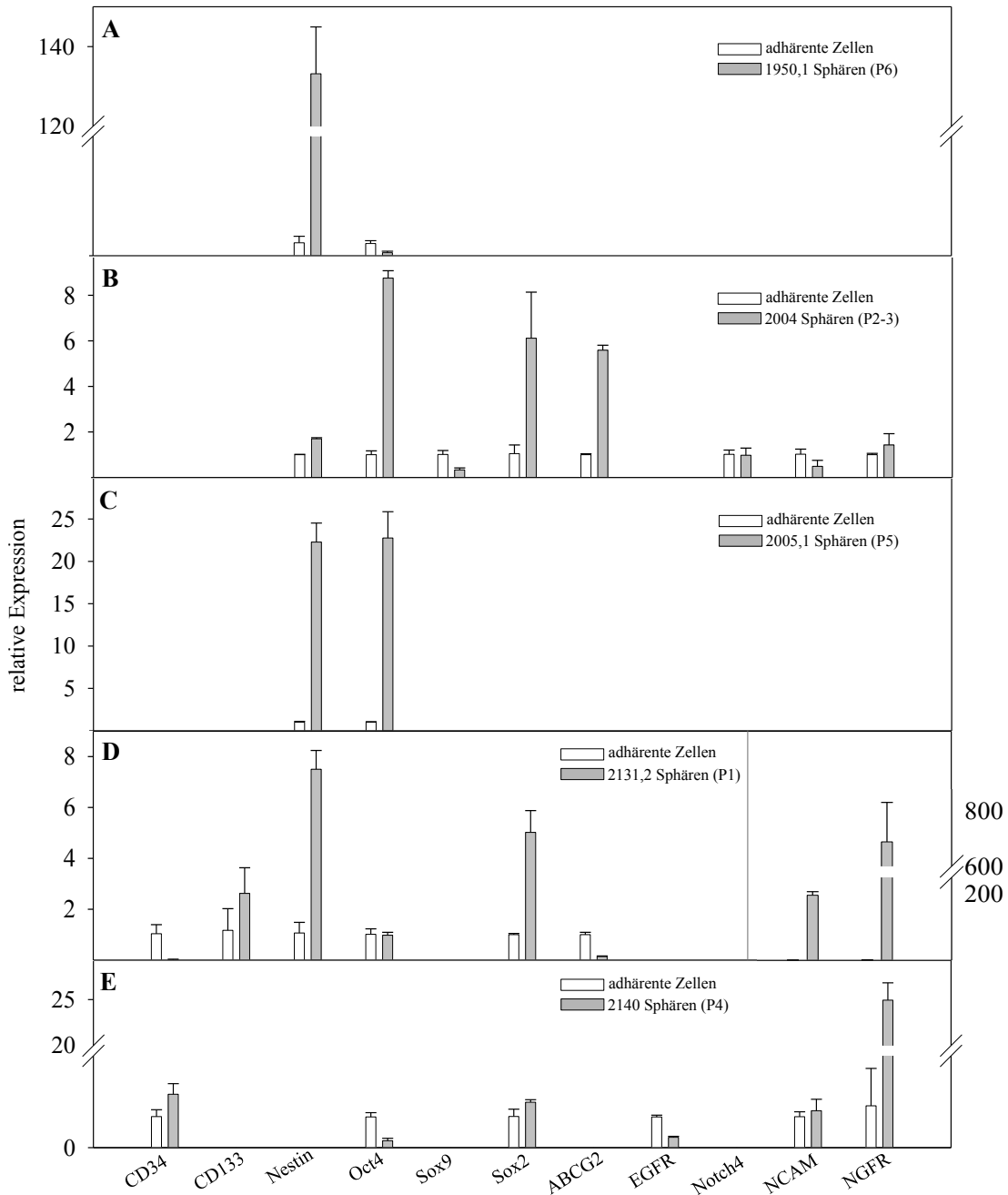
#### **d) Genexpression weiterer MPNST Sphären**

Bei Sphären (P2) aus einer weiteren etablierten MPNST Zelllinie S1507,2 wurde eine erhöhte Expression von Nestin, Oct4 und Sox2 beobachtet (Abb. 4.10); für die Marker CD133 und Sox9 dagegen eine verringerte Expression.



**Abbildung 4.10:** relative Expression der Sphären (Passage 2) der etablierten Zelllinie S1507,2 (Passage 25). Alle gemessenen Werte zeigten einen signifikanten Unterschied. Aufgrund der geringen Replikatzahl konnte für den Marker Oct4 kein t-Test gemacht werden.

Für die Sphären 1950,1 (P6) aus direkt dissoziierten Zellen von MPNST Frischgewebe konnte für den Marker Nestin eine erhöhte Expression beobachtet werden (Abb. 4.11A). Die Expression von Oct4 war bei 1950,1 verringert. Als Vergleichsprobe diente die adhärenente Primärkultur 1950,1 (P3). Die Sphären 2004 (P2-3) zeigten ebenso für eine Reihe von Stammzellmarkern wie Nestin, Oct4, Sox2, ABCG2 und NGFR eine erhöhte Expression der stammzellähnlichen Sphären im Vergleich zur adhärenenten Primärkultur (P6-7) (Abb. 4.11B). Eine verringerte Expression lag für Sox9, Notch4 und NCAM vor. Sphären von 2005,1 (P5) wiesen eine erhöhte Expression für Nestin und Oct4 im Vergleich zur adhärenenten Kultur (P4) auf (Abb. 4.11C). Für die sphäroide Kultur 2131,2 (P1) konnte eine erhöhte Expression für die Stammzellmarker CD133, Nestin, Sox2 sowie NGFR und NCAM im Vergleich zur adhärenenten Kultur (P3) beobachtet werden. Eine verringerte Expression lag für die Marker CD34, Oct4 und ABCG2 vor (Abb. 11D). Die Sphären 2140 (P4) wiesen für die Stammzellmarker CD34 sowie Sox2 eine erhöhte Expression auf (Abb. 4.11E). Die Marker NCAM und NGFR zeigten ebenfalls eine leicht erhöhte Expression bzw. deutlich erhöhte Expression. Für Oct4 sowie EGFR konnte eine verringerte Expression im Vergleich zur adhärenenten Kultur (P3) beobachtet werden.



**Abbildung 4.11:** Genexpression von Sphären aus dissoziierten Zellen von Tumorfrischmaterial im Vgl. zur Primärkultur. Alle Werte zeigen einen signifikanten Unterschied (A) 1950,1; eine statistische Analyse (t-Test) der Primärkultur 1950,1 für den Marker Nestin konnte aufgrund der zu geringen Replikatzahl nicht gemacht werden. (B) 2004; Notch4, NCAM und NGFR zeigten keinen signifikanten Unterschied. (C) 2005,1 (D) 2131,2; Oct4 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Eine statistische Analyse (t-Test) für die adh. Primärkultur und die Sphären-Kultur 2131,2 für den Marker CD133 konnte aufgrund der zu geringen Replikatzahl nicht gemacht werden (E) 2140; NCAM zeigte keinen signifikanten Unterschied. Eine statistische Analyse (t-Test) der adhären Primärkultur 2140 und der Sphären-Kultur 2140 für die Marker CD34 und Oct4 konnte aufgrund der zu geringen Replikatzahl nicht gemacht werden.



Zusammenfassend für die Primärkulturen im Vergleich von adhärenter zu stammzellähnlicher sphäroider Kultur lässt sich sagen, dass die Stammzellmarker Nestin und Sox2 sowie NGFR eine erhöhte Expression in den getesteten Sphären aufwiesen. Alle weiteren geprüften (Stammzell-)Marker zeigten eine differenzielle Expression. Da nicht für jede Sphären-Kultur alle Marker geprüft werden konnten, beispielsweise auf Grund von zu geringer Zellverfügbarkeit, kann an dieser Stelle nur von einer Tendenz gesprochen werden.

***e) Expression von (Stammzell)-Markern an MPNST und PNF: Immunhistochemie***

Neben dissoziierten Zellen aus Tumorfrischgewebe wurden Primärkulturen bzw. etablierte Zelllinien auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen oder stammzellähnlichen Zellen mittels serumfreier Kultivierung untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Analyse ausgewählter Tumore von NF1 Patienten. Es erfolgte die Untersuchung der Expression von diversen Markern (Tab. 4.3) direkt an 4 MPNST Proben (u.a. 462) sowie 5 PNF Proben. Zusätzlich wurden 2 Maus-MPNST Xenograft-Tumore aus subkutanen Injektionen von S462 Sphären (1961,1) und adhärenenten S462 Zellen (1983,1) analysiert.

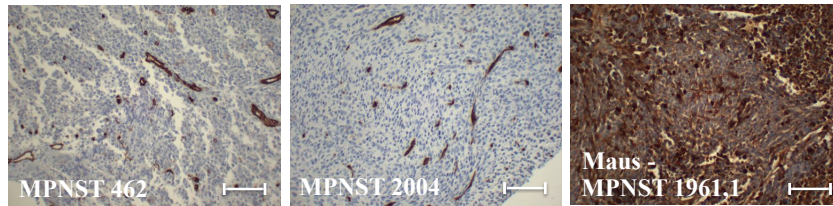
Die Auswertung der Proben wies CD34 positive Zellen in allen untersuchten Proben auf. Zu berücksichtigen ist hier die Verwendung von CD34 auch als Endothelmarker. Somit konnte auch die Färbung von Gefäßstrukturen beobachtet werden. Nestin, Sox9 und NGFR waren überwiegend schwach bis positiv. CD133, EGFR und NCAM dagegen waren überwiegend negativ (mit Ausnahme von EGFR für PNF Gewebeproben) (Abb. 4.12 & 4.13; Tab. 4.3). Auffallend ist die überwiegend positive Färbung von allen Markern, auch CD133, EGFR und NCAM für beide Maus-MPNST Xenograft-Proben (Tab. 4.3). Eine unspezifische Bindung bzw. Kreuzreaktion der Antikörper ist für diese Fälle nicht auszuschließen.

**Tabelle 4.3:** Immunhistologische Färbungen von MPNST und PNF Proben. In Klammern dargestellt ist der prozentuale Anteil der positiven adhärennten Zellen der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zum direkten Vergleich des Originaltumors 462 (n.d. = nicht durchgeführt).

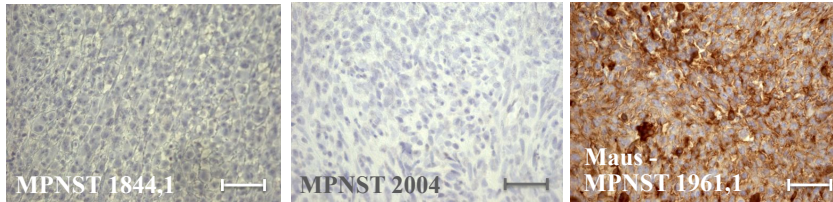
Tumor ID	CD34	CD133	Nestin	Sox9	EGFR	NCAM	NGFR
<b>MPNST von Patienten</b>							
<b>462</b>	positiv (28%)	negativ (32%)	positiv (55%)	positiv	negativ	negativ (38%)	sehr schwach positiv (5%)
<b>1844,1</b>	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	schwach positiv
<b>1878</b>	positiv	n.d.	positiv	n.d.	positiv	negativ	n.d.
<b>2004</b>	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	sehr schwach positiv
<b>MPNST von Maus-Xenografts</b>							
<b>1961,1</b>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<b>1983,1</b>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	schwach positiv
<b>PNF von Patienten</b>							
<b>1884</b>	positiv	negativ	schwach positiv	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>2029</b>	positiv	negativ	schwach positiv	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>2138</b>	positiv	sehr schwach positiv	sehr schwach positiv	positiv	schwach positiv	schwach positiv	positiv
<b>2144</b>	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	schwach positiv	positiv
<b>2211</b>	positiv	sehr schwach positiv	schwach positiv	positiv	positiv	negativ	positiv

Die nachstehenden Abbildungen 4.12 und 4.13 zeigen exemplarisch Immunfärbungen der verwendeten Patienten- bzw. Mausgewebeproben. Die originale Tumorprobe des Patienten 462 wies für die Marker NCAM und CD133 keine Übereinstimmung im Vergleich zu adhärennten S462 Zellen auf.

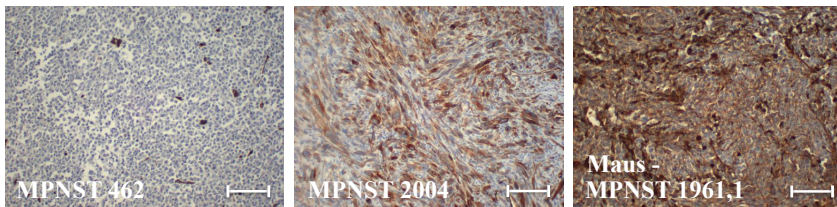
**CD34**



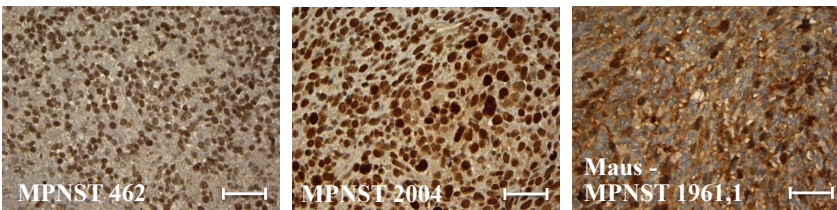
**CD133**



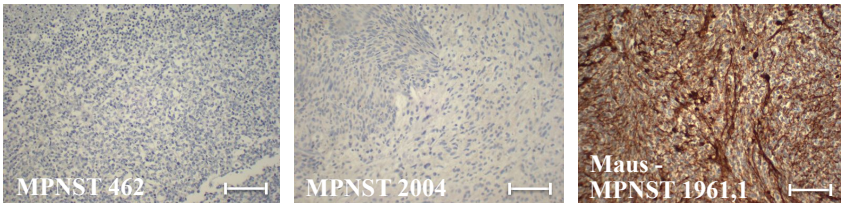
**Nestin**



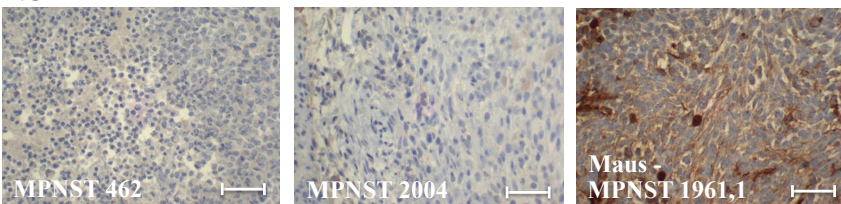
**Sox9**



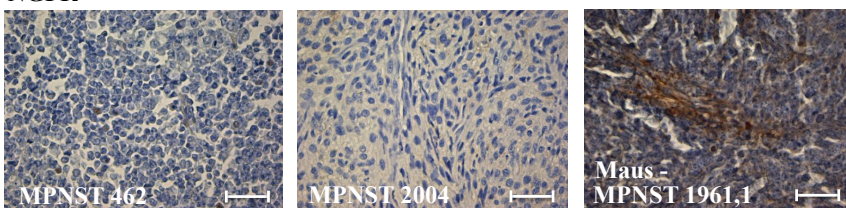
**EGFR**



**NCAM**



**NGFR**



**Abbildung 4.12:** immunhistologische Färbungen von MPNST Gewebeproben. Maßstabsbalken für CD34, Nestin & EGFR = 100 µm; für CD133, Sox9, NCAM & NGFR = 50 µm

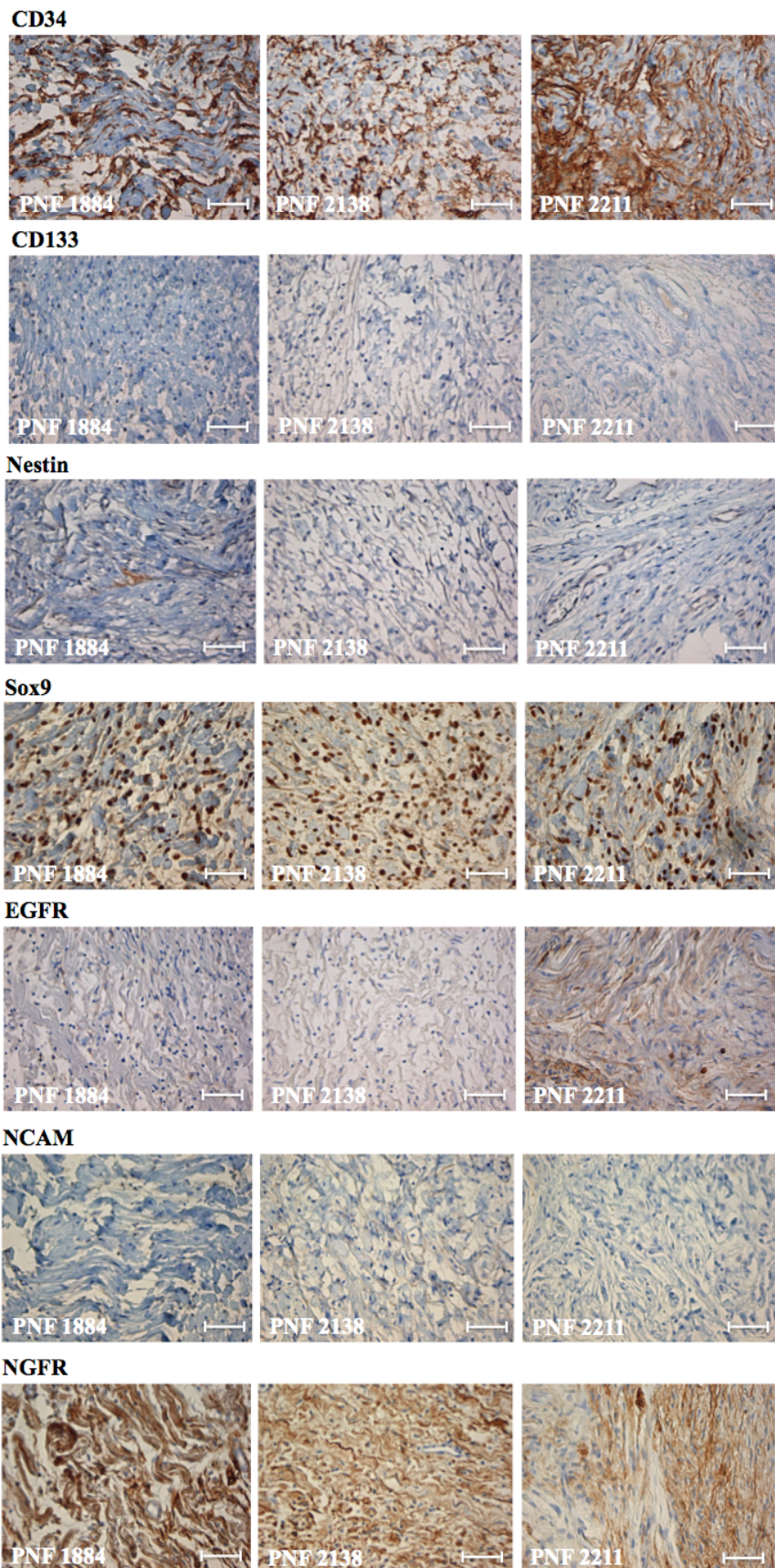


Abbildung 4.13: immunhistologische Färbungen von PNF Gewebeproben. Maßstabsbalken = 50 µm

### 4.1.3 Whole Genome Expressionsprofiling der S462 Sphären

Die Whole Genome Micro-Array Genexpressionsanalyse diente zur Untersuchung der globalen Expression der S426 Sphären (P16) im Vergleich zu adhärenenten S462 Zellen (16 h). Analysiert wurden 54.100 SONDENSSETS des GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays. Ca. 30% der Sets zeigten eine differenzielle Expression auf, wobei ca. 13,4% Gene in der sphäroiden Kultur herunterreguliert und ca. 15,6% hochreguliert vorlagen.

#### a) *Bestätigung der Expression von Stammzellmarkern*

Eine veränderte Expression der S462 Sphären für CD34, Nestin, EGFR und NGFR in der vorherigen Real-Time PCR konnten für die untersuchten Marker in der Arrayanalyse bestätigt werden, wobei einige Sonden im Array für EGFR keine Veränderung aufzeigten. Sox2, CD133 und Oct4 dagegen zeigten bei einer automatischen Analyse der Daten keine veränderte Expression. Bei einer genaueren Betrachtung der Signalstärke für Oct4 lagen die Werte unterhalb der Detektionsgrenze zum Nachweis einer Expressionsänderung, jedoch deutete ein Wert auf eine erhöhte Expression hin und konnte somit nur bedingt bestätigt werden. Die Signalstärken für Notch4, ABCG2 und NCAM waren zu schwach für eine Auswertung bzw. zeigten für NCAM einige Signale, die keine veränderte Genexpression aufwiesen. Sox9 wies eine eindeutig verminderte Expression im Vergleich zu den Ergebnissen der Real-Time PCR auf (Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4:** Ergebnisse zur Übereinstimmungen der Micro-Arrayanalyse im Vergleich zur vorherigen Real-Time PCR der S462 Sphären („-“ = nicht auswertbar).

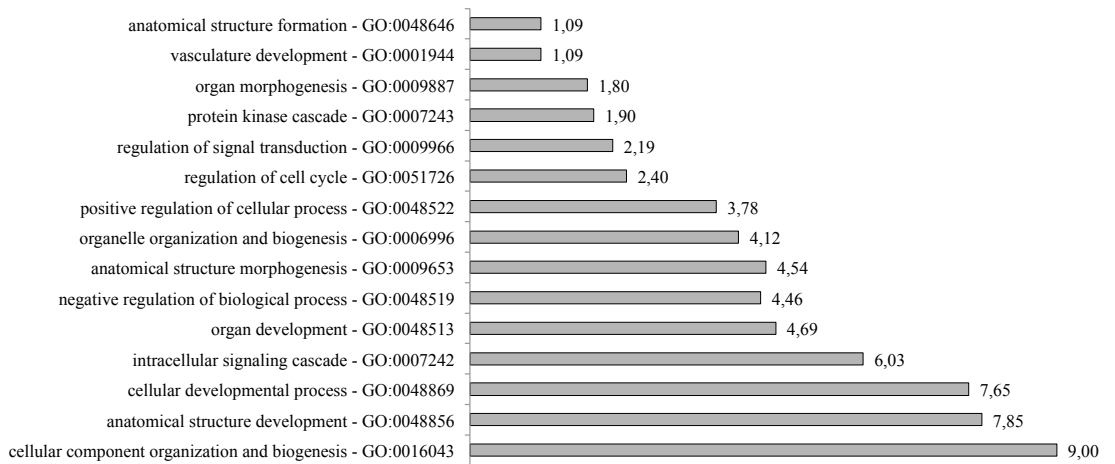
	CD34	CD133	Nestin	Oct4	Sox9	Sox2	ABCG2	EGFR	Notch4	NCAM	NGFR
<b>Real-Time PCR</b>	hoch	hoch	hoch	hoch	hoch	hoch	hoch	runter	hoch	runter	hoch
<b>Micro-Array</b>	hoch	keine Änderung	hoch	keine Änderung	runter	keine Änderung	Signal zu schwach	runter bzw. keine Änderung	Signal zu schwach	Signal zu schwach bzw. keine Änderung	hoch
<b>Übereinstimmung</b>	ja	nein	ja	nein	nein	nein	-	ja	-	-	ja

#### b) *Funktionale Gruppierung differenziell regulierter Gene*

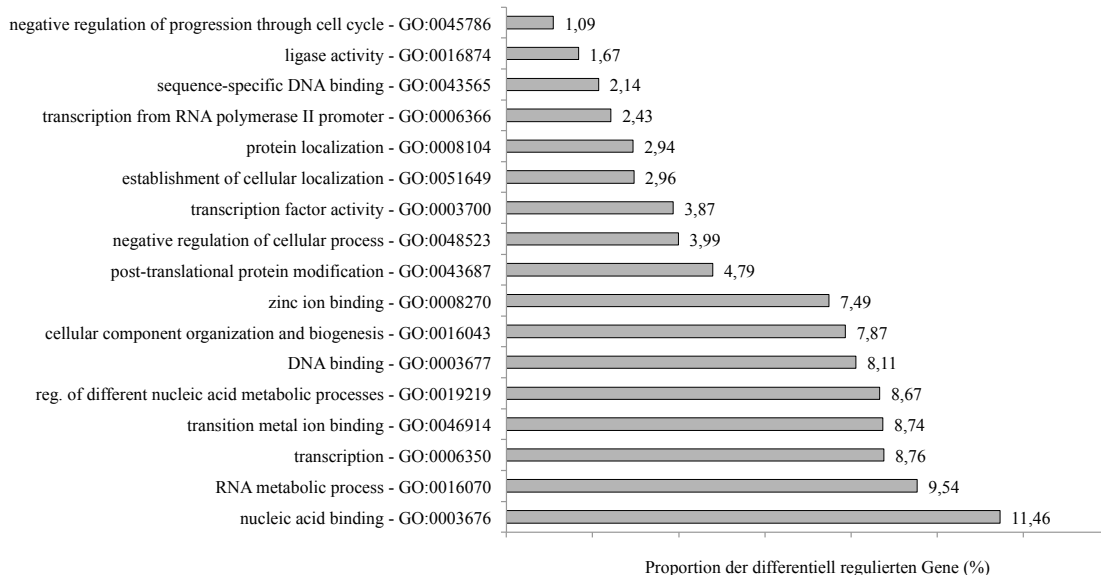
Um eine Strukturierung der differenziell regulierten Gene vorzunehmen, wurden funktionale Gruppierungen der hoch- und herunterregulierten Gene mit einer Signal Log Ratio (SLR) von

mehr als 1 bzw. -1 mittels der Software *EXPANDER* erstellt (Abb. 4.14). Die Herunterregulierung von Genen in einigen funktionalen Gruppen, wie z.B. „*anatomical structure formation*“, „*anatomical structure development*“ und „*cellular developmental process*“ der S462 Sphären stimmen mit einem undifferenzierten Zelltyp überein. Dagegen wurden auch Änderungen in der Genexpression für Gruppen wie „*regulation of cell cycle*“ oder „*protein kinase cascade*“ gefunden, für die keine direkte Rolle bei Zelltypen mit stammzell- oder stammzellähnlichen Eigenschaften bekannt ist (Abb. 4.14A). Gene mit hoch regulierter Expression waren in Gruppen wie „*negative regulation of progression through cell cycle*“, „*negative regulation of cellular process*“ oder „*transcription*“ zu finden. Für jene Gruppen sind jedoch keine bekannten Rollen in der Biologie undifferenzierter, stammzellähnlicher Zellen beschrieben (Abb. 4.14B).

A



B



Proportion der differentiell regulierten Gene (%)

**Abbildung 4.14:** Funktionale Gruppierung der (A) herunter- und (B) hochregulierten Gene. GO: Gene Ontology-Nummern.

Zusammenfassend fiel ein Großteil der resultierenden funktionalen Gruppen in Bereiche, die keine stammzell- oder undifferenzierten Zellen beschreiben. Eine weitere Eingrenzung der differenziell regulierten Gene erfolgte durch eine Analyse der hoch- und runterregulierten Gene mit einer SLR von mehr als 3 bzw.  $-3$ . Die Auswertung der Daten ergab die Gruppierung von herunterregulierten Genen, die an Entwicklungsprozessen wie z.B. der Blutgefäßentwicklung, Zellmigration und Zellmortalität beteiligt sind (Tab. 4.5).

**Tabelle 4.5:** Funktionale Gruppierung herunterregulierter Gene mit einer SLR  $> -3$

GO-Nummer	Funktion	%	p-Wert
GO:0001944	vasculature development	6,71	2,41E-11
GO:0001568	blood vessel development	6,47	7,94E-11
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	5,76	5,77E-10
GO:0016477	cell migration	6,24	4,32E-09
GO:0048870	cell motility	6,47	1,03E-08
GO:0051674	localization of cell	7,19	1,55E-06
GO:0006928	cell motion	7,19	1,55E-06

Für hochregulierte Gene mit einer SLR  $> 3$  (Tab. 4.6) konnten funktionale Gruppierungen gebildet werden, die vor allem Komponenten der Plasmamembran enthielten. Dazu gehörten beispielsweise G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder membranständige Proteine wie CD34. Einige Gene gehörten zudem der funktionalen Gruppierung „*response to endogenous or hormone stimulus*“ an, wie beispielsweise RERG (*RAS-like estrogen-related growth inhibitor*).

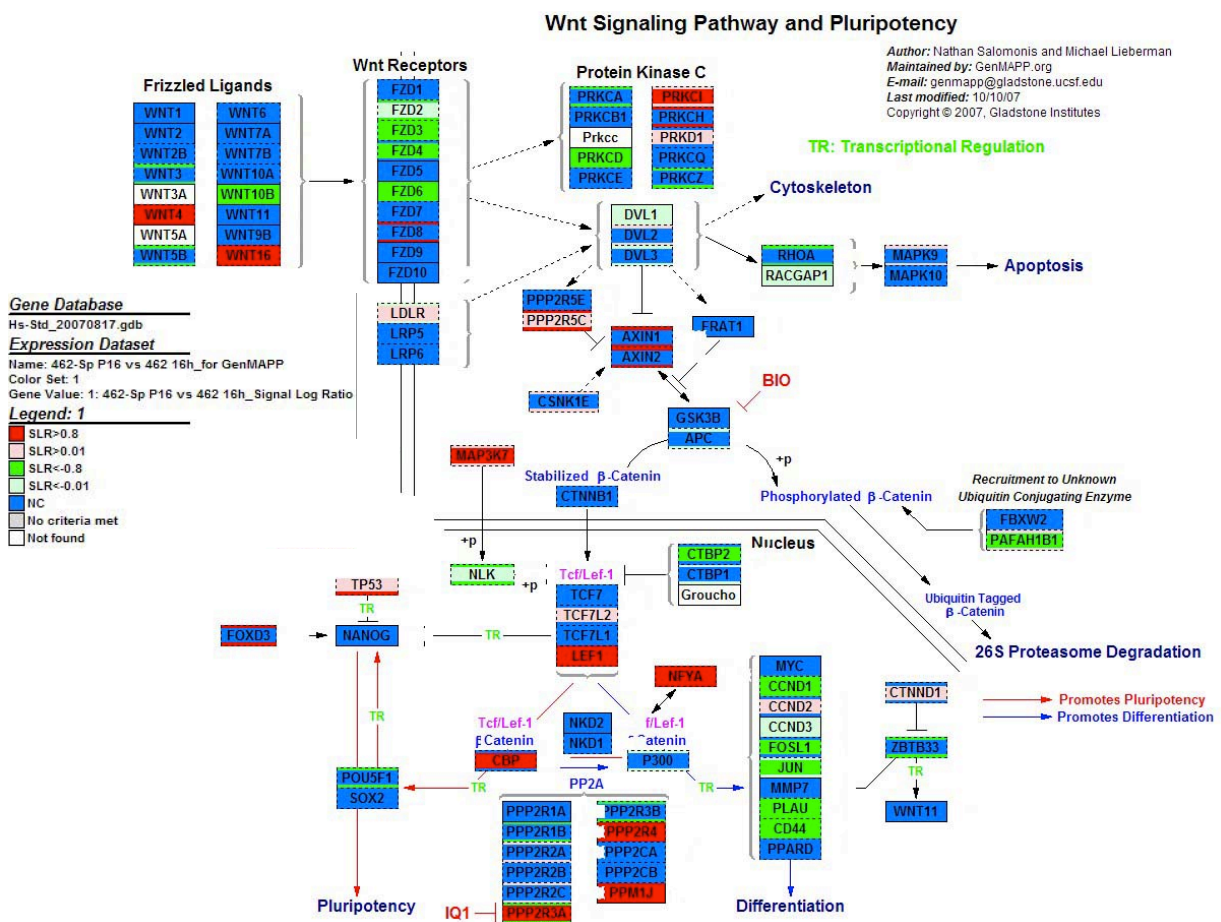
**Tabelle 4.6:** Funktionale Gruppierung hochregulierter Gene mit einer SLR  $> 3$

GO-Nummer	Funktion	%	p-Wert
GO:0009719	response to endogenous stimulus	5,92	6,85E-05
GO:0010033	response to organic substance	8,45	7,19E-05
GO:0009725	response to hormone stimulus	5,07	5,04E-04
GO:0005887	integral to plasma membrane	11,27	2,74E-04
GO:0031226	intrinsic to plasma membrane	11,27	4,30E-04
GO:0044459	plasma membrane part	15,49	0,0151
GO:0005886	plasma membrane	23,38	0,0467

### c) *Ergebnisse der Signalweg-Analyse differenziell regulierter Gene*

Auffallend war, dass einige Gene mit den stärksten Arraysignalen der S462 Sphären, Proteine kodierten, die Funktionen bei verschiedenen Signaltransduktionswegen aufweisen. Vor allem Gene wie *DKK1* (*Dickkopf Homolog*), *BCL9L* (*B-Cell CLL/Lymphoma 9-like*), *DKK1L*

(Dickkopf-like 1) und *CTNNB1* (Catenin (Cadherin-Associated Protein) Beta 1)) sind Komponenten des Wnt-Signalweges. Die Signalweg-Analyse wies eine Vielzahl differenziell regulierter Gene im Wnt-Signalweg auf (Abb. 4.15). Zu diesen Genen gehörten beispielsweise Frizzled-Liganden, Wnt-Rezeptoren und Proteinkinasen sowie auch Transkriptionsfaktoren. Zudem wiesen Gene der Differenzierungslinie (z.B. *JUN* oder *CD44*) eine verminderte Expression auf, so dass es sich bei den S462 Sphären um weniger differenzierte Zellen handeln könnte. Abbildung 4.15 zeigt die Signalkaskade um den Wnt-Signalweg mit den entsprechend differenziell regulierten Genen in farblichen Abstufungen.



**Abbildung 4.15:** Differenziell regulierte Wnt-Signalkaskade dargestellt in farblichen Abstufungen in Abhängigkeit der veränderten Genexpression (siehe Legende). Die gestrichelten Linien weisen auf multiple Gen ID's hin, die einem Kandidaten zugesprochen werden. Wenn zwei Farben innerhalb eines Kandidatengens vorliegen, weist dies auf ein Gen hin, welches multiplen korrespondierenden Gen ID's zugesprochen werden kann. Die innere Farbe basiert auf dem häufigsten repräsentativen Kriterium, während die äußere Umrandung dem zweit häufigstem repräsentativen Modus entspricht.



Eine Sortierung der differentiell regulierten Gene des Wnt-Signalweges anhand der Abbildung 4.15 wies eine erhöhte bzw. verminderte Expression für jeweils 16 bzw. 23 Gene auf (Tab. 4.7). Dabei wurden alle Gene mit einer SLR von  $> 0,8$  und  $< -0,8$  berücksichtigt.

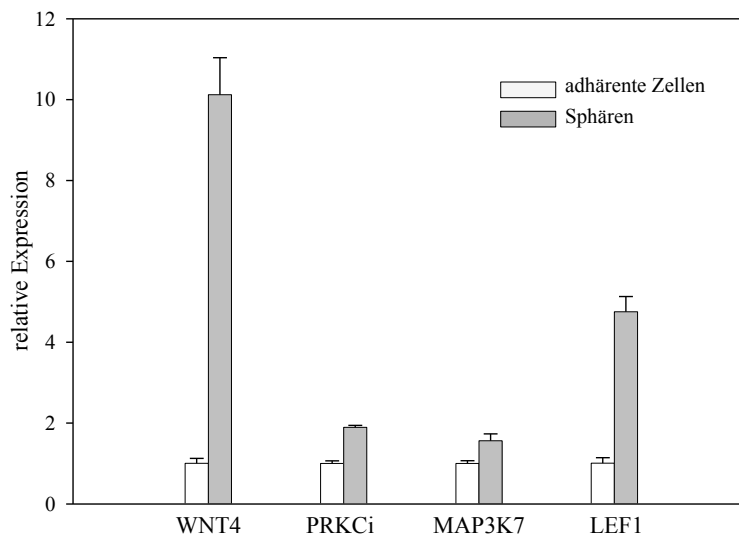
**Tabelle 4.7:** Differenziell regulierte Gene des Wnt-Signalweges. Die Zusammensetzung der Tabelle richtete sich dabei nach der inneren Farbe/Markierung sowie nach einer roten bzw. grünen Außenmarkierung, d. h. Kandidaten wie WNT3 mit einer blauen Innenfarbe und einer grünen Außenfarbe wurden als Kandidaten der Gruppe mit einer SLR von  $< -0,8$  berücksichtigt sowie PPP2R5C mit einer rosafarbenen Innenfarbe und einer roten Außenfarbe als Kandidat der Gruppe mit einem SLR von  $> 0,8$  (siehe Abb. 4.15). Eine Ausnahme für die Auswertung der Daten bestand für PPP2R3A. PPP2R3A wies sowohl eine innere rote Farbe auf als auch eine grüne Außenfarbe und wurde somit als Kandidat nicht berücksichtigt.

<b>hochreguliert; SLR <math>&gt; 0,8</math></b>	<b>Funktion</b>	<b>herunterreguliert; SLR <math>&lt; -0,8</math></b>	<b>Funktion</b>
WNT4 WNT16	Frizzled Liganden	WNT3 WNT5B WNT10B	Frizzled Liganden
FZD8	Wnt-Rezeptor	FZD2 FZD3 FZD4 FZD6	Wnt-Rezeptor
PRKCH PRKCi	Proteinkinase C	PRKCA PRKCD PRKCZ	Proteinkinase C
AXIN1 AXIN2 TP53	Tumorsuppressorgen	RHOA	kleines GTPase Protein
MAP3K7	Serin/Threonin Proteinkinase	PAFAH1B1	Plättchen-aktivierender Faktor Acetylhydrolase 1b, regulator. Untereinheit 1
LEF1 FOXD3	Transkriptionsfaktor	CTBP2	C-terminales Bindungsprotein
NFYA	Nuklearer Transkriptionsfaktor	NLK	Serin/Threonin Proteinkinase
CBP	Transkriptionscoaktivator	CCND1	Zyclin
PPM1J PPP2R4 PPP2R5C	Protein Phosphatase	FOSL1	Leucin-Zipper Protein
		JUN POU5F1	Transkriptionsfaktor
		PLAU	Serin-Protease
		CD44	Rezeptor
		ZBTB33	Regulator der Transkription
		PPP2R1B PPP2R3B	Protein Phosphatase

Zu berücksichtigen waren bei der Analyse zusätzlich die nicht illustrierten herunterregulierten Gene *DKK1*, *DKK2* und *DKK3* in Abbildung 4.15, die als negative Regulatoren des Wnt-Signalweges fungieren. Die Auswertung bzw. Literaturrecherche erfolgte zunächst vorrangig für Gene mit einer SLR > 0,8 (hochreguliert). Hierbei erwiesen sich die Gene *WNT16*, *WNT4*, *FZD8*, *PRKCi*, *MAP3K7*, *LEF1* und *FOXD3* als interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen, da sie bereits in den Zusammenhang mit verschiedenen Tumorentitäten gebracht wurden und von funktionaler Bedeutung sein könnten.

#### d) Validierung von Kandidatengenen des Wnt-Signalweges

Für 4 der 7 Gene wurde eine Validierung mittels Real-Time PCR durchgeführt (Abb. 4.16). Die Ergebnisse der validierten Taq-Man Assays bestätigten eine erhöhte Expression für *LEF1*, *MAP3K7*, *PRKCi* und *WNT4*.



**Abbildung 4.16:** Validierung der „Whole Genome Micro-Array“-Kandidatengene des Wnt-Signalweges untersucht an S462 Sphären (P15) und adhärenen S462 (P40) Zellen. Alle Messungen zeigten einen signifikanten Unterschied.

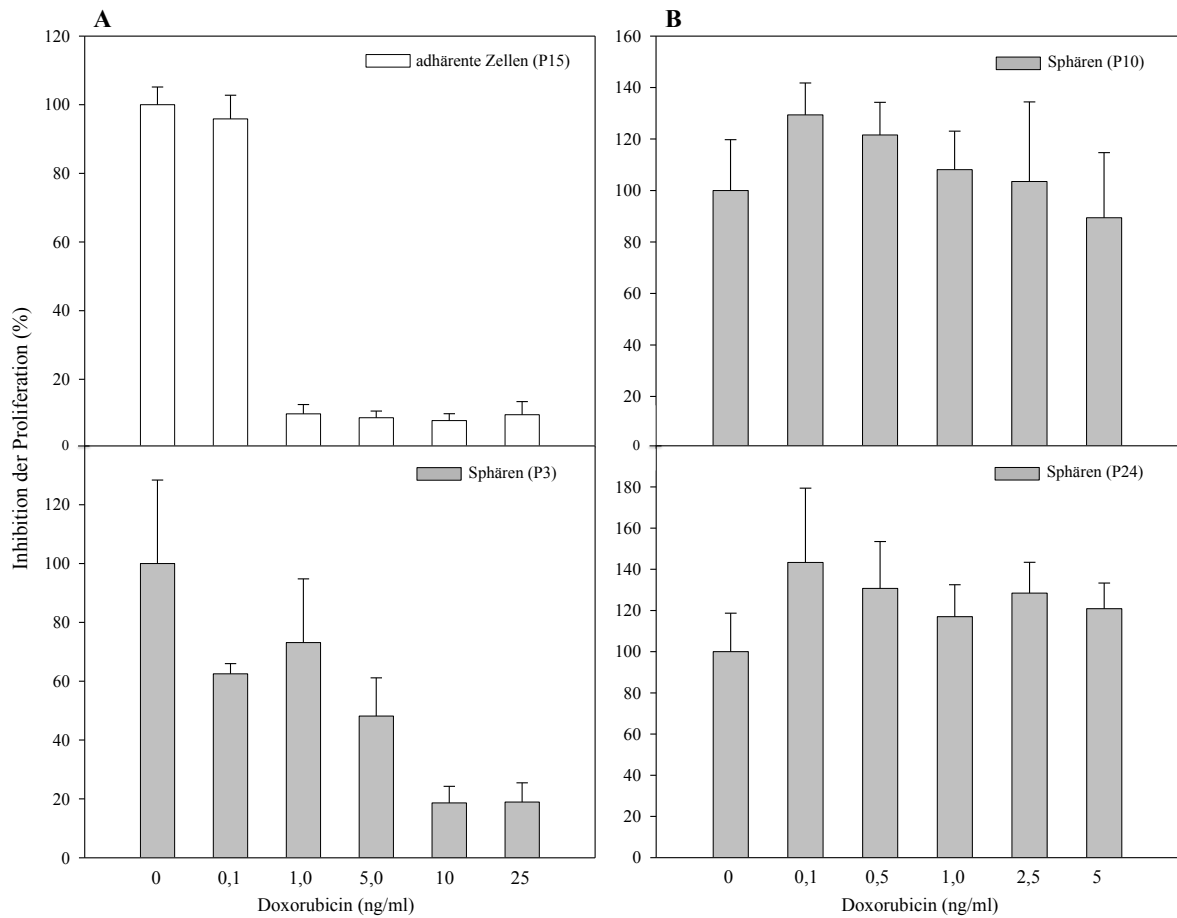
Mit Hilfe der Micro-Array Genexpressionsanalyse konnte dargestellt werden, dass ein deutlicher Unterschied zwischen der Sphären und adhärenen S462 Kultur durch eine Vielzahl differenziell regulierter Gene vorlag. Weiter zeigten die Daten, dass es sich bei der Sphären-Kultur um weniger differenzierte Zellen handeln könnte. Eine Signalweg-Analyse wies eine Reihe differenziell regulierter Gene im Wnt-Signalweg auf.

#### ***4.1.4 Differenzielle Wirkung von Zytostatika an adhärennten und sphäroiden S462 Zellen***

Ein weiteres Charakteristikum von Tumorstammzellen ist ihre Resistenz gegenüber Zytostatika. Um diese bei den stammzellähnlichen S462 Sphären zu prüfen, wurde die Wirkung verschiedener Substanzen, u.a. Doxorubicin und Ifosfamid, welche bei der Chemotherapie von MPNST Patienten eingesetzt werden, geprüft.

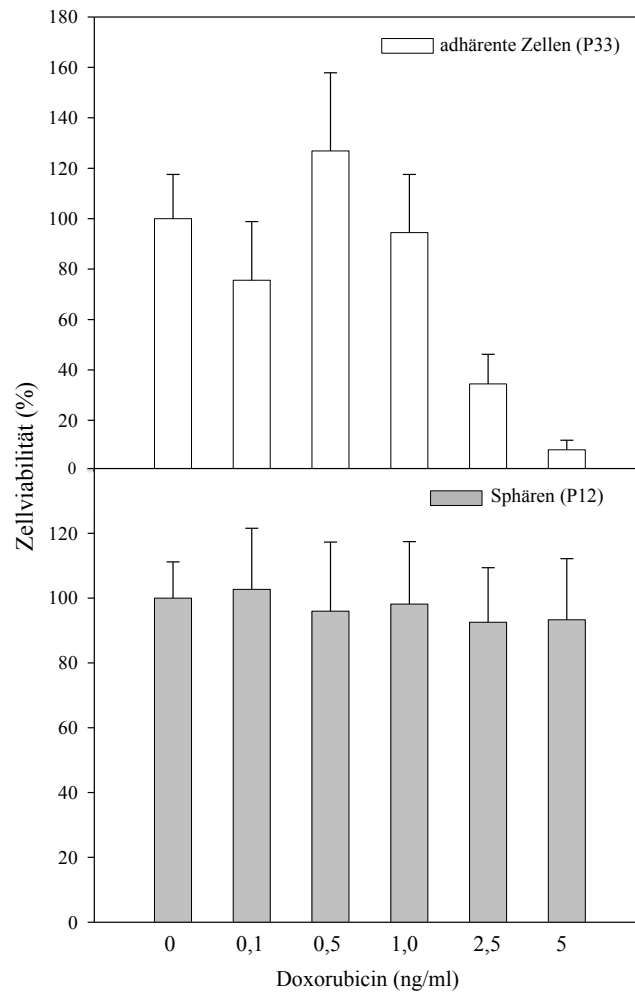
Die Gabe von Doxorubicin, einem interkalierenden Zytostatikum welches zur Stoffgruppe der Anthracycline gehört, zeigte bei der adhärennten S462 Kultur eine deutliche Inhibition ab 1 ng/ml (Abb. 4.17A). Im Vergleich dazu war die Sphären-Kultur auch in ihrer Proliferation gehemmt, jedoch nicht so deutlich wie die adhärennte Kultur. Für diese Untersuchung wurden die adhärennten S462 Zellen in serumhaltigem Medium kultiviert während die S462 Sphären in serumfreien Stammzellmedium gehalten wurden.

Um die Kulturbedingungen gleich zu halten, wurde ein Vergleich zweier S462 Sphären-Kulturen verschiedener Passagen (P10 vs. P24) durchgeführt. Dabei zeichnete sich tendenziell eine stärkere Resistenz der älteren Passage ab (Abb. 4.17B), bei der ein höherer Anteil an stammzellähnlichen Zellen zu erwarten ist.



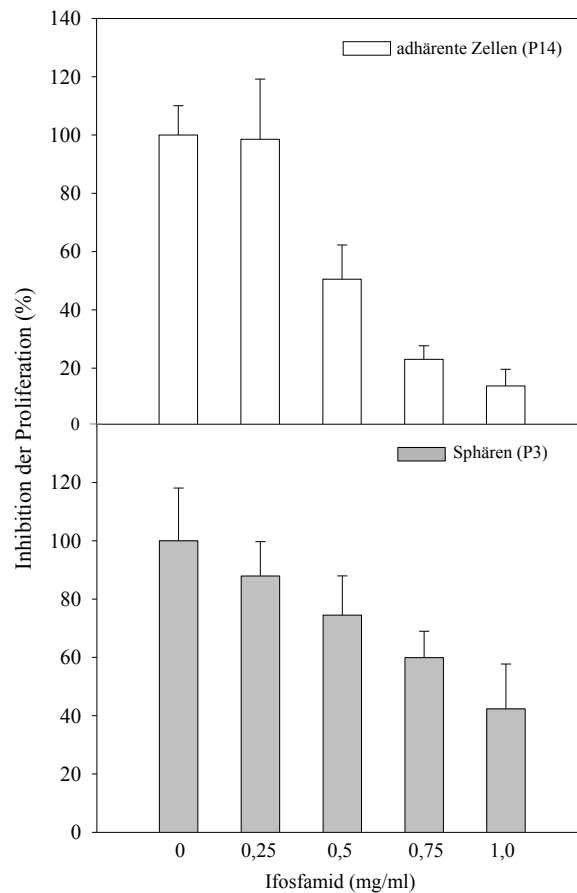
**Abbildung 4.17:** Proliferation (BrdU Assay) (A) der adhärenen S462 Zellen (P15) im Vergleich zur Sphären-Kultur (P3) sowie (B) zweier Sphären-Kulturen verschiedener Passagen nach Zugabe von Doxorubicin über einen Zeitraum von 10 bzw. 9 Tagen.

Auch die Inhibition der Viabilität ist deutlich stärker in der adhärenen S462 Kultur und bei Gabe von 2,5 und 5 ng/ml Doxorubicin nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 4.18). Bei den S462 Sphären war hingegen kein Effekt zu beobachten.



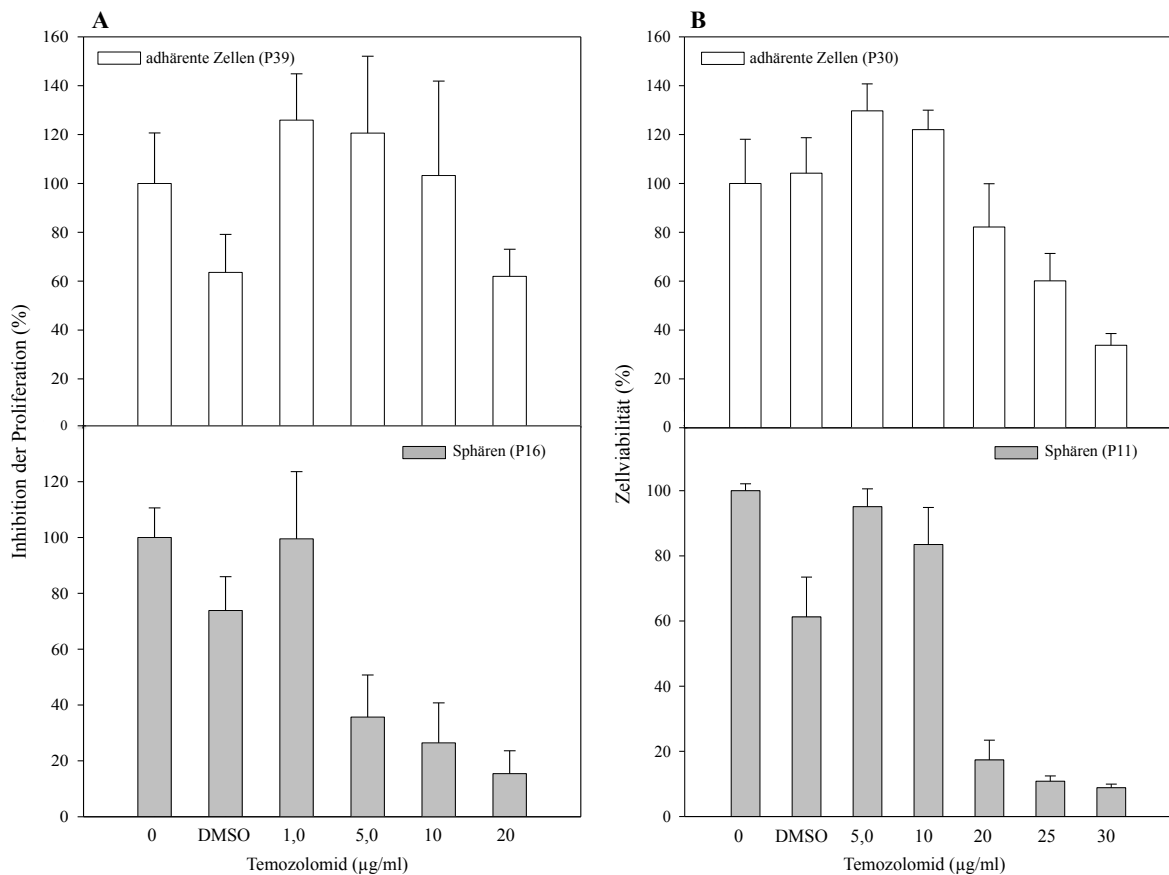
**Abbildung 4.18:** Viabilität (XTT Assay) der adhärenen (P33) und Sphären Kultur S462 (P12) nach 11-tägiger Behandlung mit Doxorubicin.

Bei der Behandlung der Zellen mit Ifosfamid, einem alkylierendem Zytostatikum, waren ähnliche Ergebnisse zu beobachten. Besonders der Konzentrationsbereich von 0,5 mg bis 1 mg/ml zeigte eine stärkere Proliferationsinhibition der adhärenen S462 Kultur im Vergleich zu S462 Sphären (Abb. 4.19).



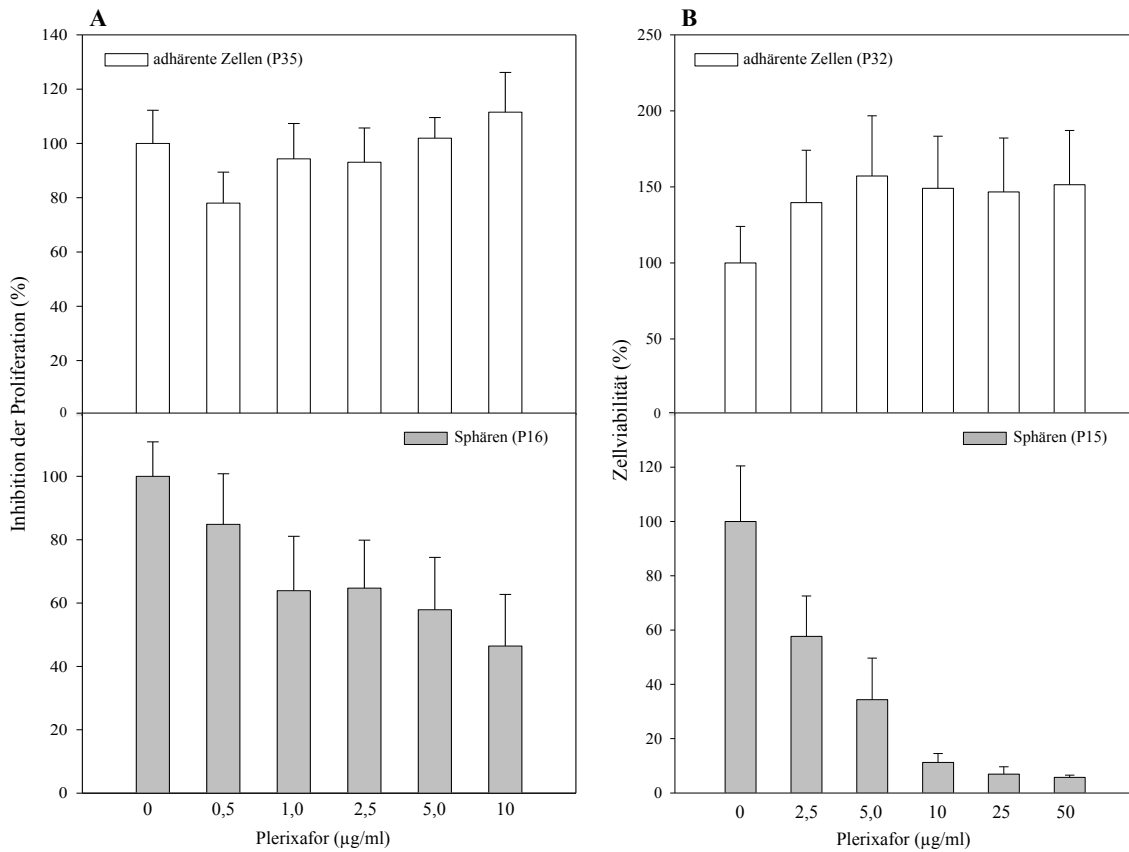
**Abbildung 4.19:** Proliferation (BrdU Assay) der adhärenen (P14) und Sphären-Kultur S462 (P3) nach 10-tägiger Behandlung mit Ifosfamid.

Temozolomid, ein alkylierendes Zytostatikum, welches vor allem bei Patienten mit Hirntumoren eingesetzt wird, wurde ebenfalls an beiden Zellkulturen geprüft. Hier zeigte sich im Vergleich zu den Stoffen Doxorubicin und Ifosfamid ein umgekehrter Effekt. Bei der Behandlung der Zellen wurde eine stärkere Inhibition der Proliferation und Viabilität an S462 Sphären beobachtet (Abb. 4.20). Studien zeigen, dass Therapieerfolge in Abhängigkeit der Aktivität der O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) stehen könnten. MGMT wirkt Temozolomid entgegen, wobei es die Methylgruppe von Guanin entfernt, welche zuvor von Temozolomid angefügt wurde. Kommt es nicht zur Transkription von MGMT und somit zu keiner aktiven Form des Enzyms, besteht eine deutlich höhere Wirksamkeit durch das Zytostatikum. Die Aktivität von MGMT wird durch eine methylierte Promoterregion des Enzyms bestimmt und lässt sich durch Methylierungs-PCR's nachweisen (Hegi *et al.*, 2005; Kaina *et al.*, 2007; Wick *et al.*, 2009; Kreth *et al.*, 2011; Suri *et al.*, 2011). Für die adhärenen S462 Zellen und Sphären konnten jeweils sowohl methylierte als auch unmethylierte Promoterregionen detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass die unterschiedlichen Resistenzen nicht eindeutig darauf zurück zu führen sind.



**Abbildung 4.20:** (A) Proliferation (BrdU Assay) und (B) Viabilität (XTT Assay) der adhärenen S462 Zellen (P39 bzw. 30) und Sphären (P16 bzw. 11) nach 12 bzw. 11 Tagen Behandlung mit Temozolomid.

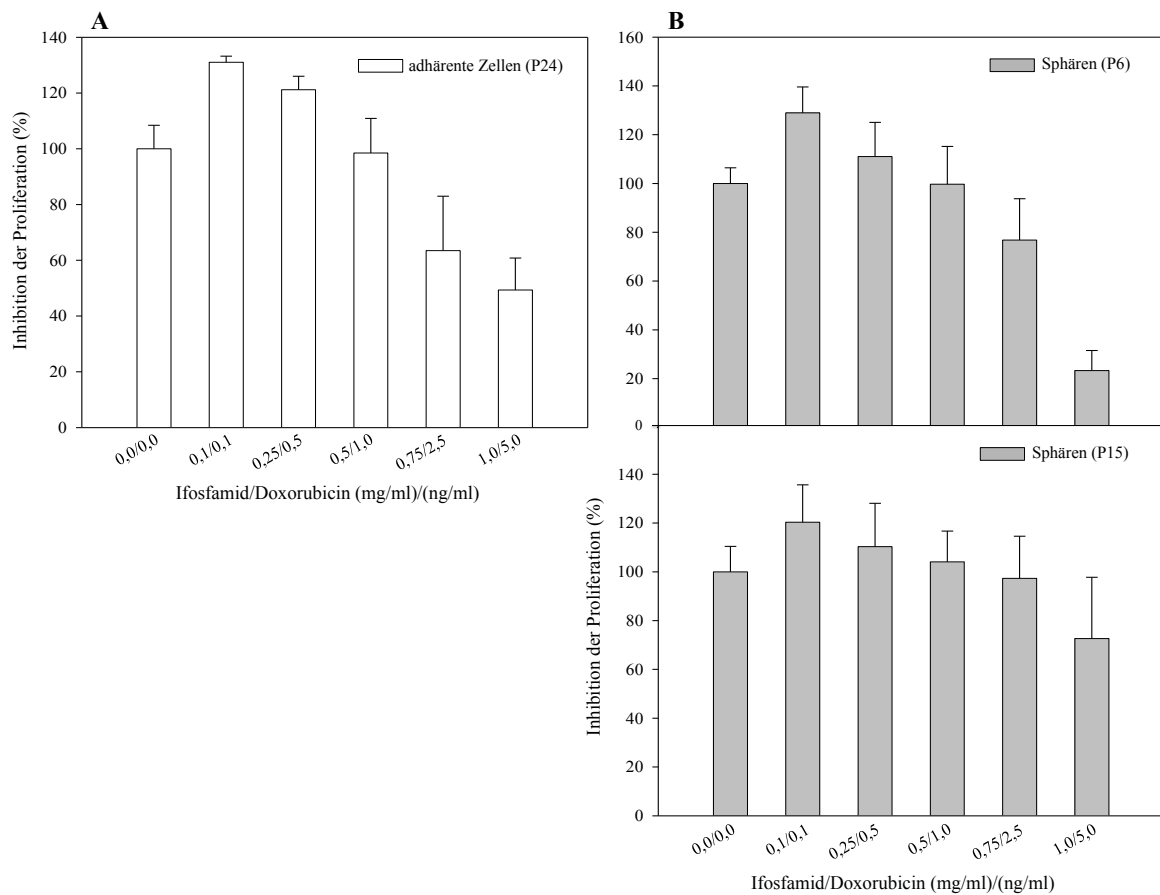
Als weitere Substanz wurde Plerixafor (AMD3100), ein Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR4, an beiden Kulturen geprüft. Auch hier zeigte sich wieder eine stärkere Inhibition der Proliferation und Viabilität der S462 Sphären (Abb. 4.21). Ein besonders großer Unterschied war bei der Inhibition der Viabilität zu beobachten, die ab 10 µg/ml Plerixafor bei S462 Sphären über 80% lag (Abb. 4.21B).



**Abbildung 4.21:** (A) Proliferation (BrdU Assay) und (B) Viabilität (XTT Assay) der adhärenen S462 Zellen (P35 bzw. P32) und Sphären (P16 bzw. P15) nach 9 bzw. 10 Tagen Behandlung mit Plerixafor.

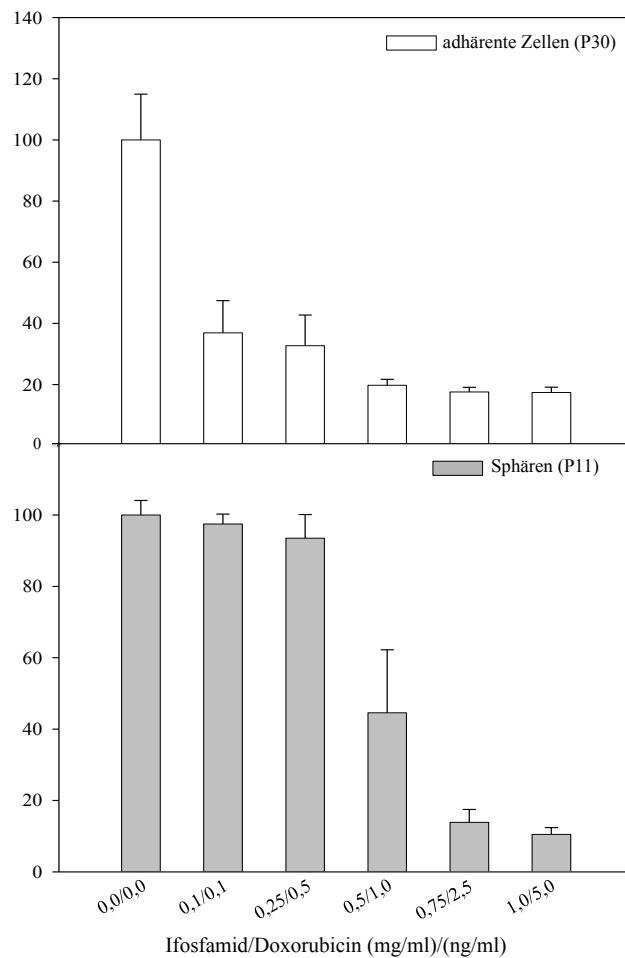
Bei einer Kombinationstherapie mit Doxorubicin und Ifosfamid reagierten die S462 Sphären jüngerer Passage (P6) stärker als die S462 Sphären älterer Passage (P15). Die Empfindlichkeit der adhärenen S462 Zellen lag dazwischen (Abb. 4.22).





**Abbildung 4.22:** Kombinationstherapie (BrdU Assay) mit Doxorubicin und Ifosfamid über einen Zeitraum von 12 Tagen (A) an der adhärennten (P24) und (B) der sphäroiden S462 Kultur, P6 & P15.

Bezüglich der Viabilität war eine stärkere Inhibition der adhärennten Kultur bei der Kombinationstherapie zu beobachten (Abb. 4.23).



**Abbildung 4.23:** Viabilität (XTT) der adhärenen Zellen (P30) und S462 Sphären (P11) bei einer Kombinationstherapie von Doxorubicin und Ifosfamid über einen Zeitraum von 11 Tagen.

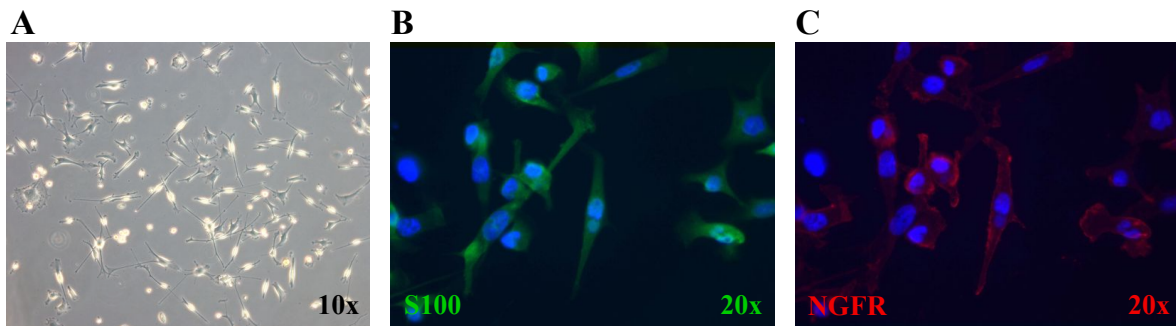
#### 4.1.5 Side Population an S462

Die sog. „Side Population“ konnte als ein Merkmal für Tumorstammzellen für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten beschrieben werden. Es handelt sich dabei um Zellen, die Resistenzen gegenüber Zytostatika aufweisen, beruhend auf dem Mechanismus des Effluxtransporters ABCG2. Jene Form der „Side Population“ konnte für die etablierte Zelllinie S462 jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch war eine ca. 2,5fach erhöhte Expression von ABCG2 auf mRNA Ebene für S462 Sphären gegenüber den adhärenen Zellen zu beobachten (Abb. 4.5). Allerdings konnten auf Proteinebene nur <1% positive Zellen für den ABCG2 Transporter sowohl in der sphäroiden als auch in der adhärenen Kultur detektiert werden (Abb. 4.9).

## 4.2 Neue MPNST-Zelllinie

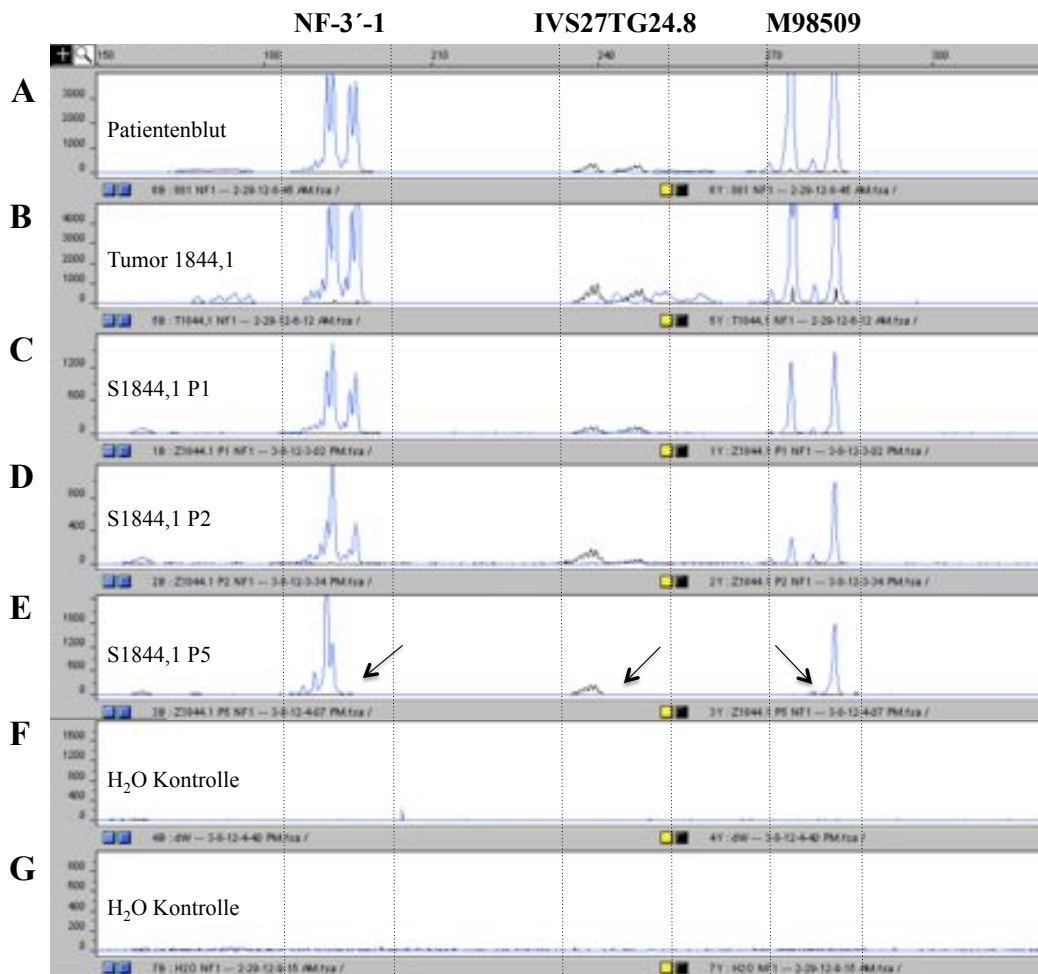
### 4.2.1 Etablierung neuer MPNST-Zelllinie

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte eine weitere MPNST Zelllinie etabliert werden. Die histologische Auswertung des Tumors 1844,1 ergab die Einordnung in die Gruppe der Triton-Tumore, einer Form der malignen Nervenscheidentumore. Das Grading für Weichteilsarkome (FNCLCC) ergab die Zuordnung zu Grad II (Tab. 4.2). Morphologisch betrachtet wiesen die Zellen *in vitro* spindelartige, Schwann-zelltypische Zellformen (Abb. 4.24A) auf. Die Zellen waren deutlich positiv für das S100-Protein (Abb. 4.24B) und für den Schwann-Zell- und Neuronenmarker NGFR (Abb. 4.24C).



**Abbildung 4.24:** Zelllinie S1844,1 (A) Phasenkontrast-Aufnahme der Zellen in Passage 16, (B) S100 Fluoreszenzfärbung (grün) und (C) NGFR (rot) der Zellen in Passage 14. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Abbildungen liegen in 10 bzw. 20facher Vergrößerung vor.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den S1844,1 Zellen auch wirklich um Tumorzellen handelt, wurde eine Genotypisierung bezüglich des Allel-Verlustes (LOH) der *NF1*-, *TP53*- und *CDKN2A*-Genregionen durchgeführt. Dabei konnte partiell ein NF1-LOH in den Zellen der Passage 1 festgestellt werden (Abb. 4.25C), welches in Passage 2 deutlicher auftrat (Abb. 4.25D) und in Passage 5 (Abb. 4.25E) vollständig zu beobachten war. Jenes NF1-LOH war in der originalen Tumorprobe (Abb. 25B) allerdings noch nicht zu sehen, was aufgrund der Heterogenität des Tumors hervorgerufen werden sein könnte. Ein Allelverlust in den *CDKN2A*- und *TP53*-Regionen hat nicht vorgelegen, weder im originalen Tumor noch in den kultivierten Zellen.



**Abbildung 4.25:** Drei intragene NF1 Mikrosatelliten amplifiziert von (A) Leukozyten-DNA des Patienten (B) Tumor-DNA 1844,1 (C) sowie von den Primärkulturen S1844,1 in den Passagen 1 (D) P2 (E) und P5; (F) & (G) Wasserkontrollen.

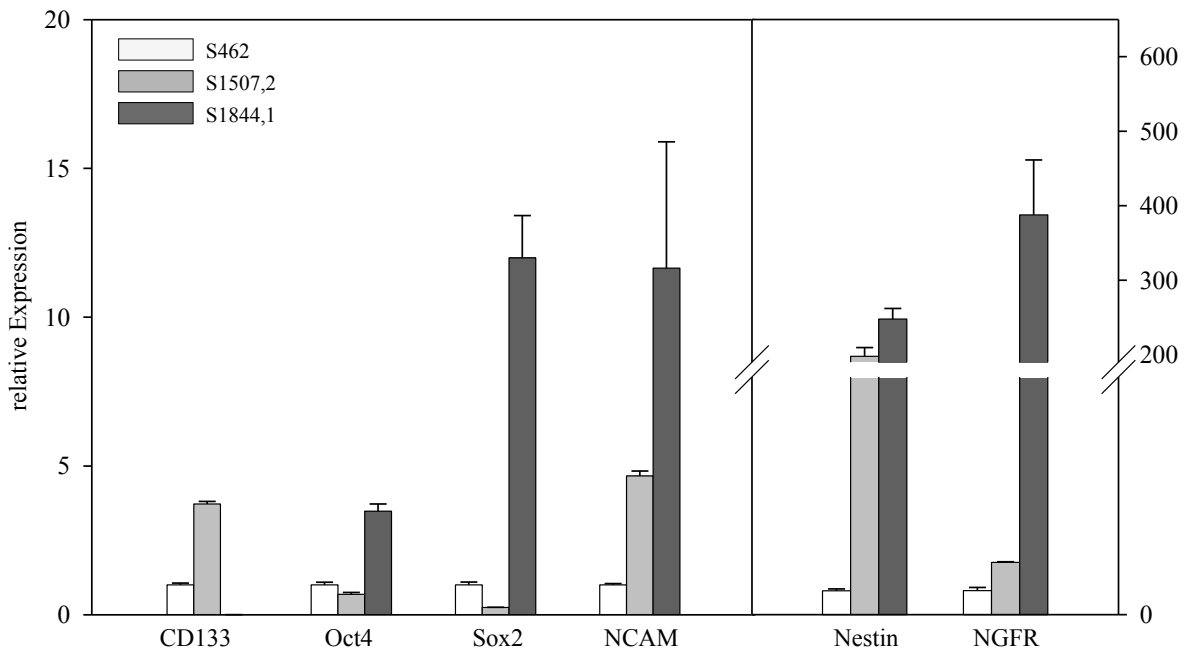
#### 4.2.2 Tumorigenität *in vivo*

Neben der etablierten Zelllinie S1844,1 wurde eine weitere bereits etablierte MPNST-Zelllinie, S1507,2, für Untersuchungen als Vergleichsprobe zu S462 und S1844,1 herangezogen.

Die subkutane Injektion der adhärenen Zelllinie S462 dient bereits als etabliertes Mausmodell für *in vivo* Studien (Demestre *et al.*, 2010; Spyra *et al.*, 2011). Um weitere *in vivo* Modelle zu schaffen und um die Tumorigenität zusätzlich etablierter Zelllinien zu testen, wurden die Zelllinien S1507,2 und S1844,1 subkutan in Mäuse injiziert. Eine Tumormorphie bei Injektion von  $4-6 \times 10^6$  Zellen je Maus konnte für beide Zelllinien nicht gezeigt werden. Histologische Untersuchungen zeigten bindegewebsartige Strukturen nach Injektion der Zellen (Daten nicht gezeigt), jedoch keine Proliferation der implantierten Zellen.

### 4.2.3 Stammzellmarkerexpression etablierter MPNST Zelllinien

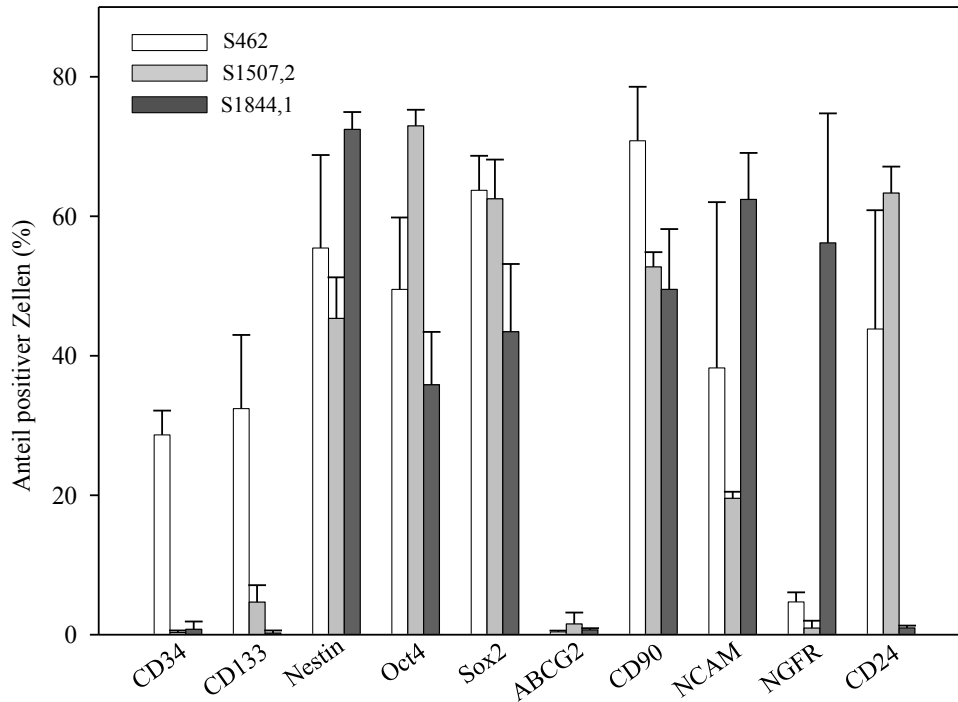
Für einen Vergleich von Stammzeleigenschaften der verwendeten etablierten MPNST Zelllinien wurde eine Real-Time PCR Analyse für verschiedene Stammzellmarker durchgeführt (Abb. 4.26). Der direkte Vergleich von S1507,2 und S1844,1 zu S462 zeigte die höchste Expression für alle untersuchten Marker bis auf CD133 für die Zelllinie S1844,1. S1507,2 zeigte für die Marker NCAM, Nestin und NGFR im Vergleich zu S1844,1 eine geringere Expression, jedoch im Vergleich zu S462 eine erhöhte Expression wobei die höchste Expression von CD133 auch bei S1507,2 vorlag. Für die Marker Oct4 und Sox2 lag bei S1507,2 im Vergleich zu S462 eine verminderte Expression vor.



**Abbildung 4.26:** Relative Expression von Stammzellmarkern der adhärenen Zelllinien S462 (P22-42), S1507,2 (P27-34) und S1844,1 (P13). Alle gemessenen Werte sind signifikant unterschiedlich. Für den Marker NCAM konnte jedoch kein t-Test beim Vergleich von S462 mit S1844,1 sowie S1507,2 mit S1844,1 aufgrund der zu geringen Replikatmenge von S1844,1 durchgeführt werden.

Die Validierung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie für die etablierten Zelllinien S1507,2 und S1844,1 im Vergleich zu S462. Zu den Markern der Genexpression wurden noch CD90, CD24 und ABCG2 hinzugezogen (Abb. 4.27 & Tab. 4.8). Auf Proteinebene konnten die Ergebnisse der Real-Time PCR für S1844,1 für den Marker CD133 und dessen geringste Expression bestätigt werden sowie jeweils die höchste Expression für Nestin, NCAM und NGFR. Des Weiteren lagen übereinstimmende Ergebnisse für S462 mit einer mittleren Expression für Oct4 vor. Sox2 zeigte keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Real-Time PCR. Der größte Anteil CD34, CD133 und

CD90 positiver Zellen lag in der Zelllinie S462 vor, wohingegen die stärkste Proteinexpression von Oct4, ABCG2 und CD24 bei S1507,2 bestand. Auffallend war ein deutlich geringerer Anteil positiver Zellen für die Marker CD34 und CD133 sowohl für S1507,2 als auch S1844,1 im Vergleich zu S462 sowie von NGFR für S462 und S1507,2 im Vergleich zu S1844,1.



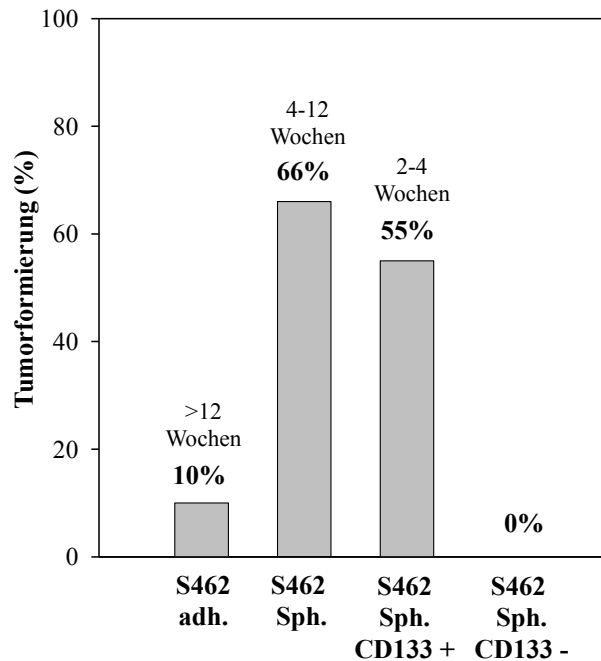
**Abbildung 4.27:** Proteinanalyse mittels Durchflusszytometrie an den adhärenen Zelllinien S1507,2 (P26-48) und S1844,1 (P8-27) im Vergleich zu S462 (P3-49) für verschiedene Stammzellmarker. Alle gemessenen Werte sind signifikant bis auf S462 im Vergleich zu S1507,2 für Nestin, Sox2, ABCG2, NCAM und CD24 sowie S462 im Vergleich zu S1844,1 für Nestin, Oct4 und NCAM und S1507,2 im Vergleich zu S1844,1 für CD34, ABCG2 und CD90.

**Tabelle 4.8:** Gegenüberstellung der Expression von Stammzellmarkern im Vergleich von S462 zu S1507,2 und S1844,1. 1 = höchste Expression; 2 = mittlere Expression; 3 = geringste Expression. Übereinstimmungen von Real-Time PCR und Durchflusszytometrie (FACS) sind blau markiert (n.d.= nicht durchgeführt).

	CD34		CD133		Nestin		Oct4		Sox2	
	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS
<b>S462</b>	n.d.	1	2	1	3	2	2	2	2	1
<b>S1507,2</b>		3	1	2	2	3	3	1	3	2
<b>S1844,1</b>		2	3	3	1	1	1	3	1	3
	CD338		CD90		NCAM		NGFR		CD24	
	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS	Real-Time PCR	FACS
<b>S462</b>	n.d.	3	n.d.	1	3	2	3	2	n.d.	2
<b>S1507,2</b>		1		2	2	3	2	3		1
<b>S1844,1</b>		2		3	1	1	1	1		3

### 4.3 Tumorigenität von MPNST Tumorstammzellen *in vivo*

Die Tumorigenität von Zellen wird als äußerst wichtiges Kriterium, im Besonderen bei Tumorstammzellen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl adhärenente Zellen als auch S462 Sphären subkutan in athymische NMRI nude Mäuse implantiert. Verwendet wurden pro Implantation  $2,5 \times 10^5$  Zellen. Die *in vivo* Versuche zeigten eindeutig eine höhere Tumorformierungsrate der S462 Sphären (66%), in einem Zeitraum von 4-12 Wochen, im Vergleich zur adhärenente S462 Kultur (10%) (Abb. 4.28). Die Mausgruppe mit adhärenente implantierten Zellen wies Tumore zu einem späteren Zeitpunkt, nach über 12 Wochen, auf. Bei einer selektiven Implantation CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup> Sphären waren in einem Zeitraum von 2-4 Wochen deutlich Tumore bei Tieren mit CD133<sup>+</sup> Zellimplantaten zu erkennen (55%), wohingegen CD133<sup>-</sup> Zellen in keinem Fall zu einer Tumorformierung führten (0%) (Abb. 4.28).

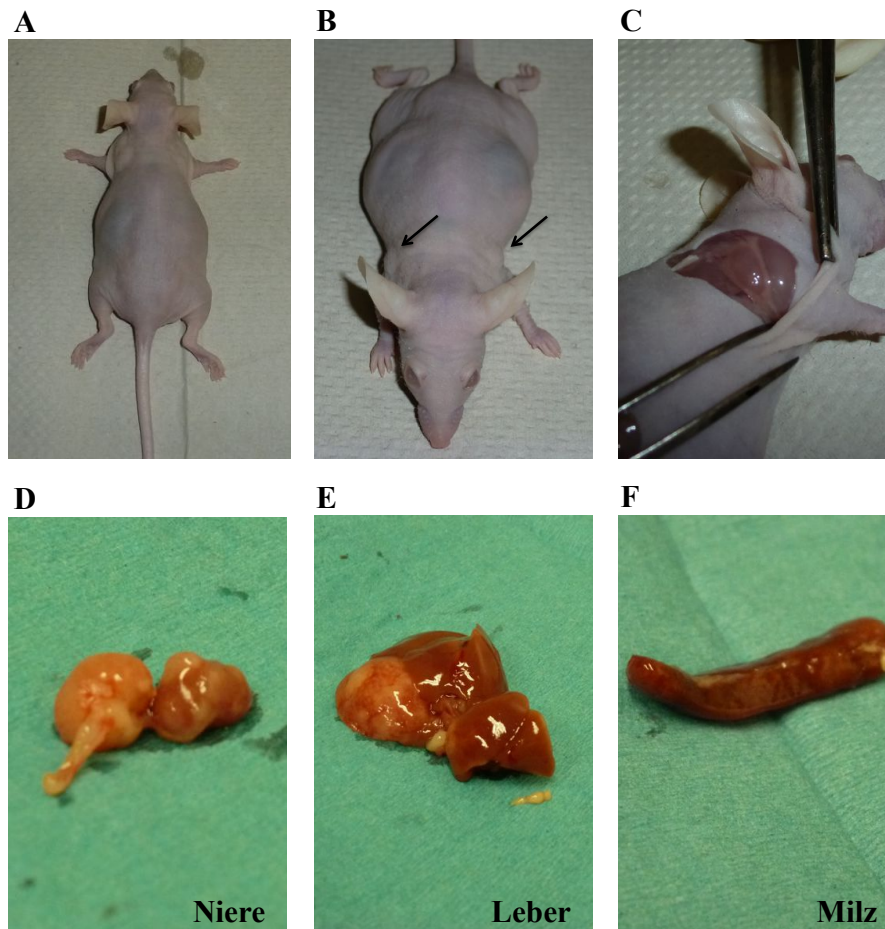


**Abbildung 4.28:** *in vivo* Tumorformierungsraten. Die Implantation von  $2,5 \times 10^5$  adhären S462 Zellen führte nur bei 10% der verwendeten Tiere ( $n=10$ ) zu einer Tumorformierung (nach über 12 Wochen) im Vergleich zu S462 Sphären mit 66% ( $n=9$ ) (nach 4-12 Wochen). Eine selektive Implantation CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup> Sphären führte bei 55% der Tiere mit CD133<sup>+</sup> Zellimplantaten zu einer Tumorformierung (nach 2-4 Wochen). Tiere mit CD133<sup>-</sup> Sphären wiesen keine Tumore auf.

### 4.3 *in vivo* Modell für die Metastasierung von MPNSTs

Ein wichtiges Charakteristikum von Tumorstammzellen ist ihr hohes Potential der Metastasierung. In der vorliegenden Studie wurden Inflammationen mit einer deutlichen Vergrößerung der Lymphknoten und/oder Organveränderungen der Milz, Leber oder Nieren in Mäusen nach subkutaner Injektion von S462 Zellen beobachtet, die eine Metastasierung der MPNST Zellen vermuten lassen (Abb. 4.29 und Tab. 4.9). Histologische Untersuchungen einiger der entnommenen Gewebe erhärteten den Verdacht der Metastasierung, da positive Signale zu erkennen waren (Daten von Dr. Maria Demestre, hier nicht gezeigt). Jedoch ergaben immunhistochemische Analysen nicht immer die eindeutig erwünschte spezifische Erkennung von humanen Zellen/Geweben. Als Alternative wurde in der vorliegenden Studie der genetische Nachweis von metastasierenden humanen Zellen erprobt.





**Abbildung 4.29:** Aufnahmen einer NMRI nude Maus aus einem Tierversuch mit S462 (adhärent) Implantation (A-C) sowie Gewebeprobe einer Maus nach subkutaner Injektion von S462 Sphären (D-F). (A) vergrößertes Abdomen, (B) & (C) stark vergrößerte Lymphknoten, (D) Metastasen an der Niere, (E) der Leber sowie (F) der Milz.

#### 4.3.1 Genetischer Nachweis

Grundlage des angewandten genetischen Nachweises von humanen Zellen war der Einsatz von humanspezifischen Primern für Mikrosatellitenmarker (NF-3'-1, M98509 und IVS27TG24.8). Eine Amplifikation deutete auf das Vorhandensein von humanen Zellen hin. Darüber hinaus konnten anhand der Länge der amplifizierten Marker die verwendeten Zellen bezüglich ihrer Identität verifiziert werden (Tab. 4.9). Als interne Kontrolle zum Nachweis des Mausgewebes dienten mausspezifische GAPDH-Primer.

Neun Tiere aus Versuchen mit Injektionen (subkutan oder intramuskulär) der adhären S462 Zellen sowie 14 Tiere aus Versuchen mit der Implantation (subkutan oder intramuskulär) von S462 Sphären wurden für die Etablierung der Analyseverfahren verwendet. Von den untersuchten Proben zeigten dabei 15 (Maus-Nr. 1-6 & 8-15) Proben in allen untersuchten

Geweben positive Signale der humanen S462 Zellen wobei für Mausprobe 7 nur die Tumorprobe ausgewertet werden konnte. Für 4 weitere Proben (Maus-Nr. 16-19) konnten nicht in allen zur Verfügung stehenden Proben humane Signale detektiert werden. Vier weitere Proben (Maus-Nr. 20-23) wiesen keine humanen Signale auf, obwohl zwei Mäuse einen Primärtumor aufwiesen (Maus-Nr. 20 & 21). Für Maus-Nr. 20 konnte zudem eine Probe nicht bewertet werden, so dass nicht eindeutig humane Signale nachgewiesen bzw. nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnten.

Zusammenfassend konnte anhand des Probenmaterials für einen Großteil der Proben eine Metastasierung mittels der Markeranalyse nachgewiesen werden. Dabei konnten Mäuse unterschieden werden, die sowohl eine Metastasierung in allen untersuchten Geweben aufwiesen als auch Tiere mit einer partiellen Metastasierung. Beispielsweise entstammte Mausprobe 16 (aus der Implantation adhärenter S462 Zellen) einer Maus ohne Primärtumor, dennoch konnten humane Zellen in Lymphknotengewebe aber nicht im Nierengewebe nachgewiesen werden. Auch die Mäuse 13, 17 und 18 (aus der Implantation von S462 Sphären) wiesen keinen Primärtumor auf, jedoch humane Zellen in Geweben wie Lymphknoten, Niere oder Milz. Für Tiere ohne die Detektion humaner Zellen mittels Mikrosatelliten wird angenommen, dass keine Metastasierung vorlag.

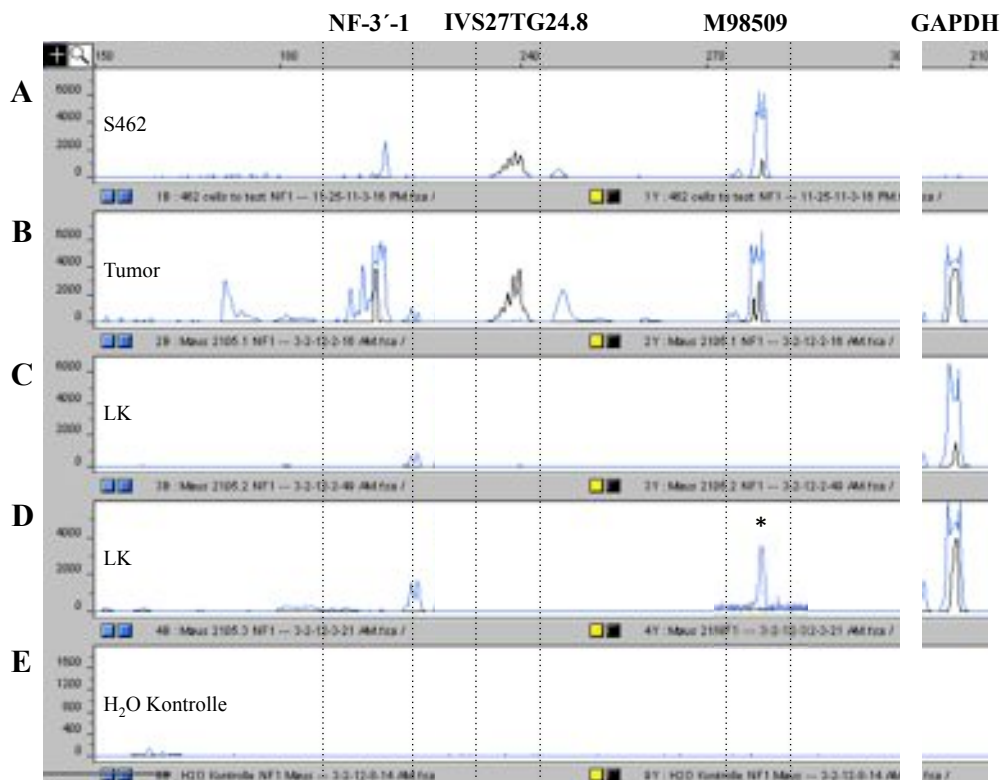
**Tabelle 4.9:** Nachweis der Metastasierung adhärenter und sphäroider S462 Zellen *in vivo* durch Amplifikation humanspezifischer Marker. Positive Signale für humane Zellen sind durch ein Kreuz dargestellt. (n.d. = nicht durchgeführt; LK = Lymphknoten; \* Gewebeprobe war nicht vorhanden bzw. \*\* unzureichende DNA Qualität).

Maus- probe	S462 Zelltyp	Gewebe	makroskop. Auswertung	humanspezifische Marker			Maus GAPDH	genet. Nachweis von Metastasen
				NF- 3'-1	M98509	IVS27TG 24.8		
1	adh.	Tumor		+	+	+	+	
	adh.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	adh.	LK	unverändert	+			+	ja
2	adh.	Tumor**						
	adh.	LK	unverändert	+			+	ja
	adh.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
3	adh.	Tumor		+	+		+	
	adh.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	adh.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	adh.	LK	unverändert	+			+	ja
	adh.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	adh.	Milz	weiße Areale	+	+		+	ja
4	adh.	Tumor		+	+	+	+	
	adh.	LK	unverändert	+	+		+	ja
5	adh.	Tumor		+	+	+	+	
	adh.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
6	adh.	Tumor**						
	adh.	LK	unverändert		+		+	ja
	adh.	Milz	unverändert		+		+	ja
7	adh.	Tumor		+	+	+	+	
8	Sph.	Tumor		+	+	+	+	
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
9	Sph.	Tumor		+	+	+	+	
	Sph.	LK	unverändert		+	+	+	ja
10	Sph.	Tumor		+	+		+	
	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
11	Sph.	Tumor		+	+	+	+	
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
12	Sph.	Tumor		+	+	+	+	
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja

Fortsetzung Tabelle 4.9:

Maus- probe	S462 Zelltyp	Gewebe	makroskop. Auswertung	humanspezifische Marker			Maus GAPDH	genet. Nachweis von Metastasen
				NF- 3'-1	M98509	IVS27TG 24.8		
13	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	Sph.	Niere	unverändert	+			+	ja
	Sph.	Niere	unverändert	+	+	+	+	ja
	Sph.	Milz	unverändert	+	+		+	ja
14	Sph.	Tumor*						
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
	Sph.	Niere	unverändert	+	+		+	ja
15	Sph.	Tumor		+	+	+	+	
	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+		+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+	+	+	+	ja
16	adh.	LK	vergrößertes		+		+	ja
	adh.	Niere	Abdomen				+	nein
17	Sph.	LK	vergrößert	+	+		+	ja
	Sph.	LK	vergrößert				+	nein
	Sph.	LK	vergrößert				+	nein
	Sph.	LK	vergrößert	+			+	ja
18	Sph.	LK		+			+	ja
	Sph.	LK	unverändert	+			+	ja
	Sph.	Niere	unverändert	+		+	+	ja
	Sph.	Niere	unverändert	+	+	+	+	ja
	Sph.	Milz	unverändert				+	nein
19	adh.	Tumor		+	+	+	+	
	adh.	LK	unverändert				+	nein
	adh.	LK	unverändert		+		+	ja
20	Sph.	Tumor*						
	Sph.	LK	unverändert	<i>nicht bewertbar</i>			+	
	Sph.	LK	unverändert				+	nein
	Sph.	LK	unverändert				+	nein
	Sph.	LK	unverändert				+	nein
21	Sph.	Tumor**						
	Sph.	LK	unverändert				+	nein
22	Sph.	LK	unverändert				+	nein
	Sph.	Niere	unverändert				+	nein
23	Sph.	LK	vergrößert				+	nein

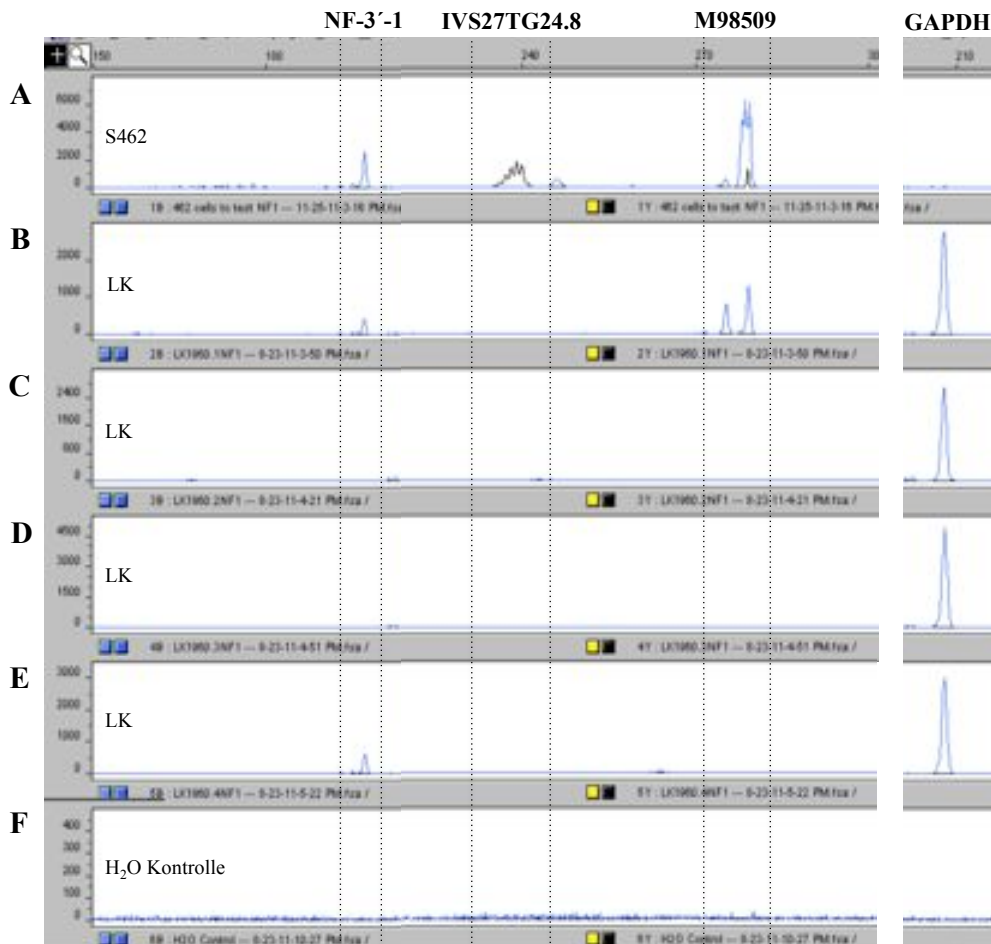
Nachstehend, exemplarisch aufgeführt, zeigt Abbildung 4.30 die Mikrosatellitenanalyse für Mausprobe 19. Als Vergleichsprobe diente die originale Zelllinie S462 (Abb. 4.30A). Deutlich zu erkennen waren humane Signale für die Maustumorprobe durch Injektion adhärenter S462 Zellen (Abb. 4.30B). Abbildungen 4.30C & D stellen zwei Lymphknotengewebeproben derselben Maus dar, wobei Amplifikationen für den murinen Kontrollmarker GAPDH zu erkennen sind sowie für einen humanen Marker für die Lymphknotenprobe in Abbildung 4.30D. Bei Maus 19 lagen darüber hinaus keine Hinweise für eine Metastasierung der Zellen S462 in weiteren untersuchten Lymphknotenproben vor.



**Abbildung 4.30:** Mikrosatelliten NF-3'-1, IVS27TG24.8 & M98509, die mit humanspezifischen Primern an DNA aus verschiedenen Proben einer Maus amplifiziert wurden. (A) Mikrosatellitenanalyse der Zelllinie S462, (B) des Maustumors von Mausprobe Nr. 19 sowie (C) & (D) der Lymphknoten (LK); (E) Wasserkontrolle; \* vergrößerte Darstellung.

Abbildung 4.31 zeigt eine weitere exemplarische Mikrosatellitenanalyse der Mausprobe 17 durch Injektion von S462 Sphären. Auch hier diente die Zelllinie S462 als Kontrolle (Abb. 4.31A). Untersucht wurden vier verschiedene Lymphknotengewebeproben wobei die Proben unter Abb. 4.31B & 4.31E neben dem murinen Kontrollsignal GAPDH, humane Signale für den Marker NF-3'-1 zeigten sowie die Probe unter Abb. 4.31B zusätzlich für den Marker

M98509. Die Amplifikationsprodukte entsprechen auch hier denen der Zelllinie S462 und deuten somit auf eine Metastasierung hin. Für die Proben unter Abb. 4.30C & 4.30D konnten diese humanen Signale nicht bestätigt werden. Eine Metastasierung lag in den untersuchten Lymphknoten höchstwahrscheinlich nicht vor.



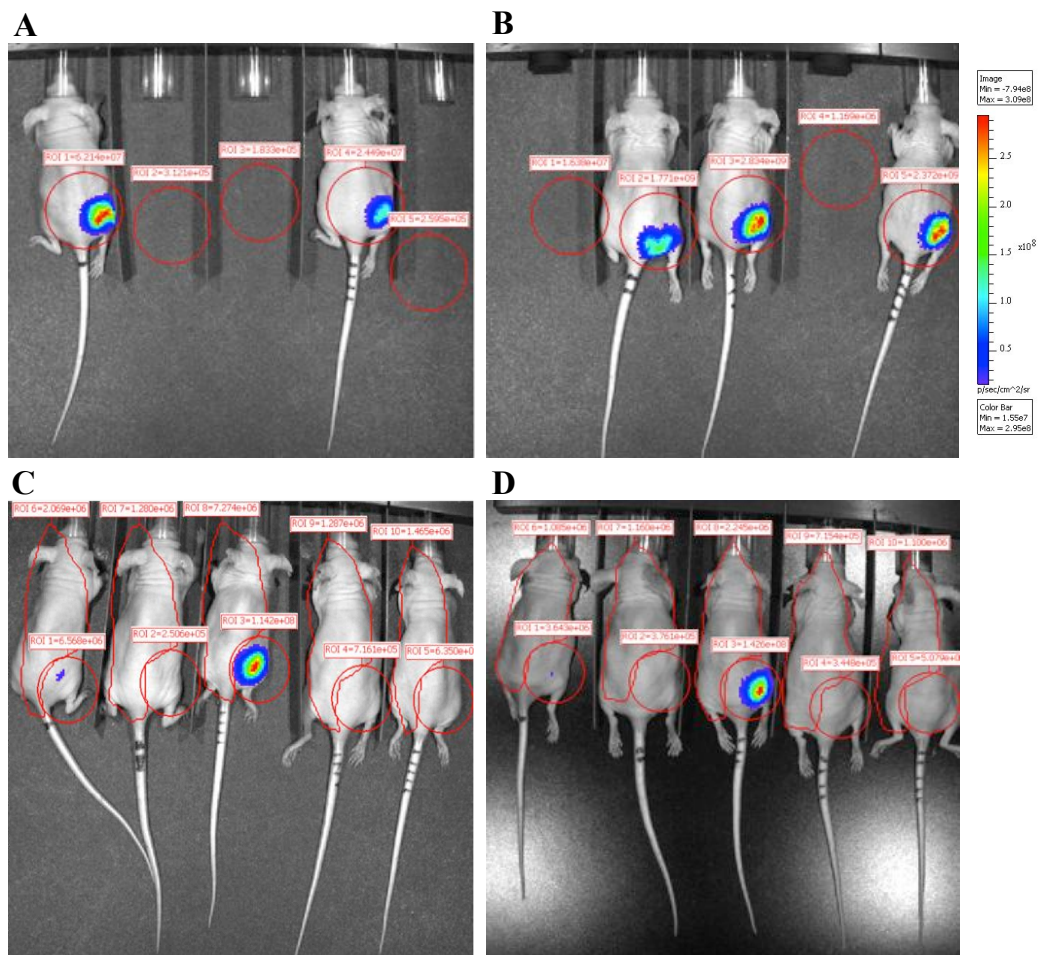
**Abbildung 4.31:** Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse als Nachweis der Metastasierung von S462 Sphären *in vivo* unter Verwendung humanspezifischer Marker (NF-3'-1, IVS27TG24.8 & M98509) (A) Mikrosatellitenanalyse der Zelllinie S462 sowie der (B) bis (E) Lymphknotenproben (LK) von Mausprobe Nr. 17; (F) Wasserkontrolle.

### 4.3.2 Bioimaging als Nachweis der Tumorformierung in Mäusen

Für das Biolumineszenz-Imaging (BLI) zur Verfolgung der Tumorformierung sowie der Metastasierung *in vivo* wurde zunächst die adhärenente MPNST Zelllinie S462 mit dem lentiviralen Plasmid pLenti CMV Puro LUC transduziert (Durchführung Labor für Transplantations- und Stammzellimmunbiologie am Universitätsklinikum, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sonja Schrepfer). Mit Hilfe der Puromycin *Killing Curve* konnte die geeignete Selektionskonzentration für

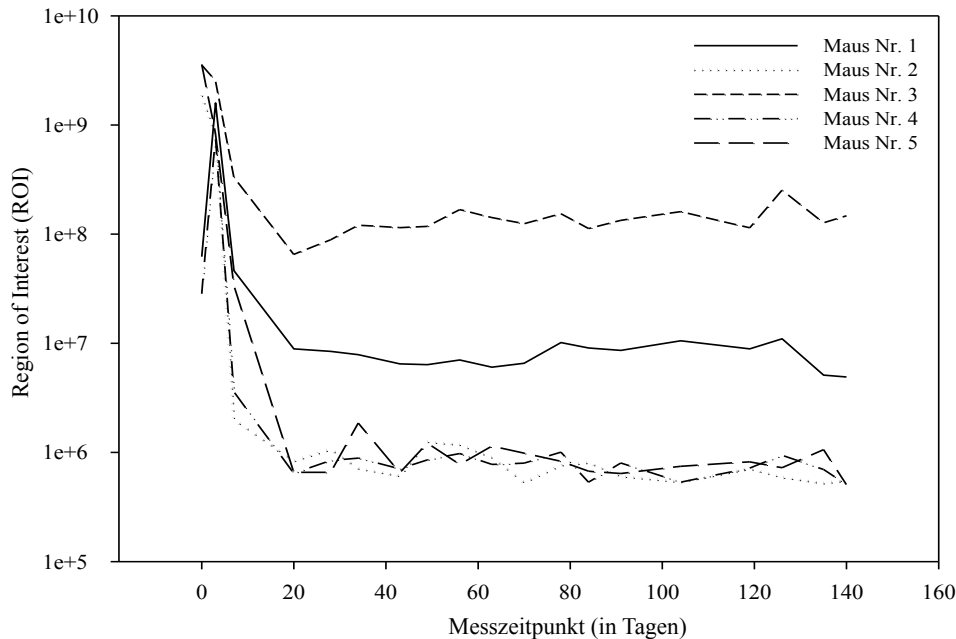
Puromycin von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden und somit die transduzierten Zellen für die anschließende Injektion *in vivo* selektiv expandiert werden.

In einem ersten Tierversuch an 5 NMRI nude Mäusen wurden die Signale von subkutan injizierten Tumorzellen für einen Zeitraum von 140 Tagen beobachtet (Abb. 4.32 & 4.33). Gemessen wurde zunächst der Bereich um die Injektionsstelle der Zellen an der rechten Flanke der Tiere. Die Messsignale waren zu Versuchsbeginn Tag 0 am höchsten und nahmen in den ersten 20 Tagen rapide ab. Danach blieben die Lumineszenzmesswerte bis zum Endpunkt des Experiments am Tag 140 relativ stabil. Unter den Mäusen variierten die Messsignale stark. Drei Mäuse (Nr. 2, 4 und 5 in Abb. 4.32 & 4.33) wiesen sehr schwache Signale auf, die nahe am Hintergrundsignal (im Bereich um  $10^5$ ) lagen und darauf hindeuteten, dass es zu einer Abstoßungsreaktion der transduzierten Zellen gekommen war.



**Abbildung 4.32:** Imaging der Biolumineszenz der injizierten S462 Zellen in die rechte Flanke an (A & B) Tag 0 (C) Tag 70 und (D) Tag 140. (C) und (D) zeigen zusätzlich die Markierungen zur Messung der gesamten Mausoberfläche exklusive der Injektionsstelle.

Über den gesamten Messzeitraum ist es zu einem Abfall der Lumineszenzsignale um die Injektionsstelle gekommen (Abb. 4.33).



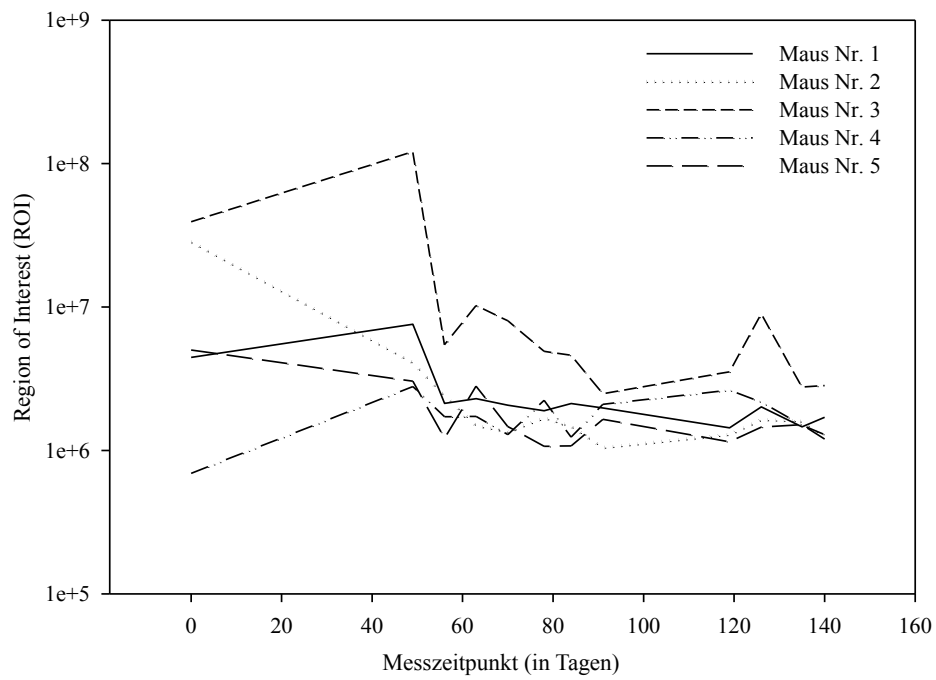
**Abbildung 4.33:** Verlauf der Biolumineszenzwerte an der Injektionsregion (rechte Flanke) von 5 NMRI nude Mäusen gemessen über 140 Tage.

Auch bei der Maus (Nr. 3) mit den höchsten Signalen über den gesamten Messzeitraum von 140 Tagen konnte keine Formierung eines soliden Tumors beobachtet werden. Eine anschließende makroskopische Untersuchung aller weiteren Tiere zeigte ferner keine subkutanen, soliden Tumore.

### 4.3.3 Bioimaging als Nachweis der Metastasierung

Um eine Metastasierung der Zellen *in vivo* zu prüfen wurden zusätzlich Messungen der gesamten „Mausoberfläche“ exklusive der Injektionsstelle der Tumorzellen durchgeführt. Wie Abbildung 4.34 zeigt waren keine Veränderungen der Messwerte über den Versuchszeitraum von 140 Tagen zu erkennen. Eine Metastasierung der Zelllinie S462 war nicht zu beobachten. Die Messung der Gesamtoberfläche von Maus Nr. 3 zeigte die stärkste Signalintensität, jedoch wiesen die makroskopisch untersuchten Organe keine Veränderungen auf, die auf eine Metastasierung hindeuten könnten.





**Abbildung 4.34:** Verlauf der Biolumineszenz der gesamten Oberfläche von 5 NMRI nude Mäusen, mit Ausnahme der Injektionsstelle der Tumorzellen gemessen über 140 Tage.

Eine makroskopische Untersuchung der Tiere nach Beendigung des Versuches zeigte keine pathologischen Veränderungen, wie z.B. Vergrößerungen der Lymphknoten.

## 5. Diskussion

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass MPNSTs tumorstammzellähnliche Zellen enthalten. Die Isolierung und Anreicherung von Tumorstammzellen bzw. tumorstammzellähnlichen Zellen konnte primär anhand der etablierten MPNST Zelllinie S462 dargelegt werden. So zeichneten sich S462 Zellen vor allem durch ein klonales, Wachstum als Sphären unter Stammzellbedingungen für mehr als 40 Passagen aus. Zudem waren sie durch eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern, eine differentielle Regulierung des Wnt-Signalweges, eine erhöhte Tumorigenität und veränderte Zytostatika-Sensitivität gekennzeichnet.

### 5.1 Sphären-Formation

Ein begrenztes Wachstum unter serumfreien Bedingungen war neben S462 bei der Mehrheit anderer etablierter MPNST Zelllinien, Primärkulturen und dissoziierten Zellen aus Tumorfriechmaterial zu beobachten. Bei einigen konnten Sphären oder sphärenähnliche Aggregate beobachtet werden. Jedoch waren sie, ausgenommen S462, nicht durch ein stammzellcharakteristisches klonales Wachstum gekennzeichnet und erfüllten somit nicht ein wichtiges Kriterium für Tumorstammzellen. Eine Klassifizierung der Tumore nach dem französischen Grading-System für Sarkome (FNCLCC) konnte tendenziell zeigen, dass je höher der Grad des Tumors ausfiel desto höhere Passagen der Sphären konnten erreicht werden (Abb. 4.1). Auch die Zellen aus atypischen plexiformen Neurofibromen, die als eine Art von Transitform zu MPNSTs beschrieben werden (Nielsen *et al.*, 1999; Brems *et al.*, 2009; Beert *et al.*, 2011), konnten höhere Sphären-Passagen erreichen als die aus den typischen gutartigen plexiformen Neurofibromen. Die erhöhte Aggressivität des Tumors könnte somit in Assoziation zu dem serumfreien Wachstum unter Stammzellbedingungen stehen, die möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass der Anteil an Tumorstammzellen höher lag, aber Dedifferenzierungsprozesse weiter fortgeschritten waren oder beides. Bislang zeigte nur die etablierte Zelllinie S462 ein klonales Wachstum über mehr als 40 Passagen unter den beschriebenen Bedingungen. Die Zellen des Tumors S462 entstammten einem rezidivierenden MPNST FNCLCC Grad III. Der Anteil an tumorstammzellähnlichen Zellen könnte somit erhöht sein. In diesem Zusammenhang berichtete eine Studie von Pece *et al.* (2010) von einer 3-fach höheren Mammosphären-Formationsrate bei weniger differenziertem G3 Brustkrebs im Vergleich zu differenzierteren G1-Tumoren.

Das Merkmal der runden Sphärenform wurde in der Studie stets berücksichtigt, so dass eine unspezifische Aggregation, verursacht durch hohe Zelldichten, nicht fälschlicherweise als Sphären interpretiert wurde. Zu hohe Zelldichten lösen beispielsweise auch bei Neurosphären Aggregationen von Sphären durch Fusion aus (Singec *et al.*, 2006; Gilbert & Ross, 2009). Solche Aggregate lassen sich jedoch nicht passagieren. Bei Sphären aus MPNSTs, die weniger als 3 Passagen proliferierten, ist davon auszugehen, dass es sich hauptsächlich um differenzierte Tumorzellen handelte oder aber der Dedifferenzierungsgrad zu niedrig war, um unter serumfreien Bedingungen zu proliferieren. Die Heterogenität der Tumore könnte auch eine Rolle für das selektive Wachstum unter Stammzellbedingungen darstellen. Die intratumorale Heterogenität eines Tumors konnte sowohl für Primärtumore als auch Metastasen beobachtet werden (Brabletz *et al.*, 2005; Dalerba *et al.*, 2007). Verursacht werden kann dies vor allem durch die Umgebung des Tumors (*Microenvironment*) und das Wachstum von multiplen Subklonen, die divergente genetische Aberrationen tragen (Brabletz *et al.*, 2001; Losi *et al.*, 2005; Dalerba *et al.*, 2007).

Die klonale Kultivierung der parentalen adhärennten S462 Zellen unter Stammzellbedingungen einer frühen Passage (P2) zeigte eine nahezu zweifach höhere Sphären-Formationsrate ( $31,86\% \pm 2,50$ ) im Vergleich zu einer späten Passage (P35) (Spyra *et al.*, 2011). Der Passagierungsprozess adhärennter Zellen unter serumhaltigen Bedingungen könnte somit ursächlich für einen geringeren Anteil tumorstammzellähnlicher Zellen sein. Die Untersuchung von Primärkulturen aus Brustkrebs lässt die Vermutung zu, dass der Kultivierungs- bzw. Passagierungsprozess zu einem Verlust der regenerativen Eigenschaften von Tumorzellen führt (Clarke *et al.*, 2006a; Fillmore & Kuperwasser, 2008). Daher können dissoziierte Zellen aus Tumorfrischmaterial oder Primärkulturen als bevorzugte Quelle für die Stammzellenanreicherung betrachtet werden. Andererseits ist zu vermuten, dass gerade aufgrund des hohen Anteils an Tumorstammzellen oder/und des geringen Differenzierungsgrades der Zellen eine Zelllinie etabliert werden konnte. Anhand verschiedener Brustkrebszelllinien, wie MDA.MB.231 und MCF-7, konnte nachgewiesen werden, dass Zelllinien eine Vielzahl von Eigenschaften beibehalten, die auch dazugehörige Primärtumore charakterisieren (Wistuba *et al.*, 1998; Lacroix & Leclercq, 2004; Neve *et al.*, 2006; Charafe-Jauffret *et al.*, 2006; Fillmore & Kuperwasser, 2008). So führten Brustkrebszelllinien *in vivo* auch zu einer Tumorformierung (Gupta & Kuperwasser, 2004; Kuperwasser *et al.*, 2005; Sheridan *et al.*, 2006; Fillmore & Kuperwasser, 2008). Fillmore & Kuperwasser konnten weiter zeigen, dass sich CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/ESA<sup>+</sup>-Brustkrebszellen aus Zelllinien durch ihr Selbsterneuerungspotential, langsames Wachstum,

ihre Tumorformierung und Chemotherapie-Resistenz auszeichneten (Fillmore & Kuperwasser, 2008).

Berücksichtigt werden sollte das Zellkultivierungssystem an sich, so dass nicht auszuschließen ist, dass das verwendete System mit Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF, welche beispielsweise auch für das Wachstum von Tumorstammzellen aus Glioblastomen verwendet werden (Günther *et al.*, 2008), nicht ausreichend optimal für das Wachstum von Tumorstammzellen bzw. dedifferenzierte Zellen aus MPNSTs ausgerichtet ist. Diesbezüglich könnte die sog. Nische normaler Stammzellen von besonderer Bedeutung sein. Sie reguliert unter anderem die Anzahl an Stammzellen, die Proliferation oder asymmetrische Zellteilung (Fuchs *et al.*, 2004; Li & Neaves, 2006; Moore & Lemischka, 2006; Calabrese *et al.*, 2007). Auch Tumorstammzellen scheinen für die Erhaltung ihrer Stammzeleigenschaften, wie ihrem Selbsterneuerungspotential, von einer Nische abhängig zu sein. So interagieren beispielsweise Endothelzellen mit Nestin<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Gehirn-Tumorzellen durch die Freisetzung von Faktoren für die Erhaltung von stammzellcharakteristischen Eigenschaften (Calabrese *et al.*, 2007). Zu berücksichtigen sind zudem Morphologien der Sphären. Wenn es zu einer Fusion von Sphären kommt oder aber Sphären gewisse Größen überschreiten, kann eine verschlechterte Diffusion von Wachstumsfaktoren und ein Anstieg der zentralen Hypoxie zu einer Verringerung von Tumorstammzellen führen. Ferner können Differenzierungsprozesse oder aber auch Apoptose einsetzen (Woolard & Fine, 2009). Die Untersuchung von Neurosphären des Striatum fötaler Ratten wies zudem nekrotische Zellen innerhalb von Neurosphären auf (Lobo *et al.*, 2003).

Eine Optimierung des Stammzellkultivierungssystems soll dazu dienen eine gezieltere selektive Anreicherung von tumorstammzellähnlichen Zellen aus MPNSTs zu gewährleisten.

## 5.2 Stammzellmarker-Expression

Die erhöhte Expression einer Vielzahl von Stammzell- und Tumorstammzellmarkern, die bei anderen Tumorentitäten wie Glioblastomen (Hemmati *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2006a, 2006b & 2008; Lee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009) oder Brustkrebs (Al-Hajj *et al.*, 2003) beschrieben wurden, bekräftigen weiter die Annahme einer Anreicherung stammzellähnlicher Zellen der S462 Sphären. Die ansteigende Expression einiger dieser Marker, wie beispielsweise CD34 und Oct4, in höheren Sphären-Passagen ist ein weiterer Nachweis der zunehmenden Anreicherung stammzellähnlicher Zellen. Eine Langzeitkultivierung der S462 Sphären führte auf Grund der induzierten Differenzierung durch die Gabe von serum-

haltigem Medium zu einer Abnahme der Expression für die Marker Nestin und Sox2 und verstärkte sie für Oct4. Der Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf die Genexpression wurde stets berücksichtigt. Für die Expressionsstudien wurden die zur Kontrolle dienenden adhären-ten S462 Zellen, für einen kurzen Zeitraum unter Stammzellbedingungen kultiviert. Die Inku-bation von parentalen S462 Zellen löste den umgekehrten Effekt für Nestin und Sox2 aus und verstärkte dessen Expression und verringerte sie für Oct4. Die veränderten Expressionen be-legen, dass die Kultivierungsbedingungen einen deutlichen Einfluss auf die Proliferation von (Tumorstamm-) Zellen nehmen. So könnten die Stammzellbedingungen eine Dedifferenzie-rung der S462 Zellen oder aber eine verstärkte Proliferation der stammzellähnlichen Zellen im Vergleich zu parentalen S462 Zellen auslösen. Die Validierung der Genexpressionsanalyse mittels der Durchflusszytometrie konnte einen Teil der erhöhten Expression auch auf Protein-ebene bestätigen. Die signifikant verringerte Proteinexpression für den Differenzierungs-mar-ker CD24 in erhöhter Sphären-Passage bestätigte abermals, dass diese Zellen einem weniger differenzierten, stammzellähnlichen Phänotyp entsprechen.

Die Genexpressionsanalyse weiterer Sphären-Kulturen aus dissoziierten Zellen von Tumor-frischmaterial, Primärkulturen und einer weiteren etablierten Zelllinie konnte die Hypothese der Tumorstammzellen bekräftigen, wobei die Marker Sox2, Nestin und NGFR von einer zum Teil deutlich erhöhten Expression gekennzeichnet waren. Aufgrund des geringen Probenum-fanges kann jedoch nicht verallgemeinert werden, dass es sich bei diesen Markern um spezifi-sche Marker für Tumorstammzellen aus MPNSTs handelt.

Immunhistochemische Analysen originaler MPNST und PNF Tumorproben für verschiedene Stammzellmarkermoleküle wiesen einen deutlichen Unterschied für die Marker Nestin und NGFR auf. Nestin positive Zellen waren in allen untersuchten MPNST Proben deutlich sicht-bar, jedoch nur schwach-positiv in Geweben der plexiformen Neurofibrome. NGFR positive Zellen konnten deutlich häufiger in PNF Proben detektiert werden und weniger in MPNSTs. Nestin scheint somit als Marker für Tumorstammzellen für MPNSTs von Bedeutung zu sein. Seine Rolle als Tumorstammzellmarker wurde mittlerweile auch im Zusammenhang mit bei-spielweise Hirn- oder Prostata Tumoren diskutiert (Kleeberger *et al.*, 2007; Ishiwata *et al.*, 2011; Arai *et al.*, 2012).

Die histologische Untersuchung von Tumorgewebe aus Maus-Xenograft-Proben zeigte für alle verwendeten Marker positive Signale. Zum einen könnten diese positiven Färbungen auf-grund von unspezifischen Antikörperbindungen hervorgerufen worden sein oder zum anderen

durch eine selektive Anreicherung von Zellen *in vitro*. Ein Vergleich der Proteinanalyse von adhärennten S462 Zellen und dem originalen S462 Patiententumor konnte nachweisen, dass beispielsweise die Marker CD133 und NCAM im Tumorgewebe negativ waren, jedoch in der dazugehörigen Zelllinie deutlich positiv. Die Tumore aus Implantationen von adhärennten S462 Zellen sowie S462 Sphären waren von der Expression dieser und weiterer Marker gekennzeichnet. Die Zellen könnten ihren Phänotyp *in vivo* so beibehalten haben.

### 5.3 Multipotenz und Tumorigenität der S462 Sphären

Die Untersuchung der Multipotenz von S462 Sphären lieferte einen weiteren Beweis für das Vorhandensein von Tumorstammzellen. So war eine Differenzierung zu Schwann-Zellen, glatten Muskelzellen/Fibroblasten und neuronähnlichen Zellen möglich (Spyra *et al.*, 2011). Es lässt die Vermutung zu, dass undifferenzierte bzw. dedifferenzierte Zellen mit einem höheren Potential der Differenzierung als Sphären erstmals aus MPNSTs angereichert werden konnten. Die Differenzierung zu Schwann-Zellen ist hierbei von besonderer Bedeutung, da Schwann-Zellen aus Stammzellen der Neuralleiste hervorgehen und so gezeigt werden konnte, dass sich die isolierten Sphären durch einen stammzellartigen Phänotyp auszeichneten. Zugleich stellen die Schwann-Zellen die primären Tumorzellen dar (Kluwe *et al.*, 1999b).

Einen weiteren wichtigen Beweis erbrachten *in vivo* Studien, die demonstrierten, dass S462 Sphären tumorigener waren als die dazu gehörigen parentalen Zellen. Weiter führte die Implantation von  $2,5 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> S462 Zellen aus Sphären zu einer Tumormorphierung im Vergleich zu  $2,5 \times 10^5$  CD133<sup>-</sup> Zellen. Die Implantation von  $5,6 \times 10^4$  CD133<sup>+</sup> S462 Zellen aus Sphären resultierte nach einem Monat bei 66% der Tiere in einem Tumorwachstum wohingegen eine höhere Zellzahl von  $5 \times 10^6$  CD133<sup>-</sup> S462 Zellen aus Sphären zu einem Tumorwachstum lediglich bei 14% der Tiere nach zwei Monaten führte (Spyra *et al.*, 2011). CD133, ein transmembranes Oberflächenprotein, das erstmals bei hämatopoetischen Stammzellen bzw. Progenitorzellen der akuten myeloischen Leukämie beschrieben wurde (Horn *et al.*, 1999), erwies sich auch für weitere Entitäten als Marker von Tumorstammzellen bzw. Tumor-initiiierenden Zellen (Singh *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2007; Rappa *et al.*, 2008). So führte die Implantation von 100 CD133<sup>+</sup> Gehirntumorzellen zu einer Tumormorphierung *in vivo*, jedoch nicht bei der Implantation von CD133<sup>-</sup> Zellen (Singh *et al.*, 2003 & 2004).

## 5.4 Globale Expressionsprofile

Die globalen Genexpressionsprofile der S462 Sphären im Vergleich zu den adhärenen S462 Zellen konnten abermals den stammzellähnlichen Phänotyp der Sphären bestätigen. Die funktionale Gruppierung differenziell regulierter Gene ermöglichte die Identifizierung von Kandidaten verschiedener Signaltransduktionswege. In diesem Zusammenhang konnten wir erstmalig für diese Entität eine entscheidende Bedeutung des Wnt-Signalweges zeigen, der eine Vielzahl differenziell regulierter Gene in Sphären gegenüber adhärenen S462 Zellen aufwies. Einige dieser Kandidaten wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Entitäten gebracht und könnten von funktionaler Bedeutung sein (Tab. 5.1). Bislang durchgeführte Expressionsstudien anderer Arbeitsgruppen für MPNSTs beruhten auf der Untersuchung verschiedenster MPNST Zell- und Tumorproben (Holtkamp *et al.*, 2004a & 2004b; Lévy *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004; Karube *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006 & 2009), jedoch standen bislang keine tumorstammzellähnlichen Zellen zur Verfügung.

Grundsätzlich wird dem Wnt-Signalweg eine Schlüsselrolle der Zellbewegung, Entwicklung der Gewebepolarität, Zellproliferation und Stammzellerhaltung zugesprochen (van Amerongen & Nusse, 2009). Besonders gut beschriebene Wnt-Signaltransduktionswege sind der kanonische *Wnt/β-Catenin*, der *Wnt/planar cell polarity* sowie der *Wnt/Calcium*-Signalweg (Huelsenken & Behrens, 2002; James *et al.*, 2008). Die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade durch Bindung von Wnt-Liganden an Frizzled-Rezeptoren resultiert in einer Stabilisierung zytoplasmatischen β-Catenins, durch die Bildung eines Komplexes bestehend aus dem *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* und *Dishevelled*, welcher letztlich zu einer Formierung des nuklearen *β-Catenin/T-Cell Factor (TCF)/Lymphoid Enhancer Factor (LEF)* und *Cyclic AMP Response Element Binding (CREB) Binding Protein (CBP)*-Komplexes führt und die Transkription von Zielgenen auslöst. In seiner inaktiven Form wird das nicht gebundene β-Catenin durch einen Komplex bestehend aus der Glycogen-Synthase Kinase 3β, dem Tumorsuppressor-Protein *Adenomatous-polyposis-coli* und Axin degradiert (Emami *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2009; Phillips & Kimble, 2009; Henderson *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2011). Wenn nukleäres β-Catenin nicht vorliegt, wird die Transkription der Zielgene durch TCF inhibiert (Cavallo *et al.*, 1998; Phillips & Kimble, 2009). Sowohl der *Wnt/planar cell polarity* als auch der *Wnt/Calcium*-Signalweg werden den nicht-kanonischen Signalwegen zugeordnet, verlaufen TCF- und β-Catenin unabhängig und regu-

lieren das Aktin-Zytoskelett bzw. den intrazellulären Calciumspiegel (James *et al.*, 2008; Phillips & Kimble, 2009).

Die Bedeutsamkeit des Wnt-Signalweges im Kontext mit Tumorstammzellen konnte anhand einer Reihe verschiedener Entitäten beschrieben werden, so dass gehäuft Dysregulierungen identifiziert wurden (Reya & Clevers, 2005; Valkenburg *et al.*, 2011) wie beispielsweise bei Kolorektalkrebs (Liu *et al.*, 2000; Polakis, 2000; Holcombe *et al.*, 2002; Valkenburg *et al.*, 2011) oder Brustkrebs (Lin *et al.*, 2000; Karayiannakis *et al.*, 2001; Ryo *et al.*, 2001; Nakopoulou *et al.*, 2002; Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Zardawi *et al.*, 2009; Valkenburg *et al.*, 2011). Auch Prostatakrebs zeichnete sich in einigen Fällen durch eine Hochregulierung von Wnt-Liganden aus. Zudem zeigen Studien einen Zusammenhang von der Expression jener Liganden und der Aggressivität und Metastasierung auf (Hall *et al.*, 2005; Valkenburg *et al.*, 2011). Auch die untersuchten S462 Sphären waren durch die erhöhte Expression von Genen gekennzeichnet (Tab. 5.1), deren kanzerogene Rolle vor allem auch im Zusammenhang mit Tumorstammzellen beschrieben werden konnte. Zugleich waren Gene, die eine Rolle bei der Differenzierung spielen, herunter reguliert und bekräftigen so den undifferenzierten Phänotyp der S462 Sphären. Interessanterweise zeigte der Transkriptionsfaktor Oct4 auf mRNA Ebene der S462 Sphären (Abb. 4.5) eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zur adhärenenten Kultur. Bei humanen embryonalen Stammzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Oct4 den  $\beta$ -Catenin Signalweg während der Selbsterneuerung reprimiert (Davidson *et al.*, 2012). Eine Validierung ausgewählter Kandidaten konnte die Ergebnisse der Micro-Arrayanalyse bestätigen (Abb. 4.16) und soll von weiteren gefolgt werden.

**Tabelle 5.1:** Differenziell regulierte Gene (mit einer SLR > 0,8) des Wnt-Signalweges. Die aufgelisteten Gene konnten bereits in den Zusammenhang mit der Tumorgenese verschiedener Entitäten gebracht werden.

Kandidaten SLR > 0,8	Funktion
WNT16 WNT4	Frizzled Liganden
FZD8	Wnt-Rezeptor
PRKCi	Protein-Kinase C
MAP3K7	Serin/Threonin Protein-Kinase
LEF1 FOXD3	Transkriptionsfaktor



Beispielsweise besteht eine Überexpression des Wnt4-Liganden in CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen aus Karzinosarkomen des Uterus (Choijamts *et al.*, 2011). Auch eine hochregulierte Wnt16 Expression trägt zur akuten lymphoblastischen Leukämie bei (Mazieres *et al.*, 2005; Román-Gómez *et al.*, 2007). Jene Patienten zeigen zudem einen schlechten Therapieausgang bei einer Überexpression von LEF1 (Kühnl *et al.*, 2011). Auch der Rezeptor FZD8, welcher bei den S462 Sphären hochreguliert vorlag, konnte bereits in Zusammenhang mit beispielsweise Lungenkrebs gebracht werden. So könnte FZD8 bei Lungenkrebs als therapeutisches Target fungieren. Zudem führte der Einsatz von shRNA zu einer Chemosensitivierung (Wang *et al.*, 2012). MAP3K7 ist unter anderem von Bedeutung für die Regulation von TGF- $\beta$ 1 bzw. MMP9 sowie dem metastasierenden Potential von Brustkrebszelllinien. Eine Unterdrückung von MAP3K7 reduzierte die Expression von MMP9 und somit auch die Tumordinvasion (Safina *et al.*, 2008). Der Transkriptionsfaktor FOXD3 scheint im Zusammenhang mit Therapieresistenzen bei Melanomzellen mit B-Raf Mutation zu stehen (Basile *et al.*, 2012) und zeigte auch bei den untersuchten S462 Sphären eine erhöhte Expression im Vergleich zu parentalen Zellen.

Die Wnt-Signalweganalyse resultierte auch in der Identifizierung von Kandidaten mit einer verminderten Expression bei den S462 Sphären (siehe dazu Abschnitt 4.1.3 & Tab. 4.7). Das Tumorsuppressorgen DKK3 beispielsweise ist in den meisten soliden Tumoren durch eine verringerte Expression gekennzeichnet (Veeck & Dahl, 2012). So waren die untersuchten S462 Sphären ebenso durch eine verringerte Expression von DKK3 charakterisiert. Wnt3 ist häufig in verschiedenen Entitäten hochreguliert (Bengochea *et al.*, 2008; Gelebart *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2012), wohingegen Wnt10B in Tumoren dereguliert und sowohl überexprimiert als auch unterdrückt vorliegen kann (Yoshikawa *et al.*, 2007). Die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Arrayanalyse konnte eine verringerte Expression für Wnt3 aufzeigen. Eine verringerte Expression für Wnt10B, wie sie für S462 Sphären bestand, könnte für tumorstammzellähnliche Zellen aus MPNSTs von funktionaler Bedeutung sein. Auch weitere Kandidaten der Wnt-Signalweganalyse stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Entitäten, wie PLAU (Sudol, 2011) aber auch WNT5 beispielsweise bei Brustkrebs und Hirnmetastasen (Klemm *et al.*, 2011), FZD4 bei Gliom-Stammzellen (Jin *et al.*, 2011), FZD6 bei Leukämien (Wu *et al.*, 2009), PAFAH1B1 bei Lungenkrebs (Lo *et al.*, 2012), RHOA (Ginestier *et al.*, 2012) und CCND1 bei Brustkrebs (Elsheikh *et al.*, 2008) bzw. JUN bei Brustkrebs-Tumorstammzellen (Jiao *et al.*, 2010) sowie Mutationen bei PPP2R1B (Wu *et al.*, 1999a). Eine Bedeutsamkeit besteht auch als Tumorstammzellmarker wie POU5F1 (Oct4) (Kim &

Nam, 2011) und CD44 (Jaggupilli & Elkord, 2012). Dem Wnt-Signalweg wird überdies eine essentielle Rolle bei der Regulierung der Selbsterneuerung und Differenzierung von Tumorstammzellen eingeräumt (Sugimura & Li, 2010; Takahashi-Yanaga & Kahn, 2010; Wend *et al.*, 2010; Dodge & Lum, 2011).

Aufgrund seiner dysregulierten Präsenz für eine Vielzahl von Tumorentitäten, wird der Wnt-Signalweg vermehrt als therapeutisches Target diskutiert. Der Einsatz von Inhibitoren wie PKF118-310, PKF115-584 und CGP049090 gegen den kanonischen Signalweg und den nuklearen  $\beta$ -Catenin-Transkriptionskomplex führte an hepatozellulären Zelllinien zu einer Dosis-abhängigen Zytotoxizität. Normale Hepatozyten reagierten deutlich weniger zytotoxisch bei Gabe genannter Inhibitoren. Auch die Behandlung *in vivo* führte zu einer Suppression des Tumorwachstums (Wei *et al.*, 2010). Der Inhibitor PKF118-310 hatte zudem einen deutlichen Effekt auf Brustkrebstumorstammzellen *in vitro*, als auch auf das Tumorwachstum *in vivo* (Hallett *et al.*, 2012). ICG-001 bindet spezifisch an CBP, jedoch nicht den Coaktivator p300 und führte somit zu einem Interaktionsverlust zwischen CBP und  $\beta$ -Catenin. Die Gabe von ICG-001 löste Apoptose in Kolonkarzinom-Zelllinien aus aber nicht in normalen Kolon-Epithelzellen sowie eine deutliche Wirksamkeit im Mausmodell beobachtet werden konnte (Emami *et al.*, 2004). Eisen-Chelatoren wie Desferrioxamine, Deferasirox und Ciclopiroxolamin inhibieren ebenfalls die Wnt-Signalkaskade sowie das Zellwachstum von beispielsweise Kolorektal-Tumorzelllinien (Song *et al.*, 2011). Drug-Screenings identifizierten das Molekül XAV939 als selektiven Inhibitor der  $\beta$ -Catenin-gesteuerten Transkription wobei es die Degradierung von  $\beta$ -Catenin durch Stabilisierung von Axin herbeiführt. XAV939 stabilisiert Axin durch Inhibition der Poly-ADP-Ribose-Polymerasen Tankyrase 1 und 2. Jene Enzyme interagieren mit einer hoch konservierten Axin-Domäne und stimulieren so seine Degradierung mittels des Ubiquitin-Proteasomen-Signalweges (Huang *et al.*, 2009). Eine weitere Klasse von Inhibitoren wird durch Moleküle beschrieben, welche die Wnt-Produktion inhibieren, sog. IWP's. IWP-2 verhindert die Palmytylierung von Wnt-Proteinen durch eine membrangebundene O-Acyltransferase und letztlich die Wnt-Sekretion (Chen *et al.*, 2009).

Um nachzuweisen ob der Wnt-Signalweg bei der Erhaltung stammzellcharakteristischer Eigenschaften der S462 Sphären eine Schlüsselrolle spielt, sind funktionale Analysen geplant. Durch die Blockade verschiedener Komponenten der Signalkaskade könnten downstream der Kaskade die Proteinlevel verschiedener Faktoren wie  $\beta$ -Catenin quantifiziert oder das Wachstumsverhalten *in vitro* beobachtet werden. Der Einsatz verschiedener Substanzen mit unter-

schiedlichen Targets innerhalb des Signalweges könnte sowohl grundsätzliche Sensitivitäten auf adhärenzte und sphäroide S462 Zellen verdeutlichen aber auch gegebenenfalls in unterschiedlichen Wirksamkeiten resultieren und somit für die Planung neuer therapeutischer Strategien von großer Bedeutung sein.

### 5.5 Tumorstammzellresistenzen

Tumorstammzellen sind durch Resistenzen gegenüber Zytostatika gekennzeichnet und sind in der Lage Therapien unbeschadet zu überstehen (Dean *et al.*, 2005). Für eine Vielzahl von Entitäten, wie beispielsweise maligne Melanome (Frank *et al.*, 2005; Schatton *et al.*, 2008), Brustkrebs (Li *et al.*, 2008), oder Hirntumore (Eramo *et al.*, 2006), konnten Chemoresistenzen nachgewiesen werden. So zeigte die Therapie eines MPNST Patienten mit Doxorubicin und Ifosfamid zunächst eine Tumorregression, die jedoch in einer Rekurrenz resultierte, so dass vermutet wird, dass eine Subpopulation an Zellen besteht, die Therapieresistent ist. Somit könnte man auch für MPNSTs postulieren, dass Resistenzmechanismen über Tumorstammzellen oder tumorstammzellähnliche Zellen ausgeübt werden (Beobachtung durch Prof. Dr. Mautner, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für S462 Sphären und die dazu gehörigen parentalen S462 Zellen divergente Einflüsse verschiedener Zytostatika auf die Zellproliferation beobachtet, die auf Tumorstammzellen bzw. tumorstammzellähnliche Zellen zurückzuführen sein könnten. Doxorubicin und Ifosfamid bestätigten die erhöhte Zytostatikaresistenz, wohingegen die Plerixafor und Temozolomid-Behandlungen einen umgekehrten Effekt hervorgerufen haben. Doxorubicin und Ifosfamid gehören zu den Standardtherapien für MPNST Patienten und werden häufig in Kombination verabreicht. Die Kombinationsbehandlung der adhärenzten S462 Zellen und Sphären führte *in vitro* tendenziell zu keiner verbesserten Wirksamkeit gegenüber einer Einzeltherapie, jedoch konnte eine leicht erhöhte Resistenz der höheren Sphären-Passage bestätigt werden. Im Gegensatz dazu reagierten S462 Sphären sensitiver auf die Behandlung mit Plerixafor oder Temozolomid. Plerixafor fungiert als CXCR4 Antagonist und erbrachte in einer Studie von Mo *et al.* Hinweise darauf, dass die CXCR4/CXCL12-Achse essentiell für die MPNST Tumorprogression sein könnte (Mo *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der Behandlung von MPNST stammzellähnlichen Zellen vergleichend zu differenzierten parentalen Zellen konnten darlegen, dass Unterschiede in der Behandlung beider Zelltypen bestehen. Die Identifizierung zweier Substanzen, die eine stärkere Wirksamkeit an S462 Sphären mit tumorstammzellähnlichen Charakter zeigten, ist von essentieller Bedeutung für die

Entwicklung spezifischerer und effektiverer Therapien und sollte in weiteren Studien berücksichtigt werden.

Wirkungsmechanismen der verschiedenen Zytostatika spielen dabei eine essentielle Rolle. So gibt es Hinweise darauf, dass bei Temozolomid, welches unter anderem bei Glioblastom- und Astrozytom Patienten als Standardtherapie verabreicht wird, eine Wirkungsabhängigkeit beruhend auf dem Methylierungsmuster der Promoterregion von der *O*-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) besteht. Normale Zellen sind in der Lage die angefügten Alkylreste reversibel durch die aktive *O*-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase aufzuheben. Besteht die Transferaseaktivität jedoch nicht, kommt es zu einer besseren Wirksamkeit durch Temozolomid, so dass sie chemosensitiver reagieren, da die angefügten Alkyl-Reste bestehen bleiben. Die Verwendung von MGMT-Promoter-Methylierungsmustern als prognostischer Marker findet bereits Anwendung in der Therapie von Glioblastom Patienten (Hegi *et al.*, 2005; Kaina *et al.*, 2007; van den Bent *et al.*, 2009; Wick *et al.*, 2009; Suri *et al.*, 2011). Unterschiedliche Methylierungsmuster der S462 Sphären und adhärennten S462 Kultur als Ursache differenter Sensitivitäten konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. So zeigten adhärennte S462 Zellen und Sphären sowohl beides, in Abhängigkeit der untersuchten Proben, methylierte als auch unmethylierte Promoterregionen und konnten nicht eindeutig zugewiesen werden. Bei den durchgeführten *in vitro* Studien sind grundsätzlich die verwendeten Zellkultivierungsmethoden zu berücksichtigen, deren Zusammensetzungen Einfluss auf die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen nehmen kann und nicht auszuschließen ist. Eine Angleichung der Systeme auf beide Zelltypen war nicht möglich, da ein serumhaltiges Medium zu einer Differenzierung der Sphären führte bzw. unter Serumentzug ein Großteil der differenzierten adhärennten Tumorzellen nicht proliferierte (eigene Beobachtung während der Versuchsdurchführung und Auswertung).

Grundsätzlich können Mechanismen für Zytostatikaresistenzen sehr unterschiedlichen Ursprungs sein. Effluxtransporter, wie der ABCG2-Transporter, sind häufig ursächlich für Zytostatikaresistenzen. Man findet häufig eine erhöhte Expression in zytostatikaresistenten Tumorzellen (Doyle *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2010). Expressionsanalysen der S462 Sphären auf mRNA Ebene für ABCG2 zeigten eine erhöhte Expression, jedoch konnten nur weniger als 1% positive Zellen auf Proteinebene detektiert werden und stimmen somit auch mit den Ergebnissen der *Side-Population*-Messung überein, die keine Detektion dieser Subpopulation erbrachte. Slomiany *et al.* konnten nichtsdestoweniger zeigen, dass der Hyaluronsäure-

Rezeptor CD44 Komplexe mit den Transportern ABCG2 und ABCB1 in der Plasmamembran von humanen MPNST Zellen bildet. CD44 wird neben verschiedenen Entitäten auch in MPNSTs exprimiert (Sherman *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2003; Slomiany *et al.*, 2009). Die Gabe von Hyaluron-Oligosacchariden, die gegen CD44 gerichtet waren, verhinderten Hyaluron-CD44-vermittelte Prozesse sowie die Hyaluronsäure-Produktion. Eine Behandlung von MPNST Zellen mit Hyaluron-Oligomeren verursachte den Abbau der Komplexe und führte zu einer Internalisierung von CD44, ABCG2 und ABCB1 von der Zellmembran ins Zytoplasma, so dass es letztlich zu einer Unterdrückung der Transporteraktivität und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Doxorubicin gekommen war. Auch *in vivo* führte die Gabe von Hyaluron-Oligomeren zu einer Inhibition des Tumorwachstums sowie zu einem synergistischen Effekt bei zusätzlicher Behandlung mit Doxorubicin (Slomiany *et al.*, 2009).

Eine erhöhte Expression der Proteinkinase C iota (PRKCi) für S462 Sphären wurde anhand der Micro-Array Signalweganalyse identifiziert bzw. mittels quantitativer PCR validiert. Der atypischen PRKCi wird eine Taxol-induzierte Apoptose-Resistenz bei Leukämiezellen zugesprochen (Murray & Fields, 1997; Jamieson *et al.*, 1999). Zusätzlich wird die PRKCi für die KRAS-induzierte Transformation und Expandierung von Tumor-initiiierenden stammzellähnlichen Zellen der Lunge benötigt (Regala *et al.*, 2009; Justilien & Fields, 2012). Eine erhöhte Expression der PRKCi wurde vor allem in Entitäten wie Gliomen, myeloische Leukämien, alveolären Rhabdomyosarkomen (Justilien & Fields, 2012; Kikuchi *et al.*, 2012), Lungenkrebs, Kolonkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs (Scott *et al.*, 2010; Justilien & Fields, 2012), Ovarial- und Brustkrebs (Justilien & Fields, 2012) wiedergefunden. Die atypische Kinase interagiert in verschiedenen Signalkaskaden, welche die Proliferation von Tumorzellen, die Invasion und das Überleben jener Zellen steuern (Fields *et al.*, 2007; Fields & Murray, 2008; Justilien & Fields, 2010; Justilien *et al.*, 2012). Somit wird ihr eine onkogene, aber auch prognostische sowie therapeutische Rolle für eine Vielzahl von Tumoren eingeräumt (Fields *et al.*, 2007). Auch für tumorstammzellähnliche Zellen aus MPNSTs könnte die PRKCi von Bedeutung und gegebenenfalls an Resistenzen beteiligt sein. Funktionale Analysen durch Inhibition der PRKCi könnten weiter Aufschluss über die Bedeutsamkeit geben. Das Molekül Aurothiomalat führt beispielsweise zur Inhibition der nicht kleinzelligen Lungenkrebs-Zell-Transformation (Regala *et al.*, 2008). Der Inhibitor ICA-1 führt wiederum zu einer Inhibition der Neuroblastom-Zellproliferation und Apoptoseinduktion (Pillai *et al.*, 2011). Im Fall der S462 Sphären könnte der Einsatz genannter Inhibitoren dazu beitragen die Rolle der Proteinkinase näher zu beschreiben.

Die meisten konventionellen klinischen Therapien richten sich gegen ausdifferenzierte Tumorzellen. Jedoch sind Therapien aufgrund von Resistenzen, in vielen Fällen verursacht durch Tumorstammzellen, von limitierender Effizienz. Die Etablierung einer tumorstammzellgerichteten Therapie könnte somit die Wirksamkeit positiv beeinflussen und Resistenzen aufheben. Hierbei bieten Tumorstammzellen verschiedenste direkte und indirekte Angriffspunkte, die mittlerweile in präklinischen Studien erprobt worden sind (Frank *et al.*, 2010). So zeichnen sich beispielsweise maligne Melanome durch eine ABCB5 Expression auf, die spezifisch im humanen Melanom-Xenograft Mausmodell durch Administration des monoklonalen ABCB5 Antikörpers so eine Tumorformation verhindert wurde bzw. dies zu einem Wachstumsstopp führte sowie bereits etablierte Tumore in ihrem Wachstum unterdrückt wurden (Schatton *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2010). Auch der Einsatz von shRNA gegen CD133 (Frank *et al.*, 2005 & 2010; Klein *et al.*, 2007; Monzani *et al.*, 2007) führte *in vitro* zu einer verringerten Klonogenität und Mortalität von Melanomzellen sowie *in vivo* zu einem verminderten Metastasierungsverhalten (Rappa *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2010). Die Gabe von CD44-spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Tumorstammzellen von hepatozellulären Karzinomen mit einer CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> Markerexpression führte *in vivo* zu einer Inhibition der Tumorformation und des Wachstums von CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> implantierten Karzinomzellen (Yang *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2010). *In vitro* Versuche, mittels shRNA gerichtet gegen L1CAM, verhinderte bei CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen aus Gliomen eine Neurosphärenformation und induzierte Apoptose. Zusätzliche *in vivo* Versuche mit einem L1CAM Knockdown zeigten bei CD133<sup>+</sup> implantierten Gliomzellen ferner eine Inhibition der Tumorgenese und ein längeres Überleben der Tiere (Bao *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2010). Eine Inhibition des Nuklearfaktors  $\kappa$ B bei Leukämie Tumorstammzellen führte *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Inhibition (Guzman *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2010). Auch über den PI3K/Pten/mTOR-Signalweg konnten leukämische Stammzellen moduliert werden (Yilmaz *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2010). Weitere Möglichkeiten Tumorstammzellen anzugreifen wird durch Inhibitoren begründet, die gezielt Resistenzmechanismen der Zellen regulieren, wie beispielsweise Transportermoleküle (Frank *et al.*, 2010). Die Behandlung von Melanomen mit dem Zytostatikum Doxorubicin führte zu einer Resistenz, verursacht durch den ABCB5 Transporter, wobei diese Resistenz reversibel durch eine Behandlung mit monoklonalen ABCB5 Antikörpern (Frank *et al.*, 2005) oder shRNA (Elliott & Al-Hajj, 2009) aufgehoben werden konnte und zu einer Wirksamkeit von Doxorubicin führte (Frank *et al.*, 2010). Das Gen-Silencing löste zusätzlich eine deutliche

Senitivität gegenüber 5-Fluorouracil und Camptothecin aus (Huang *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2010).

Eine weitere indirekte Möglichkeit der Inhibition der Tumorprogression von Tumorstammzellen wird durch die Radiosensitivierung ermöglicht und konnte bereits an CD133<sup>+</sup> Glioma Stammzellen (Bao *et al.*, 2006a; Chang *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010) sowie an CD24<sup>-/lo</sup>CD44<sup>+</sup> Brustkrebs Tumorstammzellen gezeigt werden (Phillips *et al.*, 2006; Diehn *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010). Des Weiteren bietet die induzierte Differenzierung von undifferenzierten malignen Zellen einen weiteren Angriffspunkt der Tumorrückbildung aber auch eine verbesserte therapeutische Sensibilisierung (Pierce, 1983; Frank *et al.*, 2010), beispielsweise bei Glioblastomen (Piccirillo *et al.*, 2006), Brustkrebs (Yu *et al.*, 2007) oder Melanomen (Schatton *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2010). Eine Charakterisierung von Tumorstammzellen bzw. tumorstammzellähnlichen Zellen aus MPNSTS, die eine deutliche Abgrenzung zu parentalen Tumorzellen erlaubt, könnte dazu beitragen Oberflächenstrukturen zu erkennen, die einzigartig auf jener Subpopulation vorliegen um zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

Eine gegen Tumorstammzellen gerichtete Therapie würde so das Selbsterneuerungs- und Wachstumspotential unterbinden und langfristig das Wachstum verhindern. Folglich könnte das Risiko für eine Metastasierung und Tumorrekurrenz gesenkt werden. Eine deutliche Regression des Tumolvolumens, wie bei der Therapie gegen differenzierte Tumorzellen, würde allerdings ausbleiben (Jordan *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007; Frank, 2010). Die Etablierung von Kombinationstherapien werden somit gehäuft in den Fokus verschiedener Tumortherapien gestellt. Eine Therapie, die sich sowohl gegen differenzierte Tumorzellen als auch Tumorstammzellen richtet, könnte in einer positiveren Prognose für den Patienten resultieren und somit von entscheidener Bedeutung sein. So zeichnen sich beispielsweise CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML Stammzellen aber auch differenzierte AML Zellen durch eine erhöhte CD123 ( $\alpha$ -Untereinheit des IL-3 Rezeptor) Expression aus. Die Gabe des spezifischen, neutralisierenden monoklonalen CD123 Antikörpers beeinträchtigte das Wachstum *in vivo*, wobei sowohl leukämische Tumorstammzellen als auch differenzierte Tumorzellen davon betroffen waren (Jin *et al.*, 2009a; Frank *et al.*, 2010). Für duktales Adenokarzinome des Pankreas konnten ebenfalls Tumorstammzellen beschrieben werden, die womöglich ursächlich für Therapiesistenzen sind, Rekurrenzen sowie Metastasierungen hervorrufen und eine Expression des *Death Receptor 5* (DR5) aufweisen. Eine Kombinationstherapie von

Gemcitabin gegen differenzierte Tumorzellen sowie dem monoklonalen DR5-Antikörper Tigatuzumab gegen Tumorstammzellen führte *in vivo* zu einer Reduktion von Tumorstammzellen und einer Tumorregression. Des Weiteren verhinderte die Kombinationstherapie eine Tumorrekurrenz bzw. bewirkte ein Hinauszögern der Tumorprogression (Rajeshkumar *et al.*, 2010). Der mTOR Inhibitor RAD001 und Docetaxel führten bei Brustkrebs zu einer verstärkten Inhibition, wobei RAD001 sowohl auf Tumorstammzellen als auch differenzierte Tumorzellen einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt zeigte (Zhang *et al.*, 2012).

Die Wichtigkeit von Kombinationstherapien, die es ermöglichen, Therapieresistenzen zu überwinden und Tumorrekurrenzen sowie Metastasierungen zu vermeiden, besteht auch für maligne Nervenscheidentumore. Johansson *et al.* zeigten am Beispiel von *in vitro* Versuchen an verschiedenen sporadischen sowie NF1-assoziierten MPNST Zelllinien mit RAD001 so ebenfalls ein vermindertes Zellwachstum nach 4-tägiger Behandlung. *In vivo* führte die Gabe von RAD001 am sporadischen MPNST Xenograft Modell zu einem verzögerten Tumorwachstum. Die Kombination mit dem EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib führte zu einer verstärkten Inhibition des Tumorzellwachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Johansson *et al.*, 2008). Die Kombination aus onkolytischen Herpes simplex Viren und Erlotinib wies eine leicht verstärkte Inhibition der Proliferation im Vergleich zur Einzeltherapie auf (Mahller *et al.*, 2007). Interessanterweise berichteten Studien von Lee *et al.* und Park *et al.* von einer Bcl-xL Überexpression in einer NF1-assoziierten MPNST Zelllinie. Eine Inhibition von Bcl-xL mittels RNAi aber auch ABT-737 führte zu einer Apoptose-Sensitivierung der Zellen, die letztlich für ABT-737 synergistisch mit Doxorubicin in einer Zytotoxizität der MPNST Zellen resultierte (Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). Auch die Kombinationstherapie bestehend aus einem Geranylgeranyl-Transferase Inhibitor und Lovastatin verursachte einen G0/G1 Arrest sowie eine synergistische Inhibition und Autophagie von STS-26T MPNST Zellen (Sane *et al.*, 2010). Eine Behandlung der MPNST Zelllinien NF90-8 und ST88-14 mit Farnesyl-Transferase Inhibitoren und Lovastatin zeigte ebenso eine Inhibition der Proliferation sowie Apoptoseinduktion (Wojtkowiak *et al.*, 2008). Die Kombinationstherapie der S462 Zellen sowie der S462 Sphären mit Doxorubicin und Ifosfamid führte zu keiner deutlich verbesserten Wirksamkeit, soll jedoch von weiteren Kombinationen gefolgt werden, die sowohl das Wachstum von differenzierten parentalen Tumorzellen als auch das der Sphären inhibieren. Zusätzliche präklinische *in vivo* Versuche



könnten dazu dienen die Wirksamkeiten näher zu untersuchen und gegebenenfalls zu untermauern.

Die hier vorliegende Arbeit beschreibt erstmals das Vorhandensein von tumorstammzellähnlichen Zellen in MPNSTs bei NF1 Patienten. Bislang richteten sich präklinische aber auch klinische Studien nicht spezifisch gegen Tumorstammzellen. Zukünftige Studien sollten daher diese Tumorzellen einschließen. Die vorgelegten Ergebnisse erlauben jetzt eine weitere Charakterisierung dieses Zelltyps beispielsweise durch Erstellung spezifischerer Markerprofile, die nicht nur eine Unterscheidung differenzierter Tumorzellen und Tumorstammzellen zulassen, sondern auch jene Tumorstammzellen von normalen Stammzellen abgrenzen. Eine Studie von Faris Farassati (Borrego-Diaz *et al.*, 2012) erbrachte hierzu erste Erkenntnisse. So untersuchte die Arbeitsgruppe selektiv CD133<sup>+</sup> MPNST Zellen etablierter Zelllinien, darunter auch S462 und S805, welche unter Stammzellbedingungen als Sphären kultiviert wurden. CD133<sup>+</sup> Zellen zeichneten sich beispielsweise durch eine erhöhte Aktivierung des Ras-Signalweges sowie seinen Effektoren ERK, JNK, PI3K, p38K und RalA aus. Zusätzlich wiesen sie eine Expression von  $\beta$ -Catenin und Snail auf, zwei Proteine, die auch an der epithelialen zur mesenchymalen Transition beteiligt sind sowie ein invasiveres Wachstum in Matrigel, welches im Zusammenhang mit einem höheren Metastasierungspotential stehen könnte. Besonders hervorzuheben war jedoch der Einsatz von ERK Inhibitoren, der zeigte, dass CD133<sup>+</sup> Zellen resistenter gegenüber einer Behandlung waren als die gesamte, nicht selektierte Zellpopulation und somit nochmals verdeutlichte, dass dieser stammzellähnliche Zelltyp für Therapieresistenzen verantwortlich sein kann (Borrego-Diaz *et al.*, 2012). Weitere Daten der Arbeitsgruppe von Christopher Maxwell (Mohan *et al.*, 2013) zeigten, dass die Aktivität der Aurora Kinase A Einfluss auf die Proliferation und Selbsterneuerung von S462 Sphären nimmt. Die Gabe des Aurora Kinase Inhibitors MLN8237 verminderte die Sphärenformation und begünstigte deren Differenzierung. Zudem verstärkte das Silencing des regulatorischen Gens *HMMR/RHAMM* die Sphärenformation von CRL-2884 (sNF96.2) Zellen wohingegen das Silencing eines weiteren regulatorischen Gens der Aurora Kinase, TPX2, zu einer verminderten Sphärenformationsrate führte (Mohan *et al.*, 2013).

Expressionsanalysen, globale Expressionsprofile sowie die Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika konnten die Hypothese stammzellähnlicher Zellen aus MPNSTs untermauern. Die differenzielle Regulierung des Wnt-Signalweges könnte dabei von besonderer Bedeutung

sein und für die Erhaltung des stammzellähnlichen Charakters der S462 Sphären eine zentrale Rolle einnehmen.

### 5.6 Etablierung von MPNST-Zelllinien

Die Grundlage von *in vitro* - aber auch *in vivo* Studien sind etablierte Zelllinien. Die geringe Verfügbarkeit aber auch die außerordentliche Heterogenität von MPNSTs erschwert die Etablierung von Tumorzelllinien. Eine Sicherstellung von Tumorzellen *in vitro* wird häufig nicht berücksichtigt, wobei eine genetische Verifikation der Zellen von essentieller und grundlegender Bedeutung ist. Hierbei kann sowohl gewährleistet werden, dass es sich bei den untersuchten Zellen um reine Tumorzellen handelt, als auch dass Kontaminationen mit anderen Zelllinien auszuschließen sind. Die Wichtigkeit der genetischen Überprüfung von Zelllinien konnte am Beispiel der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 verdeutlicht werden. Globale Micro-Arrayanalysen durch Ross *et al.* warfen erstmals die Frage nach dem Ursprung dieser Zelllinie auf, welche deutliche Ähnlichkeiten zu einer Melanomzelllinie aufwies (Ross *et al.*, 2000). Zusätzliche Expressionsprofile, SNP-, Mikrosatelliten- und CGH-Analysen konnten die Vermutungen bestätigen, wobei gewisse Abweichungen zu berücksichtigen sind (Rae *et al.*, 2007). Die Zelllinie befindet sich nach wie vor im Umlauf und wird als Modell für Brustkrebs, trotz bestehender Zweifel ob es sich wirklich um Brustkrebstumorzellen handelt, verwendet (Rae *et al.*, 2007; Holliday & Speirs, 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue MPNST-Zelllinie (S1844,1) etabliert und mittels Mikrosatellitenanalyse genetisch verifiziert und dem originalen Tumor zugeordnet werden. Die Zellen zeichnen sich vor allem durch Schwann-zellartige Strukturen aus sowie durch die Expression von S100 und NGFR. Eine Tumorigenität *in vivo* dieser und einer weiteren Zelllinie (S1507,2) bei subkutaner Implantation sowohl in die Flanke als auch in den Nackenbereich war allerdings nicht nachweisbar, so dass auch eine veränderte Lokalisation der Implantation (von Flanke zu Nackenbereich) zu keiner Tumorformierung führte. Expressionsanalysen wiesen einen deutlich höheren Anteil CD34 und CD133 positiver Zellen auf Proteinebene der Zelllinie S462 im Vergleich zu S1844,1 und S1507,2 auf. Die signifikant höhere Proteinexpression beider Marker könnte ausschlaggebend für das Wachstum *in vivo* sein. Die Implantation CD133<sup>+</sup> S462 Sphären *in vivo* führte wie zuvor beschrieben zu einer Tumorformierung indes bei einer Injektion von CD133<sup>-</sup> S462 Sphären eine Tumorbildung nicht vorlag bzw. deutlich geringer ausfiel (Spyra *et al.*, 2011). Die Expression des

Stammzellmarkers CD133 könnte somit von entscheidender Bedeutsamkeit für das Wachstum *in vivo* sein.

Bislang existieren nur einige etablierte MPNST Zelllinien. Häufig stehen zudem regelmäßige genetische Charakterisierungen aus, die einen Nachweis von Tumorzellen des Originaltumorgewebes einschließen. Die Mikrosatellitenanalyse als Tool zum Nachweis von Tumorzellen bietet so die Möglichkeit einer ständigen Kontrolle verwendeter Zellen, um vor allem auch Kontaminationen durch andere Zellen auszuschließen.

### 5.7 Metastasierungsmodelle

Mausmodelle sind von essentieller Bedeutung für das Verständnis der Tumorgenese und Metastasierung. Eine Vielzahl von bestehenden Neurofibromatose Typ 1-Mausmodellen dienen bereits als Grundlage, um Prozesse der Tumorgenese nachzuvollziehen (siehe dazu auch Kapitel 1.2.5) (Brannan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1994; Cichowski *et al.*, 1999; King *et al.*, 2002; Huijbregts *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2008; Gregorian *et al.*, 2009; Brossier & Carroll, 2012).

Die Prüfung des tumorigenen Potentials von Zelllinien dient vor allem auch zur Etablierung weiterer Mausmodelle. Die heterotope oder orthotope Implantation von humanen Zellen räumt im Vergleich zu transgenen Mausmodellen die Möglichkeit ein, ein Tumormodell zu nutzen, welches dem originalen humanen Tumor entspricht. Bei transgenen Mausmodellen könnte somit auch die Möglichkeit bestehen, dass die Histologie der Tumore nicht denen der humanen Tumore gleicht. Die Originalität des Tumors im Xenograft Modell schafft somit eine patientennähere Simulierung der Tumorgenese. Die hohe Metastasierungsfrequenz von MPNSTs erfordert zudem Modelle, die Mechanismen bzw. Ursachen widerspiegeln. In einer Studie von Ducatman *et al.* wurden 62 NF1-assoziierte MPNST und 58 sporadische MPNST Patienten eingeschlossen, wobei es bei 39% bzw. 16% der Patienten zu der Entwicklung von Metastasen gekommen war. Diese traten am häufigsten in der Lunge auf aber auch im Weichgewebe, in Knochen, Leber, im abdominalen Hohlraum, in den Adrenaldrüsen, im Zwerchfell, Mittelfell, Gehirn, an den Ovarien, Nieren und Retroperitoneum (Ducatman *et al.*, 1986; Carroll & Ratner, 2008). Gegenwärtig bestehen nur wenige MPNST Metastasierungsmodelle wie beispielsweise durch die Tumorzellinjektion in die Schwanzvene (Torres *et al.*, 2011; Ghadimi *et al.*, 2012). Immunhistologische Analysen zum Nachweis von Metastasen erfordern zudem die Berücksichtigung von Antikörper-Kreuzreaktionen, vor

allem für polyklonale Antikörper, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (Mighell *et al.*, 1998; Ramos-Vara, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Modelle zum Nachweis der Metastasierung etabliert, die sich durch ihre hohe Spezifität auszeichnen. Das Modell der Mikrosatellitenanalyse wird vor allem durch den spezifischen Nachweis humaner Zellen geprägt, da die verwendeten Marker nur zur Amplifikation humaner DNA führen. Des Weiteren kann anhand der angewandten Markermoleküle mit hoher Präzision die verwendete Zelllinie, ähnlich wie ein individueller Fingerabdruck, nachgewiesen werden. Die divergenten Signalstärken können ferner auch im Zusammenhang mit der Menge an metastasierten humanen Zellen stehen, so dass je nach Metastasierungsgrad zu den einzelnen Organen unterschiedlich starke Ausprägungen der Migration der Zellen vorliegen, die sich ihrerseits von der Mikrosatelliten-Signalstärke ableiten lassen. Die verwendete Nachweismethode bietet somit eine Möglichkeit der Detektion humaner Zellen bzw. Subpopulationen, aber auch den Nachweis von Metastasen, wobei sie simultan eine genetische Verifizierung der Zellen erlaubt und so Zellen unterschiedlichen Ursprungs zuordnen kann. Anhand der verwendeten Proben ließen sich für einen Großteil der Mausgewebeproben Metastasierungen bestätigen. Die untersuchten Proben gingen aus Versuchen hervor, die im Wesentlichen zur Etablierung von Primärtumoren dienten. Die daraus hervorgegangenen Metastasen entsprachen demnach einer spontanen Metastasierung wie sie häufig im Tiermodell wiederzufinden ist und zur Anwendung kommt. Hierbei kann zudem zwischen heterotopen subkutanen Injektionen von Tumorzellen (entsprechend der vorliegenden Arbeit) sowie orthotopen Injektionen unterschieden werden. Das Modell der spontanen Metastasierung erlaubt initialisierende Prozesse zu untersuchen bzw. zu verfolgen. Demgegenüber gestellt besteht die Möglichkeit der experimentellen Metastasierung, die auf der Injektion von Tumorzellen in das zirkulierende System besteht (Khanna & Hunter, 2005). Beispielsweise führt die Injektion von Zellen in die Schwanzvene primär zu Lungenmetastasen wohingegen eine intrasplenische- oder Pfortader-Veneninjektion zu Lebermetastasen führt sowie intrakardiale Injektionen unter anderem in Knochenmetastasen resultieren. Auch wenn das experimentelle System zu einer schnellen Metastasierung führt, reproduzierbar und beständig ist, so können grundlegende Mechanismen der Entstehung nicht nachvollzogen werden (Khanna & Hunter, 2005). Anhand der verwendeten Gewebeproben konnte im Rahmen der Arbeit für einige Tiere eine Metastasierung von parentalen S462 Zellen bzw. erstmals von S462 tumorstammzellähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte vereinzelt beobachtet werden, dass beispielsweise bei den untersuchten

Lymphknotenproben einer Maus nicht zwangsläufig humane Zellen in allen Proben detektierbar waren. Eine Visualisierung der Zellen *in vivo*, wie sie durch das Biolumineszenz Imaging ermöglicht wird, könnte den Metastasierungsprozess noch deutlicher darstellen.

Das System des Biolumineszenz Imaging offeriert den spezifischen Nachweis implantierter Zellen basierend auf Stoffwechselprozessen, wobei ein stabiles Signal in Abhängigkeit der Zellvitalität detektierbar ist. Luciferase-transduzierte S462 Zellen konnten somit direkt nach Implantation visualisiert und ihre potenzielle Metastasierung/Migration verfolgt werden. Biolumineszenzmessungen finden bereits für eine Vielzahl von Tumorzelllinien aber auch Tumorstammzellen Anwendung als Nachweis der Metastasierung, wie beispielsweise bei Brustkrebs (Jenkins *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Bolin *et al.*, 2012). Die Arbeitsgruppe von Steven Carroll konnte die Methode der Biolumineszenzmessung an der NF1-assoziierten MPNST Zelllinie ST88-14 näher beschreiben. Hierfür erfolgten neben *in vitro* Versuchen mit dem Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen auch *in vivo* Studien Luciferase-transduzierter ST88-14 Zellen an NIH III Mäusen im orthotopen Xenograft Modell. So konnte nicht nur die Visualisierung der malignen Zellen am Nervus ischiadicus gewährleistet werden, sondern vielmehr auch die Wirksamkeit von Tamoxifen (Byer *et al.*, 2011; Turk *et al.*, 2011). Durch die Transduktion von MPNST Sphären könnte in zukünftigen Studien das Metastasierungspotential jener Zellen geprüft und quantifiziert werden. Zudem wird ein grundlegendes Modell geschaffen, welches die Untersuchung verschiedener Therapien ermöglicht, deren Beeinflussung auf die Tumorkinetik sowie den Metastasierungsprozess von MPNST Tumorstammzellen nachvollziehen lässt. Die Methode der Biolumineszenzmessung bietet grundsätzlich eine Möglichkeit der Visualisierung von Zellen oder Organen *in vivo*. Ein Vorteil wird durch ein Signal geschaffen, welches nur detektierbar ist solange die Luciferase-transduzierten Zellen vital *in vivo* vorliegen. Im dargelegten ersten Versuch zur Etablierung der Methode zeigte sich eine deutliche Abnahme des Signales, welches höchstwahrscheinlich mit einer Abstoßungsreaktion vitaler Zellen zu erklären ist. Zusätzlich wurden für die erste Versuchsdurchführung aus tierschutzrechtlichen Aspekten 5 Tiere verwendet. Eine höhere Anzahl von Tieren hätte gegebenenfalls die Wahrscheinlichkeit der Tumorformierung bzw. Metastasierung erhöht. Vorangegangene Experimente bei subkutaner Injektion von adhären-ten S462 Zellen zeigten in einigen Fällen sehr geringe Tumorformierungsraten (Beobachtung durch Frau Dr. Maria Demestre). Weiterführende Versuche mit erhöhter Mausanzahl aber auch Luciferase-transduzierten S462 Sphären könnten zudem weiter Aufschluss über das Metastasierungsverhalten dieses Zelltyps geben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien lieferten erstmalig solide Beweise für stammzellähnliche Zellen in MPNSTs und eröffnen somit neue Perspektiven in der Forschung und Therapieentwicklung für diese malignen Tumore. Wie einige Komponenten des Wnt-Signalweges, deren veränderte Expression in den MPNST Sphären bereits in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurde, könnten in der Zukunft weitere Targets entdeckt werden. Die unterschiedlichen Wirksamkeiten der getesteten Zytostatika könnten zudem ermöglichen, spezifischere Therapien zu entwickeln, die Tumorstammzellen bzw. stammzellähnliche Zellen zum Ziel haben. Die Etablierung einer neuen genetisch verifizierten MPNST Zelllinie ist eine signifikante Bereicherung, neben den vereinzelten etablierten Zelllinien, die meist nicht genetisch verifiziert sind. Xenograft Mausmodelle die eine Metastasierung nachvollziehbar machen sind der Ausgangspunkt für das Verständnis der Biologie der malignen peripheren Nervenscheidentumore beim Menschen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abbott BL.** „ABCG2 (BCRP): a cytoprotectant in normal and malignant stem cells.“ *Clin Adv Hematol Oncol.*, Nr. 4 (2006): 63-72.

**Adams JM,** Cory S. „The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.“ *Science*, Nr. 281 (1998): 1322-1326.

**Aguirre A,** Rizvi TA, Ratner N, Gallo V. „Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors.“ *J Neurosci.*, Nr. 25 (2005): 11092-11106.

**Aguirre A,** Rubio ME, Gallo V. „Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal.“ *Nature*, Nr. 467 (2010): 323-327.

**Ailles LE,** Weissman IL. „Cancer stem cells in solid tumors.“ *Curr Opin Biotechnol.*, Nr. 18 (2007): 460-466.

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

**Allendoerfer KL,** Shelton DL, Shooter EM, Shatz CJ. „Nerve growth factor receptor immunoreactivity is transiently associated with the subplate neurons of the mammalian cerebral cortex.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 87 (1990): 187-190.

**Alonso L,** Fuchs E. „Stem cells of the skin epithelium.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 100 (2003): 11830-11835.

**An Y,** Ongkeko WM. „ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells?“ *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, Nr. 5 (2009): 1529-1542.

**Angata K,** Chan D, Thibault J, Fukuda M. „Molecular dissection of the ST8Sia IV polysialyltransferase. Distinct domains are required for neural cell adhesion molecule recognition and polysialylation.“ *J Biol Chem.*, Nr. 279 (2004): 25883-25890.

**Aoki M,** Nabeshima K, Nishio J, Ishiguro M, Fujita C, Koga K, Hamasaki M, Kaneko Y, Iwasaki H. „Establishment of three malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines, FU-SFT8611, 8710 and 9817: conventional and molecular cytogenetic characterization.“ *Int J Oncol.*, Nr. 29 (2006): 1421-1428.

**Arai H,** Ikota H, Sugawara K, Nobusawa S, Hirato J, Nakazato Y. „Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas.“ *Brain Tumor Pathol.*, Nr. 29 (2012): 160-167.

**Bach SP,** Renahan AG, Potten CS. „Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm.“ *Carcinogenesis*, Nr. 21 (2000): 469-476.

**Badache A**, De Vries GH. „Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB.“ *J Cell Physiol.*, Nr. 177 (1998): 334-342.

**Bajenaru ML**, Donahoe J, Corral T, Reilly KM, Brophy S, Pellicer A, Gutmann DH. „Neurofibromatosis 1 (NF1) heterozygosity results in a cell-autonomous growth advantage for astrocytes.“ *Glia*, Nr. 33 (2001): 314-323.

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

**Bao S**, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. „Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor.“ *Cancer Res.*, Nr. 66 (2006b): 7843-7848.

**Bao S**, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. „Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth.“ *Cancer Res.*, Nr. 68 (2008): 6043-6048.

**Barnett SC**, Robertson L, Graham D, Allan D, Rampling R. „Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells transformed with c-myc and H-ras form high-grade glioma after stereotactic injection into the rat brain.“ *Carcinogenesis*, Nr. 19 (1998): 1529-1537.

**Basile KJ**, Abel EV, Aplin AE. Source. „Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells.“ *Oncogene*, Nr. 31 (2012): 2471-2479.

**Basu TN**, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. „Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients.“ *Nature*, Nr. 365 (1992): 713-715.

**Battula VL**, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Müller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Bühring HJ. „Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1.“ *Haematologica*, Nr. 94 (2009): 173-184.

**Beert E**, Brems H, Daniëls B, De Wever I, Van Calenbergh F, Schoenaers J, Debiec-Rychter M, Gevaert O, De Raedt T, Van Den Bruel A, de Ravel T, Cichowski K, Kluwe L, Mautner V, Sciot R, Legius E. „Atypical neurofibromas in neurofibromatosis type 1 are premalignant tumors.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 50 (2011): 1021-1032.

**Bengochea A**, de Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Treppe C, Hainaut P, Scoazec JY, Vitvitski L, Merle P. „Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma.“ *Br J Cancer*, Nr. 99 (2008): 143-150.

**Bhola P**, Banerjee S, Mukherjee J, Balasubramaniam A, Arun V, Karim Z, Burrell K, Croul S, Gutmann DH, Guha A. „Preclinical in vivo evaluation of rapamycin in human malignant peripheral nerve sheath explant xenograft.“ *Int J Cancer*, Nr. 126 (2010): 563-571.



- Blau HM**, Brazelton TR, Weimann JM. „The evolving concept of a stem cell: entity or function?“ *Cell*, Nr. 105 (2001): 829-841.
- Bolin C**, Sutherland C, Tawara K, Moselhy J, Jorcyk CL. „Novel mouse mammary cell lines for in vivo bioluminescence imaging (BLI) of bone metastasis.“ *Biol Proced Online*, Nr. 14 (2012): doi: 10.1186/1480-9222-14-6.
- Bollag G**, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, Lange BJ, Freedman MH, McCormick F, Jacks T, Shannon K. „Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells.“ *Nature Genetics*, Nr. 12 (1996): 144-148.
- Bonnet D**, Dick JE. „Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.“ *Nat Med.*, Nr. 3 (1997): 730-737.
- Borrego-Diaz E**, Terai K, Lialyte K, Wise AL, Esfandyari T, Behbod F, Mautner VF, Spyra M, Taylor S, Parada LF, Upadhyaya M, Farassati F. „Overactivation of Ras signaling pathway in CD133+ MPNST cells.“ *J Neurooncol.*, Nr. 108 (2012): 423-434.
- Borst P**. „Genetic mechanisms of drug resistance. A review.“ *Acta Oncol.*, Nr. 30 (1991): 87-105.
- Borst P**, Kool M, Evers R. „Do cMOAT (MRP2), other MRP homologues, and LRP play a role in MDR?“ *Semin Cancer Biol.*, Nr. 8 (1997): 205-213.
- Bosch I**, Croop J. „P-glycoprotein multidrug resistance and cancer.“ *Biochim Biophys Acta*, Nr. 1288 (1996): F37-54.
- Brabletz T**, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. „Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 98 (2001): 10356-10361.
- Brabletz T**, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. „Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.“ *Nat Rev Cancer*, Nr. 5 (2005): 744-749.
- Brannan CI**, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. „Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues.“ *Genes Dev.*, Nr. 8 (1994): 1019-1029.
- Brekke HR**, Kolberg M, Skotheim RI, Hall KS, Bjerkehagen B, Risberg B, Domanski HA, Mandahl N, Liestøl K, Smeland S, Danielsen HE, Mertens F, Lothe RA. „Identification of p53 as a strong predictor of survival for patients with malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Neuro Oncol.*, Nr. 11 (2009): 514-528.
- Brems H**, Beert E, de Ravel T, Legius E. „Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1.“ *Lancet Oncol.*, Nr. 10 (2009): 508-515.
- Britsch S**, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M. „The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.“ *Genes Dev.*, Nr. 15 (2001): 66-78.

- Brittan M**, Wright NA. „Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development.“ *Gut*, Nr. 53 (2004): 899-910.
- Brossier NM**, Carroll SL. „Genetically engineered mouse models shed new light on the pathogenesis of neurofibromatosis type I-related neoplasms of the peripheral nervous system.“ *Brain Res Bull.*, Nr. 88 (2012): 58-71.
- Burrows RC**, Wancio D, Levitt P, Lillien L. „Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex.“ *Neuron*, Nr. 19 (1997): 251-267.
- Byer SJ**, Eckert JM, Brossier NM, Clodfelder-Miller BJ, Turk AN, Carroll AJ, Kappes JC, Zinn KR, Prasain JK, Carroll SL. „Tamoxifen inhibits malignant peripheral nerve sheath tumor growth in an estrogen receptor-independent manner.“ *Neuro Oncol.*, Nr. 13 (2011): 28-41.
- 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. „A perivascular niche for brain tumor stem cells.“ *Cancer Cell*, Nr. 11 (2007): 69-82.
- Carroll SL**, Ratner N. „How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1?“ *Glia*, Nr. 56 (2008): 1590-1605.
- Caussinus E**, Gonzalez C. „Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*.“ *Nat Genet.*, Nr. 37 (2005): 1125-1129.
- Cavallo RA**, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. „*Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity.“ *Nature*, Nr. 395 (1998): 604-608.
- Chang CC**, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL, Wu CL. „Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells.“ *Cancer Res.*, Nr. 15 (2008): 6281–6291.
- Chang CJ**, Hsu CC, Yung MC, Chen KY, Tzao C, Wu WF, Chou HY, Lee YY, Lu KH, Chiou SH, Ma HI. „Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression.“ *Biochem Biophys Res Commun.*, Nr. 380 (2009): 236-242.
- Charafe-Jauffret E**, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. „Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers.“ *Oncogene*, Nr. 25 (2006): 2273-2284.
- Chaudhary PM**, Roninson IB. „Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists.“ *Oncol Res.*, Nr. 4 (1992): 281-90.
- Chen B**, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Roth MG, Amatruda JF, Chen C, Lum L. „Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer.“ *Nat Chem Biol.*, Nr. 5 (2009): 100-107.

**Chen Z**, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, Zhang L, Han Z. „Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation.“ *Int J Cancer*, Nr. 126 (2010): 841-851.

**Chiasson BJ**, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. „Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics.“ *J Neurosci.*, Nr. 19 (1999): 4462-4471.

**Cho Y**, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. „Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.“ *Science*, Nr. 265 (1994): 346-355.

**Chojamts B**, Jimi S, Kondo T, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto M. „CD133+ cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor).“ *Stem Cells*, Nr. 29 (2011): 1485-1495.

**Cichowski K**, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T. „Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1.“ *Science*, Nr. 286 (1999): 2172-2176.

**Cichowski K**, Santiago S, Jardim M, Johnson BW, Jacks T. „Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor.“ *Genes Dev.*, Nr. 17 (2001): 449-454.

**Clarke MF**. „A self-renewal assay for cancer stem cells.“ *Cancer Chemother Pharmacol.*, Nr. 56 (2005): 64-68.

**Clarke MF**, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. „Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.“ *Cancer Res.*, Nr. 66 (2006a): 9339-9344.

**Clarke MF**, Fuller M. „Stem cells and cancer: two faces of eve.“ *Cell*, Nr. 124 (2006b): 1111-1115.

**Clevers H**. „Stem cells, asymmetric division and cancer.“ *Nat Genet.*, Nr. 37 (2005): 1027-1028.

**Coindre JM**. „Grading of soft tissue sarcomas: review and update.“ *Arch Pathol Lab Med.*, Nr. 130 (2006): 1448-1453.

**Collins CA**, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. „Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche.“ *Cell*, Nr. 122 (2005): 289-301.

**Colman SD**, Williams CA, Wallace MR. „Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene.“ *Nat Genet.*, Nr. 11 (1995): 90-92.

**Cozzio A**, Passegué E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. „Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors.“ *Genes Dev.*, Nr. 17 (2003): 3029-3035.

**Cunningham BA**, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. „Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing.“ *Science*, Nr. 236 (1987): 799-806.

- Däschner K**, Assum G, Eisenbarth I, Krone W, Hoffmeyer S, Wortmann S, Heymer B, Kehrer-Sawatzki H. „Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene.“ *Biochem Biophys Res Commun.*, Nr. 234 (1997): 346-350.
- Dahlberg WK**, Little JB, Fletcher JA, Suit HD, Okunieff P. „Radiosensitivity in vitro of human soft tissue sarcoma cell lines and skin fibroblasts derived from the same patients.“ *Int J Radiat Biol.*, Nr. 63 (1993): 191-198.
- Dahlstrand J**, Collins VP, Lendahl U. „Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors.“ *Cancer Res.*, Nr. 52 (1992): 5334-5341.
- Dalerba P**, Cho RW, Clarke MF. „Cancer stem cells: models and concepts.“ *Annu Rev Med.*, Nr. 58 (2007): 267-284.
- Dalerba P**, Ricci A, Russo V, Rigatti D, Nicotra MR, Mottolese M, Bordignon C, Natali PG, Traversari C. „High homogeneity of MAGE, BAGE, GAGE, tyrosinase and Melan-A/MART-1 gene expression in clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma: implications for protocol design of therapeutic antigen-specific vaccination strategies.“ *Int J Cancer*, Nr. 77 (1998): 200-204.
- Dasgupta B**, Li W, Perry A, Gutmann DH. „Glioma formation in neurofibromatosis 1 reflects preferential activation of K-RAS in astrocytes.“ *Cancer Res.*, Nr. 65 (2005a): 236-245.
- Dasgupta B**, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH. „Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors.“ *Cancer Res.*, Nr. 65 (2005b): 2755-2760.
- Daston MM**, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. „The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes.“ *Neuron*, Nr. 8 (1992): 415-428.
- Davidson KC**, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, Biechele TL, Taylor RJ, Moon RT. „Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 109 (2012): 4485-4490.
- Dean M**, Fojo T, Bates S. „Tumour stem cells and drug resistance.“ *Nat Rev Cancer*, Nr. 5 (2005): 275-284.
- DeClue JE**, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR. „Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis.“ *Cell*, Nr. 69 (1992): 265-273.
- Deeley RG**, Cole SP. „Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP).“ *Semin Cancer Biol.*, Nr. 8 (1997): 193-204.
- Demestre M**, Herzberg J, Holtkamp N, Hagel C, Reuss D, Friedrich RE, Kluwe L, Von Deimling A, Mautner VF, Kurtz A. „Imatinib mesylate (Glivec) inhibits Schwann cell viability and reduces the size of human plexiform neurofibroma in a xenograft model.“ *J Neurooncol.*, Nr. 98 (2010): 11-19.

**Dewey MJ**, Martin DW Jr, Martin GR, Mintz B. „Mosaic mice with teratocarcinoma-derived mutant cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 74 (1977): 5564-5568.

**Diehn M**, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. „Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells.“ *Nature*, Nr. 458 (2009): 780-783.

**DiStefano PS**, Chelsea DM, Schick CM, McKelvy JF. „Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo.“ *J Neurosci.*, Nr. 13 (1993): 2405-2414.

**Dive C.** „Avoidance of apoptosis as a mechanism of drug resistance.“ *J Intern Med Suppl.*, Nr. 740 (1997): 139-145.

**Dodge ME**, Lum L. „Drugging the cancer stem cell compartment: lessons learned from the hedgehog and Wnt signal transduction pathways.“ *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, Nr. 51 (2011): 289-310.

**Dolled-Filhart M**, McCabe A, Giltnane J, Cregger M, Camp RL, Rimm DL. „Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome.“ *Cancer Res.*, Nr. 66 (2006): 5487-5494.

**Dombi E**, Solomon J, Gillespie AJ, Fox E, Balis FM, Patronas N, Korf BR, Babovic-Vuksanovic D, Packer RJ, Belasco J, Goldman S, Jakacki R, Kieran M, Steinberg SM, Widemann BC. „NF1 plexiform neurofibroma growth rate by volumetric MRI: relationship to age and body weight.“ *Neurology.*, Nr. 68 (2007): 643-647.

**Donovan S**, See W, Bonifas J, Stokoe D, Shannon KM. „Hyperactivation of protein kinase B and ERK have discrete effects on survival, proliferation, and cytokine expression in Nf1-deficient myeloid cells.“ *Cancer Cell*, Nr. 2 (2002): 507-514.

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

**Ducatman BS**, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. „Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases.“ *Cancer*, Nr. 57 (1986): 2006-2021.

**Duggal N**, Schmidt-Kastner R, Hakim AM. „Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats.“ *Brain Res.*, Nr. 768 (1997): 1-9.

**Eckhardt M**, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A. „Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity.“ *J Neurosci.*, Nr. 20 (2000): 5234-5244.

**Elliott AM**, Al-Hajj MA. „ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome.“ *Mol Cancer Res.*, Nr. 7 (2009): 79-87.

**Ellis P**, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L. „SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult.“ *Dev Neurosci.*, Nr. 26 (2004): 148-165.

**Elsheikh S**, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. „CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome.“ *Breast Cancer Res Treat.*, Nr. 109 (2008): 325-335.

**Emami KH**, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M. „A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected].“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Nr. 101 (2004): 12682-12687.

**Episkopou V**. „SOX2 functions in adult neural stem cells.“ *Trends Neurosci.*, Nr. 28 (2005): 219-221.

**Eramo A**, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. „Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells.“ *Cell Death Differ.*, Nr. 13 (2006): 1238-1241.

**Evans DG**, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A. „Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1.“ *J Med Genet.*, Nr. 39 (2002): 311-314.

**Evans MJ**, Kaufman MH. „Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.“ *Nature*, Nr. 292 (1981): 154-156.

**Fearon ER**, Vogelstein B. „A genetic model for colorectal tumorigenesis.“ *Cell*, Nr. 61 (1990): 759-767.

**Fernandes KJ**, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD. „A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells.“ *Nat Cell Biol.*, Nr. 6 (2004): 1082-1093.

**Ferner RE**, Golding JF, Smith M, Calonje E, Jan W, Sanjayanathan V, O'Doherty M. „[18F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG PET) as a diagnostic tool for neurofibromatosis 1 (NF1) associated malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs): a long-term clinical study.“ *Ann Oncol.*, Nr. 19 (2008): 390-394.

**Fields AP**, Frederick LA, Regala RP. „Targeting the oncogenic protein kinase Ciota signalling pathway for the treatment of cancer.“ *Biochem Soc Trans.*, Nr. 35 (2007): 996-1000.

**Fields AP**, Murray NR. „Protein kinase C isozymes as therapeutic targets for treatment of human cancers.“ *Adv Enzyme Regul.*, Nr. 48 (2008): 166-178.

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

**Flørenes VA**, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O. „Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas.“ *Cancer Res.*, Nr. 54 (1994): 354-356.

- Fletcher JA**, Kozakewich HP, Hoffer FA, Lage JM, Weidner N, Tepper R, Pinkus GS, Morton CC, Corson JM. „Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors.“ *N Engl J Med.*, Nr. 324 (1991): 436-442.
- Frahm S**, Kurtz A, Kluwe L, Farassati F, Friedrich RE, Mautner VF. „Sulindac derivatives inhibit cell growth and induce apoptosis in primary cells from malignant peripheral nerve sheath tumors of NF1-patients.“ *Cancer Cell Int.*, Nr. 4 (2004a): 4.
- Frahm S**, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knöfel WT, Peiper M, Kluwe L. „Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients.“ *Neurobiol Dis.*, Nr. 16 (2004b): 85-91.
- Frank NY**, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH. „ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma.“ *Cancer Res.*, Nr. 65 (2005): 4320-4333.
- Frank NY**, Schatton T, Frank MH. „The therapeutic promise of the cancer stem cell concept.“ *J Clin Invest.*, Nr. 120 (2010): 41-50.
- Friedrich C**, Holtkamp N, Cinatl J Jr, Sakuma S, Mautner VF, Wellman S, Michaelis M, Henze G, Kurtz A, Driever PH. „Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency.“ *Int J Oncol.*, Nr. 27 (2005): 1433-1440.
- Friedrich RE**, Hartmann M, Mautner VF. „Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in NF1-affected children.“ *Anticancer Res.*, Nr. 27 (2007): 1957-1960.
- Friedrich RE**, Kluwe L, Fünsterer C, Mautner VF. Source. „Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnostic findings on magnetic resonance images and mutation analysis of the NF1 gene.“ *Anticancer Res.*, Nr. 25 (2005): 1699-1702.
- Fuchs E**, Tumbar T, Guasch G. „Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.“ *Cell*, Nr. 116 (2004): 769-778.
- Fuchs E**, Weber K. „Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.“ *Annu Rev Biochem.*, Nr. 63 (1994): 345-382.
- Götz C**, Montenarh M. „p53: DNA damage, DNA repair, and apoptosis.“ *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, Nr. 127 (1996): 65-95.
- Günther HS**, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. „Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria.“ *Oncogene*, Nr. 27 (2008): 2897-2909.
- Gachiani J**, Kim D, Nelson A, Kline D. „Surgical management of malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Neurosurg Focus*, Nr. 22 (2007): E13.
- Galli R**, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. „Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.“ *Cancer Res.*, Nr. 64 (2004): 7011-7021.

- Garcia-Linares C**, Fernández-Rodríguez J, Terribas E, Mercadé J, Pros E, Benito L, Benavente Y, Capellà G, Ravella A, Blanco I, Kehrer-Sawatzki H, Lázaro C, Serra E. „Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH.“ *Hum Mutat.*, Nr. 32 (2011): 78-90.
- Gargett CE**. „Stem cells in gynaecology.“ *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, Nr. 44 (2004): 380-386.
- Gelebart P**, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, Lai R. „Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma.“ *Blood*, Nr. 112 (2008): 5171-5179.
- Geller D**, Gebhardt M. *Liddy Shriver Sarcoma Initiative*. Juni 2006. [http://sarcomahelp.org/mpnst.html#tpm2\\_1](http://sarcomahelp.org/mpnst.html#tpm2_1) (Zugriff am 07.04.2013. April 2013).
- Ghadimi MP**, Young ED, Belousov R, Zhang Y, Lopez G, Lusby K, Kivlin C, Demicco EG, Creighton CJ, Lazar AJ, Pollock RE, Lev D. Source. „Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 18 (2012): 2545-2557.
- Gilbert CA**, Ross AH. „Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies.“ *J Cell Biochem.*, Nr. 108 (2009): 1031-1038.
- Ginestier C**, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, Finetti P, Guille A, Larderet G, Viens P, Sebti S, Bertucci F, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E. „Mevalonate metabolism regulates Basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target.“ *Stem Cells*, Nr. 30 (2012): 1327-1337.
- Glinsky GV**, Berezovska O, Glinskii AB. „Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer.“ *J Clin Invest.*, Nr. 115 (2005): 1503-1521.
- Glover TW**, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S. „Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 3 (1991): 62-70.
- Goodell MA**, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. „Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.“ *J Exp Med.*, Nr. 183 (1996): 1797-1806.
- Gottesman MM**, Fojo T, Bates SE. „Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.“ *Nat Rev Cancer*, Nr. 2 (2002): 48-58.
- Graham V**, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. „SOX2 functions to maintain neural progenitor identity.“ *Neuron*, Nr. 39 (2003): 749-765.
- Gregorian C**, Nakashima J, Dry SM, Nghiemphu PL, Smith KB, Ao Y, Dang J, Lawson G, Mellinghoff IK, Mischel PS, Phelps M, Parada LF, Liu X, Sofroniew MV, Eilber FC, Wu H. „PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 106 (2009): 19479-19484.
- Groszer M**, Erickson R, Scripture-Adams DD, Dougherty JD, Le Belle J, Zack JA, Geschwind DH, Liu X, Kornblum HI, Wu H. „PTEN negatively regulates neural stem cell



self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 103 (2006): 111-116.

**Groszer M**, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H. „Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo.“ *Science*, Nr. 294 (2001): 2186-2189.

**Guo W**, Lasky JL 3rd, Wu H. „Cancer stem cells.“ *Pediatr Res.*, Nr. 59 (2006): 59R-64R.

**Gupta P**, Kuperwasser C. „Disease models of cancer: breast cancer.“ *Drug Discovery Today*, Nr. 1 (2004): 9-16.

**Gutmann DH**, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D. „The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2.“ *JAMA*, Nr. 278 (1997): 51-57.

**Gutmann DH**, Wu YL, Hedrick NM, Zhu Y, Guha A, Parada LF. „Heterozygosity for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in abnormalities in cell attachment, spreading and motility in astrocytes.“ *Hum Mol Genet.*, Nr. 10 (2001): 3009-3016.

**Guzman ML**, Rossi RM, Neelakantan S, Li X, Corbett CA, Hassane DC, Becker MW, Bennett JM, Sullivan E, Lachowicz JL, Vaughan A, Sweeney CJ, Matthews W, Carroll M, Liesveld JL, Crooks PA, Jordan CT. „An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.“ *Blood*, Nr. 110 (2007): 4427-4435.

**Hadnagy A**, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. „SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations.“ *Exp Cell Res.*, Nr. 312 (2006): 3701-3710.

**Hagel C**, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A, Mautner VF. „Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *J Neurooncol.*, Nr. 82 (2007): 187-92.

**Hakozaki M**, Hojo H, Sato M, Tajino T, Yamada H, Kikuchi S, Abe M. „Establishment and characterization of a novel human malignant peripheral nerve sheath tumor cell line, FMS-1, that overexpresses epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2.“ *Virchows Arch.*, Nr. 455 (2009): 517-526.

**Hall CL**, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. „Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts.“ *Cancer Res.*, Nr. 65 (2005): 7554-7560.

**Hallett RM**, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AM, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, Hassell JA. „Small molecule antagonists of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer.“ *PLoS One*, Nr. 7 (2012): e33976.

**Hao S**, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, Hou FF, Kahn M, Liu Y. „Targeted inhibition of  $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis.“ *J Am Soc Nephrol.*, Nr. 22 (2011): 1642-1653.

**Hegi ME**, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG,

Janzer RC, Stupp R. „MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.“ *N Engl J Med.*, Nr. 352 (2005): 997-1003.

**Hemmati HD**, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. „Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 100 (2003): 15178-83.

**Henderson WR Jr**, Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien YT, Zhou B, Borok Z, Knight DA, Kahn M. „Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 107 (2010): 14309-14314.

**Hochedlinger K**, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. „Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues.“ *Cell*, Nr. 121 (2005): 465-477.

**Hockfield S**, McKay RD. „Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system.“ *J Neurosci.*, Nr. 5 (1985): 3310-3328.

**Holcombe RF**, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T. „Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma.“ *Mol Pathol.*, Nr. 55 (2002): 220-226.

**Holliday DL**, Speirs V. „Choosing the right cell line for breast cancer research.“ *Breast Cancer Res.*, Nr. 13 (2011): 215.

**Holtkamp N**, Mautner VF, Friedrich RE, Harder A, Hartmann C, Theallier-Janko A, Hoffmann KT, von Deimling A. „Differentially expressed genes in neurofibromatosis 1-associated neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Acta Neuropathol.*, Nr. 107 (2004a): 159-168.

**Holtkamp N**, Okuducu AF, Mucha J, Afanasieva A, Hartmann C, Atallah I, Estevez-Schwarz L, Mawrin C, Friedrich RE, Mautner VF, von Deimling A. „Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumors, and its implications for imatinib sensitivity.“ *Carcinogenesis*, Nr. 27 (2006): 664-671.

**Holtkamp N**, Reuss DE, Atallah I, Kuban RJ, Hartmann C, Mautner VF, Frahm S, Friedrich RE, Algermissen B, Pham VA, Prietz S, Rosenbaum T, Estevez-Schwarz L, von Deimling A. „Subclassification of nerve sheath tumors by gene expression profiling.“ *Brain Pathol.*, Nr. 14 (2004b): 258-264.

**Holyoake TL**, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. „Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia.“ *Leukemia*, Nr. 16 (2002): 549-558.

**Horn PA**, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. „Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells.“ *Blood*, Nr. 93 (1999): 1435-1437.

**Horstadius S.** *The Neural Crest*. Oxford: Oxford Univ. Press, 1950.

**Hu T**, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. „Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis.“ *Cancer Res.*, Nr. 68 (2008): 6533-40.

**Huang SM**, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. „Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling.“ *Nature*, Nr. 461 (2009): 614-620.

**Huang Y**, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadée W. „Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance.“ *Cancer Res.*, Nr. 64 (2004): 4294-4301.

**Huelsken J**, Behrens J. „The Wnt signalling pathway.“ *J Cell Sci.*, Nr. 115 (2002): 3977-3978.

**Huijbregts RP**, Roth KA, Schmidt RE, Carroll SL. „Hypertrophic neuropathies and malignant peripheral nerve sheath tumors in transgenic mice overexpressing glial growth factor beta3 in myelinating Schwann cells.“ *J Neurosci.*, Nr. 23 (2003): 7269-7280.

**Huntly BJ**, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, Rowan R, Amaral S, Curley D, Williams IR, Akashi K, Gilliland DG. „MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors.“ *Cancer Cell*, Nr. 6 (2004): 587-596.

**Huson SM**. „Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis.“ *Archives of Disease in Childhood*, Nr. 64 (1989): 745-749.

**Huson SM**, Hughes RAC. „The Neurofibromatoses: a pathogenic and clinical overview.“ *Chapman and Hall*, 1994: 160-203.

**Imaizumi S**, Motoyama T, Ogose A, Hotta T, Takahashi HE. „Characterization and chemosensitivity of two human malignant peripheral nerve sheath tumour cell lines derived from a patient with neurofibromatosis type 1.“ *Virchows Arch.*, Nr. 433 (1998): 435-441.

**Ingram DA**, Hiatt K, King AJ, Fisher L, Shivakumar R, Derstine C, Wenning MJ, Diaz B, Travers JB, Hood A, Marshall M, Williams DA, Clapp DW. „Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro.“ *J Exp Med.*, Nr. 194 (2001): 57-69.

**Ishiwata T**, Matsuda Y, Naito Z. „Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis.“ *World J Gastroenterol.*, Nr. 17 (2011): 409-418.

**Jacks T**, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. „Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1.“ *Nat Genet.*, Nr. 7 (1994): 353-361.

**Jaggupilli A**, Elkord E. „Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity.“ *Clin Dev Immunol.*, Nr. 2012 (2012): ID 708036.

**James RG**, Conrad WH, Moon RT. „Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors.“ *Methods Mol Biol.*, Nr. 468 (2008): 131-144.

**Jamieson CH**, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. „Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML.“ *N Engl J Med.*, Nr. 351 (2004): 657-667.

**Jamieson L**, Carpenter L, Biden TJ, Fields AP. „Protein kinase C $\alpha$  activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis.“ *J Biol Chem.*, Nr. 274 (1999): 3927-3930.

**Jenkins DE**, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, Contag PR. „Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis.“ *Clin Exp Metastasis.*, Nr. 20 (2003): 733-744.

**Jensen M**, Berthold F. „Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer.“ *Cancer Lett.*, Nr. 258 (2007): 9-21.

**Jessen KR**, Mirsky R. „The origin and development of glial cells in peripheral nerves.“ *Nat Rev Neurosci.*, Nr. 6 (2005): 671-682.

**Jiao X**, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N, Lisanti MP, Pestell RG. „c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion.“ *J Biol Chem.*, Nr. 285 (2010): 8218-8226.

**Jin L**, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gearing DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB. „Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells.“ *Cell Stem Cell*, Nr. 5 (2009a): 31-42.

**Jin X**, Jeon HY, Joo KM, Kim JK, Jin J, Kim SH, Kang BG, Beck S, Lee SJ, Kim JK, Park AK, Park WY, Choi YJ, Nam DH, Kim H. „Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation.“ *Cancer Res.*, Nr. 71 (2011): 3066-3075.

**Jin Y**, Bin ZQ, Qiang H, Liang C, Hua C, Jun D, Dong WA, Qing L. „ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma.“ *J Cancer Res Clin Oncol.*, Nr. 135 (2009b): 1369-1376.

**Johansson G**, Mahller YY, Collins MH, Kim MO, Nobukuni T, Perentesis J, Cripe TP, Lane HA, Kozma SC, Thomas G, Ratner N. „Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Mol Cancer Ther.*, Nr. 7 (2008): 1237-1245.

**Jordan CT**, Guzman ML, Noble M. „Cancer stem cells.“ *N Engl J Med.*, Nr. 355 (2006): 1253-1261.

**Jorgensen OS**, Bock E. „Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis.“ *J Neurochem.*, Nr. 23 (1974): 879-880.

**Joseph NM**, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, Conway SJ, Parada LF, Zhu Y, Morrison SJ. „The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells.“ *Cancer Cell*, Nr. 13 (2008): 129-40.

**Justilien V**, Fields AP. „Atypical PKCs as Targets for Cancer Therapy.“ In *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy*, von Marcelo G. Kazanietz, 543-549. Humana Press (2010).

- Justilien V**, Fields AP. „Atypical Protein Kinase C Signaling in Cancer.“ In *Am Assoc Cancer Res Educ Book 2012*, 17-22 (2012).
- Kühnl A**, Gökbuget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T, Mochmann LH, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. „Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, Nr. 118 (2011): 6362-6367.
- Kaina B**, Christmann M, Naumann S, Roos WP. „MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents.“ *DNA Repair (Amst)*., Nr. 6 (2007): 1079-1099.
- Kania G**, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, Boheler KR, Wobus AM. „Somatic Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 Is Expressed in Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors.“ *Stem Cells*, Nr. 23 (2005): 791-804.
- Karayiannakis AJ**, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Davaris PS, Pignatelli M. „Expression patterns of beta-catenin in in situ and invasive breast cancer.“ *Eur J Surg Oncol.*, Nr. 27 (2001): 31-36.
- Karube K**, Nabeshima K, Ishiguro M, Harada M, Iwasaki H. „cDNA microarray analysis of cancer associated gene expression profiles in malignant peripheral nerve sheath tumours.“ *J Clin Pathol.*, Nr. 59 (2006): 160-165.
- Kehrer-Sawatzki H**, Mautner VF. „Klinik und Genetik der Neurofibromatose Typ 1.“ *Medizinische Genetik*, Nr. 4 (2009).
- Khan ZA**, Jonas SK, Le-Marer N, Patel H, Wharton RQ, Tarragona A, Ivison A, Allen-Mersh TG. „P53 mutations in primary and metastatic tumors and circulating tumor cells from colorectal carcinoma patients.“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 6 (2000): 3499-3504.
- Khanna C**, Hunter K. „Modeling metastasis in vivo.“ *Carcinogenesis*, Nr. 26 (2005): 513-523.
- Kikuchi K**, Soundararajan A, Zarzabal LA, Weems CR, Nelon LD, Hampton ST, Michalek JE, Rubin BP, Fields AP, Keller C. „Protein kinase C iota as a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma.“ *Oncogene*, Nr. 32 (2012): 286-295
- Kim HA**, Rosenbaum T, Marchionni MA, Ratner N, DeClue JE. „Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes.“ *Oncogene*, Nr. 11 (1995): 325-335.
- Kim RJ**, Nam JS. „OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer.“ *Lab Anim Res.*, Nr. 2 (2011): 147-52.
- King D**, Yang G, Thompson MA, Hiebert SW. „Loss of neurofibromatosis-1 and p19(ARF) cooperate to induce a multiple tumor phenotype.“ *Oncogene*, Nr. 21 (2002): 4978-4982.
- Kisselbach L**, Merges M, Bossie A, Boyd A. „CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures.“ *Cytotechnology*, Nr. 59 (2009): 31-44.

- Kleeberger W**, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM. „Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis.“ *Cancer Res.*, Nr. 67 (2007): 9199-9206.
- Klein WM**, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. „Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma.“ *Mod Pathol.*, Nr. 20 (2007): 102-107.
- Klemm F**, Bleckmann A, Siam L, Chuang HN, Rietkötter E, Behme D, Schulz M, Schaffrinski M, Schindler S, Trümper L, Kramer F, Beissbarth T, Stadelmann C, Binder C, Pukrop T. „ $\beta$ -catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis.“ *Carcinogenesis*, Nr. 32 (2011): 434-442.
- Kluwe L**, Friedrich RE, Mautner VF. „Allelic loss of the NF1 gene in NF1-associated plexiform neurofibromas.“ *Cancer Genet Cytogenet.*, Nr. 113 (1999a): 65-69.
- Kluwe L**, Friedrich R, Mautner VF. „Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 24 (1999b): 283-285.
- Kluwe, L.** „Application of Microsatellite Marker Analysis.“ In *Genetic Screening: New Research*, von Sandra R. Pupecki. Nova Science Publishers (2006).
- Knudson**, AG Jr. „Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 68 (1971): 820-823.
- Komuro H**, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, Hayashi Y. „Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines.“ *J Pediatr Surg.*, Nr. 42 (2007): 2040-2045.
- Kreth S**, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretzschmar HA, Hinske LC, Kreth FW. „O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation.“ *PLoS One*, Nr. 6 (2011): e17156.
- Krivtsov AV**, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. „Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9.“ *Nature*, Nr. 442 (2006): 818-822.
- Kuperwasser C**, Dessain S, Bierbaum BE, Garnet D, Sperandio K, Gauvin GP, Naber SP, Weinberg RA, Rosenblatt M. „A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone.“ *Cancer Res.*, Nr. 65 (2005): 6130-6138.
- Lacroix M**, Leclercq G. „Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.“ *Breast Cancer Res Treat*, Nr. 83 (2004): 249-289.
- Lapidot T**, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. „A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.“ *Nature*, Nr. 367 (1994): 645-648.
- Lau N**, Feldkamp MM, Roncari L, Loehr AH, Shannon P, Gutmann DH, Guha A. „Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma.“ *J Neuropathol Exp Neurol.*, Nr. 59 (2000): 759-767.

- Le Douarin NM**, Dupin E. „Multipotentiality of the neural crest.“ *Curr Opin Genet Dev.*, Nr. 13 (2003): 529-536.
- Le LQ**, Parada LF. „Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPS.“ *Oncogene*, Nr. 26 (2007): 4609-4616.
- Lee J**, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. „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*, Nr. 9 (2006): 391-403.
- Lee SJ**, Park HJ, Kim YH, Kim BY, Jin HS, Kim HJ, Han JH, Yim H, Jeong SY. „Inhibition of Bcl-xL by ABT-737 enhances chemotherapy sensitivity in neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumor cells.“ *Int J Mol Med.*, Nr. 30 (2012): 443-450.
- Legius E**, Dierick H, Wu R, Hall BK, Marynen P, Cassiman JJ, Glover TW. „TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 10 (1994): 250-255.
- Legius E**, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW. „Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis.“ *Nat Genet.*, Nr. 3 (1993): 122-126.
- Leis O**, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. „Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells.“ *Oncogene*, Nr. 31 (2012): 1354-1365.
- Lendahl U**, Zimmerman LB, McKay RD. „CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.“ *Cell*, Nr. 60 (1990): 585-595.
- Lessard J**, Sauvageau G. „Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells.“ *Nature*, Nr. 423 (2003): 255-260.
- Lévy P**, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, Parfait B, Wolkenstein P, Vidaud M, Bièche I. „Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR.“ *Mol Cancer*, Nr. 3 (2004): 20.
- Li L**, Neaves WB. „Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters.“ *Cancer Res.*, Nr. 66 (2006): 4553-4557.
- Li X**, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. „Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.“ *J Natl Cancer Inst.*, Nr. 100 (2008): 672-679.
- Li Y**, Rao PK, Wen R, Song Y, Muir D, Wallace P, van Horne SJ, Tennekoon GI, Kadesch T. „Notch and Schwann cell transformation.“ *Oncogene*, Nr. 23 (2004): 1146-1152.
- Li Z**, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. „Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells.“ *Cancer Cell*, Nr. 15 (2009): 501-513.

- Lillien L**, Wancio D. „Changes in Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Competence to Generate Glia Regulate Timing and Choice of Differentiation in the Retina.“ *Mol Cell Neurosci.*, Nr. 10 (1998): 296-308.
- Lin SY**, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. Source. „Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 97 (2000): 4262-4266.
- Liu G**, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. „Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma.“ *Mol Cancer*, Nr. 5 (2006): 67.
- Liu H**, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang YF, Bachmann MH, Shimono Y, Dalerba P, Adorno M, Lobo N, Bueno J, Dirbas FM, Goswami S, Somlo G, Condeelis J, Contag CH, Gambhir SS, Clarke MF. „Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 107 (2010): 18115-18120.
- Liu W**, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. „Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling.“ *Nat Genet.*, Nr. 26 (2000): 146-147.
- Livak KJ**, Schmittgen TD. „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method.“ *Methods*, Nr. 25 (2001): 402-408.
- Lo FY**, Chen HT, Cheng HC, Hsu HS, Wang YC. „Overexpression of PAFAH1B1 is associated with tumor metastasis and poor survival in non-small cell lung cancer.“ *Lung Cancer*, Nr. 77 (2012): 585-592.
- Lobo MV**, Alonso FJ, Redondo C, López-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paíno CL, Reimers D, Bazán E. Source. „Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres.“ *J Histochem Cytochem.*, Nr. 51 (2003): 89-103.
- Loe DW**, Deeley RG, Cole SP. „Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP.“ *Eur J Cancer*, Nr. 32A (1996): 945-957.
- Losi L**, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. „Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression.“ *Carcinogenesis*, Nr. 26 (2005): 916-922.
- Losi L**, Benhattar J, Costa J. „Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer.“ *Eur J Cancer*, Nr. 28A (1992): 1115-1120.
- Lothe RA**, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen-Dale AL, Kallioniemi OP. „Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis.“ *Cancer Res.*, Nr. 56 (1996): 4778-4781.
- MacDonald BT**, Tamai K, He X. „Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.“ *Dev Cell*, Nr. 17 (2009): 9-26.
- Mahller YY**, Vaikunth SS, Currier MA, Miller SJ, Ripberger MC, Hsu YH, Mehrian-Shai R, Collins MH, Crombleholme TM, Ratner N, Cripe TP. „Oncolytic HSV and erlotinib inhibit



tumor growth and angiogenesis in a novel malignant peripheral nerve sheath tumor xenograft model.“ *Mol Ther.*, Nr. 15 (2007): 279-286.

**Maliepaard M**, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. „Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues.“ *Cancer Res.*, Nr. 61 (2001): 3458-3464.

**Martin GA**, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, Innis MA, McCormick F. „The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21.“ *Cell*, Nr. 63 (1990): 843-849.

**Martin GR**. „Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia.“ *Cell*, Nr. 5 (1975): 229-243.

**Mautner VF**, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, Widemann BC, Friedman JM. „Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1.“ *Neuro Oncol.*, Nr. 10 (2008): 593-598.

**Mautner VF**, Brenner W, Fünsterer C, Hagel C, Gawad K, Friedrich RE. „Clinical relevance of positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the progression of internal plexiform neurofibroma in NF1.“ *Anticancer Res.*, Nr. 27 (2007): 1819-1822.

**Mautner VF**, Friedrich RE, von Deimling A, Hagel C, Korf B, Knöfel MT, Wenzel R, Fünsterer C. „Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis type 1: MRI supports the diagnosis of malignant plexiform neurofibroma.“ *Neuroradiology*, Nr. 45 (2003): 618-625.

**Mautner VF**, Hartmann M, Kluwe L, Friedrich RE, Fünsterer C. „MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1.“ *Neuroradiology*, Nr. 48 (2006): 160-165.

**Mazieres J**, You L, He B, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. „Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis.“ *Oncogene*, Nr. 24 (2005): 5396-5400.

**Mechtersheimer G**, Otaño-Joos M, Ohl S, Benner A, Lehnert T, Willeke F, Möller P, Otto HF, Lichter P, Joos S. „Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 25 (1999): 362-369.

**Meissner K**, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer Zu Schwabedissen H, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Böhm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, Kroemer HK. „The ATP-binding Cassette Transporter ABCG2 (BCRP), a Marker for Side Population Stem Cells, Is Expressed in Human Heart.“ *J Histochem Cytochem.*, Nr. 54 (2006): 215-21.

**Menon AG**, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Putter H, Janssen-van Rhijn CM, Keijzer R, Fleuren GJ, Kuppen PJ. „p53 and HLA class-I expression are not down-regulated in colorectal cancer liver metastases.“ *Clin Exp Metastasis*, Nr. 21 (2004): 79-85.

**Mighell AJ**, Hume WJ, Robinson PA. „An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry.“ *Oral Dis.*, Nr. 4 (1998): 217-223.

**Miller SJ**, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, Jegga AG, Li H, Upadhyaya M, Giovannini M, Muir D, Wallace MR, Lopez E, Serra E, Nielsen GP, Lazaro C, Stemmer-Rachamimov A, Page G, Aronow BJ, Ratner N. „Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene.“ *EMBO Mol Med.*, Nr. 1 (2009): 236-248.

**Miller SJ**, Lavker RM, Sun TT. „Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications.“ *Biochim Biophys Acta*, Nr. 1756 (2005): 25-52.

**Miller SJ**, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, Kaiser S, Aronow BJ, Frahm S, Kluwe L, Mautner V, Upadhyaya M, Muir D, Wallace M, Hagen J, Quelle DE, Watson MA, Perry A, Gutmann DH, Ratner N. „Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues.“ *Cancer Res.*, Nr. 66 (2006): 2584-2591.

**Ming GL**, Song H. „Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.“ *Annu Rev Neurosci.*, Nr. 28 (2005): 223-250.

**Mirsky R**, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. „Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation.“ *J Peripher Nerv Syst.*, Nr. 13 (2008): 122-135.

**Mo W**, Chen J, Patel A, Zhang L, Chau V, Li Y, Cho W, Lim K, Xu J, Lazar AJ, Creighton CJ, Bolshakov S, McKay RM, Lev D, Le LQ, Parada LF. „CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell-cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Cell*, Nr. 152 (2013): 1077-1090.

**Mohan P**, Castellsague J, Jiang J, Allen K, Chen H, Nemirovsky O, Spyra M, Hu K, Kluwe L, Pujana MA, Villanueva A, Mautner VF, Keats JJ, Dunn SE, Lazaro C, Maxwell CA. „Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.“ *Oncotarget*, Nr. 4 (2013): 80-93.

**Molofsky AV**, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R. „Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways.“ *Genes Dev.*, Nr. 19 (2005): 1432-1437.

**Molofsky AV**, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. „Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation.“ *Nature*, Nr. 425 (2003): 962-967.

**Monzani E**, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA. „Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential.“ *Eur J Cancer.*, Nr. 43 (2007): 935-946.

**Moore KA**, Lemischka IR. „Stem cells and their niches.“ *Science*, Nr. 311 (2006): 1880-1885.

**Morrison SJ**, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. „Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors.“ *Development*, Nr. 124 (1997): 1929-1939.

- Morrison SJ**, Weissman IL. „The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.“ *Immunity*, Nr. 1 (1994): 661-673.
- Murray NR**, Fields AP. „Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis.“ *J Biol Chem.*, Nr. 272 (1997): 27521-27524.
- Naber U**, Friedrich RE, Glatzel M, Mautner VF, Hagel C. „Podoplanin and CD34 in peripheral nerve sheath tumours: focus on neurofibromatosis 1-associated atypical neurofibroma.“ *J Neurooncol.*, Nr. 103 (2011): 239-245.
- Nagashima Y**, Ohaki Y, Tanaka Y, Sumino K, Funabiki T, Okuyama T, Watanabe S, Umeda M, Misugi K. „Establishment of an epithelioid malignant schwannoma cell line (YST-1).“ *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, Nr. 59 (1990): 321-327.
- Nakashima N**, Liu D, Huang CL, Ueno M, Zhang X, Yokomise H. „Wnt3 gene expression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer.“ *Lung Cancer*, Nr. 76 (2012): 228-234.
- Nakopoulou L**, Gakiopoulou-Givalou H, Karayiannakis AJ, Giannopoulou I, Keramopoulos A, Davaris P, Pignatelli M. „Abnormal alpha-catenin expression in invasive breast cancer correlates with poor patient survival.“ *Histopathology*, Nr. 40 (2002): 536-546.
- Natarajan TG**, FitzGerald KT. „Markers in normal and cancer stem cells.“ *Cancer Biomark.*, Nr. 3 (2007): 211-231.
- Nedelec J**, Pierres M, Moreau H, Barbet J, Naquet P, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. „Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons.“ *Eur J Biochem.*, Nr. 203 (1992): 433-442.
- Neve RM**, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. „A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.“ *Cancer Cell*, Nr. 10 (2006): 515-527.
- Nguyen R**, Dombi E, Widemann BC, Solomon J, Fuensterer C, Kluwe L, Friedman JM, Mautner VF. „Growth dynamics of plexiform neurofibromas: a retrospective cohort study of 201 patients with neurofibromatosis 1.“ *Orphanet J Rare Dis.*, Nr. 7 (2012): 75.
- Nielsen GP**, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. „Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation.“ *Am J Pathol.*, Nr. 155 (1999): 1879-1884.
- Nielsen JS**, McNagny KM. „Novel functions of the CD34 family.“ *J Cell Sci.*, Nr. 121 (2008): 3683-3692.
- Nigro JM**, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. „Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.“ *Nature*, Nr. 342 (1989): 705-708.
- O'Brien CA**, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. „A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.“ *Nature*, Nr. 445 (2007): 106-110.

**O'Connor PM**, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ Jr, Kohn KW. „Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents.“ *Cancer Res.*, Nr. 57 (1997): 4285-4300.

**Park D**, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT. „Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells.“ *Stem Cells*, Nr. 28 (2010): 2162-2171.

**Park HJ**, Lee SJ, Sohn YB, Jin HS, Han JH, Kim YB, Yim H, Jeong SY. „NF1 deficiency causes Bcl-xL upregulation in Schwann cells derived from neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Int J Oncol.*, Nr. 42 (2013): 657-666.

**Park IK**, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. „Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells.“ *Nature*, Nr. 423 (2003): 302-305.

**Pece S**, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, Bernard L, Viale G, Pelicci PG, Di Fiore PP. „Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content.“ *Cell*, Nr. 140 (2010): 62-73.

**Perrin GQ**, Li H, Fishbein L, Thomson SA, Hwang MS, Scarborough MT, Yachnis AT, Wallace MR, Mareci TH, Muir D. „An orthotopic xenograft model of intraneural NF1 MPNST suggests a potential association between steroid hormones and tumor cell proliferation.“ *Lab Invest.*, Nr. 87 (2007): 1092-1102.

**Phillips BT**, Kimble J. „A new look at TCF and beta-catenin through the lens of a divergent *C. elegans* Wnt pathway.“ *Dev Cell*, Nr. 17 (2009): 27-34.

**Phillips TM**, McBride WH, Pajonk F. „The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation.“ *J Natl Cancer Inst.*, Nr. 98 (2006): 1777-1785.

**Piccirillo SG**, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. „Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells.“ *Nature*, Nr. 444 (2006): 761-765.

**Pierce GB**. „The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture.“ *Am J Pathol.*, Nr. 113 (1983): 117-124.

**Pillai P**, Desai S, Patel R, Sajan M, Farese R, Ostrov D, Acevedo-Duncan M. „A novel PKC- $\iota$  inhibitor abrogates cell proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma.“ *Int J Biochem Cell Biol.*, Nr. 43 (2011): 784-794.

**Polakis P**. „Wnt signaling and cancer.“ *Genes Dev.*, Nr. 14 (2000): 1837-1851.

**Posterpräsentation:** Panse J, Mautner VF, Reichardt P, Brümmendorf T, de Wit M. „An open-label multicenter phase II study of Imatinib mesylate (Glivec<sup>®</sup>) treatment of patients with malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology Supplement 1; Berliner Krebskongress 2012*. Springer (2012) 107.

**Potten CS**. „Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death.“ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, Nr. 353 (1998): 821-830.

- Qiang L**, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, Qi Q, Lu N, Tao L, Wang XT, You QD, Guo QL. „Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines.“ *Cancer Lett.*, Nr. 279 (2009): 13-21.
- Rae JM**, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD. „MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research.“ *Breast Cancer Res Treat.*, Nr. 104 (2007): 13-9.
- Rajeshkumar NV**, Rasheed ZA, García-García E, López-Ríos F, Fujiwara K, Matsui WH, Hidalgo M. „A combination of DR5 agonistic monoclonal antibody with gemcitabine targets pancreatic cancer stem cells and results in long-term disease control in human pancreatic cancer model.“ *Mol Cancer Ther.*, Nr. 9 (2010): 2582-2592.
- Ramos-Vara JA**. „Technical aspects of immunohistochemistry.“ *Vet Pathol.*, Nr. 42 (2005): 405-426.
- Rappa G**, Fodstad O, Lorico A. „The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma.“ *Stem Cells*, Nr. 26 (2008): 3008-3017.
- Rasmussen SA**, Friedman JM. „NF1 gene and neurofibromatosis 1.“ *Am J Epidemiol.*, Nr. 151 (2000): 33-40.
- Rasmussen SA**, Yang Q, Friedman JM. „Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates.“ *Am J Hum Genet.*, Nr. 68 (2001): 1110-1118.
- Regala RP**, Davis RK, Kunz A, Khor A, Leitges M, Fields AP. „Atypical protein kinase C $\{\iota\}$  is required for bronchioalveolar stem cell expansion and lung tumorigenesis.“ *Cancer Res.*, Nr. 69 (2009): 7603-7611.
- Regala RP**, Thompson EA, Fields AP. „Atypical protein kinase C  $\iota$  expression and aurothiomalate sensitivity in human lung cancer cells.“ *Cancer Res.*, Nr. 68 (2008): 5888-5895.
- Reya T**, Clevers H. „Wnt signalling in stem cells and cancer.“ *Nature*, Nr. 434 (2005): 843-850.
- Reya T**, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. „A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells.“ *Nature*, Nr. 423 (2003): 409-414.
- Reynolds JE**, Fletcher JA, Lytle CH, Nie L, Morton CC, Diehl SR. „Molecular characterization of a 17q11.2 translocation in a malignant schwannoma cell line.“ *Hum Genet.*, Nr. 90 (1992): 450-456.
- Reynolds BA**, Tetzlaff W, Weiss S. „A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes.“ *J Neurosci.*, Nr. 12 (1992a): 4565-4574.
- Reynolds BA**, Weiss S. „Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.“ *Science*, Nr. 255 (1992b): 1707-1710.
- Riccardi VM**. *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis*. 2. Edition. Baltimore, MA: Johns Hopkins University Press (1992).

- Rizo A**, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. „Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche?“ *Hum Mol Genet.*, Nr. 15 (2006): R210-219.
- Robey RW**, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. „ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance.“ *Cancer Metastasis Rev.*, Nr. 26 (2007): 39-57.
- Román-Gómez J**, Cordeu L, Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Eneriz E, Garate L, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Prosper F. „Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, Nr. 109 (2007): 3462-3469.
- Rosner MH**, Viganò MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. „A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo.“ *Nature*, Nr. 345 (1990): 686-692.
- Ross DT**, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. „Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines.“ *Nat Genet.*, Nr. 24 (2000): 227-235.
- Rougon G**, Alterman LA, Dennis K, Guo XJ, Kinnon C. „The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hemolymphoid and neural cell lineages.“ *Eur J Immunol.*, Nr. 21 (1991): 1397-1402.
- Rubin JB**, Gutmann DH. „Neurofibromatosis type 1- a model for nervous system tumour formation?“ *Nature Reviews, Cancer*, Nr. 5 (2005): 557-567.
- Rutishauser U**, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM. „Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 73 (1976): 577-581.
- Ryo A**, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. „Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC.“ *Nat Cell Biol.*, Nr. 3 (2001): 793-801.
- Safina A**, Ren MQ, Vandette E, Bakin AV. „TAK1 is required for TGF-beta 1-mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and metastasis.“ *Oncogene.*, Nr. 27 (2008): 1198-1207.
- Sancho E**, Batlle E, Clevers H. „Live and let die in the intestinal epithelium.“ *Curr Opin Cell Biol.*, Nr. 15 (2003): 763-770.
- Sane KM**, Mynderse M, Lalonde DT, Dean IS, Wojtkowiak JW, Fouad F, Borch RF, Reiners JJ Jr, Gibbs RA, Mattingly RR. „A novel geranylgeranyl transferase inhibitor in combination with lovastatin inhibits proliferation and induces autophagy in STS-26T MPNST cells.“ *J Pharmacol Exp Ther.*, Nr. 333 (2010): 23-33.
- Satterthwaite AB**, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. „Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen.“ *Genomics*, Nr. 12 (1992): 788-794.
- Sawada S**, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D. „Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma.“ *Nat Genet.*, Nr. 14 (1996): 110-112.

- Scadden DT.** „The stem-cell niche as an entity of action.“ *Nature*, Nr. 441 (2006): 1075-1079.
- Scarpini E**, Meola G, Baron P, Beretta S, Velicogna M, Scarlato G. „S-100 protein and laminin: immunocytochemical markers for human Schwann cells in vitro.“ *Exp Neurol.*, Nr. 93 (1986): 77-83.
- Schatton T**, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. „Identification of cells initiating human melanomas.“ *Nature*, Nr. 451 (2008): 345-349.
- Scheithauer BW**, Woodruff JM, Erlandson RA. *Primary malignant tumors of the peripheral nerve*. Bd. 3, in *Tumors of the Peripheral Nervous System-Atlas of Tumor Pathology*, 336-340 (2000).
- Schmid RS**, Graff RD, Schaller MD, Chen S, Schachner M, Hemperly JJ, Maness PF. „NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells.“ *J Neurobio.*, Nr. 38 (1999): 542-558.
- Schmidt H**, Taubert H, Meye A, Würfl P, Bache M, Bartel F, Holzhausen HJ, Hinze R. „Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease.“ *Cancer Lett.*, Nr. 155 (2000): 181-190.
- Schreiner S**, Cossais F, Fischer K, Scholz S, Bösl MR, Holtmann B, Sendtner M, Wegner M. „Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages.“ *Development.*, Nr. 134 (2007): 3271-3281.
- Scott CE**, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gaviro MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R, Briscoe J. „SOX9 induces and maintains neural stem cells.“ *Nat Neurosci.*, Nr. 13 (2010): 1181-1189.
- Seaberg RM**, van der Kooy D. „Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions.“ *Trends Neurosci.*, Nr. 26 (2003): 125-131.
- Serra E**, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lázaro C. „Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas.“ *Am J Hum Genet.*, Nr. 61 (1997): 512-519.
- Shakhova O**, Sommer L. „Neural crest-derived stem cells.“ *StemBook, Harvard Stem Cell Institute* (2010).
- Sheridan C**, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr, Badve S, Nakshatri H. „CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis.“ *Breast Cancer Res.*, Nr. 8 (2006): R59.
- Sherman L**, Skroch-Angel P, Moll J, Schwechheimer K, Ponta H, Herrlich P, Hofmann M. „Schwann cell tumors express characteristic patterns of CD44 splice variants.“ *J Neurooncol.*, Nr. 26 (1995): 171-184.
- Sherr C.** „Principles of tumor suppression.“ *Cell*, Nr. 116 (2004): 235-246.

- Shirasawa T**, Akashi T, Sakamoto K, Takahashi H, Maruyama N, Hirokawa K. „Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues.“ *Dev Dyn.*, Nr. 198 (1993): 1-13.
- Shmelkov SV**, St Clair R, Lyden D, Rafii S. „AC133/CD133/Prominin-1.“ *Int J Biochem Cell Biol.*, Nr. 37 (2005): 715-719.
- Sieber-Blum M**, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME. „Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord.“ *Mol Cell Neurosci.*, Nr. 32 (2006): 67-81.
- Singec I**, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, Frotscher M, Snyder EY. „Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology.“ *Nat Methods*, Nr. 3 (2006): 801-806.
- Singh SK**, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. „Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.“ *Cancer Res.*, Nr. 63 (2003): 5821-5828.
- Singh SK**, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. „Identification of human brain tumour initiating cells.“ *Nature*, Nr. 432 (2004): 396-401.
- Skuse GR**, Kosciolk BA, Rowley PT. „Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 1 (1989): 36-41.
- Slomiany MG**, Dai L, Bomar PA, Knackstedt TJ, Kranc DA, Tolliver L, Maria BL, Toole BP. „Abrogating drug resistance in malignant peripheral nerve sheath tumors by disrupting hyaluronan-CD44 interactions with small hyaluronan oligosaccharides.“ *Cancer Res.*, Nr. 69 (2009): 4992-4998.
- Sommer L**. „Context-dependent regulation of fate decisions in multipotent progenitor cells of the peripheral nervous system.“ *Cell Tissue Res.*, Nr. 305 (2001): 211-216.
- Song S**, Christova T, Perusini S, Alizadeh S, Bao RY, Miller BW, Hurren R, Jitkova Y, Gronda M, Isaac M, Joseph B, Subramaniam R, Aman A, Chau A, Hogge DE, Weir SJ, Kasper J, Schimmer AD, Al-awar R, Wrana JL, Attisano L. „Wnt inhibitor screen reveals iron dependence of  $\beta$ -catenin signaling in cancers.“ *Cancer Res.*, Nr. 71 (2011): 7628-7639.
- Sonobe H**, Takeuchi T, Furihata M, Taguchi T, Kawai A, Ohjimi Y, Iwasaki H, Kaneko Y, Ohtsuki Y. „A new human malignant peripheral nerve sheath tumour-cell line, HS-sch-2, harbouring p53 point mutation.“ *Int J Oncol.*, Nr. 17 (2000): 347-352.
- Spyra M**, Kluwe L, Hagel C, Nguyen R, Panse J, Kurtz A, Mautner VF, Rabkin SD, Demestre M. „Cancer stem cell-like cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *PLoS One*, Nr. 6 (2011): e21099.
- Stambolic V**, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. „Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.“ *Cell*, Nr. 95 (1998): 29-39.
- Stasik CJ**, Tawfik O. „Malignant peripheral nerve sheath tumor with rhabdomyosarcomatous differentiation (malignant triton tumor).“ *Arch Pathol Lab Med.*, Nr. 130 (2006): 1878-1881.



**Statement Bethesda**, National Health Consensus Development Conference. „Neurofibromatosis.“ Bethesda, Md., USA (1988): 172-178.

**Stavrovskaya AA**. „Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells.“ *Biochemistry (Mosc)*, Nr. 65 (2000): 95-106.

**Su W**, Sin M, Darrow A, Sherman LS. „Malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion is facilitated by Src and aberrant CD44 expression.“ *Glia*, Nr. 42 (2003): 350-358.

**Subramanian S**, Thayanithy V, West RB, Lee CH, Beck AH, Zhu S, Downs-Kelly E, Montgomery K, Goldblum JR, Hogendoorn PC, Corless CL, Oliveira AM, Dry SM, Nielsen TO, Rubin BP, Fletcher JA, Fletcher CD, van de Rijn M. „Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours.“ *J Pathol.*, Nr. 220 (2010): 58-70.

**Sudol M**. „From Rous sarcoma virus to plasminogen activator, src oncogene and cancer management.“ *Oncogene*, Nr. 30 (2011): 3003-3010.

**Sugimura R**, Li L. „Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases.“ *Birth Defects Res C Embryo Today*, Nr. 90 (2010): 243-256.

**Sun D**, Tainsky MA, Haddad R. „Oncogene Mutation Survey in MPNST Cell Lines Enhances the Dominant Role of Hyperactive Ras in NF1 Associated Pro-Survival and Malignancy.“ *Transl Oncogenomics*, Nr. 5 (2012): 1-7.

**Suri V**, Jha P, Sharma MC, Sarkar C. „O6 -methylguanine DNA methyltransferase gene promoter methylation in high-grade gliomas: a review of current status.“ *Neurol India.*, Nr. 59 (2011): 229-235.

**Takahashi-Yanaga F**, Kahn M. „Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells?“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 16 (2010): 3153-3162.

**Tang Y**, Marwaha S, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Phillips PC, Field J. „A role for Pak protein kinases in Schwann cell transformation.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, Nr. 95 (1998): 5139-5144.

**Tew KD**. „Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.“ *Cancer Res.*, Nr. 54 (1994): 4313-4320.

**Thomas L**, Kluwe L, Chuzhanova N, Mautner V, Upadhyaya M. „Analysis of NF1 somatic mutations in cutaneous neurofibromas from patients with high tumor burden.“ *Neurogenetics*, Nr. 11 (2010): 391-400.

**Thomas L**, Spurlock G, Eudall C, Thomas NS, Mort M, Hamby SE, Chuzhanova N, Brems H, Legius E, Cooper DN, Upadhyaya M. „Exploring the somatic NF1 mutational spectrum associated with NF1 cutaneous neurofibromas.“ *Eur J Hum Genet.*, Nr. 20 (2012): 411-419.

**Topilko P**, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. „Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system.“ *Nature*, Nr. 371 (1994): 796-799.

- Topilko P**, Meijer D. *Transcription factors that control Schwann cell development and myelination*. Bd. 2nd Edn, in *Glia Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance*s, von Richardson WD Jessen KR, 223-244. Oxford: Oxford University Press (2001).
- Torres KE**, Zhu QS, Bill K, Lopez G, Ghadimi MP, Xie X, Young ED, Liu J, Nguyen T, Bolshakov S, Belousov R, Wang S, Lahat G, Liu J, Hernandez B, Lazar AJ, Lev D. „Activated MET is a molecular prognosticator and potential therapeutic target for malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 17 (2011): 3943-3955.
- True LD**, Zhang H, Ye M, Huang CY, Nelson PS, von Haller PD, Tjoelker LW, Kim JS, Qian WJ, Smith RD, Ellis WJ, Liebeskind ES, Liu AY. „CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker.“ *Mod Pathol.*, Nr. 23 (2010): 1346-1356.
- Tucker T**, Friedman JM, Friedrich RE, Wenzel R, Fünsterer C, Mautner VF. „Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas.“ *J Med Genet.*, Nr. 46 (2009): 81-85.
- Tucker T**, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM. „Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1.“ *Neurology*, Nr. 65 (2005): 205-211.
- Turk AN**, Byer SJ, Zinn KR, Carroll SL. „Orthotopic xenografting of human luciferase-tagged malignant peripheral nerve sheath tumor cells for in vivo testing of candidate therapeutic agents.“ *J Vis Exp.*, Nr. 49 (2011): pii: 2558. doi: 10.3791/2558.
- Uchida N**, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. „Direct isolation of human central nervous system stem cells.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nr. 97 (2000): 14720-14725.
- Upadhyaya M**, Kluwe L, Spurlock G, Monem B, Majounie E, Mantripragada K, Ruggieri M, Chuzhanova N, Evans DG, Ferner R, Thomas N, Guha A, Mautner V. „Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs).“ *Hum Mutat.*, Nr. 29 (2008): 74-82.
- Valkenburg KC**, Graveel CR, Zylstra-Diegel CR, Zhong Z, Williams BO. „Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells.“ *Cancers*, Nr. 3 (2011): 2050-2079.
- van Amerongen R**, Nusse R. „Towards an integrated view of Wnt signaling in development.“ *Development*, Nr. 136 (2009): 3205-3214.
- van den Bent MJ**, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM. „MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951.“ *J Clin Oncol.*, Nr. 27 (2009): 5881-5886.
- Veeck J**, Dahl E. „Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3.“ *Biochim Biophys Acta*, Nr. 1825 (2012): 18-28.
- Viskochil D**. *Neurofibromatosis 1. Introduction*. Bd. 89. Am J Med Genet (1999).
- Vogel KS**, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF. „Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1.“ *Science*, Nr. 286 (1999): 2176-2179.

- Wang HQ**, Xu ML, Ma J, Zhang Y, Xie CH. „Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer.“ *Biochem Biophys Res Commun.*, Nr. 417 (2012): 62-66.
- Watson MA**, Perry A, Tihan T, Prayson RA, Guha A, Bridge J, Ferner R, Gutmann DH. „Gene expression profiling reveals unique molecular subtypes of Neurofibromatosis Type I-associated and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *Brain Pathol.*, Nr. 14 (2004): 297-303.
- Watt FM**. „Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis.“ *Curr Opin Genet Dev.*, Nr. 11 (2001): 410-417.
- Wei W**, Chua MS, Grepper S, So S. „Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo.“ *Int J Cancer*, Nr. 126 (2010): 2426-2436.
- Weinhold B**, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. „Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule.“ *J Biol Chem.*, Nr. 280 (2005): 42971-42977.
- Weiss B**, Bollag G, Shannon K. „Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1.“ *Am J Med Genet.*, Nr. 89 (1999): 14-22.
- Weiss SW**, Goldblum JR. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Bd. 5th Revised Edition. Mosby (2008).
- Weissman IL**. „Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.“ *Cell*, Nr. 100 (2000): 157-168.
- Wend P**, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W. „Wnt signaling in stem and cancer stem cells.“ *Semin Cell Dev Biol.*, Nr. 21 (2010): 855-863.
- Wick W**, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. „NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide.“ *J Clin Oncol.*, Nr. 27 (2009): 5874-5880.
- Williams JP**, Wu J, Johansson G, Rizvi TA, Miller SC, Geiger H, Malik P, Li W, Mukoyama YS, Cancelas JA, Ratner N. „Nf1 mutation expands an EGFR-dependent peripheral nerve progenitor that confers neurofibroma tumorigenic potential.“ *Cell Stem Cell*, Nr. 3 (2008): 658-669.
- Williams VC**, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. „Neurofibromatosis type 1 revisited.“ *Pediatrics*, Nr. 123 (2009): 124-133.
- Wistuba II**, Behrens C, Milchgrub S, Syed S, Ahmadian M, Virmani AK, Kurvari V, Cunningham TH, Ashfaq R, Minna JD, Gazdar AF. „Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors.“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 4 (1998): 2931-2938.
- Wojtkowiak JW**, Fouad F, LaLonde DT, Kleinman MD, Gibbs RA, Reiners JJ Jr, Borch RF, Mattingly RR. „Induction of Apoptosis in Neurofibromatosis Type 1 Malignant Peripheral

Nerve Sheath Tumor Cell Lines by a Combination of Novel Farnesyl Transferase Inhibitors and Lovastatin.“ *J Pharmacol Exp Ther.*, Nr. 326 (2008): 1-11.

**Wong WW**, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE, Gunderson LL. „Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome.“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, Nr. 42 (1998): 351-360.

**Woodruff JM**, Chernik NL, Smith MC, Millett WB, Foote FW Jr. „Peripheral nerve tumors with rhabdomyosarcomatous differentiation (malignant "Triton" tumors).“ *Cancer*, Nr. 32 (1973): 426-439.

**Woodward WA**, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. „On mammary stem cells.“ *J Cell Sci*, Nr. 118 (2005): 3585-3594.

**Woolard K**, Fine HA. „Glioma stem cells: better flat than round.“ *Cell Stem Cell*, Nr. 4 (2009): 466-467.

**Wu QL**, Zierold C, Ranheim EA. „Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia.“ *Blood*, Nr. 113 (2009): 3031-3039.

**Wu Rong**, Connolly DC, Ren X, Fearon ER, Cho KR. „Somatic mutations of the PPP2R1B candidate tumor suppressor gene at chromosome 11q23 are infrequent in ovarian carcinomas.“ *Neoplasia.*, Nr. 1 (1999a): 311-314.

**Wu Rina**, López-Correa C, Rutkowski JL, Baumbach LL, Glover TW, Legius E. „Germline mutations in NF1 patients with malignancies.“ *Genes Chromosomes Cancer*, Nr. 26 (1999b): 376-380.

**Xu G**, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R. „The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP.“ *Cell*, Nr. 62 (1990): 599-608.

**Yang FC**, Ingram DA, Chen S, Hingtgen CM, Ratner N, Monk KR, Clegg T, White H, Mead L, Wenning MJ, Williams DA, Kapur R, Atkinson SJ, Clapp DW. „Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1<sup>+/-</sup> mast cells.“ *J Clin Invest.*, Nr. 112 (2003): 1851-1861.

**Yang HJ**, Xia YY, Wang L, Liu R, Goh KJ, Ju PJ, Feng ZW. „A novel role for neural cell adhesion molecule in modulating insulin signaling and adipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells.“ *J Cell Sci.*, Nr. 124 (2011): 2552-2560.

**Yang ZF**, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. „Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer.“ *Cancer Cell*, Nr. 13 (2008): 153-166.

**Yano S**, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. „Characterization and localization of side population cells in mouse skin.“ *Stem Cells*, Nr. 23 (2005): 834-841.

**Yilmaz OH**, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, Morrison SJ. „Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells.“ *Nature*, Nr. 441 (2006): 475-482.

**Yoshikawa H**, Matsubara K, Zhou X, Okamura S, Kubo T, Murase Y, Shikauchi Y, Esteller M, Herman JG, Wei Wang X, Harris CC. „WNT10B functional dualism: beta-catenin/Tcf-dependent growth promotion or independent suppression with deregulated expression in cancer.“ *Mol Biol Cell*, Nr. 18 (2007): 4292-4303.

**Yu F**, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. „let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells.“ *Cell*, Nr. 131 (2007): 1109-1123.

**Zardawi SJ**, O'Toole SA, Sutherland RL, Musgrove EA. „Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer.“ *Histol Histopathol*, Nr. 24 (2009): 385-398.

**Zauber P**, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT. „Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas.“ *Mol Pathol.*, Nr. 56 (2003): 137-140.

**Zhang W**, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. „The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels.“ *FASEB J*, Nr. 17 (2003): 2085-2087.

**Zhang X**, Zhang S, Liu Y, Liu J, Ma Y, Zhu Y, Zhang J. „Effects of the combination of RAD001 and docetaxel on breast cancer stem cells.“ *Eur J Cancer*, Nr. 48 (2012): 1581-1592.

**Zhang YY**, Vik TA, Ryder JW, Srour EF, Jacks T, Shannon K, Clapp DW. „Nf1 regulates hematopoietic progenitor cell growth and ras signaling in response to multiple cytokines.“ *J Exp Med.*, Nr. 187 (1998): 893-1902.

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

## 7. Publikationen

1. **Spyra M**, Kluwe L, Hagel C, Nguyen R, Panse J, Kurtz A, Mautner VF, Rabkin SD, Demestre M. „Cancer stem cell-like cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors.“ *PLoS One*, Nr. 6 (2011): e21099.
2. Borrego-Diaz E, Terai K, Lialyte K, Wise AL, Esfandyari T, Behbod F, Mautner VF, **Spyra M**, Taylor S, Parada LF, Upadhyaya M, Farassati F. „Overactivation of Ras signaling pathway in CD133+ MPNST cells.“ *J Neurooncol.*, Nr. 108 (2012): 423-434.
3. Mohan P, Castellsague J, Jiang J, Allen K, Chen H, Nemirovsky O, **Spyra M**, Hu K, Kluwe L, Pujana MA, Villanueva A, Mautner VF, Keats JJ, Dunn SE, Lazaro C, Maxwell CA. „Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.“ *Oncotarget*, Nr. 4 (2013): 80-93
4. Jiang W, Schnabel C, **Spyra M**, Mautner VF, Friedrich RE, Hagel C, Manley PW, Kluwe L. „Efficacy and selectivity of nilotinib on NF1-associated tumors in vitro.“ *J Neurooncol.*, Epub ahead of print (2013); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173684>; Zugriff am 07.01.2013
5. Gleiss J, Demestre M, **Spyra M**, Eschenhagen T, Hagel C, Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE. „B-scan ultrasonographic monitoring of orthotopic xenografted plexiform neurofibroma in mice.“ *In Vivo*, Nr. 27 (2013): 723-727

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Victor-Felix Mautner für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihm herzlich für seine Unterstützung, sein Engagement und die Möglichkeit an interessanten Projekten mitzuwirken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher und Herrn PD Dr. Hartwig Lüthen für die Übernahme des Disputationsgutachtens und Herrn Dr. Andreas Pommerening-Röser für den Disputationsvorsitz sowie allen Fragestellern.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Lan Kluwe für die Betreuung meiner Laborarbeit und ihrer Hilfestellung bei der Verfassung meiner Arbeit. Ich möchte mich sehr für das herzliche Arbeitsklima mit spannenden Diskussionen und Anregungen bedanken.

Frau Dr. Maria Demestre danke ich sehr für die Zusammenarbeit im Labor aber auch für die Möglichkeit viel von ihr zu lernen. Ich danke Dr. Andreas Kurtz und Dr. Samuel Rabkin als Kollaborationspartner für die vielen Anregungen und die Möglichkeit im Labor von Dr. Rabkin zu arbeiten. Weiterhin möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für die herzliche und fröhliche Zusammenarbeit, für die zahlreichen Gespräche rund um den Laboralltag und Hilfestellungen bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei vor allem Ellen Drews für ihre Mithilfe bei der Durchführung von *in vitro* Assays.

Überdies hinaus danke ich Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus und ihren Mitarbeitern für die Möglichkeit einen Teil meiner Versuche in ihrem Labor durchzuführen sowie Herrn Dr. Alexander Schulte und Dr. Hauke Günther für die Einarbeitung. Frau Dr. Leticia Oliveira-Ferrer danke ich sehr für ihre Unterstützung und für die Möglichkeit der Nutzung des Durchflusszytometers. Bei Herrn Prof. Hagel möchte ich mich ganz herzlich für die Durchführung und Hilfe bei der immunhistologischen Arbeit bedanken. Herrn Dr. Benjamin Otto und Kristin Klätschke danke ich für die Durchführung des Micro-Arrays und die Mithilfe/Geduld bei der Datenauswertung. Für die BLI Messung danke ich Frau Prof. Dr. Sonja Schrepfer und ihrer Arbeitsgruppe, im Besonderen Christiane Pahrman.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner restlichen Familie sowie meinen Freunden möchte ich mich für ihre Unterstützung, ihren liebevollen Zuspruch und für die zahlreichen motivierenden Telefonate bedanken. Meiner Oma Anna möchte ich vor allem für ihren Glauben an mich danken. Du bist jeden Tag bei mir! Zu guter Letzt danke ich Michi für seine Unterstützung, seine Geduld und seine Liebe. Du und meine Eltern haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit abgeschlossen habe.