

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. U. BOGDHORN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TEMOZOLOMIDSENSITIVITÄT VON TUMORSTAMM-
ZELLEN IM HUMANEN GLIOBLASTOM**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Röhrl

2010

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. U. BOGDHORN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TEMOZOLOMIDSENSITIVITÄT VON TUMORSTAMM-
ZELLEN IM HUMANEN GLIOBLASTOM**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Röhrig

2010

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ulrich Bogdahn
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Brawanski
Tag der mündlichen Prüfung:	5. April 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Glioblastoma multiforme	6
1.1.1 Einteilung	6
1.1.2 Makro – und Mikroskopie	6
1.1.3 Prognose	7
1.2 Tumorstammzellen	7
1.2.1 Tumorstammzellhypothese	7
1.2.2 Identifizierung von Tumorstammzellen im Glioblastom	8
1.2.3 Einfluss von Tumorstammzellen auf die Therapie	9
1.3 Temozolomid (Temodal®)	11
1.3.1 Geschichte von Temozolomid	11
1.3.2 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	11
1.3.3 Nebenwirkungsprofil	12
1.3.4 Resistenzmechanismen	13
1.3.5 Temozolomid in der Therapie des primären Glioblastoms	14
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Biologisches Material	17
3.2 Zellkultur	17
3.3 Klonogenitätsassay	18
3.4 Durchflusszytometrie	18
3.5 Fluoreszenzaktivierte und magnetische Zellsortierung	19
3.6 Immunzytochemie	20
3.7 In-vivo-Modell	20
3.8 Immunhistochemie	21
3.9 Statistik	21

4. Ergebnisse	22
4.1 Einfluss von Temozolomid auf Zelltod und Proliferation in CD133 ⁺ TSZ-Linien	22
4.2 Temozolomid vermindert die Anzahl schnell proliferierender CD133 ⁺ Zellen in CD133 ⁺ TSZ-Linien	25
4.3 Temozolomid eliminiert TSZ in CD133 ⁺ TSZ-Linien	27
4.4 Einfluss von Temozolomid auf das Differenzierungspotential CD133 ⁺ TSZ	29
4.5 Temozolomid eliminiert TSZ in CD133 ⁻ TSZ-Linien	30
4.6 Temozolomid hebt die Tumorgenität von MGMT-negative CD133 ⁻ TSZ auf	33
5. Diskussion	36
6. Schlussfolgerung	39
7. Literaturverzeichnis	40
8. Abkürzungsverzeichnis	48
9. Danksagung	51
10. Lebenslauf	52

1. Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Einteilung

Mit einer Inzidenz von etwa 3 pro 100000 Einwohner ist der häufigste maligne hirneigene Tumor das Glioblastom. Dieses kann jede Altersgruppe betreffen, tritt jedoch bevorzugt zwischen dem 45.-70. Lebensjahr auf, wobei das männliche Geschlecht bei den Erkrankten leicht überwiegt. Das Glioblastom zählt zu den neuroepithelialen Tumoren, welche ausgehend von ihrem Ursprungsgewebe in astrozytäre, oligodendrogliale oder ependymale Tumore unterteilt werden. Neben histologischen Kriterien können auch andere Charakteristika wie die Tumorentwicklung oder Tumormanifestation zur weiteren Unterteilung der Glioblastomformen herangezogen werden. So hat sich insbesondere die Differenzierung zwischen primären Glioblastomen, welche *de novo* aus gesundem Hirngewebe entstehen, und sekundären Glioblastomen, welche sich aus besser differenzierten präexistenten Gliomen entwickelt haben, etabliert. Die World Health Organisation (WHO) wählt folgende Einteilung:

Tabelle 1:WHO-Klassifikation

WHO-Klassifikation der Gliome	
Grad I	Pilozytisches Astrozytom
Grad II	Diffuses/Fibrilläres/Protoplasmatisches Astrozytom Oligodendrogliome Oligoastrozytome
Grad III	Anaplastisches Astrozytom Anaplastisches Oligodendrogliom Anaplastisches Oligoastrozytom
Grad IV	Glioblastom

1.1.2 Makro - und Mikroskopie

Der Name Glioblastoma multiforme leitet sich von der makroskopisch meist sehr bunt erscheinenden Schnittfläche ab, welche durch ein Nebeneinander von vitalem Tumorgewebe, Nekrosen, Einblutungen sowie narbigen und zysti-

schen Veränderungen gekennzeichnet ist. Makroskopisch imponiert das Glioblastom gegenüber dem benachbarten gesunden Gehirngewebe relativ scharf abgegrenzt, jedoch bestätigt sich dieser Eindruck mikroskopisch in der Regel nicht. Aufgrund einer ausgeprägten migratorischen Kapazität finden sich in Autopsien regelhaft längs der Markfaserbahnen gewanderte Tumorzellen fernab der ursprünglichen Tumormasse [1, 2]. Eine vollständige Tumorsektion ist infolgedessen meist nicht möglich. Histologisch finden sich gliale Zellen mit ausgeprägter zytoplasmatischer und nukleärer Polymorphie sowie eine hohe mitotische Aktivität. Ein wichtiges diagnostisches Merkmal ist die massiv gesteigerte Angiogenese, wobei oftmals glomeruloid konfigurierte Neokapillaren auffallen. In vielen Fällen zeigen insbesondere die ektatisch erweiterten Tumorgefäße eine ausgedehnte Thrombosierungsneigung.

1.1.3 Prognose

Trotz neuer multimodaler Therapiekonzepte ist die Prognose des Glioblastoms weiterhin ernüchternd. Selbst durch neu etablierte Therapieansätze, die nach der Operation und der folgenden Strahlentherapie, welches bis 2004 die Standardprimärtherapie des Glioblastoms darstellte, noch eine adjuvante Chemotherapie beinhaltet, wird lediglich eine mittlere Überlebenszeit von etwa 14,6 Monaten und eine 2-Jahresüberlebensrate von etwa 26% erreicht [3].

1.2 Tumorstammzellen (TSZ)

1.2.1 Tumorstammzellhypothese

Nach der Tumorstammzellhypothese [4] besitzen nicht alle Tumorzellen (TZ) die Möglichkeit zu proliferieren und das Tumorstadium zu unterhalten. Der Großteil der Tumorzellen verliert die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und differenziert weiter zu Tumorzellen welche dem Ursprungsgewebe je nach Ausmaß der Differenzierung ähneln. Eine kleine multipotente Subpopulation der Tumorzellen jedoch behält die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation und wird aufgrund dessen Tumorstammzellen (TSZ) genannt, wobei davon ausgegangen wird, dass sich die Stammzellen (SZ) nur selten, dafür jedoch asymmetrisch teilen und zu einem Teil erneut langsam teilende Tumorstammzellen

und zum anderen Teil schnell proliferierende Progenitorzellen generieren [5]. Noch konnte nicht abschließend geklärt werden ob sich diese Tumorstammzellen aus normalen Stammzellen, bzw. Progenitorzellen entwickeln oder *de novo* aus einer mutierten differenzierten Zelle entstehen. Jedoch lassen neuere Untersuchungen darauf schließen dass im zentralen Nervensystem insbesondere Stammzellen und Progenitorzellen ein erhöhtes Entartungsrisiko aufweisen. Dies ist mutmaßlich durch bereits aktivierte zelluläre Vorgänge, wie beispielsweise die Selbsterneuerungskapazität sowie die erhöhte Aktivität der Telomerase und anti-apoptotischer Gene bedingt. In Folge dessen benötigen Stammzellen auch nicht wie differenzierte Zellen die geschätzten vier bis sieben Mutationen um maligne zu entarten [6]. Des Weiteren wird eine Akkumulation von tumorinduzierenden Mutationen durch die Langlebigkeit der Stammzellen erleichtert [7].

Seit Jahren schon finden sich in Patienten disseminierte Tumorzellen in Gewebe weit abseits der eigentlichen Tumorformation ohne dass diese Metastasen ausbilden [2]. Eine kompetente Immunantwort könnte eine mögliche Erklärung hierfür darstellen, bei der disseminierte Tumorzellen effektiv eliminiert werden bevor sie eine klinisch relevante Tumorformation generieren können. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass, im Einklang mit der Tumorstammzellhypothese, Tumorzellen selbst nicht in der Lage sind neue Tumorformationen zu bilden und lediglich versprengte Tumorstammzellen die Fähigkeit besitzen Metastasen zu erzeugen [8, 9].

1.2.2 Identifizierung von Tumorstammzellen im Glioblastom

In den letzten Jahren wurden einige bisher gültige, das adulte Gehirn betreffende Grundsätze in Frage gestellt. Aufgrund des geringen Zellumsatzes und der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit wurde dieses lange Zeit als statisches Gewebe betrachtet, in dem Stammzellen lediglich in embryonalen und frühen postnatalen Phasen auffindbar waren. Zwischenzeitlich konnten jedoch sowohl multipotente neuronale Stammzellen mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung, als auch davon ausgehende Progenitorzellen in mehreren Regionen des adulten humanen Gehirnes nachgewiesen werden [10]. Diese sind in erster Linie in der subventrikulären Zone [11] gelegen, in geringer Anzahl werden Stammzellen jedoch auch im Hippocampus [12] sowie in der subcorticalen weißen Substanz

[13] gefunden. Aufgrund der offensichtlichen Gemeinsamkeiten von Stammzellen und Tumorzellen, wie etwa die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation, brachten Reya et al. schließlich das moderne Konzept der Tumorstammzellen auf [8]. Dieses Konzept kann in hämatologischen Tumoren als gesichert gelten. Das humane Glioblastom war hierbei einer der ersten soliden Tumore bei denen eine kleine Tumorzellsubpopulation isoliert werden konnte welche Stammzelleigenschaften besitzt. Diese Subpopulation exprimiert die neuronalen Stammzellmarker CD133 und Nestin und ist in der Lage *in vitro* klonale Tumorsphären auszubilden [14], sowie *in vivo* nach Injektion von lediglich 100 CD133⁺ Tumorzellen den ursprünglichen Tumor in vormals gesundem Hirngewebe von immundefizienten Nacktmäusen wieder herzustellen [15-17]. Jedoch scheint der Oberflächenmarker CD133 allein keine suffiziente Charakterisierung bezüglich der Stammzelleigenschaften von Tumorzellen darzustellen. Derzeit wird angenommen, dass lediglich eine kleine Subgruppe der CD133⁺-Tumorzellen (<10%) Tumorstammzellen darstellen und somit nicht durch derzeitige Antikörper zweifelsfrei detektiert werden können [18]. Zusätzlich konnten 2007 in Glioblastomzelllinien CD133⁻ Tumorstammzellen identifiziert werden, welche den bereits bekannten CD133⁺ TSZ im Bereich der Kolonizität, der Tumorgenität sowie dem Differenzierungspotential ähneln, jedoch unterschiedliche molekulare und zelluläre Eigenschaften aufweisen [15]. Bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden ob das Vorliegen unterschiedlicher Tumorstammzellen im primären Glioblastom auf unterschiedliche Ursprungszellen oder auf unterschiedliche molekulare Veränderungen der gleichen Zellgruppe zurückzuführen ist. Nichtsdestoweniger wird das Vorhandensein von Tumorstammzellen und deren Einfluss auf die Tumorentstehung und die Tumorthherapie nicht mehr geleugnet, allerdings steht die Identifizierung eindeutiger Marker weiterhin noch aus.

1.2.3 Einfluss der Tumorstammzellen auf die Therapie

Die bisherigen Therapien zur Behandlung maligner Tumore zielen in erster Linie auf eine Zytoreduktion ab, welche die Tumormorphose in unterschiedlichem Maße verkleinert. In einigen Fällen ist der Tumor anschließend makroskopisch nicht mehr nachweisbar. Jedoch ist der Therapieerfolg meist nur von kurzer Dauer, sowohl Rezidive als auch ein Tumorprogress treten häufig, beim Gli-

oblastom regelhaft, auf. Die Annahme, dass sowohl Tumorbildung als auch Tumorwachstum und Metastasierung von einer zahlenmäßig kleinen Population an Tumorstammzellen unterhalten wird, liefert eine mögliche Erklärung für das bisherige Scheitern antitumoröser Therapien (Abbildung 1). Normale Stammzellen verschiedener Gewebe scheinen im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen desselben Gewebes gegenüber Chemotherapeutika resistenter zu sein [19]. Dies könnte durch eine in Stammzellen erhöhte Expressionsrate u.a. von antiapoptotischen Proteinen [20-23] und ABC-Transportern [24-26], welchen eine entscheidende Rolle in der Medikamentenresistenz zukommt [27], bedingt sein. Ausgehend von der Hypothese, dass Tumorstammzellen sich aus normalen Stammzellen entwickeln, lässt dies möglicherweise auch auf eine erhöhte Chemoresistenz der Tumorstammzellen schließen, so dass selbst bei gutem Therapieansprechen mit kompletter Remission genügend Tumorstammzellen überleben, welche ein Rezidiv verursachen (Abbildung 1). Diese Überlegungen zeigen die Notwendigkeit neue zelluläre Therapien zu entwickeln, die speziell gegen diese Tumorsubpopulation bzw. gegen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung gerichtet sind um dauerhafte Therapieerfolge oder sogar Heilungen zu erzielen.

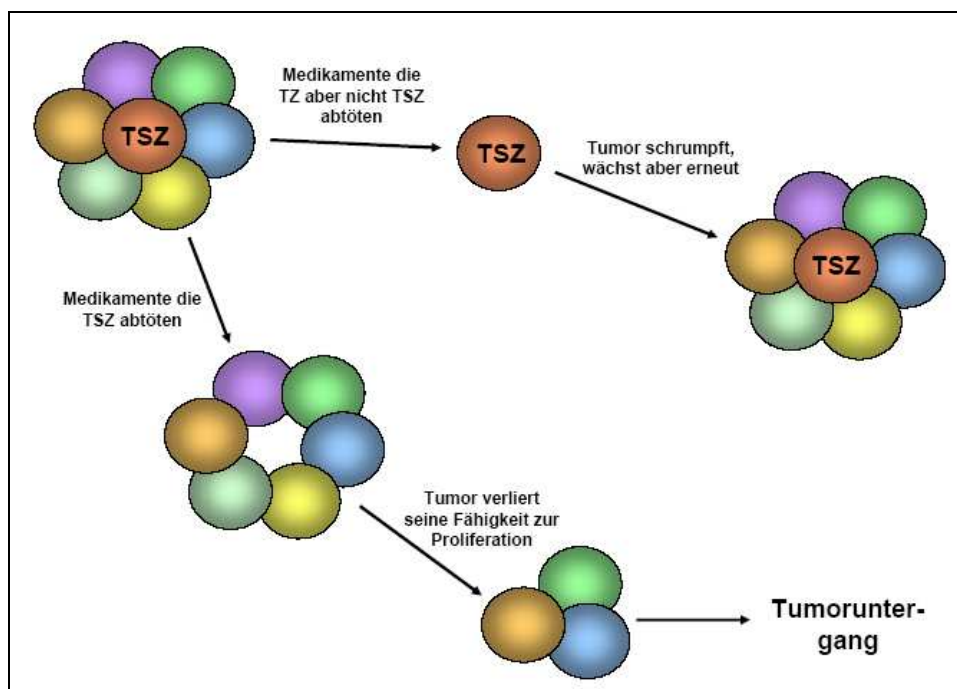


Abbildung 1: In Anlehnung an Reya et al., 2001

1.3 Temozolomid (Temodal®)

1.3.1 Geschichte von Temozolomid

Temozolomid (TMZ) wurde erstmals 1984 an der Aston University von der UK Cancer Research Campaign (jetzt: Cancer Research UK) synthetisiert und im Folgenden hauptsächlich in Großbritannien weiter entwickelt [28, 29]. Es handelt sich hierbei um ein orales, ankylierendes Zytostatikum, das zur Therapie von malignen Gliomen, sowohl bei primär diagnostizierten Gliomen als auch beim Rezidiv oder Progress, seit 1999 europaweit zugelassen ist. Im Tiermodell sowie in klinischen Studien ließ sich eine breite Wirksamkeit gegenüber einer großen Zahl an hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren, insbesondere gegenüber ZNS-Tumoren und dem malignem Melanom [30, 31], nachweisen.

1.3.2 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Bei Temozolomid handelt es sich um ein Triazen, das bei einem physiologischen pH-Wert spontan in seine Wirkform 3-Methyl-Triazen-1-yl-Imidazol-4-Carboxamid (MTIC) hydrolysiert wird. Die Zytotoxizität von MTIC wird hauptsächlich auf die Alkylierung an der O-6-Position von Guanin mit zusätzlicher Alkylierung an der N-7-Position zurückgeführt [32]. Zum resultierenden O-6-Methylguanin existiert keine komplementäre Base, so dass es nach frustranen Reparaturversuchen durch *Mismatch-Repair*-Enzyme schließlich bei der DNA-Replikation zu Strangbrüchen kommt, welche letztlich eine Apoptose induzieren [33]. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation beträgt nahezu 100%, maximale Plasmakonzentrationen von Temozolomid werden darunter nach 30-90 min erreicht [34]. Die besondere Eignung zur Behandlung maligner Gliome beruht auf der Eigenschaft, dass Temozolomid aufgrund der geringen Molekülgröße und des lipophilen Charakters zu 20-30% des Plasmaspiegels die intakte Blut-Hirn-Schranke überschreitet [35, 36]. Somit werden auch diffus infiltrierende Tumorzellen erreicht, die in Regionen mit intakter Blut-Hirn-Schranke wachsen. MTIC und 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid (AIC), in das MTIC spontan hydrolysiert, sowie weitere Abbauprodukte werden über die Nieren eliminiert. Die Plasmaclearance von Temozolomid ist dabei unabhängig von Lebensalter, Nierenfunktion oder Raucherstatus. Da Temozolomid nicht über die Leber metabo-

lisiert wird und nur eine geringe Proteinbindung (10-20%) aufweist, ist eine Wechselwirkung mit anderen Arzneimitteln nicht zu erwarten [32].

1.3.3 Nebenwirkungsprofil

Die relativ selten auftretende Knochenmarkssuppression ist, wie bei den meisten zytotoxischen Substanzen, auch bei Temozolomid die dosislimitierende Toxizität. Anzeichen für eine kumulative Myelosuppression sind jedoch nicht zu beobachten [32]. Aufgrund der geringen emetogenen Wirkung von Temozolomid reichen milde Antiemetika wie Metoclopramid oder Dimenhydrinat zur Therapie und Prophylaxe des zytostatikainduzierten Erbrechens meist aus. Weiterhin zu beachten ist das mögliche Auftreten eines allergischen Arzneimittel-exan-thems, welches gehäuft bei Patienten zu beobachten ist, die gleichzeitig Carbamazepin als antikonvulsive Therapie erhalten [37]. Wie jedes Zytostatikum ist auch Temozolomid embryo- und fetotoxisch, sowie potenziell keimzellschädigend. Eine Auflistung der häufigsten Nebenwirkungen findet sich in Tabelle.2.

Tabelle 2: Temozolomid-assoziierte Toxizität bei Standarddosis [38] (nach CTC-Kriterien)

Toxizität	Auftreten bei täglicher Einnahme von TMZ über 5 Tage
Übelkeit	52% davon 4% Grad III + IV
Erbrechen	34% davon 5% Grad III + IV
Schmerzen	34% davon 7% Grad III + IV
Obstipation	30%
Kopfschmerzen	22%
Müdigkeit	20%
Anorexie	15%
Asthenie	12%
Fieber	11%
Thrombozytopenie	9% davon 7% Grad III + IV
Anämie	8% davon 2% Grad III + IV
Neutropenie	5% davon 3% Grad III + IV

1.3.4 Resistenzmechanismen

Die von Temozolomid verursachten DNA-Schäden werden in erster Linie durch die O-6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) erkannt und behoben, indem MGMT die übertragene Methylgruppe von der O-6-Position des Guanins abspaltet und mit dieser selbst eine irreversible Bindung eingeht [31, 39]. Dadurch wird die ursprüngliche DNA wiederhergestellt, MGMT jedoch inaktiviert. Die de-
rart inaktivierte MGMT wird ubiquitiert und anschließend proteolytisch abgebaut, weshalb MGMT auch als *“suicide protein“* bezeichnet wird [40]. Um den Schutzmechanismus aufrechtzuerhalten muss MGMT von der Zelle neu synthetisiert werden, was bis zu 72 h in Anspruch nehmen kann [41]. Bisher ist kein anderes Reparaturenzym bekannt, welches an der O-6-Position des Guanins ansetzt, so dass MGMT eine entscheidende Rolle in der Temozolomidresistenz zukommt. Da MGMT bei der Reparatur der von Temozolomid verursachten DNA-Schäden verbraucht wird, kann durch eine kontinuierliche bzw. konzentrierte Gabe von Temozolomid die Tumorzelle von MGMT depletiert werden und damit die Suszeptibilität gegenüber Temozolomid möglicherweise erhöht werden [42]. Ebenfalls von großer Bedeutung in der Temozolomidtherapie ist der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors. Die epigenetische Modifizierung (*silencing*) des MGMT-Gens durch eine Promotormethylierung kommt einem funktionellen MGMT-Verlust gleich und beeinträchtigt somit ebenfalls die DNA-Reparatur. Zur Bedeutung des MGMT-Status im Hinblick auf das Therapieansprechen von Gliomen auf alkylierende Substanzen liegen kontroverse Ergebnisse vor, wenngleich die Mehrzahl der Studien zu dem Schluss kam, dass eine niedrige oder fehlende MGMT-Expression mit einem deutlichen Überlebensvorteil gekoppelt ist [39, 43, 44]. Um ein Therapieversagen aufgrund einer erhöhten MGMT-Expression zu vermeiden wurde versucht selektive MGMT-Inhibitoren zu entwickeln [45, 46]. Dies gelang mit O-6-Benzylguanin (6-BG), welches gegenüber MGMT als Pseudosubstrat wirkt und in Folge dessen zu einer MGMT-Depletion der Tumorzelle und damit zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber alkylierenden Substanzen wie etwa Temozolomid führt [47-49]. Da eine systemische 6-BG Gabe jedoch eine MGMT-Depletion aller Körperzellen verursacht musste auch die Temozolomiddosis erniedrigt werden um unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere die erhöhte Myelotoxizität, zu minimieren. Konsekutiv wird, um zur Behandlung des Glioblastoms ausreichende

Temozolomidosen aufrechterhalten zu können, derzeit eine intrathekale Gabe von 6-BG in klinischen Studien untersucht [50]. Die zytotoxische Wirkung von Temozolomid korreliert größtenteils mit der Bildung von O-6-Methylguanin. Die O-6-Position des Guanins ist jedoch nur eine von 14 möglichen Positionen an denen Temozolomid angreift, wobei 70% der übertragenen Methylgruppen an die N-7-Position des Guanins binden [31]. Die Reparatur dieser methylierten DNA-Basen ist ein weiterer möglicher Resistenzfaktor gegenüber Temozolomid. Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym, welches über Aktivierung, bzw. Rekrutierung von Reparaturenzymen wie Basenexzisionsenzymen oder DNA-Mismatch-Reparaturenzymen die Ausbesserung methylierter DNA induziert. Auf diese Weise schützt PARP die Tumorzellen insbesondere vor alkylierenden Substanzen wie Temozolomid. Durch die Hemmung von PARP konnte sowohl in der Zellkultur als auch im Tierversuch nachweislich die zytotoxische Wirkung von Temozolomid erhöht werden. Mögliche PARP-Inhibitoren durchlaufen derzeit klinische Studien [51].

Die endgültige zytotoxische Wirkung entfaltet Temozolomid durch die Induktion der Apoptose. Über die Tumorsuppressorgene p53 und p21 wird der Zellzyklusarrest induziert und Caspase 3 aktiviert, welches als Schlüsselenzym in der Apoptosekaskade fungiert. Funktionsstörungen dieser Tumorsuppressorgene führen zu einer verminderten Apoptosefähigkeit und damit möglicherweise zu Wirkungsverlusten in der Temozolomidtherapie [52].

1.3.5 Temozolomid in der Therapie des primären Glioblastoms

Aufgrund vielversprechender Ergebnisse von Temozolomid in Phase-II-Studien zur Primärtherapie des Glioblastoms [53] und in der Rezidivtherapie anaplastischer Gliome [54] führten die European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und das National Cancer Institute of Canada (NCIC) eine gemeinsame Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von Temozolomid in der Primärtherapie des Glioblastoms durch. Hierzu wurde die Wirksamkeit einer Strahlentherapie mit konkomitanter, niedrig dosierter Chemotherapie mit Temozolomid (75 mg/m²/d) gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid (150-200 mg/m², Tag1-Tag5, Repetition nach 28 Tagen, bis zu 6 Zyklen) mit einer alleinigen Strahlentherapie verglichen. Die zusätzliche Behandlung mit Temozolomid verlängerte die mittlere Überlebenszeit von 12,1 Monaten auf

14,6 Monate und steigerte die 2-Jahresüberlebensrate von vormals 10% auf 26%. Auch das progressionsfreie Überleben erhöhte sich in der Gruppe, die eine zusätzliche Temozolomidgabe erhielt auf 6,9 Monate gegenüber 5 Monaten in der Gruppe, welche allein strahlentherapeutisch behandelt wurden [3]. Eine weitere Subgruppenanalyse ergab, dass insbesondere Patienten mit Glioblastomen, welche einen methylierten MGMT-Promotor aufweisen, von der zusätzlichen Chemotherapie mit Temozolomid profitieren [39]. Da sich MGMT-Gehalt einer Zelle aufgrund des vorher genannten Suizidmechanismus bei prolongiertem Reparaturbedarf erschöpfen, kann Temozolomid zudem als MGMT-depletierendes Agens verwendet werden, welches für nachfolgende Temozolomidgaben, aber auch für eine nachfolgende Strahlentherapie sensibilisiert [55-57].

Begleitend zur Strahlentherapie galt in Deutschland bislang Nimustin (ACNU), ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe, als Standardmedikament zur Primärtherapie des Glioblastoms basierend auf den Protokollen der NOA-01-Studie. In dieser konnte eine mittlere Überlebenszeit von 15,7 Monaten sowie eine 2-Jahresüberlebensrate von 29% ermittelt werden [58]. Trotz der laut Studien geringfügig kürzeren mittleren Überlebenszeit von Temozolomid gegenüber ACNU ist Temozolomid jedoch aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils und der oralen Applikationsmöglichkeit einer intravenösen Therapie, wie sie bei der Behandlung mit ACNU notwendig wäre, unter Umständen vorzuziehen, so dass die konkomitante und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid begleitend zur Strahlentherapie zum neuen Standard in der Primärtherapie des Glioblastoms werden [59].

2. Fragestellung

Die Entdeckung von Tumorstammzellen, wie etwa im humanen Glioblastom, hat bisherige Therapieansätze in Frage gestellt [9, 14]. Da, im Einklang mit der Tumorstammzellhypothese, eine langfristige Heilung beim Glioblastom nicht allein durch eine Zytoreduktion des Tumolvolumens, sondern nur durch eine vollständige Abtötung von Tumorstammzellen erreicht werden kann, soll in dieser Arbeit die Wirkung von Temozolomid auf diese Tumorzellsubpopulation genauer untersucht werden. Insbesondere soll auf die Frage eingegangen werden ob sich bisherige Arbeitshypothesen wie eine erhöhte Chemoresistenz von Tumorstammzellen bewahrheiten.

3. Material und Methoden

3.1 Biologisches Material

Sämtliche Tumorproben (n=5: R8, R11, R18, R28 und R44) stammen von Patienten der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Regensburg (Direktor: Prof. Dr. A. Brawanski). Bei den Proben handelt es sich ausschließlich um primäre Glioblastome (WHO Grad IV). Die histologischen Befunde wurden vom Pathologischen Institut des Klinikums Regensburg erstellt (Direktor: Prof. Dr. F. Hofstädter). Alle Versuche mit menschlichem Material wurden von dem örtlichen Ethikkomitee genehmigt (Universität Regensburg, Nr. 05/105, 14. Juni 2005).

3.2 Zellkultur

Für die Experimente wurden bereits etablierte, aus humanen Glioblastomen gewonnene Tumorstammzelllinien verwendet [15], welche in einem Brutschrank bei 37°C, einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre und einem Kohlendioxidgehalt von 5% kultiviert wurden. Dem Nährmedium DMEM/F12 wurde jeweils 20 ng/ml der Wachstumsfaktoren *rec human EGF*, *rec human bFGF* (beides von R&D Systems) und *rec human LIF* (Chemicon), sowie 2% B27 (Gibco®) frisch zugesetzt um die Stammzeleigenschaften der Kultur zu erhalten [15-17, 60-66]. Wenn nicht anders beschrieben erfolgte hier, wie in allen anderen Versuchen, zweimal pro Woche ein Mediumwechsel, bei dem zur Vermeidung des Verlustes freischwimmender Zellen nur die Hälfte des Mediums abgesaugt und ersetzt wurde. Für die Behandlung der Tumorzellen während der Versuche wurde Temozolomid (TMZ, Temodal®, Schering-Plough; Stocklösung 150 mmol/l in DMSO) mit Stammzellmedium verdünnt und der Zellkultur zugesetzt, so dass eine Temozolomidkonzentration von 5, 50 und 500 µmol/l über den jeweiligen Versuchszeitraum erreicht wurde. Zur Kontrolle wurde Stammzellmedium mit einem Anteil von 0,3% DMSO verwendet. Um die Vitalität, Zellproliferation und metabolische Aktivität der Tumorstammzellkultur zu analysieren wurde dieser 10% AlamarBlue® zugesetzt. Dabei handelt es sich um einen flüssigen, in Zellkultur stabilen und ungiftigen Farbstoff. Im Inneren einer aktiven, bzw. proliferierenden Zelle werden mehr Stoffwechselprodukte gebildet, die in

der Lage sind AlamarBlue® zu reduzieren. Dies zeigt sich in einem Farbumschlag von der mit AlamarBlue® versetzten Zellkultur von blau nach pink. Dieser Farbumschlag kann mit Hilfe des *Elisa-Readers* quantifiziert werden. Die optische Dichtemessung erfolgte hierfür nach 16 h bei 590 nm und 540 nm. Zur weiteren Vitalitätsanalyse wurde zudem ein Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay, Promega; Cytotox96R) entsprechend der Bedienungsanleitung durchgeführt, mittels dem der Anteil der toten Zellen, bzw. der Zellen mit defekter Zellmembran ermittelt werden kann.

3.3 Klonogenitätsassay

Bei diesem Versuch wurde analysiert welcher Prozentsatz der Tumorzellen dazu in der Lage ist Tumorsphären zu bilden und damit die Fähigkeit zur Proliferation („Klonogenität“) aufweist. Dadurch sollte ermittelt werden ob die Behandlung mit Temozolomid eine Auswirkung auf die Ausbildung von Tumorsphären hat und somit Rückschlüsse auf die Wirkung von Temozolomid gegenüber Tumorstammzellen erlaubt. Hierfür wurden 10 Tumorzellen pro Loch in einer 96 Lochplatte, bzw. in einer 48 Lochplatte ausgesät und 2-mal wöchentlich mit frischem Medium samt Temozolomid in steigenden Konzentrationen über den angegebenen Zeitraum versorgt. Nach 14, 28 und 42 Tagen in Behandlung, wurde sowohl die Anzahl als auch die Größe der entstandenen Sphären im Lichtmikroskop bei 10facher Vergrößerung bestimmt.

3.4 Durchflusszytometrie

Zur phänotypischen Charakterisierung kam ein FACSCalibur Vierkanal-Durchflusszytometer zum Einsatz. Hiermit konnten gezielt Zellsubpopulationen an Hand exprimierter Epitope detektiert werden, an die mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Antikörper gebunden hatten.

Zellteilungen wurden mittels einer CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*)-Färbung analysiert. Hierbei handelt es sich um eine für Zellen ungiftige Substanz die leicht durch die Zellmembran in das Innere von Zellen diffundiert und dort an die Plasmamembran bindet [67]. Bei jeder nun folgenden Zellteilung wird das gebundene CFSE zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt. Durch die daraus resultierende, schrittweise Intensitätsminderung der CFSE-

Färbung bei nachfolgenden Zellgenerationen kann die Geschwindigkeit und Anzahl der Zellteilungen quantifiziert werden, bzw. Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden, identifiziert werden. Hierfür wurden die Tumorzellen 10 min mit 2 $\mu\text{mol/l}$ CFSE (Sigma Aldrich) gefärbt. Nach 2, 4 und 7 Tagen wurden die Zellen zusätzlich mit CD133/2-PE (1:100, Miltenyi Biotech) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Beurteilung des Zellzyklusarrests und Proliferation der behandelten Tumorstammzellen wurde neben der CFSE-Färbung auch eine BrdU (Bromodeoxyuridin)-Färbung vorgenommen. Bei BrdU handelt es sich um ein synthetisches Thymidinanalogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Gegen BrdU gerichtete, fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen in einem zweiten Schritt die Analyse der proliferierenden Zellen. Hierfür wurden die Tumorzellen 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU inkubiert. Anschließend wurden die derart behandelten Zellen mit 0,5% P-Formaldehyd fixiert und erneut mit 3 N HCl mit Zusatz von 0,5% Tween inkubiert. Daraufhin erfolgte die Doppelfärbung mit Anti-BrdU-Antikörper (1:25, Roche; Sekundärer Antikörper: Anti-Maus Antikörper Cy5, 1:50) und 75 $\mu\text{mol/l}$ Propidiumiodid (Sigma Aldrich). Des Weiteren wurde eine Vitalitätsfärbung mittels 7-Amino-Actinomycin D (7AAD, Sigma Aldrich) durchgeführt. Dieser Farbstoff kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen und lagert sich daher nur in die DNA toter Zellen ein, deren Zellmembranen defekt sind. Um die nekrotischen Zellen zu markieren wurden die Tumorzellen 10 min mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 7-AAD gefärbt und unmittelbar im Anschluss analysiert. Die endgültige Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms WinMDI 2.8. Die Zellzyklusdaten wurden durch eine Kontrollauswertung mit ModFit LT 3.1 (Verity) bestätigt.

3.5 Fluoreszenzaktivierte und magnetische Zellsortierung

Zur fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) wurde ein *fluorescence activated cell sorter* (FACSAria, B&D) verwendet. Bei diesem Dreikanal-Durchflusszytometer wurden die mit CD133/2-PE (1:10; Miltenyi Biotech) bzw. zur Kontrolle mit Isotypantikörper (1:10, mslgG1 κ -PE; Caltag Laboratories) gefärbten Tumorzellen unmittelbar nach der Detektionseinheit entsprechend der gewünschten Einstellungen elektromagnetisch abgelenkt und in Auffangbehältern gesammelt. Alternativ erfolgte die Zellsortierung mittels magnetischer Zell-

separation (MACS, *positive magnetic activated cell sorting*). Hierfür wurden die Tumorzellen mit CD133/1-*MicroBeads* (Miltenyi Biotech) inkubiert. Anschließend wurden die an die *MicroBeads* gebundenen Tumorzellen an Hand mehrerer in Folge geschalteter magnetischer Säulen abgetrennt. So war es möglich die Tumorzellen in CD133⁺ und CD133⁻ Subpopulationen aufzuteilen, um eine möglichst reine Population von Tumorstammzellen gezielt weiter zu untersuchen.

3.6 Immunzytochemie

Mit Hilfe der Immunzytochemie erfolgte die Analyse des Differenzierungsprofils der verschiedenen Tumorzelllinien und dessen Veränderung unter experimentellen Bedingungen. Hierfür wurde eine Tumorsphäre vereinzelt und die Tumorzellen daraufhin für 48 h auf Deckgläschen kultiviert. In dieser Zeit wuchsen die TZ auf den Deckgläschen fest und wurden sodann über 7 d mit Temozolomid, bzw. DMSO wie in 2.2 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Tumorzellen mit den Primärantikörpern Anti- β III-Tubulin (1:2000; Promega), Anti-GFAP (1:1000, saures Gliafaserprotein, *glial fibrillary acidic protein*; DAKO), Anti-Nestin (1:500; Chemicon) und Anti-GalC (1:500, *Galaktozerebrosid C*; Chemicon) markiert. Um diese Markierung sichtbar zu machen erfolgte daraufhin eine zweite Färbung mit den Sekundärantikörpern Anti-Maus-AlexaFluor488 (1:100; Molecular Probes), bzw. Anti-Hase-Rhodamin (1:100; Dianova). Zur eindeutigen Zelldifferenzierung wurden weiterhin die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (1:10000, DAPI; Sigma-Aldrich) gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei vierzigfacher Vergrößerung.

3.7 In-vivo-Modell

Alle Tierversuche erfolgten im Rahmen der Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes. Als Versuchstiere kamen T-Lymphozyten defiziente NMRI^(nu/nu) Mäuse zum Einsatz. In den Versuchen wurden die Tumorzellen vereinzelt, in 2 μ l PBS aufgenommen, und wie bei Beier et al. beschrieben, intrakraniell injiziert [15, 68]. Nach 12 Wochen erfolgte die Sektion, hierbei wurde der entstandene Tumor entfernt und im Ganzen eingefroren. Anschließend wurde das gefrorene

Material mittels eines Mikrotoms in 10 µm dünne Scheiben geschnitten und diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Standardprotokoll gefärbt. Sowohl die Tierversuche als auch deren histologische Auswertung wurden gemeinsam mit Frau Dr. D. Beier und Frau A. Lohmeier durchgeführt.

3.8 Immunhistochemie

Zusätzlich zur der HE-Färbung wurde noch eine Immunhistochemie des Sektionspräparates angefertigt. Hierfür wurde ein 10 µm dünner Gefrierschnitt des Mäusegehirns mit Aceton fixiert. Durch Behandlung des Schnittes mit 3% H₂O₂ über 10 min wurde die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Zusätzlich wurde, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu unterbinden, das Präparat 30 min bei Raumtemperatur in 0,2% *Fishskin-Puffer* inkubiert. Nach diesen Vorbereitungen erfolgte die Färbung des Schnittes mit Anti-Ki67-Antikörpern (1:50; Novocastra), bzw. mit der Isotypkontrolle über 1 h bei Raumtemperatur. Bei Ki67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker, welcher nur in den Replikationsphasen des Zellzyklus exprimiert wird und somit Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors gibt. Anschließend erfolgte eine neuerliche Färbung mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (ABC-Kit Vectastain Standard; Vector Laboratories) und mit Diaminobenzidin (DAB-Kit; Vector Laboratories).

3.9 Statistik

Alle Untersuchungen wurden mit den CD133⁺ Zelllinien R11, R18, R28 und R44, sowie mit der CD133⁻ Zelllinie R8 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit JMP 5.1, die jeweils verwendeten statistischen Tests sind bei den entsprechenden Abbildungslegenden angegeben. Von allen Ergebnissen sind sowohl der Mittelwert (MW) als auch der Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) dargestellt.

4. Ergebnisse

Es wurden vier CD133⁺ (R11, R18, R28 und R44) und eine CD133⁻ (R8) Tumorstammzelllinie untersucht, die aus primären Glioblastomen WHO Grad IV gewonnen wurden. In diesen Zelllinien fand sich jeweils eine kleine Subpopulation von etwa 2-4% der Tumorzellen, die alle Stammzellkriterien erfüllten [15], wohingegen der Anteil CD133⁺ zwischen 0-40% variierte. Um diese Merkmale zu erhalten wurden die Zelllinien unter den vorher genannten Bedingungen kultiviert, die selbst bei lang andauernder Kultur die molekularen Tumoreigenschaften erhalten [15, 60].

4.1 Einfluss von Temozolomid auf Zelltod und Proliferation in CD133⁺ TSZ-Linien

Alle CD133⁺ Tumorstammzelllinien zeigten, ähnlich wie aus Versuchen mit klassischen, FCS-Medium kultivierten Gliomzelllinien vorbeschrieben [69-72], keinen Temozolomid-induzierten Zelltod bei Konzentrationen, die bei Anwendung beim Menschen im Plasma (50 µmol/l Temozolomid) [36, 73] oder im Liquor (5 µmol/l Temozolomid) [36] maximal erreicht werden. Jedoch zeigte sich bei Inkubation mit Temozolomid über 7 Tage in höheren Konzentrationen ein deutlicher Rückgang der metabolisch aktiven Tumorzellen gegenüber der Kontrollgruppe, die mit Temozolomid-freiem Stammzellmedium behandelt wurden (Abbildung 2 links).

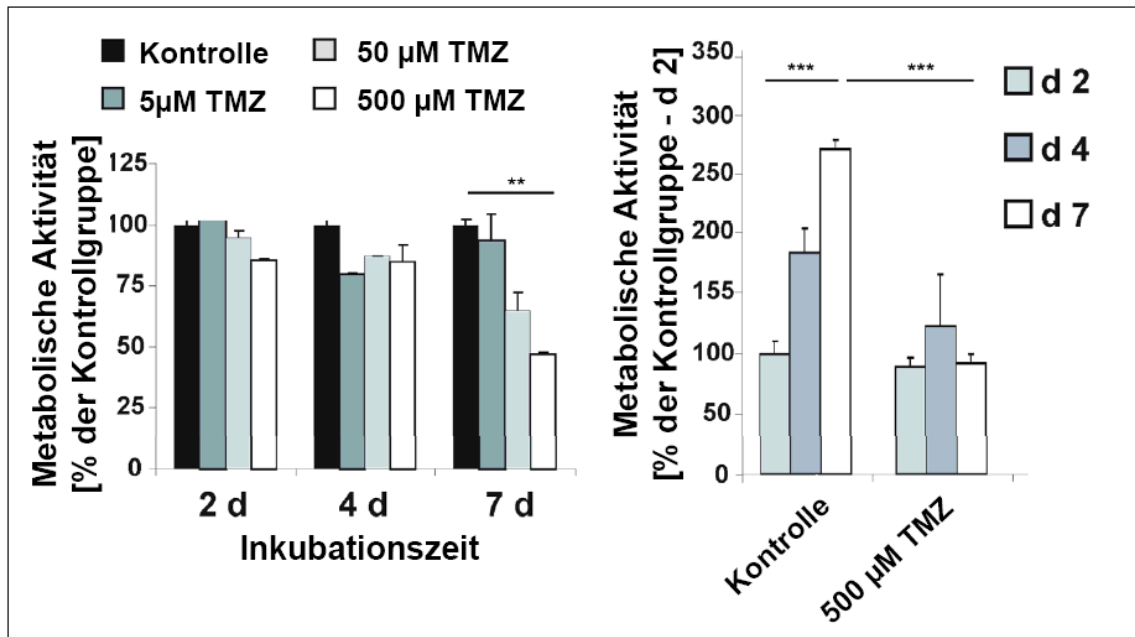


Abbildung 2: Ergebnisse der TSZ-Linie R11
 ** P < 0.01, *** P < 0.001, ANOVA gefolgt von Tukey-Kramer HSD Test
 Messung der metabolischen Aktivität mittels AlamarBlue-Assay nach 2, 4 und 7 d in ansteigenden TMZ-Konzentrationen. Die erhaltenen Werte zeigen die relative Aktivität gegenüber den unbehandelten Zellen nach 2, 4 und 7 d (links), bzw. nach 2 d (rechts).

Um eine eingeschränkte Proliferation von einem Rückgang der Zellanzahl unterscheiden zu können wurde die metabolische Aktivität der Tumorzellen nach 7 Tagen in Kultur in Temozolomid-haltigem Medium mit der der Kontrollgruppe nach 2 Tagen in unbehandeltem Stammzellmedium verglichen. Es zeigte sich auch nach weiteren 5 Tagen in Kultur mit 500 µmol/l Temozolomid weder ein Rückgang noch ein Anstieg der metabolischen Aktivität, spricht der lebenden Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass die Tumorzellen aufgehört haben zu proliferieren (Abbildung. 2 rechts). Anschließend wurde der Temozolomid-induzierte Zelltod mittels LDH, einem cytoplasmatischen Enzym welches bei sterbenden Zellen austritt, und CSFE, welches bei jeder Zellteilung gleich auf beide Tochterzellen aufgeteilt wird und ebenfalls bei sterbenden Zellen austritt, untersucht. Nach Inkubation über 7 Tage in maximaler Temozolomidkonzentration zeigte die LDH-Aktivität im Überstand lediglich einen diskreten Anstieg und konkordant dazu stieg auch die Anzahl der Zellen, die CSFE vollständig verloren hatten, nur von 29% auf 35%. Dies bedeutet, dass Temozolomid auch in hohen Dosen nur geringfügig den Zelltod der Tumorzellen herbeiführte (Abbildung 3).

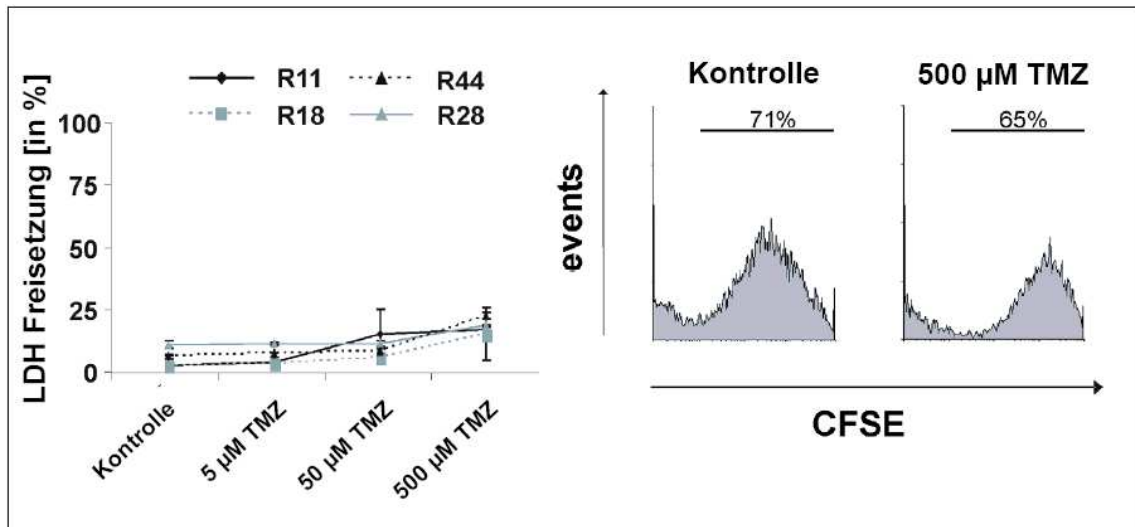


Abbildung 3: links: Ergebnisse der TSZ-Linien R11, R18 und R28 [alle Konzentrationen] $P > 0.05$, sowie R44 [Kontrolle vs. 500 µmol/l] $P < 0.05$
ANOVA gefolgt von Tukey-Kramer HSD Test
rechts: Ergebnisse der TSZ-Linie R11 nach 7 Tage in Kultur, Darstellung als Histogramm

Demgegenüber zeigten jedoch die Versuche mit CFSE-Färbung einen signifikanten Rückgang der Zellteilungen von 0.65 auf 0.16 pro Tag. In gleicher Weise lässt die verminderte Inkorporation von BrdU, welches in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, Rückschlüsse auf eine verminderte Proliferationsrate der mit Temozolomid behandelten Tumorstammzelllinien zu (Abbildung 4).

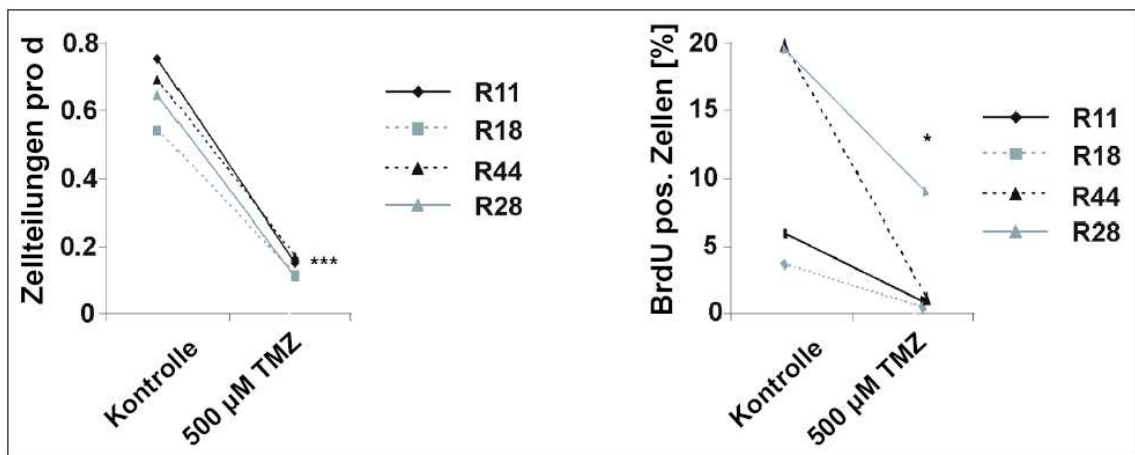


Abbildung 4: links: Ergebnisse der TSZ-Linie R11. Berechnung der Anzahl der Zellteilungen (Z_t) anhand Vergleich der mittleren Fluoreszenz der CFSE-gefärbten Zellen nach 2 und 7 d mittels folgender Gleichung $Z_t = [\log(F^{d2}) - \log(F^{d7})]/\log(2)$
rechts: Inkubation mit TMZ für 7 d, anschließend Gegenfärbung mit BrdU für 12 h; Bestimmung der Anzahl an Zellen die mindestens einen Zellzyklus beendet haben (BrdU+ Zellen in G_0 - G_1 Phase); * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, einseitiger Student's T-Test

In Abhängigkeit der jeweiligen Tumorstammzelllinien induzierte die Kultur in Temozolomid-haltigem Medium entweder einen G₂-M-Zellzyklusarrest oder einen Verlust des G₂-Peaks (Daten nicht aufgeführt). In allen behandelten Zelllinien, analog zu Ergebnissen früherer Publikationen [74], überschritt der Anteil der Zellen in der Sub-G₀-Phase, in welcher sich apoptotische, tote Zellen befinden, dabei nie 8% (Abbildung 5). Temozolomid induzierte somit nicht den Zelltod, verhinderte aber effizient die Proliferation von CD133⁺ Tumorstammzelllinien.

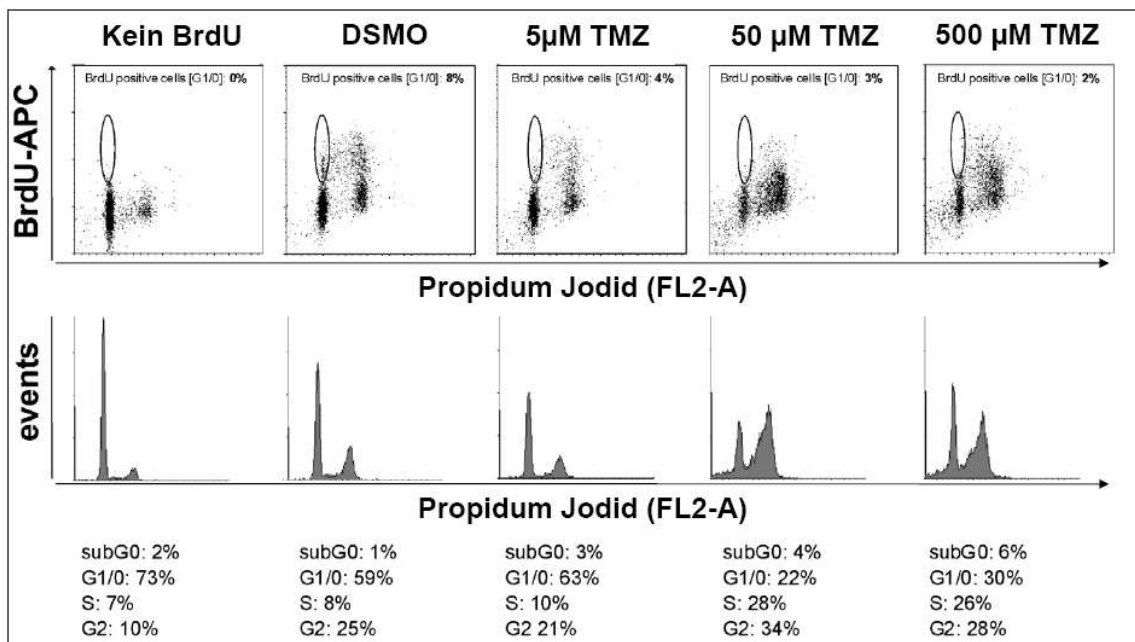


Abbildung 5: Ergebnisse der TSZ-Linie R11 nach 7 Tage in TMZ-Kultur und anschließend 12 h BrdUrd, Daten als *Dotplot* und Histogramm nach Doppelfärbung mit α-BrdUrd-Cy5 und PI

4.2 Temozolomid vermindert die Anzahl schnell proliferierender CD133⁺ Zellen in CD133⁺ TSZ-Linien

In CD133⁺ Tumorstammzelllinien unterhält, wie bereits mehrfach nachgewiesen, lediglich eine kleine Subpopulation an CD133⁺ Tumorstammzellen, nicht jedoch CD133⁻ Tumorzellen das Wachstum dieser Zelllinien [14, 16, 17, 75]. Daher wurden CD133⁺ Tumorstammzelllinien mit Temozolomid behandelt und die Auswirkungen dieser Behandlung auf jene Subpopulation untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien für jeweils 7 d mit Temozolomid in ansteigenden Dosen bis maximal 500 μmol/l inkubiert und mit 7-AAD angefärbt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie neben der Gesamtanzahl lebender Zellen auch der Anteil CD133⁺ Tumorstammzellen ermittelt.

Der Prozentsatz lebender Zellen sank unter maximaler Temozolomiddosis um ca. 8%, während hingegen der Anteil der CD133⁺ Tumorstammzellen um bis zu 80% abnahm (Abbildung 6, Daten nicht aufgeführt).

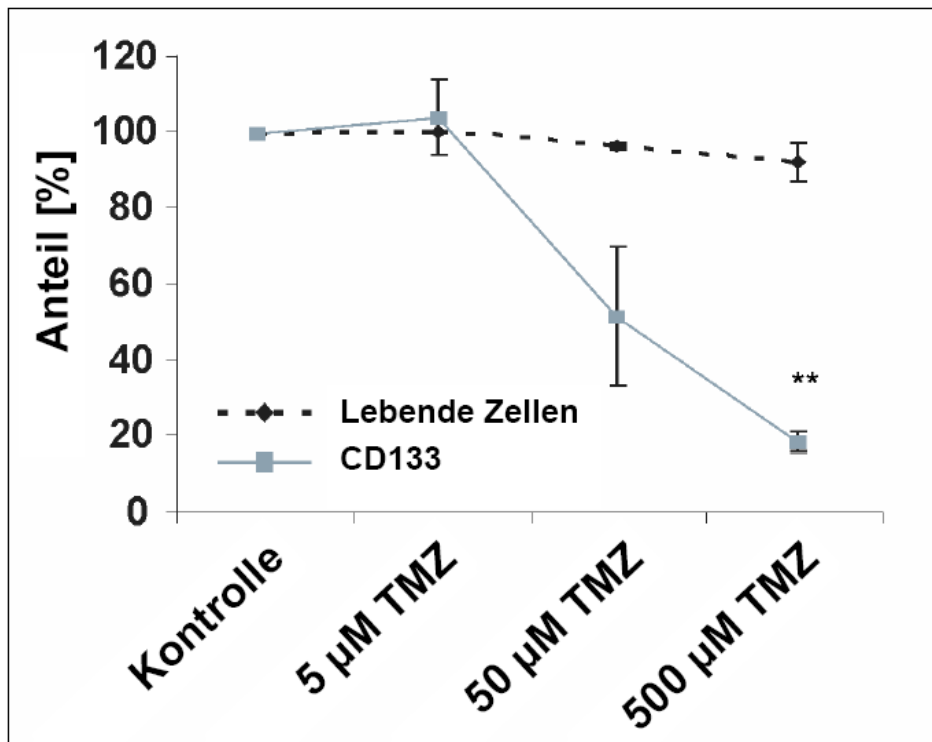


Abbildung 6: Ergebnisse der TSZ-Linie R11
 ** P<0,01, einseitiger Student's T Test. Die Daten ergeben sich aus dem MW dreifach, voneinander unabhängig durchgeführter Experimente mit R11 (SA als Balken gekennzeichnet)

Daraufhin wurde, um die Teilungsrate und das Absterben von CD133⁺ und CD133⁻ Tumorzellen genauer aufzuschlüsseln und die Ergebnisse des vorherigen Experimentes zu verifizieren, die Proliferationsfähigkeit mittels CSFE-Färbung beurteilt.

Nach Anreicherung CD133⁺ Tumorstammzellen mittels FACS wurden die Tumorzellen für mindestens 2 d, jedoch maximal 7 d in ansteigenden Temozolomiddosen inkubiert und anschließend mit CSFE und PE doppelgefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich eine deutliche, sowohl zeit- als auch dosisabhängige Abnahme der CD133⁺ Tumorstammzellen, wohingegen bei den CD133⁻ Tumorzellen keine wesentliche Abnahme zu verzeichnen war (Abbildung 7). Unerwarteter Weise zeigte diese Untersuchung jedoch dass CD133⁺ Tumorstammzellen schneller proliferieren als CD133⁻ Tumorzellen. Anhand der Histogramme ließ sich für die CD133⁺ Tumorstammzellen eine durchschnittliche Teilungsrate von 0,9/d ermitteln (dunkel gefärbtes Histog-

ramm), im Vergleich dazu teilten sich die $CD133^-$ Tumorzellen im Schnitt nur 0,3/d (weiß hinterlegtes Histogramm).

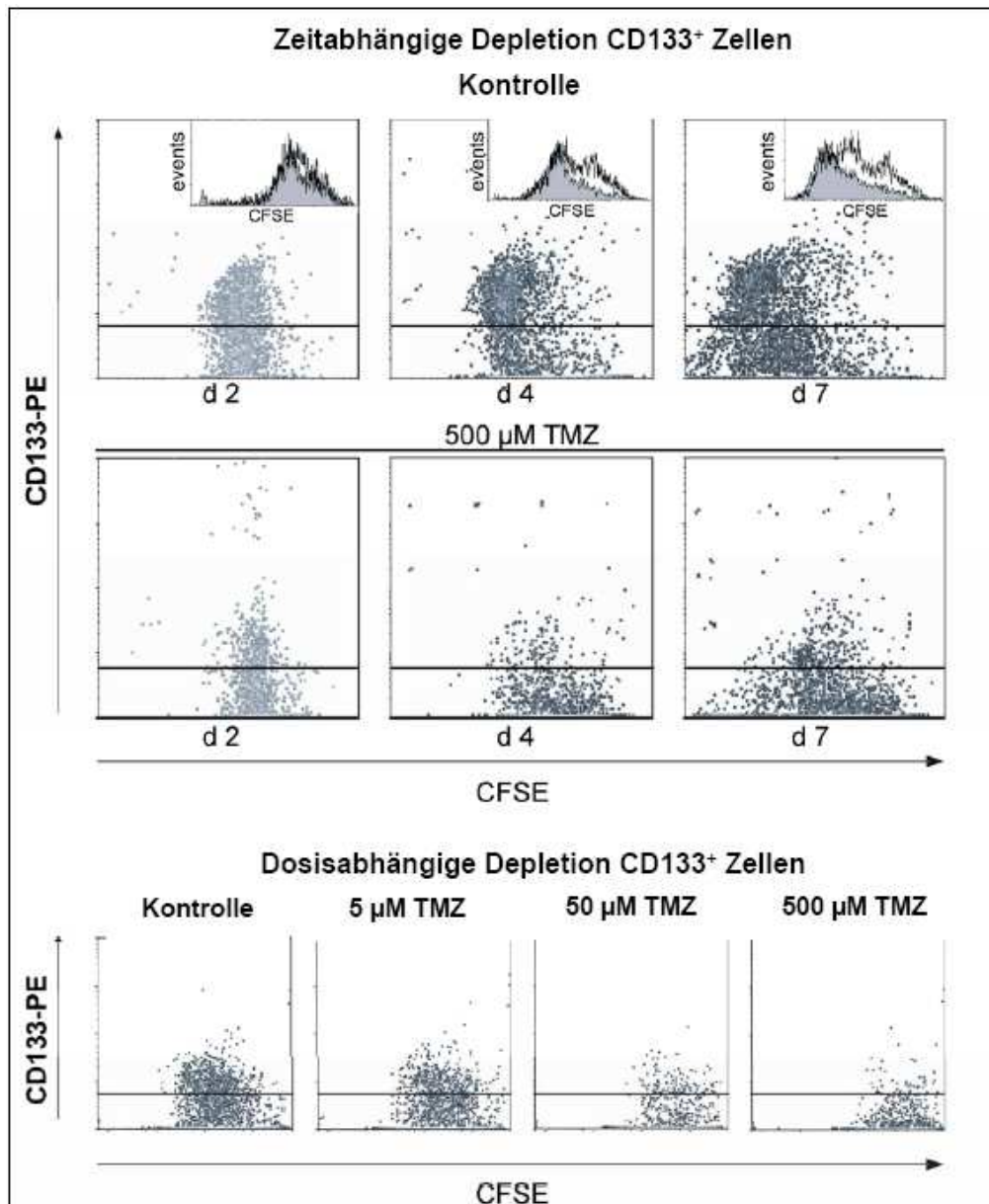


Abbildung 7: Analyse von jeweils 10000 Zellen der TSZ-Linie R11 im Durchflusszytometer und Darstellung der Ergebnisse als *Densityplot* und Histogramm.

4.3 Temozolomid eliminiert TSZ in $CD133^+$ TSZ-Linien

Wie bereits von Dirks et al. und Clement et al. beschrieben wurde stellt lediglich eine Subgruppe der $CD133^+$ Tumorzellen tatsächlich Tumorstammzellen dar [63, 76]. Allerdings war es technisch nicht möglich den Einfluss der Temozolomidbehandlung auf diese Subpopulation gesondert zu untersuchen, so dass alternativ dazu die Fähigkeit Tumorsphären zu bilden analysiert wurde, da nur

Tumorstammzellen in der Lage sind diese zu generieren [62, 77]. In den verwendeten Glioblastomzelllinien besaßen ca. 2-10% der CD133⁺ Tumorzellen das Potential zur Sphärenbildung [15], was sich mit den Ergebnissen anderer Autoren deckte [76]. Wir beobachteten, dass mit Temozolomid behandelte Tumorzellen dosisabhängig die Fähigkeit zur Klonogenität verlieren (Abbildung 8, links). Dieser Effekt stellte sich bei vergleichbaren Temozolomidkonzentrationen ein, bei denen auch die Anzahl CD133⁺ Tumorzellen abnahm (vgl. Abbildung 6).

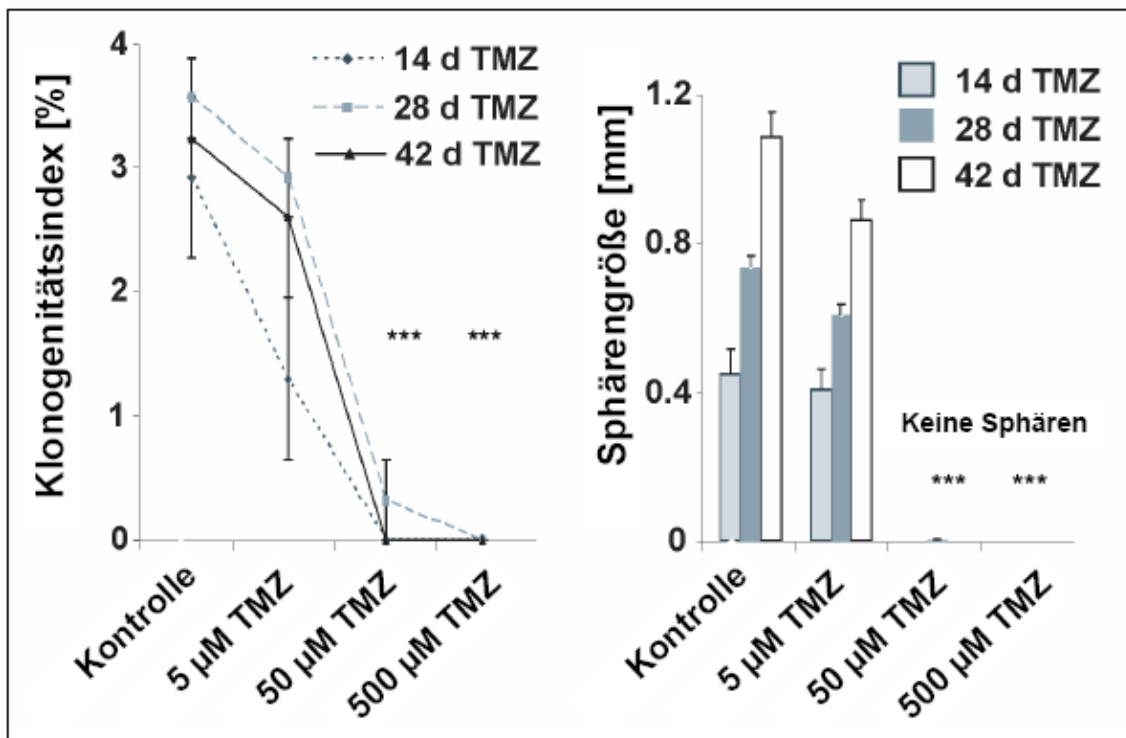


Abbildung 8: Klonogenitätsindex (Anzahl der Sphären pro 100 ausgesäte Zellen) und Sphärengröße (MW) ermittelt an R11

Temozolomid verminderte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle allerdings lediglich die Anzahl der Sphären, nicht jedoch die Größe der gebildeten Sphären (Abbildung 8, rechts). Dies lässt vermuten dass Temozolomid das Wachstum der Progenitorzellen und ausdifferenzierten Zellen, die sich aus den überlebenden Tumorstammzellen gebildet hatten, nicht beeinträchtigt. Da jedoch auch ein reversibler Zellzyklusarrest in gleicher Weise wie die eigentliche Abnahme von Tumorstammzellen die Ausbildung von Tumorsphären verhindert, wurde in einem weiteren Experiment der Versuchsaufbau dahingehend verändert. Die kontinuierliche Behandlung mit Temozolomid wurde durch eine Bolusgabe über 2, 4 und 7 d ersetzt und die Anzahl der gebildeten Sphären ebenfalls

nach 42 d ermittelt. Hierbei zeigte sich dass auch eine kurzzeitige Temozolomidinkubation über 2 d mit 50, bzw. 500 $\mu\text{mol/l}$ ausreichend war um die Sphärenbildung vollständig zu verhindern (Abbildung 9). Somit ließ sich nachweisen dass Temozolomid keinen Zellzyklusarrest verursacht sondern die Tumorstammzellen tatsächlich depletiert.

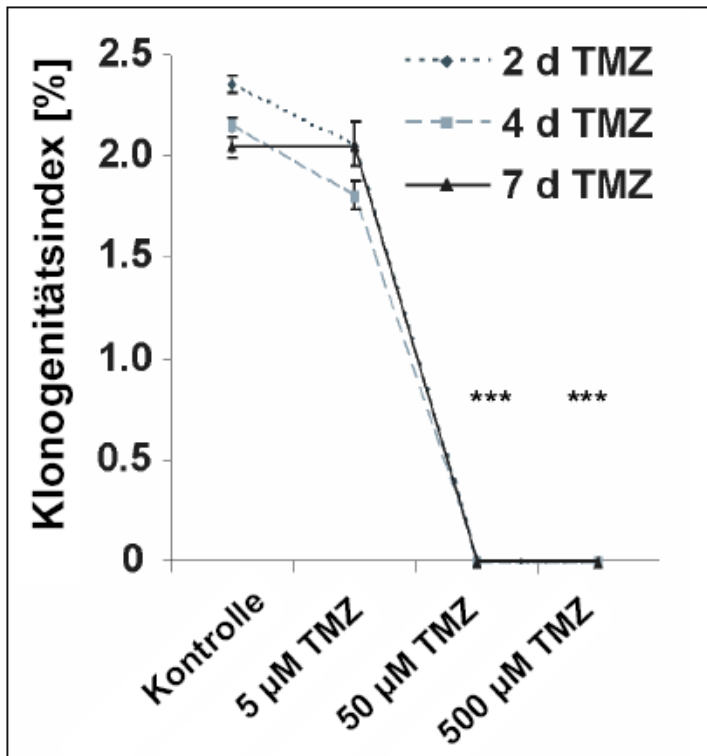


Abbildung 9: Ergebnisse der TSZ-Linie R11 Inkubation für 2, 4 und 7 d in den angegebenen Konzentrationen, anschließend Kultur in SZ-Medium für 42 d und Ermittlung der Sphärenanzahl.

4.4 Einfluss von Temozolomid auf das Differenzierungspotential CD133⁺ TSZ

Wie Beier et al. nachgewiesen haben, können die aus primären Glioblastomen gewonnenen Tumorstammzellen in alle drei neuronalen Zelllinien ausdifferenzieren [15, 68]. Um den Einfluss von Temozolomid auf das Differenzierungspotential der Tumorstammzellen zu untersuchen erfolgte eine immunzytochemische Analyse der behandelten und unbehandelten Zellen. Analog der vorher genannten Ergebnisse zeigt sich auch hier ein Rückgang der Tumorzellen, welche den Stammzellmarker Nestin exprimieren. Hingegen bleibt sowohl der Anteil der β -III-Tubulin⁺ (neuronale Zellreihe), als auch der Anteil GFAP⁺ Zellen (astrozytäre Zellreihe) und GalC⁺ Zellen (oligodendrogliale Zellreihe) weitestge-

hend stabil oder zeigte sogar, wie im Fall der GFAP⁺ Tumorzellen, eine relative Zunahme (Abbildung 10).

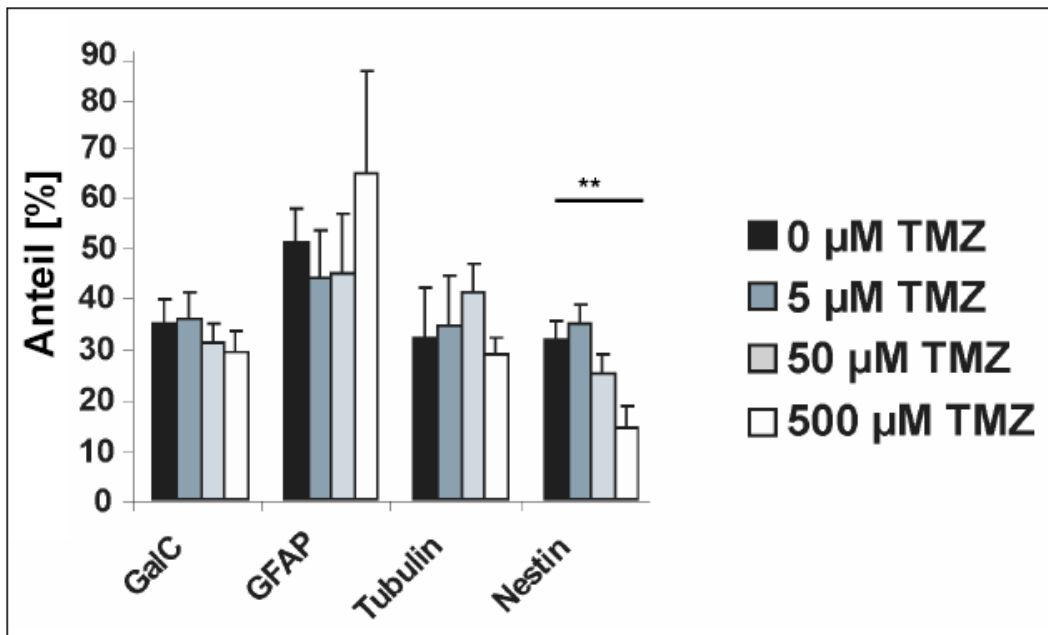


Abbildung 10: Ergebnisse der TSZ-Linie R11 nach Inkubation mit TMZ über 7d
 **, P < 0,01; ANOVA, gefolgt vom Tukey-Kramer HSD-Test

4.5 Temozolomid eliminiert TSZ in CD133⁻ TSZ-Linien

Neben den bekannten CD133⁺ Tumorstammzellen lassen sich auch CD133⁻ Tumorstammzellen in den verwendeten Glioblastom-Stammzelllinien nachweisen [15]. Diese unterscheiden sich von den CD133⁺ Tumorstammzellen anhand ihres molekularen Profils und ihres Wachstumsmusters. Die von CD133⁻ Tumorstammzellen generierten Zelllinien bildeten adhärent wachsende Sphären, die sich deutlich von den freischwimmenden neurosphärenähnlichen Kolonien der anderen Zelllinien unterscheiden. Analog der vorher untersuchten CD133⁺ Tumorstammzelllinien waren auch diese Zelltypen weitestgehend resistent gegenüber Temozolomid-induzierten Zelltod, jedoch wurde die Proliferationsrate signifikant vermindert (Abbildung 11, Daten nicht aufgeführt).

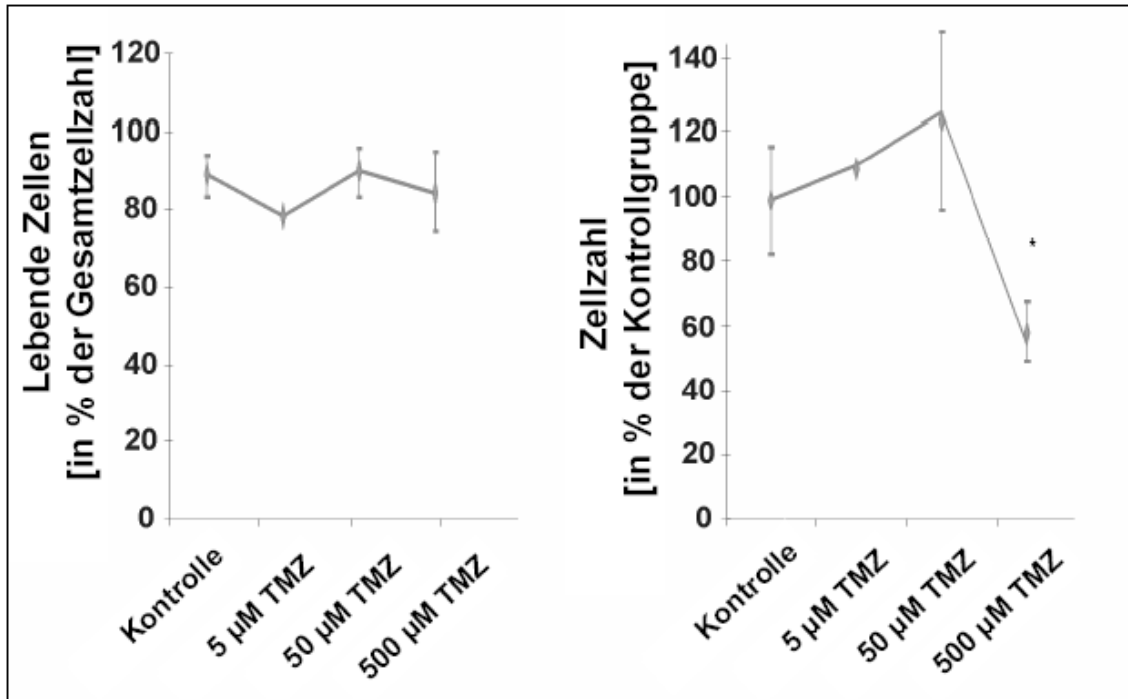


Abbildung 11: Ergebnisse der CD133⁻ TSZ-Linie R8, *, $P \leq 0.05$, einseitiger Student's T Test Inkubation für 2 Tage in ansteigenden TMZ-Dosen, der Anteil lebender Zellen wurde mittels des Trypanblau-Assay ermittelt.

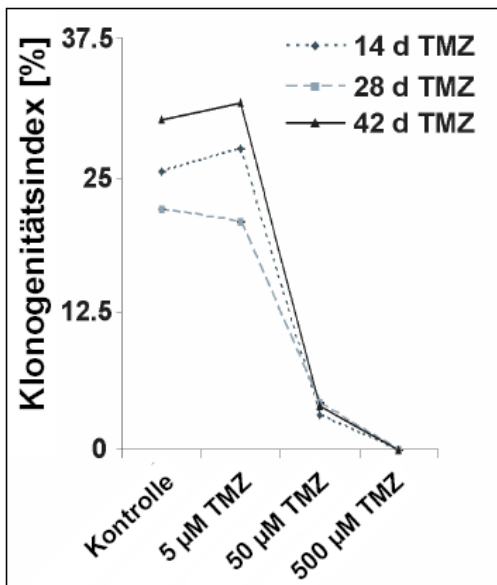


Abbildung 12: Ergebnisse der CD133⁻ TSZ-Linie R8. Bestimmung des Klonogenitätsindex (Anzahl der adhärenen Sphären pro 100 Zellen) nach 14, 28 und 42 d Inkubation mit TMZ wie angegeben.

Da bisher noch keine spezifischen Tumorstammzellmarker für CD133⁻ Tumorstammzelllinien verfügbar sind, wurde die Anzahl Tumorstammzellen indirekt anhand des Anteils klonogener Zellen ermittelt. Bereits nach Behandlung mit 50 µmol/l Temozolomid verlor ein Großteil der CD133⁻ Tumorstammzellen die Fähigkeit zu klonogenem Wachstum (Abbildung 12). Eine Inkubation mit 500

µmol/l Temozolomid über lediglich zwei Tage zeigte insgesamt keine akute Toxizität, jedoch konnte hierunter die Fähigkeit zur Klonogenität vollständig aufgehoben werden (Abbildung 11 und 13).

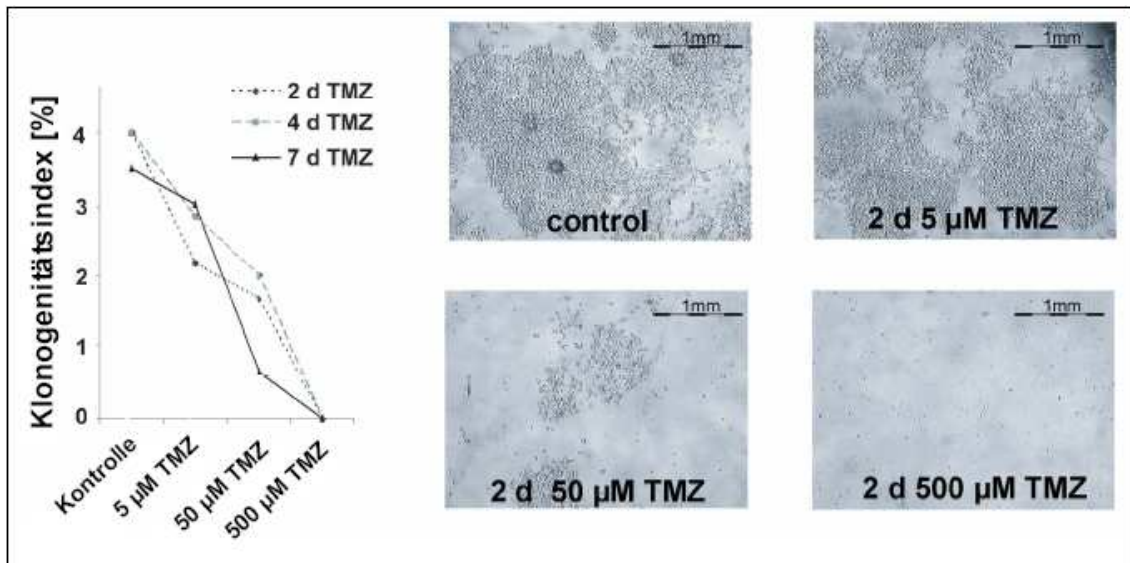


Abbildung 13: Ergebnisse der TSZ-Linie R8
Bestimmung des Klonogenitätsindex (Anzahl Sphären pro 100 Zellen) nach 2, 4 und 7 d Inkubation mit TMZ wie angegeben, gezeigt werden repräsentative Photographien.

Die reduzierte Klonogenität weist auf einen Untergang der Tumorstammzellen hin, was durch den Rückgang der Nestin-positiven Population bestätigt wird (Abbildung 14). Der Anteil weiter ausdifferenzierter Tumorzellen blieb hingegen im Wesentlichen stabil.

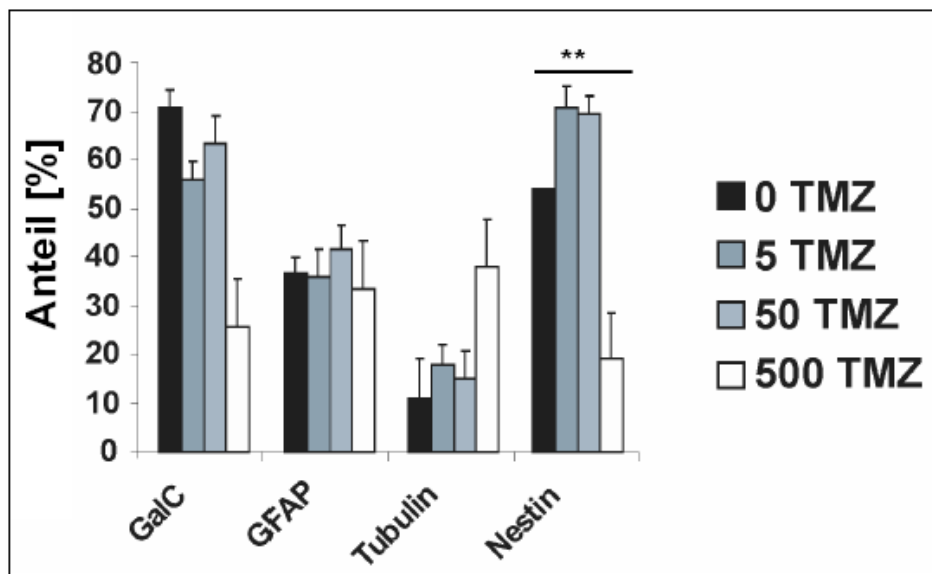


Abbildung 14: Ergebnisse der TSZ-Linie R8
**, P < 0.01, ANOVA, gefolgt vom Tukey-Kramer HSD-Test.
Immunhistochemie folgte nach 7 d Inkubation mit TMZ wie angegeben.

4.6 Temozolomid hebt die Tumorgenität von MGMT-negative CD133⁺ TSZ auf

Da die *in vivo* Tumorgenität den Goldstandard zur Untersuchung von Tumorstammzellen darstellt wurden die *in vitro* ermittelten Ergebnisse anschließend im Tiermodell überprüft. Dazu wurden sowohl MGMT-negative (R11) als auch MGMT-positive (R28) Tumorstammzellen für 2 Tage in ansteigenden Temozolomidosen inkubiert und anschließend jeweils 200.000 lebende Zellen T-Lymphozyten defiziente NMRI^(nu/nu) Nacktmäusen intrakraniell injiziert. Der Anteil lebender Zellen wurde mittels AlamarBlue-Assay ermittelt und erneut wurde deutlich, dass die derart behandelten Tumorzellen auch hohe Temozolomidosen fast vollständig überleben (Abbildung 15).

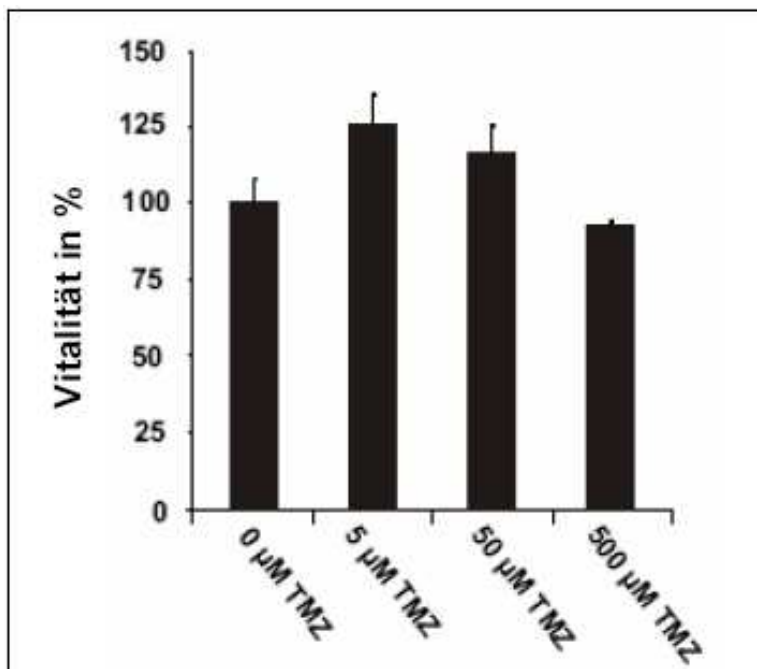


Abbildung 15: Ergebnisse der TSZ-Linie R11 und R28
Nach Inkubation je 1.000.000 TZ über 48 h mit TMZ wie angegeben erfolgte eine Vitalitätsprüfung mittels Trypanblaufärbung

Nach 12 Wochen erfolgte die Sektion der Versuchstiere und die histologische Aufarbeitung der erhaltenen Präparate. Hierbei zeigte sich unabhängig vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors eine deutliche, ebenfalls dosisabhängige Größenabnahme der am Injektionsort entstandenen tumorähnlichen Läsionen (Abbildung 16). Jedoch unterschieden sich diese entstandenen Läsionen abhängig von dem Methylierungsstatus in ihrem histologischen Phänotyp nach Vorbehandlung mit 50 und 500 µmol/l Temozolomid. Während die vorbehandelten MGMT-positiven Tumorstammzelllinien zellreiche, infiltrativ

wachsende Tumorformationen ausbildeten, erzeugten die vorbehandelten MGMT-negativen Tumorstammzelllinien lediglich zellarme, narbig imponierende Tumorkläsionen (Abbildung 17), in welchen sich nahezu keine proliferierenden Zellen nachweisen ließen (Abbildung 18). Diese Ergebnisse lassen vermuten dass die vorbehandelten MGMT-negativen Tumorzellen zwar *in vivo* überleben, jedoch ihre Klonogenität und damit ihre Tumor erzeugende Wirkung verloren haben. Diese eingeschränkte Tumorgenität konnte erneut nur bei Temozolomidkonzentrationen nachgewiesen werden, bei welcher einerseits CD133⁺ Tumorzellen abgetötet werden sowie andererseits auch ein Rückgang der Klonogenität *in vitro* beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen bestätigen somit die Hypothese, nach welcher Temozolomid im humanen Glioblastom vorzugsweise Tumorstammzellen abtötet.

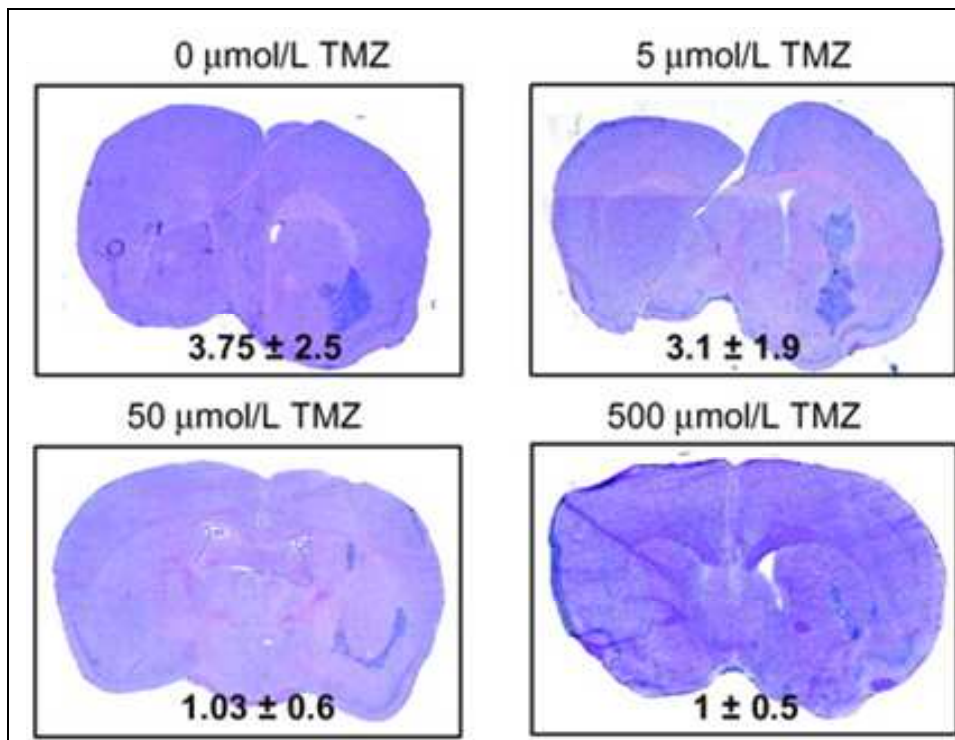


Abbildung 16: Nach 12 w erfolgte die Sektion mit Aufarbeitung des Präparates mittels eines Mikrotoms und HE Färbung. Angabe des histologischen Tumorkläsionenvolumens ± SEM.

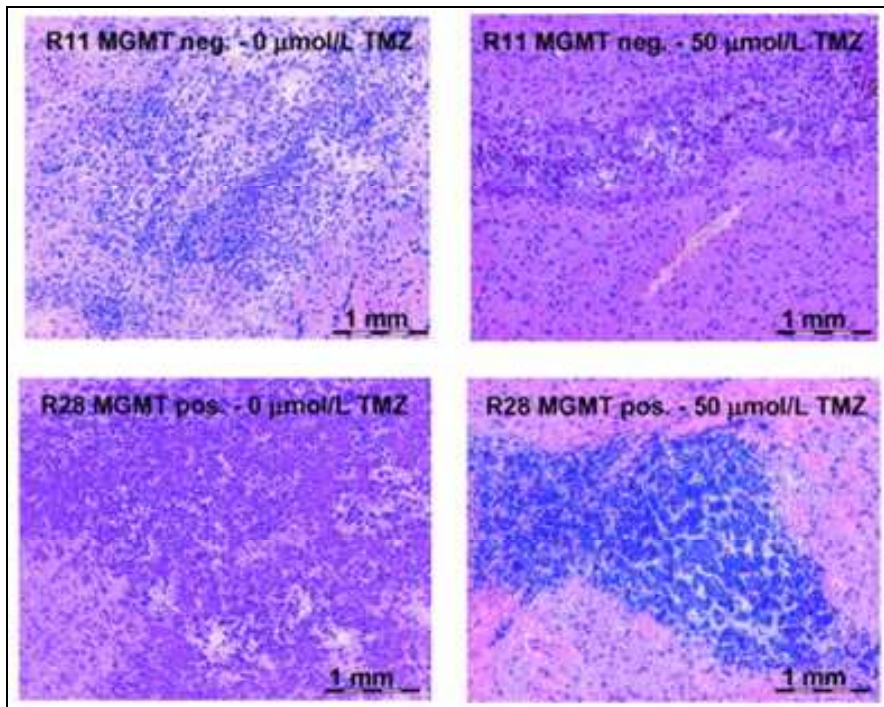


Abbildung 17: Repräsentative Photographien der entstandenen tumorähnlichen Läsionen nach Injektion von TMZ behandelten MGMT-pos. und MGMT-neg. TZ.

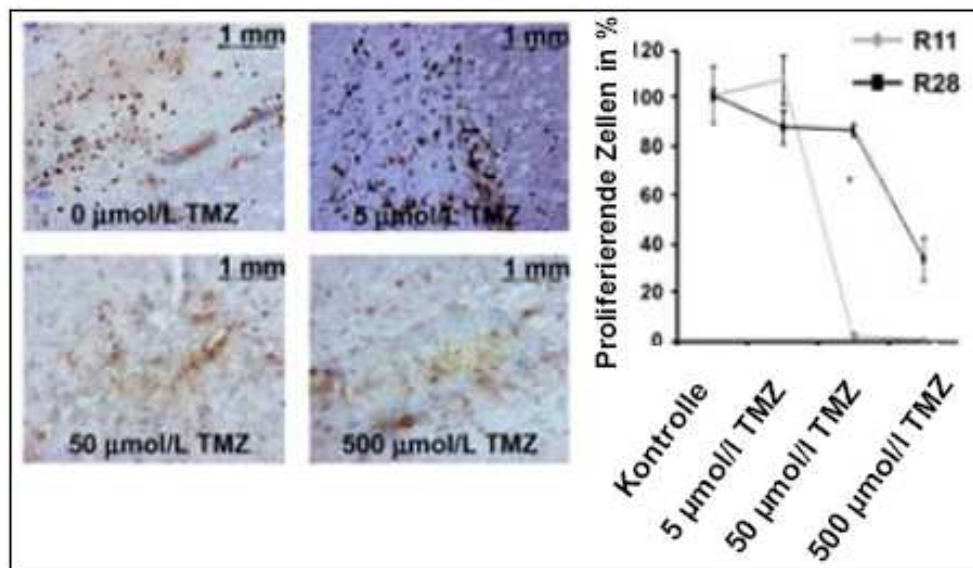


Abbildung 18: Färbung der nach Injektion von MGMT-positiven und MGMT-negativen TZ entstandenen tumorähnlichen Läsionen mit dem Proliferationsmarker Ki-67. Darstellung repräsentativer Photographien der TSZ-Linie R11. Vergleich des Anteils Ki-67-pos. Zellen bei TMZ-behandelten TZ und der Kontrollgruppe. *, $P < 0.05$; einseitiger Student's T-Test.

Zu Abbildung 16-18: Ergebnisse der TSZ-Linien R11 (MGMT-negativ) und R28 (MGMT-positiv). Je 1.000.000 TZ wurden über 48 h mit TMZ wie angegeben inkubiert, anschließend folgte die Ermittlung lebender Zellen mittels AlamarBlue-Assay. Intrakranielle Injektion von 200.000 lebenden Zellen in NMRI^(nu/nu) Mäuse (n=16; 2 Tiere pro Gruppe)

5. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen überraschenderweise, dass Temozolomid bevorzugt jene Glioblastomzellen abtötet, welche Stammzelleigenschaften besitzen, wohingegen sich die weiter ausdifferenzierten Tumorzellen weitestgehend resistent gegenüber diesem Zytostatika erweisen. Diese Tatsache steht jedoch in Widerspruch zu den Vorhersagen der Stammzellhypothese [8], welche ausgehend von einer vermehrten Expression von anti-apoptotischen Proteinen und ABC-Transportern durch das *multidrug-resistance-Gen* [21, 23, 24, 69] von einer erhöhte Resistenz von Tumorstammzellen gegenüber Zytostatika oder einer Strahlentherapie ausgegangen war.

Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Tatsache dass MGMT, welches zum großen Teil für die Temozolomidresistenz verantwortlich gemacht wird, in CD133⁻ Zellen überexprimiert wird, was diesen Tumorzellen im Gegensatz zu den CD133⁺ Tumorstammzellen einen relativen Schutz gegenüber einer Temozolomidtherapie bietet. Da jedoch Temozolomid in den Experimenten Tumorstammzellen in allen behandelten Tumorstammzelllinien, unabhängig von deren MGMT-Status, eliminierte, muss es weitere Gründe für diese Selektivität geben. In Anbetracht der Tatsache, dass Temozolomid eine Alkylierung an der O-6-Position von Guanin verursacht und somit seine Wirkung erst in der folgenden Replikationsphase entfaltet, bedeutet, dass in Tumorstammzellen ein intakter Zellzyklus und eine häufige Replikation, welche sich in der Tumorphiliferation widerspiegelt, vorhanden sein muss um Temozolomid einen Angriffspunkt zu bieten. Konkordant dazu stellte sich in meinen Versuchen heraus, dass der Anteil CD133⁺ Tumorzellen, unter welchen auch die eigentlichen Tumorstammzellen zu finden sind, eine höhere Proliferationsrate besitzt als der CD133⁻ Anteil (Abbildung 7). In Folge dessen muss die Frage gestellt werden ob das schnelle, unkontrollierte Wachstum der Glioblastome ein Ausdruck der hohen Proliferationsrate der Tumorstammzellen ist und nicht wie bisher angenommen, der Proliferation weiter ausdifferenzierter Tumorzellen zuzuordnen ist. Dies wiederum würde ebenfalls der Tumorstammzellhypothese widersprechen, welche davon ausgeht, dass sich die Stammzellen nur selten, dafür jedoch asymmetrisch teilen und zu einem Teil erneut langsam teilende Tumorstammzellen und zum anderen Teil schnell proliferierende Progenitorzellen generieren [5]. Da jedoch

davon ausgegangen wird, dass die eigentlichen Tumorstammzellen lediglich durch eine kleine Subpopulation der CD133⁺ Tumorzellen repräsentiert wird (<10%), welche durch derzeitige Antikörper nicht zweifelsfrei detektiert werden kann, kann diese Frage letztlich nur eindeutig geklärt werden sobald spezifische Tumorstammzellmarker entwickelt worden sind [18].

Des Weiteren zeigten unsere Versuche, dass Temozolomid vollständig die Klonogenität und die Tumor induzierende Wirkung sowohl in CD133⁺ Tumorzelllinien als auch in CD133⁻ Tumorzelllinien aufhebt. Dies lässt ebenfalls darauf schließen, dass Temozolomid selektiv Tumorstammzellen, welchen diese Fähigkeiten zugeschrieben wird, abtötet. Da diese lediglich eine kleine Subgruppe der CD133⁺ Tumorzellen darstellen wird dieser Effekt erst nach längerer Kulturdauer erkenntlich (Abbildung 2-5). Jedoch kann ohne suffiziente Tumorstammzellmarker letztlich nicht sicher ausgeschlossen werden, dass Temozolomid möglicherweise nur eine Differenzierung [78] oder Alterung [74] der Tumorstammzellen bewirkt anstelle der angenommenen Elimination.

Wie bereits vorher genannt widersprechen unsere Ergebnisse klar den bisherigen Berichten nach denen CD133⁺ Zellen resistenter gegenüber Chemotherapeutika seien als CD133⁻ Zellen [70, 79]. Dies könnte dadurch begründet sein dass die meisten Autoren nach Exposition von extrem hohen Temozolomiddosen (500-2000 µmol/l) [55, 63, 72, 74] metabolische Assays nach lediglich kurzer Kulturdauer durchführten und somit die beobachtete (noch) geringe metabolische Aktivität (~20%) unspezifisch sein könnte und nicht zwangsläufig einem Zelltod zuzuschreiben ist. Zudem wurde bei diesen Untersuchungen in der Zellkultur auf Mediumzusätze, welche bekanntermaßen die Stammzeleigenschaften von Tumorstammzelllinien aufrechterhalten können [15-17, 60-66], verzichtet und lediglich mit FCS versetztes Medium verwendet. Dieses jedoch induziert, wie von mehreren Autoren beschrieben, eine Vielzahl an genetischen und transkriptionellen Veränderungen, welche eine Weiterdifferenzierung, bzw. Ausdifferenzierung der Tumorstammzellen verursachen [60, 61, 64]. Anders als die oben genannten Studien verwendete Clement et al. stammzellerhaltende Kulturbedingungen [63] und untersuchte unter anderem ebenfalls die Wirkung von Temozolomid auf Glioblastom-Stammzelllinien. Analog zu unseren Ergebnissen induzierte Temozolomid auch in deren Untersuchungen in drei von vier behandelten Stammzelllinien einen Rückgang der Proliferationsrate um 50 –

80%, wohingegen sich der Anteil der Caspase-3-positiven Tumorzellen, welcher apoptotische Zellen darstellt, nur unwesentlich erhöhte. Dies bestätigt unsere Daten wonach Temozolomid bei insgesamt geringfügiger Gesamtzelltoxizität in hohem Ausmaß die Proliferation hemmt, von der angenommen wird, dass sie durch Tumorstammzellen bewirkt wird. Des Weiteren beschreiben diese Autoren langsame Erholungsraten der Zellkultur auch noch 20 Tage nach Behandlung mit Temozolomid, was sie ebenfalls einer Wirkung von Temozolomid auf Tumorstammzellen zuschreiben.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse erwiesen sich in meinen Versuchen die Tumorstammzellen vollständig resistent gegenüber Temozolomidkonzentrationen von 5 $\mu\text{mol/l}$, was der maximalen Temozolomidkonzentration entspricht, die im Liquor von Patienten gemessen wird [36]. Diese Erkenntnis deckt sich mit früheren Untersuchungen welche ebenfalls eine Resistenz von Glioblastomzelllinien gegenüber Temozolomid beschreiben [71]. Als Ursache hierfür wurde bisher eine Überexpression leistungsstarker Reparaturenzyme und ABC-Transporter in Glioblastomzellen angenommen, welche in der Lage sind applizierte Medikamente wie Zytostatika und Fluorochrome zu einem hohen Prozentsatz rasch aus der Zelle zu pumpen [24, 26, 80], bzw. die von ihnen verursachten DNS-Schäden zu beheben. Jedoch können Temozolomidkonzentrationen von 500 $\mu\text{mol/l}$, welche in meinen Untersuchungen *in vitro* notwendig waren um MGMT-positive Tumorstammzellen abzutöten, *in vivo* nicht erreicht werden, was das bisherige Scheitern einer Temozolomidtherapie in dieser Patientengruppe erklären würde. MGMT-negative Tumorstammzellen hingegen werden bereits bei einer Temozolomidkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ eliminiert. Diese Konzentration wird jedoch im Plasma von Patienten nach konventioneller Temozolomiddosierung erreicht und ist in Folge dessen auch in Regionen mit gestörter Blut-Hirn-Schranke zu erwarten. Da Glioblastome ebenfalls eine gestörte Blut-Hirn-Schranke aufweisen, stellt sich die Frage, warum auch MGMT-negative Glioblastome bisher nicht durch eine Temozolomidtherapie zu heilen sind. Denkbar wäre, dass Tumorstammzellen aufgrund der bekanntermaßen ausgeprägten Migrationskapazität von Glioblastomen in der Lage sind sich in benachbartem gesundem Hirngewebe anzusiedeln und sich somit, durch die in diesen Regionen intakte Blut-Hirn-Schranke, einer Temozolomidtherapie entziehen.

6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Temozolomid selektiv Tumorstammzellen im humanen Glioblastom eliminiert, sei es indem es den Zelltod herbei führt oder durch Alterung, Weiterdifferenzierung und Zellzyklusarrest, wohingegen die übrigen Tumorzellen überleben, jedoch eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit besitzen. Dementsprechend würde die Tumorformation unter Temozolomidtherapie nicht schrumpfen sondern auch über einen längeren Zeitraum im Wesentlichen größenkonstant bleiben, was den Beobachtungen in der klinischen Anwendung von Temozolomid entspricht. Diese Daten helfen nicht nur die Problematik von Tumorstammzellen im Glioblastom weiter zu ergründen sondern stellen auch bisherige Therapieschemata in Frage. Die Annahme dass jene Tumorstammzellen, welche auch nach oder während der Therapie einen Tumorprogress generieren, nicht mit ausreichend hohen Temozolomiddosen in Kontakt gekommen sind würde auch eine prolongierte, bzw. wiederholte Temozolomidgabe rechtfertigen. Dies ist im Einklang mit neueren Publikationen, welche in ihren Untersuchungen einer höher dosierten Temozolomidtherapie einen Wirkvorteil gegenüber dem konventionellen Therapieschematas bescheinigten [81-83]. Exemplarisch sei hier eine Fallstudie zu nennen in der nach einer akzidentiellen Überdosierung von Temozolomid ein Patient mit einem MGMT-positiven Glioblastom ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 22 Monaten sowie ein Überlebenszeit von insgesamt 24 Monaten erreichte, was annähernd einer Verdopplung der durchschnittlichen Überlebenszeiten von Patienten entspricht, die entsprechend der bisherigen Therapieansätze behandelt wurden [84]. So ist zu hoffen dass in Zukunft, insbesondere in MGMT-negativen Glioblastomen, durch optimierte Temozolomiddosierungen Tumorstammzellen vollständig eliminiert werden können und somit eine Heilung, bzw. eine Tumorkontrolle zu erreichen ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Schmitt, P.D.G., *Onkologie systematisch - Diagnostik und interdisziplinäre Therapie maligner Tumore*. 1. Auflage ed. 1999.
2. Salsbury, A.J., *The significance of the circulating cancer cell*. *Cancer Treat Rev*, 1975. **2**(1): p. 55-72.
3. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-96.
4. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. *J Natl Cancer Inst*, 1971. **46**(2): p. 411-22.
5. Galderisi, U., M. Cipollaro, and A. Giordano, *Stem cells and brain cancer*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(1): p. 5-11.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
7. Holland, E.C., et al., *Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 55-7.
8. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
9. Al-Hajj, M., et al., *Therapeutic implications of cancer stem cells*, in *Curr Opin Genet Dev*. 2004. p. 43-7.
10. Gage, F.H., *Neurogenesis in the adult brain*. *J Neurosci*, 2002. **22**(3): p. 612-3.
11. Sanai, N., et al., *Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration*. *Nature*, 2004. **427**(6976): p. 740-4.
12. Eriksson, P.S., *Neurogenesis and its implications for regeneration in the adult brain*. *J Rehabil Med*, 2003(41 Suppl): p. 17-9.
13. Nunes, M.C., et al., *Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain*. *Nat Med*, 2003. **9**(4): p. 439-47.

14. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
15. Beier, D., et al., *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4010-5.
16. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
17. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
18. Ligon, K.L., et al., *Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma*. *Neuron*, 2007. **53**(4): p. 503-17.
19. Williams, S.D., et al., *Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(23): p. 1435-40.
20. Bouwens, L. and E. De Blay, *Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas*. *J Histochem Cytochem*, 1996. **44**(9): p. 947-51.
21. Domen, J., K.L. Gandy, and I.L. Weissman, *Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation*. *Blood*, 1998. **91**(7): p. 2272-82.
22. Feuerhake, F., et al., *Immunohistochemical analysis of Bcl-2 and Bax expression in relation to cell turnover and epithelial differentiation markers in the non-lactating human mammary gland epithelium*. *Cell Tissue Res*, 2000. **299**(1): p. 47-58.
23. Peters, R., S. Leyvraz, and L. Perey, *Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors*. *Blood*, 1998. **92**(6): p. 2041-52.
24. Zhou, S., et al., *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*, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
25. Terskikh, A.V., et al., *From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(14): p. 7934-9.

26. Kondo, T., T. Setoguchi, and T. Taga, *Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 781-6.
27. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 48-58.
28. Brada, M., *NICE verdict on Temozolomide: where next?* Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 499-500.
29. Newlands, E.S., et al., *Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials*. Cancer Treat Rev, 1997. **23**(1): p. 35-61.
30. Stevens, M.F., et al., *Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine*. Cancer Res, 1987. **47**(22): p. 5846-52.
31. Payne, M.J., S.E. Pratap, and M.R. Middleton, *Temozolomide in the treatment of solid tumours: current results and rationale for dosing/scheduling*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **53**(3): p. 241-252.
32. Fachinformation, *Temodal*. Juni 2005: essexpharma.
33. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 440-50.
34. Hundt, M., et al., *Temozolomid in der Behandlung maligner Gliome*. Akt Neurol 2003, 2003. **30**: p. 184-187.
35. Stupp, R., et al., *Cerebrospinal fluid levels of temozolomide in malignant glioma patients (abstract 232)*. Proc Am Soc Clin Oncol, 20: 59a 2001.
36. Ostermann, S., et al., *Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3728-36.
37. Brandes, A.A., et al., *Temozolomide in glioblastoma multiforme of the elderly*. Tumori, 2002. **88**(1 Suppl 1): p. S69-70.
38. Middleton, M.R., et al., *Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 158-66.

39. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
40. Gerson, S.L., *Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2388-99.
41. Pegg, A.E., *Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6119-29.
42. Lee, S.M., et al., *Inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human peripheral blood mononuclear cells by temozolomide*. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 452-6.
43. Hegi, M.E., et al., *Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 1871-4.
44. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
45. Dolan, M.E., R.C. Moschel, and A.E. Pegg, *Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5368-72.
46. Middleton, M.R., et al., *O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: results of a phase II study*. Int J Cancer, 2000. **88**(3): p. 469-73.
47. Konduri, S.D., et al., *Blockade of MGMT expression by O6 benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6087-95.
48. Koch, D., et al., *Local intracerebral administration of O(6)-benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma*. J Neurooncol, 2007. **82**(1): p. 85-9.

49. Wedge, S.R., J.K. Porteous, and E.S. Newlands, *Effect of single and multiple administration of an O6-benzylguanine/temozolomide combination: an evaluation in a human melanoma xenograft model*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997. **40**(3): p. 266-72.
50. Quinn, J.A., et al., *Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(28): p. 7178-87.
51. Calabrese, C.R., et al., *Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2711-8.
52. Hickman, M.J. and L.D. Samson, *Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(19): p. 10764-9.
53. Stupp, R., et al., *Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(5): p. 1375-82.
54. Yung, W.K., et al., *Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse*. *Temodal Brain Tumor Group*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2762-71.
55. Wick, W., et al., *Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase*. *Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1915-9.
56. Wedge, S.R., et al., *In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation*. *Anticancer Drugs*, 1997. **8**(1): p. 92-7.
57. van Rijn, J., et al., *Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000. **47**(3): p. 779-84.
58. *Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society. Neuro-Oncology Working Group (NOA)-01 trial of ACNU/VM26 versus ACNU/Ara-C chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma*. *Clin Oncol*, 2003. **21**: p. 3276-3284.

59. Weller, M., *Standards and new developments in the chemotherapy of glioblastomas*. Dtsch Med Wochenschr, 2005. **130**(40): p. 2270-4.
60. Lee, J., et al., *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, 2006. **9**(5): p. 391-403.
61. Galli, R., et al., *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7011-21.
62. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
63. Clement, V., et al., *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity*. Curr Biol, 2007. **17**(2): p. 165-72.
64. Li, A., et al., *Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(1): p. 21-30.
65. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
66. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. Glia, 2002. **39**(3): p. 193-206.
67. Farrokh-Siar, L., et al., *Human fetal retinal pigment epithelium-induced cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(12): p. 3991-8.
68. Beier, D., et al., *CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors*. Brain Pathol, 2008. **18**(3): p. 370-7.
69. Salmaggi, A., et al., *Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype*. Glia, 2006. **54**(8): p. 850-60.
70. Liu, G., et al., *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 67.

71. Eramo, A., et al., *Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(7): p. 1238-41.
72. Hermisson, M., et al., *O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells*. *J Neurochem*, 2006. **96**(3): p. 766-76.
73. Brada, M., et al., *Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(6): p. 1022-30.
74. Hirose, Y., M.S. Berger, and R.O. Pieper, *p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 1957-63.
75. Beier, C.P., et al., *FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35*. *J Neurosci*, 2005. **25**(29): p. 6765-74.
76. Dirks, P.B., *Cancer: stem cells and brain tumours*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 687-8.
77. Fomchenko, E.I. and E.C. Holland, *Stem cells and brain cancer*. *Exp Cell Res*, 2005. **306**(2): p. 323-9.
78. Zucchetti, M., et al., *Temozolomide induced differentiation of K562 leukemia cells is not mediated by gene hypomethylation*. *Biochem Pharmacol*, 1989. **38**(13): p. 2069-75.
79. Kang, M.K. and S.K. Kang, *Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma*. *Stem Cells Dev*, 2007. **16**(5): p. 837-47.
80. Jackson, E.L., et al., *PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling*. *Neuron*, 2006. **51**(2): p. 187-99.
81. Chinot, O.L., et al., *Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(12): p. 1470-5.

82. Wick, W., et al., *One week on/one week off: a novel active regimen of temozolomide for recurrent glioblastoma*. Neurology, 2004. **62**(11): p. 2113-5.
83. Brandes, A.A., et al., *Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO)*. Br J Cancer, 2006. **95**(9): p. 1155-60.
84. Spence, A.M., et al., *Complications of a temozolomide overdose: a case report*. J Neurooncol, 2006. **80**(1): p. 57-61.

8. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ABC	<i>ATP binding cassette</i> (Membranprotein)
ACNU	Nimustin (Nitrosoharnstoff)
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
6-BG	O-6-Benzylguanin
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
ca	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD133	neuronaler Stammzellmarker (Oberflächenantigen)
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
CTC	<i>common toxicity criteria</i>
d	Tag/Tage
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)

GalC	Galaktozerebrosid C (<i>anti-human galactocerebroside C</i>)
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ki	Kiel (Ort des pathologischen Institutes, welches den Ki-67 Antikörper herstellt)
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MDR	<i>multidrug resistance</i> (Gruppe der ABC-Transporter)
MGMT	O-6-Methylguanin-Methyltransferase
min	Minute(n)
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde(n)
MW	Mittelwert
NCIC	<i>National Cancer Institute of Canada</i>
neg	negativ
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer

NOA	Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft der deutschen Krebsgesellschaft (<i>Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Jodid (<i>propidium iodide</i>)
pos	positiv
rec	recombinant
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleinacid</i>)
s	Sekunde(n)
SA	Standardabweichung
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SZ	Stammzellen
TMZ	Temozolomid (Temodal®)
TPBS	Tween PBS
TSZ	Tumorstammzellen
TZ	Tumorzellen
u.a.	unter anderem
Vgl	Vergleich
w	Woche(n)
WHO	World Health Organisation
Zt	Zellteilung(en)

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn für die Übernahme der Doktorvaterschaft danken.

Insbesondere gilt mein Dank Dr. med. Dagmar Beier und Dr. med. Christoph Beier, die mir jederzeit auch telefonisch mit Rat und Tat zur Seite standen, für die Idee dieser Arbeit, für die außergewöhnliche Unterstützung und interessierte, engagierte und geduldige Betreuung, für die zahlreichen Ratschläge, sowie Hilfestellungen und Korrekturen dieses Manuskripts, für die Durchführung der Tierversuche, kurzum ohne deren Hilfe und kompetente Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vor allem danke ich Anette Lohmeier für die fachlich außerordentlich kompetente Hilfe zu wirklich jeder Tageszeit, für die „psychologische“ Betreuung, wenn mir die Arbeit über den Kopf zu wachsen drohte, für die gute Organisation im Labor, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte und mich vom ersten Tag an mit großem Engagement unterstützte und mir darüber hinaus eine bemerkenswerte Freundin war.

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Brawanski danke ich für die Tumorproben, die mir für die Durchführung der Untersuchungen überlassen wurden.

Außerdem bedanke ich mich bei der Forschungsabteilung der Anästhesie, die mir für meine Untersuchungen den Durchflusszytometer zur Verfügung gestellt hat, sowie bei dem Laborpersonal des H3 für die gute Zusammenarbeit.

Schlussendlich gilt mein Dank meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mich dabei immer unterstützt haben.

