# *AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE PROF. DR. RALF LINKER* DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

### MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON "LEADER CELLS" BEIM GLIOBLASTOM

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades *der Medizin* 

der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

> vorgelegt von *Roman Kiesel*

> > 2021

# *AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE PROF. DR. RALF LINKER* DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

### MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON "LEADER CELLS" BEIM GLIOBLASTOM

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades *der Medizin* 

der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

> vorgelegt von *Roman Kiesel*

> > 2021

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig Prof. Dr. med. Peter Hau

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2021

# Gliederung

<u>1.</u>	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	6
1.1	DAS GLIOBLASTOM	7
1.2	TUMORHETEROGENITÄT	
1.3	BRAIN TUMOR STEM CELLS	
1.3.1	1 CANCER STEM CELLS	10
1.3.2	2 Brain Tumor Initiating Cells	12
1.4	TUMORMIGRATION	14
1.4.1	1 Prinzipien der Migration	15
1.4.2	2 Invasionsmodell	17
1.4.3	3 Organotypic Brain Slice Cultures	18
1.4.4	ZELLISOLATION MITTELS MIKROMANIPULATION ALS IN VITRO ZUGANG ZUR MIGRATION	19
1.5	Rolle von Tenascin C	20
1.6	ZIELE DIESER ARBEIT	21
<u>2</u> <u>N</u>	MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1	ZELLKULTUR	22
2.1.1	1 GENERELLE ZELLKULTUR	22
2.1.2	2 ZELLZÄHLUNG	23
2.2	PROBENGEWINNUNG	23
2.2.1	1 PROBENAUFARBEITUNG	23
2.2.2	2 ISOLATION VON EINZELZELLEN	24
2.3	PROBENANALYSE	25
2.3.1	1 CDNA LIBRARIES	25
2.3.2	2 MICROARRAY BASIERTE TRANSKRIPTOMANALYSE	27
2.3.3	3 STATISTISCHE AUSWERTUNG	29
2.3.4	OPTIMIERUNG DER BEDINGUNGEN FÜR DIE GENSPEZIFISCHE PCR	29
2.3.5	5 GENSPEZIFISCHE PCR ZUR DETEKTIERUNG AUSGEWÄHLTER TRANSKRIPTE IN PATIENTENPROBEN	
2.3.6	5 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	31
2.3.7	7 Agarose Gel Elektrophorese	32
2.4	ORGANOTYPIC BRAIN SLICES	32
2.4.1	1 ANFERTIGUNG	32

2.4.2	.2 Kultur	34
2.4.3	.3 IMPLANTATION	34
2.4.4	.4 MIGRATIONSVERFOLGUNG	34
2.4.	.5 ISOLATION VON EINZELZELLEN	34
2.5	Verwendete Materialien	
2.5.2	.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN	36
2.5.2	.2 CHEMIKALIEN	36
2.5.3	.3 GERÄTE	37
2.5.4	.4 Software	38
<u>3</u>	ERGEBNISSE	
3.1	Kollektivergebnisse	39
3.2	MICROARRAY ERGEBNISSE	42
3.2.2	.1 PATHWAY UND GENE ONTOLOGY ANALYSEN	42
3.2.2	.2 DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES	44
3.3	QPCR ERGEBNISSE FÜR POTENTIELLE SIGNATURGENE	47
3.4	QPCR ERGEBNISSE FÜR TENASCIN C	48
<u>4.</u>	DISKUSSION	5 <u>0</u>
<u>5.</u>	ZUSAMMENFASSUNG	60
<u>6.</u>	ANHANG	61
6.1.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	61
<u>7.</u>	LITERATURVERZEICHNIS	62
<u>8.</u>	ERKLÄRUNG	<u>.</u>
<u>9.</u>	DANKSAGUNG	
10.	LEBENSLAUF	

# Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolaevulansäure
Вр	Basenpaar
BTIC	Brain Tumor Initiating Cell
BTSC	Brain Tumor Stem Cell
CEN	Zentrale primäre Glioblastomzelle
CSC	Cancer Stem Cell
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epithelial Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
LEA	Leader Cell
Ns	nicht signifikant
NSC	Neuronal Stem Cell
OBSC	Organotypic Brain Slice Culture
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNA	Poly-T-Peptid Nukleinsäure
RIM	Randständige primäre Glioblastomzelle
STA	Stationary Cell
TAM	Tumor-associated Macrophage
TNC	Tenascin C
TGF	Transforming Growth Factor
tRNA	transfer-RNA
WHO	World Health Organization
WTA	Whole Transcriptome Amplification

Gliome sind die häufigsten primären Hirntumore, die zusammen über 80% aller malignen Hirntumore ausmachen (Ostrom et al., 2014). Sie können entweder aus Astrozyten, Oligodendrozyten oder einer Mischung aus diesen beiden Zelltypen hervorgehen, die zum Gliagewebe des Hirns gehören (Ostrom et al., 2016). Gliome werden nach dem *International Classification of Diseases-Oncology, Version 3*, (ICD-O-3), die größtenteils der zehnten Version der *International Classification of diseases, injuries and causes of death* (ICD-10) entspricht, und der *World Health Organization* (WHO) klassifiziert (Louis et al., 2016; Ostrom et al., 2014).

Die WHO klassifiziert die Gliome anhand der unterschiedlichen histologischen Merkmale in die Kategorien I-IV: Grad I (pilozytisches Astrozytom), Grad II (diffuses Astrozytom), Grad III (anaplastisches Astrozytom), Grad IV (Glioblastom) (Louis et al., 2007). Dabei werden Grad III und IV als maligne Neoplasien angesehen, die sich histologisch mit erhöhter mitotischer Aktivität und Zellkernatypien zeigen (Louis et al., 2007). Aufgrund einer hohen Infiltrationsrate in gesundes Gewebe haben diese malignen Tumore (Claes, Idema, & Wesseling, 2007) eine hohe Mortalität und lassen sich nicht eindeutig einer Ursprungszellpopulation zuordnen (Phillips et al., 2006). Zudem wird bei vielen niedergradigen Gliomen, etwa dem diffusen Astrozytom (WHO Grad II), eine Progression des Tumors zu höhergradigen Gliomen wie dem Glioblastom (Grad IV) beobachtet (Louis et al., 2007).

Seit 2016 werden in der WHO Klassifikation zusätzlich die molekularen Merkmale der Tumore, etwa die Isocitrat Dehydrogenase (IDH) Mutation (IDH wildtyp, IDH 1, IDH 2) berücksichtigt (Louis et al., 2016). Die IDH Mutationen treten in der Mehrheit aller Astrozytome und Oligodendrozytome auf (Yan et al., 2009) und deuten daher auf ein gemeinsames Mutationsereignis in der Entstehung dieser Tumore hin (Riemenschneider, Jeuken, Wesseling, & Reifenberger, 2010). Das Auftreten der Mutationen scheint gegenüber dem Wildtyp vorteilhaft zu sein (Louis et al., 2016). Zusätzlich wird beim Oligodendrogliom nach einer 1p/19q Codeletion klassifiziert, die ebenfalls unabhängig von dem Tumorgrad als positiver Prädiktionsfaktor angesehen werden kann (J. S. Smith et al., 2000). Die Aufnahme von ersten molekularen Markern in diese Klassifikationen sowie die kontinuierliche Entde-

ckung weiterer molekularer Eigenschaften der Gliome (Karsy, Guan, Cohen, Jensen, & Colman, 2017) unterstreichen weiterhin die Bedeutung der Genmutationen in Gliomen.

Um der dynamischen Entwicklung der molekularen Forschung an Tumoren des ZNS gerecht werden zu können, wurde mit cIMPACT-NOW ein Revisionssystem des bestehenden Klassifikationssystems eingeführt (Louis et al., 2019). So wurde mittels cIMPACT-NOW-Update unter anderem spezifiziert, dass Gliome mit IDH-wildtyp mittels weiterer molekularer Untersuchungen, etwa EGFR-Amplifikationen, genauer charakterisiert werden können (Louis et al., 2019). Einige histologisch als Grad III klassifizierte Gliome sind aufgrund molekularer Untersuchungen nun prognostisch als Grad IV anzusehen. Die hierin vorgebrachten Vorschläge sind als zukunftsweisend anzusehen und verdeutlichen die zunehmende Relevanz molekularer Charakteristika für die Klassifikation. Insbesondere durch die bekannte Progression der Tumore sowie die schlechte Prognose der höhergradigen Gliome ist weitere Forschung zu Genmutationen in Gliomen unbedingt nötig.

### **1.1 Das Glioblastom**

Glioblastome (GBM) als Subtyp der Gliome sind primäre Hirntumore mit einer sehr schlechten Prognose und wenigen therapeutischen Optionen. Mit einer Inzidenz von etwa 5 Fällen pro 100,000 Einwohner pro Jahr in den Vereinigten Staaten machen Glioblastome etwa 60-70% aller malignen Gliome aus (Wen & Kesari, 2008). Die mittlere Überlebensdauer liegt zwischen 12 und 18 Monaten bei einem durchschnittlichen Diagnosealter von 64 Jahren (Bush, Chang, & Berger, 2017) bei der aktuellen Standardtherapie bestehend aus chirurgischer Entfernung, Radiotherapie und der Gabe von Temozolomiden (Stupp et al., 2009). Weniger als 5% aller Patienten überleben 5 Jahre nach Diagnosestellung (Ostrom et al., 2014). Es gelingt mit den aktuellen Therapiemöglichkeiten nicht, diese Überlebenszeit signifikant zu verlängern (Chinot et al., 2014).

Glioblastome treten häufiger bei Männern als bei Frauen auf (1,5 fach) und doppelt so häufig bei Menschen mit weißer Hautfarbe. Neben genetischen Risikofaktoren wie etwa der Neurofibromatose ist als einziger Risikofaktor ionisierende Strahlung nachgewiesen (Ostrom, Gittleman, Stetson, Virk, & Barnholtz-Sloan, 2015). Ein Zusammenhang zu anderen Umwelteinflüsse wie Infektionen oder der Nutzung von Mobilfunkgeräten konnte nicht nachgewiesen werden (Butowski, 2015). Systemische Metastasen sind beim Glioblastom extrem selten, wobei bereits gezeigt werden konnte, dass, vergleichbar mit anderen Tumoren, auch beim Glioblastom Tumorzellen als *Circulating Tumor Cells* im peripheren Blut vorhanden sind (Sullivan et al., 2014), sich aber nicht ansiedeln.

In der Klassifikation der WHO werden Glioblastome in Grad IV und damit dem höchstmöglichen klassifiziert. Diese zeichnen sich histologisch durch Zellatypien und verstärkte mitotische Aktivität aus (Louis et al., 2007). Zusätzlich zeigen sich beim Grad IV Areale, die Gefäßproliferationen oder Nekrosen enthalten (Wen & Kesari, 2008). Glioblastome werden weiterhin in primäre (IDH-wildtyp) und sekundäre Glioblastome (IDH-mutiert) kategorisiert, abhängig davon ob sie *de novo* (primär) oder durch Progression aus dem anaplastischem Astrozytom entstanden sind (Kleihues & Ohgaki, 1999). Primäre Glioblastome treten typischerweise in älteren Patienten auf und sind durch EGFR Amplifikationen und Mutationen, Verlust der Heterogenität des Chromosoms 10q und Verlust von PTEN charakterisiert. Die deutlich selteneren sekundären Glioblastome sind hingegen vielmehr durch Mutationen des p53 Supressorgenes, Überexpression des PDGFR sowie Aberrationen im Retinoblastom (Rb) Pathway gekennzeichnet (Wen & Kesari, 2008). Generell scheint das IDH-mutierte Glioblastom eine etwas günstigere Prognose aufzuweisen, wobei es jedoch auch bei jüngeren Patienten auftritt (Louis et al., 2016).

Die Bedeutung des Glioblastoms wurde dadurch unterstrichen, dass es als erster Tumor überhaupt im *The Genomic Cancer Atlas* hinsichtlich Genexpressions, Methylierung, und DNA Kopienanzahl untersucht und analysiert wurde (McLendon et al., 2008). Mithilfe dieser Ergebnisse wurde eine weitere Unterteilung in 4 genomische Subtypen (proneural, neural, classical, und mesenchymal) vorgenommen (Verhaak et al., 2010).

Diese Subtypen entstehen durch verschiedene genetische Signalwege, haben eine eigene genetische Signatur und sprechen demzufolge unterschiedlich auf Therapien an. Es ist jedoch nicht nachvollzogen, ob sich diese Subtypen aus gemeinsamen Stammzellen entwickeln, zu denen sie nur noch distinkte Ähnlichkeiten aufweisen, oder ob sie verschiedene Entwicklungswege haben (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). Von besonderem Interesse ist der mesenchymale Subtyp, da dieser die schlechteste Prognose aller Subtypen aufweist (Sullivan et al., 2014). Die mesenchymale Signatur weist auf eine Transformation der Zellen von einem epithelialen zu mesenchymalem Phänotyp hin (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), welche mit Zellmigration assoziiert ist (Carro et al., 2010; Phillips et al., 2006). Genauere Untersuchungen dieser Signatur bzw. dieser Subgruppe erscheinen folglich besonders relevant.



Figur 1 Subtypen des GBMs und dazugehörige spezifische pathologische Veränderungen. Abbildung entnommen aus Van Meir et al. (2010)

### 1.2 Tumorheterogenität

Für Glioblastome ist die Tumorheterogenität bereits ausführlich beschrieben worden (Darmanis et al., 2017; Patel et al., 2014). Diese Heterogenität erschwert sowohl die Diagnose als auch die Behandlung des Tumors, da trotz des identischen histologischen Bildes verschiedene genetische Mutationen oder Expressionsmerkmale mit unterschiedlichem Outcome oder therapeutischem Ansprechen assoziiert sind. Dadurch steht diese Heterogenität in direktem Zusammenhang mit der Überlebensrate (Parsons et al., 2008; Patel et al., 2014): Ein besseres Verständnis der molekularen Heterogenität des GBMs könnte zu besseren therapeutischen Optionen führen.

Kürzlich konnte in verschiedenen Single-Cell RNA-Seq. Untersuchungen nachgewiesen werden, dass alle Tumore Zellen aus allen verschiedenen Subtypen gleichzeitig besitzen können (Darmanis et al., 2017; Patel et al., 2014). Auch wurde demonstriert, dass die einzelnen Subtypen sehr unterschiedlich auf Therapieversuche mit verschiedenen Medikamenten, unter anderem auch der aktuellen Standardtherapie Temozolomid, reagierten (Meyer et al., 2015). Diese Untersuchung verdeutlicht die Schwierigkeit der Glioblastomtherapie, insbesondere solange die gemeinsamen Ursprünge und Entwicklungswege und die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Subtypen nicht ge-klärt sind.

#### **1.3 Brain Tumor Stem Cells**

#### 1.3.1 Cancer Stem Cells

Aufgrund des bisherigen Therapieversagens beim GBM ist ein besseres Verständnis der frühen Entwicklung und Zellursprungs von besonderem Interesse. Bereits 2001 wurde als Erklärung für die Tumorheterogenität die Hypothese der sogenannten Cancer Stem Cells (CSCs) aufgestellt, die in einem heterogenen Tumor über unbegrenztes Teilungspotential verfügen (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). Vergleichbar mit normalen Stammzellen können sich diese CSCs in verschiedene, phänotypisch heterogene Zellen teilen, jedoch unterliegen die CSCs nicht mehr dem physiologischen Regulationsmechanismus. Als definierende Fähigkeiten der CSC werden die Selbsterneuerung, die Proliferation und der

Aufbau eines heterogenen Tumors genannt (Lathia, Mack, Mulkearns-Hubert, Valentim, & Rich, 2015).

Die CSC machen jedoch nur einen kleinen Anteil der Zellen innerhalb eines Tumors aus (Singh et al., 2003). Zwei Modelle können diese Beobachtungen erklären: Einerseits das stochastische Modell (a), welches eine Heterogenität der Tumorzellen postuliert, in der alle Zellen, - wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit - als Tumor-initiierende Zellen fungieren können. Im Gegensatz dazu geht das hierarchische Modell (b) davon aus, dass nur eine kleine Subpopulation als Tumorstammzellen fungiert, die exzessiv proliferieren und das Wachstum und Fortschreiten des Tumors sicherstellen (Vescovi, Galli, & Reynolds, 2006).



Figur 2 Modelle zur Entstehung von CSCs Graphische Visualisierung des stochastischen und hierarischen Modelles. Graphiken entnommen aus (Reya et al., 2001)

Unabhängig von der Entstehungweise der CSCs kann ein Tumor nicht mehr als starres Konstrukt betrachtet werden, sondern als heterogenes Gebilde, welches selbst evolutionären Prozessen unterworfen ist und dessen einzelne Populationsgruppen wiederum einander beeinflussen. (Tabassum & Polyak, 2015). Es wurde zudem gezeigt, dass sich differenziertere Tumorzellen im richtigen *Microenvironment* auch wieder dedifferenzieren können (Medema & Vermeulen, 2011). Dementsprechend wird von der Existenz einer CSC Nische ausgegangen, in welcher diese Zellen ihren undifferenzierten Status aufrechterhalten, sich gegensätzlich beeinflussen und aus dieser Nische vielleicht auch auf andere Populationsgruppen des Tumors Einfluss nehmen können (Medema, 2013). Grundlage dieser Vorstellung sind die spezialisierten Nischen für neurale Stammzellen (NSCs), welche in einem funktionsfähigen Organismus die Stammzellaktivität regulieren, um beispielsweise

Gewebereparaturen zu ermöglichen (Voog & Jones, 2010). Als Hauptnische im adulten Gehirn wird die Subventrikularzone beschrieben (Chen et al., 2012).

Die CSC-Nische besteht - ähnlich der NSC Nische - neben den CSC aus supportiven Zellen und spezialisierter Extrazellulärmatrix (EZM) (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014). Diese Bestandteile können sich ebenfalls wandeln um die Proliferation und den Erhalt von CSCs zu fördern (Tlsty & Coussens, 2006). Weiter produzieren die Zellen innerhalb dieser CSC-Nische Faktoren, welche die Angiogenese, und die Immunevasion des Tumors unterstützen (Plaks, Kong, & Werb, 2015). So fördern die CSCs durch die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Angiogenese (Bao, Wu, Sathornsumetee, et al., 2006), welche das Wachstum des Tumors ermöglicht. Wesentlicher Faktor für die Angiogenese ist die Hypoxie innerhalb des Tumors, die zur Expression von Hypoxieinduzierten Faktoren (HIFs) führt, welche durch TGF-Beta reguliert werden (Cabarcas, Mathews, & Farrar, 2011). Zusätzlich inhibiert die CSC-Nische die Immunreaktion auf den Tumor, beispielsweise durch die Suppression von natürlichen Killerzellen (NKs) im Tumorgewebe (Kitamura, Qian, & Pollard, 2015). Durch die Infiltration in gesundes Gewebe sind sie für Metastasen und Rezidivbildung besonders bedeutsam (Claes et al., 2007). Es wird angenommen, dass sie die Metastasenbildung häufig aus perivaskulären Nischen organisieren (Plaks et al., 2015).

### 1.3.2 Brain Tumor Initiating Cells

Bisherige Forschungsergebnisse rechtfertigen die weitere Untersuchung der Stammzellhypothese. Die sogenannten Brain Tumor Stem Cells (BTSCs) wurden als möglicher Ursprung der Gliome und insbesondere des Glioblastoms von mehreren Gruppen bereits beschrieben (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Die BTSCs sind als multipotente Zellpopulation definiert, die selbsterneuernde Fähigkeiten hat, und können bereits in geringer Anzahl einen heterogenen Tumor im immunsupprimierten Mausmodell generieren (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004).

BTSC können, ähnlich wie normale neuronale Stammzellen (NSCs), unter Zellkulturbedingungen angereichert werden, indem man Tumorgewebe in neurobasalem, serum-freiem Medium mit spezifischen Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) aussetzt (Vescovi et al., 2006). Weiter konnte bei diesen BTCS unter Zugabe von Fetal Bovine Serum (FBS) eine Differenzierung in Neuronale Zellen sowie in Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Singh et al., 2003). Dies stärkt die Vermutung, dass diese BTSCs als Ursprung der Tumorheterogenität zu sehen ist.

BTSCs wurden eine phänotypische Ähnlichkeit zur Neuralen Stammzellen (NSCs) nachgesagt, insbesondere aufgrund der Expression der Stammzellmarker CD133, Nestin, Musashi und Sox2 (Li, Wang, Eyler, Hjelmeland, & Rich, 2009). Dies stärkt die These, dass diese auch auf Genexpressionsebene den NSCs ähneln, im Gegensatz zu diesen allerdings nicht mehr einer entsprechenden engen Regulation unterliegen. Unter Therapieversuchen konnte ein Anstieg des CD133<sup>+</sup>-Anteils beobachtet werden, was eine Resistenzbildung in diesem Populationsanteil impliziert (Bao, Wu, McLendon, et al., 2006). Jedoch herrschen bisweilen in der Literatur aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse Kontroversen um die benannten BTSC-Marker (Medema, 2013). So wurden bei CD-133 negativen Zellen ebenfalls Stammzellcharakteristika, wie etwa die Selbsterneuerung und Möglichkeiten der Differenzierung dieser Zellen beobachtet, was auf eine CD-133 negative BTSC Subpopulation hindeutet (Beier et al., 2007). Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen konnte bis heute kein universeller BTSC-Marker gefunden werden (Dirkse et al., 2019). So bleibt es umstritten, ob sich Marker wie CD133 überhaupt für die Charakterisierung von BTSC eignen (Lathia et al., 2015).

Aufgrund der Unsicherheiten in der BTSC Identifikation werden häufig *patient-derived* Modelle für BTSC-Studien verwendet, da diese das beste Modell zur Untersuchung der Stammzelleigenschaften darstellen (Dirkse et al., 2019). Die in Kulturen angereicherten Zellen sollten dann besser als Brain Tumor Initiating Cells (BTICs) bezeichnet werden (Leidgens, 2015). BTICs sind als eine Subgruppe der BTCSs zu verstehen, die für das Tumorwachstum und die Progression eine Rolle spielen (Lathia et al., 2015). Sie gedeihen in serum-freien Bedingungen, sind klonal, erneuern sich selbst, sind in verschiedene Phänotypen differenzierbar und können einen heterogenen Tumor bilden (Dirkse et al., 2019; Galli et al., 2004).

BTICs gelten als das beste verfügbare Modell, um hochgradige Gliome *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen (Moeckel et al., 2014). Jedoch koexistieren *in vivo* BTICs mit normalen Tumorzellen, welche sich wiederum gegenseitig beeinflussen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Phänotyp der BTICs durch das *Microenvironment* der Zellen beeinflusst werden

kann (Calabrese et al., 2007; Li et al., 2009). Beim Glioblastom wurde dieser veränderte Einfluss des *Microenvironments* als Ursache für die verschiedenen Subgruppen postuliert (Borovski, Vermeulen, Sprick, & Medema, 2009). Auch können die epigenetische Einflüsse auf Tumorzellen *in vitro* nur ungenügend abgebildet werden (Riemenschneider et al., 2010), so dass weitere Forschung hier vonnöten ist.

Bezieht man die Tumorheterogenität in die Überlegungen ein, so ist es vorstellbar, dass eine Systemtherapie gegen den Tumor die entscheidenden Zellen mit Stammzellpotential nicht angreift, was zur Remission des Tumors führt (Singh et al., 2004). Experimente diesbezüglich bestätigten diese Vermutung, da zumindest Teile der BTICs Resistenzen gegen die "*Standard of Care*" Chemotherapie zeigen (Chen et al., 2012). Die BTICs können also als treibende Kraft hinter dem Wiederauftreten des GBMs verstanden werden. Besseres Verständnis der molekularen Substrukturen und der hier ebenfalls vorhandenen Heterogenität ist nötig, um bessere und persönlichere Therapieansätze entwickeln zu können.

### 1.4 Tumormigration

Anders als solide Tumore metastasiert das GBM selten in andere Organe. Die Malignität des GBMs besteht insbesondere in seinem infiltrativen Wachstum (Claes et al., 2007), welches der Hauptgrund für das Wiederauftreten des GBMs und das Scheitern aller Therapieansätze ist. Diese Infiltration tritt häufig 2-3cm vom ursprünglichen Tumor auf (Hou, Veeravagu, Hsu, & Tse, 2006), kann aber auch in weit entfernten Hirnarealen auftreten (Darmanis et al., 2017). Nach der primären Tumorresektion verbleiben BTICs in Zellnischen im gesunden Hirngewebe, wiederstehen Bestrahlungstherapien und sorgen so für eine Rezidivbildung (Leidgens, 2015).

Die Migrationsbewegung der BTICs beginnt sehr früh in der Tumorbildung (Louis, 2006), zu einem Zeitpunkt bei dem der Tumor meist noch nicht diagnostiziert ist und daher noch keine Behandlung erfolgt. Jedoch deutet das charakteristische Migrationsmuster vieler Gliome, etwa die Überquerung des Corpus Callosums zur Formung von sogenannten Schmetterlings-Läsionen (Louis, 2006), auf eine systematische Migration hin. Besseres Verständnis der Rolle der BTICs und der molekularen Ursachen dieser Migration könnte zur Entdeckung von spezifischen Inhibitoren beitragen und so das Wiederauftreten des GBMs begrenzen (Liu et al., 2018).

### 1.4.1 Prinzipien der Migration

Der Neuropathologe Hans Joachim Scherer stellte bereits 1938 fest, dass auswandernde Gliomazellen sich bevorzugt an bereits existierenden Hirnstrukturen orientieren (Review: Claes et al., 2007). Heutzutage als "Scherers Strukturen" bekannt, beinhalten diese das Hirngewebe, bereits existierende Blutgefäße, weiße Leitungsfasern sowie den Subarachnoidalraum (Review: G. Gritsenko, Ilina, & Friedl, 2012). Inwieweit diese Strukturen nur den Weg des geringsten Widerstandes darstellen, oder ob sie aktiv Gliomazellen anziehen, verbleibt Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen, da die migrierenden Zellen in diesen Strukturen schwer zugänglich sind. (G. Gritsenko et al., 2012).

Die Bewegung einer Zelle erfordert eine koordinierte Sequenz von Abläufen: Zuerst erfolgt die Adhäsion der frontopolaren Membran einer migrierenden Zelle an die EZM, anschließend eine Verankerung dort und schlussendlich Loslösung am zurückliegenden Ende (Ridley et al., 2003). Die benötigte Kontraktionskraft gewinnt die Zelle aus Aktin-Myosin Komplexen, wobei Myosin II besonders bedeutsam für die Migration durch enge Räume im Hirnparenchym ist (Beadle et al., 2008). Im Zuge dieser Migration ist auch die Umwandlung der Membran der invadierenden Gliomazelle in eine elongierte, spindelförmige Form elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden (Soroceanu, Manning, & Sontheimer, 1999).

Die Adhäsion und Verankerung einer Zelle an der EZM wird durch Zell-Zell und Zell-Matrix Proteine, etwa Integrine oder Cadherine, ermöglicht (Demuth & Berens, 2004). Die Integrine als Transmembranrezeptoren ermöglichen Zellen, ihre Umgebung wahrzunehmen und ihr Verhalten dementsprechend anzupassen (Wolfenson, Lavelin, & Geiger, 2013). Integrine sind Heterodimere bestehend aus einer  $\alpha$ -Untereinheit sowie einer  $\beta$ -Untereinheit, wobei die vermehrte Expression der  $\beta$ 1 Untereinheit mit einem erhöhten Invasionspotential der Gliomazellen assoziiert ist (Kwiatkowska & Symons, 2013). Eine generelle Hemmung der Integrin-Adhäsion konnte *in vivo* allerdings keine Vorteile in Patienten zeigen (Eisele et al., 2014).

Zusätzlich die Gliazelle verschiedene Proteasen, sezerniert etwa aus der Matrixmetalloprotein (MMP) Gruppe, die die Loslösung von der EZM ermöglichen (Cuddapah, Robel, Watkins, & Sontheimer, 2014). Zudem dienen die Proteasen auch zur Lockerung der dichten EZM-Umgebung. Für diesen Zweck rekrutiert die Gliomazelle auch Microglia, Astrozyten und endotheliale Zellen, die dann ebenfalls Proteasen sezernieren (Schiffer, Annovazzi, Casalone, Corona, & Mellai, 2018). Die kombinierte Aktivität dieser Proteasen modelliert die EZM, um die nachfolgende Invasion der Zellen zu ermöglichen, und reguliert gleichzeitig die Aktivität der dafür benötigten Wachstumsfaktoren (Kwiatkowska & Symons, 2013). Eine Inhibierung der MMP hat ebenfalls noch keine klinischen Erfolge erzielen können (Cuddapah et al., 2014). Vor diesem Hintergrund scheint ein grundsätzlicheres Verständnis der Migration nötig.

Für die Ausbreitung und Invasion eines Tumors ist die Umwandlung der Zelle von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (EMT) von besonderer Bedeutung. Nur mittels EMT gelingt es einer Zelle, sich von dem primären Tumor zu lösen, welches EMT zu einem relevanten Mechanismus in der Invasion von Gliomen macht (Carro et al., 2010). Generell ist die EMT insbesondere in der Embryogenese und in der Wundheilung ein unverzichtbarer Prozess (Kalluri, 2009), jedoch wird vermutet, dass auswandernde Tumorzellen diese ursprünglich embryonalen Genprogramme zur Invasion zweckentfremden (Darmanis et al., 2017). Die Tatsache, dass EMT insbesondere in GBM Zellen vom mesenchymalen Typ induziert wird, welcher die schlechteste Prognose aufweist, verdeutlicht die Bedeutung dieses Prozesses. EMT kann in diesen Zellen induziert werden um die Invasion in das umgebende Gewebe einzuleiten, was zum Streuen des Tumors führt, jedoch wurde ebenfalls gezeigt, dass so transformierte Zellen in entsprechenden Nischen auch wieder zurückkonvertieren können (Claes et al., 2007).

Zudem gibt es verschiedene EMT-Programme, die wiederum verschiedene Formen der Migration nach sich ziehen (Pearson, 2019). So wurde beispielweise die Migration multipler einzelner Krebszellen entlang EZM Fasern hin zu Blutgefäßen beschrieben (Condeelis & Segall, 2003). Weiter gibt es kollektive Migrationsformen, bei welcher Zellen kohäsive Kontakte unterhalten und ihre intrazellulären Signale untereinander abstimmen (Friedl & Gilmour, 2009). Beim GBM gibt es durch die Existenz von *Tumor Microtubes* oder Synapsen Hinweise auf eine Kommunikationsstruktur (Osswald et al., 2015; Venkataramani et al., 2019), jedoch können sich die invadierenden Zellen sowohl fingerförmig oder diffus angeordnet präsentieren (Silver & Lathia, 2018). Die Mechanismen hinter der Migration

sind für Gliomazellen noch nicht verstanden (Leidgens, 2015), sodass hier weitere Untersuchungen angezeigt sind.

Neuere Untersuchung belegen, dass sich das Genprodukt der migrierenden Zellen, von denen im Tumorkern unterscheidet. So konnte gezeigt werden, dass infiltrierende Zellen im Gegensatz zum Tumorkern Gene für die Adaption an eine hypoxische Situation herunterregulieren (Darmanis et al., 2017). Es ist davon auszugehen, dass weitere Unterschiede in den Genprodukten zwischen migrierenden und nicht-migrierenden Zellen zu finden sind, die möglicherweise neue therapeutische Interventionen eröffnen.

#### 1.4.2 Invasionsmodell

Viele Modelle der Migration beim Glioblastom geben die Situation und das *Microenvironment in vivo* nicht detailgetreu wieder (Valster et al., 2005). So werden Standard 2D *in vitro* Assays auf Plastik oder Glasoberflächen durchgeführt. Im Gegensatz dazu berücksichtigen die 3D-Assays bereits die Dreidimensionalität des Gewebes, jedoch können Zellen auch hier nur mit einer der EZM nachempfunden Matrix interagieren. Zusätzlich bildet die Umgebung in einem 3D-Assay häufig nur unbefriedigend das Gehirn-EZM nach, da Bestandteile wie Laminin, Proteoglykane oder Hyaluronsäure fehlen (Lau, Cua, Keough, Haylock-Jacobs, & Yong, 2013). Diese Systeme können somit zudem nur ungenügend das *Microenvironment* simulieren und die Zellnischen schlecht abbilden.

Tierversuche können realitätsnahe invasive Muster von GBM Zellen initiieren. Dazu werden Gliomazellen in immundefiziente Mäuse implantiert, was Tumore mit histologische Merkmalen ähnlich denen menschlicher GBM Patienten hervorruft (Beier et al., 2008). Der Aspekt, dass Tumor assoziierte Makrophagen (TAMs) für das Tumorwachstum eine bedeutende Rolle spielen (Pyonteck et al., 2013) und die generelle Reaktion des Immunsystems auf eine Gliombildung wird durch diesen Ansatz jedoch vernachlässigt. Zudem zeigte Galli, dass Zellen in Kulturen bereits vor der Implantation ihre invasiven Eigenschaften verändern (Galli et al., 2004). Weiter ist bei diesem *in vivo* Ansatz kein fortlaufendes Monitoring der Invasion möglich.

### 1.4.3 Organotypic Brain Slice Cultures

Das Modell der Organotypic Brain Slice Cultures (OBSCs) kann dazu beitragen, einige der geschilderten Probleme zu überwinden: Im Vergleich zu anderen Kulturbedingungen bilden die OBSCs, welche aus Hirnschnitten von Ratten gewonnen werden, am ehesten die *in vivo* Situation ab (Gogolla, Galimberti, DePaola, & Caroni, 2006; Humpel, 2015). Zudem sind Strukturen wie Blutgefäße vorhanden, deren Einfluss auf das Invasionsverhalten somit geprüft werden kann. Weiter kann im Modell der OBSCs das Invasionsverhalten der Zellen über das komplette Experiment hinweg beobachtet werden und eröffnet gleichzeitig die Möglichkeit der therapeutischen Intervention (Gogolla et al., 2006). Zusätzlich wird durch die Nutzung von OBSCs die Anzahl an benötigten Experimenten an Tieren deutlich reduziert (Humpel, 2015).

Die OBSCs sind bereits in vergangen Experimenten dazu genutzt worden, das Migrationsverhalten von Glioblastomen zu beschreiben. So konnte Leidgens zeigen, dass sich in OBSCs implantierte mesenchymale BTICs in drei verschiedene Subpopulationen, die *Stationary Cells, Follower Cells* und *Leader Cells* aufteilen (Leidgens, 2015). Letztere scheinen aufgrund ihrer Initiierung des invasiven Verhaltens von besonderer Bedeutung zu sein (Leidgens, 2015).



#### Figur 3 Formierung verschiedener Subpopulationen der U87 GBM Zelllinie nach Implantation in OBSCs.

Die spindelförmige, invasive Population der *Leader Cells* unterscheidet sich morphologisch deutlich von der runden, nicht invasiven Subpopulation der *Stationary Cells*. Abbildung entnommen aus Leidgens, 2015

#### 1.4.4 Zellisolation mittels Mikromanipulation als in vitro Zugang zur Migration

Gleichzeitig bleibt auch das OBSC-Modell nur ein Abbild der tatsächlichen Situation, weswegen eine Aufteilung in verschiedene Zellarten in der *in vivo* Situation nicht vorausgesetzt werden kann. Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist daher die bessere Charakterisierung von BTICs aus der invasiven Region des Glioblastoms, welches führend für die Rezidivbildung beim Glioblastom ist. Die invasive Region ist charakterisiert als der Bereich, welcher intraoperativ nach Gabe von 5-Aminolaevulinsäure (5-Ala) (GliolanTM) fluoresziert, und über den mittels MRT-Bildgebung erkennbaren ebenfalls fluoreszierenden Tumorrand hinausgeht (S. J. Smith et al., 2017). Die unvollständige Resektion dieser invasiven Region ermöglicht den dort vorhandenen BTICs, eine führende Rolle bei der Rezidivbildung einzunehmen. Für die Isolierung von BTICs bietet sich die Zellisolation mittels Mikromanipulation an, da diese Methode die Gewinnung von Einzelzellen unter mikroskopischer Kontrolle ermöglicht (Gross et al., 2015).

### 1.5 Rolle von Tenascin C

Tenascin C ist ein hexameres extrazelluläres Glykoprotein, welches aus 4 Subeinheiten besteht: Einer cysteinreichen Untereinheit am Amino-terminus, einer Domäne aus Epidermal-Growth-Factor-like *repeats*, einer Einheit von Fibronectin type III *repeats* sowie einem fibrinogenen, kugelförmigen C-Terminus.(Xia et al., 2016).

Tenascin C ist in verschiedenen adulten Gewebeformen präsent (Leins et al., 2003) und reguliert dabei Zell-Zell sowie Zell-Matrix Kontakte. Hochreguliert ist es insbesondere während der Embryogenese sowie unter pathologischen Umständen, wie etwa während der Wundheilung oder in Tumoren (Midwood & Orend, 2009). Aufgrund seiner multifunktionellen Rolle und seiner Diversität an Bindungspartnern kann es sowohl auf inflammatorische als auch auf fibrotische Prozesse Einfluss nehmen (Midwood, Hussenet, Langlois, & Orend, 2011).

In der Hirnentwicklung wird TNC von radialen Gliazellen exprimiert, die unter anderem für die Expansion und Faltung des Cortexes verantwortlich sind. Im Verlauf der Entwicklung verbleibt ein Teil dieser Zellen in der Subventrikularzone, welche als NSC- Nische des adulten Hirns angesehen wird (Chen et al., 2012). Für diese dann als *Radial Glia Cells* Typ B bezeichneten Zellen konnte ebenfalls eine TNC-Expression nachgewiesen werden, sodass TNC als Bestandteil der NSC Nische verstanden wird (Reinhard, Brösicke, Theocharidis, & Faissner, 2016).

Ebenso wurde für TNC ein erhebliches tumorigenes Potential beschrieben. So korreliert die TNC Expression mit dem Grad der Tumor-Neovaskularisation (Herold-Mende et al., 2002), sodass ein angiogenetischer Effekt von TNC vermutet wird, welcher auch in Kulturversuchen nachgewiesen werden konnte (Whitby, Longaker, Harrison, Adzick, & Ferguson, 1995). Multiple onkogene Signalwege, etwa Wnt, können eine erhöhte Tenascin C Expression induzieren (Sivasankaran et al., 2009). Für Brustkrebs ist zudem beschrieben, dass TNC Teil einer Signatur für Lungenmetastasen darstellt (Midwood et al., 2011), was nahelegt, dass es die Invasion fördert.

Eine besondere Bedeutung kommt TNC beim Glioblastom zu, da, anders als in den meisten soliden Tumoren, beim GBM die Tumorzellen selber TNC sezernieren, und dies nicht von

Fibroblasten übernommen wird (Xia et al., 2016). Weiter korreliert der Grad der TNC Expression bei Gliomen mit der Prognose des Patienten (Midwood et al., 2011). Ebenso wurde TNC bereits als Marker für BTSCs diskutiert, da TNC<sup>+</sup> BTICs besser als CD-133<sup>+</sup> charakterisiert und so eine Subpopulation der CD-133 negativen BTICs mit eingeschlossen werden konnte (Nie et al., 2015). TNC wird zudem weiter mit der Aktivierung von Liganden des NOTCH-Signalweges assoziiert (Sarkar et al., 2017), der unter anderem wiederum mit einer Induktion von Zellmigration assoziiert ist. Durch die Präsenz von sezerniertem TNC im *Microenvironment* des Tumors wird ebenfalls die Invasion gefördert (Hau et al., 2006; Xia et al., 2016).

### 1.6 Ziele dieser Arbeit

Das Kernziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Grundlagen der Migration beim Glioblastom näher zu charakterisieren. Dazu wird die genetische Ausstattung der invasionstreibenden BTICs im OBSC-Modell betrachtet, welches ein adäquates Abbild für die BTSCs darstellt (Dirkse et al., 2019), die durch ihre Invasion besonders bedeutsam für Metastasierung und Rezidive sind (Claes et al., 2007). Dabei wird insbesondere das Transkriptom der *Leader Cells* betrachtet, welche führend in der Migration im OBSC-Modell sind (Leidgens,2015).

Es sollen sowohl Zellen der invasiven Region von Patientenproben als auch des besten verfügbaren *in vitro* Modelles der OBSCs untersucht werden, um eine gemeinsame Gensignatur zu finden, die möglichst breit sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verwendbar ist.

# 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Zellkultur

### 2.1.1 Generelle Zellkultur

Kulturen wurden generell basierend auf bereits etablierten Methoden im Labor durchgeführt. (Leidgens, 2015). Die BTIC Zellen wurden in RHB-A+ medium gezüchtet. Sie wuchsen entweder adhärent oder in Sphären. Die GBM Zellen wuchsen als adhärenter Monolayer in DMEM Medium. Zellen wurden bei 37°C mit 21%, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Zellen wurden gesplittet, wenn etwa eine Konfluenz von 80 % erreicht war. Im Allgemeinen war das ein bis zwei Mal die Woche der Fall, sodass die Zellen dann unter der sterilen Werkbank geteilt wurden. Regelmäßig wurde mittels Mycoplasmen PCR eine Kontamination mit Mycoplasmen ausgeschlossen.

Adhärente Zellen: Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 1X PBS gewaschen vor Behandlung mit Accutase. Die Zellen wurden anschließend mit Medium oder 1XPBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (5 min bei 1,200g bei RT) zu einem Pellet zusammengeführt. Nach Verwerfung des Überstands wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und entsprechend ausgesät.

Sphären: Das Medium, welches alle Zellen enthielt, wurde bei 1,200g 5min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2,5µl Accutase resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad zur Dissoziation gelagert.

Name	Histologie	Klassifikation
RAV 21	Primäres GBM	Mesenchymal
RAV 26	Primäres GBM	Mesenchymal
RAV 27	Sekundäres GBM	Mesenchymal

### Tabelle 1: Übersicht über verwendete Zelllinien

#### 2.1.2 Zellzählung

Die Zellanzahl wurde durch Messung auf einem Hemacytometer ermittelt. Dazu wurden 40µl Zellsuspension mit 10µl Tryptanblau versetzt und die so sichtbaren lebenden Zellen gezählt. Mit folgender Formel konnte dann die Zellanzahl berechnet werden.

 ${cells}/{ml} = \frac{anzahl\ an\ gezählten\ Zellen\ x\ dfx\ cf}{gezählte}$ 

Df= Verdünnungsfaktor (hier 1.25) Cf = Umrechnungsfaktor (hier 1X 10<sup>6</sup>)

### 2.2 Probengewinnung

#### 2.2.1 Probenaufarbeitung

Glioblastom (GBM) Proben wurden von Patienten gewonnen, die sich in der Klinik für Neurochirurgie, Klinikum der Universität Regensburg oder in der Klinik für Neurochirurgie, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München einer chirurgischen Entfernung eines GBM mittels 5-ALA Fluoreszenzmarkierung unterzogen. Von jedem Patienten wurde eine Probe sowohl aus der Mitte mit starker Fluoreszenz als auch vom Rand des Tumors mit schwacher Fluoreszenz entnommen und separat weiter prozessiert. Nach der Dissoziation der Proben mittels eines sterilen Skalpells wurden die Proben für 40 min in einem Wasserbad mit Neutraler Protease behandelt, um bestmögliche Qualität bei der folgenden Isolation von Single Cells zu gewährleisten (Volowitz et al., 2016). Die Neutrale Protease wurde in einer Konzentration von 0,8-1,5U/g Gewebe verwendet. Für die Isolation wurden die Zellen in einen 8-Well Objektträger mit PBS ausgesät

### 2.2.2 Isolation von Einzelzellen

Jede GBM probe wurde manuell nach dem Vorhandensein von *Stationary Cells* und *Leader Cells* unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus oder Zeiss) untersucht. Zur Zellisolierung war dieses mit einem Mikromanipulator (Patchman NP2, Eppendorf) und einer Pumpvorrichtung (CellTram, Eppendorf) ausgestattet. Es wurden jeweils etwa 0,3 x 10<sup>6</sup> GBM-Zellen in eine Kammer des 8-Kammer Objektträgers (Nunc) pipettiert, die bereits 170  $\mu$ l PBS enthielt. Einzelzellen, die fluoreszenzmarkiert waren und eine intakte Morphologie aufwiesen wurden mittels der am Mikromanipulator angebrachten Glaskapillare isoliert und abhängig des Herkunftsortes als Central (CEN) oder Rim (RIM) Cell bezeichnet (Figur 5). Nach dem Entfernen der Einzelzelle wurde diese in eine Kammer transferiert, die 200  $\mu$ l PBS enthielt, um per visueller Kontrolle sicherzustellen, dass tatsächlich nur eine einzelne Zelle isoliert wurde. Diese wurde dann mit Hilfe einer Mikropipette manuell in einem Mikroliter PBS abpipettiert und in ein kleines 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses enthielt 10ng tRNA (Roche), die in 4  $\mu$ l Lysepuffer (mTRAP kit, Active Motif) gelöst war. Die Proben wurden dann unverzüglich bei –80° gelagert.



Figur 4 Zellsuspension von primärem Patientenmaterial nach Präparation

Mikroskopische Darstellung einer aus primärem Patientenmaterial gewonnen Zellsuspension im Hellfeld und unter 625 nm. Die zentrale Zelle erfüllt durch die Fluoreszenz das Kriterium einer Tumorzelle



#### Figur 5Abfolge eines Pickvorgangs

Bildabfolge einer Isolierung sowie Überführung einer Einzelzelle aus einer Zellsuspension mittels Mikromanipulator unter Mikroskopischer Kontrolle.

Die Zellanzahl wurde durch Messung in einem Hemacytometer ermittelt. Dazu wurden 40µl Zellsuspension mit 10µl Tryptanblau versetzt und die so sichtbaren lebenden Zellen gezählt. Mit folgender Formel konnte dann die Zellanzahl berechnet werden.

 $cells/_{ml} = \frac{anzahl an gezählten Zellen x df x cf}{gezählte Quadrate x sv}$ 

Df = Verdünnungsfaktor (hier 1.25) Cf = Umrechnungsfaktor (hier 1X 10<sup>6</sup>)

### 2.3 Probenanalyse

#### 2.3.1 <u>cDNA Libraries</u>

Die Isolierung der mRNA aus den Einzelzellen, Transkription in cDNA und Amplifikation der cDNA wurde nach veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Hartmann & Klein, 2006 Braun, 2016). Die isolierten Einzelzellen wurden in je ein Reaktionsgefäß transferiert, welches 6,4 µl Lysispuffer (Active Motif) mit 10 ng tRNA (Roche), 1 µg Protease (Active Motif) und 1 µl einer 37,5 µM Lösung mit biotinylierten oligo-dT Peptid-Nukleinsäuren (PNAs; Acitve Motif) enthielt.

Für den proteolytischen Verdau wurden die Proben 10 min bei 45°C inkubiert, danach wurde die Protease durch Inkubation für 1 min bei 75°C deaktiviert. Für das Binden der PNAs an die poly-A Enden der mRNAs wurden die Proben anschließend 15 min bei 22°C gelagert. Die gebildeten PNA-mRNA Komplexe wurden mittels Streptavidin-konjugierter magnetischer Beads in einem Magnetfeld ausgefällt. Während des Ausfällens in einem Magnetständer wurden die Bead-Pellets mit 10 µl cDNA Waschpuffer 1 (50 mM Tris–HCl

pH 8,3, 75 mM KCl, 10 mM DTT und 0,25% Igepal), 20 µl cDNA Waschpuffer 2 (50 mM Tris–HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0,25% Tween-20) und erneut 20 µl cDNA Waschpuffer 1 gereinigt.

Die cDNA Transkription wurde unter dauerhafter Rotation (verhindert das Absinken der Beads) für 45 min bei 44°C durchgeführt. Der Reaktion wurde ein Gemisch aus 0,5 mM äquimolaren dNTPs (GE Healthcare), 200 U Superscript II Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific), 30  $\mu$ M CFL15CN8 Primer (C15GTCTAGAN8), 15  $\mu$ M CFL15CT24 Primer (C15GTCTAGAT24VN; beide Metabion), 0,25% Igepal, 5 mM DTT (Invitrogen) und der geeignete RT Puffer vom Hersteller (Invitrogen) zu einem Endvolumen von 20  $\mu$ l zugefügt. Vor Hinzugabe des Enzyms wurde das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur gelagert, damit sich die Primer anlagern konnten.

Nach der cDNA Synthese wurden die Beads mit 20 µl Waschpuffer (50 mM KH2PO4 pH 7, 1 mM DTT, 0,25% Igepal) gewaschen und in 10 µl Tailingpuffer (10 mM KH2PO4 pH 7, 4 mM MgCl2, 0,1 mM DTT, 200 µM dGTP) resuspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 40 µl Mineralöl überlagert und die 15 cDNA Einzelstränge durch 5-minütige Inkubation bei 95°C von den Beads gelöst. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt. Das Hinzufügen von dGTPs an das 5` Ende der cDNA Einzelstränge wurde durch Hinzugeben von 10 U der Terminal-Deoxynukleotid-Transferase (TdT, Thermo Fisher Scientific) und Inkubation der Reaktion für 60 min bei 37°C durchgeführt. Nach Inaktivierung der TdT (70°C, 5 min) wurden 35 µl WTA Gemisch 1 (4 µl Puffer 1 (Expand Long Template, Roche), 3% deionisiertes Formamid) zu jeder Probe hinzugefügt. Mittels Hinzugeben von 5,5 µl WTA Gemisch 2, welches 3,2 mM äquimolare dNTPs, 12 mM CP2 Primer (TCAGAATTCATGC15) und 7,5 U PolMix (Expand Long Template) enthielt, wurde eine *hot-start* PCR gestartet.

Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Zweck
78°C	30 sec		HotStart
94°C	15 sec		Denaturierung
65°C	30 sec		Hybridisierung
68°C	2 min	20x	Elongation
94°C	15 sec		Denaturierung
65°C	30 sec		Hybridisierung
68°C	2:30 min +10 sec/Zyklus	20x	Elongation
68°C	7:00		Finale Elongation
4°C	$\infty$		

Tabelle 2: PCR Programm für die cDNA Amplifikation

Insgesamt wurden 40 PCR Zyklen in einem Thermoblock (MJ Research PCR thermal cycler) durchgeführt: 20 Zyklen mit Denaturierungszeit 15 sec bei 94°C, Hybridisierungszeit 30 sec bei 65°C, Elongationszeit 2 min bei 68°C und 20 Zyklen mit einer Verlängerung der Elongationszeit von 10 sec sowie einer finalen Elongation von 7 min bei 68°C. Die Qualität der Amplifikation wurde mittels PCR auf die *Housekeeping Genes* ACTβ, EFα1 und GAPDH überprüft.

### 2.3.2 <u>Microarray basierte Transkriptomanalyse</u>

Das Markieren und Hybridisieren der WTAs auf Genexpressions-Mikroarrays wurde gemäß veröffentlichter Protokolle (Hartmann et al., 2006, Braun et al., 2016) mit Unterstützung des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt.

Das Markieren der cDNA wurde mit einer PCR mit Cy5-markierten Primern durchgeführt. Der Reaktionsmix enthielt 5  $\mu$ l Puffer 1 (Roche), 20% Formamid, 0,35 mM jedes dNTPs, 80  $\mu$ M des Cy5 Primers (UCAGAAUTCAUCCCCCCCCCCC), 7,5  $\mu$ M PolMix (Roche ) und 1  $\mu$ l des primären WTAs zu einem Gesamtvolumen von 49  $\mu$ l

Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Zweck
95°C	30 sec		HotStart
94°C	15 sec		Denaturierung
60°C	1 min		Hybridisierung
65°C	3:30 min	10x	Elongation
94°C	15 sec		Denaturierung
60°C	1 min		Hybridisierung
65°C	3:30 min +10 sec/Zyklus	2x	Elongation
65°C	7:00		Finale Elongation
4°C	$\infty$		

Tabelle 3: PCR Programm für die Cy5 Markierung

So markierte Produkte wurden mittels einer Säule (Qiagen PCR purification Kit) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Aufgereinigte Cy5 markierte DNA wurde denaturiert mittels 5-minütiger Inkubation bei 95°C und anschließend auf Eis aufbewahrt. Der Hybridisierungspuffer wurde mittels 42 µl der denaturierten DNA, 55 µl 2x Hi-RPM Hybridisierungspuffer (Agilent), 11 µl 10xGE Blocking Agent (Agilent) und jeweils 4 µl Tween 25% sowie Igepal 25% hergestellt. 4 Proben mit jeweils 100 µl des Hybridisierungsmixes wurden auf 4 Hybridisierungsfelder von Agilent Whole Human Genome (4x44K) Oligo Microarray Slides überschichtet, mit Sure Print (G4122F) Microarray Slides befestigt und anschließend unter konstanter Rotation 17h bei 65°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Slides in Agilent Waschpuffer 1 eine Minute im Shaker abgedunkelt gewaschen und anschließend in Agilent Waschpuffer 2 (vorgewärmt auf 37°C) eine Minute im Shaker abgedunkelt gewaschen. Schließlich wurden die Slides mittels Waschung in Acetonitrile getrocknet, Luft- und Lichtdicht verpackt und an das Deutsche Krebsforschungszentrum zum Scannen versendet.

Insgesamt wurden von je 12 Proben von *Stationary* und *Leader Cells* verglichen. Diese stammten zu gleichen Teilen von den drei mesenchymalen GBM Zelllinien RAV 21, RAV 26 und RAV 27.

### 2.3.3 <u>Statistische Auswertung</u>

Die Umwandlung der Bild- in Textdateien wurde zunächst mit Feature Extraction (Agilent) durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung der gewonnenen Genexpressions-Microarray Daten wurde durch Herrn Xin Lu, Institut für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren am Klinikum der Universität Regensburg, durchgeführt. Aus den so gewonnenen Daten wurde dann anhand der p-Werte, der adjustierten p-Werte und des log(Fold Changes) Gene zur weiteren experimentellen Untersuchung ausgewählt.

### 2.3.4 Optimierung der Bedingungen für die genspezifische PCR

Die Primer für alle ausgewählten Gene wurden anhand der cDNA Sequenz (Benson et al., 2010) mittels dem Primer 3 Softwaretool ausgewählt. Die Spezifität der Primer wurde noch einmal mit dem BLAST Software überprüft. Hiernach konnten die verwendeten Primerpaare alle Isoformen der korrespondierenden Transkripte erkennen.

Die WTAs von unspezifischen Pools aus mesenchymalen GBM Zellpools wurden zur Optimierung der PCR Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen Gene verwendet. Die Hybridisierungstemperaturen aller Primer wurden mittels Gradienten PCR ermittelt, wobei jeweils Temperaturen im Bereich 5°C über und unter der errechneten Schmelztemperatur getestet wurden

Die PCR Reaktion wurde in einem 10  $\mu$ l enthaltenden Gemisch aus 0,1  $\mu$ l WTA cDNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl2, 0,1 mM äquimolares Gemisch aus dNTPs (GE Healthcare), 0,4 pM jedes Primers (Tabelle 1), 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l an BSA (Roche) und 0,5 U Taq DNA Polymerase (Pan Biotech) durchgeführt

Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Zweck
94°C	2min		Denaturierung
Genspez.	30sec		Hybridisierung
72°C	2min		Elongation
94°C	15sec		Denaturierung
Genspez	30sec		Hybridisierung
72°C	20sec	15 Zyklen	Elongation
94	15sec		Denaturierung
Genspez.	30sec		Hybridisierung
72°C	30sec	25 Zyklen	Elongation
72°C	2min		Finale
			Elongation

Tabelle 4: Genspezifische PCR Programm

Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils genspezifisch gewählt, siehe dazu Liste der Primer.

Alle PCR Produkte wurden durch ein 3-% Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Um die korrekte Amplifikation eines Fragmentes zu beweisen wurden alle PCR Produkte mittels ausgewählter Restriktionsendonukleasen verdaut. Nur Primer dessen Fragmente die erwartete Länge und Anzahl aufwiesen, wurden in weiterführenden Versuchen verwendet.

### 2.3.5 <u>Genspezifische PCR zur Detektierung ausgewählter Transkripte in Patienten-</u> proben

Alle WTAs der Einzelzellen wurden mittels PCR wie zuvor beschrieben getestet. Um die korrekte Amplifikation des Zieltranskripts nachzuweisen, wurden alle Proben, die ein positives Ergebnis aufwiesen, dem Restriktionsverdau zugeführt. Nur wenn nach dem Restriktionsverdau auch die entsprechenden Banden zu sehen waren, wurde die Probe als positiv für das entsprechende Zieltranskript gewertet.

Der Restriktionsverdau wurde in 30  $\mu$ l eines wasserbasierten Reaktionsgemischs durchgeführt, welches 15  $\mu$ l des primären PCR Produkts, 3  $\mu$ l der entsprechenden Restriktionsendonuklease (Liste der benutzen Primer) und 3  $\mu$ l des passenden Reaktionspuffers enthielt.

Die Inkubationszeit für HaeII betrug 3h bei 37°C, gefolgt von einer Inaktivierung für 20 min bei 65°C.

### Liste der benutzen Primer

	Vorwärts	Rückwärts	°C	<b>Restriktions-</b>	Amplifikat
				Enzym	-länge
TNC	TGCCACGGAAT	TAAGGAGGGCAG	58	HaeII	140bp
	ACACAC	TTTCC			
E2F4	GCGGCTACC	AATGAAGAGAG	61	HaeII	101bp
	G	UUTATUUUUU			
Serca2	ACCAATGGGGT	AGCCTCATTCCT	59	HaeII	115bp
	TGTTAGCTTT	CTTGCAGC			

### 2.3.6 **Quantitative real-time PCR**

Die qRT-PCR wurden basierend auf Leidgens et al, 2015 durchgeführt. Dazu wurden 5  $\mu$ l SYBR Green mit 2,5 $\mu$ l der cDNA und den entsprechenden Primern (jeweils 0,5  $\mu$ l) und 1,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>0 jeweils in Triplikaten auf eine 96 Well Platte gegeben und mittels eines LightCyclers 480 amplifiziert.

Temperature	Dauer	Wiederholungen	Schritt
95°C	15min		Initiale
			Denaturierung
95°C	15sec		Denaturierung
58°C	30sec	35X	Annealing
72°C	30sec		Elongation
65-95°С	10 min		Schmelzkurve

Aus den cP Werten wurde für jedes Triplikat der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Proben mit einer Standardabweichung ≤0,5 wurden verworfen.

### 2.3.7 Agarose Gel Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden  $3\mu$ l Ethidiumbromid (0.5 $\mu$ g ml<sup>-1)</sup> zu 100ml einer 3% Agarose Lösung in eine Gelkammer mit einem Kamm gegossen. Nach der Polymerisation wurden das Gel mit TAE Puffer bedeckt und der Kamm vorsichtig entfernt. Eine DNA Ladder diente als Referenz für die entsprechende Basenpaargröße. Im Allgemeinen wurden 15  $\mu$ l Probe mit  $3\mu$  Dye in die Geltaschen aufgetragen.

Elektrophorese wurde bei 100V und 300mA für 60 min durchgeführt. Danach wurde ein Bild des Gels unter UV Licht bei 254nm spezifisch für Ethidiumbromid angefertigt.



Figur 6 Beispiel für eine Kontroll-PCR nach Elektrophorese. Jede Spalte entspricht einer Zelle, mit Referenzmarkern links und rechts. Geprüft wurde die Nachweisbarkeit von  $\beta$ -Actin, EF-1 $\alpha$  und GAPDH.

### 2.4 Organotypic Brain Slices

### 2.4.1 <u>Anfertigung</u>

Die Organotypic Brain Slice Cultures (OBSCs) wurden auf Basis bestehender Publikationen etabliert (Leidgens *et al.* 2015; Gogolla *et al.* 2006; Gähwiler *et al.* 1997;) und weiter angepasst.

OBSCs wurden in einer sterilen Umgebung unter einer sterilen Werkbank präpariert. Je nach Anzahl der Rattenwelpen wurden 6-Well Platten mit 1,2 ml/well eines Brain Slice Culture Mediums gefüllt und in einem CO<sub>2 Inkubator</sub> aufbewahrt. Aus einem Welpen waren etwa 3-5 Hirnschnitte zu gewinnen mit 2-3 Schnitten pro Well. 5 % Agarose in PBS wurde einmal

#### 2 Materialien und Methoden

pro Tag frisch zubereitet und bei 60 Grad gelagert, um Luftblasen zu eliminieren. Vor Verwendung wurde die Lösung auf 37 Grad heruntergekühlt.

Alle Materialien wie Filterpapier, Pinzetten, Skalpell, Vibratomklingen oder Spatel wurden sterilisiert und neben dem Vibratom in der sterilen Werkbank platziert. Zusätzlich wurde die Vibratomkammer mit eiskalten "Präparations" Medium gefüllt und weiter mit Eis gekühlt. Zusätzlich wurde pro Welpen je eine 3.5 cm und eine 10cm Platte bereitgestellt.

Konform mit den Richtlinien zum Umgang mit Tierexperimenten wurden die Welpen durch Genickbruch mittels einer sterilen Schere getötet. Nach dem Entfernen des Körpers wurde der Kopf mit 70% Isopropanol abgewaschen und in eine Petrischale transferiert. Durch einen Schnitt entlang der großen Mittelvene im Nacken bis vor zwischen die Augen wurde die Haut abgelöst. Anschließend wurde mittels einer kleinen Schere der Schädel eröffnet, in dem die Schere in das Foramen Magnum eingeführt wurde und wieder entlang der großen Mittelvene bis zu den Augen geführt wurde. Die zwei Hälften wurden vorsichtig getrennt um das Gehirn zu erreichen. Mittels eines kleinen Spatels wurde das Hirn aseptisch entfernt und in eiskaltes Medium gelegt um das verbleibende Blut zu entfernen. Danach wurde das Hirn vorsichtig auf Filterpapier getrocknet und mit der ventralen Seite nach oben auf eine 3.5 cm Platte gelegt, die mit 5% Agaroselösung bedeckt war und für die Polymerisation dann auf Eis gelegt wurde. Die Agarose diente als Stabilisierung während der Schnittherstellung. Anschließend wurde das Gehirn quaderförmig geschnitten und mit Gewebekleber auf dem Vibratom befestigt. 350µm dicke Hirnschnitte wurden mit dem Vibratom mit der Geschwindigkeitseinstellung 3-5 und Frequenz-Einstellung 8 angefertigt. Sobald die Hirnschnitte im Medium schwammen, wurden Sie mittels eines Spatels in die 10cm Platte transferiert. Sofern möglich, wurden die Schnitte immer im Medium auf Eis ausbewahrt.

Unter dem Mikroskop wurden alle Schnitte überprüft, und nur weiterverwendet, wenn die hippokampale Struktur mit CA1-CA3 und dem Gyrus Dentatus vollständig vorhanden war. Diese Schnitte wurden unter möglichst wenig Berührung auf Zellkultureinsätze gelegt und das verbleibende Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Einsätze in die 6 Well Platten im Inkubator transferiert. Vor Implantation wurden die Schnitte mindestens 24 Stunden kultiviert.

### 2.4.2 <u>Kultur</u>

Die Schnitte wurden bis zu 21 Tage in einem Inkubator mit 37°C und einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre aufbewahrt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Schnitte waren auf der Unterseite vom Medium bedeckt, die obere Seite war von der Atmosphäre umgeben. Für die Bildgebung wurden die Schnitte für maximal eine halbe Stunde aus dem Inkubator genommen.

### 2.4.3 Implantation

Zwei Tage vor der Implantation wurden diejenigen Zellen, die den Fluoreszenzmarker stabil exprimieren, auf einer mit Agarose bedeckten 96 Well Plate ausgesät. Die Hirnschnitte wurden mindestens 24 Stunden vor Implantation kultiviert. Einzelne Sphären wurden von der Agarose gepickt, möglichst ohne Medium, und auf dem lateralen Ventrikel gegenüber des Hippocampus platziert. Nur eine Sphäre wurde pro Schnitt verwendet.

### 2.4.4 <u>Migrationsverfolgung</u>

Am Tag der Implantation wurde der Hirnschnitt unter dem Mikroskop in 2,5-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops wurden in 5-facher Vergrößerung Bilder der implantierten Zellen gemacht. Wöchentlich wurden neue Bilder von der Migration und Invasion in umgebendes Hirngewebe angefertigt.

Während der 3-wöchigen Untersuchung, teilte sich die homogene Zellpopulation phänotypisch in drei Subgruppen: (1) *Leader*, (2) *Follower* und (3) *Stationary Cells*. Letztere verblieben in einer runden Form an der Implantationsstelle, während die *Leader Cells* am äußeren Rand des invasiven Randes lokalisiert sind und eine spindelförmiges, infiltratives Erscheinungsbild haben. Diese scheinen die Invasion zu imitieren.

#### 2.4.5 Isolation von Einzelzellen

Um Einzelzellen zu isolieren, wurde ein Adapter für den Mikromanipulator (InjectMan NI 2 und CellTram Air, Eppendorf) konstruiert, um so präzises Herausschneiden der interessanten Zellregionen zu ermöglichen. In Kooperation mit der Fakultät für Physik der
Universität Regensburg wurde ein Adapter konstruiert und aus einer  $0.6 \times 30$  23 G 1 <sup>1</sup>/<sub>4</sub> Kanüle hergestellt. (Figur 7)



#### Figur 7 konstruierter Adapter für Eppendorf Mikromanipulator

(A - C) Adapter von verschieden Blickwinkeln (D) verbunden mit dem Mikromanipulator am Olympus IX81Mikroskop. Fotos entnommen aus Leidgens, 2015.

Für Einzelzell- oder Zellpool Isolation wurde die OBSC-Membran ausgeschnitten und die Membran auf einen Objektträger geklebt. Sobald der Kleber getrocknet war, wurde OBSC Kulturmedium dazugegeben und der Schnitt unter das Mikroskop gelegt (Olympus IX81, Olympus Japan).



Figur 8 OBSC Präparation. An der OBSC Membran wurde geschnitten (A) und auf einen Objektträger geklebt(B). Anschließend wurde das OBSC mit Kulturmedium bedeck und zum Mikroskop transferiert. (C) (Fotos entnommen aus Leidgens, 2015.)

Unter Verwendung der Kanüle wurden kleine Cluster mit interessanten Zellen vom OBSC ausgeschnitten, in der Kanüle gesammelt und in ein frisches Well mit 1xPBS transferiert. Dies führte zur Aufteilung der Einzelzellen ohne weitere Manipulation oder enzymatische Dissektion. Einzelzellen wurden mit einer an den Mikromanipulator befestigten Kapillare gepickt, in Zell Lysis Puffer transferiert und bei -80°C gelagert. Insgesamt wurden 60 Einzelzellen und 22 Zellpools isoliert. Prozessierung der gewonnenen Zellen zu cDNA Libraries und weitere Analysen wurden nach Hartmann und Klein, 2006 durchgeführt.

# 2.5 Verwendete Materialien

# 2.5.1 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Herkunft
40µl Filter	Greiner Bio-one, Frickenhausen
50 ml Falcon	Becton Dickinson, USA
96 Well PCR Platte	ABGene, Epsem, UK
96 Well Platten Verschlussfolien	ABGene, Epsem, UK
Pasteurpipetten	VWR International, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Skalpell	B. Braun Melsungen, Melsungen
Vibratom Klingen	Schick, USA
Polypropylen Reaktionsgefäße (200µl, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg

# 2.5.2 <u>Chemikalien</u>

Chemikalie	Herkunft
1kb DNA Ladder +Dye	New England Biolabs, Frankfurt
Agarose	Sigma Aldrich, Hamburg
Agilent Wasch Puffer 1&2	Agilent, USA
Blocking Agent	Agilent, USA
BSA	Roche, Mannheim
Cy5 Primer	Metabion, Planegg
dNTP Set	VWR International, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Hamburg
Expand Long Template PCR Systems	Roche, Mannheim
FastStart Taq DNA Polymerase,	Roche, Mannheim
Formamide Bio Ultra	Sigma Aldrich, Hamburg
Hi-RPM Hybridisierungspuffer	Agilent, USA
Igepal CA-360	Sigma Aldrich, Hamburg
iQ SyBr Green Supermix	BIO Rad, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR International, Darmstadt
LMW Ladder	New England Biolabs, Frankfurt

# 2 Materialien und Methoden

MgCl 1M	Sigma Aldrich, Hamburg	
Mineral oil	Sigma Aldrich, Hamburg	
mTRAP <sup>TM</sup> Lysis Puffer	Active Motif, USA	
Neutrale Protease	Serva Electrophoresis, Heidelberg	
Poly T gripNA <sup>TM</sup>	Active Motif, USA	
PCR-H <sub>2</sub> O	VWR International, Darmstadt	
KCL 1M	Sigma Aldrich, Hamburg	
Protease	Active Motif, USA	
Proteinase K	Roche, Mannheim	
PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (8,5mM); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2mM)	
Streptavidin Beads	Active Motif, USA	
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, USA	
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT)	Thermo Fisher Scientific, USA	
Tris-Puffer pH 8,0 (1M) für Molekularbiologie,	AppliChem, Darmstadt	
1000 ml		
tRNA from E. coli MRE 600, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH	
Trypanblau	Sigma Aldrich, Hamburg	
Tween-20	Sigma Aldrich, Hamburg	
DEPC- Wasser	Invitrogen, Darmstadt	

## 2.5.3 <u>Geräte</u>

Geräteart	Hersteller
Agarose Gelkammer	Biostep, Jahnsdorf
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus, Japan
Nanodrop 2000Sc	Thermo Fischer Scientific
qRT-PCR Cycler	Agilent, USA
Vibratome VT1000S	Leica, Wetzlar
Vortex (Genie 2)	Scientific Industies, USA
Wasserbad WNB7	Memmert, Schwabach
Neubauer Zählkammer	Schubert&Wess OMNILAB
UV Transilluminator mit CCD Kamera	INTAS, Göttingen
MJ Research Peltier Thermal Cycler Tetrad	Bio-Rad, USA
Pipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson, Limburg Offenheim

# 2 Materialien und Methoden

Microarray Scanner	Agilent, USA
Mikromanipulator (Microinjector 5242)	Eppendorf, Hamburg
Prähybridisierungskammer	Steinbrenner, Wiesennach
Light Cycler 480	Roche, Mannheim
Zentrifuge (Z513K)	Hermle, Wehingen

# 2.5.4 Software

Software	Funktion	Referenz
GraphPad Prism, Version 8	Statistische Analysen	GraphPad Software, USA
Mendeley, Version 1.19.1	Literaturprogramm	Mendeley Ltd., UK
Microsoft Office 2011f	Dokumentation	Microsoft, USA
MxPro QPCR Software	qPCR Evaluation	Agilent Technologies, USA
Primer 3	Primer design	Unterberger et al, 2012
Feature Extraction	Bildverarbeitung	Agilent, USA
	Microarray	

# 3 Ergebnisse

Um *Leader Cells* wirksam zu untersuchen und gegen andere GBM Zellen abgrenzen zu können wurde das Transkriptom dieser Zellen mittels etablierter Protokolle (Hartmann & Klein, 2006) isoliert und mit dem Transkriptom von nicht invasiven Tumorzellen verglichen. Ziel war es dabei, Unterschiede im Genprodukt zu finden, die die Entwicklung eines *Leader Cell* Assay möglich machen.

Um den Phänotyp der *Leader Cells in vitro* als auch *in vivo* verlässlich genauer charakterisieren zu können, wurden sowohl Zellen von patientengenerierten Zelllinien aus OBSCs-Modellen als auch primäre Zellproben von GBM Patienten für die Untersuchungen verwendet. Dabei wurde der Umstand genutzt, dass mittels des OBSC-Modelles die Migrationsbewegung einzelner Zellen über längere Zeiträume verfolgt und quantifiziert werden kann. Hieraus isolierte Einzelzellen wurden aufgrund Ihrer eindeutigen Charakterisierbarkeit als *Leader Cells* bzw. als *Stationary Cells* insbesondere für den gesicherten Erkenntnisgewinn mittels *high throughput* (HT) Untersuchungen genutzt, während die Zellen der primären Zellproben aufgrund ihrer unmittelbar postoperativen Isolierung insbesondere für die Validierung der zuvor gefunden Ergebnisse bedeutsam waren.

## 3.1 Kollektivergebnisse

Für das OBSC-Modell wurden Hirntumorproben von drei verschiedenen Patienten (RAV 21, RAV 26, RAV 27) untersucht. Alle untersuchten Proben waren vom mesenchymalen Subtyp. Zwei Proben (RAV 21, RAV 26) stammten von primären GBMs, während RAV 27 eine sekundäre GBM-Probe war. Von allen Hirntumorproben wurde eine Zellsuspenison generiert, aus der mittels etablierter Kulturmethoden BTICs individuell gewonnen werden konnten. Diese wurden mittels GFP fluoreszenzmarkiert und anschließend getrennt auf OBSCs implementiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen konnte eine Aufteilung in *Leader Cells* und *Stationary Cells* beobachtet werden, sodass die Zellgruppen getrennt voneinander isoliert werden konnten. Dabei wurden von jedem Patienten sowohl von den *Leader Cells* als auch von den *Stationary Cells* mittels Mikromanipulator 20 Einzelzellen und bis zu 4 Zellpools (20 Einzelzellen pro Pool) gewonnen, um eine möglichst hohe Aus-

sagekraft über einzelne Zellen, aber auch gemittelt über die Zellgruppen zu erzielen. Von allen Zellen wurde das Transkriptom nach Hartmann und Klein (2006) isoliert, amplifiziert und qualitätskontrolliert. Hierfür wurde das Transkriptom mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese auf die drei *Housekeeping Gene* Elongation-Factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), Beta-Actin ( $\beta$ -ACT), und Glyceraldehyde 3-phosphat- dehydrogenase (GAPDH) untersucht. Nur Zellen, deren Transkriptom für mindestens zwei dieser Gene positiv war, wurden in den weitergehenden Analysen verwendet. Insgesamt konnten so 112 Einzelzellen und 22 Zellpools gewonnen werden (detaillierte Angaben sieh. Tabelle 1a).

Tabelle 1a Auflistung aller aus OBSC- Proben gewonnen Stationary (STA) und Leader(LEA) Cells

Bezeichnung	STA		LEA	
	Einzelzellen	Zellpools	Einzelzellen	Zellpools
RAV 21	20 (4)	4 (4)	20 (4)	4 (4)
RAV 26	17 (4)	3 (3)	19 (4)	4 (4)
RAV 27	18 (4)	3 (3)	18 (4)	4 (4)

Tabelle 1b Auflistung aller aus primären Proben gewonnen Central und Rim Cells

Bezeichnung	Herkunft	CEN	RIM
GB18-008	Regensburg	14	4
GB18-020	Regensburg	16	17
GB18-230	Regensburg	10	9
GB18-244	Regensburg	4	2
GB18-365	Regensburg	4	4
GB18-366	Regensburg	3	1
GB18-380	München	0	7
GB19-007	München	2	0
GB19-013	Regensburg	8	0
GB19-029	München	5	6

1a Übersicht über Bezeichnung und Anzahl der aus OBSCs gewonnen Zellproben nach Qualitätskontrolle. In Klammern jeweils die Anzahl der der HT-Untersuchung zugeführten Zellen

1b Übersicht über Bezeichnung, Herkunft und Anzahl der aus primären Proben gewonnen Zellen nach Qualitätskontrolle.

Für die primären Zellenproben wurden von insgesamt 10 GBM-Patienten unmittelbar postoperativ aus dem entfernten Tumorgewebe Zellen entnommen. Dazu wurde sowohl eine Probe des zentralen Tumorgewebes (*Central Cells* als Äquivalent zu den *Stationary Cells*) als auch eine Probe des Tumorrandes (*Rim Cells* als Äquivalent zu den *Leader Cells*) mechanisch und enzymatisch mittels Neutraler Protease zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet, aus derer mittels Mikromanipulator bis zu 20 Einzelzellen jedes Tumorareals entnommen wurden. Dabei wurde die prä-operativ applizierte und intraoperativ verwendete 5-Aminolävulinsäure (5-ALA; Gliolan<sup>TM</sup>) eingesetzt, um Tumorzellen von anderen im Tumor befindlichen Zellen abgrenzen zu können. Nur Zellen die unter der entsprechenden Wellenlänge fluoreszierten wurden isoliert, um eine Kontamination der primären Proben auszuschließen. Insgesamt stellte sich die Isolation schwieriger als erwartet dar, da aufgrund der benötigten Aufarbeitungszeit und begrenzter Fluoreszenzdauer von 5-ALA postoperativ häufig deutlich weniger, qualitätsärmere Zellen als erhofft isoliert werden konnten (Tabelle 1b).

Das Transkriptom der gewonnenen Zellen wurde nach Hartmann und Klein isoliert, amplifiziert und mittels EF1- $\alpha$ ,  $\beta$ -ACT und GAPDH qualitätskontrolliert. Nur Zellen, die mindestens für 2 dieser Gene positiv waren, wurden für weitergehende Analysen verwendet. Eine Übersicht der gewonnen Zellen findet sich in Tabelle 1b. Insgesamt konnten so 116 Zellen gewonnen werden. Patienten, bei denen nicht mindestens 10 Zellen sowohl vom Tumorkern und vom Tumorrand gewonnen werden konnten, wurden nicht für vergleichende individuelle Analysen verwendet.

## 3.2 Microarray Ergebnisse

### 3.2.1 Pathway und Gene Ontology Analysen

Aus den aus OBSC stammenden Zellen wurden zufällige Proben ausgewählt, welche mittels Microarray–Untersuchungen weiter analysiert wurden. Dabei wurde auf ein ausgewogenes Verhältnis zwischen *Leader Cells* und *Stationary Cells*, Einzelzellen und Pools sowie auf ein ausgewogenes Herkunftsverhältnis der Zellen geachtet. Besonderes Augenmerk lag auf der Fragestellung, inwieweit die *Leader Cells* von den *Stationary Cells* transkriptomisch abgrenzbar sind.

Dabei wurde zuerst eine Analyse mittels bioinformatischer Datenbanken durchgeführt, um Unterschiede zwischen den *Leader Cells* und *Stationary Cells* in den zellulären Signalwegen und Komponenten sowie in den molekularen Prozessen darzustellen. Für eine höhere Validität wurde die Gene Ontology Datenbank (GO) sowie weitere Datenbanken gesammelt (PATHWAY) isoliert betrachtet. In der gesammelten Analyse (Figur 9a) zeigte sich eine deutliche Anreicherung vieler für Migration bedeutsamer Signalwege. So weisen *Leader Cells* im Vergleich zu *Stationary Cells* eine stabileres Zytoskelett auf und exprimieren verstärkt Gene, die für die Anheftung an andere Zellen oder die Extrazelluläre Matrix bedeutsam sind. Weiter interagieren die migrierenden Zellen verstärkt mit Ihrer Umgebung und modellieren diese entsprechend. Zusätzlich zeigen Sie aufgrund Ihrer Bewegungen einen höheren metabolischen Umsatz. Als Folge dieses kontinuierlich erhöhten metabolischen Energieumsatz auf.



**Figur 9** Auflistung einer Auswahl der signifikant hochregulierten Signalwege in LEAs verglichen mit STAs a nach der GO- Datenbank b nach der PATHWAY Analyse. Die eckige Klammer verdeutlicht eine Signifikanz des jeweiligen Signalwegs nach dem adjustierten P-Wert. Das Kürzel<sup>1</sup> verdeutlicht die Teilhabe des Genes TNC an dem jeweiligen Signalweg ns=nicht signifikant; \*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001

Weiter wurde der Datensatz neben Patienten-übergreifenden auch auf individuelle Unterschiede zwischen den *Leader Cells* und den *Stationary Cells* für jeden der drei Patienten RAV 21, RAV 26 und RAV 27 verglichen. Hierbei wurden auch Follow-Up Daten der jeweiligen Patienten berücksichtigt, um ein möglichst vollständiges zusammenhängendes Bild der Prognosefaktoren und des Krankheitsbildes zeichnen zu können. Es wurden sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene separat betrachtet.

Insgesamt zeigten sich für RAV 21 fast keine nach dem adj. P-Value signifikanten Gengruppen innerhalb der Pathway und GO- Analyse. Es zeigten sich lediglich in den Einzelzellen des Patienten mehrere Signalwege, die mit der Purinsynthese assoziiert sind, in den *Leader Cells* gegenüber den *Stationary Cells* erhöht. Dies ist konsistent mit früheren Untersuchungen (Xiuxing Wang et al., 2017), nach welchen BTICs durch eine erhöhte Purinsynthese über erhöhte Mengen an Energie zur Teilung und Selbsterneuerung für die Tumorprogression verfügen. Möglicherweise ist die Bedeutung dieser Energiegewinnung innerhalb der BTICs nochmal von besonderer Bedeutung für die *Leader Cells*, da diese aufgrund Ihres migrierenden Charakters nochmal auf zusätzliche Energie angewiesen sind.

In RAV 26 zeigte sich eine Hochregulation des endoplasmatischen Retikulums (GO:0005788), was für erhöhte Sezernierungstätigkeit der entsprechenden Zellen spricht. In der PATHWAY-Analyse zeigte sich zudem eine Erhöhung von Signalwegen, die mit der Modulierung der EZM assoziiert sind, etwa *Extracellular Matrix organization* und *Collagen Formation* (beide Reactome-Datenbank).

Für den Patienten mit sekundärem Glioblastom (RAV 27) wurde eine Herunterregulierung der ionotropen (GO:0008328) bzw. insbesondere der AMPA Glutamatkanäle (GO:0032281) in den Leader Cells im Vergleich zu den Stationary Cells beobachtet. Dies war vom besonderen Interesse, da im Krankheitsverlauf früh epileptische Anfälle bei dem Patienten auftraten. Aufgrund der Möglichkeit des exzitatorischen Zelltodes durch Glutamatanhäufung (van Vuurden et al., 2009) erfolgte in denen für die Tumorerhaltung besonders bedeutsamen Leader Cells hier offensichtlich eine Art Selektion. Aufgrund der exponierten Lage der Leader Cells im Tumorumgebenden Gewebe ist die Selektion hier stärker ausgeprägt als im Tumorzentrum. Zusätzlich erlaubte die längere Progredienz eines sekundären Glioblastoms eine ausgedehntere Selektionierung. Gleichzeitig waren in den Leader Cells dieses Patienten Signalwege zur Antigenprozessierung und Antigenpräsentation (GO:0042590) hochreguliert, welches in früheren Untersuchungen als positiver Prädiktionsfaktor beschrieben wurde (Thuring, Geironson, & Paulsson, 2014). In der Follow-Up Analyse zeigte sich konstant eine erhöhte Überlebenszeit von 24 Monaten nach GBM-Operation.

## 3.2.2 Differentially expressed genes

Zur Etablierung einer verlässlichen *Leader Cell* Signatur wurden weiter auch die *differentially expressed genes* (DEGs) zwischen den *Leader Cells* und *Stationary Cells* betrachten. Hierbei zeigte sich bei der Betrachtung der *heatmaps* eine distinkte Aufteilung zwischen den *Leader* und *Stationary Cells* in der Gesamtheit der Zellen (Fig. 10a) als auch eine deutlichere Aufteilung der beiden Zellgruppen zwischen den individuellen Patienten (Fig. 10b-d).



Figur 10 Darstellung der DEGs in Form von *Heatmaps* zwischen Leader Cells und Stationary Cells a) in der Gesamtmenge der untersuchten Zellen und individuell in RAV 21 (b); RAV 26 (c); RAV 27 (d).

Allgemein zeigten sich jedoch bei der Microarray Analyse der Einzelzellen keine bis nur kleine Unterschiede in der Genexpression zwischen den *Leader Cells* und den *Stationary Cells*. Bei den DEG in der Einzelzellanalyse konnten keine nach dem adjustierten P-Wert (adj. P) signifikanten Gene gefunden werden (adj. P. >0,48). Dennoch wurde das signifikanteste Gen, Tenascin C (TNC), aufgrund seiner zusätzlich konstant erhöhten Expression über alle Zelllinien (Figur 11a), seiner Beteiligung an mehreren bereits gefunden Pathways (Figur 9) und seiner Assoziation mit migrierenden Zellen als potentieller

Signaturgen-Kandidat betrachtet. Für die individuellen DEGs jeder *patient-derived* Zelllinie konnten ebenfalls für keine der drei Zelllinien signifikante Gene (adj. P > 0,07) gefunden werden.

In den Microarray-Ergebnissen der Zellpools ließen sich diese TNC-spezifischen Beobachtungen nicht bestätigen. Auch in diesem Datensatz konnten in der Gesamtanalyse keine signifikanten Gene nach dem adj. P Wert gefunden werden (adj. P. > 0,17). Daher wurde für diesen Datensatz eine *List Comparison* der individuellen DEG Ergebnisse (Figur 11 b) aller 3 Patienten mittels Genomatix erstellt, um potentiell distinkt deregulierte Gene besser darstellen zu können. Dies zeigte zwei weitere Gene (E2F4, ATPA2) als potentielle Signaturgene aufgrund Ihrer in allen individuellen Analysen unabhängig voneinander nach dem p-Wert signifikant erhöhten Expression auf. Zusätzlich wurden die Datensätze der Einzelzellen und der Zellpools auch zusammen analysiert. Hierbei zeigten sich jedoch ebenfalls keine signifikanten Gene (adj. P. > 0,65)



Figur 11 Indikationen für Signaturgene durch TNC Expression und Genomatix-Analyse

**a** Veranschaulichung der TNC Expression in den Einzelzell-Microarrays. Ein positiver log Fold Change (logFC) steht hierbei für einen höhere Genexpression innerhalb der Leader Cells **b** Graphische Darstellung der *List Comparison* von Genomatix, bei der die sich überschneidenden Gene dargestellt werden.

Generell zeigten die Daten sehr wenige DEGs zwischen den zwei Zellgruppen. Aufgrund der unergiebigen Ausbeute an signifikant veränderten Genen wurden weiterführende Qualitätsanalysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich unter anderem, dass die Unterschiede zwischen den DEGs der Einzelzellen und Zellpools innerhalb der gleichen Patienten deutlich stärker ausgeprägt waren als zwischen den *Leader* und *Stationary Cells*.

## 3.3 qPCR Ergebnisse für potentielle Signaturgene

Eine Validierung der Microarray Ergebnisse wurde zuerst nur in den zuvor mittels HT-Methoden getesteten Zellen bzw. Zellpools angestrebt. Dafür wurden Primer für jedes der 3 Kandidatengene konstruiert, deren Amplifkationsbereich möglichst nahe oder um die entsprechende Microarraysonde lag. Hierbei zeigte sich, dass nur für TNC sowohl über die Einzelzellen als auch die Zellpools ein signifikanter Unterschied zwischen LEACs und STACs zu finden war, während dieses für die zwei anderen Kandidatengene nicht oder nur in eingeschränktem Maße möglich war (Figur 12). Daher wurde eine Erweiterung der Testung auf das gesamte Kollektiv nur für TNC durchgeführt.



Figur 12 Validierung der Kandidatengene mittels qPCR

qPCR Ergebnisse der Microarray-Proben der Leader Cells (LEA) und der Stationary Cells (STA) für die Kandidatengene SERCA2, E2F4 und TNC. Markiert sind neben den individuellen Werten der Median und die Standardabweichung ns=nicht signifikant;\*\*\*=p<0,001

## 3.4 qPCR Ergebnisse für Tenascin C

Insgesamt wurden 228 Einzelzellen sowie 22 Zellpools mittels qPCR auf Ihre spezifische Expression von TNC getestet. In den OBSC-Zellproben war ein sehr deutlicher Unterschied in der TNC-Expression zwischen den *Leader Cells* und den *Stationary Cells* festzustellen. In den primären Patientenproben war ein sehr schwacher, womöglich ebenfalls bedeutsamer Unterschied zu sehen. Jedoch zeigten sich große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten sowohl in den OBSC-Zellproben als auch in den primären Glioblastomproben. In einigen der untersuchten Patienten ist die TNC-Expression in den migrierenden Zellen signifikant höher als in den nicht migrierenden (Figur 13). Jedoch scheint es ebenfalls Patienten zu geben, bei denen eine Invasion in das umlegende Hirngewebe unabhängig von einer TNC-Expression der jeweiligen *Leader Cells* möglich ist. Als generelles Signaturgen einer migrierenden Zelle ist TNC damit primär nicht geeignet. Weiter konnte mit den sehr begrenzten Follow-Up Daten auch kein prognostischer Faktor der TNC-Expression verifiziert bzw. falsifiziert werden.



A TNC Expression in primären Patienten- und OBSC-Proben

#### Figur 13 TNC Ergebnisse im Kollektiv

TNC Expression gesammelt in den zentralen Tumorproben (CEN) und aus Proben des invasiven Randes (RIM) sowie von Leader Cells (LEA) und der Stationary Cells (STA) (a) und individuell aus OBSC-Proben (b) und Patientenproben (c). Markiert sind neben den individuellen Werten der Median und die Standardabweichung ns=nicht signifikant; \*=p<0,05;\*\*\*=p<0,001

# 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit versuchte, eine eindeutige Signatur für die *Leader Cells* zu finden, die führend für die Invasion des GBMs sind. Primäres Ziel der vorgelegten Arbeit war es, in verschiedenen Modellen das observierte Migrationsverhalten der Zellen mit der genetischen Ausstattung zu vergleichen und so für die Migration bedeutsame Gene zu identifizieren.

Dies ist nur in eingeschränktem Maße gelungen, da die Unterschiede zwischen den migrierenden BTICs und den nicht migrierenden im genomischen Transkript deutlich kleiner waren als erwartet. Im Folgenden sollen die Gründe dafür diskutiert und Schwierigkeiten benannt werden.

## Validität der erhobenen Daten

Die erhobenen Microarray Daten weisen innerhalb der individuellen Patientendaten Parallelen zu bereits berichteten genetischen Alterationen in BTICs auf. Dieses erhöht die Validität der Daten und ermöglicht die Konkretisierung von beschriebenen Veränderungen auf die verschiedenen Subgruppen der BTICs. Die gefundenen Pathway und GO-Veränderungen sowohl in RAV 21 und RAV 27 fügen sich gut ins Bild der Leader Cells ein, die aufgrund ihrer Migration auf besonders viel Energie angewiesen sind und sich in einem Umfeld, welches potentiell reich an Glutamat ist, bewegen. Aufgrund des geringen Datensatzes sind jedoch generelle Aussagen zu den individuell beobachteten Veränderungen nicht möglich. Die verwendete Methode der Microarray Hybridisierung weist zudem eine Anzahl an Schwächen auf: So werden geringe Expressionsunterschiede aufgrund der Hintergrund-Fluoreszenz nicht adäquat dargestellt und die Untersuchung ist auf die Gene limitiert, für die die Arrays konstruiert worden sind (Zhao, Fung-Leung, Bittner, Ngo, & Liu, 2014). Möglicherweise könnte daher eine erneute Untersuchung der Zellen mit einer anderen High-Throughput Methode, etwa mittels Next Generation Sequencing (NGS), neue Aufschlüsse bringen. Das NGS ist dem Microarray überlegen, da es keine Fluoreszenz als verzerrenden Parameter einführt und nicht zuvor konstruierte Genomsequenzen benötigt (Zhao et al., 2014).

#### 4 Diskussion

## **Isolierung von BTICs mittels 5-Ala Fluoreszenz**

Für die Gewinnung von BTICs möglichst nahe an der *in vivo* Situation wurde angestrebt, aus primärem Patientenmaterial BTICs zu isolieren und anhand von zuvor an *patient derived cells* etablierten Kriterien zu analysieren. Die BTICs wurden unter dem Mikroskop mittels 5-ALA identifiziert, da BTICs im Vergleich mit Gliazellen höhere Protoporphyrin IX Spiegel aufweisen (Fujishiro et al., 2018). Mittels 5-ALA kann zudem der invasive Teil des GBMs, dem eine besondere Bedeutung für die Rezidivbildung zukommt, besonders gut dargestellt werden (S. J. Smith et al., 2017). Zudem ermöglicht eine Anfärbung der Zellen mittels 5-ALA die Gewinnung vitaler Zellen, welche für die WTA unerlässlich sind.

Der beschriebene Versuchsaufbau sollte es ermöglichen, BTICs aus dem Rand einer primären GBM Probe möglichst nahe an der *in vivo* Situation zu gewinnen und ohne weitere Kulturpassagen aufzuarbeiten. Inwieweit aus primären Patientenproben tatsächlich BTICs isoliert werden konnte, bleibt nach Abschluss der Versuche unklar, da die isolierten Zellen nur teilweise dem erwarteten Profil basierend auf Analysen der *patient derived cells* entsprachen. Die Methoden der Zellisolation durch Mikromanipulation und Genomamplifikation mittels WTA wurden bereits vielfach in vergleichbaren Projekten angewendet (Leidgens, 2015), sodass vorrangig die Selektion der BTICs mittels höherer 5-ALA Fluoreszenz in Frage zu stellen ist.

So finden sich in der Literatur ebenfalls Arbeiten, die eine niedrigere Fluoreszenz von BTICs nach Färbung mit 5-ALA im Vergleich zu Gliomazellen postulieren (W. Wang et al., 2017). Aufgrund der Tatsache, dass 5-ALA Fluoreszenz nicht homogen ist, ist die methodische Definition eines stark und schwach fluoreszierenden Tumorabschnittes sowohl intraoperativ als auch während der Isolierung sehr subjektiv. Die mögliche Relevanz der unterschiedlichen Fluoreszenzstärke, insbesondere im Vergleich der *Leader* und *Stationary Cells,* zwischen verschiedenen Patienten wurde in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt und erhöht daher möglicherweise die falsch-positiv Rate in einzelnen Patienten. Zudem erschwert diese Variabilität der Fluoreszenz die Kombination von 5-ALA Daten aus verschiedenen Zentren, wie es in der vorliegenden Studie geschehen ist (Díez Valle, Hadjipanayis, & Stummer, 2019).

Aufgrund des teilweise verzögerten Aufarbeitungsbeginns durch die Probenaquirierung aus verschiedenen Zentren kam es womöglich zu einer unfreiwilligen Selektion vor Beginn der Isolierung. Durch die begrenzte Halbwertszeit von 5-ALA von etwa 3 Stunden (Stummer et al., 2000) war die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension mit qualitativ hochwertigen Zellen erschwert.

Weiter ist aufgrund der relativen Seltenheit von BTICs und der unspezifischen Anfärbung von Tumorzellen durch 5-ALA insbesondere im Tumorzentrum von einer hohen falschpositiv Rate auszugehen. Neuere Arbeiten weisen zudem darauf hin, dass innerhalb und in der Peripherie eines Tumors bis zur Hälfte der Zellen Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) sind, welche mittels eines tumorfördernden M2 Phänotyps in der Lage sind, antiinflammatorische und immunsuppressive Faktoren zu produzieren (Xia et al., 2019). Inwieweit solche Tumor-assoziierten-Zellen innerhalb des Tumor-*Microenvironments* aufgrund ihres pathologischen Phänotyps ebenfalls 5-ALA verarbeiten und daher intraoperativ fluoreszieren, ist derzeit noch nicht untersucht. Mittels der vorliegenden Arbeit ist nicht abzuschätzen, ob es durch die falsch-positiv isolierten Zellen zu einer relevanten Verzerrung der Ergebnisse in einzelnen Proben kam.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit einzelne Patientenproben möglicherweise sehr heterogene Reaktionen auf die verwendete 5-ALA Färbung für die Aufarbeitung von BTIC Zellen gezeigt haben. Dies könnte eine Erklärung für die gefunden Ergebnisse der sich nur teilweise entsprechenden genetischen Profile zwischen *patient derived cells* und primären Patientenproben sein. In Zukunft sollten daher zusätzlich zu der 5-ALA Färbung weitere Kriterien, beispielweise die mikroskopisch prüfbare Zellmorphologie, für BTICs eingeführt werden. So sind die *Leader Cells* als spindelförmige Population beschrieben worden, während die *Stationary Cells* vorrangig rund sind (Leidgens, 2015).

Um die beschriebene Unsicherheit über die Bedeutung der Fluoreszenzintensität auf 5-ALA zu reduzieren, könnte die Isolation von primären Zellen und die Etablierung einer *patient derived cell line* aus derselben Probe die verwendete Methodik weiter validieren. Es bleibt unstrittig, dass für die Gewinnung vitaler BTSCs aus einer primären GBM Probe aufgrund des Fehlens eines generellen Markers für BTSCs (Medema, 2013) die Mikromanipulation nach 5-ALA Färbung eine sinnvolle Option darstellt, dennoch sollte in Zukunft auch die Möglichkeit einer dadurch entstehenden zusätzlichen Heterogenität bedacht werden.

## Heterogenität des Glioblastoms

Nach (Verhaak et al., 2010) verfügen die einzelnen Subtypen des Glioblastoms über eigene Signaturgene, welche sie von den anderen Subgruppen abgrenzen und ihre Herkunft reflektieren. Die vorliegende Arbeit versuchte eine *Leader Cell* Signatur zu ermitteln, um ein besseres Verständnis der Migration zu ermöglich und möglicherweise Aufschlüsse über die weiterhin unklare Herkunft dieser Zellen zu gewinnen (Van Meir et al., 2010). Der gemeinsame Phänotyp der *Leader Cells* legt eine gemeinsame genetische Komponente dieser Zellen nahe.

Die gefundenen Ergebnisse verdeutlichen jedoch nur die Heterogenität des GBMs, die offensichtlich nicht nur in den allgemeinen Tumorzellen, sondern auch in der Subgruppe der BTICs vorhanden ist und sich innerhalb dieser auch auf den invasiven Teil der BTICs erstreckt. Eine eindeutige Signatur, die über mehrere Patienten hinweg Bestand hat, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden.

Innerhalb des Transkriptoms der migrierenden Zellen scheint es demzufolge keine essenziellen Alterationen im Sinne hochregulierter Gene oder aktivierter *Pathways* zu geben, die in jeder migrierenden Zelle zu finden sind und daher kausal mit der Migration verbunden sind. Durch die durchgeführte *Pathway* Analyse zeigt sich, dass die *Leader Cells* zwar generell gemeinsame Gengruppen hochregulieren und daher über einen gemeinsamen Phänotyp verfügen, die Entstehung dieses gemeinsamen Phänotyps aber aller Wahrscheinlichkeit multifaktoriell und nicht *upstream* auf einzelne genomische Mutationsereignisse im Sinne von Signaturgenen zurückzuführen ist. Ebenso kann keine Aussage über eine gemeinsame Herkunft der *Leader Cells* gemacht werden.

Vor dem Hintergrund des stochastischen und hierarchischen Modelles zur Tumorentstehung (Vescovi et al., 2006) lässt sich diese Beobachtung für das Glioblastom am besten mit einer Kombination der beiden Modelle erklären, wie es bereits für andere Tumorentitäten beobachtet wurde (Song et al., 2017). Diese propagiert eine stochastische Entstehung der BTICs, die sich dann wiederum in hierarchischen Strukturen organisieren (Kreso & Dick, 2014). Diese Hypothese wird durch die observierte Heterogenität zwischen verschieden Patienten bei gleichzeitiger Abgrenzbarkeit innerhalb eines Patienten gestützt. Eine weitere Ursache für die observierte Heterogenität könnte die Behandlung mit Temozolomid (TMZ) und Radiotherapie sein, da diese ebenfalls zu einer Entstehung von hypermutierten Klonen beitragen kann (Bernstock et al., 2019). Dagegen spricht jedoch, dass BTICs typischerweise nicht auf Therapieversuche ansprechen (Bao, Wu, McLendon, et al., 2006). Möglicherweise stellen Therapieversuche daher bisweilen nur ein weiteres stochastisches Ereignis für BTICs dar.

Der Stammzellcharakter einzelner BTICs wird hauptsächlich durch die drei Faktoren der Genetik, der Tumor-Mikroumgebung, und der Epigenetik beeinflusst (Kreso & Dick, 2014). Aufgrund der gefunden Ergebnisse muss in Erwägung gezogen werden, dass sich außerhalb der Genetik konstantere Faktoren für die Initiierung einer Migrationsbewegung finden lassen. So könnten lokale Gegebenheiten innerhalb der Tumor-Mikroumgebung eine bedeutendere Rolle spielen als bisher angenommen. Die extrazelluläre Matrix als Bestandteil der Mikroumgebung besitzt als Leit- und Ankerstruktur einen positiven, als auch als Barriere einen negativen Einfluss auf die Migration (Lu, Weaver, & Werb, 2012). Veränderungen innerhalb dieser Struktur, beispielsweise eine vermehrte Begradigung und Steifheit der Kollagenfasern, können ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Migration von Zellen haben (Egeblad, Rasch, & Weaver, 2010). Auch wurde bereits gezeigt, dass eine hypoxische Situation innerhalb des Tumors zu einer aktiven Migrationsbewegung von betroffenen Zellen führen kann (Tabassum & Polyak, 2015). Ebenfalls könnten die in einem Glioblastom ablaufenden Prinzipien der Angiogenese, neben ihrem nachgewiesenen Einfluss auf migrierende Endothelzellen (Bao, Wu, Sathornsumetee, et al., 2006) einen Einfluss auf andere migrierende Zellen haben. Jedoch wurde für die Tumor-Mikroumgebung bereits eine hohe Heterogenität und Plastizität der vorhanden Zellen beschrieben (Sattiraju & Mintz, 2019). Auch ist über eine variable DNA-Methylierung von Glioblastomen berichtet worden (Klughammer et al., 2018), sodass die Suche nach konstanten Faktoren generell erschwert scheint.

## TNC als Marker für Leader Cells

TNC ist ein EZM Protein, welches ubiquitär in Glioblastomen, nicht jedoch im gesunden Hirngewebe exprimiert wird (Nie et al., 2015). Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass TNC an der abnormalen Migration im Glioblastom beteiligt ist und im Transkriptom von BTICs exprimiert wird. Allerdings zeigen über mehrere Patient-*derived* Zelllinien hinweg nicht alle untersuchten BTICs eine erhöhte Expression von TNC. Daher kann TNC nicht als Treibergen für die Migration von BTICs postuliert werden. Gleichzeitig war die untersuchte Gruppe von Patienten zu klein, um allgemeine Aussagen über die statistische Häufigkeit des Auftretens von TNC oder dessen prognostischen Wert zu treffen. Der Nachweis von TNC sowohl im OBSC-Modell als auch in primärem Patientenmaterial bestärkt weiter den Modellansatz als realitätsnah. Aufgrund der Tatsache, dass die TNC Konzentration von Gliomazellen generell erhöht ist (Brösicke & Faissner, 2015), müsste jedoch gezeigt werden, dass die TNC+-Zellen aus dem primären Patientenmaterial weitere BTIC-Merkmale, etwa den Stammzellmarker CD 133, exprimieren (Singh et al., 2003) oder die Fähigkeit aufweisen, selber wieder heterogene Tumore bilden zu können (Galli et al., 2004).

In seiner Funktion als EZM-Protein kann TNC verschiedene Rollen innerhalb der Migrationsförderung einnehmen, die aber bei TNC negativen Patienten möglicherweise schlicht von anderen EZM-Proteinen übernommen werden können (Sarkar et al., 2017). So wurde für andere Tumorentitäten berichtet, dass eine erhöhte TNC Expression im *Microenvironment* die Aktivierung des NOTCH-Pathways fördert (Oskarsson et al., 2011). Dieser kann aber ebenfalls durch andere Faktoren innerhalb des *Microenvironments* beein-flusst werden, welche womöglich bei TNC-negativen Patienten eine prominentere Rolle einnehmen. Als möglicher Faktor wurde hier bereits TGF- $\beta$  diskutiert (Hau et al., 2006), ebenso denkbar wäre es, dass andere Zellen innerhalb des Tumors NOTCH in BTICs aktivieren können (Sarkar et al., 2017). Für eine Interaktion einer Zelle mit TNC sind zudem Integrine wie  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  oder  $\alpha 9\beta 1$  vonnöten (Orend & Chiquet-Ehrismann, 2006), die nach Mutationen im Tumor möglicherweise bei einem Teil der Patienten nicht mehr vorhanden sind, weswegen die TNC Expression herunterreguliert wird.

Weiter beeinflusst TNC die Tumor-Angiogenese positiv, da in Kultur dadurch Endothelzellen zum Wachstum und zur Migration angeregt werden (Whitby et al., 1995). Dies würde nahelegen, dass entlang der Migrationswege der BTICs neue Blutgefäße entstehen, welche die migrierenden Zellen versorgen. Jedoch ist eine gegen die Gefäßneubildung gerichtete Therapie beim GBM nicht mit einer besseren Prognose verbunden (Khasraw, Ameratunga, Grant, Wheeler, & Pavlakis, 2014). Zudem zeigen MR-Studien kein Nachweis einer Neoangionese in Glioma-Patienten, sondern vielmehr eine Anhaftung des Tumors an bereits existierende Blutgefäße (Bernsen, van der Laak, Küsters, van der Ven, & Wesseling, 2005). Vermutlich überwiegt *in vivo* daher ein Modellierungseffekt, bei welchem die Blutgefäße durch den unphysiologischen Kontakt zu TNC mit einer Endothelremodellierung und erhöhter Durchlässigkeit reagieren (Rupp et al., 2016). Möglicherweise könnte das OBSC-Modell bei TNC+- Patienten dazu genutzt werden, eine molekulare Veränderung der Endothelzellen nachzuweisen, um diese Hypothese weiter zu stärken.

Die Rolle von TNC in Migration ist jedoch ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten TNC Expression und einer CD47gesteuerten Phagozytose in Glioblastomen postuliert, welcher impliziert, dass eine erhöhte TNC Expression im GBM auch als ein Verteidigungsmechanismus der angeborenen Immunantwort zu verstehen sein könnte (Xia et al., 2019). Dieses würde auf TNC als prognostisch günstigen Faktor hindeuten; genauso ist jedoch denkbar, dass TNC innerhalb des Tumors sowohl prognostisch günstige Einflüsse auf Tumorzellen als auch prognostisch ungünstige Einflüsse auf BTICs ausübt. Möglicherweise spielen hier Wechselwirkungen innerhalb der beschriebenen CSC-Nische zwischen Zellen und der EZM eine Rolle. So zeigen Versuche mit TNC-*Knockout* Zellen eine erhöhte Proliferation bei verminderter Migration (Xia et al., 2016), die ebenfalls für eine ambivalente Rolle von TNC sprechen würden.

Eine ambivalente Rolle des Proteins würde ebenfalls den bisher fehlenden prognostischen Wert einer TNC Expression erklären. Bei fortlaufender Bestätigung dieser Hypothese könnte bei der zukünftig immer weiter personalisierten Medizin die TNC Expression eines Glioblastoms als prognostisches Kriterium verwendet werden (Reinhard et al., 2016), wie beispielsweise für das Mammakarzinom mit Her2/neu und BRCA1 bereits solche Marker in Verwendung sind (Mehta et al., 2010). So könnte eine TNC Expression als Kriterium für eine supramaximale Resektion, für eine erweiterte Radiotherapie oder engmaschigere Nachkontrollen herangezogen werden.

## Migration beim Glioblastom - Kollektiv statt Singular

Glioblastome sind als komplexe Strukturen zu verstehen, in der die einzelnen Zellen und Populationen auf vielfältige Weise miteinander kommunizieren und kooperieren, vergleichbar mit einem funktionellen Organ (Osswald et al., 2015). Aufgrund des Selektionsdruckes innerhalb eines Tumors ist eine Kooperation zwischen heterogenen Subklonen zu erwarten, von der beide profitieren und dadurch das Tumorwachstum beschleunigen (Tabassum & Polyak, 2015). Die Betrachtung der *Leader Cells* als mit der EZM und den umgebenden Zellen interagierende Zelle legt folglich nahe, dass die Migration nicht von einzelnen Zellen ausgeht, sondern von kooperierenden Subklonen initiiert und gesteuert wird.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene Phänotyp der *Leader Cells* weist zahlreiche Hinweise auf eine Vielzahl an Zell-Zell Kontakten auf, welche eher auf ein Modell einer kollektiven Migration mehrerer Zellen verschiedenen Ursprungs hindeutet als auf eine Migration vieler individueller Zellen (Friedl, Locker, Sahai, & Segall, 2012). Auch weisen die *Pathway* Analysen der Zellen des OBSC-Modells (Figur 3) Charakteristika einer kollektiven Migration nach, etwa die Überexpression von Cadherinen in den *Leader Cells*, welche kollektive und kooperative Zellmigration fördern (Stuelten, Parent, & Montell, 2018).

Inwieweit das OBSC-Modell alle kommunikativen Aspekte der Zellmigration adäquat abbilden kann, ist noch nicht abschließend erforscht. So gibt es keinerlei Untersuchungen, ob die in Glioblastomen nachgewiesenen *Tumor Microtubes*, welche ein Netzwerk innerhalb des Tumors aufbauen und an Zell-Zell Kommunikation (Osswald et al., 2015) sowie an Kommunikation zwischen CSC-Nischen (Inaba, Buszczak, & Yamashita, 2015) beteiligt sind, ebenfalls in OBSCs ausgebildet werden. Ähnlich gibt es für die kürzlich beschriebenen synaptischen Kontakte zwischen Neuronen und Gliomazellen (Venkataramani et al., 2019) keine Studien die zeigen, ob diese auch in OBSCs vorhanden sind. Durch die implizierte kollektive Migration im GBM rücken solche Kommunikationsmethoden der Tumorzellen in den Vordergrund, sodass weiteres Wissen um die Existenz solcher Strukturen in den verfügbaren Invasionsmodellen für GBM vonnöten ist.

Neben den kommunikativen Dimensionen der Migration müssen auch biomechanische Prozesse berücksichtigt werden, deren Anteile an der Selektion und Initiierung der Migration ebenfalls noch nicht abschließend geklärt sind. So führt Zug am hinteren Ende einer Einzelzelle zu ihrer Bewegung in die entgegengesetzte Richtung (Weber, Bjerke, & DeSimone, 2012). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in einer kollektiven Migration *Follower Cells* durch mechanische Zugkräfte einen erheblichen Anteil an der Selektion und Steuerung der *Leader Cells* haben (Vishwakarma et al., 2018). Für ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen dieser kollektiven Migration wäre daher auch eine Charakterisierung der *Follower Cells*, welche sich im OBSC-Modell hinter den *Leader Cells* in der invasiven Front befinden, von Bedeutung. Möglicherweise bilden sich alle Charakteristika der *Leader Cells* erst *downstream* nach mechanischer Selektion durch ihre künftigen *Follower Cells* aus (Vishwakarma et al., 2018), welches ebenfalls eine Erklärung für die gefundene Heterogenität darstellen könnte. Daher sind neue Methoden und Ansätze, die die Isolierung und Charakterisierung der *Follower Cells* sowohl aus OBSCs als auch aus primären Patientenproben ermöglichen, dringend notwendig.

## **Die CSC Nische**

Die CSC Nische ist definiert als die Mikroumgebung der jeweiligen Zelle, in welcher die Zelle ihre spezifischen multi- bzw. pluripotenten Charakteristika beibehalten kann (Fuchs, Tumbar, & Guasch, 2004). Sie besteht neben den CSC aus supportiven Zellen und spezialisierter EZM (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014), welche in einem Tumor sich ebenfalls wandelt, um die BTICs zu unterstützen (Cabarcas et al., 2011). Wesentliche Faktoren sind die Induktion der Angiogenese und die Immunevasion (Plaks et al., 2015).

Die vorliegende Arbeit ermöglicht eine genauere Charakterisierung dieser Nische, indem sie Hinweise auf TNC als Bestandteil dieser Nische liefert. TNC scheint also sowohl in der physiologischen NSC Nische als auch in der pathologischen CSC Nische vorhanden zu sein. Aufgrund der Tatsache, dass GBM Zellen in der Lage sind, die EZM und die Bestandteile ihrer Nische zu ihrem Vorteil zu modulieren (Brösicke & Faissner, 2015), kann neben den besprochenen angioproliferativen Charakteristika von TNC ein positiver Einfluss von TNC auf die Immunevasion von BTICS angenommen werden. Die Überexpression von EZM-Proteinen innerhalb der Nische erschwert etwa die Diffusion von therapeutischen Wirkstoffen an ihren Wirkort (Zamecnik, 2005). Des Weiteren ist beschrieben, dass TNC systemisch in zirkulierenden Exosomen eine immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen entfalten kann (Mirzaei et al., 2018). Da die TNC-Konzentration innerhalb der Mikroumgebung der BTICs um ein zehnfaches höher ist (Hellwinkel et al., 2016), kann auch hier von einem aktiven immunomodulatorischen Effekt ausgegangen werden. Dies könnte zudem ein Erklärungsansatz dafür sein, dass beim GBM bisher im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten T-Zell spezifische Therapien (Checkpoint-Inhibitoren) keine Prognoseverbesserung zeigen (Xin Wang et al., 2019). Möglicherweise könnten in Zukunft gezielte Therapien gegen die EZM Bestandteile dieser Nischen zur Prognoseverbesserung beim GBM führen (Reinhard et al., 2016).

Die Bedeutung von TNC als Bestandteil dieser Nische wird dadurch unterstrichen, dass es als einziges von BTICs sezerniert wird (Mahesparan et al., 2003). Möglicherweise kann dieses EZM-Protein bei Patienten mit TNC-negativen BTICs von anderen Zellen in der Nische substituiert werden. Insbesondere hier zu nennen wären die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs). So sezernieren diese etwa TGF- $\beta$ , welches über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen 2 (MMP-2) und 9 (MMP-9) zur Förderung der Invasion (Schiffer et al., 2018) führt. Da TGF- $\beta$  unter anderem auch die Expression von TNC induzieren kann (Hau et al., 2006), liegt es nahe, weitere Forschung zur TNC Expression der in der CSC-Nische vorhanden supportiven Zellen zu betreiben.

# 5. Zusammenfassung

Das Glioblastom gehört als maligner Hirntumor heute zu den tödlichsten Krebserkrankungen weltweit. Aufgrund seines invasiven und diffusen Wachstums sowie des Vorhandenseins von BTICs ist eine vollständige Resektion des Tumors unmöglich, welches wiederum ursächlich für die hohe Mortalität ist.

Grundlage dieser Arbeit bildet die Dissertation von Dr. rer. physiol. Verena Leidgens. Innerhalb ihrer Arbeit konnte im OBSC-Model eine Aufsplittung der BTICs in verschiedene migrierende und stationäre Zellgruppen festgestellt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die einzelnen Zellgruppen - insbesondere die in der Migration führenden *Leader Cells*, molekular zu charakterisieren und auch in primärem Patientenmaterial nachzuweisen. Bei der Charakterisierung dieser invasiven BTICs wurde eine größere Heterogenität als erwartet vorgefunden, sodass keine Signaturgene und keine spezifische Expressionssignatur gefunden werden konnte. Diese Heterogenität, die beim Glioblastom vielfach beschrieben wird, hat ihren Ursprung möglicherweise in veränderlichen Faktoren innerhalb des Tumor *Microenvironments* oder Wechselwirkungen zwischen den *Leader Cells* und anderen Zellgruppen innerhalb des Tumors.

Durch die qPCR Analyse des Signaturgen-Kandidaten TNC und den dadurch erzielten *in vitro* Nachweis von TNC<sup>+</sup> BTICs sowie der *in vivo* Validierung dieses Ergebnisses trägt diese Arbeit dazu bei, die Bedeutung dieses extrazellulären Proteins für die Migration im Glioblastom weiter zu unterstreichen. Durch die Verwendung eines sehr realitätsnahen Modelles, des OBSC-Modelles, kann die Existenz des Proteins spezifisch für BTICs an der invasiven Front nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine relevante Rolle von TNC innerhalb des *Microenvironments* der migrierenden Zelle hin, die möglicherweise therapeutisch beeinflusst werden kann. Jedoch wurde auch TNC als bester verfügbarer Kandidat nicht in allen Patienten signifikant höher innerhalb der *Leader Cells* exprimiert. Es muss daher hinterfragt werden, ob die Aufteilung der BTICs in *Leader* und *Stationary Cells* nicht vielmehr anhand Veränderungen im *Microenvironment* nachzuweisen wäre als mittles molekularen Unterschieden zwischen diesen beiden Zellgruppen.

# 6. Anhang

# 6.1. Abbildungsverzeichnis

Figur 1 Subtypen des GBMs und dazugehörige spezifische pathologische Veränderungen.9
Figur 2 Modelle zur Entstehung von CSCs 11
Figur 3 Formierung verschiedener Subpopulationen der U87 GBM Zelllinie nach
Implantation in OBSCs
Figur 4 Zellsuspension von primärem Patientenmaterial nach Präparation
Figur 5Abfolge eines Pickvorgangs
Figur 6 Beispiel für eine Kontroll-PCR nach Elektrophorese
Figur 7 konstruierter Adapter für Eppendorf Mikromanipulator35
Figur 8 OBSC Präparation
Figure 9 Auflistung einer Auswahl der signifikant hochregulierten Signalwege in LEAs
verglichen mit STAs
Figur 10 Darstellung der DEGs in Form von Heatmaps zwischen Leader Cells und
Stationary Cells
Figure 11 Indikationen für Signaturgene durch TNC Expression und Genomatix-Analyse
Figur 12 Validierung der Kandidatengene mittels qPCR47
Figure 13 TNC Ergebnisse im Kollektiv

# 7. Literaturverzeichnis

- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006).
  Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756–760. https://doi.org/10.1038/nature05236
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*, 66(16), 7843–7848. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1010
- Beadle, C., Assanah, M. C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S. S., & Canoll, P. (2008).
  The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3357–3368. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0319
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., ... Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–4015. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
- Beier, D., Wischhusen, J., Dietmaier, W., Hau, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., ... Beier,
  C. P. (2008). CD133 Expression and Cancer Stem Cells Predict Prognosis in Highgrade Oligodendroglial Tumors. *Brain Pathology*, 18(3), 370–377. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00130.x
- Bernsen, H., van der Laak, J., Küsters, B., van der Ven, A., & Wesseling, P. (2005). Gliomatosis cerebri: quantitative proof of vessel recruitment by cooptation instead of angiogenesis. *Journal of Neurosurgery*, 103(4), 702–706. https://doi.org/10.3171/jns.2005.103.4.0702
- Bernstock, J. D., Mooney, J. H., Ilyas, A., Chagoya, G., Estevez-Ordonez, D., Ibrahim, A., & Nakano, I. (2019). Molecular and cellular intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma: clinical and translational implications. *Journal of Neurosurgery*, 1–9. https://doi.org/10.3171/2019.5.JNS19364
- Borovski, T., Vermeulen, L., Sprick, M. R., & Medema, J. P. (2009). One renegade cancer stem cell? *Cell Cycle*, 8(6), 803–808. https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7935
- Brösicke, N., & Faissner, A. (2015). Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), 131–140. https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000071
- Bush, N. A. O., Chang, S. M., & Berger, M. S. (2017). Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical Review*, 40(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s10143-016-0709-8

- Butowski, N. A. (2015). Epidemiology and diagnosis of brain tumors. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 21(2 Neuro-oncology), 301–313. https://doi.org/10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa
- Cabarcas, S. M., Mathews, L. A., & Farrar, W. L. (2011). The cancer stem cell niche-there goes the neighborhood? *International Journal of Cancer*, 129(10), 2315–2327. https://doi.org/10.1002/ijc.26312
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., ... Gilbertson,
  R. J. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*, 11(1),
  69–82. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.11.020
- Carro, M. S., Lim, W. K., Alvarez, M. J., Bollo, R. J., Zhao, X., Snyder, E. Y., ... Iavarone, A. (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*, 463(7279), 318–325. https://doi.org/10.1038/nature08712
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522–526. https://doi.org/10.1038/nature11287
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., ... Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 370(8), 709–722. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345
- Claes, A., Idema, A. J., & Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*, *114*(5), 443–458. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0293-7
- Condeelis, J., & Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, *3*(12), 921–930. https://doi.org/10.1038/nrc1231
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., & Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 455–465. https://doi.org/10.1038/nrn3765
- Darmanis, S., Sloan, S. A., Croote, D., Mignardi, M., Chernikova, S., Samghababi, P., ... Quake, S. R. (2017). Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma HHS Public Access. *Cell Reports*, 31(215), 1399–1410. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.030
- Demuth, T., & Berens, M. E. (n.d.). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. Retrieved from https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11060-004-2751-6.pdf
- Díez Valle, R., Hadjipanayis, C. G., & Stummer, W. (2019). Established and emerging uses of 5-ALA in the brain: an overview. *Journal of Neuro-Oncology*, *141*(3), 487–494.

https://doi.org/10.1007/s11060-018-03087-7

- Dirkse, A., Golebiewska, A., Buder, T., Nazarov, P. V., Muller, A., Poovathingal, S., ... Niclou, S. P. (2019). Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature Communications*, 10(1), 1787. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z
- Egeblad, M., Rasch, M. G., & Weaver, V. M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), 697–706. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015
- Eisele, G., Wick, A., Eisele, A.-C., Clément, P. M., Tonn, J., Tabatabai, G., ... Weller, M. (2014). Cilengitide treatment of newly diagnosed glioblastoma patients does not alter patterns of progression. *Journal of Neuro-Oncology*, *117*(1), 141–145. https://doi.org/10.1007/s11060-014-1365-x
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 445–457. https://doi.org/10.1038/nrm2720
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 14(8), 777–783. https://doi.org/10.1038/ncb2548
- Fuchs, E., Tumbar, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell*, *116*(6), 769–778. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00255-7
- Fujishiro, T., Nonoguchi, N., Pavliukov, M., Ohmura, N., Kawabata, S., Park, Y., ... Kuroiwa, T. (2018). 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 24, 58–68. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.07.004
- G. Gritsenko, P., Ilina, O., & Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of Pathology*, 226(2), 185–199. https://doi.org/10.1002/path.3031
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., ... Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), 7011–7021. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Gogolla, N., Galimberti, I., DePaola, V., & Caroni, P. (2006). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nature Protocols*, 1(3), 1165– 1171. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.168
- Gross, A., Schoendube, J., Zimmermann, S., Steeb, M., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Technologies for Single-Cell Isolation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 16897–16919. https://doi.org/10.3390/ijms160816897

- Hartmann, C. H., & Klein, C. A. (2006). Gene expression profiling of single cells on largescale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, 34(21), e143–e143. https://doi.org/10.1093/nar/gkl740
- Hau, P., Kunz-Schughart, L. A., Rümmele, P., Arslan, F., Dörfelt, A., Koch, H., ...
  Bosserhoff, A.-K. (2006). Tenascin-C protein is induced by Transforming Growth
  Factor-β1 but does not correlate with time to tumor progression in high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 77(1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s11060-005-9000-5
- Hellwinkel, J. E., Redzic, J. S., Harland, T. A., Gunaydin, D., Anchordoquy, T. J., & Graner,
  M. W. (2016). Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune
  responses. *Neuro-Oncology*, *18*(4), 497–506. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov170
- Herold-Mende, C., Mueller, M. M., Bonsanto, M. M., Schmitt, H. P., Kunze, S., & Steiner,
  H.-H. (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during
  glioma progression. *International Journal of Cancer*, 98(3), 362–369.
  https://doi.org/10.1002/ijc.10233
- Hou, L. C., Veeravagu, A., Hsu, A. R., & Tse, V. C. K. (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical Focus*, 20(4), E5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709036
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, *305*, 86–98. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.07.086
- Inaba, M., Buszczak, M., & Yamashita, Y. M. (2015). Nanotubes mediate niche-stem-cell signalling in the Drosophila testis. *Nature*, 523(7560), 329–332. https://doi.org/10.1038/nature14602
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1417–1419. https://doi.org/10.1172/JCI39675
- Karsy, M., Guan, J., Cohen, A. L., Jensen, R. L., & Colman, H. (2017). New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Current Neurology* and Neuroscience Reports, 17(2), 19. https://doi.org/10.1007/s11910-017-0722-5
- Khasraw, M., Ameratunga, M. S., Grant, R., Wheeler, H., & Pavlakis, N. (2014). Antiangiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9), CD008218. https://doi.org/10.1002/14651858.CD008218.pub3
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews. Immunology*, 15(2), 73–86. https://doi.org/10.1038/nri3789
- Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology*, *1*(1), 44–51. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11550301

- Klughammer, J., Kiesel, B., Roetzer, T., Fortelny, N., Nemc, A., Nenning, K.-H., ... Bock,
  C. (2018). The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nature Medicine*, 24(10), 1611–1624. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0156-x
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 275–291. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.02.006
- Kwiatkowska, A., & Symons, M. (2013). Signaling Determinants of Glioma Cell Invasion (pp. 121–141). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4719-7\_7
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L., & Rich, J. N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12), 1203–1217. https://doi.org/10.1101/gad.261982.115
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 722–729. https://doi.org/10.1038/nrn3550
- Leidgens, V. J. (2015). In situ and in vitro profiling of brain tumour initiating cells of highgrade gliomas.
- Leins, A., Riva, P., Lindstedt, R., Davidoff, M. S., Mehraein, P., & Weis, S. (2003). Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer*, 98(11), 2430–2439. https://doi.org/10.1002/cncr.11796
- Li, Z., Wang, H., Eyler, C. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 16705–16709. https://doi.org/10.1074/jbc.R900013200
- Liu, C.-A., Chang, C.-Y., Hsueh, K.-W., Su, H.-L., Chiou, T.-W., Lin, S.-Z., & Harn, H.-J. (2018). Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). https://doi.org/10.3390/ijms19041115
- Louis, D. N. (2006). MOLECULAR PATHOLOGY OF MALIGNANT GLIOMAS. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 97–117. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043
- Louis, D. N., Ellison, D. W., Brat, D. J., Aldape, K., Capper, D., Hawkins, C., ... Wesseling,
  P. (2019). cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathology*, 29(4), 469–472. https://doi.org/10.1111/BPA.12732
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ...

Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4

- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee,
  W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. https://doi.org/10.1083/jcb.201102147
- Mahesparan, R., Read, T.-A., Lund-Johansen, M., Skaftnesmo, K. O., Bjerkvig, R., & Engebraaten, O. (2003). Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathologica*, 105(1), 49–57. https://doi.org/10.1007/s00401-002-0610-0
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., M. Mastrogianakis, G., ... Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068. https://doi.org/10.1038/nature07385
- Medema, J. P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*, *15*(4), 338–344. https://doi.org/10.1038/ncb2717
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318–326. https://doi.org/10.1038/nature10212
- Mehta, S., Shelling, A., Muthukaruppan, A., Lasham, A., Blenkiron, C., Laking, G., & Print,
  C. (2010). Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2(2), 125–148.
  https://doi.org/10.1177/1758834009360519
- Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., ... Dirks, P. B. (2015). Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), 851–856. https://doi.org/10.1073/pnas.1320611111
- Midwood, K. S., Hussenet, T., Langlois, B., & Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0783-6
- Midwood, K. S., & Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and

tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3–4), 287–310. https://doi.org/10.1007/s12079-009-0075-1

- Mirzaei, R., Sarkar, S., Dzikowski, L., Rawji, K. S., Khan, L., Faissner, A., ... Yong, V. W. (2018). Brain tumor-initiating cells export tenascin-C associated with exosomes to suppress T cell activity. *OncoImmunology*, 7(10), e1478647. https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1478647
- Moeckel, S., Meyer, K., Leukel, P., Heudorfer, F., Seliger, C., Stangl, C., ... Hau, P. (2014).
   Response-Predictive Gene Expression Profiling of Glioma Progenitor Cells In Vitro.
   *PLoS ONE*, 9(9), e108632. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108632
- Nie, S., Gurrea, M., Zhu, J., Thakolwiboon, S., Heth, J. A., Muraszko, K. M., ... Lubman,
  D. M. (2015). Tenascin-C: a novel candidate marker for cancer stem cells in glioblastoma identified by tissue microarrays. *Journal of Proteome Research*, 14(2), 814–822. https://doi.org/10.1021/pr5008653
- Orend, G., & Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters*, 244(2), 143–163. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2006.02.017
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H.-F., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., ... Massagué, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature Medicine*, 17(7), 867–874. https://doi.org/10.1038/nm.2379
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., ... Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98. https://doi.org/10.1038/nature16071
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-Oncology*, *16*(7), 896–913. https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S. M., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). Epidemiology of Gliomas. In *Cancer treatment and research* (Vol. 163, pp. 1–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5\_1
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2016). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*, 18(suppl\_5), v1–v75. https://doi.org/10.1093/neuonc/now207
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler,K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.

*Science* (*New York, N.Y.*), *321*(5897), 1807–1812. https://doi.org/10.1126/science.1164382

- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., ... Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), 1396–1401. https://doi.org/10.1126/science.1254257
- Pearson, G. W. (2019). Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5). https://doi.org/10.3390/jcm8050646
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., ... Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3), 157–173. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.02.019
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225–238. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F.,
  ... Joyce, J. A. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine*, 19(10), 1264–1272. https://doi.org/10.1038/nm.3337
- Reinhard, J., Brösicke, N., Theocharidis, U., & Faissner, A. (2016). The extracellular matrix niche microenvironment of neural and cancer stem cells in the brain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.002
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature 2001 414:6859*.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., ... Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* (*New York, N.Y.*), 302(5651), 1704–1709. https://doi.org/10.1126/science.1092053
- Riemenschneider, M. J., Jeuken, J. W. M., Wesseling, P., & Reifenberger, G. (2010). Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica*, *120*(5), 567– 584. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0736-4
- Rojas-Ríos, P., & González-Reyes, A. (2014). Concise Review: The Plasticity of Stem Cell Niches: A General Property Behind Tissue Homeostasis and Repair. *STEM CELLS*, 32(4), 852–859. https://doi.org/10.1002/stem.1621
- Rupp, T., Langlois, B., Koczorowska, M. M., Radwanska, A., Sun, Z., Hussenet, T., ...

Orend, G. (2016). Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-angiogenic Signaling. *Cell Reports*, *17*(10), 2607–2619. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.11.012

- Sarkar, S., Mirzaei, R., Zemp, F. J., Wei, W., Senger, D. L., Robbins, S. M., & Yong, V. W. (2017). Activation of NOTCH Signaling by Tenascin-C Promotes Growth of Human Brain Tumor-Initiating Cells. *Cancer Research*, 77(12), 3231–3243. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2171
- Sattiraju, A., & Mintz, A. (2019). Pericytes in Glioblastomas: Multifaceted Role Within Tumor Microenvironments and Potential for Therapeutic Interventions (pp. 65–91). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16908-4 2
- Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C., & Mellai, M. (2018). Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. Cancers, 11(1). https://doi.org/10.3390/cancers11010005
- Silver, D. J., & Lathia, J. D. (2018). Revealing the glioma cancer stem cell interactome, one niche at a time. *The Journal of Pathology*, 244(3), 260–264. https://doi.org/10.1002/path.5024
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P.
  B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396– 401. https://doi.org/10.1038/nature03128
- Sivasankaran, B., Degen, M., Ghaffari, A., Hegi, M. E., Hamou, M.-F., Ionescu, M.-C. S., ... Boulay, J.-L. (2009). Tenascin-C Is a Novel RBPJ -Induced Target Gene for Notch Signaling in Gliomas. *Cancer Research*, 69(2), 458–465. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2610
- Smith, J. S., Perry, A., Borell, T. J., Lee, H. K., O'Fallon, J., Hosek, S. M., ... Jenkins, R. B. (2000). Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(3), 636– 645. https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.3.636
- Smith, S. J., Diksin, M., Chhaya, S., Sairam, S., Estevez-Cebrero, M. A., & Rahman, R. (2017). The invasive region of glioblastoma defined by 5ALA guided surgery has an altered cancer stem cell marker profile compared to central Tumour. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijms18112452
- Song, Y., Wang, Y., Tong, C., Xi, H., Zhao, X., Wang, Y., & Chen, L. (2017). A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 116(8), 973–989. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.54
- Soroceanu, L., Manning, T. J., & Sontheimer, H. (1999). Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5942– 5954. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05942.1999
- Stuelten, C. H., Parent, C. A., & Montell, D. J. (2018). Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 296– 312. https://doi.org/10.1038/nrc.2018.15
- Stummer, W., Novotny, A., Stepp, H., Goetz, C., Bise, K., & Reulen, H. J. (2000). Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *Journal of Neurosurgery*, 93(6), 1003–1013. https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.6.1003
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C.,
  ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, *10*(5), 459–466. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Sullivan, J. P., Nahed, B. V, Madden, M. W., Oliveira, S. M., Springer, S., Bhere, D., ... Haber, D. A. (2014). Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discovery*, 4(11), 1299–1309. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0471
- Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nature Reviews Cancer*, *15*(8), 473–483. https://doi.org/10.1038/nrc3971
- Thuring, C., Geironson, L., & Paulsson, K. (2014). Tapasin and human leukocyte antigen class I dysregulation correlates with survival in glioblastoma multiforme. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(8), 1101–1109. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175688
- Tlsty, T. D., & Coussens, L. M. (2006). TUMOR STROMA AND REGULATION OF CANCER DEVELOPMENT. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 1(1), 119–150. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224
- Valster, A., Tran, N. L., Nakada, M., Berens, M. E., Chan, A. Y., & Symons, M. (2005).Cell migration and invasion assays. *Methods*, 37(2), 208–215.

https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2005.08.001

- Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H.-K., Wen, P. Y., & Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(3), 166–193. https://doi.org/10.3322/caac.20069
- van Vuurden, D. G., Yazdani, M., Bosma, I., Broekhuizen, A. J. F., Postma, T. J., Heimans, J. J., ... Cloos, J. (2009). Attenuated AMPA Receptor Expression Allows Glioblastoma Cell Survival in Glutamate-Rich Environment. *PLoS ONE*, 4(6), e5953. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005953
- Venkataramani, V., Tanev, D. I., Strahle, C., Studier-Fischer, A., Fankhauser, L., Kessler, T., ... Kuner, T. (2019). Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*, 573(7775), 532–538. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Cancer Genome Atlas Research Network, T. C. G. A. R. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020
- Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 425–436. https://doi.org/10.1038/nrc1889
- Vishwakarma, M., Di Russo, J., Probst, D., Schwarz, U. S., Das, T., & Spatz, J. P. (2018). Mechanical interactions among followers determine the emergence of leaders in migrating epithelial cell collectives. *Nature Communications*, 9(1), 3469. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05927-6
- Voog, J., & Jones, D. L. (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*, 6(2), 103–115. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.011
- Wang, W., Tabu, K., Hagiya, Y., Sugiyama, Y., Kokubu, Y., Murota, Y., ... Taga, T. (2017). Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep42070
- Wang, X., Guo, G., Guan, H., Yu, Y., Lu, J., & Yu, J. (2019). Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 87. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1085-3
- Wang, X., Yang, K., Xie, Q., Wu, Q., Mack, S. C., Shi, Y., ... Rich, J. N. (2017). Purine

synthesis promotes maintenance of brain tumor initiating cells in glioma. *Nature Neuroscience*, 20(5), 661–673. https://doi.org/10.1038/nn.4537

- Weber, G. F., Bjerke, M. A., & DeSimone, D. W. (2012). A mechanoresponsive cadherinkeratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Developmental Cell*, 22(1), 104–115. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.013
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. New England Journal of Medicine, 359(5), 492–507. https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126
- Whitby, D. J., Longaker, M. T., Harrison, M. R., Adzick, N. S., & Ferguson, M. W. J. (1995).
  Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *Journal of Cell Science*, 99(3), 583–586. Retrieved from https://jcs.biologists.org/content/108/2/797.long
- Wolfenson, H., Lavelin, I., & Geiger, B. (2013). Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions. *Developmental Cell*, 24(5), 447–458. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.012
- Xia, S., Lal, B., Tung, B., Wang, S., Goodwin, C. R., & Laterra, J. (2016). Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro-Oncology*, 18(4), 507–517. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov171
- Xia, S., Ma, D., Liu, S., Lal, B., Wei, S., Wang, S., ... Wilson, M. A. (2019). Extracellular matrix protein tenascin C increases phagocytosis mediated by CD47 loss of function in glioblastoma. *Cancer Research*, canres.3125.2018. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3125
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., ... Bigner, D. D. (2009). *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 765–773. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710
- Zamecnik, J. (2005). The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta Neuropathologica*, *110*(5), 435–442. https://doi.org/10.1007/s00401-005-1078-5
- Zhao, S., Fung-Leung, W. P., Bittner, A., Ngo, K., & Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS ONE*, 9(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078644

## 8. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungsbzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Roman Kiesel

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Hau für die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung, von welcher ich sehr profitiert habe. Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Klein insbesondere für die Ermunterung und Hilfe bei der wissenschaftlichen Antragsstellung bedanken sowie für die Möglichkeit, im Labor unter seiner Leitung zu arbeiten. Ich bedanke mich beim gesamten LEX-Team für die konstruktive Zusammenarbeit, insbesondere bei Christoph Irlbeck für die kompetente fachliche Unterstützung, Xin Lu für die Unterstützung bei den Datenanalysen und Thomas Schamberger, Sandra Grunewald und Birgit Jachnik für die geduldige Einarbeitung in die Methodik. Der deutschen Krebshilfe danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für Ihre kontinuierliche Ermutigung und den Zuspruch während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.