

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung des Transkriptoms und Phänotypisierung der Side
Population von Magenkarzinom-Zelllinien

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rosa Schmuck

aus Starnberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Röcken

2. Prof. Dr. med. M. Ebert

3. Prof. Dr. med. W. Weichert

Datum der Promotion: 18. November 2011

Abstract

Aims: The Side Population (SP) of tumor cell lines shares characteristics with tumor stem cells. In this study we phenotypically and genotypically characterized the SP of gastric cancer cell lines.

Methods: SPs were obtained from MKN45- and AGS-gastric cancer cells using Hoechst 33342 staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS). SP cells were subsequently studied morphologically (cytology, immunocytochemistry), on the transcriptional level (gene array) and in cell culture (recultivation assays). Genes differentially expressed in the SP cells were evaluated by immunohistochemistry in tissue from gastric cancer patients.

Results: SP cells were smaller and rounder than Non-SP cells. SP cells self-renewed in re-cultivation experiments and differentiated into SP- and Non-SP cells. Re-cultivated SP- and Non-SP cells showed distinct phenotypes in culture regarding cell shape and colony-formation. SP cells had increased levels of the stem cell markers CD133 and Musashi1. Transcriptional analyses demonstrated that SP cells express genes that encode for stem cell properties like FZD7, HEY1, SMO and ADAM17. Finally we found ADAM17 and FZD7 to be differentially expressed in human gastric cancer, with FZD7-positive intestinal type cancers showing a significant shorter patient survival.

Conclusions: Human gastric cancer cell lines enclose a phenotypically and genotypically distinct cell population with tumor stem cell features. Phenotypical characteristics of this distinct cell population are also present in gastric cancer tissue and seem to correlate with patient survival.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Das Magenkarzinom und die Krebs-Stammzelltheorie.....	7
1.2	Die Side Population.....	13
1.3	ABC-Transporter	14
1.4	Arbeitshypothese und Aufgabenstellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Pufferlösungen	17
2.1.2	Vorrats- und Arbeitslösungen	18
2.1.3	Zelllinien	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Isolierung der SP	21
2.2.3	Zytologie	24
2.2.4	Rekultivierungsreihen	25
2.2.5	Immunphänotypisierung.....	26
2.2.6	Auswertung der immunhistologischen Reaktionen	29
2.2.7	Gene Array.....	30
2.2.8	Magenkarzinomkollektiv.....	33
3	ERGEBNISSE	36
3.1	SP-Isolierung	36
3.1.1	Die Hoechst 33342-Färbung beeinflusst Vitalität der Zellen nicht	36
3.1.2	Zellgröße der Magenkarzinomzellen.....	37
3.1.3	Die Färbung mit Hoechst 33342 und die FACS-Analyse führen zur reproduzierbaren Darstellung einer Side Population.....	38
3.2	Zytologie: SP-Zellen sind kleiner und runder als Non-SP-Zellen	40
3.3	SP-Zellen zeigen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung und generieren sowohl SP- als auch Non-SP-Zellen	41

3.4	Das Wachstumsverhalten der rekultivierten Zellen unterscheidet sich hinsichtlich der Zellform und der Form der gebildeten Zellkolonien	43
3.5	Phänotypisierung der SP- und Non-SP-Zellen	44
3.5.1	Phänotypisierung per FACS	44
3.5.2	Phänotypisierung mit Immunzytochemie	45
3.6	Genotypisierung der SP- und Non-SP-Zellen	46
3.6.1	Photometeranalyse	46
3.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.6.3	Bioanalyser	48
3.6.4	Gene Array.....	49
4	DISKUSSION	58
4.1	SP-Zellen exprimieren vermehrt die Stammzellmarker CD133 und Musashi1	59
4.2	SP-Zellen bilden in Kultur sowohl SP- als auch Non-SP-Zellen	62
4.3	SP-Zellen exprimieren Gene, die auf transkriptioneller und translationeller Ebene für Stammzeleigenschaften kodieren	64
4.4	Prognostische Faktoren und therapeutische Relevanz	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	73

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-bindende Kassetten-Transporter
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
Side Population	SP
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor
PE	Phycoerythrin
PJ	Propidiumjodid
MSI	Musashi
ABCB1/MDR1	<i>multi drug resistance protein 1</i>
ABCG2/BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
TAE	Tris-hydroxymethyl-aminomethan- Ethylendiamintetraessigsäure Puffer
RT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
LGR5	<i>leucine-rich-repeat-containing-G-protein-coupled receptor 5</i>

1 Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom und die Krebs-Stammzelltheorie

Das Magenkarzinom ist trotz abnehmender Inzidenz weltweit der zweithäufigste maligne epitheliale Tumor. Ungeachtet aller neuen Erkenntnisse bezüglich der Entstehung des Magenkarzinoms hat sich die Prognose in den letzten 20 Jahren nicht entscheidend verbessert. Auch heute sterben noch mehr als 80% der Patienten mit einem neu diagnostizierten fortgeschrittenen Magenkarzinom innerhalb eines Jahres an ihrem Tumor. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt insgesamt unter 15% und wird unter anderem vom Alter des Patienten, Lage und Größe des Tumors, Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad des Tumors beeinflusst. Der wichtigste Faktor scheint jedoch der Zeitpunkt der Diagnosestellung zu sein: Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für das Magenfrühkarzinom 70-80%, für das fortgeschrittene Magenkarzinom jedoch weniger als 10% [1]. Die entscheidende Bedeutung für die Prognose der Patienten fällt dabei neben der Früherkennung einer radikalen chirurgischen Therapie zu. Durch zusätzliche Bestrahlung oder Chemotherapie konnte bisher, im Gegensatz zu anderen Tumoren, beim Magenkarzinom noch keine deutliche Verbesserung der Lebenserwartung erreicht werden. Durch seine späte klinische Manifestation, die dadurch häufig späte Diagnosestellung und die eingeschränkten therapeutischen Optionen ist das Magenkarzinom einer der Tumoren mit der schlechtesten Prognose.

Diese Erkenntnisse hatten eine Reihe von Untersuchungen zur Folge, um mögliche weitere diagnostische Faktoren zu etablieren, und so Magenkarzinompatienten mit hohem Risiko früher zu identifizieren. Des Weiteren wurde viel in die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze investiert. Hierbei könnte ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen entscheidend zu einer Verbesserung von Diagnostik und Therapie beitragen.

Ein Beispiel hierfür ist die Erkenntnis, dass etwa 20% der Magenkarzinome HER2 exprimieren. Dieses Oberflächenprotein ist seit langem als prognostischer Marker und Therapietarget beim Mammakarzinom etabliert. Jetzt konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz von HER2 Antikörpern bei HER2 positiven Magenkarzinomen das Überleben der Patienten signifikant verbessert [2].

Im Bereich der Krebsforschung wurden enorme Fortschritte gemacht, dennoch bleiben vor allem im Hinblick auf die molekulare Entstehungsweise von Malignomen grundlegende Fragen unbeantwortet. Bisher ist zum Beispiel ungeklärt, warum einige Tumoren resistenter gegen Therapien oder im Krankheitsverlauf deutlich aggressiver sind als andere. Auch treten bei einigen Krebserkrankungen nach kompletter Remission Rezidive auf, und das häufig nach einer für den Tumortyp charakteristischen Zeitspanne. Über 30% der Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens, die primär kurativ behandelt wurden und keine Anzeichen einer systemischen Tumorstreuung zeigten, entwickeln trotzdem ein Rezidiv. Es wird angenommen, dass eine der Ursachen für ein solches Tumorrezidiv im Vorliegen einer so genannten Minimalen Resterkrankung („Minimal Residual Disease“; MRD) besteht, die durch disseminierte Tumorzellen aufrecht erhalten wird [3]. Beim Versuch, diese Fragen zu beantworten, richtet sich die Aufmerksamkeit der Forschung seit kurzem auf adulte Stammzellen. Diese stehen im Verdacht, eher maligne zu entarten, da sie längere Lebenszeiten haben und so Mutationen akkumulieren können, welche dann wiederum zu zellulären Veränderungen führen [4,5]. Diese Zellen werden Tumor-bildende-Zellen oder Krebsstammzellen genannt.

Stammzellen sind charakterisiert durch ein ausgeprägtes proliferatives Potential und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, sowie durch die genau geregelte Weiterentwicklung in ausdifferenziertes, funktionales Gewebe. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ein ausgeprägtes proliferatives Potential sind indes ebenso charakteristische Eigenschaften von maligne entarteten Zellen (Abbildung 1). Dies wirft die Frage auf, ob der Regulation von gesunden Stammzellen und malignen Zellen ähnliche oder gar gleiche biologische Mechanismen zugrunde liegen.

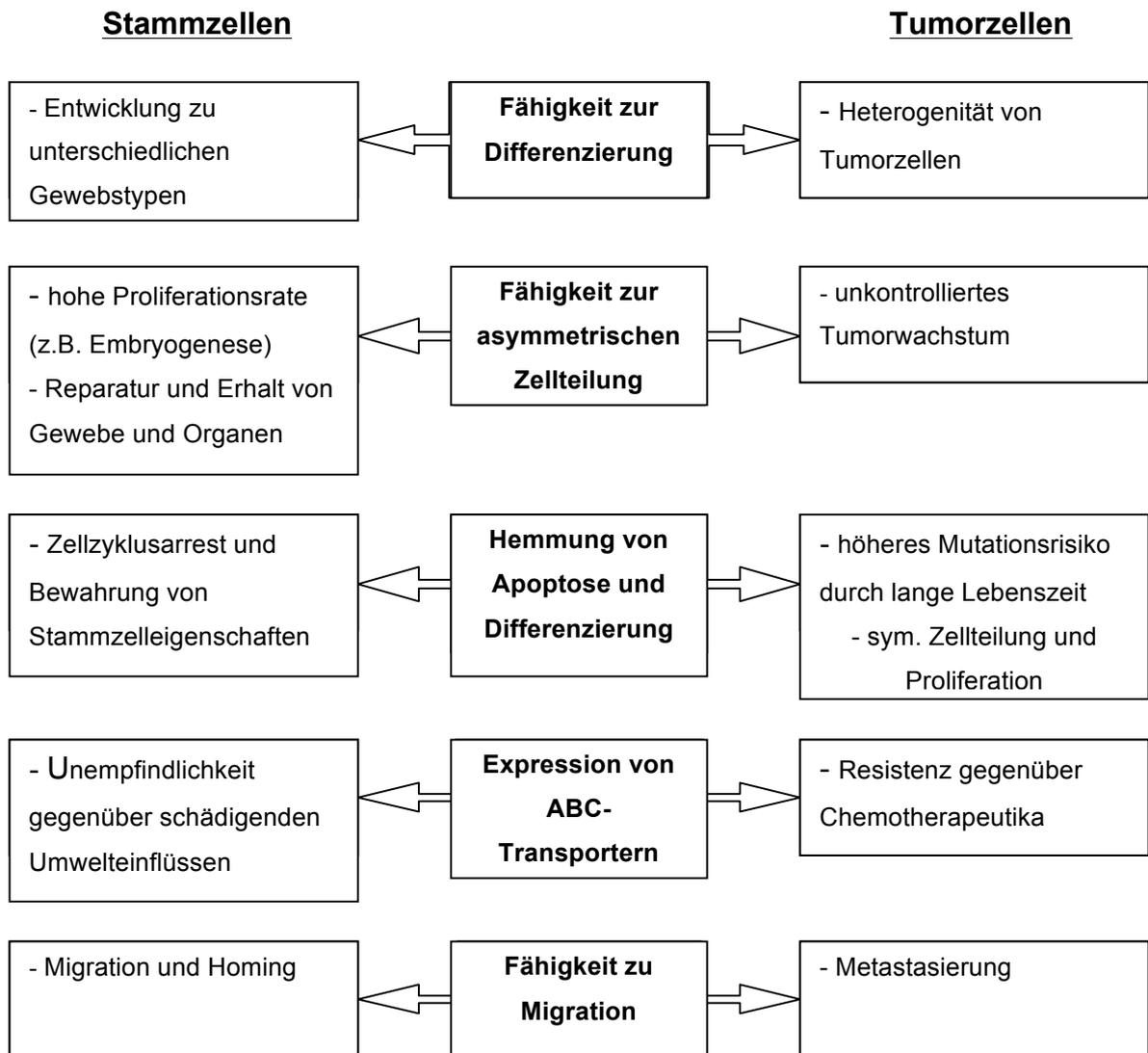


Abbildung 1: Gemeinsame Merkmale von Stammzellen und Krebszellen

Einige Signalwege, welche die Selbsterneuerung regulieren, wurden tatsächlich bereits sowohl bei normalen Stammzellen, als auch bei maligne entarteten Zellen gefunden. Hierzu gehört der Notch-[6,7,8] SHH- [9,10,11], FGF- [12] und WNT- [13,14] Signalweg. Eine Fehlregulation dieser Signalwege wurde ebenso während der Tumorentstehung beobachtet [15,16].

Bei dem physiologischen Vorgang der Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen teilt sich eine Stammzelle asymmetrisch in eine neue Stammzelle und eine weiter ausdifferenzierte Tochterzelle. Diese ist entweder nicht mehr teilungsfähig oder kann sich nur symmetrisch in zwei identische, ausdifferenzierte Tochterzellen teilen. So bleibt die Anzahl von Stammzellen immer konstant. Teilt sich eine Stammzelle aber

symmetrisch in zwei weitere Stammzellen und teilen sich diese im nächsten Schritt in vier Stammzellen, kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Stammzellzahl. Setzt sich dieser Prozess mit einer hohen Teilungsfrequenz fort, führt er zu einem exponentiellen Anstieg der Zellzahl, was ein Charakteristikum von neoplastischen Transformationen darstellt. Dieses Phänomen ist allerdings auch während der Embryogenese oder bei Reparaturvorgängen nach ausgedehnten Gewebsschäden zu beobachten und ist dann physiologisch (Abbildung 2), [17].

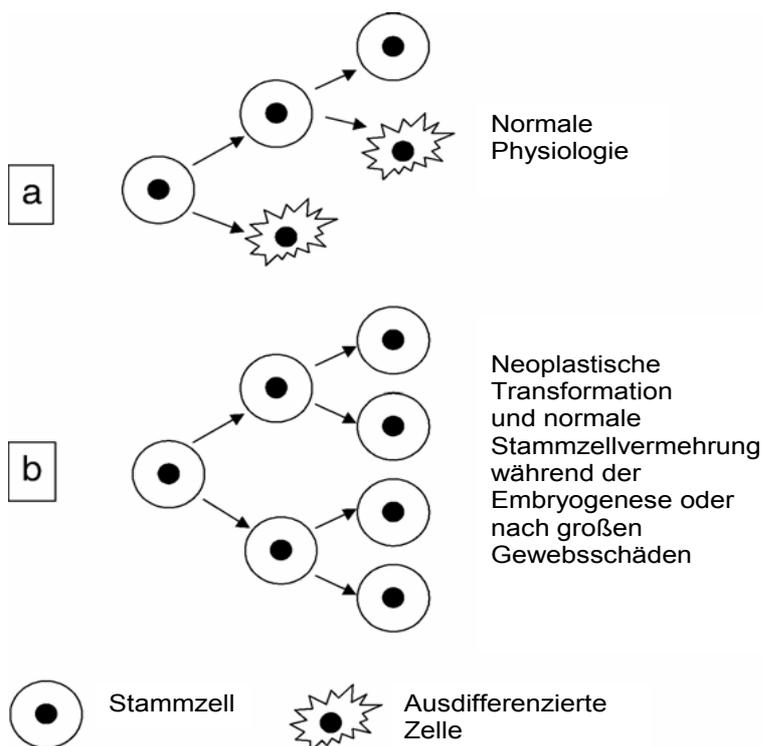


Abbildung 2: Bei der physiologischen Stammzellteilung wird die Anzahl von Stammzellen durch asymmetrische Teilung konstant gehalten (a). Bei einer neoplastischen Transformation ist ein Verlust dieser Kontrollmechanismen und somit ein Anstieg der Anzahl von Stammzellen zu beobachten (b). Dies geschieht auch während der Embryogenese oder nach großen Weichteilschäden. (Abbildung modifiziert nach Hadnagy et al. [17])

Die klassischen Theorien zur Tumorentstehung gehen von einer Anhäufung genetischer Mutationen aus, welche die Gene für Zellwachstum, Zellvermehrung oder Apoptose betreffen.

Die Krebs-Stammzelltheorie hingegen geht außerdem von der Existenz von Krebsstammzellen aus, welche für Tumorentstehung und Tumorwachstum verantwortlich sind. Die Idee, dass Krebs durch Stammzellen entsteht, ist keineswegs

neu. Bereits 1875 vermutete Cohnheim, dass während der Embryogenese falsch platzierte Stammzellen im Laufe des Lebens Krebs verursachen [18]. Nachgewiesen wurde seither bereits mehrfach, dass Tumoren ein heterogener Zusammenschluss von Zellen sind, und nur ein kleiner Teil des Tumorgewebes die Fähigkeit hat, wieder neue Tumoren zu bilden beispielsweise wenn sie in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert werden. Al Hajj et al. konnten nachweisen, dass 200.000 bis 800.000 CD44⁺- oder CD24⁻-Zellen neue Tumoren bildeten, wenn sie NOD/ SCID- Mäusen injiziert wurden, während die selbe Anzahl CD44⁻- oder CD24⁺-Zellen dies nicht vermochten. Wurden beide Oberflächenmerkmale kombiniert, reichten bereits 100 menschliche, CD44⁺ und CD24⁻ Mammakarzinomzellen aus, um in den Mäusen neue Tumoren zu bilden [19]. Auch unterscheiden sich die Zellen von Krebszelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, neue Kolonien in Soft-Agar Platten zu bilden [20]. Dass die Anzahl der gebildeten Kolonien deutlich geringer ist, als die Anzahl zu Beginn ausgesäter Zellen, lässt darauf schließen, dass nicht alle ausgesäten Zellen die Fähigkeit hatten, neue Kolonien zu bilden. Die Fähigkeit, Kolonien in Soft-Agar zu bilden, steht in direktem Zusammenhang mit der Invasionsfähigkeit in vivo, was einen der grundlegenden Malignitätsfaktoren von Tumorzellen darstellt. Dadurch wird eine bisher als gesichert angesehene Theorie zu Tumorzellen in Frage gestellt: Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Tumoren von einer einzelnen entarteten Zelle ausgehen und sich alle resultierenden Tochterzellen phänotypisch gleichen. Neue Untersuchungen zeigten aber, dass sich Zellen ein und desselben Tumors morphologisch, phänotypisch und genotypisch unterscheiden. Seitdem bringt die Vielgestaltigkeit von malignen Zellen in Tumoren Forscher immer mehr dazu, sich zu fragen, worauf diese Unterschiede begründet sind. Zwei grundlegende Hypothesen zur Heterogenität von Tumorzellen können hierbei zusammengefasst werden.

Die erste Hypothese geht davon aus, dass sich Tumorzellen zwar phänotypisch unterscheiden, funktionell aber gleich sind. Das heißt, alle Zellen haben ein ausgeprägtes proliferatives Potential und die Fähigkeit neue Tumoren zu bilden.

Die zweite Hypothese besagt hingegen, dass nur eine kleine Subpopulation exzessiv proliferiert und dass diese Zellen auch für die Bildung neuer Tumoren verantwortlich sind [21]. So sind laut der Krebs-Stammzelltheorie Tumoren nicht einfach eine homogene Ansammlung von veränderten Zellen, sondern eine komplexe Gewebsstruktur. Hierbei wird nun diskutiert, ob in einem so heterogenen Tumorgewebe

Subpopulationen vorhanden sind, welche Stammzellen ähneln. Stammzellen zeigen eine ausgeprägte Diversität bei der Ausdifferenzierung und könnten daher der Ursprung der Vielgestaltigkeit von Tumorzellen sein.

Ein Problem bei der genaueren Analyse von Stammzellen war bisher allerdings deren Isolierung aus dem Gewebeverband. Die klassische Methode zur Isolierung von einzelnen Zellen aus der Gesamtpopulation, ist die Aufteilung entsprechend unterschiedlich exprimierter Oberflächenmarker. Dies gestaltet sich im Bezug auf Stamm- beziehungsweise Vorläuferzellen als sehr schwierig, da bisher kein charakteristisches Oberflächenmarkerprofil bekannt ist, das alle Stammzellen gemein haben. Untersucht man Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben, so unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker deutlich. Ein solches Oberflächenmarkerprofil konnte bislang nur für sehr wenige gewebespezifische Vorläuferzellen, wie etwa hämatopoetische oder neuronale Stammzellen identifiziert werden. Da die Isolierung von Krebs-Stammzellen aus gastrointestinalen Tumoren mit den zur Verfügung stehenden Methoden bisher nicht möglich war, musste im Falle dieser Arbeit auf alternative Isolierungsmethoden ausgewichen werden. Es wurde hierbei mit einer Methode gearbeitet, die als Side Population (SP) Sortierung bekannt ist. Diese Sortierungsmethode ist methodisch einfach durchführbar, schnell und kostengünstig. Mit dieser Methode ist es bereits mehreren Forschungsgruppen gelungen, Vorläuferzellen aus Tumoren zu isolieren und deren Bedeutung für die Entstehung und Malignität von Tumoren nachzuweisen. Bisher wurde die Side Population Sortierung allerdings noch nie bei Magenkarzinomen des Menschen angewendet. Die Etablierung und Validierung dieser Methodik stellte daher eine besondere Herausforderung dar.

1.2 Die Side Population

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit von Vorläuferzellen, den an die DNA bindenden Farbstoff Hoechst 33342 aus der Zelle zu schleusen. Sie wurde 1996 erstmals von Goodell et al. für hämatopoetische Stammzellen beschrieben [22]. Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Durch die Färbung mit Hoechst 33342 können Aussagen über DNA-Gehalt, die Struktur des Chromatins und den Zellzyklus der gefärbten Zellen getroffen werden. 1996 arbeitete die Forschungsgruppe um Goodell mit dem Farbstoff, um den Zellzyklus von Knochenmarkszellen zu untersuchen. Hierbei fiel eine kleine (0,1% aller Zellen), nicht oder nur sehr schwach gefärbte Zellgruppe auf, wenn Knochenmark mit Hoechst 33342 gefärbt und anschließend mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) auf einem „Hoechst rot“ gegen „Hoechst blau“ Diagramm aufgetragen wurde. Wurde Verapamil zugegeben, verschwand die charakteristische Färbung (Abbildung 3).

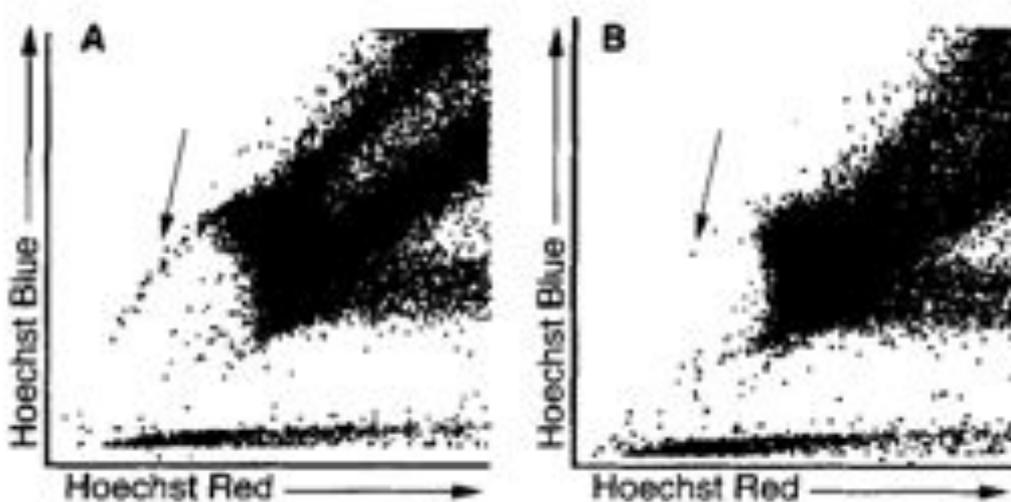


Abbildung 3: Bei der Färbung mit Hoechst fällt eine kleine, schwach angefärbte Subpopulation auf (A). Wird Verapamil zugegeben, verschwindet die charakteristische Färbung (B) [22].

Bei weiteren Versuchen zeigte sich, dass die so isolierten, so genannten SP-Zellen mit Sca1⁺ lin⁻ neg/low ein für hämatopoetische Stammzellen bekanntes Oberflächenmarkerprofil zeigten. Auch stellte die Forschungsgruppe fest, dass diese Zellen die Fähigkeit hatten, in subletal bestrahlten Mäusen neues Knochenmark zu bilden. Hierfür reichte bereits die Injektion kleiner Zellzahlen. Als anschließend diese Isolierungsmethode mit der klassischen, an den Oberflächenmarkern orientierten

verglichen wurde, zeigte sich, dass durch die SP-Sortierung eine reinere Stammzellisolierung erreicht werden konnte [23]. Auch laut Orkin et al. [24] ist die Isolierung von Stammzellen mit Hilfe der SP eine deutlich bessere Methode, als alle bisher bekannten Methoden mit Oberflächenmarkern. Es wurde bereits gezeigt, dass die SP auch in Ösophagus [25], Skelettmuskel [26], Herzmuskel [27], Brustdrüse [28,29] und Leber [30] die entsprechende Stammzellpopulation repräsentiert.

Auch konnte deren Vorkommen bei malignen Erkrankungen nachgewiesen werden. SP-Zellen scheinen nicht nur bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems [31], sondern auch bei soliden Tumoren [32] eine wichtige Rolle zu spielen. Gelänge es nachzuweisen, dass sich mit Hilfe dieser Methode tatsächlich Stammzellen isolieren lassen, wäre das Verhalten bei der Hoechst-Färbung die bisher größte bekannte Gemeinsamkeit von Stammzellen aus unterschiedlichen Gewebe. Dies würde die Arbeit im Bereich der Stammzellforschung enorm erleichtern. Der Grund für die geringe Anfärbbarkeit von SP-Zellen durch Hoechst 33342 beruht auf deren Fähigkeit, den Farbstoff aktiv durch ABC-Transporter aus der Zelle zu schleusen.

1.3 ABC-Transporter

Die ATP-bindenden Kassettentransporter (ABC-Transporter) besitzen die Fähigkeit, ATP als Energiequelle zu binden, um endogene und exogene Moleküle durch die Zellmembran zu transportieren. Meist läuft dieser Transport unidirektional. Die Moleküle werden aus der Zelle heraustransportiert oder in ein intrazelluläres Kompartiment wie die Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum eingeschleust. Es wurden bereits mehrere Gen-Untergruppen identifiziert, welche für ABC-Transporter kodieren. Hierbei sind ABCB1 (MDR1, multi drug resistance protein 1) und ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein), die am besten untersuchten Proteine [33]. Obwohl die genaue physiologische Rolle dieser Transporter noch nicht vollkommen geklärt ist, sind einige Funktionen experimentell gut dargestellt worden. Die am besten untersuchte Funktion ist der Schutz der Zelle vor exogenen Stoffen, welche die Fähigkeit besitzen, die Zellmembran zu passieren. Dies geschieht durch aktives Herauspumpen zytotoxischer Substanzen aus der Zelle. ABC-Transporter konnten beispielsweise in der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden [34], dort verhindern sie, dass schädliche

Stoffe ins zentrale Nervensystem übertreten. Für eine ähnliche Schutzfunktion spricht auch das Vorkommen von ABC-Transportern in der Blut-Hoden-Schranke [35]. In mehreren Untersuchungen wurde beschrieben, dass ABC-Transporter exprimierende Tumorzellen Therapien mit gängigen Chemotherapeutika unbeschadet überstehen. So hat eine vermehrte ABCG2-Expression eine Resistenz gegen Mitoxantrone zur Folge [36]. Insbesondere ABCG2 ist hinsichtlich seiner Expression bei SP-Zellen und Stammzellen gut untersucht. Dieser Transporter wurde nicht nur in SP-Zellen unterschiedlicher Gewebe nachgewiesen [37,38], sondern findet sich auch vermehrt bei hämatopoetischen Stammzellen [39], neuronalen Stammzellen [40] und ovalen Leberzellen [41], den Vorläuferzellen der Hepatozyten. Des Weiteren scheinen ABC-Transporter die Reifung und Ausdifferenzierung von Stammzellen zu unterdrücken. ABCG2/ BCRP ist in hämatopoetischen Stammzellen vermehrt exprimiert, und diese Überexpression verhindert die Weiterentwicklung zu hämatopoetischen Funktionszellen [42]. Diese Hemmung der Ausdifferenzierung wurde auch für andere Zelllinien beschrieben. So verhindert die übermäßige Expression von ABCB1/ MDR1 in Muskelvorläuferzellen deren Weiterentwicklung zu Muskelspindeln [43]. Dass die ABC-Transporter allerdings nicht die einzigen Faktoren sind, welche die Weiterentwicklung und Ausdifferenzierung von Stammzellen steuern, zeigt sich darin, dass ABCG2/ BCRP-Knock-out Mäuse eine normale Hämatopoese haben und nicht etwa eine verminderte Ausdifferenzierung der Stammzellen aufweisen. Dieser Vorgang scheint also von multiplen Faktoren abhängig zu sein, die noch weitgehend unbekannt sind.

Fasst man diese Erkenntnisse zusammen, ist davon auszugehen, dass innerhalb des heterogenen Tumorzellverbandes eine Subpopulation existiert, die Stammzellqualitäten aufweist. Diese Zellen zeigen ein entartetes Teilungsverhalten und sind für das schnelle Wachstum von Tumoren und deren Fähigkeit, Metastasen zu bilden, verantwortlich. Außerdem können sie durch das aktive Ausschleusen von Chemotherapeutika mit Hilfe der ABC-Transporter gängige medikamentöse Therapien unbeschadet überstehen und so nach Therapieende einen Ausgangspunkt für Rezidive darstellen. Trotz der großen Fortschritte in der Krebs-Stammzellforschung ist noch wenig über diese Zellen bekannt.

1.4 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung

Zusammenfassend geht die vorliegende Arbeit von der Hypothese aus, dass maligne Tumoren eine Zellpopulation enthalten, welche

- Stammzeleigenschaften aufweist und den SP-Zellen ähnelt,
- maßgeblich den Krankheitsverlauf und die Rezidivneigung beeinflusst und
- deshalb ein lohnenswertes Ziel zukünftiger, onkologischer Therapieansätze darstellt.

Bevor jedoch eine gegen Tumorstammzellen gerichtete Therapie entwickelt werden kann, müssen diese phäno- und genotypisch charakterisiert werden. Ziel dieser Arbeit ist,

1. die Existenz von SP-Zellen bei Magenkarzinom-Zelllinien zu prüfen und zu bestätigen,
2. die SP-Zellen der Magenkarzinom-Zelllinien phäno- und genotypisch zu charakterisieren und
3. phänotypische Eigenschaften der SP-Zellen in situ beim Magenkarzinom wiederzufinden und deren klinische Relevanz zu prüfen.

Zur Erreichung der Studienziele wurden bei zwei humanen Magenkarzinom-Zelllinien (MNK45 und AGS) mit Hilfe der Hoechst-33342-Färbetechnik und einer FACS-Analyse nach SP-Zellen gesucht. Anschließend wurden die SP-Zellen isoliert, phänotypisch mit Hilfe der Zytomorphologie und Immunzytologie sowie genotypisch mit Hilfe von Gene Arrays charakterisiert. Abschließend wurde geprüft, ob differentiell von SP-Zellen exprimierte Gene, auch auf translationeller Ebene (Immunhistologie) in Magenkarzinomen gefunden werden können und ggf. eine prognostische Relevanz haben.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Pufferlösungen

2.1.1.1 Citratpuffer

Für die Herstellung der 10fach konzentrierten Vorratslösung, wurden 3,78 g Zitronensäure (Carl Roth GMBH, Karlsruhe) und 24,21 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Biomol, Hamburg) mit deionisiertem Wasser (dH₂O) auf 600 ml aufgefüllt und solange gerührt, bis die Lösung klar war. Anschließend wurde die Lösung auf pH 6,1 eingestellt und mit dH₂O auf einen Liter aufgefüllt. Für die Arbeitslösung wurden 100 ml der 10x Vorratslösung mit dH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

2.1.1.2 Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

Die 10fach konzentrierte Vorratslösung wurde wie folgt hergestellt: 60,57 g Trizma Base (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden mit 87,66 g Natriumchlorid in 1 Liter dH₂O gelöst. Nachdem die Lösung solange gerührt wurde, bis sie klar wurde, wurde mit Hilfe von Salzsäure (HCL) der pH 7,4 eingestellt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 10 ml der Vorratslösung mit dH₂O gemischt und auf 100 ml aufgefüllt.

2.1.1.3 Tris-Acid Ethylendiamintetraacetat (TAE) Puffer

Als Agarosegelpuffer wurde ein TAE Puffer verwendet. Hierfür wurden 48,40 g Trizma Base, 11,42 ml Essigsäure und 20 ml 0,5 M Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (pH 8,0) mit 1 Liter dH₂O aufgefüllt und solange gerührt, bis die Lösung klar wurde.

2.1.2 Vorrats- und Arbeitslösungen

2.1.2.1 Hoechst 33342

Es wurde mit einer 200fach konzentrierten Hoechst 33342 Lösung gearbeitet. Hierzu wurden 25 mg Hoechst Pulver (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in dH₂O in einem Verhältnis von 1 mg/1 ml aufgelöst. Die konzentrierte Hoechst-Lösung wurde in 1 ml und 2 ml Portionen in Eppendorf Röhrchen aufgeteilt und lichtgeschützt in einem –20° kalten Tiefkühlfach gelagert. Bei Bedarf wurde die Lösung langsam im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut. Hierbei wurde immer darauf geachtet, dass die Lösung vor Licht geschützt war.

2.1.2.2 Propidiumjodid (PJ)

Es wurde eine 2 mg/ml Vorratslösung hergestellt. Hierzu wurden 10 mg Propidiumjodid (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in 5 ml dH₂O gelöst. Die Lösung wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und anschließend bis zum Verbrauch lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.1.2.3 Verapamil

Aus der gelieferten 99% Lösung (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde mit dH₂O eine 250 mM Lösung hergestellt. Diese wurde in 0,5 ml und 1 ml Eppendorf Röhrchen aliquotiert und bei –20°C gelagert. Bei Bedarf wurde die benötigte Menge über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut. Da die 250 mM Lösung aber zum Ausfallen neigte, wurde im weiteren Versuchsverlauf zu einer 25 mM Lösung gewechselt.

2.1.2.4 Agarose

Die 2%ige Agarose für die Einbettung der Zellen in Paraffin wurde wie folgt hergestellt: low melt Agarosepulver (Biocompare South San Francisco, USA) wurde in kaltem dH₂O eingerührt und anschließend in der Mikrowelle mehrmals aufgeköcht und umgerührt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte und die Lösung klar wurde. Anschließend wurde

die Agarose unter mehrmaligem Schwenken auf Handwärme abgekühlt. Sie wurde nun verwendet oder zum Lagern bei 4 °C aliquotiert.

Das 1,5%ige Agarosegel, für die Gelelektrophorese, wurde wie folgt hergestellt: 3 Agarosetabletten (Eurogentec, Seraing, Belgien) von je 0,5 g wurden in 100 ml TAE-Puffer gelöst. Hierfür wurde die Mischung mehrmals in der Mikrowelle erhitzt und solange geschwenkt bis die Tablette aufgelöst war und die Lösung klar wurde.

2.1.3 Zelllinien

In den vorliegenden Versuchsansätzen wurde mit den beiden Magenkarzinom-Linien MKN45 und AGS gearbeitet. Beide stammen von Adenokarzinomen vom intestinalen Typ und repräsentieren somit die häufigste Form des Magenkarzinoms. MKN45 stammt von einer 62-jährigen Frau mit einem Adenokarzinom des Magens, diese Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH aus Braunschweig bezogen. AGS stammt von einer 54-jährigen Frau, die ebenfalls an einem Adenokarzinom des Magens litt. Diese Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) aus Wesel, Deutschland bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Ansetzten der Zellkultur

Die Zellen wurden in VLE 1640 RPMI Medium (Biochrom AG) kultiviert, das mit 20% (MKN45) bzw. 10% (AGS) fötalem Rinderserum (Biochrom AG) versetzt war. Es wurden handelsübliche Zellkulturflaschen (BD Falcon) verwendet. Nachdem alle Arbeitsmaterialien im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt worden waren, wurden die Zellen direkt aus dem flüssigem Stickstoff in das 37 °C warme Wasserbad gegeben. Nach 1 bis maximal 2 Min. wurden die Zellen in einen 50 ml Falcon (BD Falcon, Erembodegem, Belgien) pipettiert. Danach wurde die Suspension bei 800 Umdrehungen pro Minute (Upm) für 5 Min. zentrifugiert und das Pellet anschließend in

5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Suspension in eine kleine, mit 15 ml Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kultivierung

Die Magenkarzinomzellen wurden in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen je nach Bedarf abgeerntet und für Versuche verwendet. Ansonsten wurden die Zellen etwa ein bis zweimal pro Woche in Portionen von 1×10^6 Zellen aufgeteilt und neu angesetzt, um ein zu dichtes Zellwachstum zu verhindern. Die Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden vor ihrer Verwendung gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Das Zellkulturlabor wurde regelmäßig während der arbeitsfreien Zeit mittels UV-Lampen bestrahlt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 37°C vorgewärmt. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden täglich mit einem Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TS 100) überprüft.

2.2.1.3 Ernten der Zellen

Hatte sich ein makroskopisch sichtbarer Zellteppich gebildet und war mikroskopisch ein flächendeckendes Wachstum zu sehen, wurden die Zellen abgeerntet. Im Falle eines pH-Umschlags des Zellkulturmediums wurden die Zellen bereits früher geerntet. Nachdem das Medium abpipettiert worden war, wurde der Flaschenboden mehrmals mit PBS (PAA, Dulbecco's PBS ohne Kalzium und Magnesium; Pasching, Österreich) gespült. Anschließend wurde soviel steriles Trypsin (PAA, Pasching, Österreich) zugegeben, dass alle Zellen bedeckt waren. Das Trypsin diente dazu, die Zellen vom Zellflaschenboden und voneinander zu lösen, um alle Zellen möglichst in einer Einzelzellsuspension in Lösung zu bringen. Nach 5 Min. Inkubation im Brutschrank wurde Medium zugegeben, um das Trypsin zu inhibieren. Die Trypsin-Medium-Zellsuspension wurde anschließend 5 Min. bei 800 Upm abzentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und je nach weiterer Vorgehensweise die Zellen entweder wieder in Zellkulturflaschen eingesetzt oder für Versuche verwendet.

2.2.1.4 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde der Zellzähler Z1 von Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden 500 µl der trypsinisierten und gespülten Zellsuspension in eine Küvette pipettiert und mit 9,5 ml Zählösung (Isoton coulter solution, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellzählung durchgeführt.

2.2.1.5 Kryokonservierung

Ein Teil der Zellen wurde regelmäßig kryokonserviert. Es wurde 1 ml Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen hergestellt und mit 111 µl DMSO versetzt. Dann wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen abgefüllt. Die Röhrchen wurden zunächst einen Tag bei -80°C in ein Tuch eingewickelt eingefroren, um ein langsames, zellschonendes Einfrieren zu gewährleisten und anschließend bei -80°C gelagert. Grundsätzlich wurde bei jedem Versuchsaufbau darauf geachtet, unterschiedlich alte Passagen zu verwenden, um zu objektivieren, ob die vorausgegangene Teilungsaktivität Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat.

2.2.2 Isolierung der SP

2.2.2.1 Vitalitätstests

Für die Überprüfung der Farbstoffverträglichkeit des Hoechst 33342 Farbstoffs wurde Methyleneblau verwendet. Hierfür wurde eine definierte Anzahl (1×10^5) abgeernteter Zellen in Zellkulturplatten (6-well Platten, Corning incorporated, Corning, USA) eingesetzt, bis sie sich gut auf dem Boden abgesetzt hatten. Hierfür waren etwa zwei Tage nötig. Die Zellzahl wurde dann mit Hilfe der bekannten Verdopplungszeit abgeschätzt. Anschließend wurde Hoechst 33342 in aufsteigender Konzentration (2, 4, 6 und 8 µg/ml pro 1×10^6 Zellen) zugegeben. Für die Hoechstfärbung bei adhärenenten Zellen wurde zum Teil das Protokoll von Seigel et al. verwendet [44]. Bei der Negativkontrolle wurden dieselben Arbeitsschritte durchgeführt, jedoch kein Hoechst 33342 hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei niedriger Stufe kurz auf den Rüttler gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes

sicherzustellen, und anschließend im Brutschrank bei 37 °C für 90 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Vitalitätsprüfung mit Methyleneblau durchgeführt. Hierfür wurde zunächst der Farbstoff entfernt, die Zellen dreimal mit 37 °C warmen PBS gespült und anschließend mit 100% Äthanol für 30 Min. fixiert. Danach wurde Methyleneblau in einer Konzentration von 1% für 30 Min. zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde das Methyleneblau entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Abschließend wurden die Zellkulturplatten photographiert.

Um die Vitalität der Zellen nach der Färbung in normalen Versuchskonzentrationen mit anschließender FACS-Analyse zu testen wurde ebenfalls Methyleneblau verwendet. Hierfür wurde ein Teil der isolierten Zellen nach der Färbung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml und anschließender FACS-Analyse in Zellkulturplatten (6-well Platten) eingesetzt (1×10^5 Zellen pro Kavität) und inkubiert, bis sie sich abgesetzt hatten. Nach zwei Tagen wurde nach der oben genannten Vorgehensweise eine Methyleneblau-Färbung durchgeführt und die Zellkulturplatten anschließend photographiert.

2.2.2.2 Messung der Zellgröße

Für die Messung der Zellgröße wurden je 5×10^4 Zellen für zwei Tage in auf Objektträgern aufgesetzten Zellkulturkammern (*Camber slides*) angesetzt bis sie adhärent waren und danach mit Papanicolaou gefärbt. Anschließend wurden 72 (MKN45) bzw. 50 (AGS) Zellen in zwei Regionen ausgemessen.

2.2.2.3 Färbung mit Hoechst 33342

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) wurde in modifizierter Form nach der von Goodell et al. beschriebenen Hoechst-Färbungsmethode durchgeführt [45]. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die für die Versuche verwendeten Zellkulturen frei von Bakterien oder Verunreinigungen waren, dass sie nicht zu dicht gewachsen waren und der Indikator des Mediums nicht umgeschlagen war. Auch durfte der Anteil toter Zellen nicht zu groß sein, das heißt, die Lösung musste transparent sein und das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen durfte nur bis zu 5:1 betragen. Tote Zellen waren nicht mehr adhärent, schwammen frei in der Suspension und hatten eine gegenüber den vitalen Zellen deutlich veränderte Zellform (abgerundet). Die Zellen wurden durch

Trypsinierung abgeerntet und in RPMI Medium sorgfältig resuspendiert. Anschließend wurde mit dem Zellzähler die Zellzahl bestimmt und die Zellen vorsichtig auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 37°C warmem Medium resuspendiert. Für die Färbung wurden 50 ml Polypropylen Röhren verwendet, um ein Anheften der Zellen an der Wand zu verhindern. Anschließend wurde Hoechst 33342 in einer endgültigen Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Es wurde hierbei eine $200 \mu\text{g/ml}$ (1 mg/ml) Vorratslösung verwendet. Im Vorfeld wurde die optimale Konzentration des Hoechst 33342-Farbstoffs durch Verdünnungsreihen bestimmt. Im Falle schlechter Analyseergebnisse (z.B. zu wenige SP-Zellen nachweisbar) wurden Verdünnungsreihen zur Fehleranalyse wiederholt. Hierbei wurden mit 2,5, 5,0, 8,0 und $10 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 gefärbt. Ein Teil der Zellen ($2-4 \times 10^6$ Zellen) wurde zusätzlich als Kontrolle in einem separaten Röhren mit $50 \mu\text{M}$ Verapamil versetzt. Verapamil blockiert die Kalzium-abhängigen ABC-Transporter, durch welche der Hoechst-Farbstoff aus den SP-Zellen geschleust wird. Damit blockiert Verapamil die charakteristische Färbung der SP-Zellen. Anschließend wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad unter regelmäßigem Umrühren für 90 Min. inkubiert. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt, da Hoechst 33342 lichtempfindlich ist. Nach der Hoechstfärbung wurden die Zellen bei 4°C gelagert, um ein weiteres Ausströmen von Farbstoff zu verhindern. Überschüssiges Hoechst 3342 wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren in einer Kühlzentrifuge und Resuspendieren der Zellen in eisgekühltem PBS ausgewaschen.

2.2.2.4 FACS-Analyse

Die FACS-Analysen und Sortierungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Flow cytometry and cell sorting core facility (FCCF) des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie, Berlin durchgeführt. Für die FACS-Analyse wurde das DIVA FACS Gerät der Firma Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, USA) verwendet. Dieses Gerät war sowohl wegen der zuvor bestimmten Zellgröße, als auch wegen der guten Eignung für das Emissionsspektrum von Hoechst 33342 gewählt worden. Um möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erhalten, wurden die FACS-Analysen ausnahmslos an frischen, am selben Tag geernteten Zellen durchgeführt. So wurde auch ein möglicher Vitalitätsverlust der Zellen minimiert. Die Zellen wurden zusätzlich in kaltem PBS mit $2 \mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid resuspendiert, um tote Zellen darzustellen. So konnte

ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch eine erhöhte Anzahl an geschädigten oder toten Zellen verfälscht werden. Die für die Versuche verwendeten adhären, bzw. halbadhären Zellen neigten zur Klumpenbildung. Aus diesem Grunde wurden die Zellen vor der FACS-Analyse mit einem 30 µm Zellfilter (Partec, Görlitz, Deutschland) gefiltert. Damit wurde ein Verstopfen des Gerätes verhindert. Um die SP darstellen zu können, benötigte man zur Anregung des Hoechst-Farbstoffs und des Propidiumjodids einen ultravioletten Laser (350 nm). Die Emission des angeregten Hoechst-Farbstoffs wurde als „Hoechst blau“ und „Hoechst rot“ gemessen. Hoechst blau wurde mit einem 450/20-Filter gemessen, Hoechst rot mit einem 675LP-Filter. Um die Wellenlängen der Emission voneinander zu trennen, wurde ein dichroitischer (zweifarbiger) Filter verwendet. Die Fluoreszenz des Propidiumjodids wurde ebenfalls mit dem 675LP-Kanal gemessen, allerdings war das positive Signal um einiges heller als das Signal von Hoechst rot. Die simultane Anregung und Emission von Propidiumjodid durch einen 488 nm-Laser konnte verwendet werden, um tote Zellen zu erkennen und sie von den lebenden, rot fluoreszierenden Hoechst-gefärbten Zellen zu differenzieren. Die Emissionssignale wurden in einem „Rot gegen Blau“ –Diagramm aufgetragen, mit Blau auf der vertikalen und Rot auf der horizontalen Achse, beide in linearer Form. Die Spannung wurde so eingestellt, dass sich die toten Zellen, die sich mit Propidiumjodid positiv färbten, an der weit rechts liegenden vertikalen Linie ausrichteten. Der Grossteil der Zellen erschien in der Mitte oder im oberen rechten Quadranten. Das weitere Vorgehen richtete sich nach der geplanten Untersuchung.

2.2.3 Zytologie

Für eine zytologische Beurteilung wurden die MKN45-Zellen in kleine Agarosekügelchen gebettet und anschließend in Paraffinblöcke gegossen. Dieses Verfahren wurde gewählt, da hier mit sehr geringen Zellzahlen gearbeitet wurde ($<1 \times 10^6$). So konzentrieren sich die Zellen im Agarosekügelchen auf engem Raum und verteilen sich nicht im gesamten Paraffinblock. Das erleichterte das anschließende Mikroskopieren. Es wurden je zwei Sortierungen (SP und Non-SP-Zellen) pro Zelllinie für die lichtmikroskopische Auswertung fixiert. Hierbei wurden jeweils eine junge und eine ältere Passage verwendet. So ergaben sich acht Paraffinblöcke. Die Zellen wurden nach der Sortierung aus dem PBS abzentrifugiert und in 4%ig gepufferter p-Formaldehydlösung resuspendiert. Die Zellen mussten mindestens 12 Stunden in

dieser Lösung fixiert werden, konnten aber auch deutlich länger lagern, ohne Schaden zu nehmen. Danach wurde die Zellsuspension bei 3500 Upm für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Formalinrest verworfen, in welchem die Zellen resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in ein bereits abgewogenes 1 ml-Eppendorf-Hütchen überführt. Dann wurde bei 6000 Upm zweimal kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nun wurden die Eppendorf-Hütchen erneut gewogen. Die Differenz der zwei Wägungen in μg entsprach der Zugabe der erwärmten Agarose in μl . Es wurde hierfür eine 2%ige low-melt-Agarose-Arbeitslösung verwendet. Die Zellen wurden in der errechneten Agarosemenge unter Vermeidung von Bläschenbildung resuspendiert. Es wurden vorgewärmte Pipettenspitzen verwendet, da die Agarose sonst sehr schnell zäh wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend auf kaltem Parafilm in ca. 5-10 mm große Tröpfchen aufpipettiert und zum Aushärten für mindestens 10 Min. in den Gefrierschrank gegeben. Die Halbkugeln wurden dann im Kurzprogramm des Gewebeeinbettautomaten (Leica TP, Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA) entwässert und anschließend manuell in Paraffin ausgeblockt.

Die AGS-Zellen wurden per Zytospin auf Objektträgern fixiert. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen mit dem Zytospin bei 5000 Upm auf die Objektträger aufgetragen und anschließend mit einer 7:3 Aceton-Methanol-Lösung für 20 Min. bei -20°C fixiert.

2.2.4 Rekultivierungsreihen

Für die Rekultivierungsreihen wurden die Zellen bei der FACS direkt in mit Medium gefüllten Röhrchen aufgefangen und in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (6-well Platten) eingesetzt. Da sich ein unerwartet schnelles Wachstum zeigte, wurden später kleine Zellkulturflaschen verwendet. Es wurde jeweils eine Kultur der isolierten SP-Zellen und eine Kultur der Restpopulation (Non-SP-Zellen) eingesetzt. Bei beiden Kulturen wurden die gleichen Wachstumsbedingungen geschaffen wie für die normale Zellkultur, mit einem Unterschied: Aufgrund der erhöhten mikrobiellen Kontaminationsgefahr der Zellen nach der FACS-Analyse (offenes System), erfolgte die Rekultivierung mit $10 \mu\text{l/ml}$ Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich). Die Zellen wurden im weiteren Verlauf täglich mikroskopisch kontrolliert und das Wachstum dokumentiert. Für die Analyse der rekultivierten Zellen wurden diese abgeerntet, jede

Kultur (SP und Non-SP) mit Hoechst 33342 gefärbt und erneut mit dem FACS Gerät analysiert, um ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten zu beurteilen.

2.2.5 Immunphäotypisierung

2.2.5.1 Antikörper

Für die immunhistochemische Charakterisierung wurden folgende Antikörper verwendet:

Anti-CD133-Antikörper (Cell signaling, Beverly, USA), Musashi1 (MSI 1, Chemicon, Temecula, USA), anti-LGR5-Antikörper (Abcam, Cambridge, USA), CD44 (Biozol, Eching, Deutschland), anti-CD117-Antikörper (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark), anti-FZD7-Antikörper (Aviva Systems, San Diego, USA), anti-HEY1-Antikörper (Abcam, Cambridge, USA) und anti-ADAM17-Antikörper (Abcam, Cambridge, USA). Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde vorab histologisch an Gewebeschnitten von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Kontrollgewebe ausgetestet. Die Austestung der Antikörperverdünnungen erfolgte jeweils ohne und mit Citratvorbehandlung bei pH 6 und pH 9. Genauere Angaben finden sich im Abschnitt zur immunhistochemischen Färbung.

2.2.5.2 Immunphäotypisierung mit FACS

Eine Schwierigkeit bei der Beurteilung des Oberflächenmarkerprofils war die geringe Zahl an isolierbaren SP-Zellen. Deshalb wurde als erstes versucht, die Oberflächenmarker per FACS-Analyse zu untersuchen. Hierzu genügen auch wenige Zellen, um Ergebnisse mit guter Aussagekraft zu erhalten. Die Zellen wurden hierfür zuerst nach dem bereits beschriebenen Protokoll mit Hoechst 33342 gefärbt und anschließend wurde die Antikörperfärbung durchgeführt. Alle auf die Hoechst-Färbung folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um ein weiteres Ausströmen des Hoechst-33342-Farbstoffes aus den Zellen zu verhindern. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:50 für 30 Min. auf Eis inkubiert. Dies hatte sich in vorausgegangenen Austestungen als optimal erwiesen. Im Falle des intrazellulären Antikörperepitops von MSI1 wurde eine Vorbehandlung mit dem Intrastain-Kit von DakoCytomation (Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Sowohl der anti-MSI1-Antikörper,

als auch der anti-CD44-Antikörper lagen als ungekoppelte Primärantikörper vor und mussten mit einem Phycoerythrin (PE) gekoppelten Sekundärantikörper (Rockland, Gilbertsville, USA) gekoppelt werden. Hierfür folgte auf die Inkubation mit dem Primärantikörper und mehreren Waschschritten mit PBS 30 Min. Inkubation mit dem Sekundärantikörper auf Eis. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem FACS.

2.2.5.3 Immunphänotypisierung mit Immunhistochemie

Zunächst wurde geprüft, wie viele MKN45-Zellen in die Agarosekügelchen eingebettet werden müssen, damit genügend Zellen pro Schnitt für die immunhistochemischen Färbungen vorhanden sind. Hierfür wurden 1×10^4 – 1×10^6 Zellen in Agarose gegossen und in Paraffin ausgeblockt. Anschließend wurden Serienschritte angefertigt und jeder fünfte Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Für die Immunfärbungen wurden dieselben in Paraffin gebetteten Agarosekügelchen verwendet, wie im Kapitel „1.2.3. Zytologie“ beschrieben und diese nach einem viertägigen Protokoll gefärbt. Für die immunhistochemische Färbung wurde das *super-sensitive*-Link-Label IHC-System (BioGenex, San Ramon, USA) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur inkubiert:

Am ersten Tag wurden die Parafinschnitte mit Hilfe des Cryostaten hergestellt und anschließend bei 60 °C über Nacht getrocknet.

Am zweiten Tag wurden die Entparaffinierung und der erste Färbeschritt durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte 2 x 15 Min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 Min. 96%, 70% und 50% Äthanol) rehydriert. Vor der eigentlichen Färbung wurden sie zweimal in dH₂O gespült. Für eine Citratvorbehandlung wurde ein handelsüblicher Schnellkochtopf verwendet. Die Schnitte wurden 5 Min. bei maximalem Druck in 1 Liter 1x Citratpuffer inkubiert und anschließend mehrere Minuten kalt mit Leitungswasser gespült. Danach war die Weiterbehandlung für Schnitte mit oder ohne Citratvorbehandlung identisch. Die Schnitte wurden für 10 Min. in TBS-Tween gespült und anschließend für 15 Min. mit 3 Tropfen Avidin (Corning incorporated, Corning, USA) inkubiert, um das endogene Biotin zu blockieren. Freie Avidin-Bindungsstellen wurden durch 15 Min. Inkubation mit 3 Tropfen Biotin (Corning incorporated, Corning, USA) geblockt. Zwischen den Schritten wurde mit TBS-Tween jeweils 3 x 5 Min. gespült. Anschließend wurde der Primärantikörper in *Antibody Diluent* (Zytomed, Berlin) verdünnt und 150 μ l auf jeden Schnitt pipettiert. Nach 30 Min. Inkubation bei

Raumtemperatur, wurden die Schnitte über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am dritten Tag wurde überschüssiger Primärantikörper durch Spülen mit TBS-Tween (3 x 5 Min.) abgespült. Dann wurde das Gewebe mit etwa zwei Tropfen gelbem LINK-Reagenz benetzt (Zytomed, Berlin) und 20 Min. inkubiert. War, wie bei dem CD 44 Antikörper, eine Behandlung mit einem Sekundärantikörper nötig, so wurde dieser anstelle des gelben LINK Reagenz aufgetragen und 30 Min. inkubiert. Eine Behandlung mit dem gelben LINK Reagenz war in diesem Fall nicht nötig, das weitere Vorgehen blieb gleich. Nachdem die Schnitte erneut mit TBS-Tween (3 x 5 Min.) gespült worden waren, wurden sie mit etwa zwei Tropfen rotem LINK Reagenz (Zytomed, Berlin) benetzt und 20 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS-Tween (3 x 5 Min.) gespült und die Substrat-Chromogen Lösung hergestellt. Dazu wurde eine Tablette TBS mit einer Tablette Fast Red Naphtol (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in 1 ml dH₂O gelöst. Die Gewebeschnitte wurden dann mit zwei bis drei Tropfen der frisch angesetzten fertigen Substrat-Chromogen Lösung benetzt und für 10-15 Min. inkubiert. Nachdem die Schnitte mehrmals in dH₂O gespült worden waren, wurden sie zum entgasen über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C in dH₂O belassen. Am vierten Tag wurden die Schnitte 1 Min. mit der Kernfärbung Hämalaun (Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland) gegengefärbt, 5 Min. in lauwarmem Leitungswasser gebläut und abschließend mit Immumount (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Parallel wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Für beide wurden dieselben, unten genannten Gewebeschnitte verwendet. Die Positivkontrolle wurde ebenso gefärbt wie die restlichen Schnitte. Bei der Negativkontrolle wurde statt einer Antikörpersuspension, nur Antibody Diluent ohne Antikörper verwendet. Das weitere Vorgehen war dann identisch wie bei den restlichen Schnitten. Die in den vorausgegangenen Austestungen, als optimal bestimmten Färbebedingungen für die Immunhistochemie, wurden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Antibody	Kontroll-Gewebe	Färbung	Vor-behandlung	Färbe-konzentration	Klonität	Spezies
ADAM 17	Kolon	Kolonepithel	Citrat, pH 6	1:800	monoklonal	Maus
CD 44	Magen	Fibrozyten	Keine	1:100	monoklonal	Ratte
Anti- PE	CD 44 Sekundär-Antikörper			1:200		Maus
CD 117	Appendix	Mastzellen	Keine	1:50	polyklonal	Kaninchen
CD 133	Kolon-karzinom	Tumorzellen	Keine	1:100	monoklonal	Kaninchen
FZD 7	Niere	Tubulus-epithel	Citrat, pH 6	1:400	polyklonal	Kaninchen
HEY 1	Niere	-	Mit und ohne	1:50 – 1:500	polyklonal	Kaninchen
LGR 5	Hirn	Neuronen	Citrat	1:400	polyklonal	Kaninchen
MSI 1	Hirn	Neuronen	Keine	1:100	polyklonal	Kaninchen

Tabelle 1: Verwendete Antikörper mit Angaben über Kontrollgewebe, Vorbehandlungsart, Konzentration der Färbung, Klonität und Spezies.

2.2.6 Auswertung der immunhistologischen Reaktionen

Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erfolgte semiquantitativ mit Bewertung der Intensität und des Anteils der gefärbten Zellen im Präparat. Es wurden immer Präparate von mindestens zwei zeitversetzt durchgeführten Versuchen beurteilt. Hierbei wurden mindestens 80 Zellen in mindestens 8 Blickfeldern bei einer Vergrößerung von 400x evaluiert. Bezüglich des Anteils der gefärbten Zellen entspricht 0=keine Immunreaktion, 1= 1-25% immunreaktive Zellen, 2=26-50% immunreaktive Zellen, 3=51-75% immunreaktive Zellen und 4>75% immunreaktive Zellen. Die Intensität der zytoplasmatischen und nukleären Färbung wurde mit 0 (keine), 1 (schwach), 2 (mittelstark), 3 (stark) und 4 (sehr stark) bewertet.

2.2.7 Gene Array

2.2.7.1 RNA Isolierung

Bei der FACS-Analyse konnten auch mit großen Ausgangszellzahlen nur wenige SP-Zellen gewonnen werden. Deshalb wurden zuerst Testreihen zur Bestimmung jener Zellzahl durchgeführt, welche nötig ist, um die für den DANN-Gene-Array minimal erforderliche RNA-Menge zu gewinnen. Hierfür wurde mit 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 und 1×10^6 Zellen eine RNA-Isolierung durchgeführt und die RNA anschließend mit Photometeranalyse und Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit und Qualität getestet. Jede Isolierung wurde hierbei zweimal durchgeführt, um durch einen Parallelvergleich die Aussagekraft des Tests zu erhöhen. Es wurde ausschließlich mit RNA-freien Materialien gearbeitet. Für die Isolierung wurde der mirVana™ miRNA-Isolation Kit (AM1560, Ambion, Austin, USA) verwendet. Nachdem die Zellen geerntet und gezählt worden waren, wurde die gewünschte Zellzahl abzentrifugiert und das Medium durch mehrmaliges resuspendieren und abzentrifugieren mit PBS von den Zellen abgewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 600 μ l Lysis-Lösung resuspendiert. Nachdem diese Suspension mit 60 μ l Homogenisat-Zusatzlösung vermengt wurde, wurde die Suspension für 10 Min. auf Eis inkubiert. Dann wurden 600 μ l Acid-Phenol:Chloroform hinzugefügt und mit dem Vortexer 30-60 Sec. gemischt. Nach 5 Min. Zentrifugation bei 10.000 g waren drei Phasen der Lösung erkennbar. Die oberste, wässrige Schicht wurde mit der Pipette entnommen, die Menge notiert und in ein frisches Röhrchen überführt. Anschließend wurde das 1,25-fache dieser Menge an 100%igem Alkohol hinzugefügt und die Suspension 10 Sek. durch einen Filteraufsatz zentrifugiert. Dadurch verblieb die RNA im Netz des Filteraufsatzes. Dieser Vorgang wurde zweimal mit Waschlösung anstelle von Alkohol wiederholt. Anschließend wurde die RNA mit 100 μ l 95°C warmer Elutionslösung aus dem Filteraufsatz gespült und so wieder in Lösung gebracht. Anschließend konnte die RNA-Suspension bei -20°C gelagert werden oder direkt für Analysen am Photometer oder die Gelelektrophorese verwendet werden.

2.2.7.1.1 Photometeranalyse

Die Photometeranalyse wurde mit dem Genesis Scan Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Hierfür wurde 2,5 µl RNA Suspension mit 97,5 µl dH₂O gemischt und anschließend in der Analyseküvette in das Gerät eingestellt. Die Analyse erfolgte bei 260 nm Wellenlänge.

2.2.7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Gelkammern vorzubereiten, wurde 1,5%iges Agarosegel kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und solange geschwenkt, bis es klar und transparent wurde. Gleich darauf wurde das noch flüssige Gel in die Kammern ausgegossen und die Schiffchen für die Taschen, in welche die RNA gefüllt wird, eingestellt. Nachdem der Gelblock etwa 30 Min. ausgehärtet war, wurde er vollständig mit Pufferlösung bedeckt. Als Agarosegelpuffer wurde ein TAE Puffer verwendet. Bevor die RNA per Pipette in die Taschen eingefüllt wurde, wurden je 5 µl RNA-Suspension mit 5 µl TAE-Puffer gemischt. Anschließend wurde die Spannung auf 100 Volt eingestellt und die Gelelektrophorese für 30 Min. durchgeführt. Um das Ergebnis zu dokumentieren, wurde das Gel anschließend mit Hilfe des Computerprogramms „Gene Snap“ photographiert.

2.2.7.2 Bioanalyser und Gene Array

Die Analysen der RNA-Expression wurden mit Hilfe von Gene Arrays durchgeführt. Davor wurde per Bioanalyser die Qualität der isolierten RNA überprüft. Die Herstellung der Sonden, die Hybridisierung des genomischen DNA-Gene Arrays der isolierten RNA und die Auswertung der Signale, einschließlich der Statistik, wurden vom Service Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité-Universitätsmedizin Berlin, (LFGC) ausgeführt. DNA-Microarrays dienen dazu, die mRNA-Menge bestimmter Gene nachzuweisen. Hierfür wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet. Diese dienten als Sonden, die an definierte Positionen eines Rasters auf Glasträger aufgebracht wurden. Zunächst wurde, wie im Abschnitt „RNA-Isolierung“ beschrieben, RNA aus den Zellen der Magenkarzinom-Zelllinie AGS extrahiert, die Quantität UV-spektroskopisch bestimmt und die Qualität mit Hilfe des LabChip BioAnalyzers (AGILENT Technologies, Santa Clara, USA) überprüft. Dann wurde die RNA durch

reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nun wurde die cDNA mit dem BioArray High Yield RNA Transcription kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, USA) in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben und durch einen Zwischenschritt mit einer mit Granulat gefüllten Säule (RNeasy, Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Es erfolgte eine erneute Kontrolle der cRNA mit Hilfe des Bioanalyzers. Hierbei wurden die cRNA Stücke mit dem HG U133A /MG U74Av2 Array (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Dabei binden markierte cRNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach mehreren Waschschritten, um die nicht gebundene cRNA abzuwaschen, erfolgte die Färbung der Arrays mit Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (SAPE Molecular Probes, Eugene, USA). Nun folgte eine Markierung mit einem Biotin-gekoppelten Ziege-anti-Streptavidin-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Das Scannen der Arrays wurde mit einem konfokalen GeneChip System (Hewlett-Packard, Santa Clara, USA) durchgeführt. Das entstehende Signal wurde normalisiert, um Abbaueffekten, verschieden guten Extraktionen und anderen Effekten Rechnung zu tragen.

Die Normalisierung der Signale und die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Microarray Suite Version 5.0 Software, der Data Mining Tool Version 2.0 Software (Affymetrix) und der GeneSpring Software Package 7.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) durchgeführt.

Es wurden insgesamt zehn RNA-Proben für die Genanalyse isoliert: Vier SP Proben (SP a-d), vier Non-SP-Proben (Non-SP a-d) und zwei Proben der Gesamtpopulation (GP a-b). Es wurden je zwei SP- und Non-SP-Isolierungen zeitnah durchgeführt (a+b/c+d).

In einem ersten Schritt wurden die zwei zeitnah durchgeführten Isolierungen sowie die beiden GP-Isolierungen miteinander verglichen, um zu überprüfen, wie viele Gene übereinstimmten. Die konstant exprimierten Gene wurden als SP ab, SP cd, Non-SP ab, Non-SP cd und GP bezeichnet. Im zweiten Schritt wurde überprüft, welche dieser gemeinsam exprimierten Gene im Bezug zur Gesamtpopulation hoch- bzw. runterreguliert waren. In einem letzten Schritt wurde überprüft, welche der hoch- bzw. runterregulierten Gene in allen vier Isolierungen (also SP a-d und Non-SP a-d) übereinstimmten, also in allen vier Isolierungen zugleich hoch- oder runterreguliert waren.

Dies erfolgte sowohl für die SP als auch für die Non-SP-Zellen (Abbildung 4).

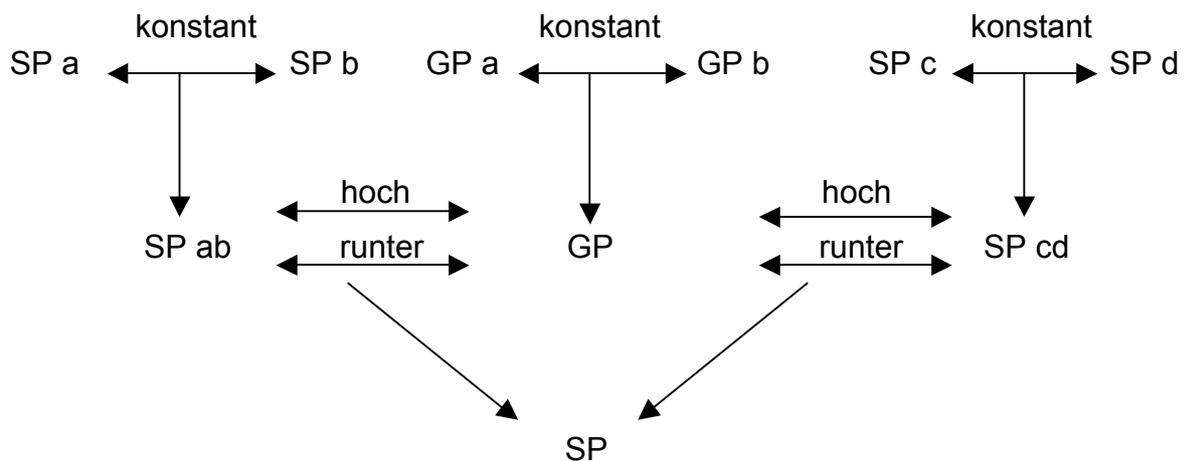


Abbildung 4: Zwei zeitnah durchgeführte Isolierungen wurden erst gegeneinander und dann gegen die Gesamtpopulation abgeglichen

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, welche Gene in SP-Zellen und Non-SP-Zellen gegenläufig, also etwa in SP-Zellen hoch- und simultan in Non-SP-Zellen herunterreguliert waren.

Die Aussagekraft der Versuche wurde durch die Reproduzierbarkeit verstärkt. Es konnte daher eine möglichst sichere Aussage getroffen werden, welche Gene differentiell in SP-Zellen und Non-SP-Zellen exprimiert werden. Die Gene wurden anschließend nach ihrem Zusammenhang mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dem Notch-WNT- und SHH- und FGF-Signalweg und dem p-Glykoprotein untersucht. Hierfür wurden die Microsoft-Excel-Tabellen, in denen die Gene aufgelistet waren, systematisch nach bestimmten Kriterien durchsucht.

2.2.8 Magenkarzinomkollektiv

Zur Überprüfung der prognostischen Aussagekraft der vermehrt exprimierten Oberflächenmarker und Gensequenzen wurde schließlich ein Kollektiv von Magenkarzinomen untersucht. Es wurden Oberflächenmarker gefärbt, die bei den Antikörperfärbungen in der SP-Population vermehrt exprimiert waren (MSI1, LGR5) oder deren Gensequenz in allen vier SP-Isolierungen vermehrt exprimiert wurden und für welche die oben genannten Suchkriterien zutrafen (FZD7, ADAM17, Hey1). Es wurden zuerst Testfärbungen an einem Kollektiv von 10 Adenkarzinomen

unterschiedlichen Differenzierungsgrades vorgenommen. Die hier selektiv und unterschiedlich stark exprimierten Marker (MSI1, FZD7 und ADAM17) wurden an einem größeren Magenkollektiv gefärbt.

2.2.8.1 Tumorproben

Aus den Archiven der Institute für Pathologie der Charite- Universitätsmedizin Berlin und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein wurden aus den Jahren 1998 bis 2005 486 Patienten mit histologisch gesichertem Magenkarzinom herausgesucht. 187 Patienten litten an einem Magenkarzinom des intestinalen Typs nach Laurén und 218 an einem Magenkarzinom diffusen Typs. Die Kohorte bestand aus 304 Männern und 182 Frauen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung betrug 68 Jahre. Informationen zum Überleben lagen bei 374 Patienten vor. Bei den restlichen Patienten lagen keine Informationen zum Überleben vor. Von 374 Patienten starben 313 während der Nachbeobachtung. Der mediane Zeitraum der Nachbeobachtung der Patienten, die zum Endpunkt der Analyse noch lebten, betrug 19 Monate. Patienten mit bekannten Zweitmalignomen oder neoadjuvanter Vorbehandlung wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Charité und des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein genehmigt (Referenz Nummer: EA1/06/2004 und D 453/10).

2.2.8.2 Histologie und pTNM-Klassifikation

Für die histologische Analyse wurde das Gewebe in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die entparaffinierten Proben wurden mit HE gefärbt. Das pTNM Stadium wurde entsprechend den UICC Richtlinien (sechste Ausgabe) festgelegt.

2.2.8.3 Tissue Microarrays

Von den Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden Tissue Microarrays hergestellt. Hierfür wurden drei aussagekräftige Regionen des Paraffinblockes ausgewählt. Hieraus wurden Zylinder mit einem Durchmesser von 1,5 mm gestanzt, die mit anderen Zylindern in einem neuen Paraffinblock ausgegossen wurden. Von diesen Blöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt.

2.2.8.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen AMAM17 (1:800, Abcam; Cambridge, USA) und einem polyklonalen Antikörper gegen FZD7 (1:400; Aviva Systems, San Diego, USA) durchgeführt. Die Vorbereitung der Schnitte und die immunhistochemische Färbung erfolgte entsprechend dem unter Punkt 2.2.5.3. beschriebenen Protokoll.

2.2.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen

Für die Auswertung wurden die Schnitte in der ersten Kategorie nach der Intensität der Färbung in vier Stufen unterteilt: 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung), 2 (moderate Färbung) und 3 (starke Färbung). In einer weiteren Kategorie wurden die Schnitte entsprechend des Anteils an gefärbten Zellen in fünf Stufen unterteilt: 0 (keine gefärbten Zellen), 1 (weniger als 10%), 2 (10-50%), 3 (51-80%) und 4 (mehr als 80%). Die Kombination der beiden Kategorien ergab den Immunreaktivitäts-Score (IRS) mit 0 bis 7 Punkten für jede gefärbte Gewebestanze.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Kieler Magenkarzinom-Kollektivs wurde von Dr. Viktoria Warneke, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel ergänzt.

2.2.8.6 Statistische Analyse

Die Signifikanz der unterschiedlichen Färbungen und klinisch-pathologischen Merkmale wurde mit dem Mann-Whitney-Test oder dem exakten Fischer-Test bestimmt. Die Patienten mit einem Tumor vom Mischtyp wurden aufgrund der geringen Anzahl der Fälle (n=10) von der Analyse ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit des Zusammenhangs zwischen Patientenüberleben und Färbeverhalten wurde mit der Kaplan-Meier-Methode bestimmt. Zusätzlich wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt, um die Signifikanz zu überprüfen. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 17.0 durchgeführt. Die statistische Analyse der immunhistochemischen Färbungen des Magenkarzinom-Kollektivs wurde freundlicherweise von Hans-Michael Behrens, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 SP-Isolierung

3.1.1 Die Hoechst 33342-Färbung beeinflusst Vitalität der Zellen nicht

Der bei den Versuchen verwendete Farbstoff Hoechst 33342 wurde als zytotoxisch beschrieben [46]. Daher wurden zunächst Vitalitätstests mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen (2-10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342) durchgeführt. Die Kulturgefäße der mit unterschiedlichen Mengen Hoechst 33342 gefärbten und auf Eis gelagerten Zellen zeigten die gleiche Anfärbbarkeit (Abb. 2 links) und damit den Erhalt der Zellvitalität.

Auch die Versuchsdurchführung der FACS-Analysen stellt für die Zellen einen erheblichen Stressfaktor dar. Nach der Färbung mit einem potentiell zytotoxischen Farbstoff werden sie bis zu zwei Stunden auf Eis gelagert und mit dem FACS-Gerät analysiert. Deshalb wurde die Vitalität der Zellen noch einmal nach dem Abschluss der FACS-Analysen überprüft (Abb. 2 rechts). Auch hier zeigte sich ein Erhalt der Vitalität der Zellen, selbst bei Einsatz einer Hoechst 33342-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 5). Gegenfärbungen mit Propidiumjodid bestätigten das Ergebnis.

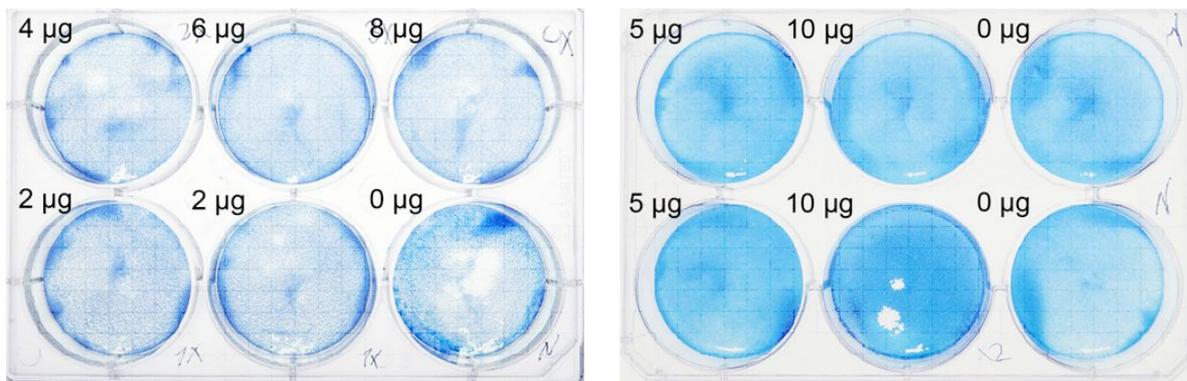


Abbildung 5: Links: Das Kulturgefäß links zeigt die gleichmäßige Anfärbung und somit Vitalität nach der Färbung mit 2 μg , 4 μg , 6 μg und 8 μg Hoechst 33342 ohne FACS-Analyse. Rechts: Die gleichmäßige Anfärbung und somit Vitalität nach der Färbung mit 5 μg und 10 μg Hoechst 33342 und anschließender FACS-Analyse

3.1.2 Zellgröße der Magenkarzinomzellen

Beim Ausmessen der Zellgröße in zwei Regionen pro Zelllinie wurde für AGS ein mittlerer Durchmesser von 28,80 μm und für MKN45 von 14,73 μm gemessen (Abbildung 6). Die Zellen wurden in adhärentem Zustand gemessen. Es muss hierbei beachtet werden, dass mikroskopisch ein weiteres Abrunden der Zellen in Suspension zu beobachten war. Es kann daher von einem Zelldurchmesser von unter 30 μm für beide Zelllinien ausgegangen werden. Aufgrund dieser Größenbestimmung wurde das DIVA FACS Gerät (BD Biosciences, San Jose, USA) ausgewählt.

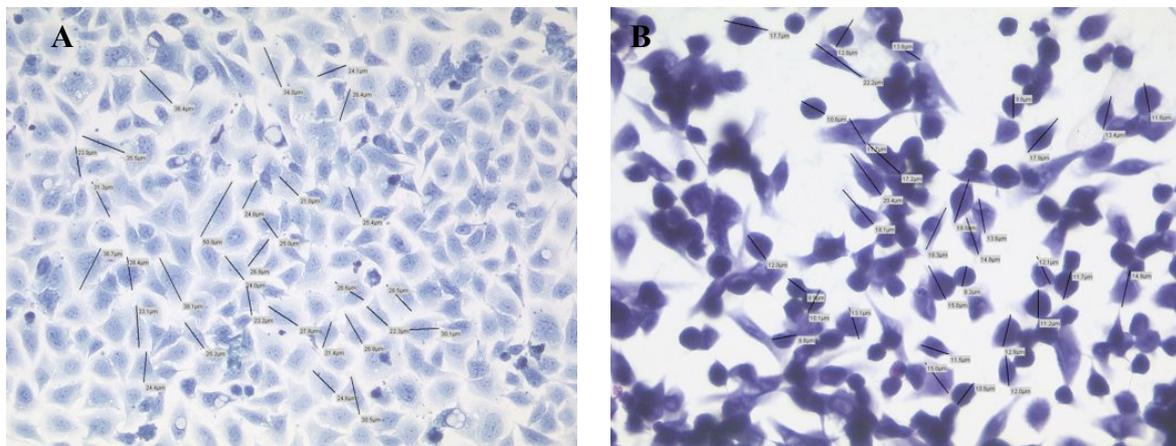


Abbildung 6: AGS zeigt bei der Zellgrößenmessung eine durchschnittliche Zellgröße von 28,80 μm (A). MKN45 zeigt bei der Zellgrößenmessung eine durchschnittliche Zellgröße von 14,73 μm (B).

3.1.3 Die Färbung mit Hoechst 33342 und die FACS-Analyse führen zur reproduzierbaren Darstellung einer Side Population

Es war mit dem beschriebenen Versuchsaufbau möglich, bei beiden verwendeten Magenkarzinom-Zelllinien konstant und reproduzierbar eine SP darzustellen. Die SP-Zellen schleusen den Farbstoff Hoechst 33342 durch den ABC-Transporter aus der Zelle aus und zeigen dadurch eine geringere Anfärbung als die Restpopulation. Erst wurden die avitalen, mit Propidiumjodid markierten Zellen durch ein *Sample Gate* ausgeschlossen. Es waren allerdings kaum abgestorbene oder beschädigte Zellen vorhanden, was wiederum für die geringe Zytotoxizität des Versuchsaufbaus spricht. Durch den Vergleich der Analyse der Zellen mit und ohne Zugabe von Verapamil konnte dann die SP identifiziert werden. Die SP wurde als die Zellgruppe definiert, die eine schwache Hoechst 33342 Färbung zeigte, welche durch die Zugabe von Verapamil verschwand. Bei den vorausgegangenen Verdünnungsreihen erwies sich die Konzentration von 5 µg/ml Hoechst als bestmögliche Konzentration, um die SP darzustellen. Dies wurde durch Verdünnungsreihen bestätigt, die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurden, und war auch in der Literatur als optimale Konzentration angegeben [44]. Bei höheren Konzentrationen wurde die Hintergrundfluoreszenz so stark, dass sie die Beurteilung der SP stark einschränkte. Bei deutlich niedrigeren Konzentrationen war teilweise keine SP mehr darstellbar. Die nach unserer Methode kultivierten, geernteten und gefärbten Zellen waren in jeder Hinsicht geeignet für die FACS-Analyse und zeigten in der Auftragung Hoechst rot gegen Hoechst blau ein in vergleichbaren Arbeiten beschriebenes, charakteristisches Bild [47,32]. Hierbei war auch die Menge der so dargestellten SP mit 0,1% bis 0,8% mit Ergebnissen aus Arbeiten mit ähnlichem Versuchsaufbau vergleichbar (Abbildung 7), [48,49].

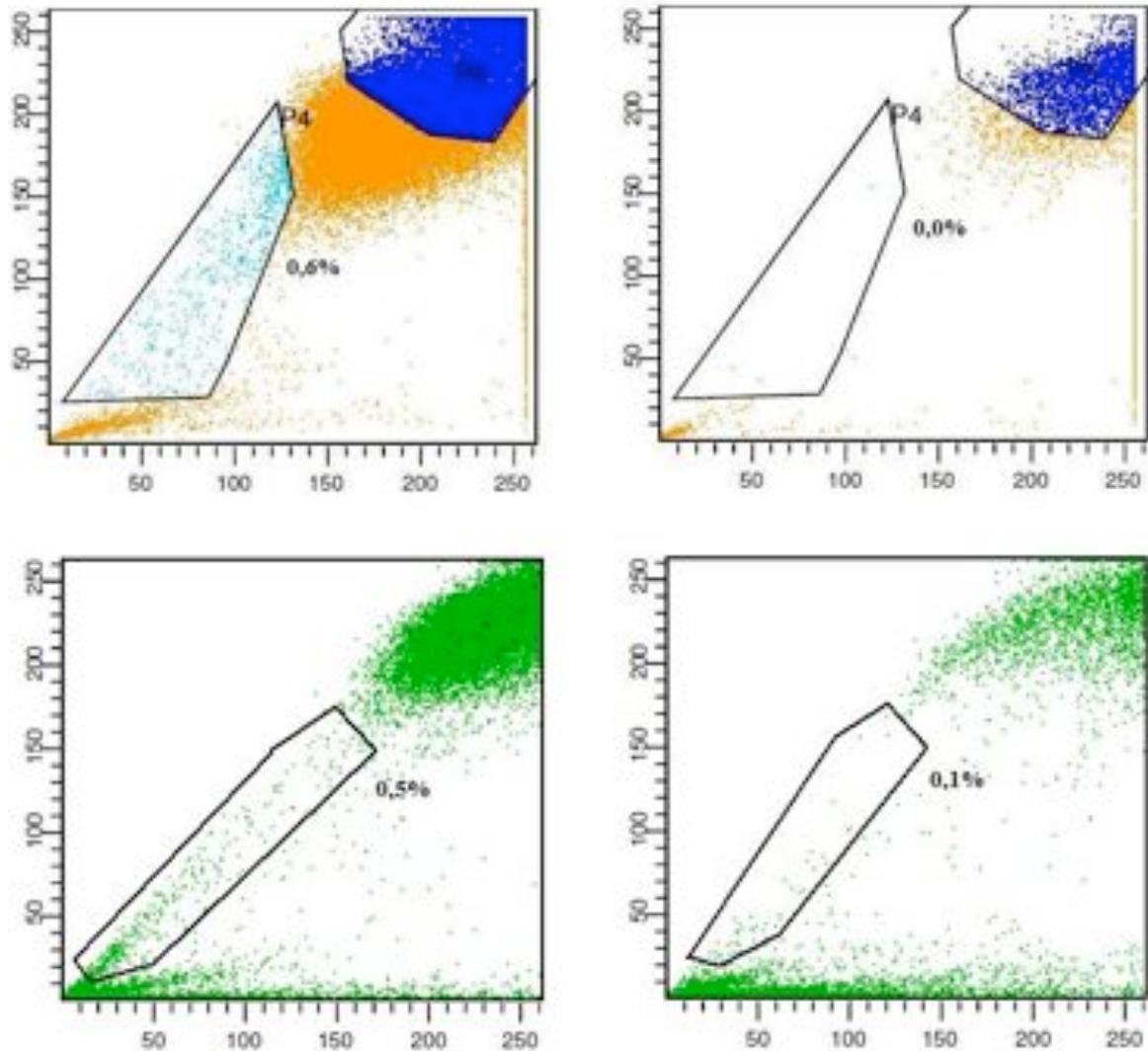


Abbildung 7: Mit Hoechst 33342 gefärbte Zellen der Zelllinie AGS bei FACS-Analyse mit Auftragung Hoechst rot (horizontale Achse) gegen Hoechst blau (vertikale Achse). Links zeigen sich 0,5% bzw. 0,6% der Zellen im SP-typischen Bereich. Durch Zugabe von Verapamil (rechts) verschwindet die charakteristische Minderfärbung (0,0% bzw. 0,1%).

Insgesamt wurden 23 Sortierungen durchgeführt, hiervon 16 mit AGS- und 7 mit MKN45-Zellen. Die beiden Zelllinien zeigten ähnliche Ergebnisse bei der Analyse sowie der späteren Sortierung und waren somit vergleichbar. Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied, ob die Zellen aus dicht bewachsenen oder spärlich bewachsenen Zellkulturflaschen abgeerntet wurden. Auch das Alter der verwendeten Passage schien keinen Einfluss auf das Ergebnis zu haben.

3.2 Zytologie: SP-Zellen sind kleiner und runder als Non-SP-Zellen

Bei den sortierten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten SP- und Non-SP-Zellen zeigte sich, dass sowohl bei AGS als auch bei MKN45 die SP-Zellen kleiner und runder waren, als die Non-SP-Zellen. Dieser Unterschied war bei der Zelllinie MKN45 deutlicher als bei AGS. Dies könnte möglicherweise an der Methodik der Fixierung und Einbettung liegen: Durch die Zytospin Technik (bei AGS verwendet) wurden die Zellen mit großer Geschwindigkeit auf die Objektträger aufgebracht. Dies könnte die Zellform und Größe stärker beeinträchtigen, als die Fixierung in Agarosekügelchen. Trotz der unterschiedlichen Methodik und Ausprägung zeigte sich dennoch dasselbe Bild von kleineren runderen SP-Zellen gegenüber Non-SP-Zellen (Abbildung 8).

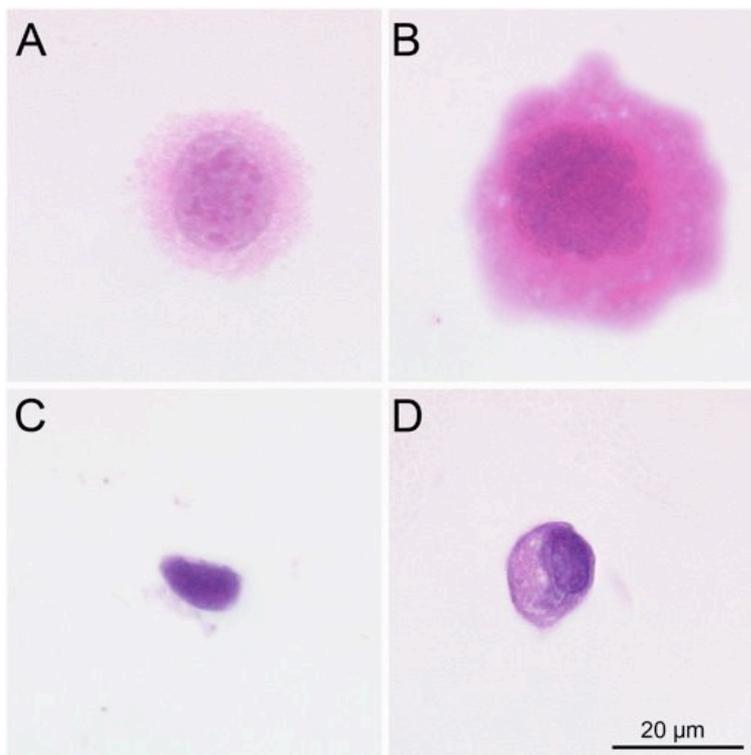


Abbildung 8: SP-Zellen von AGS (A) und MKN45 (C) sind kleiner und runder als Non-SP-Zellen (B, D)

3.3 SP-Zellen zeigen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung und generieren sowohl SP- als auch Non-SP-Zellen

Im nächsten Experiment wurde die Fähigkeit von SP- und Non-SP-Zellen geprüft, erneut Kulturen bilden zu können. Dazu wurden SP- und Non-SP-Zellen mit Hilfe des FACS Gerätes voneinander getrennt, unter gleichen Bedingungen separat rekultiviert und zwischen dem 6. und 11. Tag erneut geerntet, gefärbt und analysiert. Beide Populationen waren in Kultur überlebensfähig und vermehrten sich. Es zeigte sich jedoch, dass die SP-Zellen sowohl SP-Zellen als auch Non-SP-Zellen generierten, während die rekultivierte Non-SP Population vor allem Non-SP-Zellen generierte. Auch war der Anteil der SP-Zellen in der rekultivierten SP Population mit bis zu 5,3% höher als in der Ausgangspopulation. Es hatte also eine Anreicherung von SP-Zellen stattgefunden. Hierbei war zu beobachten, dass der Anteil an SP-Zellen umso größer war, je früher sie nach der ersten Sortierung analysiert wurden: Am 6. Tag der Rekultivierung betrug die SP-Fraktion noch 5,3%, am 10. Tag hatte sich die Anzahl mit 0,2% beinahe dem Ausgangswert von 0,1% angeglichen (Tabelle 2, Abbildung 9,10). Die isolierten SP-Zellen hatten also innerhalb von 10 Tagen der Rekultivierung eine Gesamtpopulation mit SP und Non-SP-Zellen gebildet, die der Ausgangspopulation weitgehend entsprach. Non-SP-Zellen zeigten diese Fähigkeit nicht.

Tage zwischen erster und zweiter FACS-Analyse (Rekultivierungszeit)	6	7	9	10
SP-Fraktion bei erster Sortierung	0,2%	0,2%	0,1%	0,1%
SP-Fraktion nach Rekultivierung der SP-Zellen	5,3%	2,1%	0,8%	0,2%
SP-Fraktion nach Rekultivierung der Non-SP-Zellen	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%

Tabelle 2: Größe der SP Fraktion in rekultivierten SP und Non-SP Populationen.

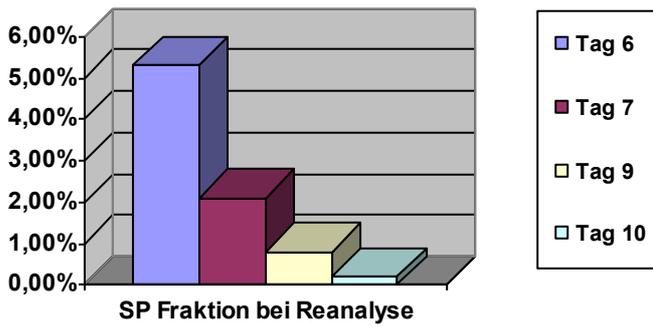


Abbildung 9: Größe der SP-Fraktion in rekultivierten SP- und Non-SP Populationen.

Rekultivierte SP-Zellen

Rekultivierte Non-SP-Zellen

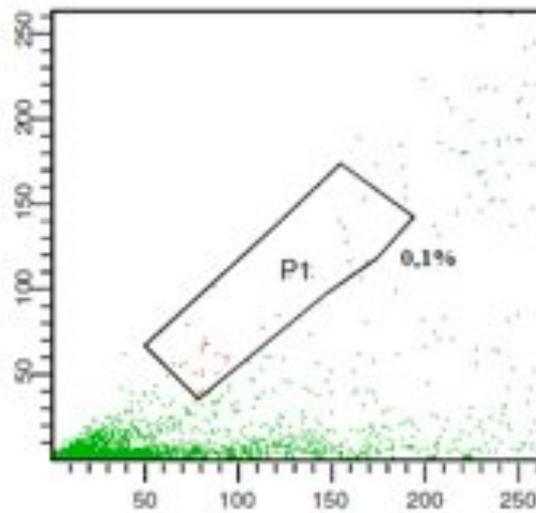
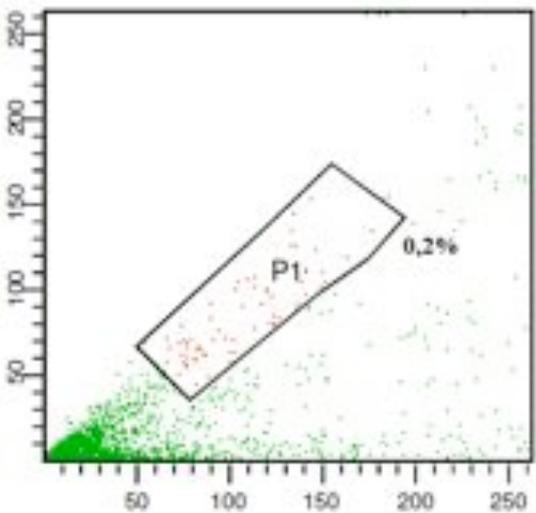
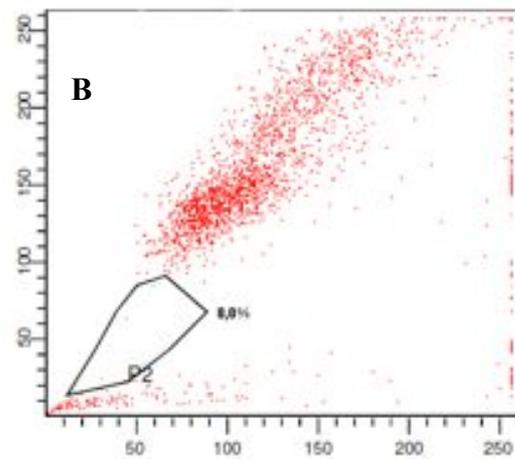
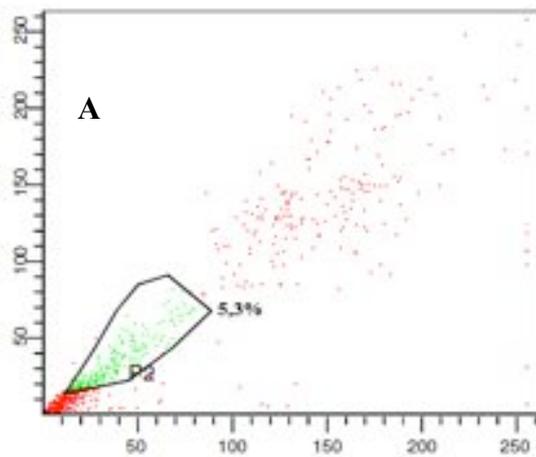


Abbildung 10: Die Ergebnisse der FACS-Analyse der rekultivierten Zellen zeigt nach 6 Tagen einen Anteil von 0,53% SP-Zellen bei den rekultivierten SP-Zellen (A), im Gegensatz zu 0,0% bei den Non-SP-Zellen (B). Nach 10 Tagen hat sich der Anteil mit 0,2% bzw. 0,1% fast wieder angeglichen (C, D).

3.4 Das Wachstumsverhalten der rekultivierten Zellen unterscheidet sich hinsichtlich der Zellform und der Form der gebildeten Zellkolonien

Während der Rekultivierungsexperimente wurde das Wachstumsverhalten der Zellen und Zellkolonien kontinuierlich mit dem Mikroskop überwacht. Dabei zeigte sich, dass sich die rekultivierten Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in den von ihnen gebildeten Kulturen unterschieden. Die rekultivierten SP-Zellen setzten sich in den ersten Tagen als runde Zellen auf dem Boden des Zellkulturgefäßes ab. In der Folge bildeten sie konzentrisch von diesen Zellen ausgehende, kreisförmige Kulturen, die in der Folge konfluieren und im Verlauf auch Zellen mit unterschiedlichen Morphologien bildeten. So waren ab etwa dem 6. Tag auch Zellen mit längeren, fibrozytären Formen zu beobachten. Die Non-SP-Zellen hingegen zeigten von Beginn an eine länger gestreckte fibrozytäre Form. Die von ihnen ausgehenden Kulturen bildeten eher lose zusammenhängende Zellverbände ohne konstante Form (Abbildung 11).

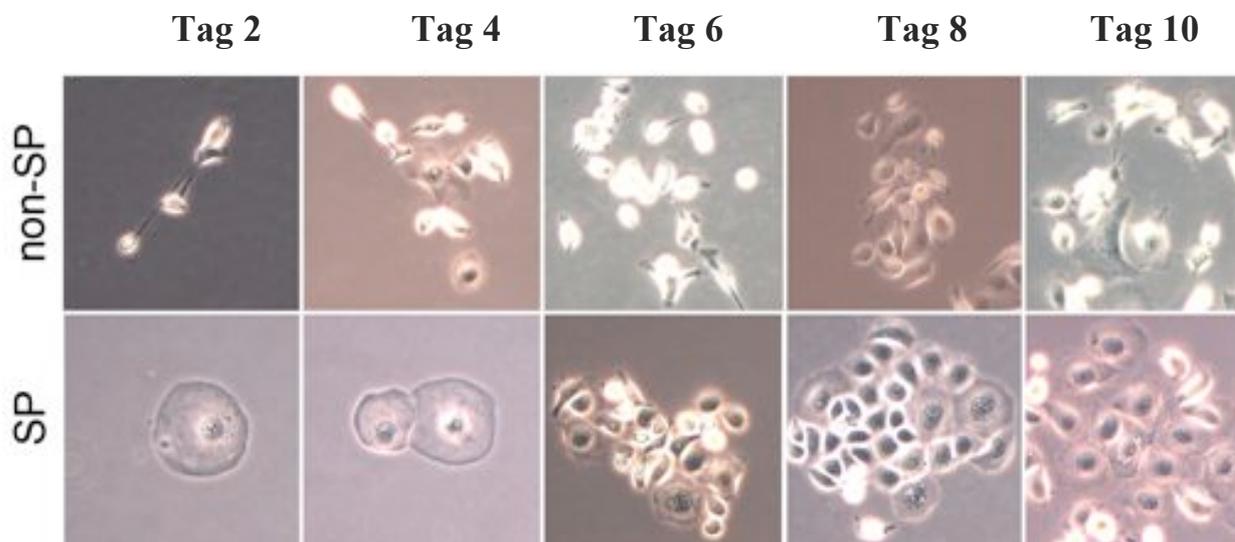


Abbildung 11: Das Wachstumsverhalten von SP- und Non-SP-Zellen unterschied sich bei Rekultivierung hinsichtlich Zellform und Form der gebildeten Kulturen: SP-Zellen bildeten von runden Zellen ausgehende runde Kulturen, Non-SP-Zellen bildeten lose Zellverbände aus fibrozytären Zellen.

3.5 Phänotypisierung der SP- und Non-SP-Zellen

3.5.1 Phänotypisierung per FACS

In den nun folgenden Experimenten sollte der Immunphänotyp der SP und Non-SP-Zellen näher charakterisiert werden. Zunächst wurde dazu die FACS-Analyse eingesetzt. Durch die starke Überlagerung der Fluoreszenz des PE-gekoppelten Antikörpers und Hoechst 33342 war eine Auswertung der Ergebnisse der FACS-Analyse nicht möglich. Erschwerend kam hinzu, dass auch das Signal von PJ das von PE zum Teil überlagerte. Auch war bei den anti-MSI1- und anti-CD117-Antikörpern eine sehr starke unspezifische Anfärbung der Zellen durch den Sekundärantikörper zu beobachten. Dadurch entstand eine diffuse, unspezifische und somit nicht auswertbare Anfärbung der Zellen. Aus diesem Grund wurde zu immunhistochemischen Färbungen übergegangen.

3.5.2 Phänotypisierung mit Immunzytochemie

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Immunphänotypisierung an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellen aufgeführt.

		AGS			MKN45		
		Negative Zellen [%]	Positive Zellen [%]	p-Wert	Negative Zellen [%]	Positive Zellen [%]	p-Wert
CD44	SP	38	62	0,007	63	37	0,08
	Non-SP	51	49		49	51	
CD117	SP	85	15	0,44	83	17	0,42
	Non-SP	88	12		88	12	
CD133	SP	5	95	0,003	0	100	<0,001
	Non-SP	14	86		30	70	
LGR5	SP	0	100	n.s.	0	100	n.s.
	Non-SP	0	100		0	100	
MSI-1	SP	5	95	<0,001	4	96	<0,001
	Non-SP	56	44		43	57	

Tabelle 3: Expression der Antikörper CD44, CD117, CD133, LGR5 und MSI1 in der SP und Non-SP Population von MKN45 und AGS



Abbildung 12: Expression der Antikörper CD133 und MSI1 in der SP- und Non-SP von MKN45 und AGS

In den durchgeführten Antikörperreaktionen zeigte sich eine vermehrte Anfärbung der SP-Zellen mit anti-CD133- und anti-Musashi1-Antikörpern (Abbildung 12, 13). Die Farbtintensität der Färbung mit anti-LGR5-Antikörpern war bei SP-Zellen stärker als bei Non-SP-Zellen. Bei anti-CD44- und anti-CD117-Antikörpern war kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Zelltypen zu erkennen.

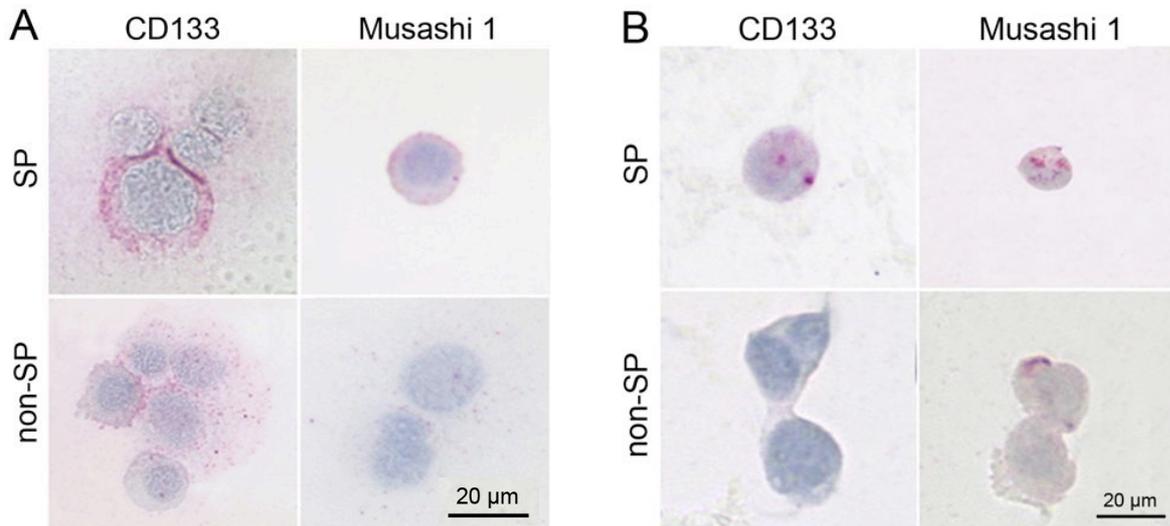


Abbildung 13: Die Expression unterschiedlicher Stammzellmarker wurde immunzytochemisch bestimmt. Sowohl AGS (A) als auch MKN 45 (B) zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression von CD133 und MSI1.

3.6 Genotypisierung der SP- und Non-SP-Zellen

3.6.1 Photometeranalyse

Zellzahl	Test 1			Test 2		
	Absorption b. 260 nm	µg/ml	RNA (ng)	Absorption b. 260 nm	µg/ml	RNA (ng)
1x10 ⁴	0,011	0,44	44	0,005	0,20	20
5x10 ⁴	0,013	0,52	52	0,007	0,28	28
1x10 ⁵	0,014	0,56	56	0,01	0,4	40
5x10 ⁵	0,022	0,88	88	0,025	1,0	100
1x10 ⁶	0,049	1,96	196	0,045	1,8	180

Tabelle 4: Ergebnisse der Photometeranalyse der Testisolierung der RNA: aus 1x10⁴ Zellen konnte bereits genug Material für den Gene Array isoliert werden.

Die Photometeranalyse der isolierten RNA gab Aufschluss darüber, ob genug RNA aus den Zellen isoliert werden konnte, um eine Analyse am Bioanalyzer und einen anschließenden Gene Array durchführen zu können. Bei den beiden Testreihen konnte bereits bei 1×10^4 beziehungsweise 1×10^5 Zellen genug RNA-Material für eine Analyse gewonnen werden (Tabelle 4). Die ähnlichen Ergebnisse bei beiden Parallelversuchen sprechen für die Vergleichbarkeit der beiden Durchführungen und somit für die Reproduzierbarkeit der RNA-Isolierungsmethode.

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Austestung der minimal erforderlichen Zellzahl zur Gewinnung der notwendigen RNA-Menge für die Durchführung eines Gene Arrays zeigte sich folgendes Ergebnis: In beiden durchgeführten RNA-Isolierungen waren in der Agarose-Gelelektrophorese schon bei 5×10^4 Zellen Banden zu erkennen. Wie bei der Photometeranalyse waren beide Parallelversuche vergleichbar. Die hierbei erkennbare DNA-Kontamination konnte bei der hier gestellten Fragestellung vernachlässigt werden, da sie sich als isolierte Banden darstellt und die so isolierte RNA nicht weiter verwendet wurde. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits bei einer Zellzahl von 1×10^5 genügend RNA gewonnen werden kann, um Voranalysen wie die hier aufgeführten mittels Bioanalyzer und Gene Array durchführen zu können, ohne qualitative Einschränkungen in Kauf nehmen zu müssen (Abbildung 14).

Kontrolle 1×10^4 5×10^4 1×10^5 5×10^5 1×10^6 leer 1×10^4 5×10^4 1×10^5 5×10^5 1×10^6

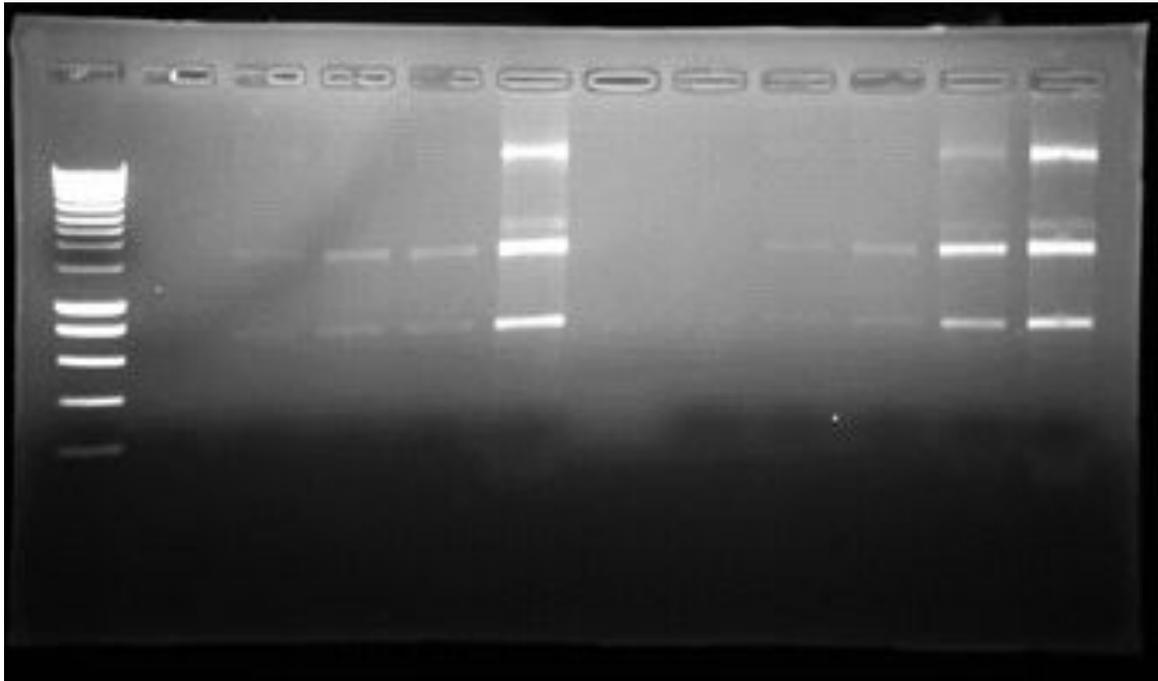


Abbildung 14: Ergebnis der Gelelektrophorese der Testisolierung der RNA

3.6.3 Bioanalyser

Der Bioanalyser diente dazu, die Qualität der isolierten RNA vor dem Gene Array zu überprüfen. Er erlaubt außerdem eine Aussage über den Degradationsgrad der RNA. Mit dem Bioanalyser ist eine schnelle Qualitätskontrolle der RNA möglich, wobei deutlich weniger Material verbraucht wird als bei der Gelelektrophorese. Die Proben, mit denen in der Folge der Gene Array durchgeführt wurde, wurden zunächst per Bioanalyser geprüft. Beim Bioanalyser zeigte sich, dass alle gewonnenen Proben den Voraussetzungen für Bioanalyser und Gene Array sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht entsprachen. So konnte das genomische Profil von vier SP-/Non-SP-Paaren und der Gesamtpopulation auf dem Gene Array bestimmt werden.

3.6.4 Gene Array

3.6.4.1 Hoch- und runterregulierte Gene

Als nächstes sollte gezeigt werden, wie viele und welche Gene der SP- und Non-SP- im Gegensatz zur Gesamtpopulation vermehrt bzw. vermindert exprimiert werden. Es wurden hierfür ausschließlich AGS-Zellen verwendet. Die mRNA von vier verschiedenen FACS-Sortierungen, sowie von zwei unsortierten Proben nach Hoechst-Färbung wurde per Gene Array analysiert, wodurch 10 Datensätze generiert wurden: vier Datensätze von SP-Zellen (SP a-d), vier Datensätze von Non-SP-Zellen (Non-SP a-d) und zwei Datensätze von unsortierten Zellpopulationen (UCP a-b).

Die Datensätze der zehn Arrays wurden gegeneinander normiert, um Artefakte zu minimieren. Für die Normierung wurden im ersten Schritt die Daten von zwei Parallelversuchen gegeneinander abgeglichen (SP-a gegen SP-b, SP-c gegen SP-d, Non-SP-a gegen Non-SP-b, Non-SP-c gegen Non-SP-d, UCP-a gegen UCP-b). Wie in Graphik 3 gezeigt, konnten wir zwischen 40649 und 44542 Gene identifizieren, die gemeinsam in SP-, Non-SP und UCP-Zellen exprimiert waren. Im zweiten Schritt identifizierten wir Gene, die mit einem fold-change factor von $>1,5$ hoch- oder runterreguliert waren und trennten SP- und Non-SP-Zellen von UCP-Zellen und SP- von Non-SP-Zellen. 4806 bis 6908 Gene sind zwischen SP- und UCP-Zellen unterschiedlich exprimiert, 2804 bis 4292 Gene zwischen SP- und UCP-Zellen und 1391 bis 3124 Gene zwischen SP- und Non-SP-Zellen. Im dritten Schritt suchten wir nach Genen, die in allen vier SP-Zellisolierungen im Vergleich zu den UCP-Zellen hoch- bzw. runterreguliert waren (Abbildung 15). Wir konnten schließlich 531 Gene identifizieren, von denen 172 Gene hoch- und 359 Gene herunterreguliert waren (siehe Anhang 1).

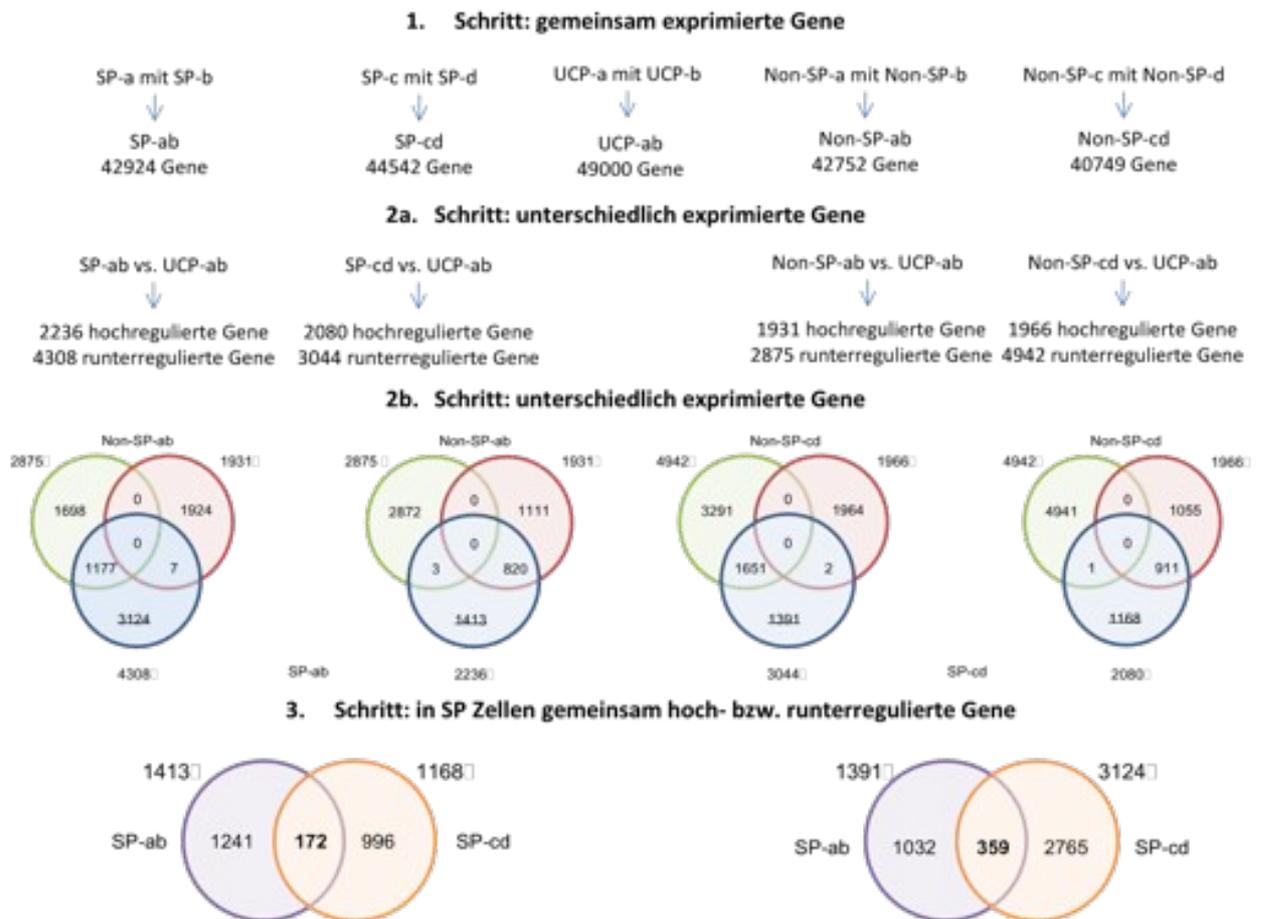


Abbildung 15: bei SPab waren 1168 Gene hochreguliert, bei SPcd 1413. 172 Gene waren bei beiden gegeneinander abgeglichenen Sortierungspaaren hochreguliert.

Auf die Relevanz dieser Gene, in Bezug auf die Fragestellung der Arbeit, wird in der Folge genauer eingegangen.

Die Gene wurden nach ihrem Zusammenhang mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren, dem Notch-, WNT-, SHH- und FGF-Signalweg und dem p-Glykoprotein untersucht.

3.6.4.2 Gene welche in SP-Zellen hoch- oder herunterreguliert sind, können auch in Tumorproben nachgewiesen werden.

Im folgenden Versuchsaufbau sollte auf transkriptioneller und translationeller Ebene überprüft werden, ob einige der 172 in SP-Zellen hochregulierten Gene auch in Tumorproben von Patienten mit Magenkarzinom nachgewiesen werden können. In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, der Notch- [6,7,8] SHH- [9,10,11], FGF- [12] und WNT- [13,14] Signalweg eine wichtige Rolle in der Stammzell-Biologie spielen. Die Datensätze wurden daher

systematisch nach Genen untersucht, die eine Rolle in einem dieser Signalwege spielen. Wir konnten 10 Gene identifizieren, die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GNAS, SMO, YY1, S1PR3, GPR161), und/oder Teile des Notch- (ADAM17, Hey1), WNT- (FZD7, FOSL1), oder FGF- (FGFR2) Signalwegs kodieren. Antikörper für die Immunhistochemie waren für zwei der identifizierten Gene im Handel verfügbar (ADAM17 und FZD7). Wir überprüften deren Expression schließlich an Magenkarzinom-Proben sowie an gesundem Magengewebe.

Sowohl ADAM17, als auch FZD7 waren in Magengewebe nachweisbar (Abbildung 16 und 17). In den Proben von gesundem Magengewebe konnte ADAM17 in einigen verstreuten Zellen der Magendrüsen nachgewiesen werden, wobei FZD7 fast ausschließlich in inflammatorischen Zellen nachweisbar war. In den Foveoli war weder FZD7 noch ADAM17 nachweisbar.

Interessanterweise waren beide Marker an der Basis der intestinalen Metaplasie nachweisbar während Zellen weiter oben in der Metaplasie keine ADAM17 oder FZD7-Expression zeigten (Abbildung 16). Beide Marker waren ebenso in Magenkarzinomzellen nachweisbar, wobei die Färbung vor allem zytoplasmatisch und manchmal membranständig nachweisbar war (Abbildung 17).

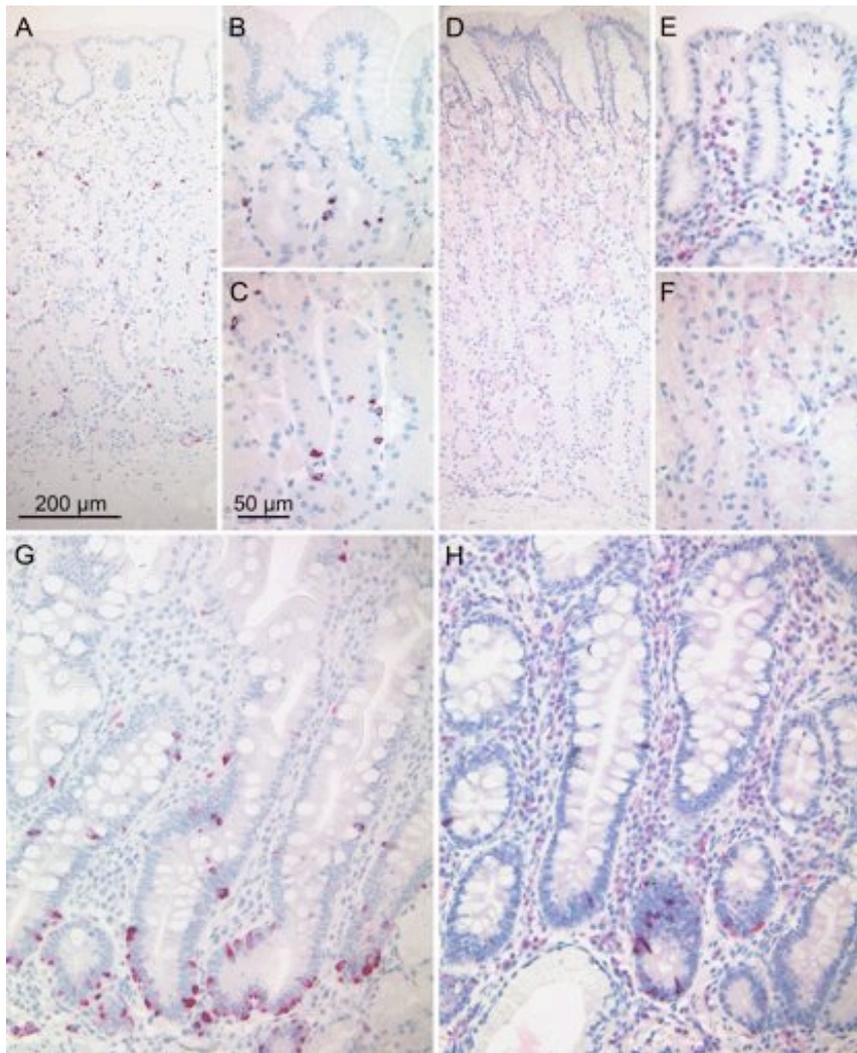


Abbildung 16: Expression von ADAM17 (**A,B,C,G**) und FZD7 (**D,E,F,H**) in nicht neoplastischer Magenmukosa. Im Epithel der Foveoli wurde kein ADAM17 (**B**) oder FZD7 (**E**) exprimiert. ADAM17 war in einigen Zellen der Magendrüsen nachweisbar (**C**), FZD7 wurde von inflammatorischen Zellen der Lamina propria exprimiert (**E**), während das Drüseneithel negativ war (**F**). ADAM17 (**G**) und FZD7 (**H**) wurden ebenso an der Basis einer intestinalen Metaplasie exprimiert. Originalvergrößerungen 100-fach (**A,D,G,H**) und 400-fach (**B,C,E,F**) mit Hämatoxylin-Gegenfärbung.

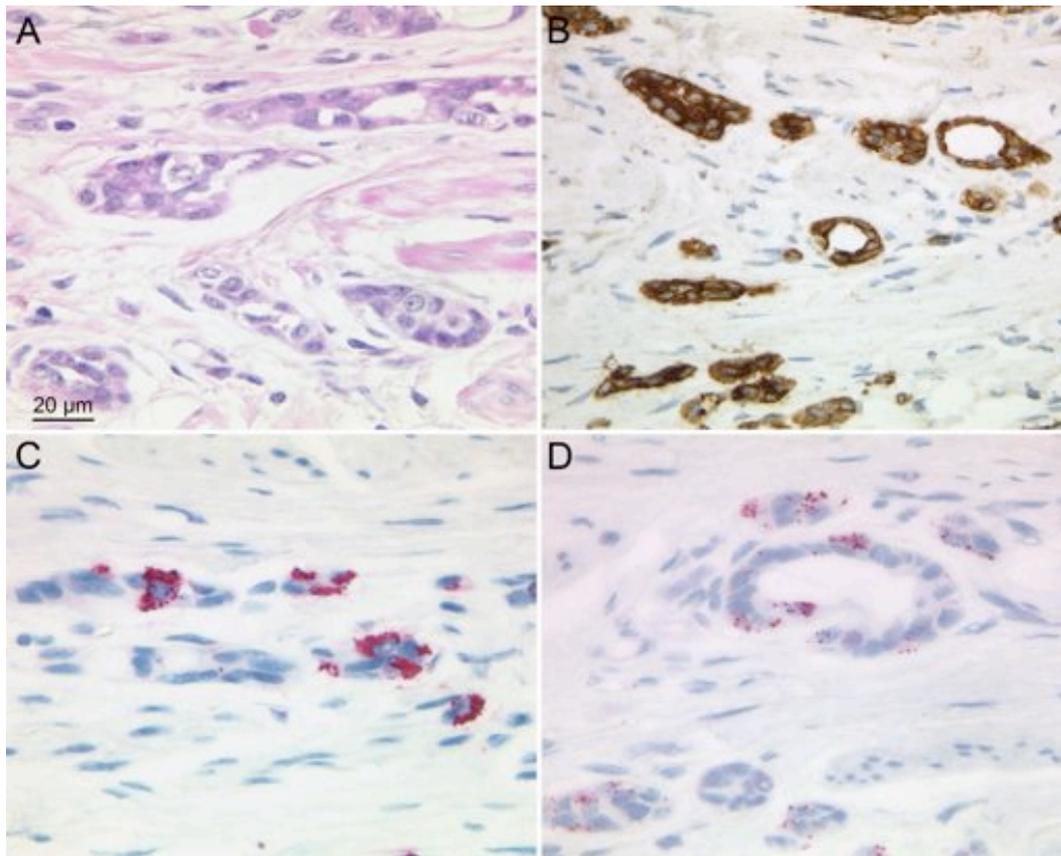


Abbildung 17: Expression von ADAM17 und FZD7 in Magenkarzinom. ADAM17 und FZD7 werden in Magenkarzinomen des intestinalen Typs exprimiert. Alle Bilder stammen vom selben Fall. HE (A), Panzytokeratin (B), ADAM17 (C), FZD7 (D); Hämatoxylin-Gegenfärbung, Originalvergrößerung 600-fach.

Anhand von Tissue-Micro-Arrays waren 123 (26%) der untersuchten Magenkarzinomfälle ADAM17-positiv und 162 (34%) FZD7-positiv. Es zeigte sich, dass eine eindeutig signifikante Korrelation zwischen der Expression von FZD7 und dem Tumortyp ($p=0,005$) sowie der Expression von ADAM17 ($p<0,001$) bestand. Keiner der beiden Marker zeigte eine Korrelation zu lokalem Tumorwachstum (T-Status), Lymphknotenbeteiligung (N-Status) oder Differenzierungsgrad des Tumors (G-Status), (Tabelle 5).

Ergebnisse

Klinisch- pathologische Charakteristika	ADAM17		p-Wert	FZD7		p-Wert
	negativ [n (%)]	positiv [n (%)]		negativ [n (%)]	positiv [n (%)]	
Geschlecht			0,668			0,161
Männer	214 (73)	81 (27)		182 (62)	111 (38)	
Frauen	133 (75)	45 (25)		120 (69)	54 (31)	
Alter [Jahre]			0,723			0,125
<68	128 (74)	44 (26)		117 (68)	55 (32)	
≥68	140 (72)	53 (28)		113 (60)	76 (40)	
T-Kategorie			0,655			0,796
pT1	44 (76)	8 (24)		26 (44)	33 (56)	
pT2	43 (80)	8 (20)		24 (67)	32 (33)	
pT3	132 (71)	45 (29)		100 (52)	91 (48)	
pT4	127 (74)	36 (26)		87 (50)	87 (50)	
Lymphknoten Status			0,525			0,627
pN0	103 (77)	31 (23)		86 (66)	45 (34)	
pN1	50 (70)	21 (30)		39 (56)	31 (44)	
pN2	54 (69)	24 (31)		51 (67)	25 (33)	
pN3	135 (73)	49 (27)		122 (66)	63 (34)	
Stadium			0,309			0,412
IA	10 (71)	4 (29)		9 (69)	4 (31)	
IB	8 (73)	3 (27)		10 (91)	1 (9)	
IIA	22 (79)	6 (21)		13 (48)	14 (52)	
IIB	20 (74)	7 (26)		15 (56)	12 (44)	
IIIA	29 (78)	8 (22)		25 (68)	12 (32)	
IIIB	46 (70)	20 (30)		45 (69)	20 (31)	
IIIC	45 (85)	8 (15)		37 (69)	17 (31)	
IV	42 (63)	25 (37)		36 (55)	30 (45)	
Differenzierungsgrad			0,467			0,308
G1/G2	81 (70)	34 (30)		96 (61)	45 (39)	
G3/G4	254 (74)	89 (26)		223 (66)	114 (34)	
Laurén Klassifikation			0,277			0,005
Intestinal	128 (71)	52 (29)		103 (57)	78 (43)	
Diffus	151 (71)	61 (29)		150 (73)	57 (27)	
Gemischt	35 (83)	7 (17)		25 (61)	16 (39)	
FZD7			<0,001			
Negativ (=0)	232 (80)	60 (20)				
Positiv (>0)	99 (61)	63 (39)				

Tabelle 5: Korrelation der Expression von ADAM17 und FZD7 mit unterschiedlichen klinischen Patienten-Charakteristika

Schließlich untersuchten wir die Korrelation zwischen unterschiedlichen klinisch-pathologischen Patienten-Charakteristika und dem Überleben der Patienten. Um diese Zusammenhänge zu überprüfen wurden die immunhistochemisch gefärbten Tumorproben der Patienten in zwei Kategorien unterteilt: Die Proben mit einem IRS unterhalb des Medians (IRS=0) wurden als ADAM17- oder FZD7-negative Proben definiert, wohingegen Karzinomproben mit einem IRS von ≥ 1 als positiv gewertet wurden.

Das Patientenüberleben korrelierte signifikant mit dem lokalen Tumorwachstum ($p < 0,001$), der Lymphknotenbeteiligung ($p < 0,001$), und dem Differenzierungsgrad des Tumors ($p < 0,001$). Interessanterweise hatten Patienten, die an einem FZD7 positiven Tumoren litten, ein eindeutig signifikant kürzeres Überleben (10,3 vs. 13,4 Monate Tabelle 6, Abbildung 18).

Ergebnisse

Charakteristika	Anzahl der Patienten [n]	Anzahl der Ereignisse [n]	Medianes Überleben [Monate; (95% C.I.)]	p-Wert [Logrank Test]
Geschlecht				0,843
Männer	233	199	12,1 (10,0 – 14,3)	
Frauen	140	113	12,6 (9,5 – 15,6)	
Alter [Jahre]				0,338
<68	177	148	12,8 (9,9 – 15,8)	
≥68	196	164	12,1 (10,2 – 14,0)	
T-Kategorie				<0,001 ^{T)}
pT1	37	15	50,5 (39,3 – 61,7)	
pT2	34	24	21,9 (0 – 45,4)	
pT3	150	129	13,6 (11,3 – 15,9)	
pT4	151	143	8,3 (5,7 – 10,9)	
Lymphknoten Status				<0,001 ^{T)}
pN0	82	48	34,7 (25,3 – 44,1)	
pN1	52	43	15,5 (10,6 – 20,4)	
pN2	69	61	16,4 (12,1 – 20,7)	
pN3	166	156	8,0 (6,1 – 9,8)	
Stadium				<0,001 ^{T)}
IA	13	11	50 (0 - 103)	
IB	11	9	13 (0 - 27)	
IIA	28	28	15,5 (0 – 35,2)	
IIB	26	26	15,5 (9,1 – 21,9)	
IIIA	36	36	12,1 (9,0 – 15,2)	
IIIB	67	67	12,6 (9,9 – 15,3)	
IIIC	54	54	4,8 (0,3 – 9,3)	
IV	69	69	6,4 (4,5 – 8,4)	
Differenzierungsgrad				<0,001
G1/G2	83	60	24,5 (14,3 – 34,7)	
G3/G4	278	243	11,1 (9,2 – 13,0)	
Laurén Klassifikation				0,052 ^{T)}
Intestinal	136	113	14,7 (10,2 – 19,1)	
Diffus	173	147	11,1 (8,8 – 13,5)	
Gemischt	36	29	9,4 (5,7 – 13,1)	
ADAM17				0,805
Negativ	267	225	12,1 (10,3 – 13,9)	
Positiv	97	82	12,7 (9,2 – 16,3)	
FZD7				0,008
Negativ	229	190	13,4 (10,9 – 15,8)	
Positiv	131	113	10,3 (7,6 – 12,9)	

^{T)} über die Gruppen gepoolt

Tabelle 6: Korrelation der Expression von ADAM17 und FZD7 mit dem Überleben der Patienten

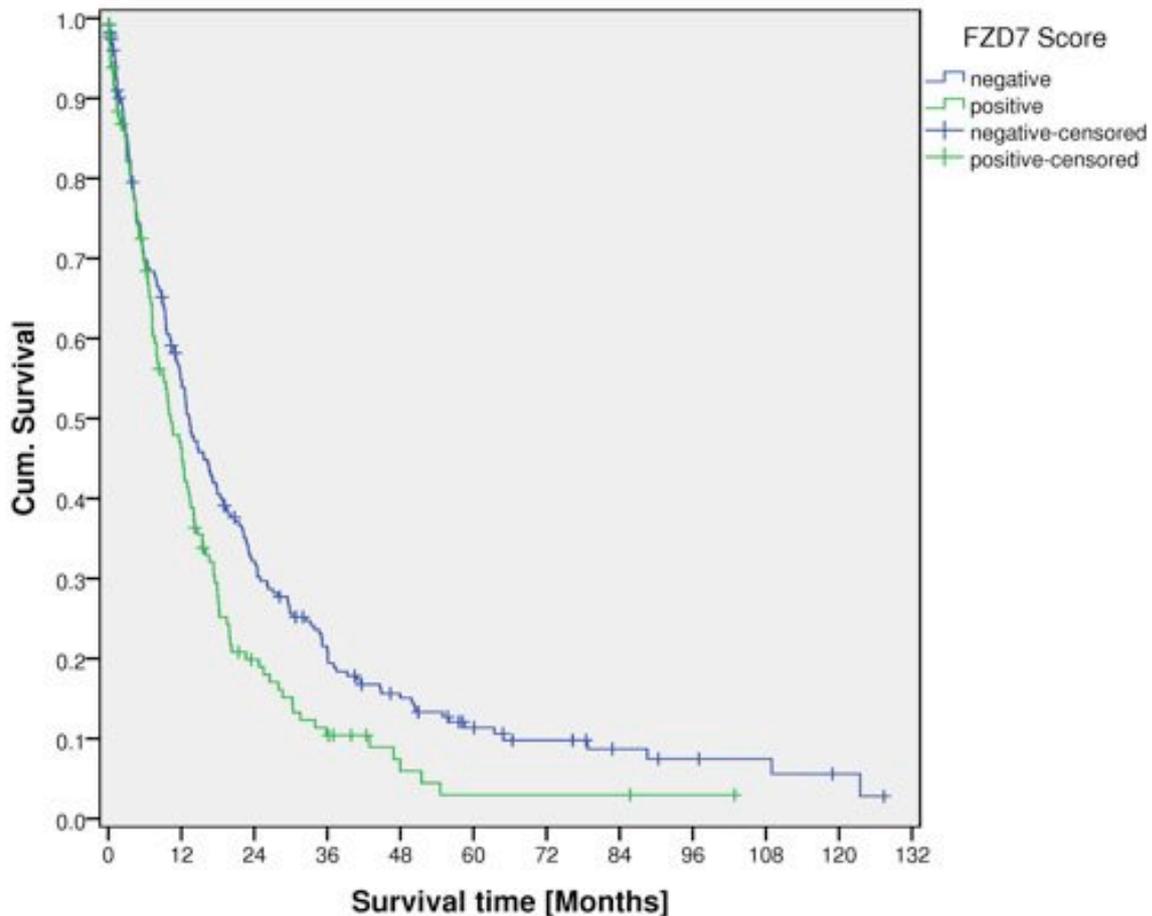


Abbildung 18: Kaplan- Meier Kurve zur Darstellung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit zur Expression von FZD7.

Im Anschluss an die experimentelle Arbeit im Rahmen der hier vorliegenden Promotionsarbeit erfolgte eine zusätzliche Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse durch quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. Diese Versuche wurden von Eva Simon, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel durchgeführt. Die Expression von ADAM17 und FZD7 konnte hierbei per RT-PCR in einem unabhängigen Satz von 38 intestinalen Magenkarzinomen bestätigt werden. Hierbei wurde gesunde Magenmukosa mit Tumorgewebe verglichen. Die Expression von ADAM17 war in Karzinom-Gewebe deutlich höher als in gesundem Gewebe ($p < 0,001$). Dieser Unterschied war bei FZD7 auf transkriptioneller Ebene nicht nachweisbar ($p = 0,448$). Dieser mangelnde Nachweis eines Expressionsunterschiedes hängt wahrscheinlich sicherlich mit der Expression von FZD7 in Entzündungszellen sowohl in neoplastischer als auch nicht neoplastischer Schleimhaut zusammen.

4 Diskussion

Eines der Hauptziele der Krebsforschung ist es, die molekularen Mechanismen von Krebsentstehung und tumorbiologischen Vorgängen wie Invasion und Metastasierung zu verstehen. Die Hypothese, dass Tumoren eine heterogene Ansammlung von Zellen sind, und dass stammzellähnliche Zellen für die Tumorentstehung und Ausbreitung verantwortlich sind, rückt hierbei immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Basierend auf dieser Hypothese wäre das Unvermögen der gängigen Therapiestrategien Krebs endgültig zu bekämpfen, auf ein falsches Therapieziel zurückzuführen. Die möglicherweise der Erkrankung zugrunde liegende Struktur bleibt demnach unbehandelt: Die Krebsstammzelle. Ein interessantes Modell hierfür bietet die SP, da SP-Zellen viele ABC-Transporter exprimieren. Es wird angenommen, dass Tumorrezidive von Krebsstammzellen ausgehen, die reich an ABC-Transportern sind.

Die vorliegende Arbeit geht von der Hypothese aus, dass SP-Zellen Stammzeleigenschaften aufweisen und hatte zum Ziel, die Existenz von SP-Zellen in den beiden Magenkarzinom-Zelllinien AGS und MKN45 zu prüfen und zu bestätigen, die SP-Zellen phäno- und genotypisch zu charakterisieren und phänotypische Eigenschaften der SP-Zellen in situ beim Magenkarzinom wieder zu finden. Die zwei Magenkarzinom-Zelllinien wurden hierfür mit Hoechst 33342 gefärbt und per FACS in SP und Non-SP-Zellen aufgeteilt. Es zeigte sich, dass in beiden Zelllinien ein kleiner Anteil reproduzierbar darstellbarer SP-Zellen vorhanden ist. Die Größe der Subpopulation (0,1% - 0,6%) war mit der ähnlicher Arbeiten vergleichbar (0,001% - 0,5%) [48,49]. Diese SP-Zellen waren kleiner und runder als die Restpopulation, exprimierten CD133 und MSI1 und bildeten sowohl SP, als auch Non-SP-Zellen bei Reaktivierung nach. Bei der genomischen Analyse konnten wir nachweisen, dass vermehrt Gene exprimiert werden, die für Stammzeleigenschaften kodieren. Schließlich gelang es uns, einige dieser Marker in einem Magenkarzinomkollektiv wieder zu finden und es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten.

4.1 SP-Zellen exprimieren vermehrt die Stammzellmarker CD133 und Musashi1

CD133 ist ein Oberflächenmolekül mit fünf Transmembrandomänen. Seine genaue Funktion ist weitgehend unbekannt, doch seitdem 1997 der Nachweis von CD133 auf hämatopoetischen Stammzellen gelang, war es Gegenstand intensiver Forschung [50]. CD133 gilt gemeinhin als einer der am besten belegten Stammzellmarker unterschiedlichen Gewebes, erlangte aber bald auch als Marker für Krebsstammzellen zunehmend an Bedeutung. Es wurde nachgewiesen, dass Zellen mit Stammzeleigenschaften in Tumoren des zentralen Nervensystems und in epithelialen Tumoren vermehrt CD133 exprimieren [51].

In den von uns durchgeführten Analysen zeigte sich, dass in den beiden untersuchten Zelllinien eine eindeutig vermehrte Expression von CD133 zu beobachten war. Auch war die Intensität der Färbung bei SP-Zellen größer. Dieser Unterschied war bei MKN45 deutlicher ausgeprägt als bei AGS: alle SP-Zellen waren CD133-positiv, Non-SP-Zellen hingegen waren zu fast 30% negativ.

Erst kürzlich kamen Zweifel auf, ob CD133 als Stammzellmarker valide ist. In der Arbeit von Nishii et al. beispielsweise zeigte die SP von Magenkarzinomzellen eine verminderte CD133-Expression. Nishii geht daher davon aus, dass sich CD133 nicht als Marker für Progenitorzellen eignet [52]. Die Unterschiede hinsichtlich des Versuchsaufbaus und der verwendeten Zelllinien bei den verschiedenen Studien sind allerdings beträchtlich und lassen eine abschließende Beurteilung noch nicht zu.

Bei den von uns durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigte sich auch, dass Musashi1 (MSI1) in der SP gegenüber der Non-SP deutlich vermehrt exprimiert war.

Das RNA-bindende Protein Musashi wurde erstmals im Drosophila-Modell nachgewiesen, wo es zwei aufeinander folgende asymmetrische Zellteilungen von sensorischen Zellen ermöglicht. Das Musashi-Protein kommt in ähnlicher Form in den meisten Lebewesen vor und MSI1 ist das erstmals bei Säugetieren nachgewiesene Homolog. MSI1 ist vermehrt in neuronalen Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems nachweisbar. Diese undifferenzierten, proliferativen Zellen bringen eine Vielzahl von Tochterzellen wie Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten hervor.

MSI1 ist hier Voraussetzung für zwei aufeinander folgende asymmetrische Zellteilungen, ein Grundcharakteristikum von Stammzellen [53].

Interessanterweise lässt sich Musashi nicht nur im Nervensystem nachweisen. Erst kürzlich wurde in mehreren Studien eine vermehrte Expression in den intestinalen Krypten beschrieben, die als Stammzellregion gelten [54]. Es wurde auch gezeigt, dass MSI1 vermehrt im Darmepithel von neugeborenen Mäusen nachweisbar ist, und dass diese Expression im Laufe des Lebens abnimmt [55]. Dies legt den Schluss nahe, dass MSI1 ein Marker für intestinale Stammzellen und deren direkten Tochterzellen ist. Da Musashi im Rahmen dieser Studien auch vermehrt in Dysplasien und Adenomen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen wurde, war dieser Marker von besonderem Interesse.

LGR5 (*leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*) wurde vor kurzem als neuer Marker von intestinalen Stammzellen identifiziert. Im Darm wird LGR5 ausschließlich in den tiefen Krypten des Darmepithels exprimiert. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zylinderzellen am Kryptengrund multipotent sind und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Es wurde nachgewiesen, dass sich diese LGR5-positiven Zellen in unterschiedliche Zelltypen weiterentwickeln [56]. Das Vorkommen von LGR5 in einer Vielzahl von Gewebstypen machte eine nähere Untersuchung seiner Rolle als potentieller universaler Stammzellmarker interessant. In den von uns durchgeführten Färbungen waren zwar alle gefärbten Zellen LGR5-positiv, jedoch zeigte sich bei den SP-Zellen in beiden untersuchten Zelllinien eine deutlich intensivere Anfärbung als bei den Non-SP-Zellen. Es besteht also ein Unterschied hinsichtlich der Ausprägung der Expression von LGR5, als ein Marker für die eindeutige Unterscheidung der beiden Zelltypen kann LGR5 nach unserer Auffassung aber nicht fungieren.

Interessanterweise konnte keine unterschiedliche Expression der potentiellen Stammzellmarker CD117 (c-kit) oder CD44 bei SP und Non-SP-Zellen nachgewiesen werden.

CD117 gilt vorwiegend als Marker für Progenitorzellen und Cajal-Zellen des Gastrointestinaltrakts und wird ebenso von Mastzellen exprimiert [57]. Bei den von uns durchgeführten Färbungen war keine Expression von CD117 nachweisbar, was für eine Gewebespezifität dieses Markers spricht.

Speziell bei Magenkarzinomen wurde erst kürzlich die Rolle von CD44-positiven Zellen hinsichtlich Invasionstiefe, Metastasierung und Prognose von Tumoren des Intestinaltraktes diskutiert [58]. Takaishi et al. wiesen bei CD44-positiven Zellen ein hohes Potential zur Tumorbildung, sowie eine gesteigerte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika nach [59]. Auch andere Arbeiten lassen einen Zusammenhang zwischen CD44 und Stammzeleigenschaften vermuten. Die CD44-Variante HCELL wird vermehrt bei hämatopoetischen Stammzellen gefunden.

Wir konnten keinen eindeutig reproduzierbaren Zusammenhang zwischen SP-Zellen und CD44-Expression zeigen: Während CD44 in der SP von AGS vermehrt exprimiert war und auch eine intensivere Anfärbung zeigte, war CD44 bei MKN45 bei Non-SP-Zellen stärker exprimiert als bei SP-Zellen. Diese variable Expression zwischen den Zelllinien spricht gegen eine umfassende Eignung von CD44 als Stammzellmarker.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den beiden von uns untersuchten Zelllinien eine vermehrte Expression der beiden Marker CD133 und MSI1 in der SP zu beobachten war. Ebenso zeigten die SP-Zellen eine deutlich stärkere Färbintensität bei der Anfärbung mit LGR5. Die Marker CD117 und CD44 zeigten keinen eindeutigen Unterschied im Färbungsverhalten.

Dies kann als weitere Bestätigung von CD133, Musashi1 und LGR5 als Stammzellmarker gesehen werden, die in mehreren Arbeiten bereits als potentielle Marker für intestinale Stammzellen beschrieben wurden. Die Reproduzierbarkeit in zwei Zelllinien erhöht hierbei die Aussagekraft der durchgeführten Versuche.

Da allerdings bei beiden Zelllinien auch Non-SP-Zellen eine Expression zeigten, eignen sich diese Marker nicht als alleiniges Charakteristikum für die Trennung dieser Subpopulation von der Gesamtpopulation.

4.2 SP-Zellen bilden in Kultur sowohl SP- als auch Non-SP-Zellen

Im Folgenden wurden SP- und Non-SP-Zellen in Rekultivierungsreihen untersucht. Hierfür wurden die Zellen nach der Hoechst Färbung in die beiden Subpopulationen separiert und getrennt rekultiviert.

Bei diesen Rekultivierungsversuchen zeigte sich, dass die rekultivierten SP-Zellen sowohl SP-Zellen, als auch Non-SP-Zellen bildeten. Hierbei war der Anteil der SP-Fraktion bei der Rekultivierung größer als in der Ausgangspopulation. Der Anteil war umso größer, je zeitnäher die Reanalyse zur ersten Sortierung durchgeführt wurde. Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass die von gereinigten SP-Zellen ausgehende Zellpopulation reicher an SP-Zellen ist als die Ausgangspopulation, es findet also eine Anreicherung von SP-Zellen statt. Dies wurde ebenfalls in der Arbeit von Haraguchi et al. beschrieben [47].

Non-SP-Zellen hingegen scheinen wenige, beziehungsweise gar keine SP-Zellen hervorbringen zu können. Da auch die Non-SP-Zellen in Kultur überlebensfähig waren und Teilungsaktivität zeigten, scheint auch bei ihnen keine gravierende Schädigung durch den Hoechst 33342-Farbstoff zu erfolgen, obwohl ihnen die Fähigkeit fehlt, den Farbstoff aus der Zelle zu schleusen und dieser so länger in der Zelle verbleibt.

Die Tatsache, dass SP-Zellen sowohl SP- als auch Non-SP-Zellen bilden können, beweist einerseits ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, als auch die zur Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen, was Stammzellen charakterisiert. Somit sind diese Zellen pluripotent und haben nach den Ergebnissen unserer Analysen die Fähigkeit, heterogene Tumorpopulationen zu bilden. Eine einzelne Zelle könnte so ausreichen, um einen Tumor zu bilden, dessen Zellen sich morphologisch und funktionell unterscheiden. Dies ist eine der Voraussetzungen für Metastasierung, eine der wichtigsten Fähigkeiten maligner Tumoren und entscheidender Prognosefaktor.

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Größe der SP-Fraktion abnahm, je länger die SP-Zellen rekultiviert wurden. Bereits nach 10 Tagen hatten die isolierten SP-Zellen so eine neue Tumorpopulation generieren können, die in Zusammensetzung und Heterogenität der Ausgangspopulation entsprach. Diese Beobachtung findet sich auch in vivo: Metastasen, die vermutlich aus einer oder nur wenigen gestreuten Tumorzellen entstehen, entsprechen in Zusammensetzung und Struktur dem Primärtumor. In anderen Untersuchungen war keine Anreicherung von SP-Zellen

erreicht worden. Dies liegt womöglich daran, dass die SP-Zellen nach Sortierung 14 Tage oder länger kultiviert wurden, bevor die Reanalyse stattfand. Nach unseren Ergebnissen ist zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zur Ausgangspopulation mehr nachweisbar.

Diese Beobachtung ließ sich auch hinsichtlich der Morphologie der Zellen reproduzieren: Die rekultivierten SP-Zellen unterschieden sich zu Beginn morphologisch eindeutig von den rekultivierten Non-SP-Zellen: Sie zeigten eine runde Form nachdem sie sich abgesetzt hatten, die Non-SP-Zellen waren lang gestreckt und ähnelten Fibroblasten. Die SP-Zellen begannen nach etwa sechs Tagen in den entstandenen Kulturen auch Zellen zu bilden, die von der Form den rekultivierten Non-SP-Zellen glichen. Die Non-SP-Zellen hingegen bildeten Zellen, die von der Morphologie den Ausgangs-Non-SP-Zellen entsprachen. Auch war die Form der entstandenen Kulturen unterschiedlich: Während die SP-Zellen kompakte, runde Kulturen bildeten, die konzentrisch von den Ausgangszellen ausgingen, bildeten die Non-SP-Zellen lockere Zellverbände. Die beiden rekultivierten Zelltypen unterscheiden sich also nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie, sondern auch hinsichtlich ihres biologischen Wachstumsverhaltens *in vitro*. Interessant hierbei wäre zu untersuchen, inwieweit dieses Wachstumsverhalten von externen Faktoren, wie beispielsweise der Zugabe von Wachstumsfaktoren, beeinflussbar ist. Mehrere Studien haben sich in der Vergangenheit bereits mit Wachstumsfaktoren beschäftigt, die möglicherweise die Bildung von Progenitorzellen in Zellkulturen fördern.

4.3 SP-Zellen exprimieren Gene, die auf transkriptioneller und translationeller Ebene für Stammzeleigenschaften kodieren

Nach der phänotypischen Charakterisierung der SP-Zellen interessierte im Folgenden die Zellen auf transkriptioneller, sowie translationeller Ebene zu untersuchen.

Die Basis der Ausdifferenzierung von Stammzellen ist ein ständiger Informationsaustausch zwischen den einzelnen Zelltypen und ihrer Umgebung. Diese Kommunikation wird von einigen Signalwegen wie dem WNT-, Notch-, FGF- oder dem Hedgehog-Signalweg entscheidend reguliert. Eine Störung dieser Signalwege kann zu aberranter Zelldifferenzierung und -teilung und so zu Tumorentstehung führen.

Einige aktuelle Studien haben hierbei nukleäre Faktoren identifiziert, welche die gemeinsame Fähigkeit haben, die Ausdifferenzierung von pluripotenten Zellen zu hemmen. Diese Faktoren sind dafür verantwortlich, dass Progenitorzellen in einem undifferenzierten Stadium verharren. Eine vermehrte Expression dieser Faktoren führt dadurch zu einer Anreicherung von Stammzellen.

Die Ergebnisse der Gene Arrays wurden hinsichtlich solcher Faktoren und deren Rolle im Notch-, WNT-, Hedgehog-, insbesondere dem SHH- und den FGF-Signalweg analysiert.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der genomischen Profile der aus der Magenkarzinom-Zelllinie AGS isolierten SP-Zellen 172 hoch- und 359 herunterregulierte Gene in allen vier RNA-Isolierungen. Einige von ihnen werden mit Stammzeleigenschaften oder verwandten Signalwegen in Verbindung gebracht. Die SP-Zellen aus der Magenkarzinom-Zelllinie AGS zeigten im Vergleich zu Non-SP-Zellen eine starke Expression von Stammzellgenen.

Zwei Gene beispielsweise zeigen einen Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg, der die Zellweiterentwicklung während Stammzellerneuerung und -differenzierung reguliert. Er ist bei Malignomen häufig dereguliert und stellt deshalb einen Angriffspunkt für genetische oder pharmazeutische Manipulation dar [60].

Die beiden Gene ADAM17 und HEY1, die von allen vier isolierten SP-Populationen vermehrt exprimiert wurden, bilden einen Teil dieses Signalwegs. Eine Studie von Zheng et al. zeigte, dass die ADAM17-Expression direkt mit der Tumorzell-Invasionsaktivität korreliert. Bei den zwei von ihnen untersuchten Gehirntumor-Zelllinien zeigte sich, dass bei vermehrter ADAM17-Expression die Invasionsaktivität der

Tumorzellen deutlich zunahm. Diese vermehrte Invasionsaktivität scheint auf einer Aktivierung des EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) und des daran gekoppelten Signalwegs zu beruhen [12]. Wir konnten zeigen, dass eine signifikante Hochregulation von ADAM17 auf transkriptioneller, wie auch translationeller Ebene in Magenkarzinomen stattfindet. Bei den untersuchten Proben von Magenkarzinomfällen konnte allerdings kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika gefunden werden. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass ADAM17 vor allem von Zellen an der Basis der intestinalen Metaplasie exprimiert wurde (Abbildung 16 G). Dies ist die Regenerationszone des Epithels. Aus ihr gehen bei Gewebsschäden oder Instandhaltungsmechanismen neue Epithelzellen hervor, die während ihrer Migration nach oben Differenzierungsvorgängen unterliegen. Das vermehrte Vorkommen von ADAM17 in dieser Zone macht diesen Marker als potentiellen Stammzellmarker zusätzlich wahrscheinlich.

Ein zweites vermehrt exprimiertes Gen, HEY1, wird im Rahmen des Notch-Signalwegs transkriptional vermehrt aktiviert, um Stamm- und Progenitorzellen zu erhalten. Dies geschieht dadurch, dass Gene der HEY-Familie die Transkription von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren unterdrücken und so die Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen verhindern [61]. Dieser Vorgang wird durch das RNA-bindende Protein Musashi1 reguliert. Dies wurde von Sakamoto et al. bereits am konkreten Beispiel der Unterdrückung der Ausdifferenzierung von Gehirnvorläuferzellen nachgewiesen [62]. Die Untersuchungen von Sharff et al. lieferten ähnliche Ergebnisse bei mesenchymalen Vorläuferzellen [63].

Zuletzt lieferten Studien auch interessante Ansätze bezüglich der therapeutischen Modulierung des Notch-Signalwegs bei der Therapie maligner Erkrankungen [64]. In den von uns durchgeführten Analysen der Oberflächenmarker der SP-Zellen zeigte sich eine vermehrte Expression von Musashi1. Die vermehrte Aktivierung des Notch-Signalwegs wurde demnach durch drei unabhängige Methoden nachgewiesen: Phänotypisierung, Genanalyse und im Patientenkollektiv.

Ein weiterer Signalweg, der einen direkten Zusammenhang zu Stammzeleigenschaften aufweist, ist der WNT-Signalweg. Er hat eine Aktivierung des membranständigen β -Catenin-Komplexes zur Folge, was wiederum dazu führt, dass Vorläuferzellen Stammzeleigenschaften bewahren und es so zu einer Akkumulation von Stammzellen

kommt [58]. Dies wird dadurch verstärkt, dass β -Catenin-gekoppelte TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren eine vermehrte Transkription von Genen bewirken, die für die Proliferation zuständig sind. Es kommt so zu einer vermehrten Proliferation von Zellen mit Stammzeleigenschaften ohne Ausdifferenzierung.

Eines der Gene, die für den WNT-Signalweg kodieren und in den von uns untersuchten AGS-RNA-Isolierungen vermehrt exprimiert war ist FZD7. Die Aktivierung des WNT-Signalwegs beginnt mit der Bindung des WNT-Liganden an den FZD7-Rezeptor. Dies führt zu einer Relokalisation des β -Catenin-Komplexes in den Kern. Nicht nur in der Arbeit von Dormeyer et al. wurde eine vermehrte Expression von FZD7 in embryonalen Stammzellen nachgewiesen [65]. Auch die Ergebnisse von Melchior et al. belegen eine bis zu 200-fache Hochregulierung von FZD7 in embryonalen Stammzellen gegenüber differenzierten Zellen. In FZD7-knock-out-Zelllinien embryonaler Stammzellen zeigten sich deutliche Veränderung hinsichtlich der Morphologie und Rezeptorexpression der Stammzellen. So wurde eine stark verminderte Expression von stammzelltypischen Transkriptionsfaktoren wie OCT4 nachgewiesen [66]. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass FZD7 ein stammzelltypischer Oberflächenrezeptor ist, der eine entscheidende Rolle bei dem Schutz von Stammzeleigenschaften spielt. Ebenso vermehrt exprimiert wurde FOSL1. Dieses Gen kodiert für Leucine-Zipper-Proteine, die zusammen mit Proteinen der JUN-Familie Transkriptionsfaktoren bilden. Als solche regulieren sie die Zellproliferation und haben einen negativen Einfluss auf die Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen.

Sowohl der Notch-, als auch der WNT-Signalweg, insbesondere HEY1 und FZD7, wurden in der Arbeit von Mitsutake et al. als in SP-Zellen hochreguliert nachgewiesen. Da diese Gene in vielen Arbeiten als stammzelltypische Gene beschrieben wurden, zieht Mitsutake den Schluss, dass SP-Zellen Stammzellcharakteristika aufweisen [67].

Wir konnten nicht nur zeigen, dass SP-Zellen vermehrt FZD7 exprimieren, auch zeigte sich bei der Analyse des Magenkarzinomkollektivs ein deutlich signifikanter Zusammenhang zu dem Überleben der Patienten. Hinzu kommt, dass auch FZD7 vorwiegend an der Übergangszone zwischen Foveoli und Drüsenkörper zu finden ist (Abbildung 19) und dass FZD7-Immunreaktivität in Karzinomzellen signifikant häufig mit einer ADAM17-Immunreaktivität vergesellschaftet ist.

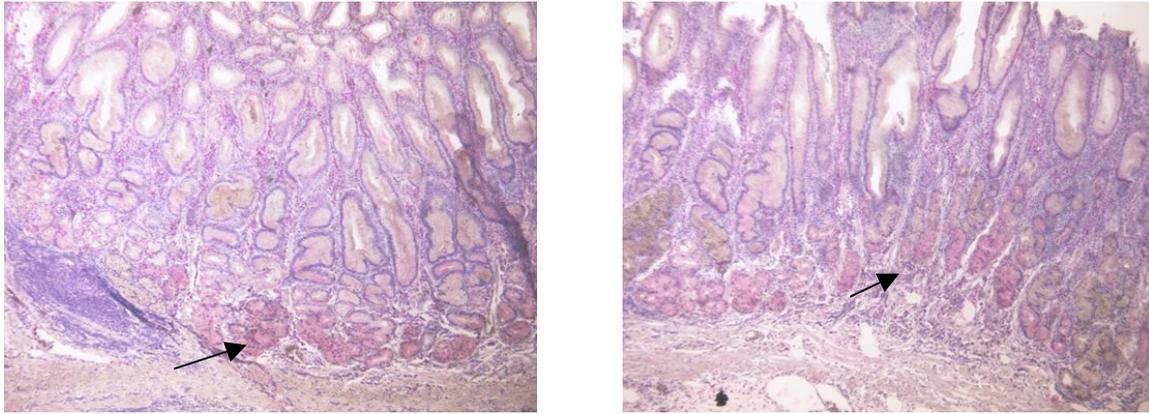


Abbildung 19: Vermehrte Expression von FZD7 in der proliferativen Region der Übergangszone zwischen Foveoli und Drüsenkörper (Pfeil)

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass sowohl FZD7 als auch ADAM17 als Marker für die Differenzierung von Magenzellen gelten können. Des Weiteren kann FZD7 als möglicher prognostischer Marker gelten, dessen vermehrte Expression den Krankheitsverlauf beeinflusst.

Ein weiterer Signalweg, der bezüglich Stammzeleigenschaften von Bedeutung ist, ist der Hedgehog-Signalweg, insbesondere der Sonic-Hedgehog-Signalweg (SHH).

Das Gen für Smoothened-Signal Übertragung, SMO, ist ein wichtiger Teil dieses Signalwegs und war in allen vier RNA-Isolierungen vermehrt exprimiert.

Im Falle maligner Erkrankungen wurde eine vermehrte Proliferation von Krebszellen bei Aktivierung des Hedgehog-Signalweges beobachtet. Inhibitoren von SMO und anti-SHH-Antikörper werden als Krebstherapie bei Karzinomen mit vermehrter Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs eingesetzt [68]. SHH spielt außerdem eine Rolle bei der Wiederherstellung von geschädigter Magenmukosa durch Stammzellen der Magendrüsen bei chronischer Infektion mit *Helicobacter pylori* [69].

4.4 Prognostische Faktoren und therapeutische Relevanz

Das Magenkarzinom gehört mit rund einer Million neu diagnostizierter Fälle pro Jahr nach wie vor zu den weltweit häufigsten Malignomen. Trotz neuer Erkenntnisse bezüglich der Entstehung dieser Krankheit und seiner Behandlung beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Magenkarzinom nur 10-15% [1]. Dies erfordert neue Ansätze bei Früherkennungs- und Therapiemethoden, um das Neuauftreten des Magenkarzinoms und seiner Rezidive zu verhindern.

Einer der entscheidenden Faktoren bezüglich der Prognose des Magenkarzinoms ist der Zeitpunkt seiner Diagnosestellung und die richtige Einschätzung der Dignität des Tumors. Je früher die Krankheit erkannt wird, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass eine kurative Therapie noch möglich ist. Die Etablierung neuer immunhistochemischer Marker könnte eine genauere Prognose ermöglichen und so auch die Therapieadaptation verbessern.

Ein bemerkenswertes aktuelles Beispiel hierfür ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu. Durch den Einsatz des HER2-Antikörpers Trastuzumab konnte das Überleben von Patienten mit HER2-positiven Magenkarzinomen signifikant verlängert werden [70]. Im Rahmen der ToGa-Studie, bei der fast 4000 Patienten mit HER2-positiven Magenkarzinomen mit Trastuzumab behandelt wurden gelang es, die vielversprechenden Ergebnisse der vorangegangenen experimentellen Untersuchungen in einer klinischen Phas- III-Studie zu festigen [71].

Unkontrolliertes und damit vermehrtes Zellwachstum stellt ein Grundcharakteristikum maligner Erkrankungen dar. Die bisherige konventionelle Therapie mit Chemotherapeutika richtete sich daher vor allem gegen schnell wachsende Zellpopulationen. Allerdings treten auch bei Magentumoren nach vollständiger Remission häufig Spätrezidive auf.

Mehrere interessante Modelle wurden in der letzten Zeit entwickelt, um dies zu erklären. Wie bereits erläutert, wird beispielsweise vermutet, dass diese von sich langsam teilenden Zellen ausgehen, die lange Zeit einem Zellzyklusarrest unterliegen und zusätzlich Stammzellcharakteristika aufweisen. Diese Zellen tragen die maligne Mutation bereits in sich und wenn sie nach teils langen Ruhephasen proliferieren, entsteht ein Rezidiv.

Eine andere Erklärung ist die, dass diese Zellen die Chemotherapeutika zwar aufnehmen, durch aktive Prozesse aber wieder aus der Zelle schleusen und so keiner Schädigung unterliegen.

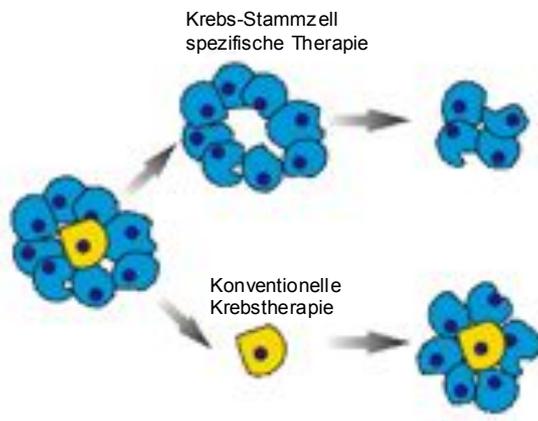


Abbildung 20: Durch herkömmlich Therapieverfahren wird nur die Tumormasse bekämpft, durch Krebsstammzellen entstehen somit Rezidive.

Um auch diese Zellen durch Therapie angreifbar zu machen, muss man erst den Mechanismus ihrer Resistenz gegen Chemotherapeutika verstehen und darauf aufbauend neue Behandlungskonzepte entwickeln (Abbildung 20).

Das SP-Modell greift diese Hypothesen auf. Zellen, die toxischen Substanzen ausgesetzt sind, können auf unterschiedliche Weise Resistenzen entwickeln. Dazu gehören verminderte Aufnahme oder vermehrter Abbau der toxischen Substanz, Veränderung der Zielstruktur wie etwa der Rezeptoren oder vermehrte Ausschleusung der schädigenden Substanz aus der Zelle. Diese Vorgänge können zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika führen. Dies stellt insbesondere bei der Krebstherapie ein Problem dar. ABC-Transportern kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Ihre Fähigkeit, intrazelluläre Farbstoffe nach außen zu schleusen könnte im Zusammenhang mit der Fähigkeit stehen, auch zytotoxische Medikamente aus der Zelle zu pumpen, was wiederum das Ansprechen des Tumors auf Chemotherapien negativ beeinflussen würde.

Diese Fähigkeit könnte direkt die Überlebensfähigkeit solcher Zellen erhöhen und ihre Teilungsfähigkeit während und nach zytostatischer Therapie erhalten, was wiederum die Metastasierungsfähigkeit nach Therapieende begründen würde. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die SP von Gliomzelllinien der Ratte

hauptsächlich verantwortlich für deren Malignität in vivo war [72]. Die Identifizierung von Vorläuferzellen in Tumoren mit intrinsischer Resistenz gegen Zytostatika liefert somit auch wichtige Erkenntnisse für eine verbesserte medikamentöse Therapie. Besonders drei Gene, die für ABC-Transporter kodieren, können bei fast allen therapieresistenten Malignomen nachgewiesen werden: ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, und ABCG2/BCRP [73]. Inhibitoren von ABC-Transportern wurden bereits entwickelt und es wird weiter intensiv daran geforscht, die Entstehung von Resistenzen bei der Chemotherapie zu verhindern. So konnte in der Studie von Merry et al. eine Anreicherung der Chemotherapeutika Adriamycin, Vincristine, und Etoposide in Zelllinien von kleinzelligen Bronchialkarzinomen erreicht werden, wenn dem Kulturmedium Verapamil zugesetzt wurde [74]. Jüngste Experimente mit hoch affinen und hoch spezifischen ABCB1 Inhibitoren haben gezeigt, dass die Aktivität des Transporters bereits durch niedrigste Dosierungen des Inhibitors blockiert werden kann. Diese niedrigen Dosierungen hatten weder gravierende Nebenwirkungen, noch beeinflussten sie die Wirkung des Chemotherapeutikums negativ [75]. Wurde das Chemotherapeutikum Topotecan mit dem selektiven ABCG2-Inhibitor GF120918 kombiniert, konnte eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit des Medikaments erreicht werden [76].

Dieser Therapieansatz hätte zur Folge, dass auch Progenitorzellen mit einer hohen ABC-Transporterdichte deutlich besser auf konventionelle Chemotherapie ansprechen. Damit könnte die Rate der Spätrezidive erheblich gesenkt werden.

Eine therapeutische Blockierung der ABC-Transporter hätte allerdings auch zur Folge, dass nicht maligne, nicht entartete Stammzellen stärker durch Chemotherapeutika geschädigt würden. So würden beispielsweise hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks geschädigt, was eine Anämie zur Folge hätte. So gesehen stellen ABC-Transporter auch einen hilfreichen Schutz von Stammzellen vor zytotoxischen Medikamenten dar. Um dieses Problem zu lösen, müssten die Funktionen der ABC-Untergruppen genau geklärt und spezifische Inhibitoren für ABC-Transporter auf maligne entarteten Zellen entwickelt werden.

Das Modell der SP-Zellen als Stammzellpopulation ist hierbei insofern interessant, als diese Zellgruppe überdurchschnittlich viele ABC-Transporter aufweist. Durch die Gegenfärbung mit Verapamil werden die ABC-Transporter blockiert und die Zellen verlieren die charakteristische Minderfärbung mit Hoechst 33342, da das Ausschleusen des Farbstoffes aus der Zelle verhindert wird. Auch wenn das SP-Modell nur einen Ansatz zur Anreicherung von Progenitorzellen darstellt und keine reine Isolierung dieser

Zellen leisten kann - durch ihre Fähigkeit Chemotherapeutika aus der Zelle zu pumpen, bieten sie nicht nur einen interessanten Ansatz zur Erforschung dieser Mechanismen, sondern sollten in neue Behandlungskonzepte konkret mit einbezogen werden.

Deshalb sind die SP-Zellen nicht nur ein geeignetes Modell, um ABC-Transporter und ihre Rolle bei Resistenzen gegen Chemotherapeutika genauer zu untersuchen, sondern auch ein Ausgangspunkt für neue Therapiekonzepte.

Die Forschung setzt auch große Hoffnungen in neue Therapieformen von chronischen Krankheiten mit Stammzellen. Bachrach et al. zeigten, dass auch hier SP-Zellen als Stammzellhomologe fungieren können [77]. Er arbeitete hierbei mit einem der am häufigsten verwendeten Tiermodelle der Stammzellforschung: Der MDX-Maus, einer Maus, die Träger der Mutation für Muskeldystrophie Duchenne ist. Es wurden Muskel-SP-Zellen der Maus verwendet, denen mit viraler Transduktion der menschliche Dystrophiegen-Wildtyp (also ohne Mutation und daher nicht pathogen) eingebaut wurde. Wurden diese Zellen MDX-Mäusen injiziert, konnte in deren Muskeln menschliches Dystrophiegen nachgewiesen werden. SP-Zellen führten also zu einer systemischen Muskelregeneration, nachdem sie injiziert und über die Blutbahn zu ihrem Bestimmungsort gelangt waren.

Die Tatsache, dass durch virale Transduktion veränderte Muskel-SP-Zellen die Fähigkeit zu Regeneration von dystrophischem Muskel zeigen, könnte als Modell für eine autologe Stammzelltherapie bei Muskeldystrophie Duchenne dienen. Ähnliche Strategien könnten bei einer großen Bandbreite von genetischen Erkrankungen Anwendung finden, die auf die Mutation eines einzelnen Genlokus zurückzuführen sind. Hierzu zählen die zystische Fibrose, Morbus Huntington und die Sichelzellanämie.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es möglich war, eine reproduzierbare SP in Zelllinien des Magenkarzinoms des Menschen darzustellen und zu isolieren. Diese Zellen unterschieden sich sowohl morphologisch als auch hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens von der Restpopulation. Sie besaßen die Fähigkeit, eine der Ausgangspopulation entsprechende Gesamtpopulation zu bilden und zeigten so die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung ebenso wie die der asymmetrischen Zellteilung. Die SP-Zellen exprimierten vermehrt stammzelltypische Oberflächenmarker wie MSI1 und CD133 und zeigten auch in der genomischen Analyse eine vermehrte Expression von Genen, die für Stammzeleigenschaften kodieren. Die so identifizierten Faktoren waren bei der Färbung eines Magenkarzinomkollektivs selektiv unterschiedlich stark in den Tumoren exprimiert und zeigten einen eindeutigen Zusammenhang zum Überleben der Patienten und könnten als prognostische Faktoren des Magenkarzinoms Anwendung finden.

SP-Zellen eignen sich somit zur Identifikation und Charakterisierung von Stammzeleigenschaften von Magenkarzinom-Zelllinien.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Selgrad M, Bornschein M, Rokkas T, Malfertheiner T. Clinical Aspects of Gastric Cancer and Helicobacter pylori –Screening, Prevention, and Treatment. *Helicobacter* 15 (Suppl. 1): 40–45
- [2] Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology*. 2010;78(1):26-33. Epub 2010 Feb 25.
- [3] Wikman H, Vessella R, Pantel K. Cancer micrometastasis and tumour dormancy, *APMIS*. 2008 Jul-Aug;116(7-8):754-70.
- [4] Keith WN. From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene* 23 (2004) 5092–5094
- [5] Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 895–902
- [6] Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Staats S, Flowers D, Griffin JD, Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch 1 signalling. *Nature Med* 2000; 6:1278-81
- [7] Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D, Lewis J. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 1997; 7:661-70
- [8] Austin J, Kimble J. Glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. Elegans*. *Cell* 1987; 51:589-99
- [9] Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunol* 2001; 2:172-80
- [10] Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999; 22:103-14
- [11] Zhang Y, Kalderon D. Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in *Drosophila* ovary. *Nature* 2001; 410:599-604
- [12] Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, Vodinska M, Najvirtova M, Krekac D, Hampl A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005, 23 (8), 1200–11.
- [13] Zhu AJ, Watt FM. β -catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 1999; 126:2285-98

- [14] Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelia stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genet* 1998; 19:1-5
- [15] Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumor is caused by activating mutations in β -catenin. *Nature Gen* 1999; 21:410
- [16] Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66:649-61
- [17] Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research* 312 (2006) 3701–3710
- [18] *Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 40 (1867) 1-79; *Virchows Arch.* 65 (1875) 64
- [19] Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3983–3988.
- [20] Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. SP in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res* 2007; 67: (10). May 15, 2007
- [21] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105-11
- [22] Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797–1806
- [23] Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3:1337–1345
- [24] Orkin SH. Stem cell alchemy. *Nat Med* 2000;6:1212–1213
- [25] Oyama K, Nakagawa H, Harada H, Andl C, Takaoka M, Rustgi AK. Murine oral-epithelial cells have a subpopulation of potential stem cells. *Gastroenterology* 2003;124:A-457
- [26] Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of SP cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123–134

- [27] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12313–12318
- [28] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MM, Dale TC, Smalley MJ. Functional and molecular characterisation of mammary SP cells. *Breast Cancer Res* 2003;5: R1–R8.,
- [29] Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 2002;245:42–56
- [30] Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic SP contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003;88:368–378
- [31] Wulf G, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98:1166-73
- [32] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulff GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct “SP” of tumor cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *PNAS* 2004; 101:14228-33
- [33] Choi CH. ABC-Transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal *Cancer Cell int.* 5 (2005), p.30
- [34] Hagenbuch B, Gao B, Meier PJ. Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol.Sci.* 17 (2002), pp. 231-234
- [35] Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries GH, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur. J. Cancer* 40 (2004) 2064–2070.
- [36] Doyle LA, Yang WD, Abruzzo LV. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15665–15670.
- [37] Shimano K, Satake M, Okaya A. Hepatic oval cells have the SP phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* 2003;163:3-9.

- [38] Lassalle B, Bastos H, Louis JP. 'SP' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 2004;131:479-87.
- [39] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD. The ABC-Transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001;7:1028-34.
- [40] Cai J, Cheng A, Luo Y. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem* 2004;88:212-26.
- [41] Summer R, Kotton DN, Sun X. SP cells and Bcrp1 expression in liver. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L97-104.
- [42] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD. The ABC-Transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7 (2001) 1028–1034.
- [43] Benchaouir R, Rameau P, Decraene C, Dreyfus P, Israeli D, Pietu G, Danos O, Garcia L. Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. *Exp. Cell Res.* 294 (2004)254–268.
- [44] Seigel GM, Campbell LM. High-throughput microtiter assay for Hoechst 33342 dye uptake. *Cytotechnology* 45: 155–160, 2004
- [45] Lin KK Goodell MA. Purification of Hematopoietic Stem Cells Using the SP. *Methodes in Enzymology*, Vol. 420, 0076-6879/06
- [46] Zhang X, Chen J, Davis B, Kiechle F. Hoechst 33342 Induces Apoptosis in HL-60 Cells and Inhibits Topoisomerase I In Vivo. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123:921–927
- [47] Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Human Cell* 2006; 19: 24–29
- [48] Iwatani H, Ito T, Imai E. Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/SP cells isolated from adult rat kidney. *Kidney Int* 2004;65:1604-14
- [49] Triel C, Vestergaard ME, Bolund L. SP cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004;295:79-90.
- [50] Yin AH. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90:5002–5012
- [51] Singh SK. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63:5821–5828.

- [52] Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009, 100:1397-402
- [53] Kayahara T, Sawada M, Takaishi S. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett.* 2003; 535; 131–135.
- [54] Satoshi N, Naoki W, Kazuyuki T. Expression of Musashi-1 in Human Normal Colon Crypt Cells A Possible Stem Cell Marker of Human Colon Epithelium. *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 48, No. 8 (August 2003), pp. 1523–1529
- [55] Potten CS, Booth C, Tudor GL. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 2003; 71; 28–41.
- [56] Haegebarth A, Clevers H. WNT signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am Pathol.* 2009 Mar;174(3):715-21. Epub 2009 Feb 5.
- [57] Sperling C, Schwartz S, Büchener T. Expression of the stem cell factor c-kit (Cd117) in acute leucaemias. *Haematologica* 1997; 82:617-621
- [58] Schulenburg A, Cech P, Herbacek I, Marian B, Wrba F, Valent P, Ulrich-Pur H. CD44-positive colorectal adenoma cells express the potential stem cell markers musashi antigen (msi1) and ephrin B2 receptor (EphB2). *J Pathol.* 2007 Oct;213(2):152-60.
- [59] Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009, 27:1006-20
- [60] Zheng X, Jiang F, Katakowski M. Blackwell Publishing Asia Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness. *Cancer Sci* 2007; 98: 674–684
- [61] Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract. *International Journal of Oncology* 30: 247-251, 2007
- [62] Sakamoto M, Hirata H, Ohtsuka T, Bessho Y, Kageyama R. The Basic Helix-Loop-Helix Genes Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 regulate Maintenance of Neural Precursor Cells in the Brain. *The Journal of biological Chemistry* Vol. 278, No. 45, Issue of November 7, pp. 44808–44815, 2003
- [63] Sharff KA, Song WX, Luo X. Hey1 Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Protein Plays an Important Role in Mediating BMP9 Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal

Progenitor Cells. JBC Papers in Press. Published on November 5, 2008 as Manuscript M806389200

[64] Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* (2003) 22, 6598–6608, Nature Publishing Group

[65] Dormeyer W, van Hoof D, Braam SR, Heck AJR, Mummery CL, Krijgsveld L. Plasma Membrane Proteomics of Human Embryonic Stem Cells and Human Embryonal Carcinoma Cells. *J. Proteome Res.*, 2008, 7 (7), 2936-2951

[66] Melchior K, Weiß J, Zaehres H, Kim Y. The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells. *Biol. Chem.*, Vol. 389, pp. 897–903, July 2008

[67] Mitsutake N, Iwao A, Nagai K. Characterization of SP in Thyroid Cancer Cell Lines: Cancer Stem-Like Cells Are Enriched Partly but Not Exclusively. *Endocrinology* 148(4):1797–1803, 2007

[68] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network. *International Journal for Molecular Medicine* 18: 1019-1023, 2006

[69] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog Signaling Pathway and Gastric Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 4:10, 1050-1054, October 2005

[70] Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer., *Adv Anat Pathol.* 2011 Jan;18(1):53-9.

[71] Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Hill J, Lehle M, Feyereislova A, Bang Y. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol* 27:18s, 2009

[72] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *PNAS* 2004; 101:781-6

[73] Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* 59:4237–4241; 1999

[74] Merry S, Courtney ER, Fetherston CA. Circumvention of drug resistance in human non-small cell lung cancer in vitro by verapamil. *Br J Cancer* 1987;56:401-5.

[75] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48–58; 2002

[76] Schellens JHM, Kruijtzter CMF, Rosing H. Complete oral bioavailability of topotecan in combination with the BCRP and Pglycoprotein inhibitor GF120918. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 74A.

[77] Bachrach E, Li S, Perez AL. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3581–3586.

Anhang

Hochregulierte Gene

Probe Set ID	Gen Symbol	Gen Titel
1552790_a_at	SEC62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)
1554014_at	CHD2 KLRC4 ///	chromodomain helicase DNA binding protein 2
1555691_a_at	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
1555842_at	LOC284356	hypothetical LOC284356
1557189_at	DNASE1	deoxyribonuclease I
1557257_at	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
1557567_a_at	LOC148987	hypothetical protein LOC148987
1557744_at	---	---
1557964_at	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2
1558154_at	---	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)
1560689_s_at	AKT2 LOC285103/	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
1561433_at	LOC100133471	hypothetical protein LOC285103/hypothetical protein LOC100133471
1561871_at	---	---
1561937_x_at	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant mu
1568600_at	CALML4	calmodulin-like 4
200688_at	SF3B3	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa
200921_s_at	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
201018_at	EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked
201285_at	MKRN1	makorin, ring finger protein, 1
201677_at	C3orf37	Chromosome 3 open reading frame 37
201855_s_at	ATMIN	ATM interactor
202353_s_at	PSMD12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12
202478_at	TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila) sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
202524_s_at	SPOCK2	
202646_s_at	CSDE1	cold shock domain containing E1, RNA-binding
202743_at	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
202768_at	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
203706_s_at	FZD7	frizzled homolog 7 (Drosophila)
203725_at	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
203818_s_at	SF3A3	splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa
204254_s_at	VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
204287_at	SYNGR1	synaptogyrin 1
204420_at	FOSL1	FOS-like antigen 1
204436_at	PLEKHO2	pleckstrin homology domain containing, family O member 2
206019_at	RBM19	RNA binding motif protein 19 fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)
208229_at	FGFR2	
208877_at	PAK2	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
209153_s_at	TCF3	
209255_at	KIAA0265	KIAA0265 protein
209505_at	NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
211347_at	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)
212111_at	STX12	syntaxin 12

212256_at	GALNT10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 (GalNAc-T10)
212310_at	MIA3	melanoma inhibitory activity family, member 3
212371_at	FAM152A	family with sequence similarity 152, member A
212463_at	CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
212482_at	RMND5A	required for meiotic nuclear division 5 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
212549_at	STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B
212605_s_at	---	---
212799_at	STX6	syntaxin 6
212996_s_at	URB1	URB1 ribosome biogenesis 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
213018_at	GATAD1	GATA zinc finger domain containing 1
213051_at	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1
213295_at	CYLD	cyldromatosis (turban tumor syndrome)
213532_at	ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17
213615_at	MBOAT5	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 5
213778_x_at	ZNF276	zinc finger protein 276
213982_s_at	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
214079_at	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2
214157_at	GNAS	GNAS complex locus
214868_at	PIWIL1	piwi-like 1 (<i>Drosophila</i>)
214980_at	UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
215809_at	CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
217783_s_at	YPEL5	yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)
217974_at	TM7SF3	transmembrane 7 superfamily member 3
218629_at	SMO	smoothened homolog (<i>Drosophila</i>)
218964_at	ARID3B	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)
220180_at	CCDC68	coiled-coil domain containing 68
	LOC100132214	
	///	
220692_at	LOC100134722	similar to HSPC047 protein /// similar to HSPC047 protein
221260_s_at	FAM130A1	family with sequence similarity 130, member A1
221527_s_at	PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog (<i>C. elegans</i>)
221571_at	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
222383_s_at	ALOXE3	arachidonate lipoxygenase 3
222681_at	KTELC1	KTEL (Lys-Tyr-Glu-Leu) containing 1
222829_s_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha
223052_x_at	SSU72	SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
223408_s_at	---	---
224711_at	YY1	YY1 transcription factor
224893_at	ATL3	atlastin 3
224945_at	BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7
224998_at	CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4
225002_s_at	SUMF2	sulfatase modifying factor 2
225045_at	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A
225192_at	C10orf46	chromosome 10 open reading frame 46
225276_at	---	---
225342_at	AK3L1	adenylate kinase 3-like 1
225488_at	DERL1	Der1-like domain family, member 1
	NPHP3 ///	nephronophthisis 3 (adolescent) /// acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11
225573_at	ACAD11	
225725_at	---	---
225813_at	RC3H2	ring finger and CCCH-type zinc finger domains 2
225876_at	NPAL3	NIPA-like domain containing 3
225962_at	ZNRF1	zinc and ring finger 1

226137_at	ZFXH3	zinc finger homeobox 3
226326_at	PCGF5	polycomb group ring finger 5
226327_at	ZNF507	zinc finger protein 507
226377_at	---	---
226391_at	---	---
226394_at	MARCH5	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5
226533_at	HINT3	histidine triad nucleotide binding protein 3
226567_at	USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)
226572_at	SOCS7	suppressor of cytokine signaling 7
226692_at	SERF2	small EDRK-rich factor 2
226719_at	---	---
226760_at	LOC203411	hypothetical protein LOC203411 v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (arg, Abelson-related gene)
226893_at	ABL2	
227020_at	YPEL2	yippee-like 2 (Drosophila)
227060_at	RELT	RELT tumor necrosis factor receptor
227150_at	MTF1	metal-regulatory transcription factor 1
227193_at	---	---
227306_at	---	---
227329_at	ZBTB46	zinc finger and BTB domain containing 46
227467_at	RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)
227504_s_at	---	---
227576_at	---	---
227586_at	TMEM170	transmembrane protein 170
227604_at	LOC151146	hypothetical protein LOC151146
227770_at	---	---
	NBPF14 ///	
	NBPF1 ///	
	KIAA1245 ///	
	NBPF11 ///	
	NBPF15 ///	
	NBPF20 ///	
	NBPF9 ///	neuroblastoma breakpoint family, member 14 ///
	NBPF10 ///	neuroblastoma breakpoint family, member 1 ///
	NBPF8 ///	KIAA1245 ///
	RP3-377D14.1 ///	neuroblastoma breakpoint family, member 11 ///
	XXyac-	neuroblastoma breakpoint family, member 15 ///
	YX155B6.1 ///	neuroblastoma breakpoint family, member 20 ///
	NBPF16 ///	neuroblastoma breakpoint family, member 9 ///
		neuroblastoma breakpoint family, member 10 ///
		neuroblastoma breakpoint family, member 8 ///
		CG10522-PA-like ///
		CLIP-190-like ///
		neuroblastoma breakpoint family, member 16 ///
227926_s_at	LOC100132406	similar to NBPF9
228000_at	ADC	arginine decarboxylase
228031_at	C20orf121	chromosome 20 open reading frame 121
228153_at	RNF144B	ring finger 144B
228176_at	S1PR3	sphingosine-1-phosphate receptor 3
228214_at	---	---
228226_s_at	ZNF775	zinc finger protein 775
228349_at	---	---
		nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
228388_at	NFKBIB	
228539_at	---	---
228797_at	---	---
228964_at	PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
229126_at	TMEM19	transmembrane protein 19
229279_at	---	---
229544_at	---	---

Anhang

229572_at	---	---
229813_x_at	DAZAP1	DAZ associated protein 1
229901_at	ZNF488	zinc finger protein 488
230110_at	MCOLN2	mucolipin 2
230302_at	---	---
230369_at	GPR161	G protein-coupled receptor 161
230491_at	---	---
230570_at	---	---
230758_at	GEMIN8	gem (nuclear organelle) associated protein 8
231686_at	GATM	Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)
231984_at	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase
232391_at	ZNF461	zinc finger protein 461
232649_at	GLDN	gliomedin phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)
233254_x_at	PTEN	
234590_x_at	---	---
235045_at	RBM7	RNA binding motif protein 7
235695_at	---	---
235830_at	---	---
236104_at	---	---
236605_at	EIF3K	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K
236821_at	---	---
236975_at	---	---
237321_at	---	---
237594_at	---	---
238295_at	C17orf42	Chromosome 17 open reading frame 42
238813_at	---	---
239430_at	IGFL1	IGF-like family member 1
240440_at	NPL	N-acetylneuraminase pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
241430_at	C2orf51	chromosome 2 open reading frame 51
241948_at	---	---
242181_at	---	---
242329_at	LOC401317	hypothetical LOC401317
242398_x_at	---	---
242751_at	---	---
242875_at	---	---
243078_at	---	---
243509_at	---	---
38037_at	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor
44783_s_at	HEY1	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
58916_at	KCTD14	potassium channel tetramerisation domain containing 14

Anhang 1: Unterschiedlich exprimierte Gene der SP Population in AGS Zellen

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Familie für den stetigen Rückhalt nicht nur während Studium und Promotion danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Röcken, Direktor des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Vergabe des Themas sowie den großen Freiraum den er mir bei Planung und Durchführung der Arbeit einräumte und seiner steten Ansprechbarkeit und tatkräftigen Unterstützung bei der Umsetzung.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Viktoria Warneke, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Magenkarzinomkollektivs und Hans-Michael Behrens, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel, für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Analyse der immunhistochemischen Färbungen des Magenkarzinomkollektivs.

Mein Dank gilt auch Frau Eva Simon, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die weiterführende Überprüfung unserer Ergebnisse per Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion sowie Herr Kuban vom Flow cytometry and cell sorting core facility (FCCF) des Max Planck Instituts für Infektionsbiologie, Berlin und den Mitarbeitern des Service-Labors für Funktionelle Genomforschung der Charité-Universitätsmedizin Berlin, (LFGC) für die stetig gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der FACS-Analysen und der Gene-Arrays.

Abschließend möchte ich Frau Sandra Krüger, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit und ihre stetige Ansprechbarkeit danken.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Rosa Schmuck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Untersuchung des Transkriptoms und Phänotypisierung der Side Population von Magenkarzinom-Zelllinien" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.