

André Maciej Warzecha, *1991

Schule:
Gymnasium Münsingen

Eingang der Arbeit:
Januar 2010

Revidierte Fassung nach
Begutachtung vorgelegt:
Februar 2015

Krebsstammzellen - Die Wurzel des Bösen

Identifizierung von Tumorstammzellen in etablierten humanen Melanomzelllinien

Krebserkrankungen in fortgeschrittenen Stadien sind auch heute noch schwer behandelbar und mit einer niedrigen Überlebensrate verbunden. Auch nach scheinbar erfolgreicher Krebstherapie kommt es zu einem Rückfall, der sich durch rapides Tumorstadium, Metastasenbildung und Resistenz gegenüber allen Behandlungsmaßnahmen äußert. Therapieresistente Tumorstammzellen könnten die Ursache hierfür sein.

1 Einleitung

1.1 Die Krebsstammzellhypothese

Krebs ist in unserer Gesellschaft eine der gefürchtesten Krankheiten überhaupt. Grundlegend kommt es bei einer Zelle durch eine längerfristige Ansammlung von zahlreichen Mutationen in kritischen Genen, die für die Zellwachstumskontrolle von Bedeutung sind, zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Dadurch entsteht bösartiges Tumorgewebe, welches gesundes Organewebe befällt, verdrängt und zerstört. Einzelne Tumorzellen können den Primärtumor verlassen, schwimmen über das Blut und die Lymphe entfernt liegende Organe (wie z.B. Gehirn, Leber, Lunge) an und bilden dort Tochtergeschwülste (Metastasen), die zur Funktionseinschränkung und Gewebezerrörung der befallenen Organe führen.

Trotz der über Jahre hinweg verbesserten Überlebensraten durch bessere Behandlungsmaßnahmen, die sich aus einer Kombination von Chemo- und Strahlentherapie sowie chirurgischer Intervention zusammensetzen, konnten bisher keine bahnbrechenden Erfolge in der Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen verzeichnet werden. Die Ursache liegt darin, dass die gängigen medikamentösen und strahlentherapeutischen Maßnahmen nicht imstande sind, sämtliche Tumorzellen zu eliminieren. Kleine Tumorzellpopulationen überleben, die eine besondere Resistenz aufweisen, nicht auf gängige Therapien ansprechen und folglich für den tödlich verlaufenden, durch massives Tumorstadium und Metastasenbildung gekennzeichneten Krankheitsrückfall verantwortlich sind.

Dementsprechend erscheint es außerordentlich wichtig, die Gründe der Resistenzentwicklung gegenüber Tumorthérapien zu erforschen und entsprechende therapeutische Interventionen zu entwickeln.

Lange Zeit war die Annahme unter Wissenschaftlern verbreitet, dass Tumorzellen unter der Krebsbehandlung spontan genetische Mutationen akkumulieren, die zu einem resistenten Phänotyp führen ("Somatische Mutationshypothese"). Die Gründe für diese Resistenz können sein: Eine höhere Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen, die chemo- und strahlentherapeutisch induzierte DNA-Schäden reparieren, eine höhere Aktivität von sogenannten "Effluxpumpen" (membrangebundene Glykoproteine, die als Pumpen fungieren und zellschädigende

Medikamente nach Eintritt in die Zelle aus dem Zellinneren wieder heraustransportieren) oder eine Inaktivierung von Apoptose (Zelltod) induzierenden Faktoren. Durch die spontane Resistenzentwicklung überleben wenige Tumorzellen, die für den letalen Krankheitsrückfall verantwortlich sind.

In den letzten Jahren fand jedoch ein Paradigmenwechsel statt. Laut einer neuen Hypothese, der Krebsstammzellhypothese [13], [14], sind wenige, inhärent resistente stammzellähnliche Tumorzellgruppen die Urheber für das behandlungsresistente Wiederauftreten der Erkrankung. Diese Zellpopulationen sind vermutlich entartete Gewebestammzellen oder haben durch spontane genetische Mutationen Stammzeleigenschaften erworben und werden daher auch als "Tumorstammzellen" bezeichnet.

Normale Stammzellen weisen eine Vielzahl von verschiedenen Eigenschaften auf. Zum einen sind sie besonders langlebig, teilen sich relativ selten (verbleiben öfters in der G₀-Phase des Zellzyklus) und sind im Gewebe relativ selten vorkommend (0,1 bis 1 % der gesamten Zellpopulationen des Gewebe). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, abgestorbene, ausdifferenzierte Gewebzellen zu ersetzen, wobei dies durch die sogenannte asymmetrische Teilung geschieht. Durch die asymmetrische Teilung entstehen zwei Tochterzellen. Eine verbleibt als Stammzelle und die andere beginnt sich als Vorläuferzelle auszdifferenzieren, wodurch sie zunehmend ihre Stammzeleigenschaften verliert um eine gewebetypische Funktion anzunehmen. Bemerkenswerterweise besitzen Stammzellen ebenfalls die Fähigkeit der Pluripotenz und können sich sogar zu verschiedenen Zelltypen eines Organgewebes ausdifferenzieren, die verschiedene Funktionen übernehmen können. Ein sehr bedeutendes Charakteristikum dieser seltenen Zellen ist auch die Fähigkeit in umliegendes, geschädigtes Gewebe einzuwandern (Zellmigration), um dort regenerativ zu wirken. In Vitro Studien haben Hinweise geliefert, dass normale Stammzellen auch eine inhärente Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Agenzien aufgrund effizienteren DNA-Reparaturmechanismen und eine Re-

sistenz gegenüber zum Zelltod (Apoptose) führenden Faktoren aufweisen. Auf der Zellmembran exprimieren sie zudem noch stammzellspezifische Rezeptoren und Oberflächenproteine, die normale, ausdifferenzierte Zellen nicht besitzen, wodurch die Identifizierung dieser bedeutenden Zellen durch labor-technische Methoden gegeben ist.

Ein Tumor ist demnach ein zellhierarchisch strukturiertes Organ, das durch seltene, entartete Tumorstammzellen aufrecht erhalten wird, welche durch ihre Stammzeleigenschaften zur Gewebeinvasion und Metastasierung entfernter Organe befähigt sind und durch ihre Resistenz gegenüber zellschädigenden Einflüssen eine Tumorthherapie selektiv überleben. Weitere spontane Mutationen in diesen überlebenden Zellen, die die Resistenz gegenüber Krebstherapien noch verstärken, können durch darauffolgende Zellteilungen an sämtliche Tochterzellen weitervererbt werden. Das Resultat ist ein progressives, Organ zerstörerisches Wachstum von neuen therapieresistenten Tumorherden und Metastasen, die letztendlich zum Tod des Patienten führen [1], [2].

Die Konklusion ist einleuchtend: Fortgeschrittene Krebskrankheiten können erst dann erfolgreich behandelt werden, wenn es gelingt, die Urheber der Krebswucherung zu eliminieren. Die Identifizierung und Charakterisierung von mutmaßlich existierenden Tumorstammzellen ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Sollte sich die Tumorstammzelltheorie bewahrheiten und würde es gelingen therapeutisch Krebsstammzellen zu eradizieren, könnten viele Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien geheilt werden.

1.2 Identifikation von Tumorstammzellen

Ganz allgemein basiert derzeit die Methodik der putativen Tumorstammzellidentifizierung auf der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Diese sind gegen gewebeunspezifische Stammzelloberflächenproteine gerichtet, welche auf der Zellmembran bei herkömmlichen Stamm- oder wenig differenzierten Vorläuferzellen hämatopoetischen (Blut), neuronalen (Nerven) oder dermalen (Haut)

Ursprungs vorkommen. Solche "markierten" Zellen werden mithilfe des Durchflusszytometers identifiziert und für weitere Untersuchungen aussortiert. Die aussortierten Zellen werden dann auf ihr tumorbildendes Potential in Tiermodellen, ihre Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, ihre eventuellen Stammzeleigenschaften (z.B. Expression von stammzellossoziierten Genen) und anderes untersucht.

Einen definitiven Hinweis für die Existenz seltener, mutmaßlicher Krebsstammzellen, die anhand von stammzellspezifischen Oberflächenproteinen ("Cluster of Differentiation" CD-Proteine) erfasst werden konnten, erbrachten die Wissenschaftler um Bonnet und Dick [1], die im Jahre 1997 mittels der Methodik der Durchflusszytometrie putative stammzellähnliche Tumorzellen in zahlreichen humanen AML (akute-myeloischen Leukämie) Linien identifizierten. Es bestand die Annahme, dass die gesuchten Tumorstammzellen den Oberflächenphänotyp CD34⁺ / CD38⁻, wie er bei primitiven hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist, aufweisen müssten. Und tatsächlich wurden die Wissenschaftler fündig und identifizierten wenige Zellen mit diesem Phänotyp (eine in 10 000 AML-Zellen). Daraufhin isolierten die Forscher diese Zellen von den AML-Zelllinien und injizierten sie subkutan in immungeschwächte Ratten. Zum Vergleich wurde einer Tierkontrollgruppe AML Zellen injiziert, die nicht den CD34⁺ / CD38⁻ Oberflächenphänotyp aufwiesen. Das Ergebnis war erstaunlich: Nur die isolierten CD34⁺ / CD38⁻ putativen Tumorstammzellen konnten AML in Ratten induzieren, während sämtliche andere AML-Zellen keine Leukämie etablieren konnten. Diese Entdeckung war der erste wissenschaftliche Beweis für die Existenz von stammzellähnlichen Tumorzellen und veranlasste die Suche nach solchen in soliden Tumoren.

Zahlreiche Forschergruppen isolierten über die Jahre hinweg putative stammzellähnliche Tumorzellen aus diversen Zelllinien solider Tumore, welche unspezifische Stammzelloberflächenproteine aufwiesen und in extrem geringer Zahl (z.B 100 Zellen ausreichend!) eine hinreichende tumorinduzierende Wir-

kung im Tiermodell anzeigten, wobei andere Tumorzellpopulationen keine Tumore etablieren konnten. Im Falle des Mammakarzinoms (Brustkrebs) exprimierten solche Zellen den Oberflächenphänotyp CD44+ / CD24- low / ESA+ (2).

CD44 und ESA (Epithelial Specific Antigen) sind Oberflächenproteine, die von wenig differenzierten Vorläuferzellen (solche, die aus der asymmetrischer Stammzellteilung entstanden sind und sich beginnen auszudifferenzieren) exprimiert werden, während der Marker CD24 für komplett ausdifferenzierte Brustzellen charakteristisch ist.

Im Falle des Pankreaskarzinoms (Bauchspeicheldrüsenkrebs) exprimierten stark-tumorinduzierende stammzellähnliche Krebszellen den Oberflächenphänotyp CD44+ / CD24+ / ESA + (0,2- 0,8 % positiv für diesen Phänotyp) [3].

Auch in den humanen Zelllinien des Prostatakrebses [4] konnte man im Tiermodell stark krebsinduzierende CD44+ Tumorzellen nachweisen. Potente Tumorstammzellen wurden auch aus Kolonkarzinomen (Dickdarmkrebs) und aus Glioblastomen (hoch aggressiver Hirntumor) isoliert, wobei diese in beiden Fällen das Oberflächenmolekül CD133 aufwiesen, welches auf hämatopoetischen (Blut), dermalen (Haut) und neuronalen (Nerven) Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird [5], [6].

Andere Studien berichten über die Existenz von CD133+ Zellen in Bauchspeicheldrüsen und Prostata-tumoren, die neben den oben beschriebenen CD44+ Zellpopulation, ebenfalls stark tumorinduzierend wirkten und stammzellähnliche Eigenschaften anzeigten [7],[8].

Genetische Analysen an Tumorgeweben von Patienten mit diversen Tumorarten zeigten erstaunlicherweise, dass eine höhere Aktivität bestimmter intrazellulärer Signaltransduktionswege (NOTCH,BMI-1, Hedghog, WNT), die für die Selbsterneuerung und Zellteilung von Stammzellen von Bedeutung sind, mit einer schlechteren Prognose und einem hohen Metastasierungsrisiko vergesellschaftet ist [10]. Auch dies legt die Existenz von stammzellähnlichen Tumorzellen nahe, die für einen fatalen Krankheitsverlauf verantwortlich sind.

Die Krebsstammzellforschung ist eine junge, evolvierende Wissenschaft. Zahlreiche Forschergruppen sind weltweit darum bemüht, vermeintliche Tumorstammzellkandidaten zu identifizieren, zu charakterisieren und daraufhin spezielle therapeutische Interventionen zu entwickeln, die auf die Eliminierung dieser hochmalignen Zellen abzielen. Bisweilen existieren einige Studien zur Identifizierung solcher Zellen für einige Krebsarten (Brust- / Dickdarmkrebs und Glioblastomen). Wenige Untersuchungen sind für das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs), sowie für den Bauchspeicheldrüsen- oder Prostatakrebs publiziert worden, wobei kaum Untersuchungen für das Bronchialkarzinom (Lungenkrebs) vorliegen.

2 Fragestellungen der Forschungsarbeit

In der vorliegenden Forschungsarbeit beschäftigte ich mich mit der Frage, ob stammzellähnliche, hochresistente Tumorzellen in verschiedenen etablierten humanen Zelllinien des schwarzen Hautkrebses (malignes Melanom) unterschiedlicher Krankheitsstadien mithilfe von fluorszenz-markierten Antikörpern gegen die unspezifischen stammzellassozierten Oberflächenproteine CD44, CD24 und CD133 ,welche mit vermeintliche Tumorstamm-

zellen bei anderen Krebsarten assoziiert sind, mittels der Methodik der Durchflusszytometrie identifiziert werden können.

Dabei fokussierte ich meine Arbeit auf folgende Fragestellungen:

1. Gibt es eine Korrelation zwischen den verwendeten stammzellassozierten Oberflächenmarkern und dem Krankheitsstadium des Melanoms ?
2. Lassen sich "identifizierte", seltene, putative Tumorstammzellen mittels geeigneter Kultivierungsmethoden anreichern, sodass funktionelle und molekulargenetische Studien besser ermöglicht werden ?
3. Kennzeichnen sich die identifizierten Tumorstammzellkandidaten durch eine signifikante höhere Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin?

3 Methodik und Vorgehensweise

3.1 Verwendete Zelllinien

Für meine Untersuchungen habe ich 12 etablierte humane Melanomzelllinien unterschiedlicher Krankheitsstadien verwendet (siehe Tab. 1). Diese Krankheitsstadien unterteilen sich je nach pathohistologischen Kriterien in einen radialen (oberflächlich), einen vertikalen (in tiefere Gewebeschichten infiltrierenden), einen hoch aggressiven und einen metastatischen Phänotyp. Die Zelllinien des radialen, vertikalen und hoch aggressiven Krankheitstypes wurden von Primärtumoren bei Patienten gewonnen, während die Linien des metastatischen Phänotypes aus Metastasen von befallenen Organen etabliert wurden.

Radial wachsende Melanome sind frühe Erscheinungsformen des schwarzen Hautkrebses. Sie wachsen begrenzt horizontal und durchbrechen nicht die

Radial	Vertikal	Metastatisch	Hoch aggressiv
WM-3211	WM115	SK-mel19	BLM
WM-1552C	WM3248	M5	WM 1205- LU
SBCL-2	WM 1819	WM 852	
		IGR-39	

Tab. 1: Verwendete Zelllinien.

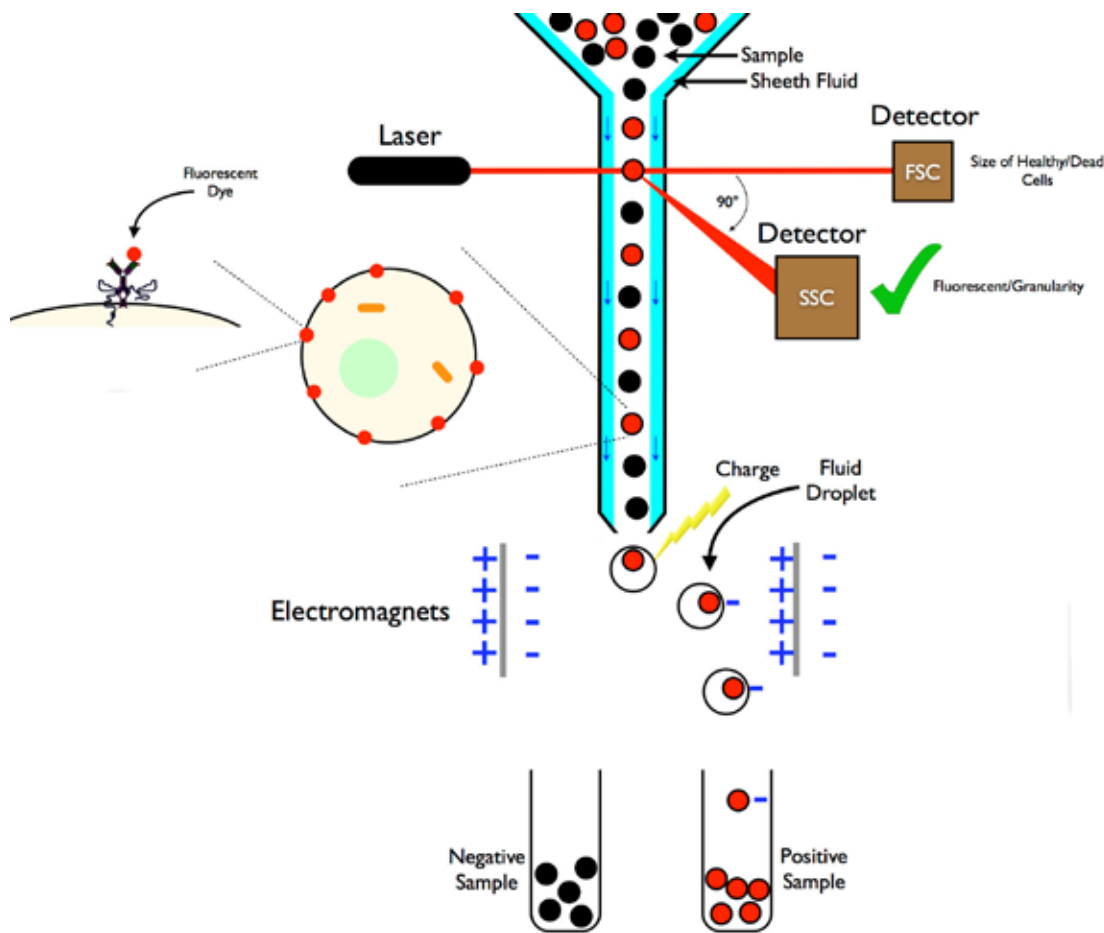


Abb 1.: Aufbau eines Durchflusszytometers mit dargestellter Sortierung: FSC = Forward Scatter (Streulicht zur Messung der Zellgröße, SSC= Side scatter = Streulicht zur Messung der Zellgranularität, sowie Anregung des gebundenen Antikörpers zur Fluoreszenzemission). (Quelle: Wikipedia, Author SariSabban)

obere Epidermis der Haut. Tumorzellen solcher Melanome besitzen weder in Tierstudien, noch beim Menschen die Fähigkeit Metastasen zu bilden oder umliegendes Gewebe zu invadieren.

Tumore des vertikalen und hoch aggressiven Krankheitstyps sind durch ein starkes Potential zur Invasion und Metastasenbildung gekennzeichnet und gehören zu den fortgeschrittenen Melanomen. In Tiermodellen und auch beim Menschen durchbrechen sie die Epidermis, gelangen in die Blutbahn und bilden multiple Metastasen in anderen Organsystemen. Tumorzellen dieser Krankheitsstadien weisen eine Vielzahl von genetischen Mutationen auf, die sie von bösartigen Zellen des harmloseren, radialen Krankheitsstadiums unterscheiden lässt.

Die Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Krankheitsstadien erlaubte mir somit, eine mögliche Korrelation zwischen fortschreitender Erkrankung und der Expression von den zu un-

tersuchenden stammzellassoziierten Oberflächenphänotypen zu überprüfen, was auf eine bedeutende Rolle von potentiellen Krebsstammzellen bei fortschreitenden, metastasierenden Melanomen hinweisen könnte (Fragestellung 1).

Die in der Tab. 1 aufgezeigten Zelllinien habe ich über mehrere Wochen hinweg in einem geeigneten Wachstumsmedium (1640 RPMI, 10 % Rinderkalbserum und 1 % Penstrep der Stocklösung) bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert.

Zum Anreicherungsversuch von identifizierten, seltenen, potentiellen Tumorstammzellkandidaten in ausgewählten Zelllinien habe ich jene Zellen durchflusszytometrisch aussortiert und versucht im normalen Zellkulturmedium anzureichern. In einem weiteren Anreicherungsversuch habe ich noch zusätzlich ein geeignetes Medium verwendet, das ebenfalls zur Kultivierung von normalen Stammzellen hinzuge-

zogen wird (mithilfe eines hESC-Mediums "human embryonic stem cell medium - (Millipore)). Zellen, die in einem hESC-Medium kultiviert werden, wachsen charakteristisch und aggregieren zu kugelförmigen Klumpen.

Der prozentuale Anteil an Stammzellmarker positiven Zellen nach Kultivierung im hESC-Medium ist mittels der Durchflusszytometrie ermittelt worden (Fragestellung 2).

Die Analyse der Resistenz der identifizierten putativen Krebsstammzellkandidaten gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin habe ich an selektierten Zelllinien durchgeführt. Hierbei habe ich ausgewählte Linien nach Cisplatingabe (jeweils 5 und 15 Mikrogramm pro Zelllinie) für 72 Stunden kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert, ob die Stammzellmarker positiven Zellen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Stammzellmarker negativen Zellen nach Medikamentengabe aufweisen.

Als Kontrolle dienten dieselben Zelllinien, die ohne Cisplatingabe kultiviert wurden (Fragestellung 3).

3.2 Die Methodik der Durchflusszytometrie

Die Methodik der Durchflusszytometrie (siehe Abb.1, Seite 59) (Fluorescence Assisted Cell Sorting FACS) erlaubt eine spezifische Analyse auf die quantitative und qualitative Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen in einer Zellpopulation, sowie auf die physikalische Eigenschaften von Zellen in einer Suspension. Vereinfacht besteht ein Durchflusszytometer aus einem Laser, einer Messküvette mit Trägerflüssigkeit und mehreren Detektoren. Die zu untersuchenden Zellen werden hierfür mit einem fluorochrommarkierten Antikörper inkubiert, der spezifisch auf ein Oberflächenmolekül auf der Zellmembran (Antigen) bindet und bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge eine farbspezifische Fluoreszenz emittiert. Die inkubierte Zellsuspension wird mit Druck in eine Trägerflüssigkeit eingeführt, wodurch ein Flüssigkeitsstrom entsteht, der einzelne Zellen zum Laser transportiert (hämodynamische Fokussierung).

Der Laser bestrahlt daraufhin diese einzelnen Zellen mit einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch wird das Fluorochrom des gebundenen Antikörpers zur Fluoreszenzemission angeregt, deren Intensität mithilfe von Detektoren gemessen wird. Dabei korreliert diese Intensität direkt mit der Menge der an der Zellmembran gebundenen Antikörper und ist somit ein Maß für die Expression des Oberflächenmoleküls. Bei der Laserbestrahlung entsteht noch zusätzlich vorwärts (FSC) und seitlich (SSC) gerichtetes Streulicht (scattered light), dessen Intensität ein Maß für die Zellgröße und intrazelluläre Beschaffenheit darstellt. Der Durchflusszyto-

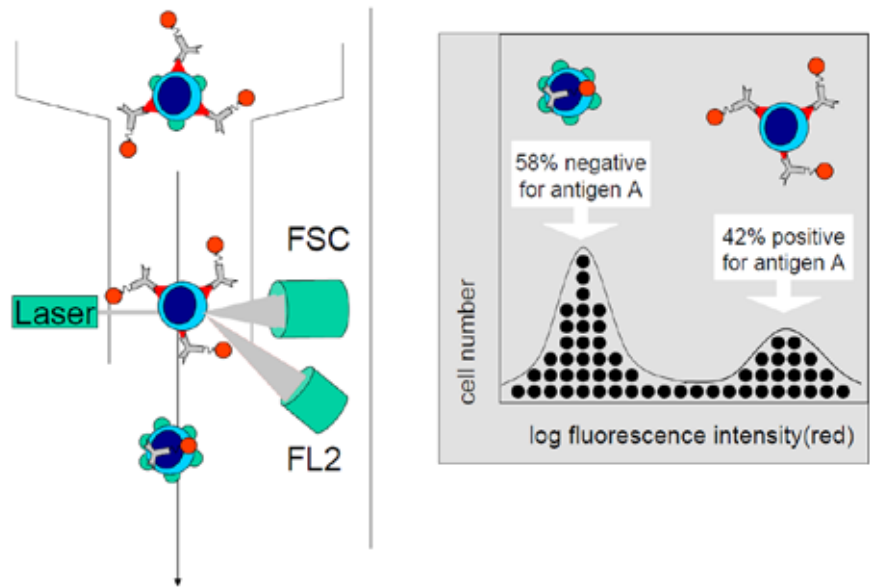


Abb. 2 : links: Eine typische durchflusszytometrische Analyse (Abkürzungen: FSC= Forward Scatter, Streulicht zur Bestimmung des Zellvolumens; FL2= Laser) rechts: Typisches Histogramm. Dabei kennzeichnet die X-Achse die Fluoreszenzintensität und die y-Achse die Zellzahl. Zellpopulationen, die dem rechten Bereich des Histogrammes zugeordnet werden, emittieren nach Laserbestrahlung eine hohe Fluoreszenz und sind somit Marker positiv. Populationen im linken Bereich des Histogrammes emittieren eine geringe Fluoreszenzintensität und sind somit Marker negativ. (Bild: Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald).

meter erlaubt ebenfalls eine Sortierung von Zellen mit ermittelten Eigenschaften wie hoher Fluoreszenzintensität. Dabei werden Einzelzellsuspensionen positiv oder negativ geladen und entsprechend der Ladung entweder nach links oder rechts in ein Auffangreagenz (siehe Abb.1) geführt.

Bei einer durchflusszytometrischen Analyse wird die Anzahl der Zellen (prozentualer Anteil der gesamten untersuchten Zellpopulation), die nach der Laserbestrahlung eine bestimmte Fluoreszenzintensität emittieren, ermittelt und in einem geeigneten Schaubild dokumentiert (Histogramm). Dabei weisen Zellen mit hoher Fluoreszenzemission (rechter Bereich im Histogramm, Abb.2) eine starke Expression des untersuchten Oberflächenmoleküls auf (Marker positive Zellen), wobei Zellen mit einer schwachen oder keiner Fluoreszenzemission (linker Bereich im

Histogramm, Abb. 2) das Oberflächenmolekül nicht exprimieren (Marker negative Zellen), da der fluorochromgekoppelte Antikörper nicht an die Zellmembran bindet (Abb. 2). Die für meine Studie verwendeten Antikörper sind in Tab. 2 dargestellt. Die in meiner Arbeit untersuchten Zellen wurden mit Trypsin/ EDTA von der Petrischale abgelöst, zweimal mit einer gepufferten Lösung (PBS mit 2 % FCS und 0,05 % Natriumazid) gewaschen und für mindestens eine Stunde bei 4 °C mit den in Tab. 2 aufgeführten Antikörpern unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Analyse der Zellen am Durchflusszytometer (20.000 Zellen je untersuchte Linie). Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen, sowie Zellen, die mit einem Isotypkontrollantikörper inkubiert wurden. Die Isotypkontrolle ermittelt den Wert der unspezifischen Antikörperbindung, da auch fluorochrom-markierte

Antikörper	Hersteller	Verdünnung für Durchflusszytometrie
Anti-human CD133 FITC Mouse	Ancell Corporation	1:100
Anti-human CD24 FITC Mouse	Immunotools	1:100
Anti-human CD44 FITC Mouse	Immunotools	1:100
Isotypkontrolle FITC Mouse IgG	Immunotools	1:100

Tabelle 2.: Verwendete Antikörper

Zelllinie	Phänotyp	CD44		CD24		CD133	
		Nachweis	Zellanteil [%]	Nachweis	Zellanteil [%]	Nachweis	Zellanteil [%]
WM-3211	R	+	97,8	-		-	
SBCL-2	R	NA		NA		+	0,9
WM-1502C	R	NA		NA		+	1,4
WM-115	V	+	99,6	-		-	
WM-3248	V	NA		NA		+	1,7
WM-1819	V	NA		NA		+	4,3
SK-mel19	M	+	82,9	-		+	18,8
M5	M	+	99,4	-		+	3,5
WM-852 (M)	M	+	99,3	-		+	1,7
IGR	M	+	98,0	+	3,1	+	3,0
BLM (H)	H	+	98,7	-		+	25,6
WM 1205 – LU	H	+	99,4	-		+	0,8

Tab. 3: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse auf CD44, CD24 und CD133 (Abkürzungen: R = radial, V = vertikal, H = hoch aggressiv, M = metastatisch, NA = Nicht gemessen, + = Marker positiv, - = Marker negativ) - Hinweis: Die Antikörperisotypkontrollen sind von den dargestellten Werten abgezogen worden, um die unspezifischen Bindungen der Antikörper aus dem Betracht zu ziehen. Die Histogramme für die dargestellten Werte können über den Autor bezogen werden.

Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine auch andere Membranproteine binden und somit falsch-positive Signale in der durchflusszytometrischen Analyse aussenden können. Der durchflusszytometrisch ermittelte Wert der Isotypkontrolle sollte daher stets vom Prozentanteil der Zellen, die positiv für einen Oberflächenmarker (z.B. für CD133) sind, abgezogen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse

Der erste Versuchsansatz war die Untersuchung der Expression von stammzellassozierten Oberflächenmarkern CD44, CD24, CD133 in den zwölf etablierten humanen Melanomzelllinien. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt. Der in Klammern dargestellte Zahlenwert entspricht dem Zellanteil in Prozent, der positiv für den jeweiligen Oberflächenmarker ist. Die Zelllinien sind nach Aggressivität und Krankheitsstadien sortiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der Oberflächenmarker CD133 in nahezu allen Zelllinien exprimiert wird (in 10 der 12 der untersuchten Zelllinien). Der Prozentanteil an CD133 + Zellen variiert von Linie zu Linie und liegt im gering ausfallenden Bereich von 0,8 % bis 25,6 %. Alle Zelllinien exprimieren den Marker CD44, wobei der Prozentanteil

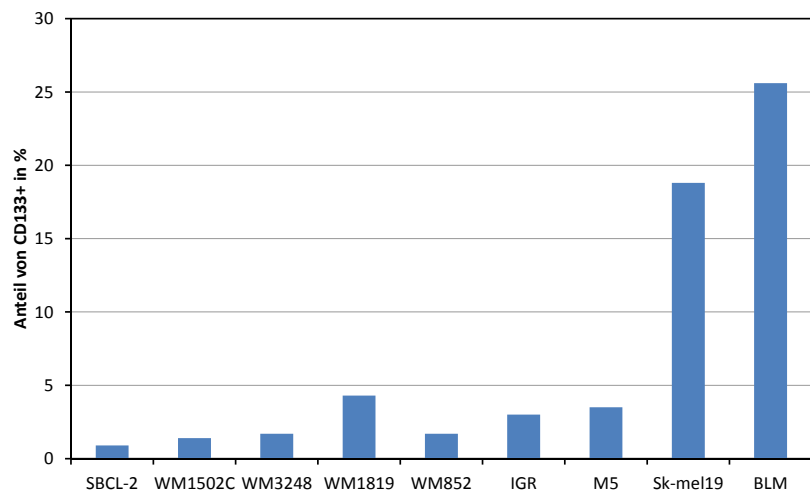


Abb. 3: Anteil an CD133+ Zellen in ausgewählten Zelllinien. Stadien: radial = SBCL und WM1502; vertikal= WM3248 und WM1819 ; metastatisch= IGR,M5 und SK-mel 19 ; aggressiv= BLM.

an CD44+ Zellen nahezu bei 100% liegt. Lediglich eine Zelllinie ist positiv für CD24 (eine von acht der untersuchten Zelllinien).

Basierend auf diesen Ergebnissen erfüllt alleinig der in anderen Tumoren assoziierte Krebsstammzellmarker CD133+ die Kriterien der Tumorstammzellhypothese. Der Prozentanteil an CD133+ Zellen in den untersuchten Linien ist relativ gering, sodass dies mit der Annahme der Seltenheit von stammzellähnlichen Tumorzellen in großen Tumorzellverbänden konform ist. Da

beinahe sämtliche Tumorzellen in den analysierten Linien CD44+ exprimieren und CD24 nicht aufweisen, entfallen somit diese beiden genannten Marker zur Identifizierung von seltenen, potentiellen Krebsstammzellkandidaten. Aus diesen Gründen begründete sich meine Forschungsarbeit auf die In-Vitro Charakterisierung von CD133+ Melanomzellen.

4.2. Korrelationsuntersuchungen

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Feststellung, dass Zelllinien, die den aggressiveren Stadien zu zuordnen

Zelllinie	Isotypkontrolle [%]	CD133 [%]	Ungefärbt [%]
BLM	0,4	6,1 (-0,4)	0,3
BLMsort	1	5,7 (-1,0)	-

Tab. 4: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse auf CD133 Expression in den BLM CD133+ sortierten Zellen im Vergleich zur BLM-Linie (BLMsort. = BLM sortierte CD133+ Zellen).

Zelllinie	Isotypkontrolle [%]	CD133 [%]	Ungefärbt [%]
SK-mel19	2,5	30,7 (-2,5)	1,5
SK-mel19sort.	1,3	33,5 (-1,3)	1,7

Tab. 5: Ergebnisse der CD133-Expressionsanalyse auf CD133+ sortierten SK-mel19 Zellen im Vergleich zur SK-mel Linie.

sind (vertikal, metastatisch, aggressiv wachsend) einen prozentual höheren Anteil an CD133+ Zellen aufweisen, als Zelllinien des radialen, nicht aggressiven Wachstumsstadium (siehe Abb. 3, Seite 61). Dabei finden sich extrem hohe Prozentanteile bei der Zelllinie des metastatischen SK-mel19 (18,8 % CD133+) und der hoch aggressiven Linie BLM (25,6 % CD133+). Obwohl eine gewisse Tendenz der höheren Aggressivität mit erhöhter Expression des CD133 Stammzellmarkers vorliegt, ist jedoch anzumerken, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Linien unterschiedlicher Krankheitsstadien nicht so gravierend sind (Unterschied 2 bis 3 %).

4.3 Anreicherung von CD133+

Da die prozentualen Anteile an CD133+ Zellen in den untersuchten Linien gering sind, stellte ich mir die Frage, ob sich diese Zellpopulationen mit der gängigen Kulturtechnik anreichern lassen, nachdem sie durchflusszytometrisch aussortiert wurden. Durch die Anreicherung sollten weitere In Vitro Studien ermöglicht werden. Für diesen Versuch wählte ich die metastatische BLM, sowie die hoch aggressive SK-mel19 Zelllinie. Aus diesen Linien wurden CD133+ Zellen heraussortiert und einen Monat lang im normalen Zellkulturmedium (1640 RPMI 10 % Rinderkalbsserum, 1 % Penstrep der Stocklösung) kultiviert. Danach wurde in den sortierten, kultivierten Zellen erneut der Prozentanteil an CD133+ Zellen ermittelt und mit den Ausgangswerten der beiden verwendeten Zelllinien verglichen. Aufgrund von bakteriellen Kontaminationen vor der

Zellsortierung musste ich die BLM und SK-mel19 Zelllinie komplett neu kultivieren, sodass andere CD133+ Werte in diesen vorliegen als in der vorherigen "Expressionsanalyse".

Die Ergebnisse für den Anreicherungsversuch sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt. Die durchgeführte Analyse ergibt keinen Hinweis auf eine Erhöhung der CD133 Expressionswerte bei den sortierten BLMsort CD133+ Zellen im Vergleich zu den Werten der etablierten BLM-Linie : 4,7 % (nach Abzug der Isotypkontrolle = 1 %) vs. 5,7 % (nach Abzug der Isotypkontrolle = 0,4 %). Nach einem Monat Kulturzeit ist somit ein schwacher Rückgang der CD133 Expression bei den sortierten BLM-CD133+ Zellen zu verzeichnen.

Die Ergebnisse von SK-mel19 zeigt Tab. 5: Der CD133+ Zellanteil beläuft sich bei der Sk-mel 19 auf 28,2 % (nach Abzug der Isotypkontrolle = 2,5 %). Bei den Skmel19 sortierten CD133+ Zellen beträgt der Wert 32,2 % (nach Abzug der Isotypkontrolle = 1,3 %) Somit ist eine leichte Anreicherung von CD133+

Zellen nach einem Monat Kultivierung erkennbar (+ 4 %).

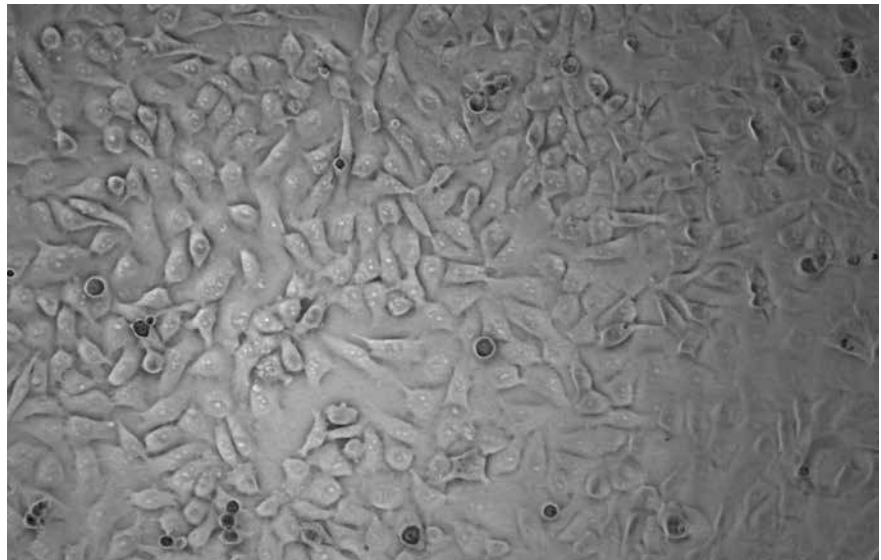
4.4 Sphäroid-Methode

Diese Methode findet in der Stammzellforschung häufig Anwendung. Mittels geeignetem Zellkulturmedium, welches bestimmte epidermale und fibroblastische Wachstumsfaktoren beinhaltet, können gezielt Stammzellen (z.B neuronalen Ursprungs) zur Proliferation angeregt und somit quantitativ expandiert werden. Unter diesen Kulturbedingungen der Nicht-Adhärenz proliferieren Stammzellen zu kugelförmigen Zellaggregaten (sogenannte Sphäroide), die in Suspension schwimmen. An den Peripherien dieser Aggregate differenzieren einige Zellen zu bestimmten Zelltypen, wobei im Zentrum die undifferenzierten Stammzellen in der Ruhephase (G0-Phase) verbleiben. Demnach bestand bei mir die folgende Annahme: Falls CD133+ Zellen wirklich stammzellähnlich sind, könnte man sie theoretisch mit dieser Methode ebenfalls wie normale Stammzellen quantitativ anreichern. In diesem Versuch habe ich

Zelllinie	CD133 [%]
BLM- Ungefärbt	0,6
BLM-sphäroid ungefärbt	0,7
BLM- CD133	22,9
BLM-sphäroid CD133	8,2

Tab. 6 : Durchflusszytometrische Analyse der CD133 Expression auf BLM-Zellen nach Kultivierung im hESC-Medium.

die ausgewählten Zelllinien WM1819, WM1502-C, BLM und WM3248 im humanen embryonalen Stammzellmedium (hESC) 1 bis 2 Wochen lang kultiviert bis sich Zellaggregate (Sphäroide) gebildet haben. Bedauerlicherweise reagierte nur die BLM-Linie auf das Medium, während die anderen zugrunde gingen, sodass ausschließlich die BLM für die durchflusszytometrische CD133-Expressionsanalyse hinzugezogen werden konnte. Diese Linie zeigte ein schönes sphäroides Wachstum nach sieben Tagen Kultivierung (Abb. 4). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigt Tab. 6.

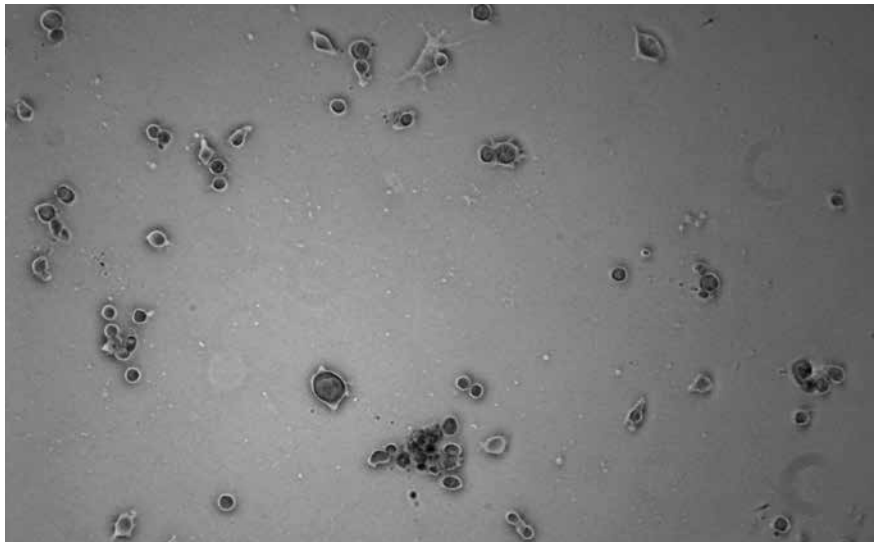


BLM -Zelllinie, Monolayer Tag 0.

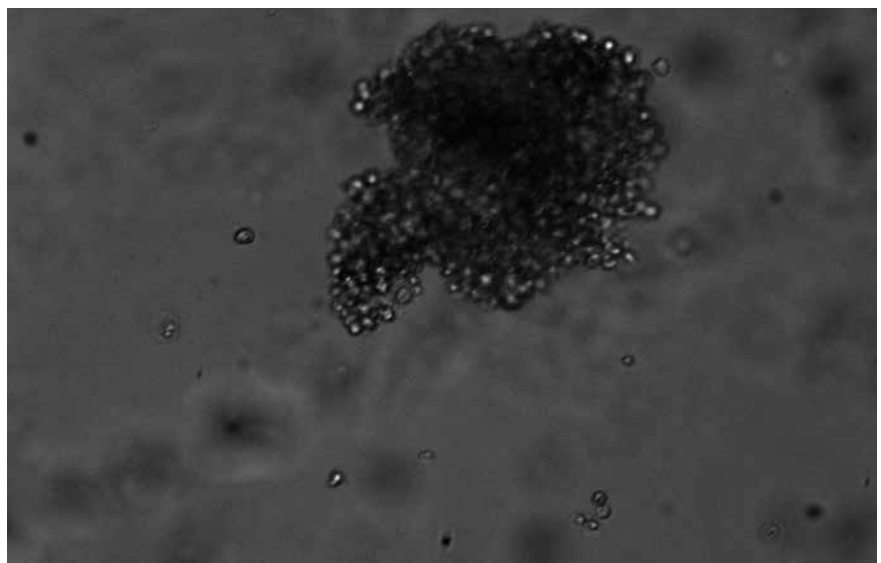
Die Analyse ergab, dass auch mit der Sphäroid-Methode keine CD133+ Zellen angereichert werden können. Die CD133 Expressionswerte sinken überraschenderweise signifikant von 22,3 % in der BLM-Linie (nach Abzug der Isotypkontrolle = 0,6 %) auf lediglich 7,5 % der BLM-Sphäroiden.

4.5. Resistenzanalyse von CD133+ Zellen

In diesem letzten In Vitro Experiment wollte ich untersuchen, ob die identifizierten CD133+ Zellen in den verschiedenen Zelllinien eine relativ höhere Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin aufweisen als CD133- Zellen. Cisplatin ist ein platinbasierendes Medikament, das sich an die DNA von schnell teilenden Zellen bindet und irreversible DNA-Schäden und somit den Zelltod (Apoptose) verursacht. Ich inkubierte fünf ausgewählte Zelllinien, deren CD133+ Zellanteil möglichst gering war, mit 0,5 und 15 μM Cisplatin für 72 h. Die Dosis legte ich empirisch für jede Zelllinie fest, da das Cisplatin möglichst viele Tumorzellen eliminieren, aber nicht vollständig letal für die Linie wirken sollte. Nach 72 h wurden die Prozentanteile an CD133+ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Falls CD133+ Zellen eine relativ resistente Population darstellen, müsste nach der Cisplatin-Exposition eine signifikante CD133+ Zellanreicherung bzw. Expression bei dosisabhängiger Verkleinerung der gesamten Tumorzellzahl beobachtet werden. Für diesen Versuch verwendete ich die Linien BLM, WM-1819, WM-1502C, WM3248 und SK-mel19.



BLM Zelllinie, hESC-Medium Tag 3.



BLM-Zelllinie, hESC Medium Tag 7.

Abb. 4: Durchlichtbilder von BLM Zellen, die in konventionellem Zellkulturmedium (oben) bzw. in hESC-Medium (mitte und unten) kultiviert wurden (Aufnahmen: Dr. Angelika Haußer, Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart).

Zelllinie	CD133 Expression bei 0 µM Cisplatin (Kontrolle) [%]	CD133 Expression bei 5 µM Cisplatin [%]	CD133 Expression bei 15 µM Cisplatin [%]
WM-1502 C	2,4	11,9	23,9
WM-1819	2,2	23,5	NA
WM-3248	7,2	32,0	NA
BLM	1,9	5,7	NA
SK-mel19	7,7	23,0	17,2

Tab. 7: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse auf CD133+ Zellen nach Cisplatin-Behandlung.

Die Ergebnisse sind der Tab. 7 zu entnehmen. In allen Cisplatin-inkubierten Zelllinien fand eine dosisabhängige CD133+ Zellanreicherung bei dosisabhängiger Verkleinerung der gesamten Tumorzellpopulation statt (Tab. 7).

5. Diskussion

Im Mittelpunkt meiner Arbeit stand der Versuch der Identifizierung und *In Vitro* Charakterisierung von stammzellähnlichen Tumorzellen in etablierten humanen Melanomzelllinien. Hier berichte ich von kleinen Zellpopulationen, die fast in allen Zelllinien gefunden werden konnten und den für andere Tumorarten assoziierten Krebsstammzellmarker CD133 exprimierten.

Die Untersuchungen auf die CD133 Expression in Bezug auf das Krankheitsstadiums des Tumors ließen eine leichte Korrelation zwischen der Aggressivität von Tumorzellen und erhöhten CD133 Expressionswerten erkennen. Eine solche Korrelation könnte theoretisch auf eine bedeutende Rolle von CD133+ Tumorzellen auf das Fortschreiten der Erkrankung und aggressiverem Wachstumsverhalten hinweisen. Diese Tendenz war jedoch nur in einigen Zelllinien feststellbar und nicht signifikant (Unterschiede von 2 bis 3 % zwischen aggressiven und weniger aggressiven Linien). Es ist durchaus möglich, dass die langjährige Kultivierung der etablierten Melanomlinien einen Einfluss auf die CD133 Expressionswerte hatte. Demnach wäre es besser für die oben genannte Korrelationsuntersuchung direkt entnommene Gewebeproben von Melanompatienten hinzuziehen. Der Versuch CD133+ Tumorzellen aus

zwei verschiedenen Zelllinien durchflusszytometrisch herauszusortieren und über eine Kultivierungszeit von einem Monat im Standardmedium anzureichern ist leider erfolglos geblieben. Vielmehr blieb der Prozentanteil an CD133+ Zellen in den aussortierten Zellen im Vergleich zu den zwei verwendeten Linien konstant. Weshalb die Anreicherungsversuche fehlschlugen, ist ohne weitere Untersuchungen schwer zu erklären, wobei ich hierzu zwei Erklärungsansätze vorschlage. Zum einen ist es möglich, dass neben CD133+ Zellen auch wenige CD133- Zellen durchflusszytometrisch mit aussortiert wurden. Falls CD133+ Zellen im Vergleich zu CD133- Zellen sich durch eine niedrigere Proliferationsrate auszeichnen (sprich, sich seltener teilen), könnte es sein, dass die durch die Marker negativen Zellen prozentual "überwachsen" wurden, weswegen eine gezielte Anreicherung fehlschlug. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es sich bei den CD133+ Populationen tatsächlich um stammzellähnliche Tumorzellen handelt, welche die Fähigkeiten zur asymmetrischen Teilung aufweisen. In diesem Falle generierten die wenigen, sortierten CD133+ Zellen die gesamte Tumorzellpopulation, die sich zumeist aus differenzierteren bzw. ausdifferenzierten CD133- Zellen zusammensetzte.

Leider habe ich keine weiteren Untersuchungen (z.B. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid oder BrdU-Analyse) durchgeführt, mit denen ich die Proliferationsrate und Zellteilungsaktivität dieser Zellen ermitteln könnte. In einem weiteren Versuchsansatz versuchte ich eine Anreicherung von

CD133+ Zellen durch die Kultivierung im Stammzellmedium (hESC) zu erreichen. Leider konnte ich in diesem Ansatz nur eine Zelllinie (BLM) untersuchen, welche im gegebenen Stammzellmedium zu sphäroiden, dreidimensionalen Zellaggregaten auswuchs, die am ehesten mit der Form und Struktur von normalen Gewebetumoren vergleichbar sind. Überraschenderweise zeigte sich, dass sich die CD133- Expression in dieser Linie um ein Vielfaches reduziert hat, denn falls CD133+ Zellen stammzellähnlich wären, so müsste eine quantitative Expansion unter diesen Kulturbedingungen beobachtbar sein.

Der Grund für diese Reduktion könnte darin liegen, dass in den entstehenden Zellaggregaten im Vergleich zu der normalen Zellkultur (Monolayerkultur) komplett andere physiologische Gegebenheiten vorliegen – so ist z.B. die intrazelluläre Kommunikation, die Nährstoffversorgung und die Sauerstoffsättigung in sphäroiden Zellaggregaten (und somit in normalen Gewebetumoren) anders als in den Monolayerkulturen. Diese physiologischen Unterschiede könnten somit die niedrige CD133 Expression in den Zellaggregaten erklären. Mir ist aufgefallen, dass die CD133 Expressionswerte selbst in den Monolayer-Zelllinien von Analyse zu Analyse variieren. Dieser Umstand könnte sich ebenfalls auf Faktoren wie Zelldichte (bei der Kultivierung) und Sauerstoffsättigungsrate innerhalb des Tumorzellverbandes begründen. Zukünftige Studien sollten untersuchen, inwiefern die CD133 Expressionswerte von den Kulturbedingungen (z.B. Sauerstoffrate u.a Faktoren) abhängen und

beeinflussbar sind, was auf eine bedeutende Rolle des extrazellulären Milieus für die Regulation der CD133 Markerexpression *In Vitro* (und vermutlich auch *In Vivo*) schließen ließe.

Im abschließenden Teil meiner Arbeit interessierte mich die Überlebensfähigkeit und Resistenz der CD133+ Zellen in diversen Linien gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin. Wie bereits beschrieben, kam es bei allen Cisplatin inkubierten Zelllinien zu einer signifikanten und dosisabhängigen Anreicherung von CD133+ Zellen bei dosisabhängiger Verkleinerung der gesamten Tumorzellpopulation. Dieser Befund lässt vermuten, dass es sich bei CD133+ Zellen um kleine resistente Subpopulationen innerhalb des Tumorzellverbandes handelt, welche selektiv eine chemotherapeutische Behandlung überleben. Der nächste Schritt, der an diese Vermutung anknüpfen könnte, wäre eine an der CD133+ Subpopulation durchgeführten Expressionsanalyse von Genen und Proteinen, die mit einem resistenten Tumorphänotyp in Verbindung stehen (beispielsweise ABC-Transporter oder DNA-Reparaturproteinen), wobei die Expressionsraten mit denen der CD133- Zellen verglichen werden sollten. Zu dieser Analyse sollte zusätzlich die Expression von bestimmten stammzellähnlichen Signaltransduktionswegen (Notch, BMI-1, WNT) ermittelt werden. Außerdem könnte die Zellzyklusaktivität von CD133+ Zellen untersucht werden, um ggf. eine Assoziation zwischen der vermuteten langsamen Proliferationsrate und der höheren Resistenz gegenüber Zytostatika herzustellen.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die durchflusszytometrische Analyse lediglich eine Tendenz der höheren Überlebensfähigkeit nach vorangegangener hochdosierten Cisplatinexposition aufzeigte. Die für die jeweilige Zelllinie gewählte Cisplatinexposition eliminierte zwar eine größere Zahl an Tumorzellen, jedoch war es mir nicht möglich z.B. 99 % der Krebszellen mit dem Chemotherapeutikum abzutöten, da sonst eine zu kleine Anzahl an Zellen technisch eine durchflusszytometrische Untersuchung nicht erlaubte. Deswegen ist es

nicht auszuschließen, dass neben den CD133+ Populationen andere hochresistente CD133- Zellgruppen existieren. Um dieses Problem zu umgehen, hätte man eine Immunfluoreszenz (IF) Analyse durchführen sollen, wobei eine Cisplatinexposition gewählt werden müsste, die nahezu alle Tumorzellen abtötete. An den verbleibenden Krebszellen kann sich der Antikörper bei der IF-Analyse binden und mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop zur Lichtemission angeregt werden, wobei die fluoreszierende Intensität des gebundenen Antikörpers direkt mit der CD133 Expression korreliert. Mit dieser Methode hätte man besser untersuchen können, ob die überlebenden Zellen ausschließlich CD133+ sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen Indizien liefern, dass CD133+ Zellen sich möglicherweise durch folgendes kennzeichnen :

1. Niedrigere Zellteilungsrate (im Vergleich zu CD133- Zellen)
2. Eventuell Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung
3. Relativ höhere Resistenz zu Chemotherapeutika

Diese Faktoren gelten als Stammzeleigenschaften. Ob nun CD133+ Zellen tatsächlich stammzellähnlich sind, sollten Untersuchungen mit den oben vorgeschlagenen oder anderen Analysen zeigen.

Es ist auch möglich, dass neben den CD133+ Zellen, Zellen mit anderen Phänotypen die o.g. Eigenschaften aufweisen und als Kandidaten für Tumorstammzellen in Betracht gezogen werden können. Deswegen sollten noch andere stammzellassoziierte Marker für die Untersuchungen verwendet werden. Auch wenn die Krebsforschung zunehmend stammzellähnliche Tumorzellen in diversen Tumorarten identifiziert, gibt es einige potentielle Schwierigkeiten. Die genauen Oberflächenmarker, die selektiv Krebsstammzellen identifizieren könnten, sind bis heute noch nicht bekannt, denn die in der Forschung zurzeit verwendeten Marker sind entweder auf Vorläufer

oder Stammzellen verschiedenen Ursprungs ausgeprägt. Außerdem sind die genauen physiologischen Funktionen von CD-Molekülen wie CD133 und CD44 unbekannt und es ist ungewiss, ob diese Marker für einen Stammzellphänotyp unerlässlich sind [9], [11]. Um potentielle Tumorstammzellen zu finden, müssten Marker hinzugezogen werden, die spezifisch für den Oberflächenphänotyp der adulten Stammzellen im jeweiligen Gewebe, in welchem der Tumor entsteht, sind. Gewebespezifische Stammzellen sind beim Menschen unzureichend untersucht und charakterisiert worden, sodass die Oberflächenphänotypen dieser Zellen in zahlreichen Geweben weiterhin unbekannt bleiben. Auch die im Grundlagenteil beschriebenen tierexperimentellen Studien sind in diesem Zusammenhang problematisch. Der einzige Indikator für Krebsstammzellen in diesen *In Vivo* Studien ist das tumorinduzierende Potential dieser Zellen in immungeschwächten Ratten.

Die Frage stellt sich nun, ob die beobachtete krebsinduzierende Wirkung wirklich ein Charakteristikum von Krebsstammzellen ist, oder lediglich identifizierte stammzellähnliche Zellen besser im fremden Tiergewebe überleben und sich somit etablieren können. Tierexperimentelle Studien erbrachten auch negative Ergebnisse bezüglich der tumorinduzierenden Wirkung von identifizierten Zellkandidaten. So haben Studien gezeigt, dass auch CD133- Zellen des Glioblastoms und Dickdarmkrebses ebenfalls im hohen Maße Tumore im Tiermodell etablieren konnten [11], [12]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse unterstreichen die Tatsache, dass die derzeit verwendeten Stammzellmarker zu unspezifisch sind, um potentielle Krebsstammzellen (falls sie überhaupt existieren) zu identifizieren.

Ich schlage vor, dass eine Kombination aus Markern, die für undifferenzierte gewebespezifische Stammzellen charakteristisch sind und Markern, die eine hohe Invasivität, Migrationsfähigkeit, Resistenz zu Zytostatika und ein hohes Potential zu Metastasenbildung kennzeichnen, viel spezifischer eine potentielle Krebsstammzellpopulation identifizieren könnten. Solche Marker

können zum Beispiel Antikörper gegen den Chemokinrezeptor CXCR-4, welcher mit der Fähigkeit zur Zellmigration und Metastasenbildung korreliert oder Antikörper gegen ABC-Transporter bzw. MDR-Proteine, die zur Resistenz der Zellen gegenüber Zytostatika beitragen, umfassen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit identifizierte ich mit dem unspezifischen Stammzellmarker CD133 in den meisten etablierten Melanomzelllinien kleine CD133+ Zellpopulationen, die möglicherweise Stammzeleigenschaften aufweisen und Kandidaten für potentielle Melanomstammzellen sind. Diese Eigenschaften sollten mit den vorgeschla-

genen und anderen Analysen näher untersucht werden. Falls CD133+ Zellen tatsächlich Krebsstammzellen sind, könnte die Eliminierung dieser Population die Behandlungserfolge von fortgeschrittenen Melanomen erhöhen oder sogar die Erkrankung dauerhaft heilen.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen für die Unterstützung und Ermöglichung meines Projekts am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart herzlich bedanken. Bei Professor Klaus Pfizenmaier, dem Leiter des Institutes, bei Dr. Angelika Haußer und PD. Dr. Dagmar Kulms, meinen Betreuerinnen, bei Professor Peter Scheu-

rich für die durchflusszytometrische Zellsortierung, bei den technischen Assistentinnen Nathalie Peters und Gisela Link und bei den Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe Haußer und der Arbeitsgruppe Kulms. Für die Hilfsbereitschaft und Offenheit, die Zeit, die diese Personen für mich über 6 Monate hinweg investiert haben, sowie für die Nutzung der Laboreinrichtung und Materialien möchte ich mich an dieser Stelle sehr bedanken. Dank gilt auch Professor Ralf-Rainer Mendel, Leiter des Institutes für Pflanzenbiologie der Technischen Universität Braunschweig, welcher mir mit Rat stets zur Seite stand, sowie meinem Vater und meiner Schwester, die mich unterstützt haben, wo sie nur konnten.

Quellenverzeichnis

- [1] Bonnet, D; Dick, JE;. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med. 1997; 3: 730-737
- [2] Al-Hajj, M; Wicha, MS; Benito-Hernandez, A; Morrison, SJ; Clarke, MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells Proc Natl Acad Sci. USA 2003; 100: 3983-3988
- [3] Li, C; Heidt, DG; Dalerba, P; Burant, CF; Zhang, L; Adsay, V; Wicha, M; Clarke, MF; Simeone, DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. 2007; 67: 1030-1037
- [4] Hurt, EM; Kawasaki, BT; Klarmann, GJ; Thomas, SB; Farrar, WL. CD44+ CD24 (-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. Br J Cancer. 2008; 98: 756-765
- [5] Ricci-Vitiani, L; Lombardi, DG; Pilozzi, E; Biffoni, M; Todaro, M; Peschle, C; De Maria, R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells .Nature 2007; 445: 111-115.
- [6] Singh, SK; Clarke, ID; Terasaki, M; Bonn, VE; Hawkins, C; Squire, J; Dirks, PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. 2003; 63: 5821- 5828
- [7] Olempska, M; Eisenach, PA; Ammerpohl, O; Ungefroren, H; Fandrich, F; Kalthoff, H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2007; 6: 92-97
- [8] Vander, Griend DJ ;Karthaus , WL ; Dalrymple , S ; Meeker , A ; DeMarzo, AM ; Isaacs, JT. The role of CD133 cells in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating JT.Cancer Res. 2008; 68: 9703- 97011
- [9] Fillmore, C; Kuperwasser, C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? Breast Cancer Res 2007; 9: 303.
- [10] Yang, YM ; Chang, JW. Current status and issues in cancer stem cell study Cancer Invest.2008; 26: 741-755
- [11] Joo , KM ; Kim, SY ; Jin , X; Song, SY; Kong , DS ; Lee, JI ; Jeon, JW ; Kim, MH ; Kang, BG; Jung,Y; Jin , J; Hong, SC; Park,WY; Lee,DS; Kim,H ; Nam,DH. Clinical and biological implications of CD133- positive and CD133-negative cells in glioblastomas. Lab Invest. 2008; 88: 808-815.
- [12] Shmelkov,SV ; Butler,JM ; Hooper, AT; Hormigo, A ; Kushner , J ; Milde, T ; ST Clair , R ; Baljevic, M ; White, I ; Jin DK, Chadburn , A ; Murphy, AJ ; Valenzuela , DM ; Gale NW, Thurston , G ; Yancopoulos, GD ; D'Angelica, M ; Kemeny, N ; Lyden, D ; Rafii, S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. J Clin Invest. 2008; 118: 2111- 2120
- [13] Tan, BT; Park, CY; Ailles, LE; Weissmann, IL ; The Cancer stem cell hypothesis: a work in progress. Lab Invest. 2006; 86 ; 1203-1207 Review
- [14] Ward, RJ ; Dirks, PB. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development Annu.Rev.Pathol. 2007; 2: 175-189
- [15] Weinberg, Robert A.: The biology of cancer, New York 2007