

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Kinderchirurgie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. Udo Rolle

**Rolle von CD90- und CD34-positiven Zellen in Hepatoblastom-
Tumorzelllinien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches der Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Giulietta Volante

aus Bad Soden am Taunus

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: Prof. Dr. Henning Fiegel

Korreferent: Prof. Dr. Peter Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	- 5 -
Tabellenverzeichnis	- 7 -
1 Einleitung	- 8 -
1.1 Klinisches zum Hepatoblastom	- 8 -
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	- 8 -
1.1.2 Histologie.....	- 9 -
1.1.3 Diagnostik.....	- 9 -
1.1.4 Therapie	- 11 -
1.1.5 Prognose.....	- 12 -
1.2 Krebsstammzellen.....	- 13 -
1.2.1 Krebsstammzeleigenschaften	- 13 -
1.2.2 Marker für Stammzellen und Pluripotenz.....	- 15 -
1.3 Zielsetzung.....	- 19 -
2 Material und Methoden	- 20 -
2.1 Material.....	- 20 -
2.1.1 Apparaturen	- 20 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	- 22 -
2.1.3 Kits.....	- 24 -
2.1.4 Chemikalien und Agenzien.....	- 24 -
2.1.5 Nährmedium und Zusätze	- 25 -
2.1.6 Medien- und Pufferzusammensetzung.....	- 26 -
2.1.7 Zellkulturen.....	- 26 -
2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	- 27 -
2.1.9 Primer für quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	- 27 -
2.2 Methoden	- 29 -
2.2.1 Zellkulturarbeit	- 29 -
2.2.1.1 Umsetzen der Zellen.....	- 29 -
2.2.2 Durchflusszytometrie.....	- 29 -
2.2.3 Magnetic activated cell sorting (MACS).....	- 30 -
2.2.4 RNA-Gewinnung	- 31 -
2.2.5 Herstellung von komplementärer DNA	- 32 -
2.2.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	- 32 -

2.2.7	Migrations Assay	- 34 -
2.2.8	Tumor Sphäroid Assay	- 35 -
2.2.9	Statistische Auswertung.....	- 36 -
3	Ergebnisse.....	- 37 -
3.1	FACS-Analyse	- 37 -
3.2	FACS-Analyse von mittels MACS aufgetrennter HuH6 Zellen	- 41 -
3.3	FACS-Analyse von mittels MACS aufgetrennter HepG2 Zellen.....	- 44 -
3.4	qPCR von mittels MACS aufgetrennter HuH6 Zellen	- 47 -
3.5	Migrationsassay	- 49 -
3.6	Tumor Sphäroid Assay	- 50 -
4	Diskussion	- 52 -
5	Zusammenfassung	- 60 -
6	Summary.....	- 62 -
7	Literaturverzeichnis	- 64 -
8	Danksagungen	- 70 -
9	Lebenslauf	- 71 -
10	Schriftliche Erklärung.....	- 73 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Migrationsassay Aufbaus	- 34 -
Abbildung 2: a) Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen, gefärbt mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC, CD34-BV421 und in einer unabhängigen Analyse mit CXCR4-APC.....	- 37 -
Abbildung 3: a) Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen, gefärbt mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC, CD34-BV421 und in einer unabhängigen Analyse mit CXCR4-APC.....	- 38 -
Abbildung 4: Dreifach Färbung von HuH6 Zellen mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC und CD34-BV42	- 39 -
Abbildung 5: Dreifach Färbung von HepG2 Zellen mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC und CD34-BV42	- 40 -
Abbildung 6: Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern	- 42 -
Abbildung 7: Mit FACS ermittelte Expressionsrate von CD90 (n=15), CD34 (n=16) und dem OV-6-Antigen (n=3) bei einer unsortierten Kontrollgruppe (blauer Balken), CD90-depletierten (orangener Balken) und CD90-angereicherten Fraktion (grüner Balken)-	43 -
-	
Abbildung 8: Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern	- 43 -
Abbildung 9: Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern.....	- 45 -
Abbildung 10: Mittels FACS ermittelte Expressionsrate von CD90 (n=16), CD34 (n=6) und OV-6 (n=3) bei einer unsortierten Kontrollgruppe (blauer Balken), CD90-depletierten (orangener Balken) und CD90-angereicherten Fraktion (grüner Balken)-	46 -
-	

Abbildung 11: Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern	- 46 -
Abbildung 12: Mittels qPCR gemessene relative Expression von Oct4, Nanog, AID, Albumin, EpCAM, c-myc und AFP in CD90 angereicherten und depletierten HuH6 Zellen	- 48 -
Abbildung 13: Verhältnis der durchgewanderten HuH6 Zellen im Migrationsassay	- 49 -
Abbildung 14: Fotodokumentation des Wachstums von HepG2 Zellen im Tumor Sphäroid Assay jeweils zur Plattierung und nach 1, 4 und 7 Tagen Inkubation	- 50 -
Abbildung 15: Durch qPCR gemessene Expression von CD90, CD34, Oct4, Nanog, AID, Albumin und c-myc	- 51 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsschema in qPCR- 33 -

Tabelle 2: Passagierungsschema des Tumor Sphäroid Assay- 35 -

1 Einleitung

1.1 Klinisches zum Hepatoblastom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Hepatoblastom ist mit einem Anteil von 1% an malignen Neoplasien im Alter von 0-14 Jahren ein seltener, solider Tumor des Kindes.¹⁻⁵ Während bei Erwachsenen das hepatozelluläre Karzinom den größten Anteil an primären malignen Lebertumoren ausmacht, handelt es sich bei 2/3 der Lebertumoren des Kindes um Hepatoblastome.^{5, 6} Zusätzlich treten maligne Tumoren der Leber häufiger bei Kindern auf als benigne.⁶ Die Inzidenz von 1,6 Fällen auf 1 Million Kinder pro Jahr (Alter 0-14) macht ihn zu dem häufigsten, primären Lebertumoren des Kindes.¹ In den letzten Jahren zeigte sich allerdings eine Zunahme der Inzidenz, welche wahrscheinlich mit der vermehrten Frühgeburtlichkeit, sowie einem niedrigeren Geburtsgewicht in den Industrieländern zusammenhängt.^{2, 3} Es gibt in weniger als 20% der Fälle Assoziationen des Hepatoblastoms mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Hemihypertrophien, sowie dem Edward's Syndrom und der familiären Polyposis coli.^{2, 3, 5, 6} Im Rahmen dessen konnte eine Assoziation von Hepatoblastomen mit Aberrationen des Wnt- β -catenin Signalweges beobachtet werden. Immunhistochemisch konnten bei vielen dieser Hepatoblastome erhöhte Expressionsraten von unter anderem Cyclin D1, Survivin und MYC detektiert werden, welche über den Wnt- β -catenin Signalweg aktiviert werden. Bei diesen Hepatoblastomen konnte klinisch meist ein aggressiverer Verlauf beobachtet werden.^{2, 3, 5}

Das Haupterkrankungsalter liegt bei 18 Monaten,⁶ dabei treten Hepatoblastome häufig zwischen dem sechsten Monat und dem 3. Lebensjahr auf.^{1, 2} Fünf Prozent der Kinder, diagnostiziert mit Hepatoblastomen, sind über 4 Jahre alt.⁶ Es gibt eine leichte Häufung bei Jungen, so besteht ein Verhältnis von 1:1,6 zwischen weiblichen und männlichen Erkrankten.¹

1.1.2 Histologie

Histologisch präsentieren Hepatoblastome ein buntes Bild an unterschiedlich differenzierten Zellen. Analog zur Entwicklung reifer Hepatozyten entstehen Hepatoblastomzellen aus Hepatoblasten und können die verschiedenen Stadien der Leberentwicklung widerspiegeln. Im Gegensatz zu hepatozellulären Karzinomen entwickeln sie sich nicht nach Leberschädigungen.³ Am häufigsten sind Zellen epithelialer Genese zu finden, in welchen fetale oder embryonale Merkmale ausgeprägt werden.^{2,3,6} Einige wenige Hepatoblastome weisen undifferenzierte, kleinzellige Zellen im Gewebsverband auf, sowie Zellen, die Vorläuferzellen von Gallengängen ähneln.⁷ Hepatoblastome können auch extrahepatische Zellverbände aus Knorpel-, Osteoid-, Nerven- oder endokrinen Zellen innerhalb des mesenchymalen Gewebes enthalten. Somit ist zu vermuten, dass in einigen Hepatoblastomen neben Gewebsstammzellen auch pluripotente Zellen sein könnten.⁸ Fetale Hepatoblastome zeigen meist geregelteres Wachstum und weniger Nekrosezonen als embryonale Hepatoblastome. Letztere weisen sich durch atypische Zellen mit größerem Kern im Vergleich zum Plasma aus.⁹ Zudem treten in vielen Hepatoblastomen hämatopoetische Stammzellen in Zusammenschlüssen auf.⁷ Die Hämatopoese wird im Embryo zu großen Teilen von Leber und Milz übernommen. Das Auffinden von hämatopoetischen Stammzellen entspricht somit der embryonalen Genese des Tumors.⁹ Hepatoblastome mit geringerem Differenzierungsgrad, wie embryonale oder kleinzellige, undifferenzierte Hepatoblastome zeigen meist aggressives Wachstum und neigen eher zur Metastasierung. Dabei müssen vor allem solche Hepatoblastome aus einer reinen kleinzelligen, undifferenzierten Population bestehend genannt werden. Diese gehen häufig mit einer sehr geringen Serum AFP-Konzentration oder einer deutlich erhöhten einher.⁵ Zusätzlich konnte bei ihnen häufig ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie beobachtet werden. Letztendlich zeigen diese meist eine erhöhte Mortalität.^{2,9}

1.1.3 Diagnostik

Das Hepatoblastom präsentiert sich makroskopisch meist als ein gut durchbluteter, solider, unifokaler Tumor, vermehrt im rechten Leberlappen lokalisiert. Metastasen treten meist erst in fortgeschrittenen Stadien in der Lunge auf, ein Lymphknotenbefall ist selten.^{1,6} Klinisch zeigt sich das Blastom meist als ein tastbarer abdominaler Tumor,

teilweise mit Begleitsymptomatik wie Fieber, Gedeihstörung und Antriebsminderung.³ Seltene Symptome sind Pubertas praecox bei β -HCG (Beta-human Chorion-Gonadotropin) produzierenden Tumoren, Ikterus, Thrombozytose im Rahmen autonomer Thrombopoetinausschüttung⁶ oder in Fall von Ruptur, ein akutes Abdomen.¹

Differentialdiagnostisch muss bei einem Tumor der Leber neben lebereigenen Tumoren auch an häufigere abdominelle Tumoren wie Neuroblastome oder Wilms-Tumore gedacht werden. Lebereigene Tumore, die bei Kindern auftreten können, sind hepatozelluläre Karzinome, die eher beim älteren Kind auftreten, embryonale Rhabdomyosarkome, undifferenzierte Sarkome, Teratome oder Keimzelltumore. Benigne Neoplasien sind deutlich seltener bei Kindern und treten vor allem im Säuglingsalter auf. Zu finden sind dabei Hämangiome, mesenchymale Hamartome, fokale noduläre Hyperplasien oder hepatozelluläre Adenome.⁹

Labordiagnostisch empfiehlt sich die Bestimmung von Alpha-Fetoprotein (AFP), welches bei 80-90% der Patienten mit Hepatoblastomen erhöht ist. Ebenfalls dient der AFP- Wert als Therapieverlaufskontrolle und der Prognosebestimmung.³ In 20% der Fälle kann es auch zu einer Erhöhung von β -HCG kommen.⁶ Die Diagnosesicherung erfolgt meist über eine Tumorbiospie. Zusätzlich nimmt die histologische und immunohistochemische Klassifizierung im Rahmen der Therapieplanung einen immer größeren Stellenwert ein. So benötigen Tumore mit erhöhter INI 1-Expression häufig aufgrund eines rhabdoiden Tumorursprungs eine abgewandelte Chemotherapie. Auch konnten bei Tumoren mit erhöhter Expression von CD44, CD90 und CD133 ein schnelleres Tumorfortschreiten mit schlechterem Outcome beobachtet werden.³ In der weiteren Stadieneinteilung kommen verschiedene Bildgebungen wie Abdomensonographie mit Farbdoppler, MRT/CT oder bei entsprechender Fragestellung, FDG-PET/CT, Leber-Szintigraphie oder Leber-Angiographie zur Anwendung. Zwecks Therapieplanung und Prognoseeinschätzung erfolgt die Stadieneinteilung in der Regel in das PRETEXT-System (pre-treatment extension) der Lebertumorstudien-Gruppe der Internationalen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (SIOPEL).^{1, 2, 4} Dabei wird die Leber vor der ersten Behandlung in 4 Sektoren anhand der Portalvenenfelder eingeteilt, wobei auch extrahepatischer Befall miteinbezogen wird.^{3, 6} Zusätzlich wurde in den letzten Jahren von unterschiedlichen Arbeitsgruppen verschiedene Einflüsse für ein schlechteres Outcome zusammengetragen. Analog zu vielen anderen Tumoren weisen Metastasierung bei

Erstdiagnose, ein multifokaler Befall, Gefäßeinbruch venös oder portalvenös, sowie Tumorruptur, aber auch eine hohe PRETEXT Einteilung meist ein schlechteres Behandlungsergebnis auf. Dies konnte bei Hepatoblastomen mit niedrigeren Serum AFP-Werten (<100ng/ml) oder auch stark erhöhten Serum AFP-Werten (>1000ng/ml), sowie bei solchen vom kleinzelligen histologischen Typ, gezeigt werden. Weitere prognostische Faktoren beziehen sich auf das Ansprechen auf Therapie, sei es operativ oder durch Chemotherapie. ^{2,4}

1.1.4 Therapie

Auch wenn die vollständige chirurgische Exstirpation für die kurative Behandlung elementar ist, finden heutzutage multimodale Therapiekonzepte Anwendung. ⁶ Das Hepatoblastom ist chemosensibel und zeigt oft gutes Ansprechen auf neoadjuvante und adjuvante Chemotherapien. Allerdings können Hepatoblastome nach längerer Behandlung Zytostatikaresistenzen ausbilden, was die Therapie von nichtoperablen Tumoren erschwert. Zur Evaluation des Chemotherapiekonzepts wird das Hepatoblastom anhand der PRETEXT-Einteilung in 3 Risikogruppen eingeteilt: Standard-Risk-Hepatoblastom, High-Risk-Hepatoblastom und Very-High-Risk-Hepatoblastom. ¹⁻³ Nach neoadjuvanter Chemotherapie kann das Hepatoblastom weiter analog zu den PRETEXT Stadien in die POSTTEXT Stadien eingeteilt werden. ^{2,3}

Prinzipiell kommen zur Chemotherapie des Hepatoblastoms verschiedene Wirkstoffe zur Anwendung. Die stärkste Wirkung wird mit Cisplatin erzielt, das mit anderen Medikamenten wie Carboplatin, Doxorubicin, Ifosfamid, Etoposid, Vincristin, 5-Fluorouracil oder Irinotecan kombiniert werden kann, um somit Therapieansprechraten von bis zu 93% zu erreichen. Durch eine kombinierte Chemotherapie können weniger Zyklen von Cisplatin durchgeführt werden, um die Nebenwirkungen der Toxizität zu reduzieren. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren vermehrt Therapien mit selektiven Angriffspunkten auf ihre Wirksamkeit getestet. Der Fokus liegt hierbei auf Tumorstromung und -entwicklung sowie Vaskularisierung. ² Dennoch bleiben bis zu 30% der inoperablen Tumoren auch gegen diese Chemotherapie immun. ⁶

Bei kleineren Tumoren (PRETEXT I-II) mit low-risk Einteilung kann eine primäre totale Resektion erwogen werden, in der Regel aber erfolgt eine Resektion nach Induktionschemotherapie. ³ Die Resektion sollte möglichst anatomisch und radikal erfolgen und

mit zusätzlicher Lymphadenektomie. Metastasen Chirurgie kann vor allem bei Lungenbefall zu einem besseren Outcome führen.^{1, 3, 6} Finale Behandlungsstrategie stellt die orthotrope Lebertransplantation dar, welche Anwendung findet bei multifokalen Hepatoblastomen, die sich über alle 4 Sektoren erstrecken oder bei Gefäßeinbrüchen bei nicht resektablen Tumoren.^{1, 2, 10}

1.1.5 Prognose

Die Prognose ist abhängig von der Stadieneinteilung und dem Therapieansprechen. Insgesamt liegt die durchschnittliche Heilungsrate bei >80%. Jedoch muss zwischen den Risikogruppen differenziert werden. So variiert die tumorfreie 5-Jahres-Überlebensrate von Standard-Risk-Hepatoblastomen bei 92% bis zu 66% bei High-Risk-Hepatoblastomen.⁹ Als Kontrollparameter werden in der Regel AFP und β -HCG bestimmt. Dabei geht der Erfolg einer Chemotherapie mit einer Abnahme des Serum-AFP einher. Gleichzeitig kann ein Rezidiv zu erneutem Anstieg des Serum-AFP führen, teilweise ein bis zwei Monate bevor das Rezidiv bildmorphologisch dargestellt werden kann. Die Tumornachsorge im ersten Jahr beinhaltet eine körperliche Untersuchung und eine AFP Bestimmung alle 6 Wochen, sowie eine Sonographie des Abdomens und Röntgen des Thorax alle 3 Monate. 2-3 Jahre nach der Initialtherapie können die Kontrollen auf alle 3 Monate, nach 4 Jahren auf alle 6 Monate reduziert werden. Insgesamt sollten die Patienten mindestens 5 Jahre zur Nachkontrolle angebunden werden.^{1, 9}

1.2 Krebsstammzellen

1.2.1 Krebsstammzeleigenschaften

Krebsstammzellen sind eine meist kleine Subpopulation in Tumoren, welche Stammzeleigenschaften wie Regeneration, Differenzierung und Bildung von reifen Tochterzellen aufweisen. Ebenfalls zeichnen sie sich durch die Möglichkeit aus im Körper für eine längere Zeit zu ruhen und anschließend erneute Proliferation zu initiieren. Zusätzlich werden ihnen ein erhöhtes Metastasierungspotential und eine gewisse Chemoresistenz zugeschrieben.¹¹⁻¹⁵ Ebenso konnte bei verschiedenen Tumoren beobachtet werden, dass die Krebsstammzellen an Rezidivbildung beteiligt waren.^{12, 14, 16, 17} Krebsstammzellen wurden als erstes bei der akuten myeloiden Leukämie (AML) beschrieben. Anhand von *in vivo* Experimenten konnte 1997 durch Bonnet und Dick eine AML über CD34 positive Tumorzellen auf Mäuse übertragen werden. Tumorzellen mit anderen Expressionsmustern waren dabei nicht in der Lage zur Tumorentstehung. Nach weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen starke Ähnlichkeiten zu hämatopoetischen Stammzellen aufwiesen. Dies ließ auf das Vorhandensein von Krebsstammzellen und deren Rolle in Tumorentstehung und -regulation schließen.^{14, 15, 18, 19} Krebsstammzellen gelten seither als Initiator von Tumoren, auch in fremden Geweben, im Rahmen von Metastasierung oder Rezidivbildung.^{13, 16, 17} Ihnen wird die Ursache für einen hierarchischen Tumoraufbau mit heterogenen Gewebsstrukturen, wie man sie häufig in Tumoren findet, zugeschrieben, indem sie symmetrische und asymmetrische Zellteilung betreiben.^{13, 15, 15} Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften wird die Fähigkeit des Übergangs von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe (epithelial-mesenchymal transition, EMT) zugesprochen.^{5, 20, 21} Ausschlaggebend dafür sind verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Snail1, Twist1, oder Zeb1, die über Signalwege wie beispielsweise den Wnt- β -catenin Signalweg aktiviert werden und zu einem Verlust von Adhäsionseigenschaften in der Zelle führen. Durch eine erhöhte Plastizität spielen Krebsstammzellen somit eine große Rolle in Metastasierung und Tumorentstehung.^{5, 19} Aber auch im Rahmen der Ausbildung von Chemotherapieresistenzen zeigte sich ein enger Zusammenhang mit EMT.²⁰ So bewirkt beispielsweise eine vermehrte EMT-Aktivität in Brustkrebszellen die Ausbildung einer Trastuzumab-Resistenz im Tumor.²²

Ob Krebsstammzellen aus Stammzellen des befallenen Organs entstehen oder im Rahmen der Krebsentstehung sich Krebszellen zu Krebsstammzellen entwickeln ist nicht vollständig geklärt. Beide Optionen scheinen in verschiedenen Tumoren unterschiedlich aufzutreten.¹⁵ Im hepatozellulären Karzinom konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl hepatische Progenitorzellen, Hepatoblasten, sowie adulte, differenzierte Hepatozyten die Fähigkeit zur Entwicklung von Krebsstammzellen aufweisen.²³ In verschiedenen adulten Tumoren konnten bereits Krebsstammzellen beschrieben werden, da sie sich stark von den anderen Tumorzellen unterscheiden und stammzell-spezifische Proteine exprimieren. So wurden zunächst Krebsstammzellen im Brustkrebs, anschließend in neurologischen Tumoren wie Glioblastomen und Neuroblastomen, in gastrointestinalen Tumoren des Pankreas und Kolons, sowie diversen Hauttumoren beschrieben. Häufig wurde hierfür ein ähnlicher Ansatz mit FACS-Analysen von Expression von Stammzellmarkern, sowie Transplantationsversuchen gewählt.^{14, 19} Weitere Untersuchungen wie Migrationsassays umfassten das Verhalten der Krebsstammzellen. Im Tumor Sphäroid-Assay konnte gezeigt werden, dass nur Krebsstammzellen und Zellen mit Stammzeleigenschaften in der Lage sind *in vitro* Tumor Sphäroide in serumarmen Medium auszubilden.²⁴⁻²⁹

In Rahmen der Krebsstammzellforschung stellten solide Tumoren eine Erschwernis dar, indem sich bei ihnen die Tumorzellgewinnung schwieriger als bei nicht soliden Tumoren gestaltete. So sind Tumorzellen in soliden Tumoren in Zellverbänden mit Nicht-Krebszellen und somit erschwert zugänglich.¹⁵ Zusätzlich befinden sich in pädiatrischen Tumoren häufig bereits Zellen verschiedener Entwicklungsstufen, sodass die Unterscheidung zu Krebsstammzellen erschwert ist. Stammzellspezifische Proteine werden teilweise auch von anderen Tumorzellen im embryonalen Tumor exprimiert. Zusätzlich bewahrt sich auch adultes Lebergewebe eine gewisse Regenerationsfähigkeit, wodurch sich die Bestimmung von Krebsstammzellmarkern im hepatozellulären Karzinom bereits erschwert gestaltete.¹² Dabei wird auch unter Krebsstammzellen des hepatozellulären Karzinoms eine hohe Heterogenität bei der Ausprägung verschiedener Krebsstammzellmarker beschrieben. Auch in anderen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Expression eines einzelnen Krebsstammzellmarkers nicht direkte Rückschlüsse auf die Stammzeleigenschaft der Zelle treffen lässt. So bildete zum Beispiel bei Hauttumoren sowohl CD34 positive als auch CD34 negative Zellen nach Transplantation sekundäre Tumoren mit CD34 positiv und negativen Zelltypen aus.^{14, 19} Daraus resultiert eine zu-

sätzliche Schwierigkeit in der Bestimmung von zuverlässigen Krebsstammzellmarkern für das Hepatoblastom.¹³

1.2.2 Marker für Stammzellen und Pluripotenz

Es wurde bereits in wenigen Studien versucht Marker für Krebsstammzellen im Hepatoblastom zu definieren. CD133, zum Beispiel, wurde als bekanntester Oberflächenmarker in mehreren Krebsstammzellen unterschiedlicher Gewebe beschrieben. Initial schrieb man ihn den hämatopoetischen Stammzellen zu, allerdings ließ er sich auch auf Krebsstammzellen von Prostatakarzinomen, Kolonkarzinomen, Pankreastumoren, sowie dem hepatozellulären Karzinom vermehrt finden. Letztendlich lässt sich CD133 nicht nur in hämatopoetischen Stammzellen, sondern in verschiedenen Stammzellgeweben unterschiedlichen Ursprungs finden.^{11, 27} In verschiedenen pädiatrischen, soliden Tumoren zum Beispiel Neuroblastomen, Nephroblastomen oder Retinoblastomen zeigten CD133 exprimierende Zellen Krebsstammzeleigenschaften.²⁸ Im Hepatoblastom wurde eine Verbindung von CD133 Expression und einem erhöhten Migrationserhalten, sowie Ausbildung von Chemoresistenzen erforscht.^{5, 11} Zusätzlich zeigte sich in einigen klinischen Untersuchungen eine Assoziation von erhöhten CD133 Expressionsraten mit einer höheren Therapieresistenz und Mortalität, sowie vermehrtem Rezidivauftreten.⁵ Gleichzeitig findet sich CD133 als Marker aber auch auf vielen, nicht tumorösen Stammzellen, weshalb eine strenge Assoziation mit Krebsstammzellen gerade bei embryonalen Tumoren schwierig ist.²⁸

Das Oberflächenprotein CD90 wird in verschiedenen Stammzellgeweben im Knochenmark, sowie in hepatischen Vorläuferzellen ausgebildet. Ihm wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Metastasierung, der Chemoresistenz und Selbsterneuerung von Lebertumoren zugeschrieben.^{27, 30} CD90 und CXCR4 positive hepatozelluläre Karzinom Zellen waren bei *in vitro* Experimenten in der Lage Tumorsphäroide auszubilden, was einen Hinweis auf ihre Assoziation mit Krebsstammzellen ergab.³⁰ Auch zeigten sie, vermehrt noch als CD90 und CD133 positive Zellen, Tumorentwicklung nach *in vivo* Transplantation, sowie Metastasierungspotential nach subkutaner Transplantation.³⁰ Dies sind Eigenschaften, die Krebsstammzellen als tumorigene Zellen zugeschrieben werden.

CXCR4 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher sich auf verschiedenen Geweben, unter anderem auf hämatopoetischen Zellen, aber auch auf embryonalen und adulten Stammzellen anderen Gewebes findet. Ihm wird eine Rolle zur Regulation von Proliferation und Erneuerung im Gewebe zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass in der Leber eine supprimierte Expression durch genetisches Silencing zur gestörten Leberregeneration führt. In verschiedenen Tumoren, wie Prostata-, Nieren-, oder nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte CXCR4 auf Krebsstammzellen detektiert werden. Hier wird CXCR4 eine Beteiligung an Proliferation und Zellmigration zugeschrieben.³¹

CD34 ist ein bekannter Marker für hämatopoetische Stammzellen und konnte bereits auf AML-Krebsstammzellen als Krebsstammzellmarker identifiziert werden.^{14, 15} Allerdings weisen auch hepatische Stammzellen teilweise CD34 auf. Dies impliziert ein Vorhandensein von Stammzellen in der embryonalen Leber, welche sich sowohl in hämatopoetische Zellen als auch in Hepatozyten differenzieren können.³² CD34 konnte bereits auf Hepatoblastom-Zellen lokalisiert werden, welche ebenfalls Krebsstammzellmarker exprimieren.⁷

Der Antikörper OV-6 bindet u.a. Keratin 14 und 19 und wurde bereits zur Erkennung von hepatischen Stammzellen des hepatozellulären Karzinoms etabliert.³³ Es konnte gezeigt werden, dass hepatische ovale Zellen, welche Keratin 14/19 ausbilden, Differenzierungspotential zu Hepatozyten und Gallenwegszellen haben, sodass sie in der Leberentwicklung die Eigenschaften von frühen Progenitorzellen haben.³⁰ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation von OV-6 positiven Zellen zum Wnt- β -catenin Signalweg besteht und diese Zellen erhöhte Chemotherapieresistenz aufweisen.^{27, 30} Auch im Hepatoblastom konnten OV-6 positive Zellen gefunden werden.⁷

EpCAM ist ein transmembranes Protein, welches sich nicht nur in der embryonalen Leber, sondern auch in adulten Leberzellen nachweisen lässt. Es ist neben der Zell-Zell-Adhäsion auch an Migration, Proliferation und in Tumoren auch an Metastasierung, Regeneration und Tumorentstehung beteiligt. Im hepatozellulären Karzinom werden EpCAM ausbildenden Zellen Krebsstammzeleigenschaften wie Tumorrezidivbildung, Ausprägung von Chemotherapieresistenzen und Selbsterneuerung, sowie die Ausprägung anderer Krebsstammzellmarker wie Nanog und Oct4 zugeschrieben.^{5, 23, 30} Häufig ist eine erhöhte Expression von EpCAM bei malignen Lebertumoren mit einem schlech-

teren Outcome assoziiert.⁵ Die EpCAM Expression wird über den Wnt- β -catenin Signalweg gesteuert.^{5, 34} Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von hepatozellulären Karzinomen.²³

C-myc ist ein Zielprotein des Wnt- β -catenin Signalwegs.³⁰ Dabei fällt c-myc als Protoonkogen Aufgaben in der Regulation von Apoptose und weniger im Erhalt der Pluripotenz zu.^{35, 36} Mutationen von c-myc oder anderen Protoonkogenen der myc Familie lassen sich in vielen verschiedenen Tumoren detektieren, ihnen wird ein hohes Potential zur Tumorentwicklung zugeschrieben.³⁶ Im hepatozellulären Karzinom zeigte c-myc in niedriger Konzentration eine Förderung von Krebsstammzeleigenschaften über erhöhte Expression von Krebsstammzellmarkern. In hoher Expression jedoch bewirkt es einen gegensätzlichen Effekt.²³

Oct4 findet sich in vielen embryonalen Stammzellen früher Entwicklungsstufen. Ihm wird die Fähigkeit zugeschrieben, die Pluripotenz einer Stammzelle zu erhalten. Bei niedriger Expression von Oct4 kann es zur Zelldifferenzierung kommen und die Zellen verlieren ihre Pluripotenz.³⁷ In manchen Tumoren konnten im Vergleich zu den Ursprungsgeweben eine erhöhte Expression von Oct4 detektiert werden, welchem ein Zusammenhang mit Proliferation und Selbsterneuerung von Tumoren nachgesagt wird.³⁸ Weitergehend scheint Oct4 eine Rolle bei der Entwicklung von Chemotherapieresistenz in Krebsstammzellen, beispielsweise des Glioblastoms, Blasenkrebs oder bei Lungenkrebs, zu spielen und Tumorwachstum zu begünstigen.³⁹ Zusätzlich konnte ein schlechteres Outcome bei Tumoren mit höherer Expression von Oct4 unter anderem im hepatozellulären Karzinom beobachtet werden.^{24, 39}

Analog dazu blockiert Nanog als Pluripotenzmarker die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.^{40, 41} In verschiedenen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass Nanog nicht nur in Tumorstammzellen vorkommt, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Tumorstammzeleigenschaften wie der Bildung von Tumorsphäroiden oder Chemotherapieresistenzen spielt. Weiter bestehen Hinweise darauf, dass die Expression von Nanog zum Erhalt der Pluripotenz in Stammzellen epigenetisch reguliert wird, eine Dysregulation somit zur Entstehung von Krebsstammzellen führen könnte.^{19, 41} Dabei spielt die Demethylierung von Oct4 und Nanog Promotoren eine wichtige Rolle zur Regulation der Oct4 und Nanog Expression.

Ein Faktor, der eine Rolle in der Demethylierung zu haben scheint, ist die Zytidin-Deaminase AID (activation-induced cytidine deaminase). Neben seiner Beteiligung an der Diversifizierung von Antikörpern in B-Lymphozyten, konnte AID auch in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden. Hier scheint AID einen wichtigen Faktor für die epigenetische Regulation von den Pluripotenzmarkern Oct4 und Nanog darzustellen. Zusätzlich zeigten sich in Versuchen eine Assoziation von AID und der Ausprägung von epithelial zu mesenchymaler Transition (EMT). In AID knockdown Brustkrebszellen konnte eine reduzierte Expression von einigen EMT Transkriptionsfaktoren beobachtet werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass AID in einigen Tumoren unter anderem auch eine Aufgabe in Metastasierung zukommt.⁴² Es wird vermutet, dass durch die Deaminierung von methyliertem Zytosin von Genen, deren Transkription eigentlich epigenetisch blockiert ist, das Reparatursystem aktiviert wird und letztlich zu einer DNA-Demethylierung und somit zu einer Re-Aktivierung des Genes führen könnte. So konnte zum einen in AID knockdown Stammzellen eine fast vollständige Inhibition der Oct4 und Nanog Aktivität dargestellt werden, zum anderen konnte eine vermehrte Bindung von AID an stark methylierten Promotorregionen von Oct4 und Nanog Genen gezeigt werden. Die genaue Rolle von AID bei der Demethylierung bleibt jedoch umstritten.⁴²⁻⁴⁴

1.3 Zielsetzung

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass Krebsstammzellen in verschiedenen Tumoren für ein schlechteres Behandlungsergebnis ursächlich sind. Ihnen wird nachgesagt, dass sie vermehrt an Tumorentstehung, Metastasierung, Ausbildung von Chemotherapieresistenzen, sowie Rezidivbildung beteiligt sind. Durch ein besseres Verständnis von Krebsstammzellen können genauere Prognosen gestellt und eine individuellere Therapie entwickelt werden. Das langfristige Ziel ist es, Krebsstammzellen gezielt anzugreifen und somit ihrem Einfluss auf Tumore im Rahmen der Metastasierung, der Ausbildung von Chemoresistenzen oder der Rezidivbildung entgegenzuwirken. Im Hepatoblastom könnte die starke Heterogenität des Tumorgewebes für das Vorliegen von Krebsstammzellen sprechen. Dabei stellt sich bei diesem Tumor die besondere Schwierigkeit im bereits sehr heterogenen Gewebe Zellen zu definieren, die sich durch ihre Stammzeleigenschaften von den anderen embryonalen Tumorzellen unterscheiden.

Zweck dieser Dissertation ist es ein Set von Oberflächenmarkern für Krebsstammzellen des Hepatoblastoms zu beschreiben.

Um dies zu erreichen, soll zunächst die Expression bereits bekannter Krebsstammzellmarker mittels Durchflusszytometrie (FACS Analysen) auf zwei humanen Hepatoblastom-Tumorzelllinien (HuH6 und HepG2) untersucht werden. Es werden dabei die Expression der Oberflächenmarker CD90, CD34, CXCR4 und die Bindung von dem OV-6 Antikörper gemessen. Dabei erfolgen Mehrfachfärbungen, um mit eventuellen Markerkombinationen Zellpopulationen zu finden, die mehrere Krebsstammzellmarker exprimieren, um auszuschließen, dass einzelne Marker von Tumorzellen, aber nicht spezifisch von Krebsstammzellen ausgeprägt werden. In einem zweiten Schritt werden anhand der zuvor untersuchten Marker (CD90, CD34 und OV-6) mittels Magnetic Cell Sorting (MACS) angereicherte und depletierte Zellpopulationen für die jeweiligen Marker generiert, von welchen in weiteren Schritten mittels real-time PCR Analysen die Expression von den Stammzellmarkern CD90, CD34, CXCR4, den Pluripotenzmarkern Oct4, Nanog, AID, den Tumormarkern für Hepatoblastome AFP, den Zielproteinen des Wnt- β -cadherin Signalweges EpCAM und c-myc, sowie dem leberspezifischen Differenzierungsmarker Albumin bestimmt werden. Zusätzlich werden die depletierten und angereicherten Zellen auf ihr Migrationsverhalten mit Migrationsassays untersucht.^{24, 25} Im Tumor Sphäroid Assay wird sich die Tatsache zunutze gemacht, dass nur Krebs-

stammzellen zur Tumorsphäroid-Bildung in vitro im serumfreien Medium bei low-attachment Platten in der Lage sind.^{24–29}

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Apparaturen

Gerät	Hersteller
Absaug-Handgriff VacuuHandControl VHC pro	Vacuubrand GmbH und co. KG (Wertheim, Deutschland)
Autoklav	Systemec GmbH (Linden, Deutschland)
Durchflusszytometrie BD FACSCanto II	BD Biosciences (San Jose, USA)
Eisbehälter	BioCision LLC (Mill Valley, USA)
Eismaschine FM-80KE-HC	Hoshizaki Europe Limited (Shropshire, UK)
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Gefrierschrank CryoCube F570h	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Glasbehälter	Schott AG (Mitterteich Deutschland)
Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick by Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
Kühlschrank ProfiLine	Liebherr-International S.A. (Bulle, Schweiz)
Kryogener Gefrierschrank	Cryo-Tech (Geilnau, Deutschland)
MACS-Ständer MiniMACS-Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Mikroskop Typ Wilovert 30	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Multipipette stream	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 10, 20, 200, 1000µl	Eppendorf Research plus (Hamburg, Deutschland)
Pipette ErgoOne 20,200,1000 µl	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy 2, Akku-betrieben	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetus, Akku-betrieben	Hirschmann Laborgeräte GmbH und co. KG, (Eberstadt, Deutschland)
qPCR-Maschine Stratagene Mx3005P	Agilent (Santa Clara, USA)
Reaktionsgefäßständer für Reagiergefäß 1,5ml	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Röhrchengestell zusammensteckbar für Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (4x4, 6x6, 8x8)	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Thermo Scientific Hera SAFE KS	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Spectrophotometer NanoVue	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Timer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tischständer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Vortexer neoVortex D-6012	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Waage	Kern (Balingen, Deutschland)
Wasserbad	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labor- technik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Wärme-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Mega Star 1.6R	VWR International LLC (Radnor, USA)
Zentrifuge Mini Star D-6020	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einfrier-Tube CryoPure 1,6 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Einmalpipette Stripette steril (5, 10, 25ml)	Corning Incorporated (New York, USA)
Handschuhe Peha-Soft nitrile (S, M, L)	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
MACS-Säulen MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Pasteur Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich (Mainz, Deutschland)
PCR-Einzelgefäße Multiply-Pro 0,2 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
PCR TW 8-Tube Strip 0,2ml	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutsch- land)
PCR 8-Cap Strip	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutsch- land)
Pipettenspitzen Tip One, steril (10/20, 20, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutsch- land)

Pipettenspitzen Combitips advanced Multipipette (0,5; 1; 2,5; 5 ml)	Eppenfalconcondorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Röhrchen Cellstar, steril (15, 50ml)	Greiner Bio-one International GmbH, (Frickenhausen, Deutschland)
Rundboden-Polystyrol-Röhrchen Falcon 5 ml, steril (FACS-Röhrchen)	Corning Inc. (New York, USA)
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Zell-Einfrier-Kontainer CoolCell	BioCision LLC (Mill Valley, USA)
Zellkulturflaschen 75 cm ² , steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkultur-Platten Cellstar, steril (6, 24, 96-Well-Platten)	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten mit zellabweisender Oberfläche, 24-Well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Cell Culture Insert, Transparent PET Membrane, 12 Well 8,0 µm pore size	FalCon, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH (Gräfelifing, Deutschland)
Type 1 Collagen, 6-Well Plate, clear	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

2.1.3 Kits

Material	Hersteller
Cell Proliferation Kit (MTT)	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland)
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
RNA-Isolierungs-Kit Extract me	blirt S.A. (Gdansk, Polen)

2.1.4 Chemikalien und Agenzien

Produkt	Hersteller
Accutase Solution 100 ml, steril	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ampuwa Spüllösung 1 L, steril	Fresenius Kabi (Sèvres, Frankreich)
Anti-Adherence Rinsing Solution 100 ml, steril	STEMMCELL technologies Inc. (Vancouver, Kanada)
Mercaptoethanol	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (70 %) 5 L	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
FACSFlow 20 L	Beckton, Dickinson and Company by BD Biosciences (San Jose, USA)
FACS Shutdown Solution 5 L	BD Biosciences (San Jose, USA)
FACS Clean Solution 5 L	BD Biosciences (San Jose, USA)
Trypan Blue Stain (0,4 %) 100 ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)

2.1.5 Nährmedium und Zusätze

Medium bzw. Zusatz	Hersteller
B27-Supplement 1:50	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX 500 ml, steril	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium 500ml, steril	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
EGF 1ng/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FGF 20ng/ml	Perprotech, (Rocky Hill, USA)
N2-Supplement 1:100	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Fetal Bovine Serum 500 ml, heat inactivated	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Gentamycin (50 mg/ml) 100 ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Bovines Serumalbumin (12,5g)	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Phosphate-Buffered ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} 500ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
EDTA (0,5M) 100 ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Penicillin-Streptomycin 10.000 units penicilin, 10mg streptomycin per ml, in 0,9% NaCL, steril filtered, bioregent	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 Medien- und Pufferzusammensetzung

Medium für HuH6	RPMI + 0,01% GlutaMAX + 0,01% Penicillin-Streptomycin + 0,1% FBS
Medium für HepG2	DMEM+ 0,1% FBS + 0,01% GlutaMAX + 0,002% EDTA + 0,02% Gentamycin
FACS-Puffer	PBS + 0,5% BSA
MACS-Puffer	PBS + 2,5% BSA+ 2 mM EDTA
Tumor Sphäroid Medium	DMEM + 0,02% Gentamycin + 2% B27 + 1% N2 + 0,002% EGF + 0,002% FGF

2.1.7 Zellkulturen

Im Rahmen der folgenden Experimente wurden die beiden adhärennten Zelllinien HuH6 sowie HepG2 verwendet. HuH6 ist eine Hepatoblastomzelllinie, welche 1976 in Japan von einem 1 jährigen Jungen gewonnen wurde ^{45, 46} und für diese Versuche freundlicherweise durch Prof. Kappler der Abteilung für Kinderchirurgie am Universitätsklinikum München bereitgestellt wurde. HepG2 wurde 1979 von einem 15-jährigen kaukasischen Jungen aus Argentinien gewonnen und initial als hepatozelluläres Karzinom deklariert. ⁴⁵ Im Rahmen weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich bei HepG2 jedoch um eine Hepatoblastomzelllinie handelt. ⁴⁷ Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Elsie Opperman aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikum Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Firma
IgG-FITC 500µl, Mouse IgG1 κ Isotyp, Clon P3.6.2.8.1 (5µl pro Test)	Invitrogen by life technologies, Carlsbad, USA
IgG-PE 2ml, Mouse IgG1 κ Isotype control (5µl pro Test)	BD Pharmingen by BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IgG-APC 500µl, Mouse IgG1 κ Isotype control Klon MOPC-21 (5µl pro Test)	BioLegend, San Diego, USA
α-human CD90-FITC 500 µl, Mouse IgG1 κ, Klon 5E10 (5µl pro Test)	BioLegend, San Diego, USA
Anti-h/rOV-6 APC 1ml (100 test), Conjugated Mouse IgG (10µl pro test)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-hCD34, APC Conjugated Mouse IgG 500myl (5µl pro Tets)	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD184 (CXCR4)-APC human 1ml (10µl pro test)	MACS, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

2.1.9 Primer für quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Transkript	Forward/Reverse	Sequenz
CD90-9	For	ATCTCCTCCCAGAACGTC
	Rev	ATCTCTGCACTGGAAGTTG
CD34-7	For	CAACACCTAGTACCCTTGGAAGT
	Rev	ACTGTCGTTTCTGTGATGTTTGT
CXCR4-4	For	GAAGCTGTTGGCTGAAAAGG
	Rev	CAACCACCCACAAGTCATTG

Oct4-1	For	GAGGCAACCTGGAGAATTTG
	Rev	CGGTTACAGAACCACACTCG
Nanog-2	For	GAACTCTCCAACATCCTGAACC
	Rev	GCGTCACACCATTGCTATTC
AID-2	For	GCTGCATGAAAATTCAGTTCG
	Rev	CGAAATGCGTCTCGTAAGTC
AID-8	For	TAGTGAAGAGGCGTGACAGTG
	Rev	CAGCCGTTCTTATTGCGAAG
Albumin	For	TGCACAGAATCCTTGGTGAA
	Rev	TTCACGAGCTCAACAAGTGC
EpCAM	For	CGCAGCTCAGGAAGAATGTG
	Rev	TGAAGTACACTGGCATTGACG
AFP	For	GGTGGTGGATGAAACATATG
	Rev	TTGCTTTTGCTTCACAAGGTTAATGAG
c-myc	For	CGGTGCAGCCGTATTTCTAC
	Rev	CAGCAGCTCGAATTTCTTCC
ACTB	For	GCCCTGAGGCACTCTTCCA
	Rev	CGGATGTCCACGTCACACTTC

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeit

Die Basis der Versuche bilden die Zelllinien HuH6, bereitgestellt von Prof. Kappler der Abteilung für Kinderchirurgie am Universitätsklinikum München, sowie HepG2, bereitgestellt durch Elsie Opperman aus der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Diese Kulturen wachsen in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ Konzentration. Das Medium für die HepG2 Zellen besteht aus Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) + 0,01% L-GLU + 0,01% Penicillin-Streptomycin + 0,1% FBS, das Medium für die HuH6 Zellen aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 0,2% GlutaMAX und 0,2% Gentamycin Sulfate.

2.2.1.1 Umsetzen der Zellen

Bei Erreichen der vollständigen Konfluenz wurden die Zelllinien in neue 75-cm² Zellkulturflaschen passagiert. Dazu wurde zunächst das Nährmedium aus der Zellkulturflasche pipettiert. Zum Ablösen wurde 10 ml Accutase in die Flasche gegeben. Diese wurde für 10 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ Konzentration inkubiert. Nach Ablösung wurden die Zellen in neues Nährmedium gegeben, vereinzelt und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue Kulturflaschen übertragen.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Expression verschiedener Oberflächenproteine (CD90, CD34, CXCR4 und dem OV-6 Antigen) gemessen. Dazu wurden 1*10⁶ Zellen zunächst mit 1 ml FACS-Puffer (500ml PBS mit 2,5% BSA Rezept) gewaschen und anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die verwendeten Antikörper können der Materialliste entnommen werden. (2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie). Nach der Inkubation wurde mit 2ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und das Zellpellet jeweils in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen. Gemessen wurde mit FACS-Calibur mit einer Flowrate von 12, 35 oder

60 µL/min im „gating nach living cells“. Dabei wurden stets folgende Kombinationen gemessen:

1. Unsortierte unstained Zellsuspension
2. Unsortierte Zellsuspension IgG-FITC
3. Unsortierte Zellsuspension IgG-PE
4. Unsortierte Zellsuspension IgG-APC
5. Unsortierte Zellsuspension CD90-FITC
6. Unsortierte Zellsuspension CD34-PE
7. Unsortierte Zellsuspension CXCR4-APC oder OV-6-APC
8. Unsortierte Zellsuspension CD90-FITC, CD34-PE, CXCR4-APC oder OV-6-APC
9. CD90 reduzierte Zellsuspension CD90-FITC, CD34-PE, CXCR4-APC oder OV-6-APC
10. CD90 angereicherte Zellsuspension CD90-FITC, CD34-PE, CXCR4-APC oder OV-6-APC

2.2.3 Magnetic activated cell sorting (MACS)

Zur Anreicherung von einer CD90 positiven Subpopulation wurden CD90 Mikrobeads von MACS Miltenyi Biotec verwendet. Zunächst wurde bei ungefähr $6 \cdot 10^7$ Zellen aus den Kulturflaschen das Medium abpipettiert und die Flaschen mit jeweils 10 ml Accutase bei 37 ° und 5% CO₂ Konzentration für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium abgelöst und in zwei 50 ml Falcon Röhren überführt. Diese wurde für 5 min bei 1200 Umdrehungen und 4° C zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert. Die Zellpellets wurden in 10 ml MACS-Puffer in ein 50 ml Falcon Tube aufgenommen, davon wurden 10 µl in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen mit 90 µl Tyrosinblau gemischt. Um die Zellzahl zu bestimmen wurden 10 µl davon auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellen in 4*16 Quadranten am Lichtmikroskop ausgezählt. Bei der Zählung wurden nur lebende Zellen berücksichtigt. Aus dem Durchschnittswert der vitalen Zellen wurde die Gesamtzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzahl} = n_{(\text{durchschnittliche Zellzahl der vier Quadranten})} * 10^4 *$$

$$F_{1(\text{Verdünnungsfaktor im Trypanblau})} * F_{2(\text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension})}$$

$3 \cdot 10^7$ Zellen wurden abgenommen und in 3 Falcon Tubes (je $1 \cdot 10^7$ Zellen) für 15 Minuten mit 20 µl CD90 Mikrobeads in 80 µl MACS-Puffer bei 4-8° im Dunkeln inku-

biert. Anschließend wurden die Zellen mit je 2 ml MACS-Puffer gewaschen und die Zellpellets jeweils in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. 3 MS Columns wurden mit 500 µl MACS-Puffer durchspült und in eine magnetische Halterung gestellt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend auf die Säule gegeben und der Durchfluss wurde als CD90 depletierte Subpopulation aufgefangen. Die Säule wurden daraufhin 3 mal mit je 500 µl MACS-Puffer gespült und der Auswurf wurde verworfen. Letztendlich wurden die Säulen aus der Halterung genommen, mit je 1 ml MACS-Puffer aufgefüllt. Der Inhalt der Säulen wurde unter Stempeldruck in ein Falcon Tube überführt. Diese Zellen ergaben die CD90 angereicherte Subpopulation.

2.2.4 RNA-Gewinnung

Die RNA wurde mittels des Extractme total RNA Kit von BioScience gewonnen. Dazu wurden maximal 1×10^7 Zellen herunterzentrifugiert und das Pellet für die RNA Gewinnung verwendet. Dieses wurde mit 600 µl Rlyse Puffer und 20 µl AF Reagent für 60 Sekunden mit dem Vortex vermengt und anschließend für 120 Sekunden bei 12000 x g in einem RNase freien 2ml Eppendorftube zentrifugiert. Anschließend wurde der Überschuss abgenommen und zu dem Pellet 600 µl 70% Ethanol hinzugegeben und mittels Pipette gut vermischt. 700 µl der Mischung wurden auf eine RNA Purification Säule gegeben, welche auf ein Collectiontube gesetzt wurde. Beides wurde zusammengesetzt für 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überschuss aus der Collectiontube wurde abgekippt und die Purificationsäule erneut aufgesetzt. Die restliche Zellmischung wurde in die Purificationsäule gegeben, diese erneut für 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und der Überschuss abgekippt. Auf die Purification Säule wurden dann 700 µl RW1 Puffer gegeben, und erneut für 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert. Nach abkippen des Überschusses wurden 500 µl RW2 Puffer zur Purification Säule gegeben, wieder für 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und der Überschuss abgekippt. Der letzte Schritt wurde wiederholt und anschließend die Purifikationsäule im Collectionstube für 90 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert. Die Purificationsäule wurde anschließend auf ein steriles RNase freies 1,5 ml Eppendorfröhrchen gesetzt. Es wurden 100 µl Lösepuffer REB auf die Säule gegeben und für 2 Minuten gewartet. Anschließend wurde das Röhrchen für 60 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und der Abstand, welcher die isolierte RNA enthielt, bei -80° für die weiteren Versuche eingefroren.

2.2.5 Herstellung von komplementärer DNA

In einem ersten Schritt wurden die RNA Konzentrationen der Proben photometrisch gemessen. Dafür wurden jeweils 3 µl der Probe abgenommen und die RNA-Konzentration gemessen. Anschließend wurde die cDNA mittels des iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad) hergestellt. Hierzu wurde zunächst das Reaktionsgemisch angesetzt. Ein Ansatz bestand aus je 4 µl iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase 1 µg RNA und wurde mit nucleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde nach dem Reaktionsprotokoll folgendermaßen inkubiert: 5min bei 25°C, 20min bei 46°C, 1 Minute bei 95°C und letztendlich bei 4°C gehalten.

2.2.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Mittels quantitativer „Polymerase Chain Reaction“ wurde die Expression von CD90, CD34, CXCR4, Oct4, Nanog, AID, Albumin, EpCAM, c-myc und AFP gemessen. Es wurde für die PCR ein Reaktionsansatz aus je 10 µl SYBR Green, 1 µl Forward Primer, 1 µl Reverse Primer und 6 µl Wasser erstellt. Die verwendeten Primer können der Materialliste entnommen werden. (2.1.9 Primer für quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion) Mit Hilfe des Extractme total RNA kit wurde die RNA aus den Zellen nach Herstellerprotokoll gewonnen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Anschließend wurde aus dieser cDNA mit Hilfe des iScripts cDNA Synthesis Kit erzeugt. Die PCR Röhrchen mit je 18 µl Supermix und 2 µl cDNA befüllt. Für jeden Primer wurden negative Kontrollen mit 2 µl Wasser anstelle der cDNA befüllt. Die qPCR wurde mit der qPCR-Maschine Stratagene Mx3005P durchgeführt. Nach der initialen Denaturierung erfolgten 40 Zyklen nach dem in der Tabelle 1 dargestelltem Schema. Zur Auswertung wurde zunächst der Mittelwert zweier Experimentdurchführungen bestimmt und die Dissoziationskurven wurden kontrolliert. Somit konnte sichergestellt werden, dass nur ein PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Segment 1 (1x)	Segment 2 (40x) (Messung je Zyklus)	Segment 3 (1x) (Generierung der Schmelzkurve)
10min bei 95°C	30sek bei 95°C 30sek bei 60°C	1min bei 95°C 30sek bei 60°C 30sek bei 95°C

Tabelle 1: Reaktionsschema in qPCR

Zur Berechnung der relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta CT$ Methode verwendet. Dabei wurde neben den Expressionen der ausgewählten Kandidaten ebenfalls die Expression von ACTB als House keeping-/ oder Referenzgen bestimmt. In der Auswertung wurde zunächst der CT Wert (cycle threshold) des Referenzgens von dem CT Wert der einzelnen Probe abgezogen, um den ΔCT Wert der Probe zu erhalten. Auf dieselbe Weise wurde der ΔCT Wert der Kontrollprobe (hier RNase freies Wasser) bestimmt. Anschließend wurde der ΔCT Wert der Kontrolle von dem ΔCT Wert der Probe abgezogen. Im letzten Schritt wurde die Ratio als Zweierpotenz mit dem negativen $\Delta\Delta CT$ Wert berechnet, um somit den relativen Expressionsunterschied zwischen Probe und Kontrolle, angeglichen mit dem Referenzgen, zu erhalten. Diese Methode diente dem Eliminieren von Verfahrensfehlern.

$$Ratio = 2^{-((CT\ Zielgen - CT\ Referenzgen) - (CT\ Kontrollgen - CT\ Referenzgen))}$$

$$\Delta CT = CT(Probe) - CT(Referenz)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(Probe) - \Delta CT(Kontrolle)$$

$$Ratio = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

2.2.7 Migrations Assay

Für den Migrationsassay mit HuH6 Zellen wurde auf eine 6-Well Platte 2 ml DMEM Medium mit 10% FBS in jedes Well gegeben. Anschließend wurden Filter mit einer 8,0 µm Porengröße auf den gefüllten Wells verteilt. In diese Filter wurden vorsichtig je 50000 Zellen in 2 ml Nähmedium ohne FBS gegeben. Die 6-Well Platte wurde für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO² Konzentration inkubiert (Abbildung 1).

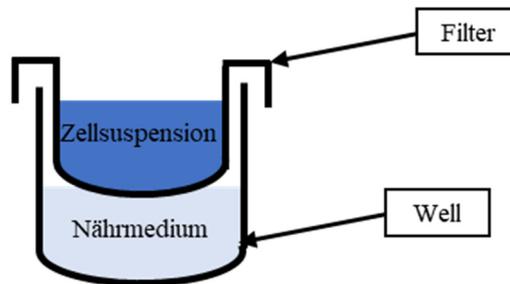


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Migrationsassay Aufbaus

Nach der Inkubation wurde eine neue 6-Well Platte beschriftet und mit 2ml Glutaraldehyd (2%) pro Well im Dunkeln gefüllt. Anschließend wurden die Filter mit den Zellen zweimal mit 2 ml PBS (mit Ca+Mg) gewaschen und in die Wells mit Glutaraldehyd gehängt und für 10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die erste 6-Wellplatte, aus der die Filter mit den Zellen entnommen wurden, wurden bis zur Auszählung im Inkubator bei 37 °C und 5% CO² Konzentration inkubiert. Währenddessen wurde Hämatoxylin gefiltert. Nach der Inkubation wurden die Filter umgedreht, 2 mal in einer Schale mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend auf die Seite gedreht, in ein Behältnis mit Hämatoxylin für 10 Minuten gefärbt. Währenddessen wurden die 6-Wellplatte mit PBS (mit Ca+Mg) von Glutaraldehyd gereinigt und mit 2 ml PBS pro Well befüllt. Anschließend wurden die Filter unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut und ausgewaschen. Die ausgewaschenen Filter wurden erneut umgedreht in die Schale mit demineralisiertem Wasser gestellt. Mit einem Wattestäbchen wurden vorsichtig die nicht-migrierten Zellen oben im Filter entfernt. Zur Auswertung wurden die Filter in die mit PBS gefüllte 6-Wellplatte gestellt und je 2 ml PBS (mit Ca+Mg) auf die Filter gegeben. Anschließend wurde unter dem Lichtmikroskop (10facher Vergrößerung) die Zellzahl pro 0,25mm² im Filter und auf der inkubierten Platte bestimmt.

2.2.8 Tumor Sphäroid Assay

Als Erstes wurde das Medium angesetzt. Für einen Ansatz für 50 Wells a 1ml wurden zu 50ml DMEM Medium je 2% B27, 0,002% EGF, 0,002% FGF und 1% N2 gegeben. Anschließend wurden HepG2 Zellen in das neu angesetzte Medium überführt und auf 24 Well ultra-low attachment Platten aufgetragen, sodass jedes Well 5000 Zellen in 1 ml Medium enthielt. Die Ausplattierung wurde lichtmikroskopisch dokumentiert. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert. Am ersten, vierten und siebten Tag der Inkubation wurde das Wachstum der Zellen mit dem Lichtmikroskop dokumentiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen von 12 Wells entnommen und die RNA aus diesen gewonnen. Die restlichen Wells wurden passagiert (Tabelle 2). Dazu wurden die Zellen zunächst in 600 µl Accutase für 5 Minuten in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5% CO² Konzentration inkubiert. Anschließend wurde die Accutase vorsichtig abzentrifugiert, durch mehrmaliges Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und mit je 1ml neu angesetztem Medium in neue 24 Well Tumor Sphäroid Platten ausplattiert. In dem Versuchsaufbau wurden die Zellen maximal 3-mal passagiert und dabei die veränderte Expression verschiedener Gene mit quantitativer PCR bestimmt.

	Tag 0	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Passage 0 (P0)	Ausplattieren	Kontrolle	Kontrolle	Entnahme von 12 Wells und Passagierung
Passage 1 (P1)	Ausplattieren der passagierten Zellen	Kontrolle	Kontrolle	Entnahme von 12 Wells und Passagierung
Passage 2 (P2)	Ausplattieren der passagierten Zellen	Kontrolle	Kontrolle	Entnahme von 12 Wells und Passagierung
Passage 3 (P3)	Ausplattieren der passagierten Zellen	Kontrolle	Kontrolle	Entnahme von 12 Wells

Tabelle 2: Passagierungsschema des Tumor Sphäroid Assay

2.2.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten, gewonnen nach qPCR, wurde ein Wilcoxon Test durchgeführt. Dieser wird zur Analyse nicht normalverteilter Datensätze verwendet.⁴⁸ Hierbei wurde mit dem Programm BiAS (espilon Verlag) gearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 FACS-Analyse

Mittels FACS-Analysen konnte in HuH6 und HepG2 Zellen die Expression von den Oberflächenmarkern CD90, CD34 und CXCR4 und ein positives Signal mit dem OV-6-Antikörper nachgewiesen werden, welches Keratin 14 und 19 erkennt (zur Vereinfachung zukünftig OV-6-Antigen genannt, Abbildung 2). Negativkontrollen wurden mit IgG Isotypen gefärbt, welche mit den Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Bei den HuH6 Zellen war die Expression von CXCR4 am höchsten mit 61,96%, die Expression der anderen Oberflächenproteine lag für CD90 durchschnittlich bei 16,2% für CD34 bei 17,8% und für das OV-6-Antigen bei 20,17% (Abbildung 2). In der HepG2 Zelllinie war die Expressionsrate der Oberflächenantigene meist geringer als bei den HuH6 Zellen, so lag sie für CD90 bei 6,75% für CD34 bei 6,61% für CXCR4 bei 7,7% und bei dem OV-6-Antigen bei 8,24% (Abbildung 3).

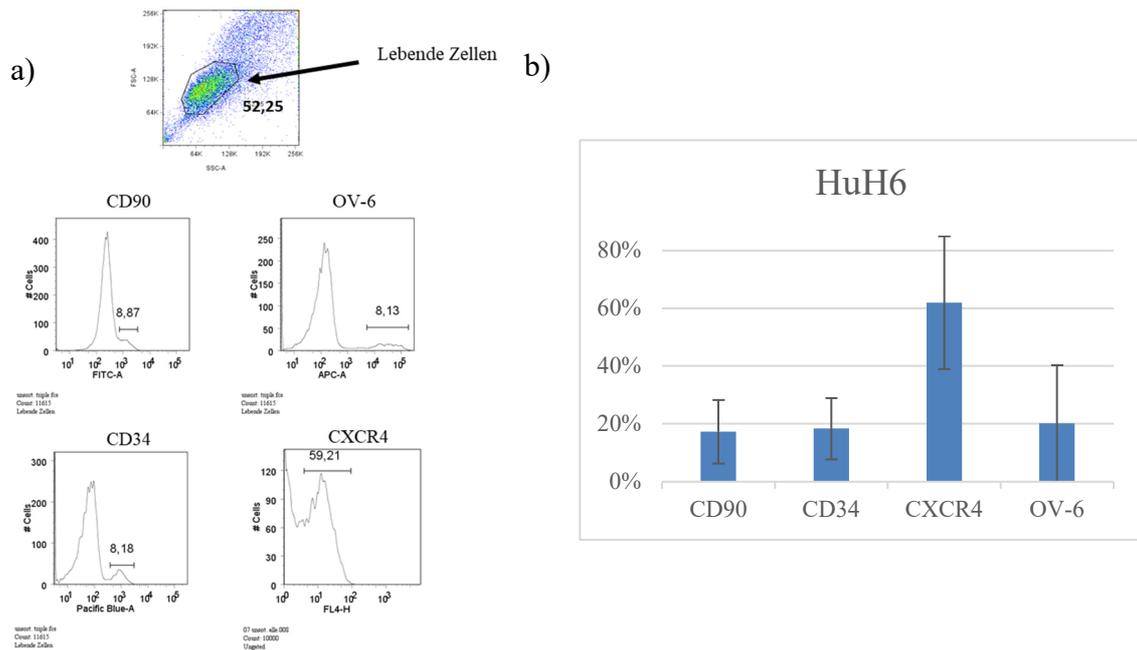


Abbildung 2: a) Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen, gefärbt mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC, CD34-BV421 und in einer unabhängigen Analyse mit CXCR4-APC

Das Gating erfolgte nach Abgleichen mit der jeweiligen IgG-Kontrollgruppe. b) Durchschnittliche Expressionsrate von CD90(n=15), CD34(n=18), CXCR4 (n=18) und dem OV-6-Antigen (n=4) bei HuH6 Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

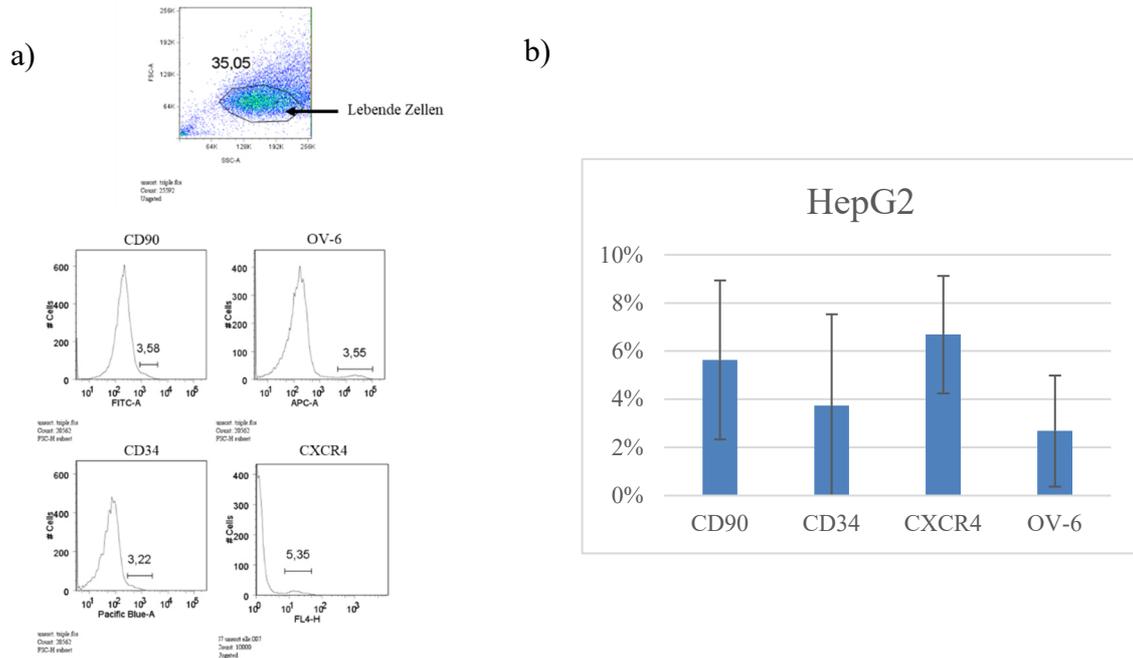


Abbildung 3: a) Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen, gefärbt mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC, CD34-BV421 und in einer unabhängigen Analyse mit CXCR4-APC

Das Gating erfolgte nach Abgleichen mit der IgG-Kontrollgruppe. b) Durchschnittliche Expressionsrate von CD90(n=16), CD34(n=16), CXCR4 (n=5) und dem OV-6-Antigen (n=11) bei HepG2 Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

In einem nächsten Schritt wurden HuH6 und HepG2 Zellen gleichzeitig mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC und CD34-BV421 inkubiert. In der FACS Analyse wurden zwei Marker gegeneinander aufgetragen und die Expression eines dritten Markers in dem doppelt positiven und dem doppelt negativen Quadranten gemessen (Abbildung 4, Abbildung 5). Es zeigte sich, dass die Expression des dritten Markers in dem doppelt positiven Quadranten in beiden Zelllinien fast bei 100% liegt. Währenddessen liegt die Expression des dritten Markers jeweils in dem doppelt negativen Quadranten, bis auf die Expression von CXCR4, fast bei 0%. Somit ist davon auszugehen, dass es nicht nur in beiden Zelllinien eine Zellpopulation gibt, welche diese Oberflächenproteine koexprimieren, sondern auch, dass diese Oberflächenproteine nur von dieser Zellpopulation stets zusammen exprimiert werden. Eine Ausnahme dazu bildet CXCR4, welches von HuH6 Zellen generell stärker exprimiert wird und sich, wenn auch in geringerer Menge, auch auf HuH6 Zellen befindet, welche kein oder wenig CD90 oder CD34 exprimieren (Abbildung 4). Aufgrund seiner im Vergleich hohen Expression haben wir CXCR4 in den weiteren Experimenten ausgeschlossen.

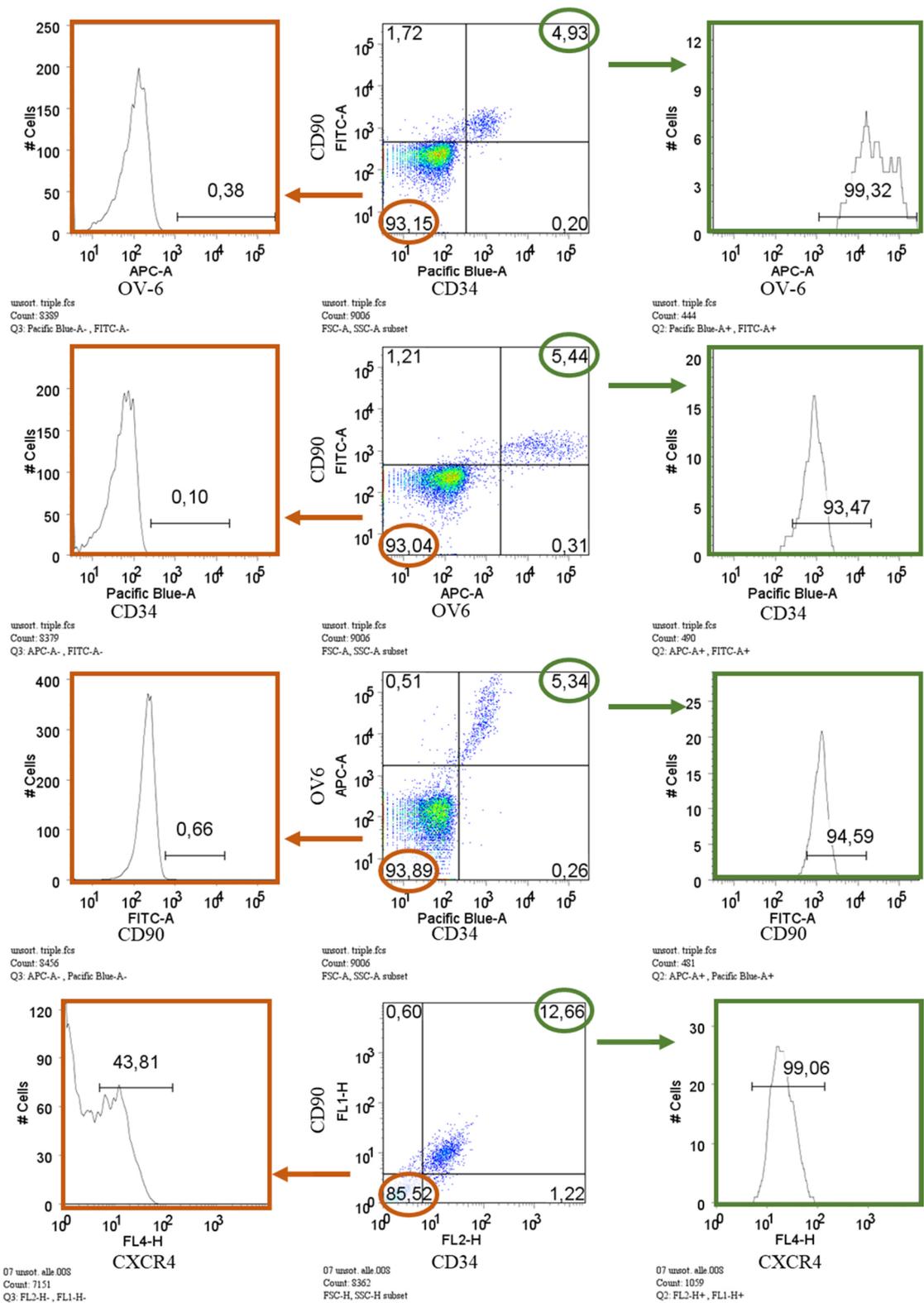


Abbildung 4: Dreifach Färbung von HuH6 Zellen mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC und CD34-BV42

In der Analyse wurden jeweils 2 Marker im 4 Quadranten-Model gegeneinander aufgetragen und die Expression des dritten Markers in dem doppelt positiven und dem doppelt negativen Quadranten bestimmt. Das Gating erfolgte nach Abgleichen mit der IgG-Kontrollgruppe.

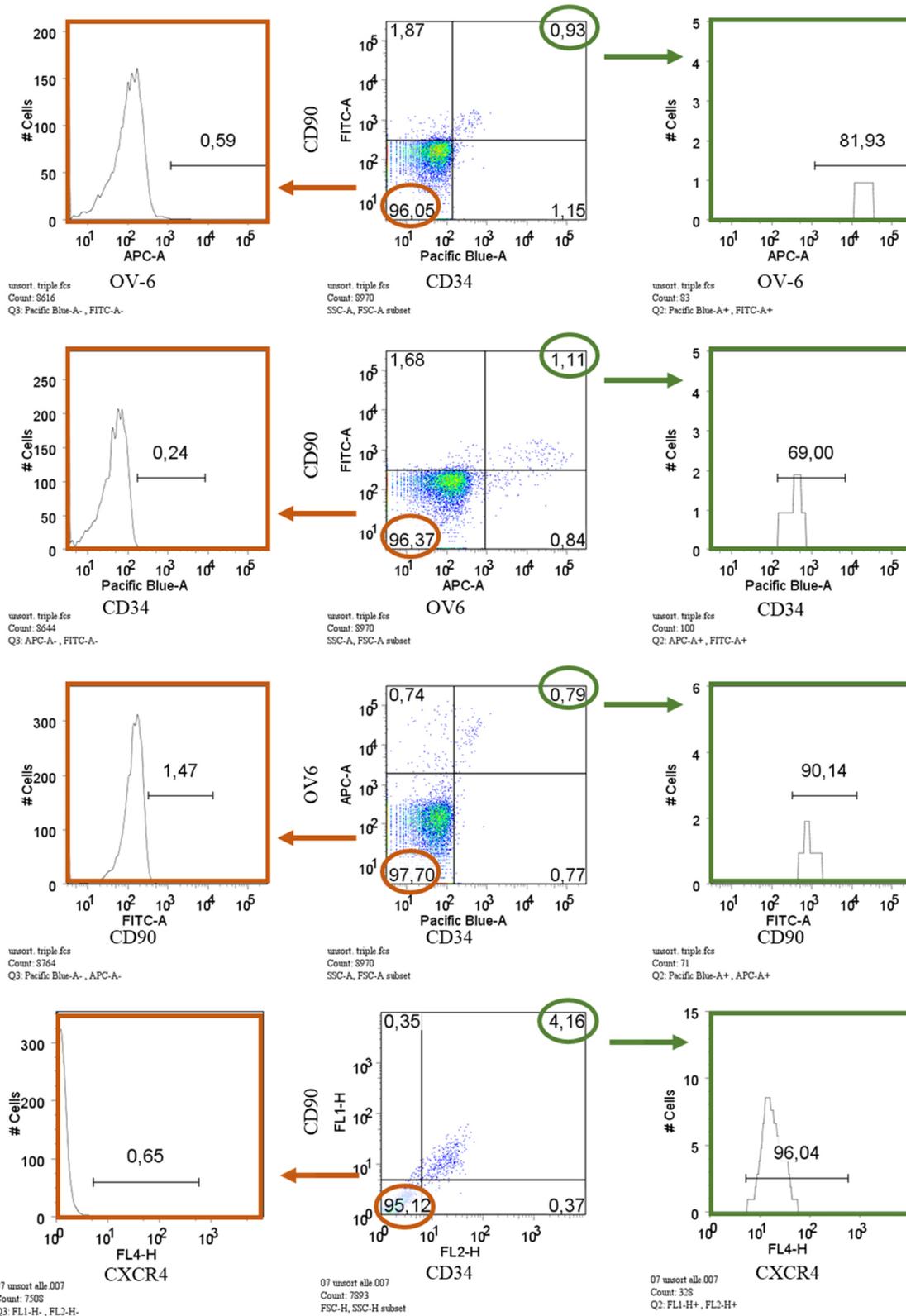


Abbildung 5: Dreifach Färbung von HepG2 Zellen mit den Antikörpern CD90-FITC, OV-6-APC und CD34-BV42

In der Analyse wurden jeweils 2 Marker im 4 Quadranten-Model gegeneinander aufgetragen und die Expression des dritten Markers, in dem doppelt positiven und dem doppelt negativen Quadranten bestimmt. Das Gating erfolgte nach Abgleichen mit der IgG-Kontrollgruppe.

3.2 FACS-Analyse von mittels MACS aufgetrennter HuH6 Zellen

Durch die MACS (magnetic activated cell sorting) Technik wurden die Zellen in eine CD90 angereicherte und eine CD90 depletierte Subpopulation magnetisch aufgetrennt. Die CD90 angereicherten und depletierten Zellen wurden anschließend mit Durchflusszytometrie auf die Expression von CD90, CD34 und dem OV-6-Antigen untersucht (Abbildung 6). Es sollte dargestellt werden, ob bei einer Sortierung nach einem Stammzellmarker, die anderen Stammzellmarker sich ähnlich verteilen. Wie zuvor beobachtet, bestätigten die CD90-MACS-Anreicherungen die Ko-Expression von CD90, CD34 und dem OV-6-Antigen, da die CD90-angereicherte Zellpopulation auch eine erhöhte Expression von CD34 und dem OV-6-Antigen aufwies. Bei einer durchschnittlichen Anreicherung für CD90 auf 54,4% bei HuH6 Zellen lag die Expression von CD34 bei 55,25%, von dem OV-6-Antigen bei 43,33%. Somit konnte eine CD90⁺ CD34⁺ OV-6-Antigen⁺ Zellpopulation mittels MACS Technik angereichert werden. Dahingegen exprimierten in der CD90 depletierten Subpopulation durchschnittlich 14,66% der Zellen CD90 und dementsprechend 15,63% CD34 und 15,52% das OV-6-Antigen (Abbildung 7), weshalb im Vergleich zu den Zellen vor Auftrennung mit MACS Technik nicht von einer wahren Depletion gesprochen werden kann. Auch in Auftrennungen mit CD34 MACS, sowie OV-6 MACS zeigten sich in den angereicherten Zellpopulationen ebenfalls vermehrt Zellen mit CD90, CD34 und dem OV-6 Oberflächenantigen (Abbildung 8). Tendenziell zeigten beide MACS Auftrennungen geringere Anreicherungen.

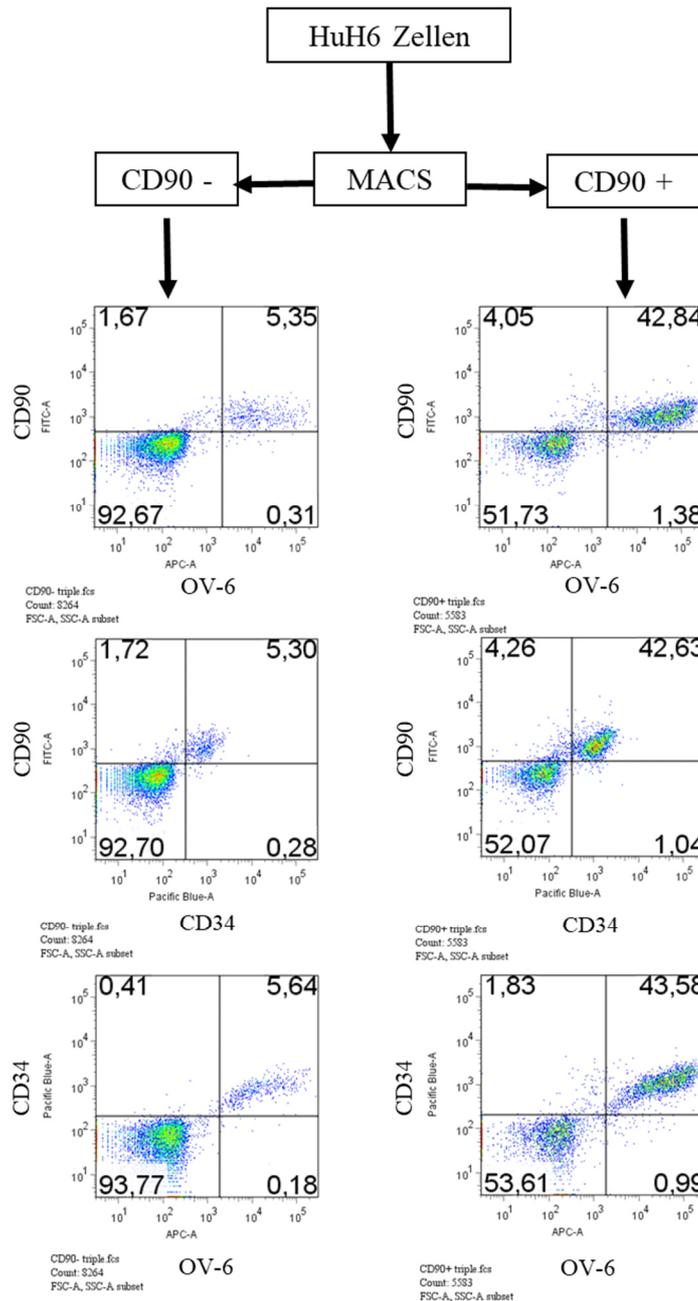
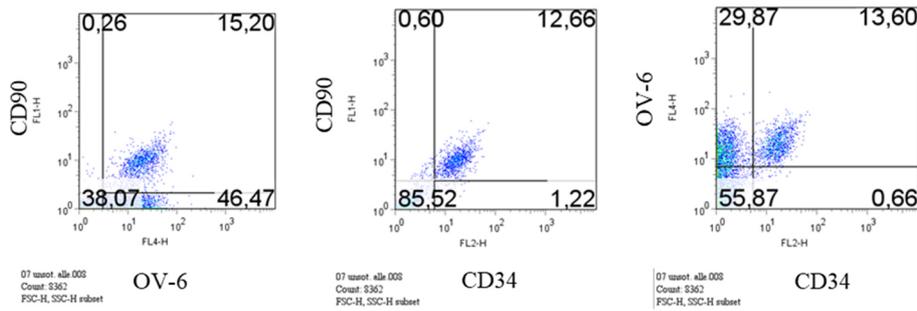


Abbildung 6: Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern

Durch die MACS Technik wurden die Zellen in eine CD90 angereicherte und eine CD90 depletierte Subgruppe aufgetrennt.

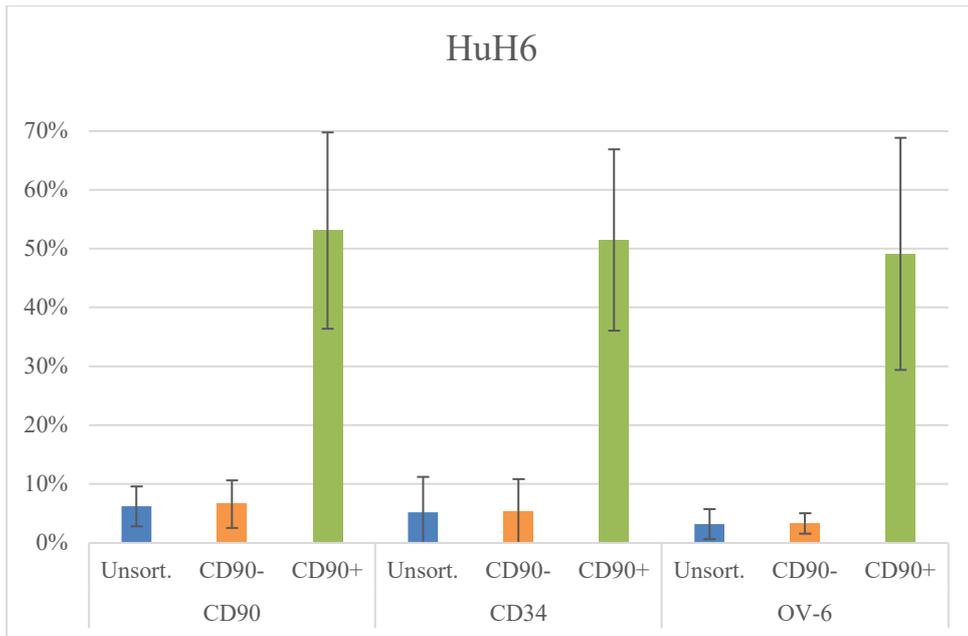


Abbildung 7: Mit FACS ermittelte Expressionsrate von CD90 (n=15), CD34 (n=16) und dem OV-6-Antigen (n=3) bei einer unsortierten Kontrollgruppe (blauer Balken), CD90-depletierten (orangener Balken) und CD90-angereicherten Fraktion (grüner Balken) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

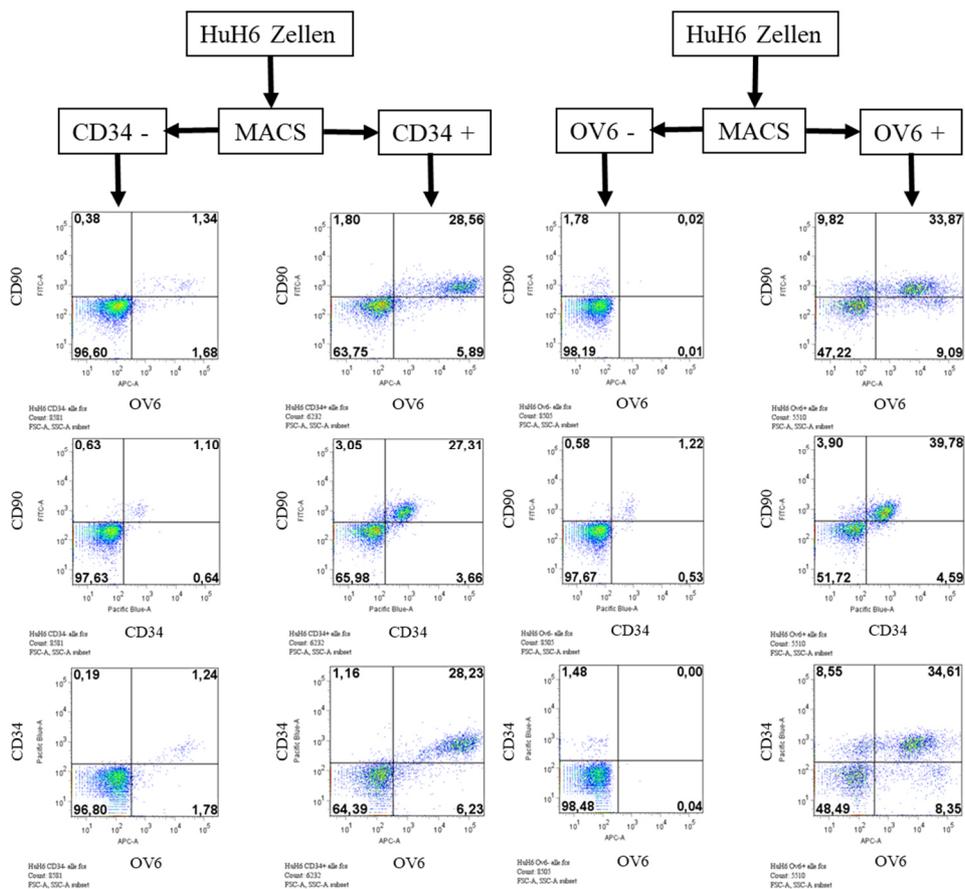


Abbildung 8: Exemplarische FACS Analyse von HuH6 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern

Die Zellen wurden mit CD34 und OV-6 Mikrobeads inkubiert und in eine angereicherte und depletierten Gruppe aufgetrennt.

3.3 FACS-Analyse von mittels MACS aufgetrennter HepG2 Zellen

Die mit CD90 Mikrobeads aufgetrennten HepG2 Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse, wie die HuH6 Zellen (Abbildung 9). Auch hier wurden die Zellen mittels der MACS-Technik in eine CD90 angereicherte und eine CD90 depletierte Fraktion aufgeteilt, um die Verteilung der anderen Oberflächenmarker zu ermitteln. So exprimierten nach der Auftrennung die angereicherten Zellen durchschnittlich 53,11% der Zellen CD90, 51,5% der Zellen CD34 und 49,14% OV-6-Antigen (Abbildung 10). Die CD90 depletierten Zellen unterschieden sich hingegen nicht von den unsortierten Zellen. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass dies auch auf eine Auftrennung mit CD34 und OV-6 Mikrobeads zutrifft (Abbildung 11).

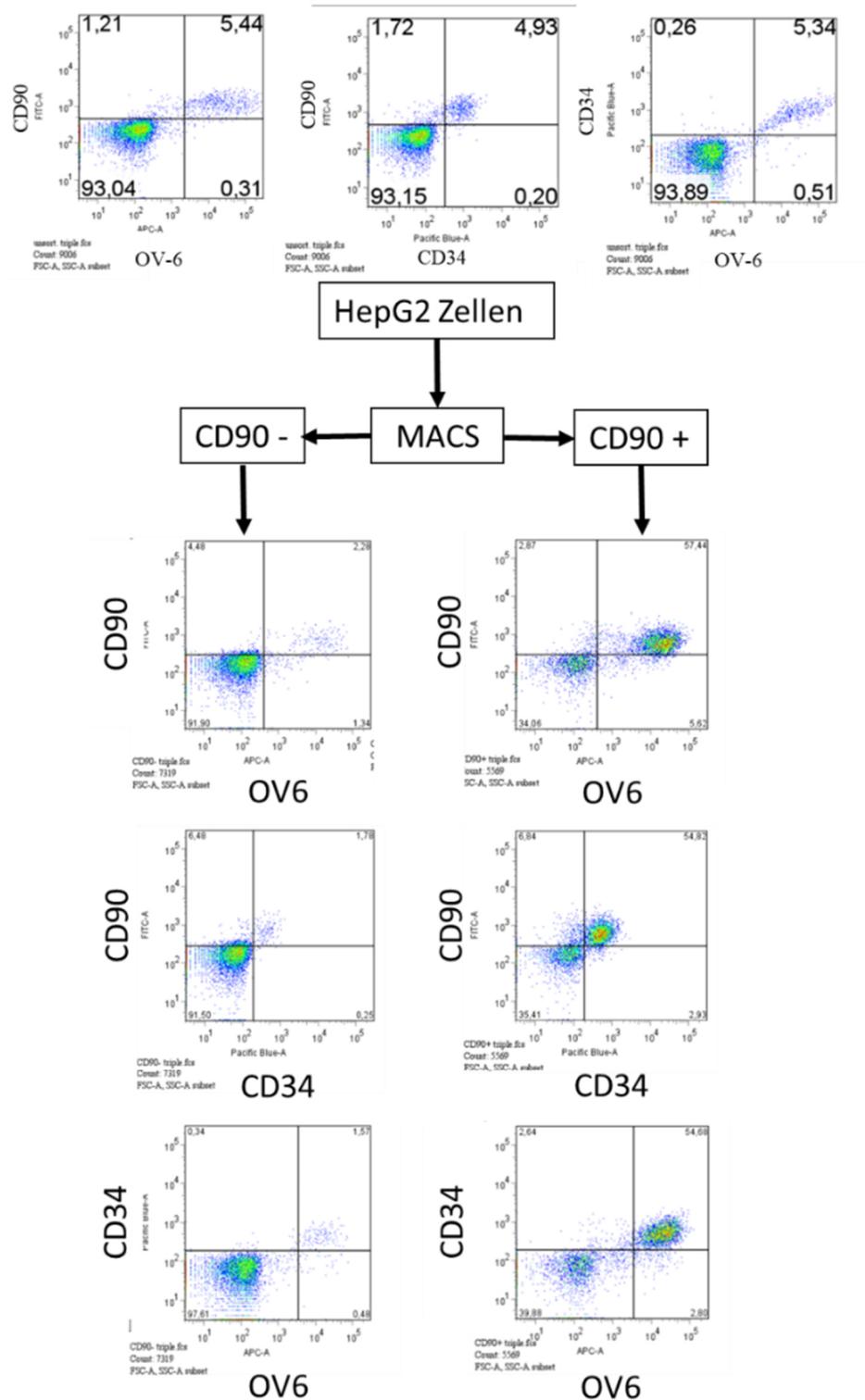


Abbildung 9: Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern

Durch die MACS Technik wurden die Zellen in eine CD90 angereicherte und eine CD90 depletierte Subgruppe aufgetrennt.

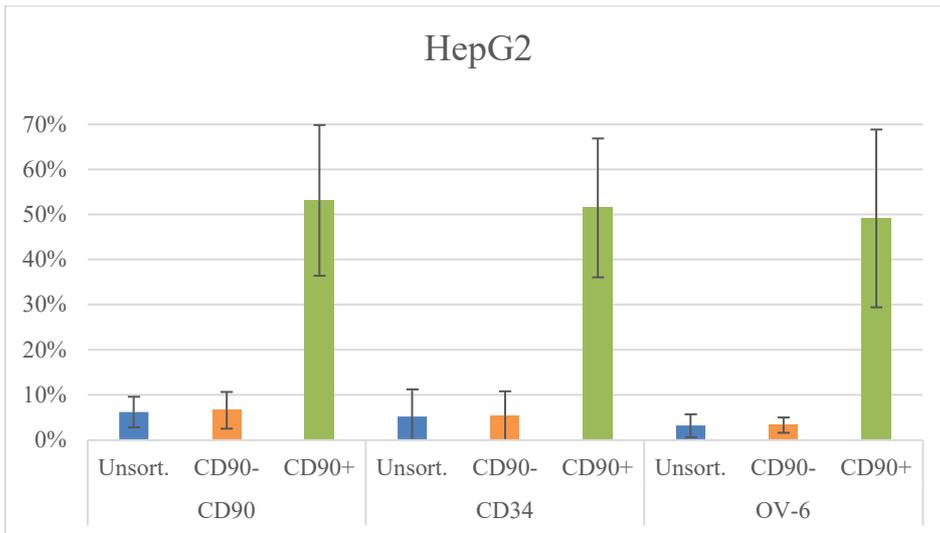


Abbildung 10: Mittels FACS ermittelte Expressionsrate von CD90 (n=16), CD34 (n=6) und OV-6 (n=3) bei einer unsortierten Kontrollgruppe (blauer Balken), CD90-depletierten (orangener Balken) und CD90-angereicherten Fraktion (grüner Balken)
 Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

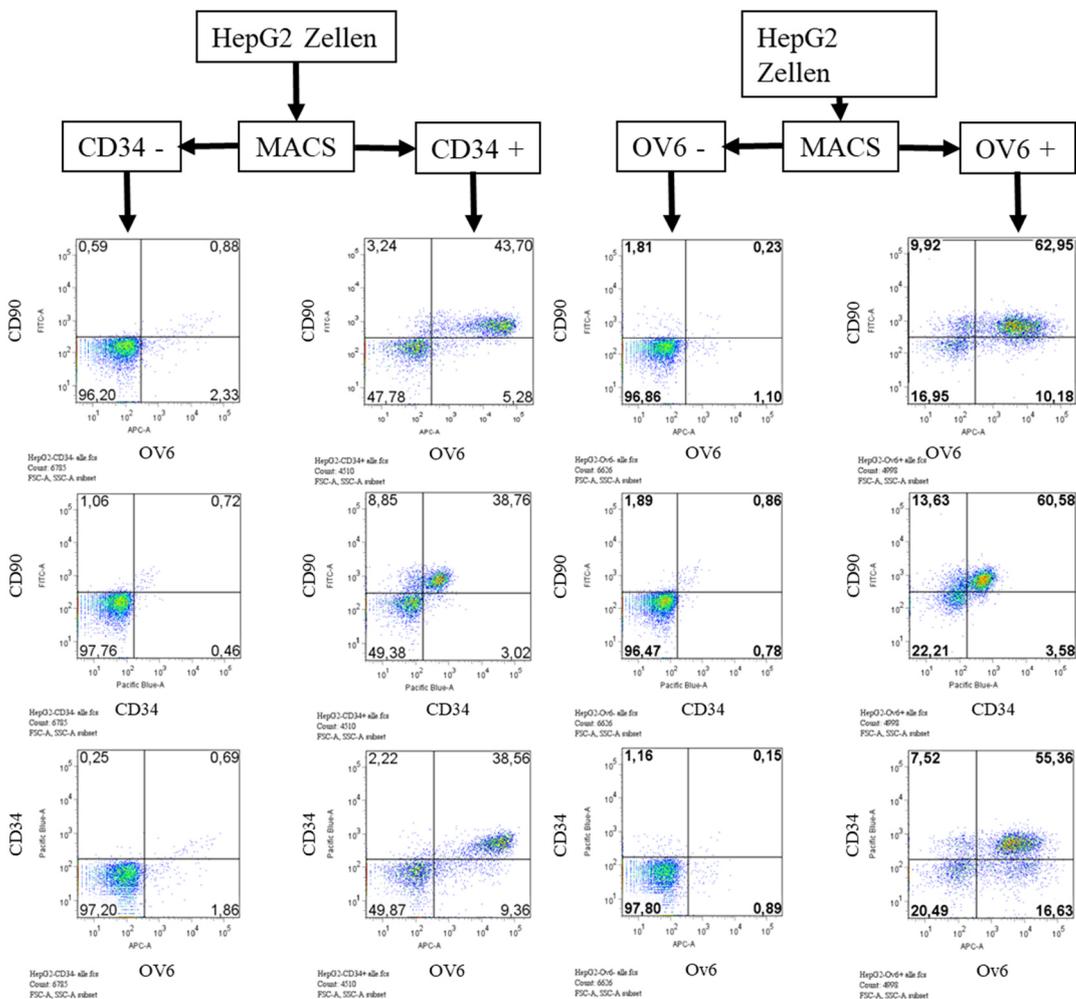


Abbildung 11: Exemplarische FACS Analyse von HepG2 Zellen gefärbt mit CD90, CD34 und OV-6 Antikörpern
 Die Zellen wurden mit CD34 und OV-6 Mikrobeads inkubiert und durch die MACS Technik in eine angereicherte und depletierte Gruppe aufgetrennt.

3.4 qPCR von mittels MACS aufgetrennter HuH6 Zellen

Um das Stammzell-Profil dieser CD90⁺ CD34⁺ OV-6-Antigen⁺ Zellpopulation näher zu bestimmen, wurden CD90 angereicherte und depletierte HuH6 Zellen in einer quantitativen PCR auf ihre Expression von Oct4, Nanog, AID, Albumin, EpCAM, c-myc und AFP gemessen (Abbildung 12). Oct 4 und Nanog sind Pluripotenzmarker, während AID eine epigenetische Rolle bei der Aktivierung dieser spielt. Als Kontrolle wurde die Expression des Syntheseproduktes adulter Leberzellen Albumin und des Weiteren auch von dem Oberflächenprotein EpCAM gemessen, das von hepatischen Vorläuferzellen und zu 100% auf HuH6 exprimiert wird. Zusätzlich wurde die Expression von dem Onkogen c-myc und diese von AFP bestimmt. AFP wird im klinischen Alltag zum Staging und Diagnosefindung von Hepatoblastomen verwendet. Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta CT$ Formel verwendet. Dabei wurde neben den Expressionen der ausgewählten Kandidaten in Form der CT Werte (cycle threshold) und ebenfalls die Expression des Haushaltsgen β -Actin (ACTB) als Referenzgen zunächst bestimmt und in die Formel eingesetzt.

Letztendlich wurden die berechneten Expression-Werte der CD90 depletierten Subpopulation jeweils als Ausgangswert bestimmt und ein Wilcoxon-Test auf eine mögliche Signifikanz durchgeführt. Die CD90 angereicherte Subpopulation zeigt eine verstärkte Expression von Oct4, Nanog und AID, während die Expression von Albumin, c-myc und AFP weniger erhöht und von EpCAM ähnlich ist im Vergleich zur depletierten Subpopulation. Nach statistischer Berechnung zeigte sich eine signifikant verstärkte Expression von Oct4, AID sowie AFP, wohingegen die Expression von Nanog, Albumin, EpCAM und c-myc sich in der angereicherten Fraktion nicht signifikant verstärkt zeigte.

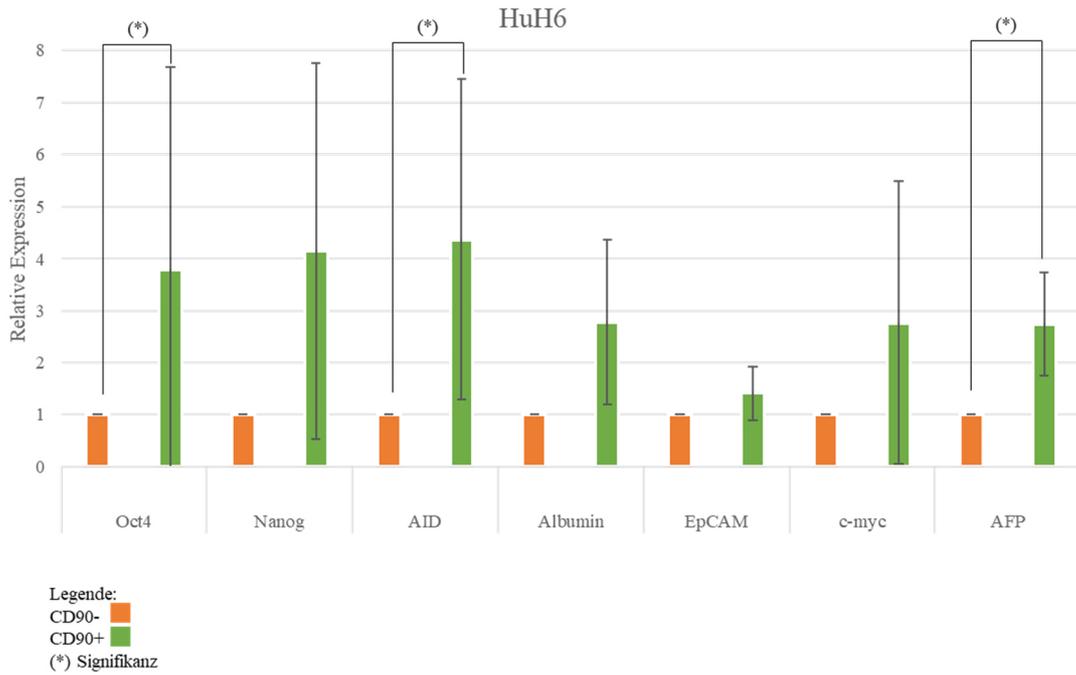


Abbildung 12: Mittels qPCR gemessene relative Expression von Oct4, Nanog, AID, Albumin, EpCAM, c-myc und AFP in CD90 angereicherten und depletierten HuH6 Zellen
 Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5). Es wurde ein Wilcoxon Test durchgeführt, die Sternchen (*) markieren eine signifikant erhöhte Expression der angereicherten Fraktion.

3.5 Migrationsassay

Zur weiteren Charakterisierung der dreifach positiven Zellen wurden die mittels MACS-Technik CD90 angereicherten und depletierten Zellsubgruppen in einem Migrationsassay analysiert. Dieser dient der Untersuchung von Migrationsverhalten von Zellen, um letztendlich Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten zu ziehen. Dafür wurde 24 Stunden nach Ausplattieren von Zellen mit einer bestimmten Zellzahl auf einen Filter die Anzahl der durchschnittlich durch den Filter gewanderten Zellen von CD90 depletierten und angereicherten HuH6 Zellen mit einer unsortierten Population ins Verhältnis gesetzt. Im Durchschnitt durchwanderten 10,6 Zellen der unsortierten HuH6 Zellen pro 0,25mm² den Filter in die Platte. Bei den CD90 depletierten Zellen waren dies 5,93 Zellen pro 0,25mm², somit 63% im Verhältnis zu den Unsortierten. Währenddessen durchwanderten durchschnittlich 17,8 Zellen pro 0,25mm² der CD90 angereicherten Subgruppe den Filter, somit also 155% im Verhältnis zu den unsortierten Zellen (Abbildung 13). Zusammengefasst wanderten deutlich mehr Zellen der CD90-angereicherten Fraktion durch den Filter und zeigten somit ein erhöhtes Migrationsverhalten.

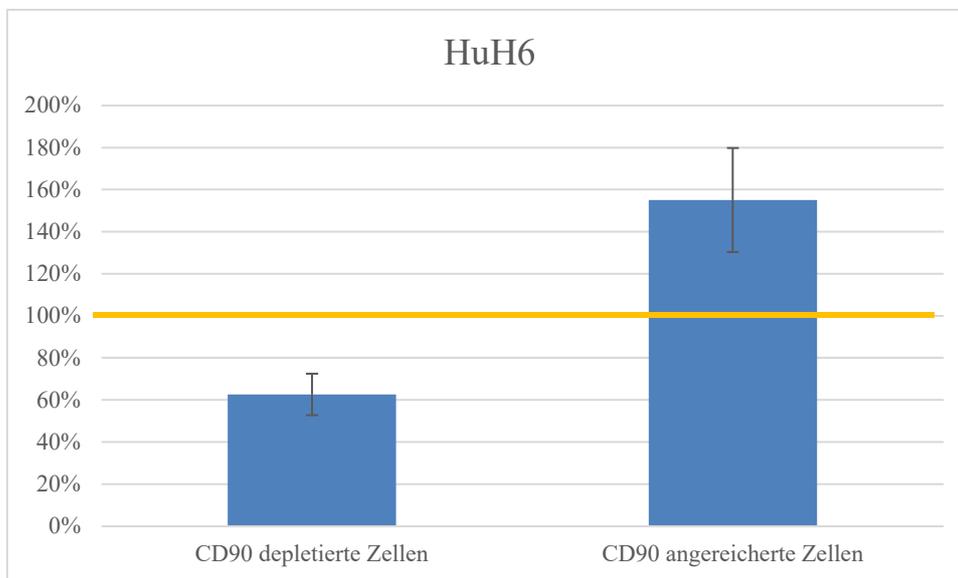


Abbildung 13: Verhältnis der durchgewanderten HuH6 Zellen im Migrationsassay
Der Versuch wurde mit CD90 angereicherten und CD90 depletierten HuH6 Zellen durchgeführt und mit einer unsortierten Gruppe (gelbe Linie) ins Verhältnis gesetzt (n=3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

3.6 Tumor Sphäroid Assay

Mit HepG2 Zellen wurden Tumor Sphäroid Assays durchgeführt, um die Fähigkeit der Zellen zur Sphäroid-Bildung zu testen. Sphäroide können sich aus Krebsstammzellen bilden, die in der Lage sind in serumfreiem Medium, welches mit bestimmten Wachstumsfaktoren versetzt ist, auf sogenannten low attachment Platten zu wachsen. Andere Tumorzellen sind nicht in der Lage unter diesen Umständen zu überleben. Die Ergebnisse zeigten, dass meist ab dem zweiten Tag nach Ansatz ein Sphäroid-Wachstum beobachtet werden konnte. Innerhalb von 7 Tagen wuchsen die Tumorsphäroide und einzelne Zellen wurden seltener. Daraufhin erfolgte jeweils eine Passagierung der Zellen, um die Sphäroid-Formation aufzulösen und die Krebsstammzellen zu isolieren. Die isolierten Zellen wurden in frischen low attachment Platten erneut ausgesetzt. Nach mehr-tägiger Inkubation zeigten die Zellen erneut das Wachstum in Tumorsphäroide. Insgesamt schien es, als würde vor allem die Zelldichte und nicht so sehr die Größe der einzelnen Tumorsphäroides von Passagierung zu Passagierung zunehmen. So konnte man an Tag 7 nach der 3. Passagierung mehr und dichter gepackte Sphäroide beobachten als vor der ersten Passagierung (Abbildung 14).

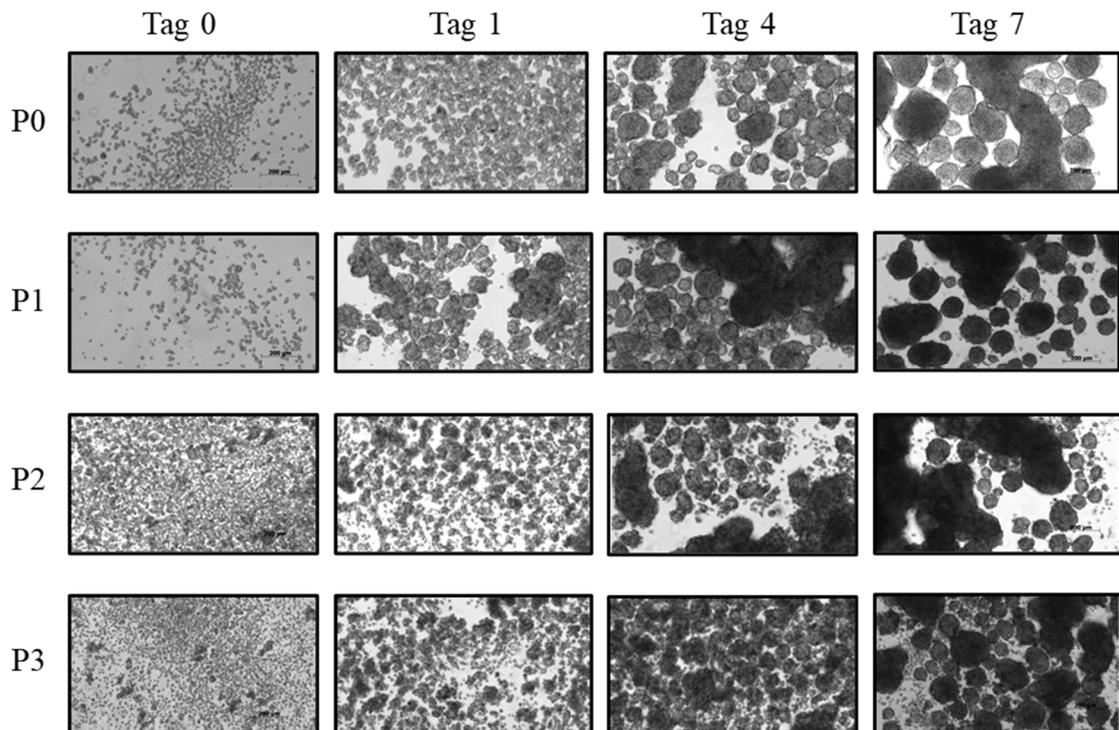


Abbildung 14: Fotodokumentation des Wachstums von HepG2 Zellen im Tumor Sphäroid Assay jeweils zur Plattierung und nach 1, 4 und 7 Tagen Inkubation

Die Zellen wurden 3-mal nach jeweils 7 Tagen passagiert. Die Bilder wurden mittels Elektronenrastermikroskop in 50-facher Vergrößerung aufgenommen.

Im nächsten Schritt wurde durch quantitative PCR die Expression von CD90, CD34, Oct4, Nanog, AID, Albumin und c-myc jeweils 7 Tage nach Inkubation gemessen. Die Expression der Krebsstammzellmarker CD90, CD34 und dem OV-6-Antigen sollte Rückschlüsse auf eine Anreicherung von Krebsstammzellen in der Sphäroid-Formation geben. Bei CD90, CD34, Oct4, Nanog und AID war durchschnittlich ein starker Anstieg vor allem zwischen der 1. und 2. Passagierung zu verzeichnen. So war die mittlere Expression nach der 3. Passagierung bei diesen Genen stets höher als ihr Ausgangswert bei P0. Dahingegen konnten bei Albumin und c-myc im Rahmen der Passagierungen keine Veränderungen in der Expression beobachtet werden (Abbildung 15).

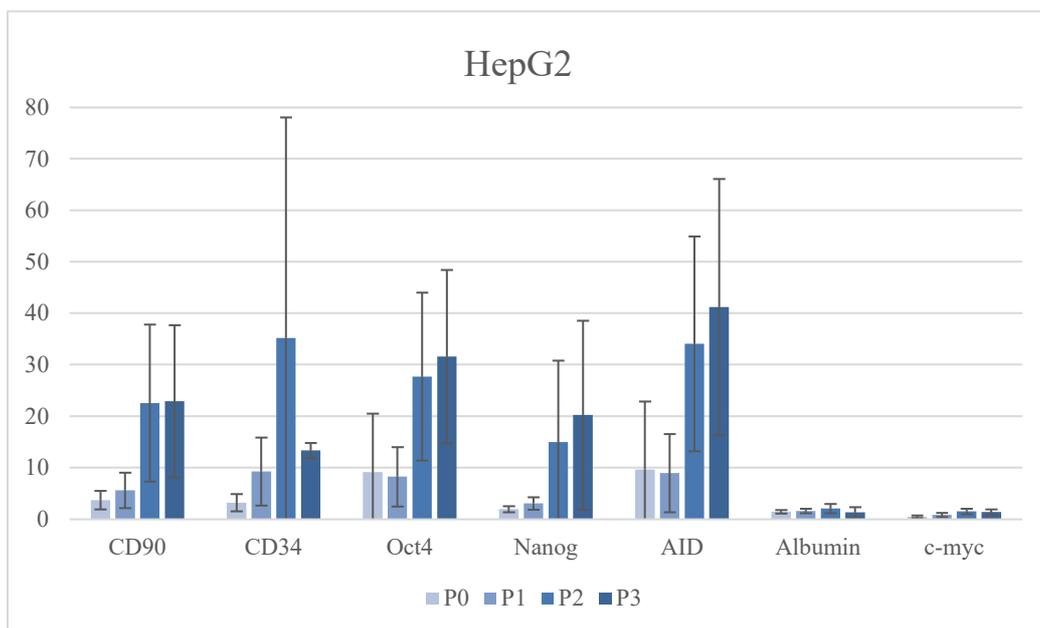


Abbildung 15: Durch qPCR gemessene Expression von CD90, CD34, Oct4, Nanog, AID, Albumin und c-myc

Die im Tumor Sphäroid Assay gewachsenen HepG2 Zellen wurden 3-mal nach 7 Tagen passagiert, die Expression wurde jeweils vor jeder Passagierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n= 3).

4 Diskussion

Die Krebsstammzellforschung hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung zugenommen. Krebsstammzellen stellen in Tumoren eine kleine Gruppe an Zellen dar, welche sich durch ihre Stammzeleigenschaften auszeichnen. Sie können sich sowohl aus differenziertem Tumorgewebe, als auch aus gewebeeigenen normalen Stammzellen entwickeln.^{15, 23} Durch ihre regenerativen Eigenschaften sowie erhöhte Zellplastizität spielen sie im Tumor eine wichtige Rolle in Metastasierung sowie Rezidiventwicklung.^{16, 17} Zusätzlich wird ihnen Strahlen- und Chemotherapieresistenz zugesprochen.^{11–15} Letztendlich werden Krebsstammzellen mit einem schlechteren Outcome und Therapieversagen in der Behandlung von verschiedenen Tumoren assoziiert. Es kann erwartet werden, dass eine gezielte Detektion sowie letztendlich Therapie von Krebsstammzellen zu einem besseren Behandlungs-Outcome in der Krebstherapie führen wird.

Die ersten Krebsstammzellen wurden 1997 durch Bonnet und Dick bei der akuten myeloischen Leukämie beschrieben.^{14, 15, 17, 18} Anschließend erfolgte die Forschung an Krebsstammzellen in soliden Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinom.^{23, 34, 49} Die Untersuchung dieser gestaltete sich bei soliden Tumoren schwieriger, da die zuvor etablierten Tests für solide Tumore teils nicht angewendet werden konnten. Zusätzlich ist es schwieriger Tumorzellen aus soliden Gewebsverbänden zu lösen.¹⁷ Letztendlich lag der Fokus auf der Beschreibung von Oberflächenmarkern, sowie genetischer Marker, welche eine Krebsstammzelle der restlichen Tumorzellen abgrenzt. So konnte in den letzten Jahren verschiedene Krebsstammzellmarker für verschiedene, solide Tumoren etabliert werden.^{23–26, 31, 33, 34, 38, 40, 41} Ebenfalls wurden Tests zur Überprüfung von Krebsstammzellen wie Tumor Sphäroid Assays, EMT Assays oder Migrationsassays in vitro entwickelt.^{20, 21} Jedoch muss betont werden, dass Krebsstammzellmarker adulter Tumoren nicht zwangsweise auch einzig auf Krebsstammzellen von embryonalen Tumoren, wie dem Hepatoblastom exprimiert werden. Aufgrund der embryonalen Genese des Tumors ist zu erwarten, dass Stammzellmarker hierbei auch auf nicht Krebsstammzellen zu finden sein können. Zuverlässige Marker zur Bestimmung von Krebsstammzellen zu finden, gestaltet sich somit bei embryonalen Tumoren schwieriger. Viele Tumorzellen des Hepatoblastoms weisen bereits stammzellspezifische Marker auf. Diese von Krebsstammzellen zu differenzieren, stellt die Schwierigkeit dar.^{5, 28} Dennoch konnte bereits in Untersuchungen von gefrorenen Gewebspräparaten gezeigt werden, dass es Zellgrup-

pen im Hepatoblastom gibt, welche Stammzellmarker wie CD34, Thy1 oder c-kit gemeinsam auf einer Zelle exprimieren.⁷

Im Rahmen weiterer Untersuchungen von zwei etablierten Hepatoblastomzelllinien konnte nun gezeigt werden, dass die Krebsstammzellmarker CD90, CD34 und CXCR4, von welchen bereits in anderen Tumoren eine Expression auf Krebsstammzellen nachgewiesen werden konnte, zu unterschiedlichem Ausmaß auch auf Zellen der zwei untersuchten Hepatoblastomzelllinien exprimiert werden. Auffällig hierbei waren hohe Expressionsraten von bis zu 60% von CXCR4 auf der HuH6 Zelllinie. Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von CD34 und CD90 von ca. jeweils 15% der HuH6 und knapp 9% der HepG2 Zelllinien nachgewiesen werden. Auch die Bindung des OV-6 Antikörpers konnte zu einem ähnlichen Prozentsatz auf HuH6 und HepG2 mittels FACS nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression von CXCR4, im Vergleich zu den anderen Markern, könnte dadurch erklärt werden, dass das Hepatoblastom ein embryonaler Tumor ist, sodass auch Tumorzellen mit Stammzellcharakteristika existieren können, welche keine Krebsstammzellen des Hepatoblastoms darstellen. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch CD133, ein etablierter Stammzellmarker, von fast allen HuH6 und HepG2 Zellen exprimiert wird.¹²

Weiter konnte mittels FACS-Analyse durch Mehrfachfärbung nachgewiesen werden, dass die Marker CD34, CD90, CXCR4, sowie das OV-6-Antigen auf einer kleinen Subpopulation ko-exprimiert wurden und sich somit von den restlichen Tumorzellen unterschieden. Noch weiter konnte gezeigt werden, dass die Hepatoblastomzellen die Oberflächenmarker stets zusammen exprimieren. Die Zellen exprimierten, mit Ausnahme von CXCR4 auf der HuH6 Zelllinie, nie nur einen dieser Oberflächenmarker. Gerade dass die Oberflächenmarker CD34, CD90 und OV-6, bereits etablierte Krebsstammzellmarker, nur gemeinsam auf einer kleinen Population der Hepatoblastomzellen nachzuweisen sind, spricht dafür, dass es sich bei dieser Population tatsächlich um Krebsstammzellen handeln könnte. Eine Expression nur eines dieser Marker auf einer Zellpopulation, unabhängig von den anderen, hätte auch durch die Heterogenität des fetalen Tumors erklärt werden können, wohingegen die gemeinsame Expression für einen Krebsstammzellcharakter der positiven Population spricht.^{5, 28} Bei der Anreicherung einer dieser Faktoren, mittels MACS-Technik, zeigte sich ebenfalls eine Anreicherung der anderen Oberflächenmarker. Im Umkehrschluss konnte beobachtet werden, dass die

Expression dieser Oberflächenantigene der restlichen Hepatoblastomzellen gänzlich fehlt. CD34 und CD90 als Marker der hämatopoetischen Stammzellreihen können in einem Zusammenhang mit der embryonalen Leberentwicklung stehen. So ist die Leber im Embryo für die Hämatopoese zuständig, bevor diese Aufgabe vom Knochenmark übernommen wird.^{7,9}

Eine Expression von CD34, CD90 und die Bindung von OV-6 Antikörpern konnte bereits in vorherigen Untersuchungen auf kleinen Zellen mit ovaler Form, ähnlich den „oval cells“, nachgewiesen werden, welche in verschiedenen Tumoren bereits als Vorläuferzellen beschrieben wurden.⁷ Allerdings konnten in diesen Studien mit Patientengewebe-Proben nur vermutet werden, dass es sich um Krebsstammzellen handelt. Mit der Verwendung von Zelllinien konnten wir einen Schritt weitergehen und haben diese Zellen auf ihre möglichen Krebsstammzeleigenschaften untersucht.

Zum einen zeigten qPCR-Analysen, dass in dieser Zellpopulation der Pluripotenzmarker Oct4 signifikant erhöht exprimiert ist. Eine erhöhte Expression von Oct4 blockiert die Zelldifferenzierung, sodass die Zellen ihre Pluripotenzeigenschaften behalten. Somit gibt eine erhöhte Expression von Oct4 einen Hinweis auf den Stammzellcharakter der untersuchten Zelluntergruppe.³⁸ Im Gegensatz hierzu konnte in den Versuchen zwar eine erhöhte, allerdings keine signifikant erhöhte Expression von Nanog in der untersuchten Zellpopulation nachgewiesen werden. In anderen Tumoren konnte mittels Knock-down Zellen gezeigt werden, dass Nanog wichtig für Metastasierung, sowie die Ausbildung von Tumorsphäroiden ist, beides Eigenschaften die Krebsstammzellen zugeschrieben werden.^{40,41} In weiteren Experimenten zeigte sich die Expression jedoch signifikant erhöht.¹² Dies kann der Tatsache geschuldet sein, dass der in die Berechnung eingegangene Datensatz klein ist und somit anfälliger für große Streuung ist.

Es wurde eine signifikant erhöhte Expression von AID detektiert. In induzierten Stammzellen sorgt AID für die Reaktivierung der epigenetisch stillgelegten Oct4 und Nanog Expression.^{43,44} Eine erhöhte Expression dieser Faktoren spricht somit für den Erhalt der Pluripotenz der umschriebenen Zellgruppe, sowie für den Stammzellcharakter dieser.

Im Vergleich zu den Stammzellmarkern zeigte sich keine signifikante Erhöhung von dem Protoonkogen c-myc. C-myc spielt im hepatozellulären Karzinom eine große Rolle

in der Tumorgenese, jedoch vermehrt in der Apoptoseregulation.^{35, 36} Die Expression von c-myc im Hepatoblastom ist somit nicht verwunderlich, jedoch scheint keine erhöhte Expression in den Krebsstammzellen des Hepatoblastoms zu bestehen. EpCAM, welches sowohl in adulten als auch embryonalen Leberzellen exprimiert wird, zeigt kaum einen Unterschied in der Expression zu den restlichen Zellen der Hepatoblastomzelllinien. Auch wenn es im hepatozellulären Karzinom Assoziationen von der Expression von EpCAM mit Krebsstammzeleigenschaften gibt, scheint dies auf das Hepatoblastom als embryonaler Tumor nicht zuzutreffen.³⁰ Vielmehr spricht es dafür, dass c-myc und EpCAM in fast allen Hepatoblastomzellen exprimiert werden, da es sich um einen embryonalen Tumor handelt. Als leberspezifischer Differenzierungsmarker gilt Albumin, welches erst in der adulten Leberzelle synthetisiert wird.⁹ Die Expression von Albumin ist entsprechend nicht erhöht in der CD90 angereicherten Population. AFP gilt als prognostischer Marker bei Hepatoblastompatienten. Dabei weisen Hepatoblastome mit geringerer AFP-Konzentration (<100ng/ml), sowie stark erhöhte Konzentrationen (>1000ng/ml) meist einen schlechteren Verlauf auf und gelten als prognostisch ungünstiger Faktor.^{1, 2, 4, 50} Zusätzlich zeigt sich bei Patienten mit Tumorrezidiven häufig eine starke Erhöhung der AFP Konzentration als erstes Zeichen für ein Rezidiv. Gerade Hepatoblastome von kleinzelligem Typ weisen ein schlechteres Outcome, sowie erhöhte Rezidivraten auf.² Da eben in diesen kleinzelligen Tumoren erhöhte Expressionsraten von Krebsstammzellmarkern wie CD34, CD90 gefunden werden konnten, könnte davon ausgegangen werden, dass Krebsstammzellen im Vergleich zu anderen Tumorzellen vermehrt AFP exprimieren.⁷ Dies bildete sich ebenfalls anhand der signifikant erhöhten Expression von AFP in der depletierten und der angereicherten Zellgruppe ab. Dies alles spricht für einen geringeren Differenzierungsgrad der CD90 angereicherten Zellen im Vergleich zu den depletierten Hepatoblastomzellen.

In einem nächsten Schritt wurde die beschriebene Zellpopulation auf weitere Krebsstammzeleigenschaften getestet. Zunächst wurde das Migrationsverhalten von CD90 depletierten und angereicherten Zellen, untersucht, um hierdurch Rückschlüsse auf das Metastasierungspotential der Zellgruppen zu schließen.²¹ Im Rahmen der Untersuchung wiesen die CD90 angereicherten Zellen, im Gegensatz zu den CD90 depletierten Zellen, ein erhöhtes Migrationsverhalten auf. Krebsstammzellen wird ein erhöhtes Metastasierungspotential zugeschrieben und bei anderen Tumoren konnte dieses Verhalten in Migrationsassays ebenfalls nachgewiesen werden.²⁴⁻²⁹ Es kann somit rückgeschlossen wer-

den, dass die beschriebene Zellgruppe ebenfalls durch die erhöhte Migrationsfähigkeit eine verstärkte Rolle in der Metastasierung des Hepatoblastoms spielt. Für die Migration einer Tumorzelle elementar ist die Fähigkeit zur Epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Im Rahmen von EMT verlieren die Zellen Zell-Zell sowie Zell-Gewebsbindungen und können sich somit aus dem Gewebsverband lösen. Aus zuvor epithelialen Zellen entstehen Zellen mesenchymalen Phänotyps. Dies ermöglicht das Lösen von einzelnen Zellen aus dem Zellverband und somit ein Migrationsverhalten.²¹ Dabei ist EMT in einer Tumorzelle nicht nur für Metastasierung, sondern auch für die Ausprägung von Chemotherapieresistenzen wichtig.²⁰ Beides sind Charakteristika, welche auch Krebsstammzellen zugeschrieben werden. EMT entsteht in der Zelle durch verschiedene Signalwege wie beispielsweise den Wnt/ β -catenin Signalweg, den Notch Signalweg oder den Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3) Signalweg.²¹ Wichtig hierfür ist die Ausprägung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Snail, Twist und ZEB, welche in der Zelle für eine Reduktion von epithelialen Zellmarkern, sowie eine vermehrte Ausprägung mesenchymaler Zellmarker sorgen. Es konnten bereits zum einen eine Induktion von EMT durch Krebsstammzellen in Tumoren gezeigt werden, als auch eine vermehrte Ausbildung von Stammzellmarkern, sowie den Erhalt von Stammzellcharakter einer Zelle durch EMT. Es ist davon auszugehen, dass es eine enge Verbindung zwischen EMT und Krebsstammzeleigenschaften, wie Metastasierung aber auch Ausprägung von Chemotherapieresistenzen gibt.²¹ In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die EMT Transkriptionsfaktoren SNAIL1, sowie TWIST 1 und der mesenchymale Marker Vimentin signifikant vermehrt in CD34 angereicherten Hepatoblastomzellen exprimiert werden.¹² Eine Verbindung von EMT mit der untersuchten Zellgruppe spricht somit für den Krebsstammzellcharakter dieser Population. Zusätzlich stellt EMT einen möglichen Angriffspunkt in der Entwicklung gezielter Chemotherapeutika gegen Krebsstammzellen dar.^{20, 21}

Im Tumor Sphäroid Assay konnte das Wachstum von kugelförmigen Zellansammlungen mit HepG2 Zellen beobachtet werden. Durch das Verwenden von serumfreiem Medium, sowie sogenannten low-attachment Platten wird das Wachstum von Nicht-Krebsstammzellen inhibiert und nur Krebsstammzellen ermöglicht.²⁴⁻²⁹ Wie erwartet konnte im Rahmen von Passagierungen der Sphäroide ein Anstieg der Expression von den Pluripotenzmarkern Oct4 und Nanog, bei nahezu gleichbleibender Expression von Albumin und c-myc mittels qPCR nachgewiesen werden. Dies spricht zusammen mit

den vermehrten Sphäroiden für eine Zunahme der Krebsstammzellen im Assay. Gleichzeitig konnte mit einer Vermehrung der Krebsstammzellen auch eine erhöhte Expression von den Oberflächenmarkern CD90 und CD34 verzeichnet werden. Eine erhöhte Expression von CD90 und CD34 auf einer Zellpopulation geht somit mit Krebsstammzelleigenschaften einher. Im Umkehrschluss konnte hiermit bewiesen werden, dass es sich bei CD90 und CD34 tatsächlich um Marker für Krebsstammzellen des Hepatoblastoms handelt.

Zusammenfassend konnte eine Population der Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 gefunden werden, welche die Oberflächenmarker CD90, CD34 und das OV-6 Antigen koexprimieren. In dieser Zellpopulation konnte die erhöhte Expression von Pluripotenzmarkern nachgewiesen werden, sowie ein erhöhtes Migrationsverhalten und die Fähigkeit zur Ausbildung von Tumorsphäroiden. All dies sind Fähigkeiten, die in anderen Tumoren den sog. Krebsstammzellen zugeschrieben wurden. Somit ist davon auszugehen, dass mit den oben genannten Oberflächenmarkern eine Subpopulation von Krebsstammzellen im Hepatoblastom identifiziert werden kann.

Erwähnt werden muss, dass in den beschriebenen Versuchsreihen mit etablierten Tumorzelllinien *in vitro* gearbeitet wurde. Im Gegensatz zu fixiertem oder frischem Tumorgewebe, handelt es sich somit bei jeder Zelle um eine Tumorzelle und Ergebnisverfälschung durch nicht Tumorzellen entstehen nicht. Limitationen bestehen durch die Anzahl der durchgeführten Versuche pro Versuchsreihe. Dadurch konnte bei kleinem Datensatz in einigen Versuchen (Migrationsassay und Tumor Sphäroid Assay) nur ein Trend abgebildet werden und keine Signifikanz bestimmt werden. Hierzu müssten die teils aufwendigen Versuchsaufbauten häufiger durchgeführt werden. In weiteren Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass sie die hier beschriebenen Trends auch tatsächlich als signifikant bestätigten.¹²

Im nächsten Schritt gilt es eine gezieltere Therapie mit Hinblick auf Krebsstammzellen zu etablieren. In verschiedenen Tumoren konnte eine erhöhte Chemotherapieresistenz von Krebsstammzellen nachgewiesen werden, außerdem wird ihnen eine große Rolle im Rahmen von Rezidiventwicklung und Metastasierung zugeschrieben. Zunächst könnte durch eine gezielte Analyse der Tumorzellen der betroffenen Patienten eine genauere Risikoeinteilung erfolgen. In einem zweiten Schritt könnte eine angepasste Therapie, die an den Krebsstammzellen des Hepatoblastoms angreift, etabliert werden, um somit

Rezidivraten in der Zukunft zu reduzieren. Aktuell können beste Therapieergebnisse mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin erzielt werden. Dies wird teilweise durch andere Chemotherapeutika wie Carboplatin, Doxorubicin, Ifosfamid, Etoposid, Vincristin, 5-Fluorouracil oder Irinotecan ergänzt, um ähnliche Ergebnisse mit reduzierter Dosis zu erwirken. Cisplatin kann jedoch mit starken Nebenwirkungen einhergehen.¹ Es konnte allerdings in vorherigen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Cisplatin nicht in der Lage ist Krebsstammzellen zu eliminieren.^{12, 49} Dies könnte erklären, weshalb es vor allem bei Hoch Risiko Hepatoblastoma, oder solchen, welche vermehrt aus unreifen oder kleinzelligen, undifferenzierten Zellen bestehen, häufiger zu Therapieversagen und Rezidivbildung kommt.^{2, 9} Zusätzlich konnte in verschiedenen Tumoren ein strahlentherapie- und chemotherapieinduzierter Übergang von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen (EMT) beobachtet werden. Noch weiter konnte nach Therapie mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin bei Pankreaskarzinom eine Induktion von Invasion, Tumorsphäroidbildung und Apoptoseresistenz, nachgewiesen werden.^{20, 49} Im Hepatozellulären Karzinom konnte eine ähnliche Beobachtung nach low-dose Therapie mittels Cisplatin gemacht werden. So reduzierte Cisplatin die meisten Tumorzellen, doch eine kleine Subpopulation, welche Krebsstammzellmarker exprimierte, blieb erhalten und vermehrte sich im Verlauf.⁴⁹ Ein ähnliches Verhalten präsentierten auch Hepatoblastomzellen bei in vitro Therapie mittels Cisplatin.¹² Eine gezielte Therapie der Krebsstammzellen, ergänzend zu der herkömmlichen Therapie, könnte daher erfolgsversprechend sein.

Ein möglicher Angriffspunkt für Krebsstammzellen des Hepatoblastoms könnten, analog zu anderen Krebsstammzellen, Mechanismen für den Übergang von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen darstellen. Gerade hier konnte beispielsweise ein Zusammenhang zwischen EMT und eine verstärkte Aktivierung des beta-Wnt Signalweges nachgewiesen werden, welcher unter anderem eine Rolle in der Ausprägung von Chemotherapieresistenzen, allerdings auch für die Ausbildung von Metastasen, spielt. Dabei haben Chaperone wie beispielsweise Hsp90 eine große Rolle in der Ausprägung von EMT.^{51, 52} Hsp90 reduziert in verschiedenen Tumoren wie epithelialen Ovarialkarzinom, klarzelligen Nierenkarzinom oder nasopharyngealen Karzinomen epithelialen Ursprungs die Expression von Twist1, einem EMT-Transkriptionsfaktor. Hierdurch kommt es zu einer Unterdrückung von EMT in den Tumorzellen, welches sich letztendlich auf Metastasierungsverhalten, Tumorprogress sowie Chemotherapieresistenz des

Tumors auswirkt.⁵² Es konnte bereits durch Experimente gezeigt werden, dass beispielsweise der Hsp90 Inhibitor 17-AAG ein mögliches Chemotherapeutikum für eine selektive Therapie gegen Krebsstammzellen, spezifisch des Hepatoblastoms darstellen kann. Es gilt dies weiter zu untersuchen, auch in Hinsicht auf eine klinische Anwendung, ergänzend zu den bereits bestehenden Chemotherapiekonzepten.¹²

5 Zusammenfassung

Die Krebsstammzellforschung gelangte in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Tumorforschung. Im Tumor bilden Krebsstammzellen eine kleine Population an Zellen mit Stammzeleigenschaften, wodurch sie eine große Rolle bei der Entstehung von Rezidiven, Metastasen, sowie der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen spielen. Um eine gezielte Bekämpfung von Krebsstammzellen zu ermöglichen, müssen diese im Tumor zunächst zuverlässig durch Krebsstammzellmarker detektiert werden können. Gerade bei soliden pädiatrischen Tumoren, wie dem Hepatoblastom, ergeben sich hierbei Schwierigkeiten dadurch, dass im sehr heterogenen Tumorgewebe viele Zellen aufgrund der embryonalen Natur des Tumors bereits Stammzellmarker exprimieren, ohne dass es sich bei diesen Zellen um Krebsstammzellen handelt. Das Hepatoblastom ist mit 2/3 der Lebertumore des Kindes die häufigste maligne Leberneoplasie im Kindesalter. Auch wenn es bereits Hinweise auf das Vorliegen von Krebsstammzellen im Hepatoblastom gibt, so konnten diese bisher nicht genauer durch fest definierte Krebsstammzellmarker identifiziert werden.

Um dies zu erreichen, wurden in dieser Arbeit die beiden Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 auf die Expression der bereits bekannten Krebsstammzellmarker CD90, CD34 und CXCR4 überprüft. Zusätzlich wurde auf eine Bindung des „oval cell“ Antikörpers, OV-6, untersucht. Mittels Durchflusszytometrie-Analysen konnte eine Zellpopulation gefunden werden, welche die Oberflächenmarker CD34 und CD90 koexprimiert und gleichzeitig den OV-6 Antikörper bindet. Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf einige Krebsstammzeleigenschaften überprüft. Zur weiteren Untersuchung dieser Subpopulation erfolgte mittels MACS (magnetic activated cell sorting) eine Anreicherung der CD90 exprimierenden Zellen. Diese wurde mittels qPCR auf die Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog, sowie der Zytidineaminase AID untersucht. Es konnte eine signifikant erhöhte Expression von AID und Oct4 detektiert werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Expression von EpCAM, c-myc und Albumin, welche als Kontrollgene untersucht wurden, nicht signifikant erhöht. Um auf das Metastasierungspotential der CD90 angereicherten Zellen rückzuschließen, wurde ein Migrationsassay mit angereicherten und depletierten Zellen durchgeführt. Hier wiesen die CD90 angereicherten Zellen, im Vergleich zu den depletierten Zellen eine erhöhte Migration auf. Im Tumorsphäroid-Assay war die HepG2 Zelllinie in der Lage Tumor-

sphäroide auszubilden. Nach der Passagierung zeigten diese eine erhöhte Expression der Krebsstammzellmarker CD90 und CD34, sowie der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog.

Zusammengefasst kann mit den Krebsstammzellmarkern CD90, CD34 und OV-6 eine Subpopulation im Hepatoblastom identifiziert werden, die nach unseren Analysen Krebsstammzeleigenschaften aufweisen. Mithilfe dieses Markersets können nun neue Therapieansätze auf ihre Effektivität, Krebsstammzellen gezielt zu eliminieren, getestet werden.

6 Summary

In recent years, cancer stem cells have increasingly become a major focus in tumor research. Cancer stem cells form a small population within the tumor with stem cell properties and play a key role in tumor recurrence, metastasis and chemotherapy resistance. Therefore, it is of great interest to have a reliable set of cancer stem cell markers in order to identify cancer stem cells and design a targeted cancer therapy. Particularly, in solid pediatric tumors, such as the hepatoblastoma, additional difficulties arise due to the fact that cells in these heterogeneous tumors already express stem cells markers, without being cancer stem cells due to the embryonic nature of the tumor itself. Hepatoblastoma is the most common malignant liver neoplasm in childhood, accounting for 2/3 of liver tumors in children. Even though studies indicated the presence of cancer stem cells in hepatoblastoma, cancer stem cell markers for hepatoblastoma have yet to be defined.

For that purpose, in this study the expression of the well-known cancer stem cell markers CD90 and CD34 was tested in the two hepatoblastoma cell lines HuH6 and HepG2. Additionally, binding of the oval cell antibody OV-6 was analysed. Using flow cytometry analysis, a subpopulation was detected that co-expressed the cell surface markers CD34 and CD90 and showed binding of OV-6 as well. In the next step, the cells were tested for cancer stem cell characteristics. Therefore, CD90 expressing cells were enriched by using the MACS technique (magnetic activated cell sorting) and the expression of pluripotency markers Oct4 and Nanog as well as of the cytidine deaminase AID was examined by qPCR. A significantly increased expression of AID and Oct4 was detected. In contrast, the expression of EpCAM, c-myc and albumin, as control genes, was not significantly increased. A migration assay was performed with the enriched and depleted cells to give a hint for a possible metastatic potential of the cell population. The CD90-enriched cells showed increased migration compared to the depleted cells. In tumor sphere assays, the HepG2 cell line was able to form tumor spheres. These showed increased expression of the cancer stem cell markers CD90 and CD34, as well as the pluripotency markers Oct4 and Nanog, after several passaging.

In summary, a subpopulation of cancer stem cells in hepatoblastoma could be detected using the cancer stem cell markers CD90, CD34 and OV-6. By utilizing these markers new therapeutic approaches can now be tested for their effectiveness in eliminating cancer stem cells of hepatoblastoma.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Schweinitz D von, Becker, Kristina. S1-Leitlinie Hepatoblastom 2016. Available at: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0111_S1_Hepatoblastom_2016-06.pdf.
- 2 Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr* 2014;**26**(1):19–28. doi:10.1097/MOP.0000000000000046.
- 3 Lim IIP, Bondoc AJ, Geller JI, et al. Hepatoblastoma-The Evolution of Biology, Surgery, and Transplantation. *Children (Basel)* 2018;**6**(1). doi:10.3390/children6010001.
- 4 Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, et al. The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur J Cancer* 2015;**52**:92–101. doi:10.1016/j.ejca.2015.09.023.
- 5 Mavila N, Thundimadathil J. The Emerging Roles of Cancer Stem Cells and Wnt/Beta-Catenin Signaling in Hepatoblastoma. *Cancers (Basel)* 2019;**11**(10). doi:10.3390/cancers11101406 [published Online First: 20 September 2019].
- 6 Litten JB, Tomlinson GE. Liver tumors in children. *The Oncologist* 2008;**13**(7):812–820. <https://theoncologist.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/theoncologist.2008-0011>.
- 7 Fiegel HC, Glüer S, Roth B, et al. Stem-like Cells in Human Hepatoblastoma. *J Histochem Cytochem* 2004;**52**(11):1495–1501. doi:10.1369/jhc.4A6297.2004.
- 8 Abenzoa P, Manivel JC, Wick MR, et al. Hepatoblastoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1987;**18**(10):1025–1035. doi:10.1016/s0046-8177(87)80219-8.
- 9 Schweinitz D von, Ure B. eds. *Kinderchirurgie: Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters*, 3rd edn. Berlin, Springer-Verlag GmbH; 2019:357-369.

- 10 Reyes JD, Carr B, Dvorchik I, et al. Liver transplantation and chemotherapy for hepatoblastoma and hepatocellular cancer in childhood and adolescence. *J Pediatr* 2000;**136**(6):795–804.
- 11 Akita M, Tanaka K, Murai N, et al. Detection of CD133 (prominin-1) in a human hepatoblastoma cell line (HuH-6 clone 5). *Microsc Res Tech* 2013;**76**(8):844–852. doi:10.1002/jemt.22237 [published Online First: 27 May 2013].
- 12 Lee-Theilen M, Hadhoud JR, Volante G, et al. Co-Expression of CD34, CD90, OV-6 and Cell-Surface Vimentin Defines Cancer Stem Cells of Hepatoblastoma, Which Are Affected by Hsp90 Inhibitor 17-AAG. *Cells* 2021;**10**(10). doi:10.3390/cells10102598 [published Online First: 29 September 2021].
- 13 Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest* 2013;**123**(5):1911–1918. doi:10.1172/JCI66024 [published Online First: 1 May 2013].
- 14 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011;**17**(3):313–319. doi:10.1038/nm.2304.
- 15 Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;**66**(19):9339–9344. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126 [published Online First: 21 September 2006].
- 16 Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 2017;**23**(10):1124–1134. doi:10.1038/nm.4409.
- 17 Kuşoğlu A, Biray Avcı Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene* 2019;**681**:80–85. doi:10.1016/j.gene.2018.09.052 [published Online First: 27 September 2018].
- 18 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;**3**(7):730–737. doi:10.1038/nm0797-730.

- 19 Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual review of pathology* 2016;**11**:47–76.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27193450/>.
- 20 Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* 2016;**21**(7). doi:10.3390/molecules21070965 [published Online First: 22 July 2016].
- 21 Babaei G, Aziz SG-G, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother* 2021;**133**:110909.
doi:10.1016/j.biopha.2020.110909 [published Online First: 20 November 2020].
- 22 Wu Y, Ginther C, Kim J, et al. Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2012;**10**(12):1597–1606. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0155-T [published Online First: 15 October 2012].
- 23 Chan L-H, Luk ST, Ma S. Turning hepatic cancer stem cells inside out--a deeper understanding through multiple perspectives. *Mol Cells* 2015;**38**(3):202–209.
doi:10.14348/molcells.2015.2356.
- 24 Wang G, Zhou H, Gu Z, et al. Oct4 promotes cancer cell proliferation and migration and leads to poor prognosis associated with the survivin/STAT3 pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2018;**40**(2):979–987.
doi:10.3892/or.2018.6491.
- 25 Zhang K, Che S, Su Z, et al. CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2018;**41**(2):946–954. doi:10.3892/ijmm.2017.3314.
- 26 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**351**(4):820–824. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.128.
- 27 Sun J-H, Luo Q, Liu L-L, et al. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications. *World J Gastroenterol* 2016;**22**(13):3547–3557.
doi:10.3748/wjg.v22.i13.3547.

- 28 Friedman GK, Gillespie GY. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancers (Basel)* 2011;**3**(1):298–318. doi:10.3390/cancers3010298.
- 29 Ishiguro T, Ohata H, Sato A, et al. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci* 2017;**108**(3):283–289. doi:10.1111/cas.13155.
- 30 Liu Y-C, Yeh C-T, Lin K-H. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells* 2020;**9**(6). doi:10.3390/cells9061331 [published Online First: 26 May 2020].
- 31 Bianchi ME, Mezzapelle R. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. *Front Immunol* 2020;**11**:2109. doi:10.3389/fimmu.2020.02109 [published Online First: 28 August 2020].
- 32 Chen Q, Khoury M, Limmon G, et al. Human fetal hepatic progenitor cells are distinct from, but closely related to, hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2013;**31**(6):1160–1169. doi:10.1002/stem.1359.
- 33 Bisgaard HC, Parmelee DC, Dunsford HA, et al. Keratin 14 protein in cultured nonparenchymal rat hepatic epithelial cells: characterization of keratin 14 and keratin 19 as antigens for the commonly used mouse monoclonal antibody OV-6. *Mol Carcinog* 1993;**7**(1):60–66. doi:10.1002/mc.2940070110.
- 34 Yamashita T, Budhu A, Forgues M, et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;**67**(22):10831–10839. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0908.
- 35 Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;**60**:575–600. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.575.
- 36 Yoshida GJ. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;**37**(1):173. doi:10.1186/s13046-018-0835-y [published Online First: 27 July 2018].

- 37 Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther* 2010;**1**(5):39. doi:10.1186/scrt39 [published Online First: 14 December 2010].
- 38 Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002;**12**(5-6):321–329. doi:10.1038/sj.cr.7290134.
- 39 Mohiuddin IS, Wei S-J, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;**1866**(4):165432. doi:10.1016/j.bbadis.2019.03.005 [published Online First: 21 March 2019].
- 40 Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007;**17**(1):42–49. doi:10.1038/sj.cr.7310125.
- 41 Santaliz-Ruiz LE, IV, Xie X, Old M, et al. Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2014;**135**(12):2741–2748. doi:10.1002/ijc.28690 [published Online First: 13 January 2014].
- 42 Muñoz DP, Lee EL, Takayama S, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**(32):E2977-86. doi:10.1073/pnas.1301021110 [published Online First: 23 July 2013].
- 43 Bhutani N, Brady JJ, Damian M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 2010;**463**(7284):1042–1047. doi:10.1038/nature08752.
- 44 Moon S-Y, Eun H-J, Baek S-K, et al. Activation-Induced Cytidine Deaminase Induces DNA Demethylation of Pluripotency Genes in Bovine Differentiated Cells. *Cell Reprogram* 2016;**18**(5):298–308. doi:10.1089/cell.2015.0076 [published Online First: 19 August 2016].
- 45 Waldherr M, Mišík M, Ferk F, et al. Use of HuH6 and other human-derived hepatoma lines for the detection of genotoxins: a new hope for laboratory animals? *Arch Toxicol* 2018;**92**(2):921–934. doi:10.1007/s00204-017-2109-4 [published Online First: 7 December 2017].

- 46 Doi I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gan* 1976;**67**(1):1–10.
- 47 Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci* 2021;**22**(23). doi:10.3390/ijms222313135 [published Online First: 4 December 2021].
- 48 Dexter F. Wilcoxon-Mann-Whitney test used for data that are not normally distributed. *Anesthesia and analgesia* 2013;**117**(3):537–538. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23966647/>.
- 49 Zhang H, Chang WJ, Li XY, et al. Liver cancer stem cells are selectively enriched by low-dose cisplatin. *Braz J Med Biol Res* 2014;**47**(6):478–482. doi:10.1590/1414-431x20143415 [published Online First: 25 April 2014].
- 50 Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *The Lancet Oncology* 2017;**18**(1):122–131. doi:10.1016/S1470-2045(16)30598-8.
- 51 Kabakov A, Yakimova A, Matchuk O. Molecular Chaperones in Cancer Stem Cells: Determinants of Stemness and Potential Targets for Antitumor Therapy. *Cells* 2020;**9**(4). doi:10.3390/cells9040892 [published Online First: 6 April 2020].
- 52 Chong KY, Kang M, Garofalo F, et al. Inhibition of Heat Shock Protein 90 suppresses TWIST1 Transcription. *Mol Pharmacol* 2019;**96**(2):168–179. doi:10.1124/mol.119.116137 [published Online First: 7 June 2019].Refere

8 Danksagungen

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt als Erstes meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Henning Fiegel für die Bereitstellung meines Themas. Seine Tür stand mir immer offen und er unterstützte mich mit seiner Erfahrung und seiner fachlichen Expertise. Nicht zuletzt wegen seines Engagements führte mich mein beruflicher Weg in die Chirurgie.

Ich bedanke mich aufs Herzlichste bei meiner Betreuerin Frau Dr. Mieun Lee-Theilen. Sie stand mir jederzeit bei Fragen und Problemen zur Seite und konnte mich stets zur richtigen Zeit motivieren und sowohl fachlich als auch mental unterstützen. Ihre Anregungen und Denkanstöße trieben mich in meiner Dissertation vorwärts und förderten nicht nur meine wissenschaftliche, sondern auch meine persönliche Weiterentwicklung. Durch sie konnte diese Arbeit erst ermöglicht werden.

Ein großer Dank gilt Frau Gabriela Kroll, die mir nicht nur das Arbeiten im Labor nähergebracht hat, sondern auch mit Vorschlägen und ermutigenden Gesprächen zur Seite stand. Zusätzlich bedanke ich mich bei der Kinderchirurgie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Udo Rolle, sowie dem kinderchirurgischen Labor für die guten Ratschläge und die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Material. Ich danke den Mitarbeitern und Kollegen des Labors der Urologie, der Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie, sowie der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie für fachliche Hilfestellungen, Anregungen, sowie gemeinsame Mittagspausen, die die Laborarbeit vereinfachten.

Zuletzt richtet sich mein Dank an meine Familie und Freunde, die mich bis hierhin begleiteteten. Meinen Eltern Kornelia und Pietro Volante danke ich sowohl für ihre moralische und finanzielle Unterstützung als auch für ihre unendliche Geduld. Sie haben mich auf meinem bisherigen Weg unermüdlich begleitet und bestätigt, sowie viele Stunden mit Korrekturlesen verbracht. Ihr liebevolles Verständnis hat mir Mut und Kraft, auch in beschwerlichen Zeiten geschenkt. Abschließend bedanke ich mich bei meinem Partner Tristan Wick, der mich in meinen Zielen nicht nur ermutigte, sondern mir auch menschlichen Halt gab.

9 Lebenslauf

Zur Person:

Name: Giulietta Volante
Geburtsdatum/Ort: 28.06.1995 in Bad Soden am Taunus
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Gartenstraße 126
Ort: 60596 Frankfurt am Main
Telefon: +49 1516 8128695
E-Mail: giulietta.volante@outlook.com

Bildungsweg

Seit 23.05.2018 Doktorandin im Kinderchirurgischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Frankfurt a. M.
Seit 01.02.2021 Facharztweiterbildung in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt a. M.
10/2013-12/2020 Studium der Humanmedizin an der Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt
Bestandene 3. ÄP 10.12.2020 und Erhalt der Approbation als Ärztin
Bestandene 2. ÄP 10.10.2019
Bestandene 1. ÄP 22.11.2015
06/2005-06/2013 Allgemeine Hochschulreife/Abitur
Albert-Einstein-Gymnasium Schwalbach am Taunus

Praktisches Jahr

- 11/2019-03/2020 1. Tertial Chirurgie am Universitätsklinikum Frankfurt
Teilbereiche: Herz-Thorax-Chirurgie, Allgemeinchirurgie,
Urologie
- 03/2020-06/2020 2. Tertial Wahltertial in der Kinderchirurgie des Kantonspi-
tals Luzern (Schweiz)
- 06/2020-10/2020 3. Tertial Innere Medizin im Krankenhaus Sachsenhausen

Famulaturen

- 03/2019 Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie am Universitätskli-
nikum Frankfurt am Main
- 09/2018 Chirurgische Notaufnahme am Klinikum Bad Soden a. Ts.
- 07/2018 Bariatrische Chirurgie im Krankenhaus Sachsenhausen
- 02/2018 Kinderchirurgie- und urologie am Universitätsklinikum
Frankfurt am Main
- 08/2016 Allgemeinmedizinische und Sportmedizinische in der Praxis
Peter Wetklo in Schwalbach am Taunus

Berufserfahrung

- 01/2017-03/2017 Studentische Tutorin am Zentrum für Chirurgie, Universi-
tätsklinikum Frankfurt

Publikation

Mieun Lee-Theiler, Julia R Hadhoud, **Giulietta Volante**, Delaine D Fadini, Julia Eich-
horn, Udo Rolle, Henning C Fiegel, Co-Expression of CD34, CD90, OV-6 and Cell-
Surface Vimentin Defines Cancer Stem Cells of Hepatoblastoma, Which Are Affected
by Hsp90 Inhibitor 17-AAG, Cells 2021;**10**(10)

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Rolle von CD90- und CD34-positiven Zellen in Hepatoblastom-Tumorzelllinien

Am Zentrum der Chirurgie, in der Klinik für Kinderchirurgie und -urologie unter Betreuung und Anleitung Prof. Dr. Henning Fiegel mit Unterstützung durch Frau Dr. Mieun Lee-Theilen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Mieun Lee-Theilen, Julia R Hadhoud, Giulietta Volante, Delaine D Fadini, Julia Eichhorn, Udo Rolle, Henning C Fiegel, Co-Expression of CD34, CD90, OV-6 and Cell-Surface Vimentin Defines Cancer Stem Cells of Hepatoblastoma, Which Are Affected by Hsp90 Inhibitor 17-AAG, Cells 2021;10(10)

(Ort, Datum)

(Unterschrift)