

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

**Eliminierung der Krebsstammzellen des Hepatoblastoms durch die
gezielte Inhibition der aktivierungsinduzierten Zytidin-Desaminase (AID)**

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

vorgelegt von
Julia Rauheja Hadhoud

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Henning Fiegel
Korreferent/in:	Prof. Dr. Jörg Trojan
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis.....	6
2	Tabellenverzeichnis.....	8
3	Abkürzungsverzeichnis.....	9
4	Einleitung.....	12
4.1	Hepatoblastom	12
4.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	12
4.1.2	Diagnostik und Risikoklassifizierung.....	13
4.1.3	Therapie und Outcome.....	13
4.1.4	Histologische Einteilung	14
4.2	Krebsstammzellen.....	16
4.2.1	Tumorheterogenität und Krebsstammzellhypothese	16
4.2.2	Problematik der Erkennung von Krebsstammzellen im Hepatoblastom .	18
4.2.3	CD90 ⁺ CD34 ⁺ OV6-Antigen ⁺ Zellen als mögliche Krebsstammzellpopulation im Hepatoblastom.....	19
4.3	Krebsstammzellen als Ziel einer zytotoxischen Therapie	21
4.3.1	Pluripotenz und Pluripotenzmarker	21
4.3.2	AID- Schlüssel zur Reprogrammierung von Pluripotenzgenen?.....	22
4.3.3	Gezielte Inhibierung von AID.....	23
4.4	Ziele der Arbeit	26
5	Material und Methoden.....	27
5.1	Verwendete Materialien.....	27
5.1.1	Geräte und Apparaturen	27
5.1.2	Software	29
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	29
5.1.4	Kits	30
5.1.5	Chemikalien und Agenzien	31
5.1.6	Primer für quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion.....	32
5.1.7	Antikörper für Durchflusszytometrie	33
5.1.8	Sequenzen siRNA.....	34
5.1.9	Nährmedien und Zusätze	34
5.1.10	Puffer	35

5.1.11	Zelllinien.....	35
5.2	Angewandte Methoden.....	36
5.2.1	Kultivierung der Zelllinien.....	36
5.2.2	Zellzahlbestimmung.....	36
5.2.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
5.2.4	Isolation von mRNA.....	38
5.2.5	Herstellung von cDNA.....	39
5.2.6	Quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	40
5.2.7	Tumor-Sphäroid-Assay.....	42
5.2.7.1	Sphäroidbildung von HepG2-Zellen mit Differenzierungsassay.....	42
5.2.7.2	Sphäroidbildung von HuH6-Zellen unter Zytostatika-Behandlung.....	43
5.2.8	Gen-Knockdown durch siRNA.....	44
5.2.9	Zytostatikabehandlung.....	45
5.2.10	MTT-Zytotoxizitätstest.....	47
5.2.11	Statistische Auswertung.....	48
6	Ergebnisse.....	49
6.1	Tumor-Sphäroid- und Differenzierungsassay.....	49
6.1.1	Fotodokumentation.....	49
6.1.2	FACS-Analyse.....	51
6.1.3	Expressionsanalyse mittels qPCR.....	52
6.2	Cisplatinbehandlung.....	54
6.2.1	Messung der Zellviabilität mittels MTT.....	54
6.2.2	FACS-Analyse der überlebenden Zellen.....	56
6.2.3	Expressionsanalyse der überlebenden Zellen mittels qPCR.....	60
6.3	siRNA-Knockdown von AID.....	63
6.3.1	Expressionsanalyse nach Knockdown mittels qPCR.....	63
6.4	Behandlung mit AID-inhibierenden-Substanzen.....	65
6.4.1	Decitabine-Behandlung der HepG2-Zellen.....	65
6.4.2	Decitabine-Behandlung der HuH6-Zellen.....	66
6.4.3	Zebularine-Behandlung der HepG2-Zellen.....	68
6.4.4	Zebularine-Behandlung der HuH6-Zellen.....	69
6.4.5	Tanespimycin-Behandlung der HepG2-Zellen.....	71
6.4.6	Tanespimycin-Behandlung der HuH6-Zellen.....	72

6.4.7	Tumor-Sphäroid- Assay der HuH6-Zellen unter Zebularine- und Tanespimycin-Behandlung	73
6.5	Konsequente Kombinationsbehandlung mit Cisplatin	76
6.5.1	Messung der Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mittels MTT-Assay.....	76
6.5.2	FACS-Analyse nach Kombinationsbehandlung.....	78
6.5.3	Expressionsanalyse nach Kombinationsbehandlung mittels qPCR	83
7	Diskussion.....	84
7.1	CD34 ⁺ OV-6 ⁺ CD90 ⁺ Zellen als mögliche Krebsstammzellen im Hepatoblastom	84
7.2	Low-positive Zellen- neue Krebsstammzellpopulation?.....	86
7.3	AID als Zielstruktur zur Eliminierung von Krebsstammzellen.....	89
7.4	Kombinationsbehandlungen mit Standardtherapeutikum Cisplatin.....	91
7.5	Behandlung mit HSP90-Inhibitor Tanespimycin	93
7.6	HSP90-Inhibitoren als Substanzklasse für pädiatrische Tumore	95
7.7	Ausblick	97
8	Zusammenfassung.....	98
9	Summary	100
10	Literaturverzeichnis.....	102
11	Schriftliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der HuH6- und HepG2-Zellen im Forward (FSC)/Sideward (SSC)-Scatter, Gating nach lebenden Zellen	37
Abb. 2: Ablaufschema Tumor-Sphäroid-Assay	43
Abb. 3: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinien HuH6 mit Decitabine und Cisplatin.	45
Abb. 4: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinie HuH6 mit Zebularine und Cisplatin.	46
Abb. 5: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinie HuH6 mit Tanespimycin und Cisplatin.	46
Abb. 6: Bildung von Tumor-Sphäroiden von HepG2-Zellen	50
Abb. 7: Morphologische Angleichung der re-differenzierten Tumor-Sphäroid-Zellen nach 72h Reaktivierung unter normalen Bedingungen	50
Abb. 8: Die Formierung von Tumor-Sphäroiden und ihre Passagierung führt zu CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Zellen mit Re-Differenzierungspotential	51
Abb. 9: Expressionsanalyse der Tumor-Sphäroid-Zellen nach P2 und Reaktivierung ..	53
Abb. 10: Reduktion der Zellzahl von HuH6- und HepG2-Zellen unter 72-stündiger Cisplatin-Behandlung	55
Abb. 11: Anstieg der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Zellen mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen nach 72-stündiger Behandlung.	56
Abb. 12: Die Cisplatin-Behandlung führt zu einem prozentualen Anstieg einer Low CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Population	57
Abb. 13: Der Gesamtanstieg der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Zellen wird durch die Zunahme des Anteils der Low-positiven-Population getragen	59
Abb. 14: Zunahme der Expression von Pluripotenz- und Krebsstammzellmarker auf mRNA-Ebene der HuH6-Zellen nach Cisplatin Behandlung.	61
Abb. 15: Zunahme der Expression von Pluripotenz- und Krebsstammzellmarker auf mRNA-Ebene der HepG2-Zellen nach Cisplatin Behandlung.	62
Abb. 16: Der AID-Knockdown führt zur verminderten Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog sowie des Oberflächenproteins CD90.	64
Abb. 17: Decitabine zeigt keine signifikante Verminderung der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ CD90 ⁺ Population der HepG2-Zellen	65

Abb. 18: Die Behandlung mit Decitabine bewirkt nur einen geringen Zelltod und hat keine signifikante Auswirkung auf die mRNA-Expression	66
Abb. 19: Decitabine zeigt eine signifikante Verminderung der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Population der HuH6-Zellen.....	67
Abb. 20: Die Behandlung mit Decitabine bewirkt einen mäßig ausgeprägten Zelltod und hat keine Auswirkung auf mRNA-Ebene	67
Abb. 21: Die Behandlung der HepG2-Zellen mit Zebularine führt bei starker zytotoxischer Wirkung zu keiner Reduktion der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ CD90 ⁺ Population.	68
Abb. 22: Zebularine führt zu einer signifikanten Verminderung der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ CD90 ⁺ Population der HuH6-Zellen	69
Abb. 23: Zebularine hat bei verstärkten Zelltod keinen signifikanten Einfluss auf mRNA-Ebene.	70
Abb. 24: Behandlung der HepG2-Zellen mit Tanespimycin führt bei starker zytotoxischen Wirkung zu einer Selektion der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Population.	71
Abb 25: Tanespimycin führt zu einer signifikanten Reduktion des Anteiles der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ Zellen.	72
Abb. 26: Die Behandlung mit Tanespimycin bewirkt nur einen geringen Zelltod und führt zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Level.....	73
Abb. 27: Eine Behandlung mit Zebularine und Tanespimylin schränkt die Bildung von Tumor-Sphäroiden ein.....	74
Abb. 28: Die Behandlung mit Zebularine und Tanespimycin führt zu einer reduzierten Größe der gebildeten Tumor-Sphäroide der HuH6-Zellen.....	75
Abb. 29: Die Zellvitalitätsbestimmung nach der Kombination mit einzelnen Substanzen mit Cisplatin führt zu einem unterschiedlich ausgeprägten Zelltod	77
Abb. 30: Die Kombibehandlung von Cisplatin und Tanespimycin zeigt eine Verringerung des Anteils der CD34 ⁺ OV-6 ⁺ positiven Population.	78
Abb. 31: Die Kombination von Decitabine und Cisplatin verursacht einen prozentualen Anstieg der Low-positiven Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung	80
Abb. 32: Die Kombination von Zebularine und Cisplatin führt zu einer prozentualen Anreicherung der Low-positiven Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung.....	81

Abb. 33: Die Kombination von Tanespimycin und Cisplatin führt zu einer prozentualen Reduktion der Low- und High-positiven Population.	82
Abb. 34: Die Kombination von Tanespimycin und Cisplatin vermindert die Expression von AID und Oct4 im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung.....	83

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte und Apparaturen	27
Tab. 2: Software.....	29
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	29
Tab. 4: Kits	30
Tab. 5: Chemikalien, Agenzien.....	31
Tab. 6: Primerpaare für qPCR	32
Tab. 7: Antikörper für FACS	33
Tab. 8: Sequenzen siRNA	34
Tab. 9: Nährmedium für adhärenente Zellen.....	34
Tab. 10: Nährmedium für Tumor-Sphäroid-Assay	34
Tab. 11: Puffer für Durchflusszytometrie	35
Tab. 12: Mastermixzusammensetzung für Reverse Transkription.....	39
Tab. 13: Ablaufschema der reversen Transkription im Thermocycler	40
Tab. 14: Zusammensetzung des Mastermix für qPCR	40
Tab. 15: Reaktionsschema in qPCR-Maschine Stratagene Mx3005P.....	41
Tab. 16: Zytostatikabehandlung mit Konzentration und Inkubationszeit.....	45

3 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin Beta
AFP	Alpha-Fetoprotein
AID	aktivierungsinduzierte Zytidin-Desaminase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
BV-421	Brilliant Violet-421
CA	Carcinom
Ca²⁺	Calcium
CD	Cluster Of Differentiation: a. e. „Oberflächenantigen“
cDNA	complementary DNA
CHIC	Children's Hepatic tumors International Collaboration
CK	Cytokeratin
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
C_T	Cycle threshold
COG	Children's Oncology Group
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nährmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
Et al.	et aliae, et alia

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FGF	Fibroblast growth factor
FSC	Forward Scatter
GPOH	German Society for Paediatric Oncology and Haematology
HSP90	Heat Shock Protein 90
IgH	Immunglobuline heavy locus
JPLT	Japanese Pediatric Liver Tumours Group
Klf-4	Kruppel-like factor 4
MACS	Magnetic Cell Separation
Mg²⁺	Magnesium
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Oct-4	Octamer-Binding Transcription Factor 4
Opti-MEM	Reduced-Serum Medium, Minimal Essential Medium
OV-1, OV-6	Oval Cell Marker Antibody 1, Oval Cell Marker Antibody 6
P0, P1, P2	Passage 0, Passage 1, Passage 2
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
POSTTEXT	Posttreatment extent of Disease
POU	Pit-Oct-Unc
PRETEXT	Pretreatment extent of Disease
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
REB	RNA-Eluierungspuffer
RW	RNA-Waschpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Carboxy-X-Rhodamine
SEC	small epithelial cell
SIOPEL	International Childhood Liver Tumour Strategy Group
siRNA	small interfering RNA

SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
SSC	Sideward Scatter
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TGFβ	Transforming growth factor beta
TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
ZEB1/2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt bzw. an gegebener Stelle im Text erläutert. Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

4 Einleitung

4.1 Hepatoblastom

4.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Hepatoblastom stellt einen malignen embryonalen Lebertumor dar.¹ Auch wenn das Hepatoblastom etwa nur 1 % aller malignen pädiatrischen Erkrankungen ausmacht¹, ist es mit einer Inzidenz von 1,6 Fällen pro 1 Mio. Kindern der häufigste Lebertumor im Kindesalter², wobei eine zunehmende Krankheitshäufigkeit zu beobachten ist.³

Das Hepatoblastom tritt am häufigsten in den ersten drei Lebensjahren auf.⁴ Symptome sind dabei oft eine abdominelle Raumforderung, Fieber, Müdigkeit, Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit.²

Risikofaktoren für das Auftreten des Hepatoblastoms sind Frühgeburtlichkeit und sowohl ein niedriges als auch sehr hohes Geburtsgewicht, wobei sich diese Patientenkohorten durch ein relativ spätes Auftreten der Malignität auszeichnen.⁵ Auch der elterliche Tabakkonsum vor der Konzeption sowie während der Schwangerschaft kann die Entstehung des Hepatoblastoms fördern, der Einfluss anderer Kanzerogene wird noch untersucht.¹ Die meisten Fälle aber treten sporadisch auf,⁴ sodass mutagene Veränderungen verschiedener Gene und Signalwege während der Embryogenese eine mögliche Erklärung zur Krankheitsentstehung liefern. Zusätzlich ist das Auftreten des Hepatoblastoms mit einigen kongenitalen Syndromen wie der Trisomie 18, der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom assoziiert.^{1,5} Dies unterstützend ist zu erwähnen, dass bereits sehr junge Kinder von Hepatoblastomen betroffen sind. Daher ist eine Anhäufung externer Ereignisse, die eine tumoröse Transformation bedingen, unwahrscheinlich.⁶

4.1.2 Diagnostik und Risikoklassifizierung

Die Diagnostik des Hepatoblastoms beinhaltet die Erhebung umfassender Laborparameter, wobei vor allem AFP und β -HCG wichtige prognostische Parameter repräsentieren. Weiterhin erfolgt die Darstellung mittels Ultraschalles, CT und MRT sowie die Sicherung des histologischen Typus mit Hilfe einer Biopsie.^{1,7}

Die verschiedenen Fachgesellschaften beurteilen den Schweregrad und die daraus resultierende Therapie unterschiedlich. Um die Risikostratifizierung zu optimieren und zu vereinheitlichen, wurde von den führenden Forschungsgruppen COG, SIOPEL, GPOH und JPLT das CHIC-Projekt ins Leben gerufen. Dieses Projekt vereinigt die Daten der vorangegangenen Studien und ermöglicht dadurch eine international validierte Einschätzung von Hepatoblastomen.⁸ Grundlage ist weiterhin das PRETEXT-Staging-System, das die Leber in vier chirurgische Sektoren einteilt und die Tumorausdehnung auf diese beschreibt.⁹ Das POST-TEXT-Staging-System wiederum erfasst nach erfolgter Therapie die Ausdehnung des noch bestehenden Tumors.⁸

Weitere prognostische Marker sind das Alter und der AFP-Serumspiegel sowie das Vorhandensein von Metastasen.⁷ Zusätzlich werden weitere Kriterien wie der Befall von Blutgefäßen oder eine Tumorrupturn zum Diagnosezeitpunkt unter den „PRETEXT annotation factors“ zusammengefasst. Dadurch findet eine Einteilung der Hepatoblastome in Risikogruppen von „very low“ zu „high“ statt, die die Behandlung bestimmen.⁸

4.1.3 Therapie und Outcome

Grundsätzlich besteht die Behandlungsstrategie aus einer neoadjuvanten Chemotherapie, die vor allem dem Ziel einer Tumorverkleinerung nachgeht. Danach folgt die chirurgische Resektion des Primärtumors und ggf. bestehender Metastasen, welche unerlässlich für eine kurative Behandlung ist.¹⁰ Daran schließt eine postoperative Chemotherapie an.^{2,7,10} Auch Chemoembolisationen kommen zum Einsatz, um eine Tumorverkleinerung zu erreichen.^{1,11} Lediglich Tumore des histologischen Typus „pure well differentiated fetal epithelial“ können ohne prä- oder postoperative Chemotherapie reseziert werden, da die chirurgische Entfernung allein kurativ ist.¹² Bei schweren PRETEXT IV Tumoren mit schwerwiegender Gefäßinvasion wie auch bei

positiven Schnitträndern nach erfolgter Resektion oder bei entstehender Leberinsuffizienz wird zu einer orthotopen Lebertransplantation geraten, welche mit zunehmender Optimierung der Chemotherapie und der chirurgischen Expertise ein 10-Jahres-Überleben von über 70 % erzielt.^{7,13,14}

Das Standardzytostatikum zur Behandlung von Hepatoblastomen ist Cisplatin. Die Protokolle der einzelnen Gesellschaften greifen außerdem je nach Risikotyp und Behandlungsstadium auf weitere Therapeutika wie Carboplatin, Ifosfamid, Doxorubicin, Vincristin, 5-Fluorouracil und Irinotecan zurück bzw. wenden Kombinationen der Zytostatika wie Cisplatin und Doxorubicin an.^{2,7,10} Die Nebenwirkungen dieser Therapie belaufen sich auf Myelotoxizität, Ototoxizität, Nephrotoxizität und die klassischen Nebenerscheinungen einer zytostatischen Therapie wie Übelkeit, Erbrechen, Schleimhautentzündungen und Haarverlust.^{10,15}

In der Regel sprechen die Patienten gut auf die Therapie an. 90 % der Patienten mit Standard-Risk-Tumoren zeigen dabei sogar ein tumorfreies Überleben.^{1,8,16} Trotz der großen Fortschritte und der stetigen Verbesserung der Chemotherapie haben 45-65 % der Patienten mit „High-Risk“-Hepatoblastomen einen Rückfall nach der Therapie ; das Gesamtüberleben liegt nur zwischen 50-65 %.^{1,8,15} Einen Grund dafür stellt die Entwicklung von Resistenzen dar, die durch die notwendige Langzeitchemotherapie bei vor allem höhergradigen Hepatoblastomen bedingt wird.¹⁵ Ob dies an der Selektion möglicher resistenter Tumorstammzellen liegt oder ob die Zellen allgemein Mechanismen entwickeln, um der zytotoxischen Wirkung zu entgehen, ist näher zu untersuchen.¹⁵

Um das Therapieansprechen und das Outcome vor allem der Patienten mit höhergradigen Hepatoblastomen zu verbessern, sind eine stetige Auseinandersetzung mit neuen Therapieansätzen sowie die internationale Zusammenarbeit und Evaluierung bestehender Behandlungsprotokolle notwendig.

4.1.4 Histologische Einteilung

Hepatoblastome zeichnen sich wie andere embryonale Tumore durch eine große histologische Heterogenität aus.¹⁷ Am häufigsten finden sich Hepatoblastome des epithelialen Typus, der durch gemischt embryonale und fötale Muster charakterisiert

wird, während der zweithäufigste Typ zusätzlich mesenchymale Komponenten enthält.⁴ Etwa 7 % der Hepatoblastome werden als „pure well differentiated fetal epithelial“ eingeschätzt, diese Entität weist eine nur sehr minimale mitotische Aktivität auf und hat die beste Prognose.^{4,17} Eine Subgruppe des epithelialen Typus enthält eine cholangioläre Komponente, während eine andere wiederum makrotubuläre Muster aufweist.¹⁷ Die selten auftretenden teratoiden Hepatoblastome beinhalten zusätzliche zelluläre Komponenten wie endokrine Zellen, muköses Epithel, Melaninpigmente oder Neurone.¹⁸ Der kleinzellige, undifferenzierte Phänotyp des Hepatoblastoms stellt einen sehr aggressiven Subtypus dar und zeichnet sich durch ein schlechtes Ansprechen auf die Chemotherapie und damit einhergehender schlechter Prognose aus.⁴ Die Gruppe der undifferenzierten Hepatoblastome ist für sich wiederum sehr heterogen. Die Entitäten beinhalten meistens „diffuse small cells“, allerdings treten teilweise auch mittelgroße und große Zellen auf.¹⁷ Ferner existiert eine Untergruppe mit rhabdoiden Merkmalen, die eine Abgrenzung zu malignen rhabdoiden Tumoren nur sehr schwer machen.¹⁹ Erst spät aufgetretene hepatische Malignitäten beinhalten oft sowohl Merkmale von Hepatoblastomen als auch von Hepatozellulären Karzinomen (HCC), sodass diese intermediären Tumore als „transitional liver cell tumors“ bezeichnet werden.¹⁷

Auch wenn die Histogenese des Hepatoblastoms noch nicht abschließend geklärt ist, legen das unterschiedliche Ausmaß an Differenzierung, das große Spektrum an Zelltypen sowie ihr unreifer Charakter die Hypothese nahe, dass der Ursprung des Hepatoblastoms bei einer pluripotenten Stammzelle liegt.^{18,20}

4.2 Krebsstammzellen

4.2.1 Tumorheterogenität und Krebsstammzellhypothese

Die meisten Krebsentitäten weisen oft ein sehr heterogenes Repertoire an Zellen auf.²¹ Um dieses Phänomen zu erklären, greift man vor allem auf zwei Hypothesen zurück:

Die Theorie der klonalen Evolution (Clonal Evolution Model) geht von einer mehrstufigen Tumorgenese aus, in der sich gemäß dem darwinistischem Prinzip Populationen mit günstigen Mutationen durchsetzen und expandieren. In diesem klonalen Wachstum führen vererbbare und neuerworbene Mutationen und epigenetische Veränderungen somit zu einer interklonalen Heterogenität.^{21,22}

Dem entgegengesetzt ist das Prinzip der Krebsstammzellen: Gemäß diesem zuerst von *Bonnet* und *Dick* formulierten Model herrscht in Tumoren eine hierarchische Ordnung mit den Krebsstammzellen an der Spitze. Diese sind ähnlich wie adulte Stammzellen in der Lage, durch asymmetrische Zellteilung sowohl den Bestand an Krebsstammzellen konstant zu halten als auch differenzierte Tumorzellen zu erzeugen, die den größten Teil des Tumors ausmachen.^{23,24} Das klassische Model geht dabei von nur sehr wenigen pluripotenten Krebsstammzellen aus, die in der Lage sind, Chemo- und Radiotherapien zu überdauern sowie ein erneutes Wachstum des Tumorgewebes zu initiieren und sogar für die Bildung von Metastasen verantwortlich sind.^{23,25}

Dafür sprechen die Ergebnisse von akuten myeloischen Leukämie-Studien, in der verschiedene Subpopulationen eines Primärtumors in immundefiziente Mäuse transplantiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, erneut einen Tumor auszubilden, analysiert wurden.^{23,25,26} Dabei konnte erstmalig festgestellt werden, dass nur eine spezielle Subpopulation von CD34⁺CD38⁻ Zellen in der Lage waren, eine akute myeloische Leukämie in immundefizienten Mäusen auszulösen.^{24,25} Dasselbe Phänomen dieser tumorinitiierenden Zellen oder Krebsstammzellen konnte schließlich auch in anderen Entitäten wie Brustkrebs²⁷, Darmkrebs²⁸ oder bei Hirntumoren²⁹ beobachtet werden.

Auch wenn Krebsstammzellen viele stammzell-ähnliche Eigenschaften aufweisen, stellt vor allem ihre unkontrollierte Proliferation einen großen Unterschied dar. Gewebsstammzellen residieren meistens in sogenannten Stammzellnischen. Diese

können durch parakrine Signale sowohl die Selbsterneuerung regulieren als auch eine asymmetrische Teilung der Gewebstammzellen zur Nachlieferung von differenzierten Nachfolgerzellen initiieren.³⁰ Die Steuerung der Proliferation durch die Stammzellnischen entfällt allerdings im Tumor. Im Gegenteil fördern die Nischen das weitere Wachstum des Tumors und helfen, den Stammzellcharakter aufrecht zu erhalten.^{30,31}

Zusätzlich bieten die Nischen einen Schutz gegenüber Zytostatika, die die Krebsstammzellen in diesen nur schwer erreichen können. Gleichzeitig stimulieren die umliegenden Zellen der Nische durch die Sekretion unterschiedlicher Zytokine und Faktoren Stoffwechselfvorgänge in den Krebsstammzellen, die die Chemoresistenz zusätzlich erhöhen.³¹ Einen anderen Mechanismus, um dem Einfluss einer Therapie zu entgehen, stellt der vermutete „Ruhezustand“ dar, in dem die Krebsstammzellen verweilen können. Herkömmliche Zytostatika werden vor allem von Zellen aufgenommen, die sich schnell und laufend teilen, und können nur hier einen Zelltod bewirken. Ruhende Zellen allerdings arretieren im Zellzyklus und sind somit vor dem Einfluss der Therapeutika geschützt.^{32,33} Weitere Wege zur Resistenz gegenüber Radio- oder Chemotherapeutika sind die verstärkte Expression von Effluxpumpen³⁴, eine erhöhte DNA-Reparatur-Kapazität oder ein erhöhter Schutz vor Sauerstoffradikalen³⁵ sowie eine erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoffmangelzuständen.³¹

Zusätzlich sind Krebsstammzellen in der Lage, ein mesenchymales Genprogramm zu durchlaufen, mit dessen Hilfe sie den Zellverband verlassen und die Fähigkeit zur Migration und Invasion erwerben können. Die sogenannte „epithelial-to-mesenchymal-transition“ (EMT) stellt somit eine Grundvoraussetzung für die Bildung von Metastasen dar. Eine erhöhte Expression der EMT-Faktoren wie SNAI1, TWIST1 und ZEB1/2 ist außerdem mit verstärkten Tumorigenitätsfähigkeiten und einer erhöhten Chemoresistenz verbunden.^{23,31}

Letztendlich ermöglichen die einzelnen Mechanismen den Krebsstammzellen, eine Therapie zu überleben, sodass eine Selektion der Krebsstammzellen stattfindet, die nach erstem Behandlungserfolg ein erneutes Tumorwachstum initiieren können.³¹ Deshalb sollte stets das Ziel einer zytostatischen Therapie sein, nicht nur den Großteil des Tumors zu eliminieren, sondern auch die resistenten Krebsstammzellen zu beseitigen, um ein

tumorfrees Überleben zu ermöglichen. Vor allem die Therapieresistenz und der Rückfall nach einer erfolgten Behandlung sowie die Heterogenität an Zelltypen unterstützen die Hypothese, dass auch im Hepatoblastom Krebsstammzellen existieren.^{26,30}

4.2.2 Problematik der Erkennung von Krebsstammzellen im Hepatoblastom

Im Erwachsenenalter stellen die meisten Malignitäten Karzinome dar, die in der Regel von differenzierten Zellen ausgehen.³⁶ Daher fallen im Gegensatz zu den pädiatrischen Krebsentitäten in adulten Tumoren Krebsstammzellen mit Merkmalen einer unreifen und undifferenzierten Zelle viel deutlicher auf. Pädiatrische Tumore allerdings sind meistens embryonalen Ursprungs, sodass die Mehrheit der Zellen ohnehin einen unreifen Charakter aufweist. Auf Grund dessen ist die Erkennung einer Krebsstammzelle, die in der Hierarchie weiter oben steht und einen noch unreiferen Zustand aufweisen muss, erschwert. Bis jetzt wird mit Hilfe verschiedenster Marker versucht, eine Population von Krebsstammzellen im Hepatoblastom zu erkennen.

Ein wichtiger Marker ist CD133. Im Hepatozellulären Karzinom, aber auch im Neuroblastom, zeichnen sich CD133-positive Zellen nicht nur durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung aus, sondern weisen gleichsam eine erhöhte Chemoresistenz und ein verstärktes Migrationsverhalten auf.^{37, 38,39} Auch embryonale Stammzellen sowie verschiedene Gewebestammzellen zeigen ein positives Oberflächenprofil für dieses Membranprotein.⁴⁰ Im Hepatoblastom konnten ebenfalls CD133-positive Zellen entdeckt werden. Nach einer Behandlung mit hemmenden CD133-Antikörpern zeigen die Zellen im Rahmen einer „Scratch Wound Healing Assay“ eine verschlechterte Migrationsfähigkeit, sodass CD133 eine wichtige Rolle beim Metastasierungsverhalten zu spielen scheint.⁴¹ Vorangegangene Untersuchungen in unserem Forschungslabor zeigten allerdings, dass CD133 in den etablierten Hepatoblastom-Zelllinien HuH6 und HepG2 bis zu 100 % exprimiert ist und somit keine Subpopulation unterschieden werden konnte. Damit fiel CD133 als Kandidat für die hier durchgeführten Experimente weg.

Gleiches gilt für das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM. Dieses wird sowohl von hepatischen Vorläuferzellen⁴² als auch von Krebsstammzellen des Hepatozellulären Karzinoms⁴³ oder kolorektaler Tumore⁴⁴ exprimiert. Immunhistochemische Studien

allerdings zeigen, dass zwischen 70-100 % der Zellen des Hepatoblastoms positiv für diesen Marker sind.⁴⁵ Auch Oberflächenexpressionsanalysen der Hepatoblastom-Zelllinien HuH6 und HepG2 in unserem Labor konnten eine derart hohe Expression von EpCAM nachweisen. So eignet auch dieser Marker sich nicht dazu, eine kleine Subpopulation von Krebsstammzellen zu unterscheiden.

Diese Zusammenhänge verdeutlichen, welche Schwierigkeit die Suche nach geeigneten Markern für Krebsstammzellen in embryonalen Tumoren mit sich führt, da grundsätzlich alle Zellen einen unreifen Charakter aufweisen. Deswegen sind selbst vielversprechende Marker nicht in der Lage, die unreiferen Krebsstammzellen in pädiatrischen Entitäten zu detektieren.

4.2.3 CD90⁺CD34⁺OV6-Antigen⁺ Zellen als mögliche Krebsstammzellpopulation im Hepatoblastom

Zwei Studien verwendeten für die Detektion von Krebsstammzellen in Hepatoblastom-Gewebeproben die sogenannten „Oval-cell“-Antikörper, OV-1 und OV-6, die vermutlich auf Cytokeratin (CK) 14 und 19 reagieren.⁴⁶ CK14 lässt sich auf hepatischen und pankreatischen Epithelzellen finden. Diese zeigen das Potential zur Differenzierung in hepatoblastenähnliche Zellen und verlieren dabei ihre CK14- Expression, sodass man diesen Marker mit einer potentiellen Subpopulation von Stammzellen in Verbindung bringt.⁴⁷ Tatsächlich lassen sich mit beiden Antikörpern „small epithelial cells“ (SEC) in Hepatoblastom-Schnitten nachweisen, die histologische Gemeinsamkeiten zu den „oval cells“ der Mäuse aufzeigen, die sich bei der Verabreichung von Hepatokarzinogenen bilden und den fötalen humanen Hepatoblasten entsprechen.^{48,49} Auch die SEC exprimieren CK7 und Albumin und sind in der Lage sich entweder in Hepatozyten oder in biliäre Epithelzellen zu differenzieren.⁴⁹

Trotzdem kamen *Ruck et. al.* zu dem Fazit, dass auf Grund des großen Spektrums an Zellen, die in den verschiedenen histologischen Subtypen vertreten sind, die bipotenten SEC nicht den Ursprung des Hepatoblastoms darstellen könnten, sondern eine noch primitivere, ggf. verwandte Vorläuferzelle ursächlich sein müsste.^{20,49,50}

Fiegel et. al. untersuchten die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und CD90 als mögliche Krebsstammzell-Marker für das Hepatoblastom.⁵¹ CD34-positive

hämatopoetische Stammzellen haben das Potential, sich in sämtliche Vertreter der hämatopoetischen Linien zu differenzieren.⁵² Die „oval cells“ der adulten Leber, die einen Kandidaten für Leberstammzellen darstellen, zeigen ebenfalls ein positives Expressionsprofil für CD34.⁵¹ Außerdem ist zu erwähnen, dass während der embryonalen Entwicklung bereits nach wenigen Wochen hämatopoetische Stammzellen in die embryonale Leber einwandern, dort expandieren und Blutzellen unterschiedlicher Art bilden.⁵³ Daher ist es wahrscheinlich, dass die unreife Leber und damit Krebsstammzellen des Hepatoblastoms ein ähnliches Profil wie die blutbildenden Zellen aufweisen könnten. Zusätzlich spielen bei anderen Tumorentitäten, vor allem bei den leukämischen Erkrankungen, CD34 positive Tumorstammzellen eine Rolle.^{24,25,54}

Auch wenn bis jetzt noch keine abschließende Charakterisierung von Leberstammzellen gelungen ist, zeigen sowohl die bipotenten „oval cells“⁵⁵ als auch die „human liver stem cells“, die eher hepatische Lineagemarker tragen,⁵⁶ ein CD90-positives Oberflächenprofil. Auch im Hepatozellulären Karzinom zeigen CD90-positive Zellen Eigenschaften von Krebsstammzellen: Sie sind in der Lage, die Tumorbildung in immundefizienten Mäusen zu initiieren und konnten im Blutkreislauf der HCC-Patienten als zirkulierende und damit mögliche metastasierende Zellen identifiziert werden.^{57,58} Auch im Hepatoblastom zeigt sich eine erhöhte Expression von CD90 im Vergleich zur gesunden Leber⁵⁹.

Fiegel et al. konnten in ihrer immunhistochemischen Studie Zellen in den Hering-Kanälen entdecken, die neben biliären und hepatischen Lineagemarkern auch CD34, CD90 und c-kit aufwiesen und damit den in der adulten Leber vermuteten „oval cells“ ähnelten. Interessanterweise waren diese Zellen nicht in periportalen Arealen oder zwischen Hepatozyten lokalisiert, sondern lediglich in den atypischen Kanälen. Neben diesen „oval-cell like cells“ konnten periduktal CD56 und CD90 doppel-positiv sowie einzelne c-kit positive Zellen im Bindegewebe gefunden werden. SEC konnten nur sporadisch nachgewiesen werden und exprimierten nur in Einzelfällen Stammzellmarker wie CD34 oder c-kit. Die Autoren kamen zu dem Fazit, dass diese Zellen nicht das tumoröse Äquivalent der „oval cells“ darstellen, sondern vermutlich noch primitivere Stammzellen repräsentieren. Weiterhin stellten die Autoren die Hypothese auf, dass es unterschiedliche Typen von Krebsstammzellen geben könnte.⁵¹

Vorangegangene Arbeiten in unserem Labor haben bereits die Kombination von CD90, CD34 und dem OV-6-Antikörper untersucht, um Krebsstammzellen im Hepatoblastom aufzuspüren. Tatsächlich konnte eine dreifach-positive Subpopulation innerhalb der Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 entdeckt werden. Zellen, die für zwei der Marker positiv waren, zeigten stets auch eine Positivität für den dritten Marker. Diese CD90⁺CD34⁺OV-6-Antigen⁺ Zellen zeichneten sich durch eine erhöhte Expression von Pluripotenzmarkern aus und wiesen ein verstärktes Migrationsverhalten auf.⁶⁰

4.3 Krebsstammzellen als Ziel einer zytotoxischen Therapie

4.3.1 Pluripotenz und Pluripotenzmarker

Neben einem für Stammzellmarker positiven Oberflächenprofil müssen die Krebsstammzellen eine wichtige Voraussetzung erfüllen: Sie müssen in Richtung Pluripotenz programmiert sein. Unabhängig davon, bei welchem Zelltyp der Ursprung der Krebsstammzellen liegt, müssen die Zellen dedifferenziert bleiben und ähnlich wie Keimzellen während der Embryonalentwicklung Stammzeleigenschaften erwerben und aufrecht erhalten.⁶¹

In normalen Stammzellen wird diese Pluripotenz durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren ermöglicht, die die Differenzierung der Stammzellen hemmen und sie zu Selbsterneuerung befähigen. Dabei übernimmt Oct4, welcher zu der Familie der POU- Transkriptionsfaktoren gehört, die Rolle eines Masterregulators.⁶² Oct4 ist sowohl für den Erhalt der Pluripotenz notwendig als auch für die Inhibition von Faktoren zuständig, die eine Differenzierung bewirken. Zusammen mit Sox2 aktiviert Oct4 weitere Transkriptionsfaktoren wie Nanog, der ebenfalls wichtig ist, um die Differenzierung zu unterdrücken.⁶³ Die Faktoren unterliegen strengen Regulationsmechanismen, da sie essenziell für die Entwicklung sind. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen nimmt die Expression dieser Pluripotenzmarker ab, ihre Promotorregionen zeigen Hypermethylierungen auf und sind inaktiv.⁶² *Yamanaka* et al. gelang es durch die vektorielle Transfektion der vier Yamanaka-Faktoren, Oct4, Sox2, Klf-4 und c-Myc, adulte Fibroblasten zu Stammzellen zu reprogrammieren. Die Autoren zeigten somit, dass Zellen mit Hilfe dieser Faktoren pluripotent werden können.⁶⁴ In Krebsstammzellen

sind diese Faktoren ebenfalls wieder verstärkt exprimiert, sodass diese die Eigenschaften und Fähigkeiten von Stammzellen zeigen können. Wie genau die Reaktivierung dieser Pluripotenzgene stattfindet, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt.⁶⁵

4.3.2 AID- Schlüssel zur Reprogrammierung von Pluripotenzgenen?

Dabei könnte die Zytidin-Desaminase „activation-induced cytidine deaminase“ (AID) eine Rolle spielen. AID wurde zunächst als ein B-zellspezifisches Protein entdeckt. Das für die Antikörper-Diversität in B-Lymphozyten verantwortliche Enzym kann aufgrund seiner Fähigkeit, Zytidin-Reste zu deaminieren, DNA-Sequenzen verändern oder auch Doppelstrang-Brüche verursachen. Es stellt somit bei unkontrollierter Expression eine Gefahr für die Integrität des Genoms dar. AID wird u.a. für die das Burkitt-Lymphom verursachenden Translokationen zwischen c-Myc und dem IgH Locus verantwortlich gemacht und triggert auch bei der chronischen myeloischen Leukämie den Übergang zur Blastenkrise.⁶⁶ Lange ging man davon aus, dass die Expression von AID auf lymphogenes Gewebe beschränkt ist. Bei der Untersuchung von pluripotentem Gewebe konnte allerdings AID in Oozyten sowie embryonalen Keim- und Stammzellen nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass AID an der epigenetischen Reprogrammierung beteiligt sein könnte.⁶⁷ Vor allem während den ersten Zellteilungen der sich bildenden Zygote müssen Demethylierungen stattfinden, um das epigenetische Silencing zu überwinden. Da bis jetzt keine direkte Demethylase entdeckt werden konnte, ist ein AID-abhängiger Mechanismus denkbar. Dabei wird ein durch AID desaminiertes Zytidin auf Grund eines Basen-Mismatches erkannt und vom „Base-Excision-Repair“-System durch ein unmethyliertes Zytidin ausgetauscht.⁶⁷

Tatsächlich konnten *Bhutani* et al. die kritische Rolle von AID bei der Reprogrammierung von Pluripotenzgenen nachweisen. Sie analysierten Heterokaryone, die sie durch die Fusion von menschlichen adulten Fibroblasten und embryonalen Stammzellen von Mäusen erzeugten, hinsichtlich der Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog. Die nach der Transfusion steigende Expression beider Faktoren ließ sich tatsächlich auf eine Demethylierung und damit Aktivierung der Promoterregionen zurückführen. Ein Knock-Down von AID mittels siRNA führte dabei wieder zu einer reduzierten Expression von Nanog und Oct4 und zur Inhibition der Promoter-Demethylierung, sodass man AID

die Eigenschaften einer indirekten Demethylase während der Induktion von Pluripotenz zusprach.⁶⁸ Kumar et al. erzeugten induzierte pluripotente Stammzellen, indem sie die vier Yamanaka-Transkriptionsfaktoren über Vektoren in AID-Knockout- und AID-Wildtyp-Fibroblasten einschleusten. Dabei zeigten die AID-Null-Zellen zunächst eine effizientere und schnellere Reprogrammierung. Nach einigen Wochen allerdings differenzierten die Zellen. Danach waren sie nicht in der Lage, den pluripotenten Status zu erhalten. Die Promotorregionen der Pluripotenzgene wiesen im Vergleich zu den AID-Wildtyp-Zellen eine Hypermethylierung auf. Daraus schlussfolgerte man, dass AID vor allem beim Erhalt der induzierten Pluripotenz und der Aktivierung von sekundären Pluripotenzgenen eine Rolle spielt.⁶⁹

Tatsächlich zeigen viele Tumore eine erhöhte Expression von AID.^{70,71} Ein Knock-Down von AID führte in Blasenkrebszellen zu einer verminderten Proliferation und schränkte die Fähigkeit zur Migration und Invasion ein.⁷¹ Auch in Gewebeproben von Hepatozellulären Karzinomen sowie in der Hepatoblastomzelllinie HepG2 zeigte sich eine im Vergleich zur gesunden Leber erhöhte Expression von AID. HepG2-Zellen, deren basale AID-Proteinmengen zwar nur gering sind, konnten dabei durch TGF β zur Steigerung der Proteinmengen stimuliert werden. Daher sprachen die Autoren der aberranten Expression von AID eine Rolle bei der Bildung von Tumoren in epithelialen Gewebe zu.⁷²

Vorarbeiten in unserem Labor untersuchten die AID-Expression in den CD90⁺ CD34⁺OV-6⁺ Zellen innerhalb der Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2. Die Forschenden konnten dabei bereits eine erhöhte Expression von AID im Vergleich zu den dreifach-negativen Zellen feststellen. Welche Rolle AID in dieser Population spielt, ist weiter abzuklären.

4.3.3 Gezielte Inhibierung von AID

Die Eliminierung von Krebsstammzellen in Rahmen einer Therapie ist wie bereits erwähnt essenziell für den Behandlungserfolg. Sollten diese der zytotoxischen Wirkung entgehen und überdauern, sind sie in der Lage, zu einem erneuten Tumorwachstum beizutragen. AID scheint einen tragenden Faktor bei der Induktion von pluripotenten Genen darzustellen. Zusätzlich ist eine aberrante Expression von AID mit Mutationen

und Tumorgenese assoziiert. Es stellt sich daher die Frage, welche Rolle AID in Krebsstammzellen spielt. Kann AID auch in diesen das epigenetische Silencing überwinden und dadurch die Dedifferenzierung und Transition zur undifferenzierten, proliferativen und invasiven (Krebs-)Stammzelle triggern? Wäre eine gezielte Inhibition von AID eine Möglichkeit, um Krebsstammzellen insgesamt empfänglicher für ein Standardtherapeutikum zu machen oder sie dadurch sogar ganz zu eliminieren?

Tatsächlich gibt es einige Substanzen, die über verschiedene Mechanismen die Aktivität von AID hemmen können, indem sie gezielt das Enzym inhibieren oder über Regulatoren indirekt in die Enzymaktivität eingreifen.

Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR) ist vorrangig als ein DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DNMT-Inhibitor) bekannt. In vielen Tumoren sind die Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen hypermethyliert und damit inhibiert. Um dieses epigenetische Silencing zu erhalten, müssen Methyltransferasen nach jeder Replikation erneut Methylgruppen vornehmlich an CpG-Inseln in den Promotorregionen einführen. In erster Linie soll Decitabine dies als Zytosinanalogon verhindern. Nach Aufnahme in die Zelle kann es während der DNA-Replikation in die Doppelhelix eingebaut werden. Methyltransferasen erkennen 5-aza-CdR als natürliches Substrat und initiieren die Methylierungsreaktion. Dadurch entstehen allerdings kovalente Bindungen zwischen der Transferase und Decitabine, was letztendlich die Funktion des Enzyms blockiert und dieses zur Degradierung freigibt.^{73,74} Dabei zeigt Decitabine vor allem bei hämatopoetischen Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom oder der AML und CMML Wirkung.^{75,76} Außerdem beweist Decitabine eine gezielte Wirkung auf Krebsstammzellen. Bei Leukämien, aber auch beim Mamma-CA und Blasen-CA reduzierte Decitabine die Fähigkeit der Krebsstammzellen zur Selbsterneuerung und zur Bildung von Sphäroiden und erhöhte die Sensitivität gegenüber Zytostatika wie Cisplatin.^{76,77}

Decitabine wirkt jedoch nicht nur als DNMT-Inhibitor, sondern führt auch zu einer Suppression von AID: *Tsai* et al. konnten die AID-Inhibition durch Decitabine in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji nachweisen. Decitabine nahm dabei keinen Einfluss auf die mRNA-Level von AID, sodass man von einer post-transkriptionellen Inhibition ausging. Interessanterweise wurde festgestellt, dass Zellen, die AID überexprimierten,

ebenfalls erhöhte DNMT-Level aufwiesen. Umgekehrt führte ein AID-Knockdown zu einer verminderten Stabilität von DNMT und einer erhöhten Induktion von zuvor stillgelegten Tumorsuppressorgenen. Folglich stellte man die Hypothese auf, dass AID zur Stabilisierung der DNMT beiträgt.⁷⁸

Zebularine (1-β-D-Ribufuranosyl-2(1H)-pyrimidinone) stellt ebenfalls ein Cytosin-Analogon dar und wirkt als DNMT-Inhibitor. Der Mechanismus der Inhibition folgt dabei dem gleichen Prinzip wie Decitabine. In Blasenkrebszellen zum Beispiel konnte Zebularine zur Demethylierung der Promotorregion des Tumorsuppressorgens p16 beitragen.⁷⁹ Aber auch bei der Inhibition von Krebsstammzellen zeigt Zebularine Wirkung: Im Pankreas-CA führte Zebularine zur Reduktion der CD133-positiven Krebsstammzellpopulation und konnte ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Bildung neuer Tumore beeinträchtigen. Außerdem führte Zebularine zu einer verminderten Expression von Pluripotenzgenen in diesen Zellen.⁸⁰ Zebularine agiert auch als Inhibitor für Zytidin-Desaminasen,⁸¹ sodass die Frage entsteht, ob es auch die Zytidin-Desaminase AID inhibieren kann.

AID unterliegt sowohl posttranskriptional als auch posttranslational unzähligen Regulationsmechanismen. Um eine mutagene Überaktivität im Kern zu verhindern, befindet sich das meiste AID im Zytoplasma. Dort wird es von dem „Heat shock protein 90“ (HSP90)-Komplex stabilisiert, an den AID mit seinem N-Terminus bindet. Dies verhindert den proteasomalen Abbau und unterstützt die zytoplasmatische Retention.⁶⁶ Der HSP90-Komplex besteht dabei aus mehreren Chaperonen und Hilfsproteinen und ist für die Stabilisierung vieler Enzyme, Transkriptionsfaktoren und intrazellulärer Rezeptoren verantwortlich.⁸² Eine Inhibition dieser Stabilisierung durch einen gezielten Angriff auf den HSP90-Komplex würde den proteasomalen Abbau von AID verstärken. Dieses Ziel verfolgt der HSP90-Inhibitor Tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG).⁸³ Tatsächlich führte die Inhibition des HSP90-Komplexes zur reduzierten AID-Proteinexpression in B-Zellen und konnte sowohl die somatische Hypermutation als auch den Klassenwechsel einschränken.⁸⁴ Die Nutzung von HSP90-Inhibitoren stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Aktivität von AID in Krebszellen und Tumorstammzellen zu beeinträchtigen.

4.4 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel dieser Doktorarbeit stellt die Entwicklung von Strategien dar, um Krebsstammzellen im Hepatoblastom gezielt zu eliminieren. Dabei werden zunächst die in Tumor-Sphäroiden sowie die durch eine Cisplatin-Behandlung angereicherten Zellen hinsichtlich der Expression der Oberflächenmarker CD90, CD34 und des OV6-Antigens untersucht. Denn diese Marker konnten in vorangegangenen Experimenten eine potente Krebsstammzellpopulation im Hepatoblastom charakterisieren. Daher werden ihre Eigenschaften analysiert. Das Hauptaugenmerk wird auf das Oberflächenprofil, die Expression der Pluripotenzmarker und vor allem auf die Zytidin-Desaminase AID gelegt. Dabei steht die Frage nach einer Abhängigkeit des Stammzellcharakters von der AID-Aktivität im Vordergrund. Zur Beantwortung dieser Frage werden das Enzym über einen siRNA vermittelten Knock-Down inhibiert und die Auswirkungen auf die Pluripotenzmarker und die Transkription der oben aufgeführten Oberflächenproteine analysiert. Sollte tatsächlich eine Abhängigkeit vorliegen, soll der Einfluss von AID-Inhibitoren auf die Krebsstammzellpopulation abgeschätzt werden. Dabei werden die in der Einleitung vorgestellten Substanzen Decitabine, Zebularine und Tanespimycin hinsichtlich ihrer Wirkung auf die dreifach-positive Krebsstammzellpopulation in den etablierten Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 untersucht. Ihre Auswirkungen auf die Zellvitalität sowie die Transkription der Pluripotenzmarker und AID werden analysiert. Final soll die Fragestellung erörtert werden, ob durch die Inhibition von AID eine Eliminierung von Krebsstammzellen möglich ist, sodass diese Inhibitoren synergistisch eine Therapie von vor allem High-Risk- Hepatoblastomen mit Cisplatin ergänzen könnte, um eine Selektion von resistenten Krebsstammzellen zu verhindern. Dazu werden die Zellen mit den möglichen AID-Inhibitoren vor einer Zugabe von Cisplatin behandelt und erneut der Anteil der Krebsstammzellpopulation über FACS-Messungen sowie der Einfluss auf mRNA-Ebene und die Zellvitalität mittels MTT untersucht.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Materialien

5.1.1 Geräte und Apparaturen

Tab. 1: Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller
Absaug-Handgriff <i>VacuuHandControl VHC pro</i>	Vacuubrand GmbH und co. KG (Wertheim, Deutschland)
Autoklav	Systemec GmbH (Linden, Deutschland)
Durchflusszytometrie <i>BD FACSCanto II</i>	BD Biosciences (San José, USA)
ELISA-Spektrophotometer Magellan Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Eisbehälter	BioCision LLC (Mill Valley, USA)
Eismaschine <i>FM-80KE-HC</i>	Hoshizaki Europe Limited (Shropshire, UK)
Gefrierschrank <i>CryoCube F570h</i>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Glasbehälter	Schott AG (Mitterteich, Deutschland)
Inkubator <i>Galaxy 170 S</i>	New Brunswick by Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
Kühlschrank <i>ProfiLine</i>	Liebherr-International S.A. (Bulle, Schweiz)
Kryogener Gefrierschrank	Cryo-Tech (Geilnau, Deutschland)
MACS-Ständer <i>MiniMACS-Separator</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikroskop <i>Typ Wilovert 30</i>	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrozentrifuge <i>Heraeus Fresco 21</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Multipipette stream	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 10, 20, 200, 1000µl	Eppendorf Research plus (Hamburg, Deutschland)

Pipette <i>ErgoOne 20,200,1000 µl</i>	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe <i>Pipetboy 2</i> , akku-betrieben	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
Pipettierhilfe <i>Pipetus</i> , akku-betrieben	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, (Eberstadt, Deutschland)
qPCR-Maschine <i>Stratagene Mx3005P</i>	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 <i>Thermo Scientific Hera SAFE KS</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Spectrophotometer <i>NanoVue</i>	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Timer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tischständer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Vortexer <i>neoVortex D-6012</i>	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Waage	Kern (Balingen, Deutschland)
Wasserbad	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Wärme-Cycler <i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge <i>Mega Star 1.6R</i>	VWR International LLC (Radnor, USA)
Zentrifuge <i>Mini Star D-6020</i>	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Zeiss Fotomikroskop	Zeiss (Jena, Deutschland)

5.1.2 Software

Tab. 2: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva 6.1.3 Software	BD Biosciences (San José, USA)
BIAS 11.12	
Flowjo 7 Software	BD Biosciences (San José, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Inc. (San Diego, USA)
Magellan Data Analysis Software	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., (Redmont, USA)
Mx Pro Mx3005pr	Agilent (Santa Clara, USA)
Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software	Zeiss (Jena, Deutschland)

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einfrier-Tube CryoPure 1,6 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Einmalpipette <i>Stripette</i> steril (5, 10, 25ml)	Corning Incorporated (New York, USA)
Einweg-Zählkammer <i>C-Chip</i> für 2 Tests	NanoEnTek (Seoul, Südkorea)
Handschuhe Peha-Soft nitrile (S, M, L)	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
OP Abdecktuch, steril	Medline International France SAS (Châteaubriant, Frankreich)
Pasteur Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich (Mainz, Deutschland)
PCR-Einzelgefäße <i>Multiply-Pro</i> 0,2 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
PCR TW 8-Tube Strip 0,2ml	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)
PCR 8-Cap Strip	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)

Pipettenspitzen <i>Tip One</i> , steril (10/20, 20, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen <i>Combitips advanced</i> Multipipette (0,5; 1; 2,5; 5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Röhrchen <i>Cellstar</i> , steril (15, 50ml)	Greiner Bio-one International GmbH, (Frickenhausen, Deutschland)
Rundboden-Polystyrol-Röhrchen Falcon 5 ml, steril (FACS-Röhrchen) Safe-Lock Tubes 2 ml	Corning Inc. (New York, USA) Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vaccum-Filtrations-System <i>Stericup Quick Release</i> 500 ml, steril	Millipore by Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Zell-Einfrier-Kontainer <i>CoolCell</i>	BioCision LLC (Mill Valley, USA)
Zellkulturflaschen 75 cm ² , steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkultur-Platten <i>Cellstar</i> , steril (6, 24, 96-Well-Platten)	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten mit zellabweisende Oberfläche, 24-Well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

5.1.4 Kits

Tab. 4: 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)

5.1.5 Chemikalien und Agenzien

Tab. 5: Chemikalien, 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)
Bovines Serumalbumin 100 g	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Mercaptoethanol	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Cisplatin	TEVA Generics GmbH (Ulm, Deutschland)
Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine)	Abcam (Cambridge, UK)
Dimethyl-Sulfoxid (> 99,5 %) 100 ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dubecco's Phosphate-Buffered Saline 500 ml, ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
EDTA (0,5M) 100 ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Ethanol (70 %) 5 L	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
FACSFlow 20 L	Beckton, Dickinson and Company by BD Biosciences (San José, USA)
FACS Shutdown Solution 5 L	BD Biosciences (San José, USA)
FACS Clean Solution 5 L	BD Biosciences (San José, USA)
Fetal Bovine Serum 500 ml, heat inactivated	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Opti-MEM	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Tanespimycin (17-AAG)	Tocris by biotechne (Minneapolis, USA)
Trypan Blue Stain (0,4 %) 100 ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)

Zebularine (1-β-D-Ribofuranosyl-2(1H)-pyriminone) Tocris by biotechne (Minneapolis, USA)

5.1.6 Primer für quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion

Tab. 6: Primerpaare für qPCR

Transkript	Forward/Reverse	Sequenz
ACTB	For	GCCCTGAGGCACTCTTCCA
	Rev	CGGATGTCCACGTCACACTTC
AID	For	TCTTGATGAACCGGAGGAAG
	Rev	AGCCGTTCTTATTGCGAAGA
Albumin	For	TGCACAGAATCCTTGGTGAA
	Rev	TTCACGAGCTCAACAAGTGC
CD34	For	CAACACCTAGTACCCTTGGAAGT
	Rev	ACTGTCGTTTCTGTGATGTTTGT
CD90	For	ATCTCCTCCCAGAACGTC
	Rev	ATCTCTGCACTGGAACCTG
c-myc	For	CGGTGCAGCCGTATTTCTAC
	Rev	CAGCAGCTCGAATTTCTTCC
E-Cadherin	For	CCTGGGCAGAGTGAATTTTG
	Rev	GAAACCGTAGAGGCCTTTTG
EpCAM	For	CGCAGCTCAGGAAGAATGTG
	Rev	TGAAGTACACTGGCATTGACG
KRT-14	For	AGAGAAGAACCGCAAGGATG
	Rev	AATCTCCAGGTTCTGCATGG
Nanog	For	GAACTCTCCAACATCCTGAACC

	Rev	GCGTCACACCATTGCTATTC
Oct4	For	GAGGCAACCTGGAGAATTTG
	Rev	CGGTTACAGAACCACACTCG
SNAI1	For	CTCTTTCCTCGTCAGGAAGC
	Rev	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAC
TWIST	For	CAAGCTGAGCAAGATTCAGACC
	Rev	CAGCTTGCCATCTTGGAGTC
Vimentin	For	TCCACGAAGAGGAAATCCAG
	Rev	GGCTTGAAACATCCACATC

5.1.7 Antikörper für Durchflusszytometrie

Tab. 7: Antikörper für FACS

Antikörper	Firma
IgG-FITC, Mouse IgG1 κ Isotyp, Clon P3.6.2.8.1	Invitrogen by life technologies (Carlsbad, USA)
IgG-BV421, Mouse IgG1 κ Isotype control Klon MOPC-21	BioLegend (San Diego, USA)
IgG-APC, Mouse IgG1 κ Isotype control Klon MOPC-21	BioLegend (San Diego, USA)
α -human CD90-FITC, Mouse IgG1 κ , Klon 5E10	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-Human CD34-BV421, Mouse IgG1 κ , Klon 581	BD Horizon by BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Human/Rat OV6-APC Monoclonal Mouse IgG1 Clone # OV-6	RD Systems (Minneapolis, USA)

5.1.8 Sequenzen siRNA

Tab. 8: Sequenzen siRNA

siRNA	Sequenz
AID	UUCAAAAUGUCCGCUGGGC
Scrambled Control	CGGCUGCCACGUGGAAUUG

5.1.9 Nährmedien und Zusätze

Tab. 9: Nährmedium für adhärenente Zellen

Medium bzw. Zusatz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX 500 ml, steril	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Fetal Bovine Serum 500 ml, hitzeinaktiviert 1:10	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Gentamycin (50 mg/ml) 1:250	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
GlutaMAX Supplement 1:500	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)

Tab. 10: Nährmedium für Tumor-Sphäroid-Assay

Medium bzw. Zusatz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX 500 ml, steril	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
B27-Supplement 1:50	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
EGF 20ng/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FGF 20ng/ml	Perprotech, (Rocky Hill, USA)
N2-Supplement 1:100	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)

5.1.10 Puffer

Tab. 11: Puffer für Durchflusszytometrie

Medium bzw. Zusatz	Hersteller
Bovines Serumalbumin 2,5%	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Phosphate-Buffered ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺ 500ml	Gibco by life technologies (Carlsbad, USA)

5.1.11 Zelllinien

Für die hier durchgeführten Experimente wird auf die Hepatoblastom-Zelllinien HuH6 und HepG2 zurückgegriffen. HuH6-Zellen wurden erstmalig 1985 aus dem Hepatoblastom eines 12 Monate alten männlichen Säuglings isoliert. Der histologische Typus ist gemischt, vorrangig sind embryonale Muster vertreten. Die Zelllinie entstammt der „Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank“ (JCRB).^{85,86}

Das Primärgewebe, aus dem die HepG2-Zelllinie 1975 etabliert wurde, entstammt einem 15-jährigen Jungen mit einem Hepatoblastom des histologischen Typus „pure well-differentiated fetal epithelial“. Die HepG2-Zellen wurden von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) erworben.^{85,87}

5.2 Angewandte Methoden

5.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Hepatoblastom-Zelllinien HepG2 und HuH6 werden in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Beide Zelllinien werden in einem 3-4 Tage Rhythmus passagiert. Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und dann mittels Accutase-Lösung für 10-15 min bei Raumtemperatur abgelöst. Die vereinzelteten Zellen werden dann in neue 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Als Nährmedium dienen 20 ml DMEM-Glutamax mit 10 % FBS, und 2,5 mg/ml Gentamicin. Die HuH6-Zellen werden mit einer Zelldichte von ca. 1x10⁶ und die HepG2-Zellen von 2,5x10⁶ ausplattiert. Die neuen Flaschen werden wieder im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl mittels Trypan-Blau-Methode ist sowohl für die Passagierung der Zellen als auch bei der Durchführung der Experimente notwendig. Dazu werden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt. Aus dieser Lösung werden 10 µl in eine Neubauerzählkammer überführt und die einzelnen Zellen in den vier Quadranten gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl in der ursprünglichen Zellsuspension wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{n}{4} * F * 10^4 * V$$

n = ausgezählte Zellzahl in den vier Quadranten

F= Verdünnungsfaktor in Trypanblau (hier =10)

V = Volumen der Ausgangslösung (ml)

5.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) stellt ein Verfahren dar, mit dem sich u. a. quantitative Aussagen über Oberflächenantigene und intrazelluläre Proteine machen lassen. Diese werden mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern gefärbt, deren Emissionen Rückschlüsse auf die Proteinmenge zulassen. Die zu analysierenden Zellen werden zunächst gründlich vereinzelt.

Nachdem die Zellzahl mittels Trypanblau-Methode ermittelt wurde, werden pro Färbung 1×10^6 Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und auf die FACS-Tubes verteilt. Dabei ist zu beachten, dass auf Eis gearbeitet wird und die Puffer gekühlt sind, um eine Verlagerung der extrazellulären Antigene ins Zellinnere zu verhindern. Die Proben werden für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet absetzt. Der Überstand wird verworfen, eine Restflüssigkeit von etwa 100 µl verbleibt. Die Antikörper werden in der entsprechenden Menge hinzu pipettiert und die Proben für wenige Sekunden gevortext. Im Anschluss folgt eine Inkubation der Proben für 30 min auf Eis im Dunkeln. Die Zellen werden dann mit 2 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und erneut für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen. Um das Zellpellet für die Messung aufzulösen, werden zwischen 300-500 µl Puffer hinzugefügt und die Proben bis zur Messung auf Eis bewahrt. Die Messung wird an dem FACS-Gerät BD FACS Canto II mit Hilfe der entsprechenden Software BD FACSDiva Software 6.1.3 durchgeführt. Die Proben werden vor der Messung nochmals gevortext.

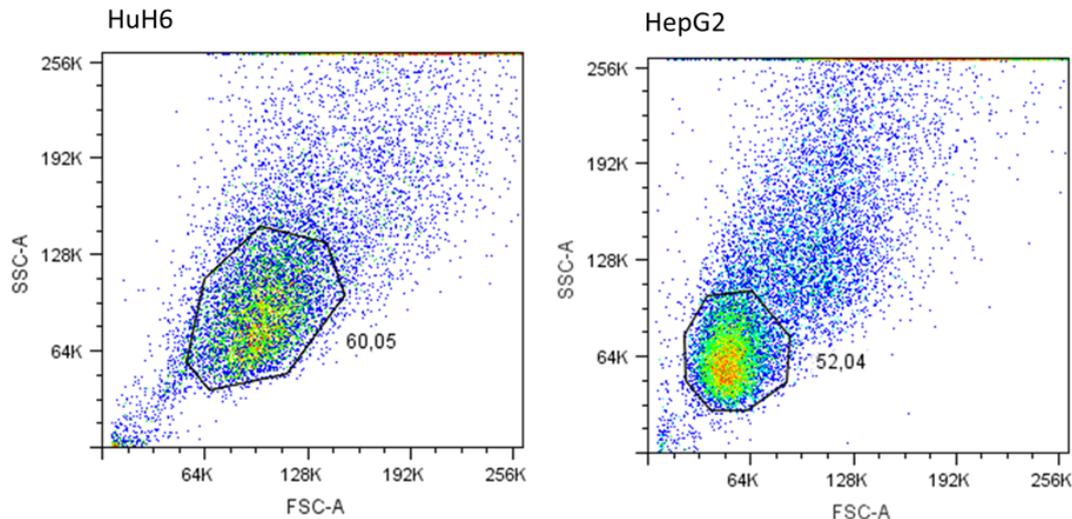


Abb. 1: Darstellung der HuH6- und HepG2-Zellen im Forward (FSC)/Sideward (SSC)-Scatter, Gating nach lebenden Zellen

Zu Beginn erfolgt die Auswahl der vitalen Zellen im Forward/Sideward-Scatter, sodass anhand der Größe und Granularität die entsprechende Population für die Analyse bestimmt werden kann. Des Weiteren wird dadurch versucht, tote Zellen als auch Zellfragmente sowie Dubletten, also unvereinzelte Zellen, von der Analyse

auszuschließen. Mittels ungefärbter Proben und Isotyp-Kontrollen der jeweiligen Antikörper werden eine Verfälschung der Ergebnisse durch Autofluoreszenzen verhindert und die Grenzen für Positivität bei der Fluoreszenzauswertung gesetzt. In der Punktwolken-Darstellung (Dot-Plot) lassen sich mehrere Antigene gleichzeitig abbilden. Jedes Ereignis wird als eigener Punkt und die Kanalintensität eines Fluorophors auf der entsprechenden Achse dargestellt. Durch das Setzen von Gates können doppelt-negative, einfach-positive und doppelt-positive Zellen voneinander unterschieden und ihr prozentualer Anteil an der Bezugspopulation bestimmt werden. Im Histogramm wird die Intensität nur eines einzelnen Fluoreszenzkanals dargestellt. Diese findet sich auf der Ordinate, während die Anzahl der Ereignisse auf der Abszisse abgebildet ist. Durch Überlagerungen mehrerer Histogramme lässt sich die Expression eines Oberflächenmarkers auf den Populationen vergleichen. Die Auswertung wird mit Hilfe der Analyse-Software Flowjo 7 durchgeführt.

5.2.4 Isolation von mRNA

Die Gewinnung von mRNA erfolgt mit Hilfe des RNA-Isolierungs-Kit „Extract me“ gemäß dem beiliegenden Protokoll. Dabei werden einem Zellpellet mit einer Größe von etwa 3×10^7 Zellen 600 μl RNA Lysis Puffer hinzugefügt. Das Zelllysate wird für etwa 60 s gevortext, im Anschluss werden 600 μl 70%iges Ethanol hinzugegeben. Das Lysat wird nun in eine Minisäule (RNA Purification Column) gefüllt. Diese Säule wird bei 14000 U/min für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Prozedere wird mit dem restlichen Lysat wiederholt. Als nächstes wird in die Säule 700 μl des RW1-Puffers (RNA-Waschpuffer) hinzugefügt, im Anschluss erfolgt die 15 s lange Zentrifugation bei 14000 U/min. Der Durchfluss wird verworfen. In die Säule wird nun 500 μl des RW2-Puffers hinzugegeben, worauf wieder eine 15 s lange Zentrifugation bei 14000 U/min folgt. Der Durchfluss wird erneut verworfen und die Waschung mit 500 μl des RW2-Puffers wird für 90 s bei 14000 U/min wiederholt. Nun erfolgt die Überführung der Minisäule auf ein 2 ml Safe-Lock Tube, das zur Endlagerung der gewonnenen mRNA genutzt werden soll. Je nach Zellpelletgröße wird zwischen 50 μl bis 100 μl REB-Puffer (RNA-Eluierungspuffer) auf die Membran pipettiert. Das Safe-Lock Tube inkl. der Säule wird nun bei 14000 U/min für 1 min zentrifugiert. Die isolierte RNA kann anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

5.2.5 Herstellung von cDNA

Die reverse Transkription der mRNA zu Herstellung von cDNA erfolgt mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kits gemäß beiliegendem Protokoll. Zu Beginn muss die RNA-Konzentration der Proben bestimmt werden. Dazu wird ein Spektrophotometer genutzt, welches die Konzentration (c) in ng/μl ermittelt. Zu Herstellung des Mastermixes pro Probe wird eine RNA-Menge von 100 fg-1 μg benötigt, wobei in den hier verwendeten Ansätzen eine RNA-Menge von 1 μg genutzt wird. Der Mastermix setzt sich wie folgt zusammen:

Tab. 12: Mastermixzusammensetzung für Reverse Transkription

Mastermix	Pro Ansatz 20 μl
iScript Reaction Mix	4 μl
iScript Reverse Transkriptase	1 μl
Nuklease-freies Wasser	Variabel: Volumen ₁ = 15 μl - Volumen ₂
RNA	Variabel: Volumen ₂ = 1000 ÷ c (RNA-Konzentration) in μl

Die Ansetzung des Mastermix erfolgt in 0,2 ml Einzelgefäßen und soll auf Eis stattfinden. Die Einzelgefäße werden zentrifugiert und in einen Thermocycler überführt, in dem die Temperaturbedingungen zur reversen Transkription hergestellt werden können.

Diese findet nach folgendem Schema statt:

Tab. 13: Ablaufschema der reversen Transkription im Thermocycler

Schritt	Dauer und Temperatur
Priming	5 min bei 25 °C
Reverse Transkription	20 min bei 46 °C
Inaktivierung der Reverse Transkriptase	1 min bei 95 °C
Aufbewahrung der Proben	Aufbewahrung bei 4 °C

Die hergestellte cDNA ist stabil und kann nun bei -20 °C gelagert werden.

5.2.6 Quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion fußt auf dem Prinzip der klassischen PCR. Anhand dieser Kettenreaktion lassen sich durch die Vervielfältigung von Nukleinsäuren und die Nutzung von fluoreszierendem Farbstoff quantitative Aussagen über die Expression von Genen in Zellpopulationen machen.

Zur Herstellung der Reaktionslösung wird der iTaq Universal SYBR Green Supermix verwendet. Es soll auf gekühlte Reaktionsgefäßständer sowie Eis zurückgegriffen werden. Zunächst wird ein Mastermix nach folgendem Schema hergestellt:

Tab. 14: Zusammensetzung des Mastermix für qPCR

Komponente	Volumen pro 20 µl Reaktionsansatz (pro Primer)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	10 µl
Forward Primer	1 µl (300-500 nM)
Reward Primer	1 µl (300-500 nM)
Nuklease-freies Wasser	6 µl

Pro Zielgen und Proben-cDNA wird ein zweifacher Ansatz gewählt. Die Menge an Mastermix pro Zielgen d.h. pro Primerpaar erschließt sich aus der Anzahl an Proben-cDNA. Der Mastermix wird durch leichtes Schütteln homogenisiert und auf 8er-Tube-Strips verteilt, wobei 18 µl pro Tube pipettiert werden. Nun werden 2 µl der entsprechenden cDNA im zweifachen Ansatz und 2 µl nukleasefreies Wasser als Negativkontrolle in einem einfachen Ansatz hinzugefügt. Die Tubes werden mit 8er-Caps-Strips versehen und zentrifugiert.

Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe der qPCR-Maschine Stratagene Mx3005P. Die Strips werden in den Cyler gesetzt und die Plattenbelegung in der Software „Mx Pro Mx3005pr“ festgelegt. Die Polymerase-Kettenreaktion wird nach folgendem Reaktionsschema durchgeführt:

Tab. 15: Reaktionsschema in qPCR-Maschine Stratagene Mx3005P

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

Als passiver Referenzfarbstoff wird ROX eingesetzt, um die Fluoreszenzintensität des SYBR Green zu normalisieren und Pipettierfehler sowie Veränderungen in den Geräteparametern auszugleichen.

Nach Beendigung der Reaktion muss mit Hilfe der Schmelzkurven und der Wasserproben die Reaktionsspezifität kontrolliert werden, d.h. überprüft werden, ob nur das gewünschte Zielgen amplifiziert wurde und keine unspezifischen Produkte oder Primer-Dimere entstanden sind. Außerdem sollen die zwei Ansätze einer cDNA für ein Zielgen hinsichtlich ihrer C_T -Werte geprüft werden, um hier zu große Differenzen auszuschließen. Diese internen Kontrollen bieten die Möglichkeit, die Qualität der PCR abzuschätzen.

Zur Auswertung wird die $\Delta\Delta C_T$ -Formel verwendet. Dabei werden folgende Rechenschritte durchgeführt:

1. $\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Haushaltsgen})$
2. $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Versuchsgruppe}) - \Delta C_T(\text{Kontrollgruppe})$
3. Relative Kopienzahl = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Als Haushaltsgen dient hier ACTB, von dem ausgegangen wird, dass es in allen Proben konstant zu gleichen Mengen vorliegt.

5.2.7 Tumor-Sphäroid-Assay

Um die physiologische Wachstums Umgebung eines Tumors nachzuahmen, werden Krebszellen in 3D-Modellen kultiviert. Durch die Nutzung von Low-Attachment-Platten und serumfreien Medium sollen vor allem Krebsstammzellen in den hier gebildeten Sphäroiden angereichert werden. Die mit Polysterol beschichteten Platten verhindern eine Zelladhäsion. Zusätzlich werden durch die Nutzung von serumfreiem Medium bereits differenzierte Tumorzellen eliminiert, wohingegen sich die Tumorstammzellen an die Bedingungen anpassen und proliferieren können.⁸⁸

5.2.7.1 Sphäroidbildung von HepG2-Zellen mit Differenzierungsassay

HepG2-Zellen werden zunächst mittels Accutase vereinzelt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt dann durch die Trypanblau-Methode. Pro Well wird eine Zellzahl von 1×10^4 Zellen angestrebt. Die Zellen werden in 500 μl Tumor-Sphäroid-Medium (vgl. Tab. 9) angesetzt. Die 24-Well-Low-Attachment-Platte wird dann für 7 Tage im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Passage 0). Nach der Inkubationszeit findet eine Fotodokumentation der gebildeten Sphäroide statt. Diese werden dann vereinigt und zweimalig mit PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss erfolgt die etwa 15 min Vereinzelung mittels Accutase.

Die vereinzelteten Zellen werden wieder auf die Low-Attachment Platten in 500 µl Tumor-Sphäroid-Medium für 7 Tage im Wärmeschrank inkubiert (Passage 1). Im Anschluss erfolgen erneut eine Fotodokumentation und Vereinzeltung sowie die Ansetzung neuer Sphäroide der Passage 2. Nach der Inkubationszeit von 7 Tagen werden die Sphäroide fotografiert und vereinzelt. Ein Teil der Zellen wird im FACS analysiert, während von einem anderen Anteil die RNA für spätere Expressionsanalysen isoliert wird.

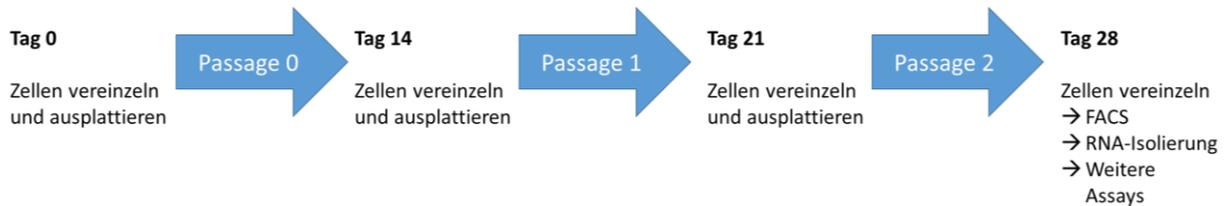


Abb. 2: Ablaufschema Tumor-Sphäroid-Assay

Für das Differenzierungsassay werden die übrigen vereinzelteten Sphäroid-Zellen (in Ergebnisse Diff-Zellen genannt) in Nährmedium mit FBS (vgl. Tab. 8) aufgenommen und auf für adhärenzte Zellen beschichtete 6-Well Platten mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well ausplattiert. Als Kontrolle werden HepG2-Zellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well ebenfalls in Nährmedium (vgl. Tab. 8) angesetzt und ausplattiert. Die 6-Well Platten werden anschließend für 72 h im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann erfolgen die Ablösung und Vereinzeltung der Zellen mittels Accutase, die Analyse der Oberflächenproteine mittels FACS und die RNA-Extraktion für die spätere Expressionsanalyse der Diff-Zellen sowie der HepG2-Zellen als Kontrolle.

5.2.7.2 Sphäroidbildung von HuH6-Zellen unter Zytostatika-Behandlung

HuH6-Zellen werden mittels Accutase vereinzelt. Im Anschluss wird die Zellzahl durch die Trypanblau-Methode ermittelt. Pro Well wird eine Zellzahl von 1×10^4 Zellen angestrebt, die Zellen werden in 500 µl Tumor-Sphäroid-Medium (vgl. Tab. 9) angesetzt und auf eine 24-Well-Low-Attachment-Platte ausplattiert. Zusätzlich werden in ein Drittel der Wells das Zytostatikum Tanespimycin in einer Konzentration von jeweils 0,1 µM sowie in ein Drittel der Wells das Zytostatikum Zebularine in einer Konzentration

von jeweils 100 μM hinzugefügt. Die restlichen Wells verbleiben ohne zusätzliche Behandlung als Kontrolle.

Die 24-Well-Low-Attachment-Platte wird dann für 11 Tage im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Ermittlung der Größe der gebildeten Sphäroide sowie die Fotodokumentation. Gezählt werden nur Sphäroide, die einen sphärischen Aufbau und eine dichte Struktur sowie einen Durchmesser von mehr als 50 μm aufwiesen; größere Zellaggregate werden nicht bei der Messung berücksichtigt.⁸⁹

5.2.8 Gen-Knockdown durch siRNA

Durch die Transfektion bestimmter siRNA mit Hilfe von Liposomen können gezielt Gene ausgeschaltet und so die Funktionen des kodierten Proteins untersucht werden.^{68,90} Die Zellen werden dafür in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well auf eine 24-Well-Platte in 500 μl DMEM mit 10 % FBS-Zusatz ohne Antibiotikum ausplattiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Um einer erfolgreiche Transfektion zu garantieren, sollen die Zellen eine Konfluenz von 30-50 % aufweisen. Am folgenden Tag wird pro Probe (Well) folgender Mastermix angesetzt:

1. Mix A: 50 pmol siRNA wird in 50 μl Opti-MEM gelöst (vgl. Tab. 7).
2. Mix B: 1 μl Lipofectamine 2000 wird in 50 μl Opti-MEM gelöst. Dieser Mix wird für 5 min inkubiert.
3. Mix A und B werden vermischt und für 20 min inkubiert. Danach wird er Mastermix auf die Wells verteilt.

6 h nach der Transfektion wird das Medium abgesaugt und 500 μl DMEM mit 10 % FBS-Zusatz und 2,5 mg/ml Gentamycin pro Well hinzugefügt. Die Platten werden für die Inkubationszeit von 24-72 h wieder im Wärmeschrank aufbewahrt. Im Anschluss werden die Zellen abgelöst und die RNA isoliert, um den Knockdown mittels qPCR nachzuweisen.

5.2.9 Zytostatikabehandlung

Die Einzelbehandlungen der HuH6- ($1,5 \times 10^6$) und HepG2-Zellen (4×10^6) mit Cisplatin, Decitabine, Zebularine, Tanespimycin werden wie folgt durchgeführt.

Tab. 16: Zytostatikabehandlung mit Konzentration und Inkubationszeit

Substrat	Konzentrationen	Inkubationszeit mit Behandlung
Cisplatin	1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml	72 h
Decitabine	0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM	72 h
Zebularine	50 µM, 100 µM, 200 µM	72 h
Tanespimycin	0,1 µM, 0,25 µM	48 h

Die Doppelbehandlungen werden nach folgendem Schema durchgeführt:

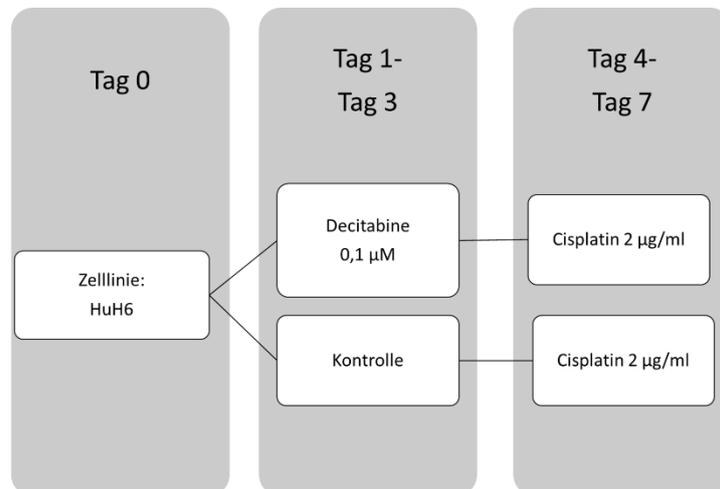


Abb. 3: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinien HuH6 mit Decitabine und Cisplatin.

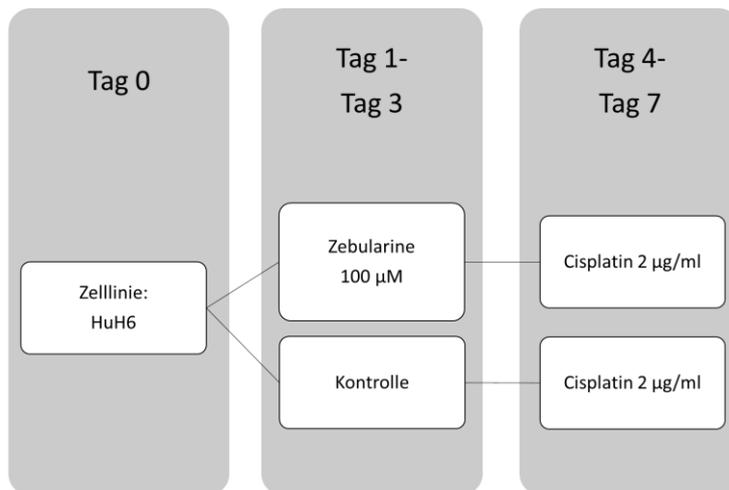


Abb. 4: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinie HuH6 mit Zebularine und Cisplatin.

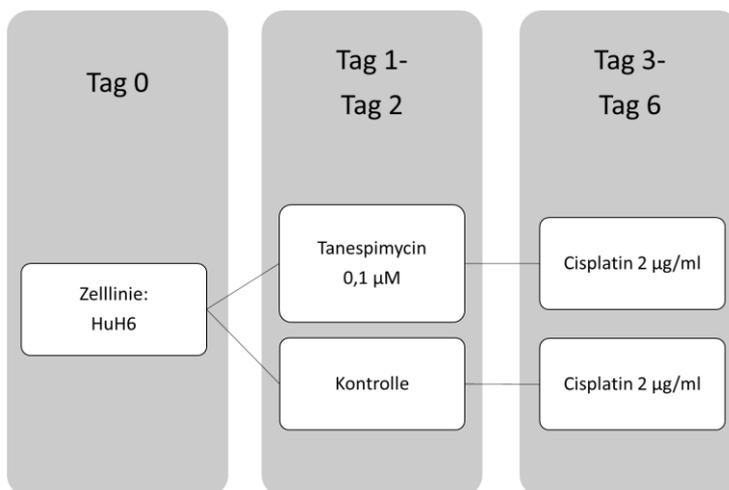


Abb. 5: Behandlungsschema der Doppelbehandlung der Zelllinie HuH6 mit Tanespimycin und Cisplatin.

5.2.10 MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Assay wird zur Bestimmung der Zellviabilität und -proliferation durchgeführt. Über eine photometrische Messung können Stoffwechselprodukte lebender Zellen nachgewiesen und so quantitative Aussagen über das Zellwachstum einer Versuchsreihe im Vergleich zu Kontrollzellen gemacht werden.⁹¹ Zur Herstellung von Eichkurven werden zunächst 160 000, 80 000, 40 000, 20 000, 10 000, 5000, 2500 Zellen der entsprechenden Zelllinie pro Well in 100 µl aufgenommen. Pro Zellzahl wird ein dreifacher Ansatz auf eine 96-Well-Platte ausplattiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit werden 10 µl MTT-Reagenz pro Well pipettiert. Die Platte wird dann für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden 100 µl Solubilisierungspuffer pro Well hinzugefügt und die Platte über Nacht im Wärmeschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgt die Messung am ELISA-Spektrophotometer bei 550 nm mit Hilfe des Programms „Magellan“.

Für die Versuchsproben werden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/Well auf eine 96-Well-Platte ausplattiert; dabei wird 100 µl Nährmedium pro Well verwendet und pro Versuchsansatz drei Wells angesetzt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert; im Anschluss werden die zu testenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt und für die jeweilige Inkubationszeit der Substanz im Wärmeschrank inkubiert (vgl. Tab. 16, Abb. 3-5). Nach der Inkubationszeit werden den Ansätzen 10 µl MTT-Reagenz pro Well hinzugegeben; 4 h danach folgen 100 µl Solubilisierungspuffer pro Well. Die Zellen werden nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgt die Messung mittels Multiwell-Spektrophotometer.

5.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software „Prism 6“ sowie „Bias 11.12“. Meist handelt es sich bei den hier dargestellten Werten um arithmetische Mittelwerte mit Angabe der Standardabweichung. Da nicht von einer Normalverteilung der Werte auszugehen ist, wird auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Bei Zwei-Gruppenvergleichen werden der Mann-Whitney-U-Test sowie der Wilcoxon-matched-pairs-Test durchgeführt. Bei Mehr-Gruppen-Vergleichen werden der Kruskal-Wallis-Test oder der Friedman-Test angewendet, der mit dem Dunn's-multiple-comparisons-Test ergänzt wird. Für die Tests liegt das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$.

6 Ergebnisse

6.1 Tumor-Sphäroid- und Differenzierungsassay

Die Kultivierung von Tumorzellen in *in vitro* 3D-Kultursystemen bietet nicht nur die Möglichkeit, die physiologischen Bedingungen und das natürliche Wachstum eines Tumors nachzuahmen, sondern auch um Tumorstammzellen anzureichern. Durch die Nutzung von Low-Attachment-Platten und einem serumfreien Medium, das mit spezifischen Wachstumsfaktoren versetzt ist, können dreidimensionale Tumor-Sphäroide (kugelförmige Gebilde) generiert werden. Da unter diesen Bedingungen nur Krebsstammzellen in der Lage sind, weiter zu wachsen, können mit diesem Assay Krebsstammzellen angereichert werden.

Hier wurde zunächst das Expressionsprofil der Tumor-Sphäroid-Zellen mittels FACS-Messung und qPCR-Analyse nach einer 3-wöchigen Kultivierung und Passagierung unter Tumor-Sphäroid Bedingungen untersucht. Anschließend erfolgte eine Reaktivierung für 72 h unter „normalen“ Bedingungen d.h. in Medium mit FBS und auf für adhärenzte Zellen beschichteten Platten. Das Oberflächenprofil dieser Zellen wurde dann ebenfalls durch eine FACS-Messung bestimmt und die Transkription verschiedener Faktoren mithilfe von qPCR ermittelt. Dabei lag der Fokus auf den Pluripotenzmarkern Oct4 und Nanog sowie den EMT-Markern SNAI1 und Vimentin. Zusätzlich sollte nachgewiesen werden, ob die in den Sphäroiden gezüchteten Zellen eine Änderung der Expression von AID zeigen sowie die Reaktivierung unter normalen Bedingungen diese nochmals beeinflusst.

6.1.1 Fotodokumentation

Die Bildung der Tumor-Sphäroide und die anschließende Differenzierung erfolgten nach in Abb. 4 dargestelltem Schema. Vor und nach Vereinzelung der Sphäroide der einzelnen Passagen erfolgte die Fotodokumentation. Die unter Abb. 6 A dargestellten Bilder zeigen beispielhaft gebildete Sphäroide der Passagen null (P0), eins (P1) und zwei (P2).

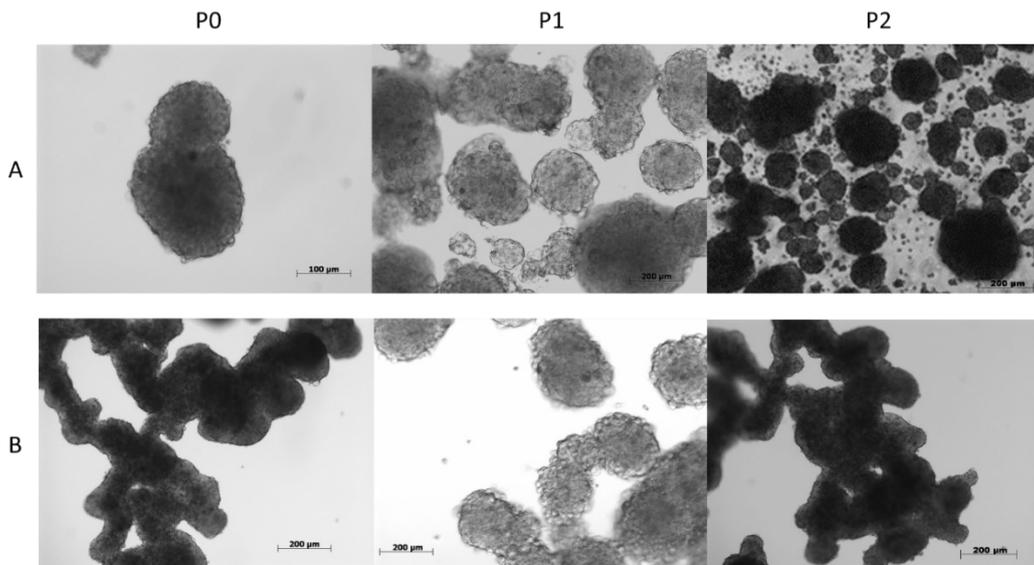


Abb. 6: Bildung von Tumor-Sphäroiden von HepG2-Zellen. A Exemplarische Bilder einer Versuchsreihe **B** Formierung von zusammenhängenden Sphäroiden. P0= Passage 0, P1=Passage 1, P2=Passage 2 (n= 3)

Die gebildeten Sphäroide wiesen in der Regel eine sphärische und dichte Struktur auf und waren größer als 50 µm im Durchmesser. Allerdings bildeten sich vereinzelt auch größere, zusammenhängende Zellgebilde, die keinen kugelförmigen Aufbau erkennen ließen (vgl. Abb. 6B). Nach Vereinzelung der Tumor-Sphäroide der P2 sowie Überführung der Sphäroid-Zellen in „normale“ Kulturbedingungen waren die Zellen in der Lage, zu adhären und zu proliferieren. Morphologisch passten sich die Diff-Zellen den HepG2-Kontrollen an (vgl. Abb. 7).

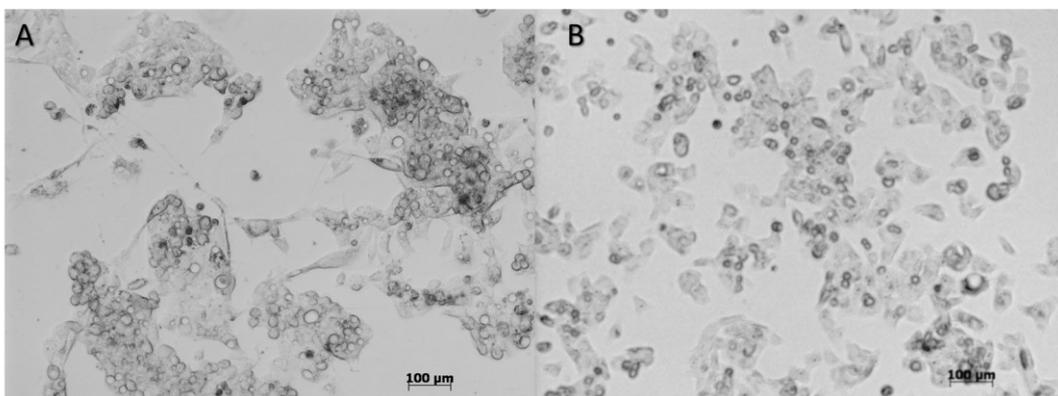


Abb. 7: Morphologische Angleichung der re-differenzierten Tumor-Sphäroid-Zellen nach 72 h Rekultivierung unter normalen Bedingungen. A Tumor-Sphäroid-Zellen nach 72 h Rekultivierung. **B** HepG2-Zellen unter normalen Kulturbedingungen.

6.1.2 FACS-Analyse

Nach P2 wurden die Tumor-Sphäroid-Zellen hinsichtlich ihres Oberflächenprofils mittels FACS untersucht. Gleiches gilt für diejenigen Zellen, die im Anschluss an das Tumor-Sphäroid-Assay für 72 h unter „normalen Bedingungen“ rekultiviert wurden (Diff-Zellen). Die in der unteren Abb. 8 dargestellten FACS-Daten zeigen, dass der Anteil der CD34⁺OV-6⁺ Zellen in den Tumor-Sphäroiden der P2 (TSA P2) im Vergleich zur Kontrolle (HepG2) deutlich zugenommen hat. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen, die unter normalen Bedingungen in Medium mit 10 % FBS kultiviert wurden. Die Anreicherung der positiven Zellen lag durchschnittlich bei 32 %. Die CD34⁺OV-6⁺ Zellen waren deckend mit den Vorarbeiten auch für das Oberflächenprotein CD90 positiv. Die 72-stündige Rekultivierung in Medium mit 10 % FBS und auf unbeschichteten Platten führte wieder zur einer Abnahme der CD34⁺OV-6⁺ Zellen (Diff-Zellen).

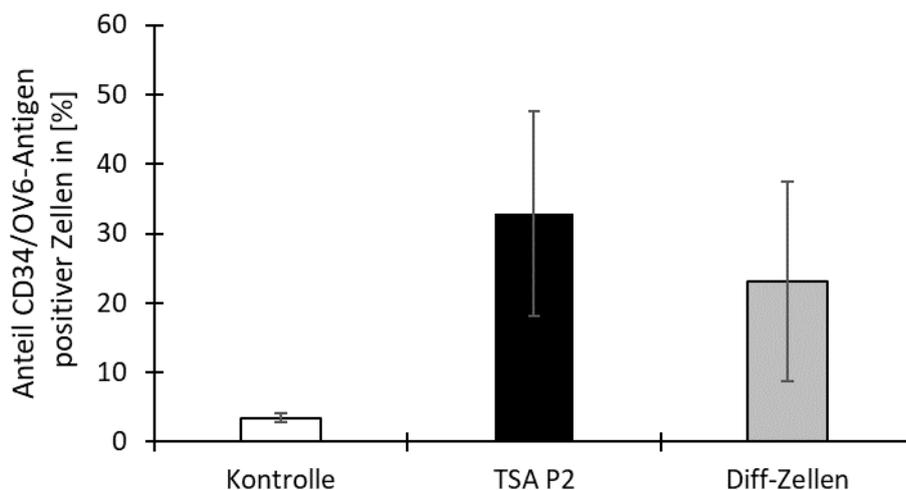


Abb. 8: Die Formierung von Tumor-Sphäroiden und ihre Passagierung führt zu CD34⁺OV-6⁺ Zellen mit Re-Differenzierungspotential. HepG2-Zellen bildeten Tumor-Sphäroide bis Passage 2 und wurden dann wieder unter normalen Bedingungen in Medium mit 10 % FBS für 72 h kultiviert. Das Oberflächenprofil wurde mittels FACS-Messung nach P2 und nach der Differenzierungszeit von 72 h ermittelt. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen, die in Medium mit 10 % FBS gewachsen sind. TSA P2=Tumor-Sphäroid-Zellen nach Passage 2, Diff-Zellen = wieder unter normalen Bedingungen für 72 h kultivierte Tumor-Sphäroid-Zellen der Passage 2. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n= 3)

6.1.3 Expressionsanalyse mittels qPCR

Auf mRNA-Ebene zeigte sich wie in den Ergebnissen der Vorarbeiten eine verstärkte Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog in den Tumor-Sphäroid-Zellen der P2 im Vergleich zu den normal kultivierten HepG2-Zellen (vgl. Abb. 9 A). Gleichzeitig wurde AID verstärkt in den Zellen exprimiert. Den gleichen Trend zeigte der EMT-Marker SNAI1. Mit den FACS-Daten übereinstimmend wiesen die Tumorstammzellmarker CD90 und CD34 sowie KRT14 (als eines der Antigene des OV6-Antikörpers) auch auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression auf.

Die Überführung der Tumor-Sphäroid-Zellen der P2 auf Platten für adhärente Zellen in Medium mit 10 % FBS führte dazu, dass die zuvor stärker exprimierten Faktoren wieder geringere Transkriptmengen aufwiesen (s. untere Abb. 9 B). Dies gilt sowohl für AID und die Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog als auch für die Oberflächenproteine CD90, CD34 und KRT14. Auch SNAI1 folgte dem gleichen Abwärtstrend. Als Kontrolle dienten hier die Expressionslevel der Tumor-Sphäroid-Zellen nach P2. Der Differenzierungsmarker E-Cadherin zeigte keine erhöhte Expression in den Diff-Zellen im Vergleich zu den TS-Zellen der P2.

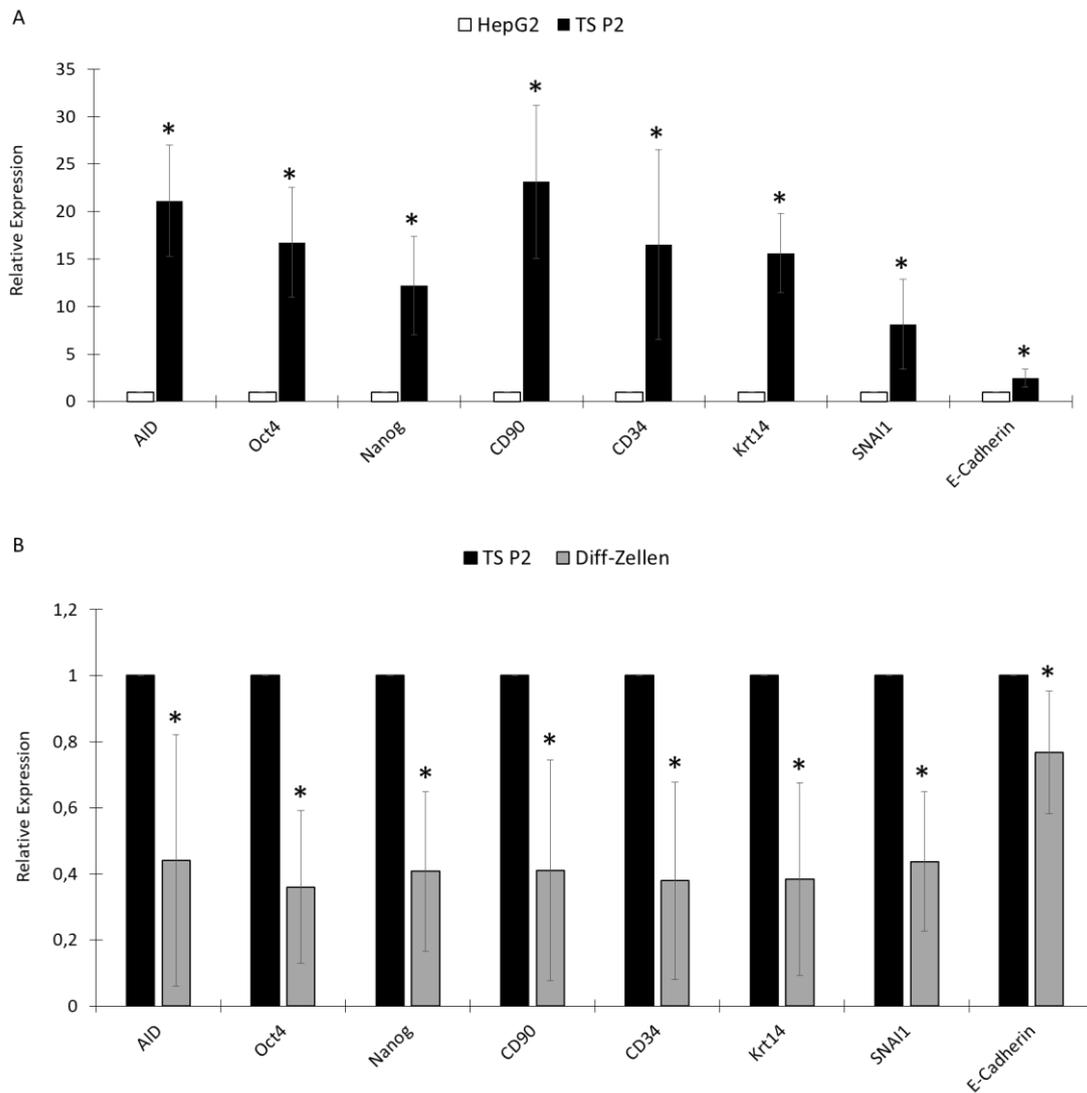


Abb. 9: Expressionsanalyse der Tumor-Sphäroid-Zellen nach P2 und Rekultivierung

A Über drei Wochen wurden aus HepG2-Zellen Tumor-Sphäroide gebildet. Im Anschluss an P2 wurde die RNA isoliert und die Expression auf mRNA-Ebene mittels qPCR ermittelt. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen, die unter normalen Bedingungen in Medium mit 10 % FBS gewachsen sind **B** Nach Beendigung des Tumor-Sphäroid-Assays wurden die Zellen erneut auf Zellkultur-Platten in Medium mit 10 % FBS ausplattiert und für 72 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse des Expressionsprofils durch qPCR. Als Kontrolle dienten die Tumor-Sphäroid-Zellen der P2 (=TSA P2). Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Ein Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

6.2 Cisplatinbehandlung

Krebsstammzellen zeichnen sich durch eine erhöhte Chemoresistenz aus. Dadurch sind sie in der Lage, nach einer vermeintlich erfolgreichen Behandlung zu einem Rückfall zu führen. Im Umkehrschluss lässt sich diese vermutete Resistenz dafür nutzen, um eine Population von Krebsstammzellen aus einer Zellkultur zu isolieren und auf diese Weise verschiedene spezifische Expressionsmuster der Tumorstammzellen differenziert beurteilen zu können.

6.2.1 Messung der Zellviabilität mittels MTT

Zunächst wurde der Einfluss von Cisplatin als Standardtherapeutikum gegen Hepatoblastome hinsichtlich der Zellvitalität mittels MTT-Assay überprüft. Die untere Abb. 10 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven als Mittelwerte von mehreren Triplikat-Ansätzen mit einer einfachen Standardabweichung (n=4).

Die unbehandelten Zellen dienten dabei als Kontrolle, wobei ihre gemessene Extinktion einer Zellviabilität von 100 % entsprach. Die behandelten Gruppen wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Es wurde deutlich, dass bei beiden Zelllinien mit steigender Cisplatin-Konzentration die Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle abnahm. Bei einer maximalen Konzentration von 7,5 µg/ml sank die relative Zellzahl der HepG2-Zellen auf einen Mittelwert von 9,4 % und die der HuH6-Zellen auf 5,8 %. Cisplatin als Standardtherapeutikum war somit in der Lage, einen großen Teil der Zellen zu eliminieren. Allerdings überlebte trotz hoher Cisplatin-Konzentrationen eine kleine Population.

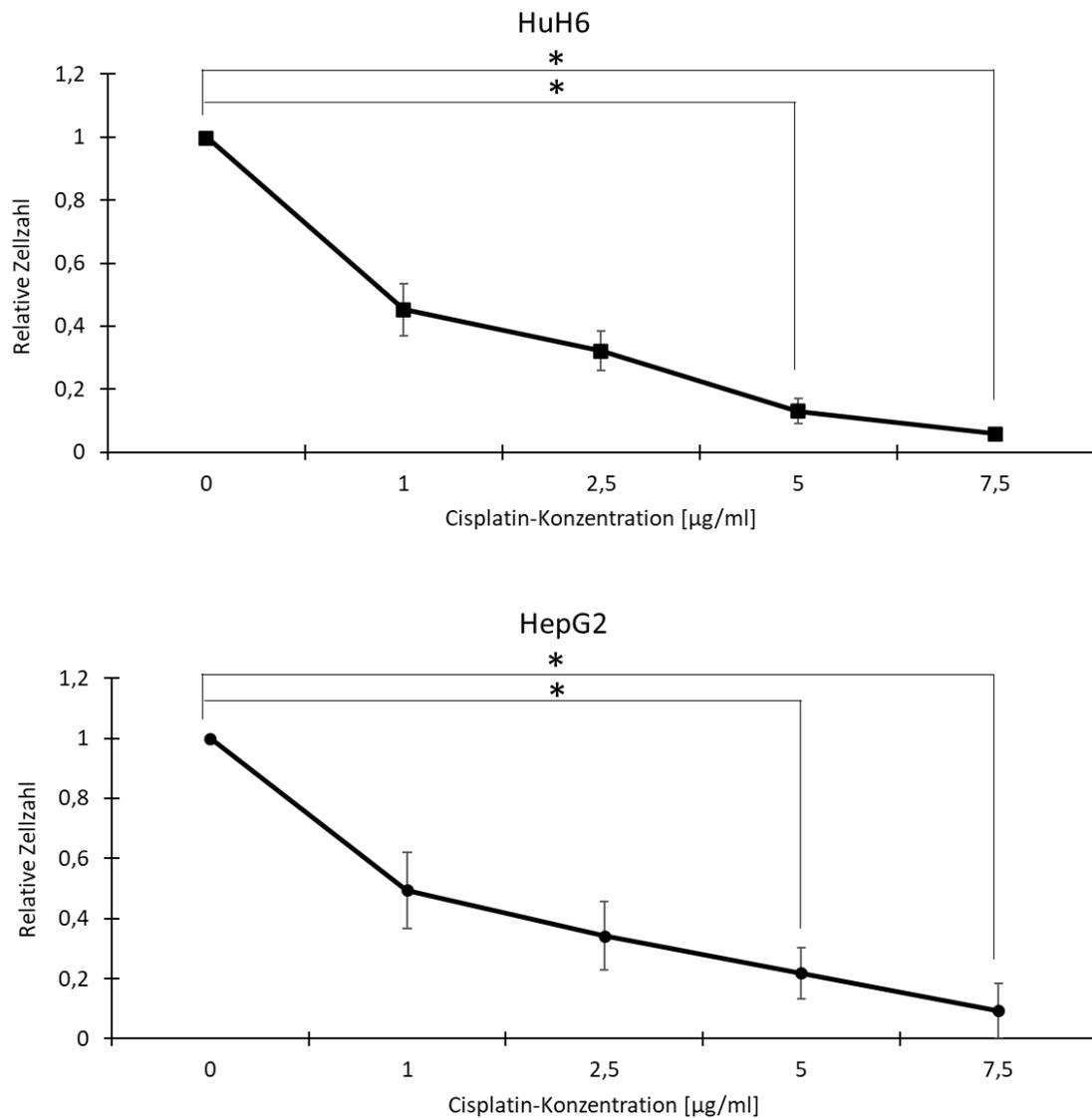


Abb. 10: Reduktion der Zellzahl von HuH6- und HepG2-Zellen unter 72-stündiger Cisplatin-Behandlung. HepG2- und HuH6-Zellen wurden 24 h nach Zellausplattierung mit 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 7,5 µg/ml Cisplatin behandelt. Nach 72 h Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung eines Triplikat-Ansatzes (n=4). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (* p < 0,05).

6.2.2 FACS-Analyse der überlebenden Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen wurde das Expressionsprofil der drei Marker CD90, CD34 und OV6-Antigen auf den die Behandlung überlebenden Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt.

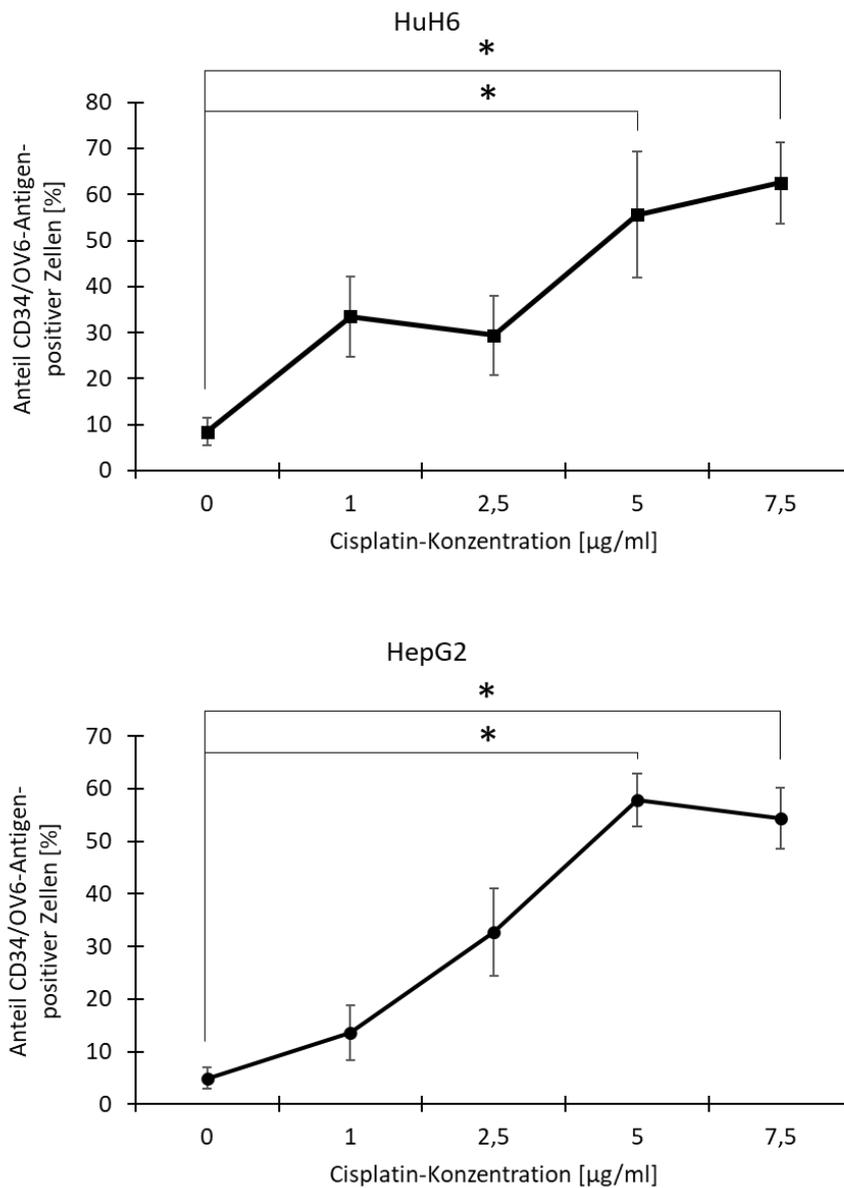


Abb. 11: Anstieg der CD34⁺OV-6⁺ Zellen mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen nach 72-stündiger Behandlung. HepG2- und HuH6-Zellen wurden 24 h nach Zellausplattierung mit 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 7,5 µg/ml Cisplatin behandelt. Nach 72 h Inkubationszeit wurde der Anteil der CD34⁺OV-6⁺ Zellen mittels FACS-Messung bestimmt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, (HuH6 n=9, HepG2 n=8). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

Abb. 11 stellt die Veränderung des Anteiles von CD34⁺OV-6⁺ Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen in einer Dosis-Wirkungskurve dar. Es zeigte sich eine deutliche Anreicherung der CD34⁺OV-6⁺ Zellen mit steigender Cisplatin-Konzentration. Die HepG2-Zellen wiesen dabei einen stetigen Anstieg der CD34⁺OV-6⁺ Zellen mit einer maximalen Anreicherung von 57,9 % bei einer Konzentration von 5 µg/ml und einem leichten Abfall bei 7,5 µg/ml auf. Die HuH6-Zellen erreichten eine maximale Anreicherung von 62,6 % bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml mit einem leichten Plateau zwischen 1 µg/ml und 2,5 µg/ml. Der hier aufgeführte Anteil der CD34⁺OV-6⁺ Zellen zeigte wie erwartet auch ein positives Markerprofil für CD90.

Bei genauerer Betrachtung der Punktwolken-Diagramme in den Abb. 12 A und 12 B präsentierten sich zwei verschiedene CD34⁺OV-6⁺ Populationen: Eine stark (im folgenden Text „high“ genannt) und eine schwach positive Population (im folgenden Text „low“ genannt).

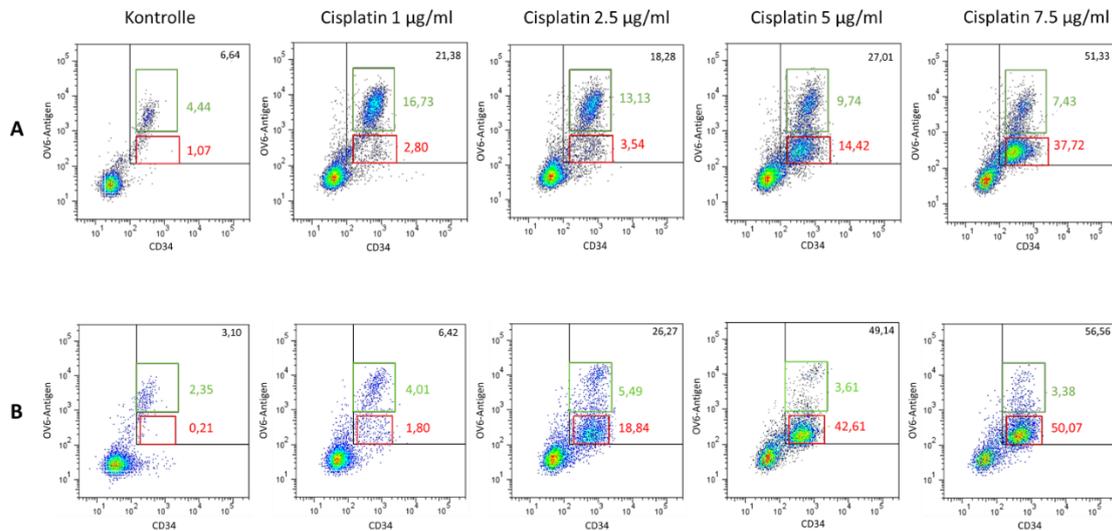


Abb. 12: Die Cisplatin-Behandlung führt zu einem prozentualen Anstieg einer Low CD34+OV-6+ Population. Nach 72 h Cisplatin-Behandlung wurde der Anteil der CD34⁺OV-6⁺ Population durch FACS ermittelt, im APC- (OV-6) und Pacific Blue- (CD34) Kanal wurden High-positive (grünes Kästchen) und Low-positive (rotes Kästchen) Zellen gemessen **A** Repräsentative Darstellung der HuH6-Zellen **B** Repräsentative Darstellung der HepG2-Zellen.

In der unbehandelten Kontrolle zeigte sich nur ein sehr kleiner Anteil der Low-positiven Zellen an der gesamten Positivpopulation. Durch eine Aufreinigung mittels „Magnetic-activated cell sorting“ (MACS) allerdings, bei der die CD34⁺ Zellen mittels magnetischer Antikörper angereichert wurden, war die Low-positive Population auch in unbehandelten Proben deutlich sichtbar (Daten nicht gezeigt). Mit steigender Cisplatin-Konzentration und zunehmenden Zelltod der vornehmlich CD34⁺OV-6⁻ Zellen stieg der prozentuale Anteil dieser Low-positiven Population in den überlebenden Zellen. Abb. 13 stellt die Anteile der Low- und High-positiven Population in Relation zur gesamten Positivpopulation dar. Es wird deutlich, dass der prozentuale Gesamtanstieg vor allem durch die Low-positive Population getragen wurde. Der Anteil der High-positiven Zellen innerhalb der HepG2-Zellen hielt sich auch unter der Cisplatin-Behandlung relativ konstant, die anteiligen High-positiven Zellen der HuH6-Zellen zeigten eine minimale Anreicherung bis zu einer Cisplatin-Konzentration von 2,5 µg/ml, bevor ihr Anteil dann zu Gunsten der Low-positiven Population abnahm.

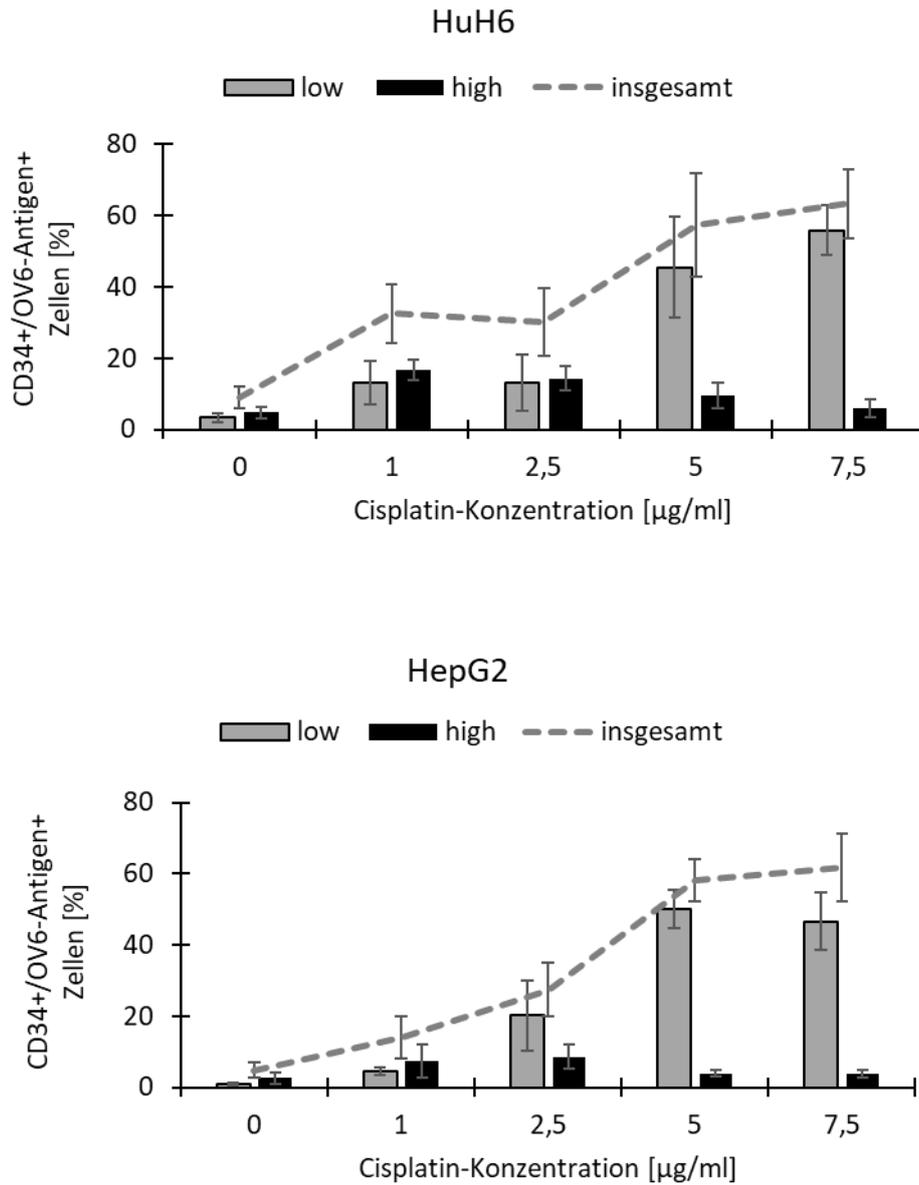


Abb. 13: Der Gesamtanstieg der CD34⁺OV-6⁺ Zellen wird durch die Zunahme des Anteils der Low-positiven-Population getragen. Die Ergebnisse der FACS-Messung nach 72 h Cisplatin-Behandlung wurden nach Low- und High-positiven Zellen gegatet und gegen die Gesamtpopulation positiver Zellen aufgetragen.

6.2.3 Expressionsanalyse der überlebenden Zellen mittels qPCR

Neben der Analyse des Oberflächenprofils auf Proteinebene wurde das Transkriptionsprofil der Cisplatin-resistenten HuH6- und HepG2-Zellen untersucht. Abb. 14 und 15 stellen die Expression einzelner Faktoren in Relation zur unbehandelten Kontrolle bei steigender Cisplatin-Konzentration dar.

Auf mRNA-Ebene zeigten die Cisplatin-resistenten Zellen der Zelllinien HuH6 und HepG2 eine verstärkte Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog. Auch AID folgte diesem Trend und war erhöht exprimiert. Die EMT-Faktoren TWIST1, SNAI1 und Vimentin wiesen ebenfalls erhöhte Expressionslevel auf. Die Differenzierungs- und Lineagemarker E-Cadherin und Albumin waren bei den HuH6-Zellen nicht signifikant verändert. Bei den HepG2-Zellen war ein Abwärtstrend der Mittelwerte mit steigender Cisplatin-Konzentration zu beobachten.

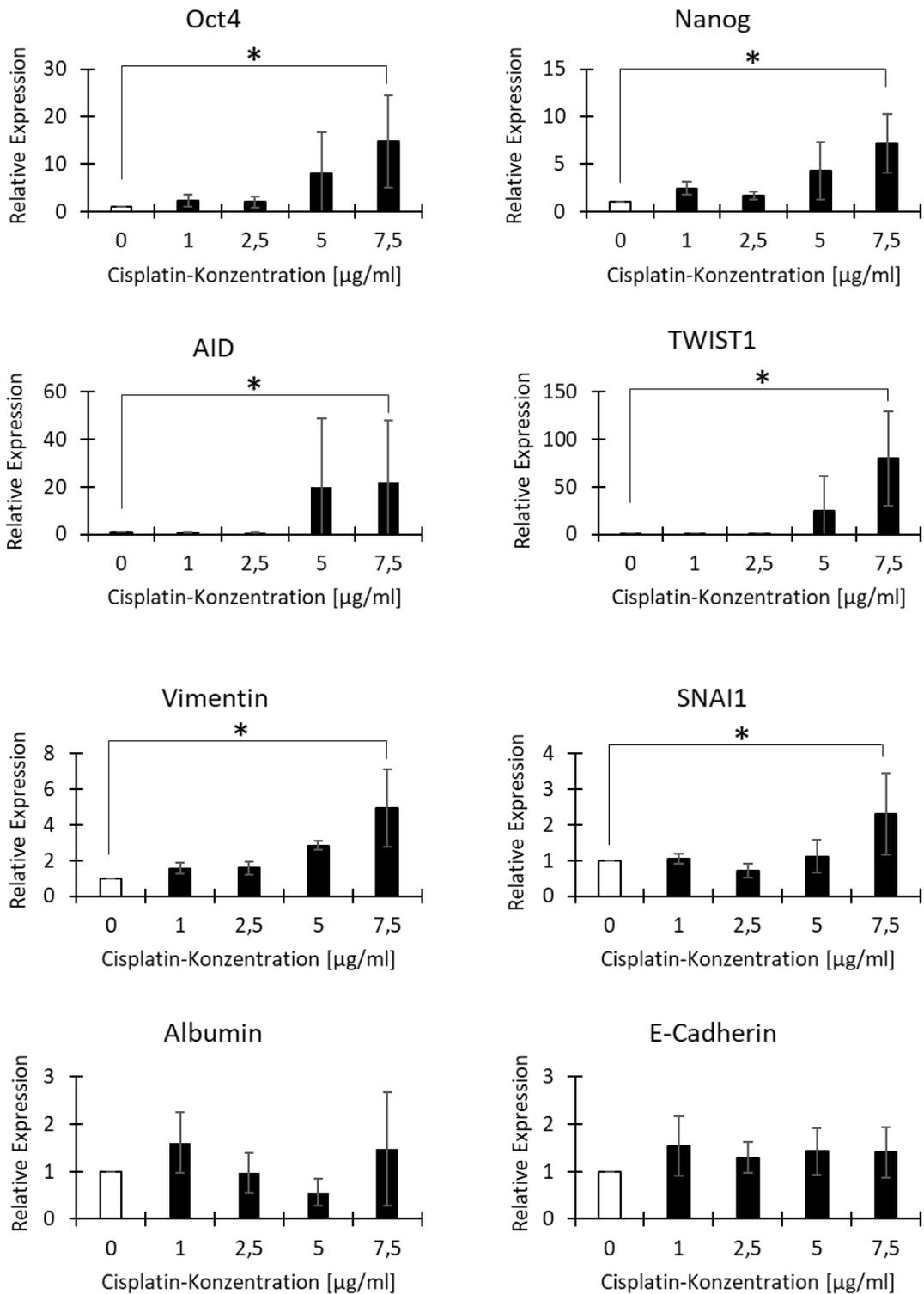


Abb. 14: Zunahme der Expression von Pluripotenz- und Krebsstammzellmarker auf mRNA-Ebene der HuH6-Zellen nach Cisplatin-Behandlung. Die im Anschluss an die 72-stündige Cisplatin-Behandlung gewonnene RNA wurde mit Hilfe von qPCR analysiert und in Relation zur Expression von unbehandelten HuH6-Zellen gesetzt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=4). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

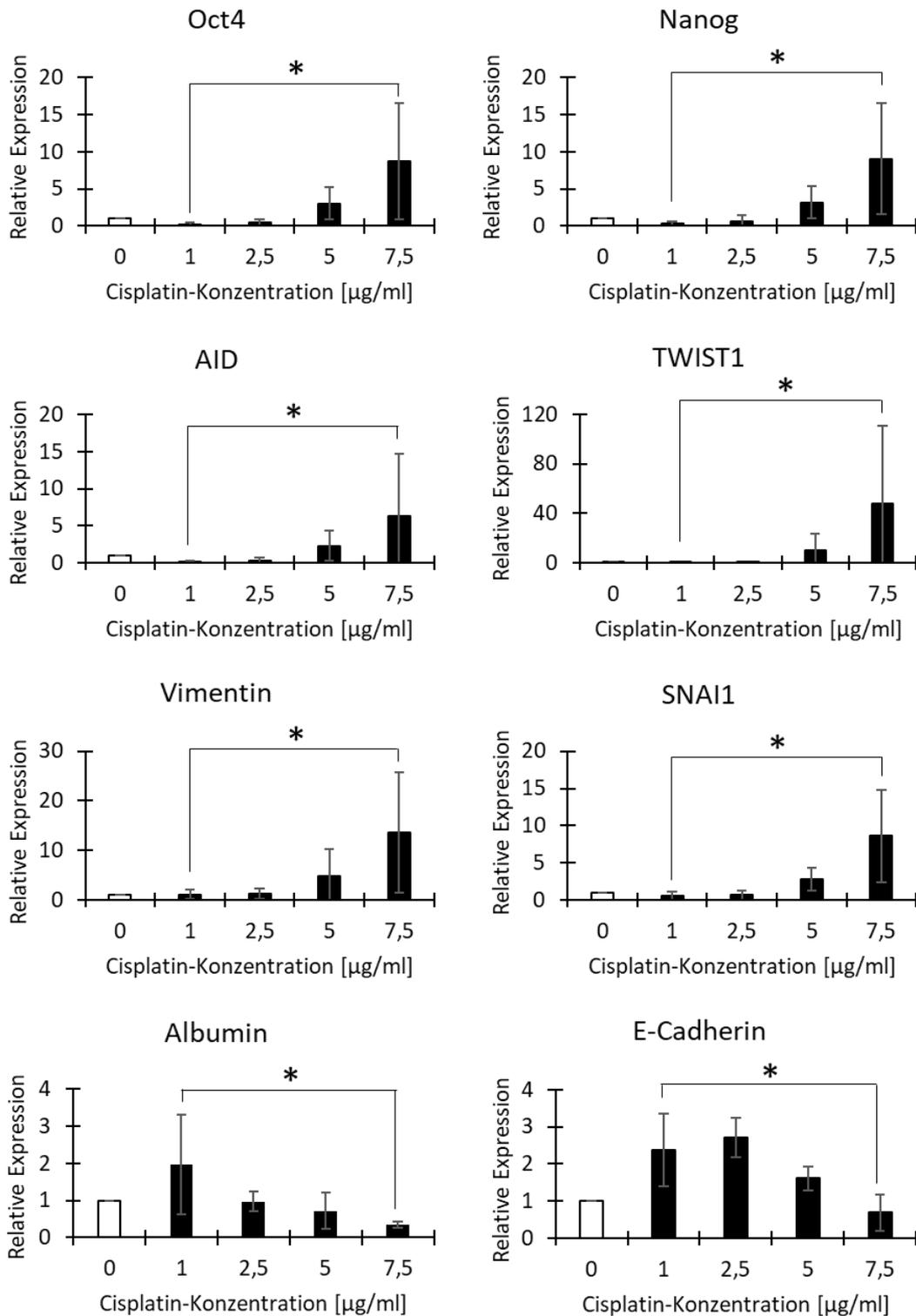


Abb. 15: Zunahme der Expression von Pluripotenz- und Krebsstammzellmarker auf mRNA-Ebene der HepG2-Zellen nach Cisplatin-Behandlung. Die im Anschluss an die 72-stündige Cisplatin-Behandlung gewonnene RNA wurde mit Hilfe von qPCR analysiert und in Relation zur Expression von unbehandelten HepG2-Zellen gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

6.3 siRNA-Knockdown von AID

Verschiedene Studien legen nahe, dass AID sowohl für die Induktion als auch für den Erhalt von Pluripotenz essenziell ist. Besonders die Reprogrammierung von Pluripotenzgenen wie Oct4 und Nanog und ihr Erhalt durch AID lassen vermuten, dass dieses Enzym eine wichtige Rolle für den Stammzellcharakter spielt. Diesen aufrecht zu erhalten und einer Differenzierung entgegenzuwirken, ist auch die Aufgabe von Krebsstammzellen.

CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ angereicherte Zellen zeigen dabei nicht nur eine verstärkte Expression von Pluripotenzmarkern, sondern auch erhöhte mRNA-Level von AID. Nun soll mittels eines siRNA Knockdowns von AID nachgewiesen werden, ob tatsächlich eine Abhängigkeit dieser Prozesse von AID vorhanden ist. Zusätzlich soll der Effekt der verminderten AID-Expression auf die Transkription der Stammzellmarker CD90 und CD34 untersucht werden.

6.3.1 Expressionsanalyse nach Knockdown mittels qPCR

HuH6-Zellen wurden hierfür ausplattiert und 24 h später die Transfektion von siRNA gegen AID und einer unspezifischen siRNA (Scrambled) mittels Lipofektion durchgeführt. Die Expression von AID wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mittels qPCR ermittelt. Dabei zeigte sich 48 h nach Transfektion der stärkste Knock-Down von AID (Daten nicht gezeigt).

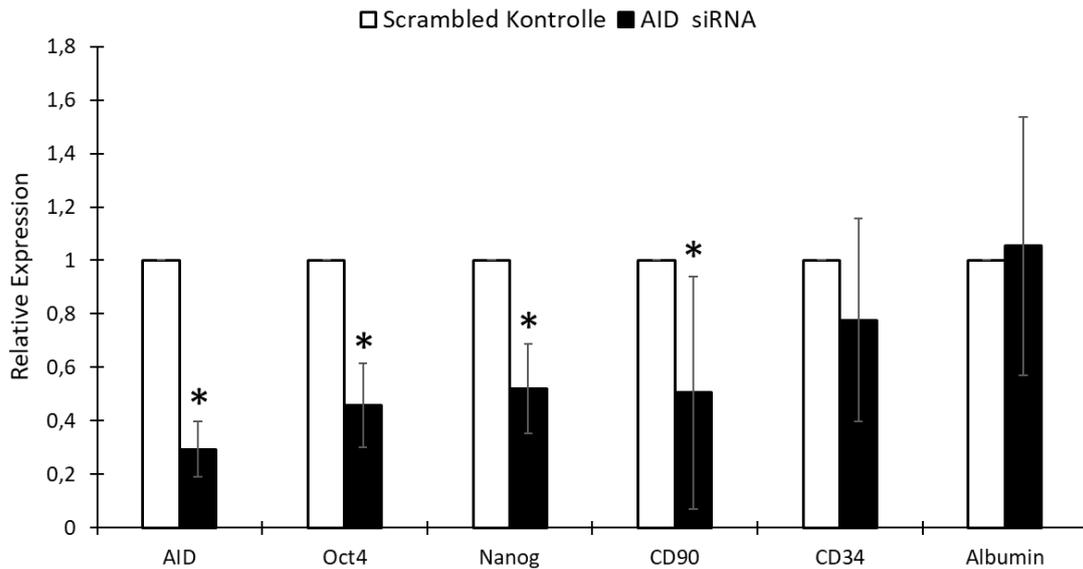


Abb. 16: Der AID-Knockdown führt zur verminderten Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog sowie des Oberflächenproteins CD90. HuH6-Zellen wurden in 24-Well-Platten in DMEM mit 10 % FBS ohne Antibiotika kultiviert. 24 h nach Ausplattierung erfolgte die Transfektion von AID-siRNA und Scrambled-siRNA mittels Lipofektion. Nach 48 h Kultivierung wurde die RNA isoliert. Es erfolgte die Expressionsanalyse durch qPCR. Es handelt sich hier um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=7). Ein Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

Die obige Abb. 16 stellt die relative Transkription verschiedener Faktoren bei einem Knock-Down von AID 48 h nach Transfektion in Relation zur Scrambled Kontrolle dar. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte \pm die Standardabweichung von 7 voneinander unabhängigen Experimenten, die durch qPCR ausgewertet wurden. Neben AID wiesen auch die *Downstream Targets* Oct4 und Nanog eine verminderte Expression auf. Das Oberflächenprotein CD90 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion. CD34 ließ hier keine signifikanten Änderungen erkennen, allerdings entsprachen die Mittelwerte dem absteigenden Trend. Die Expression von Albumin als hepatischer Lineagemarker wurde durch den Knock-Down von AID nicht verändert.

6.4 Behandlung mit AID-inhibierenden-Substanzen

Die gezielte Eliminierung von Krebsstammzellen ist für den Erfolg einer zytostatischen Therapie notwendig, um ein erneutes Tumorwachstum vorzubeugen. AID ist auf Grund der Rolle bei der Induktion und dem Erhalt von Pluripotenz ein spannendes Ziel einer zytostatischen Therapie. Deshalb wurde der Effekt von AID-inhibierenden Substanzen in HuH6- und HepG2-Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit den vor allem als DNMT-Inhibitoren, aber auch als AID-Inhibitoren nachgewiesene Substanzen, Decitabine und Zebularine, und mit der als HSP90-Inhibitor und so auch als AID-Inhibitor bekannten Substanz Tanespimycin behandelt. Hierbei wurde die Wirkung auf die CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population erfasst. HuH6- und HepG2-Zellen wurden für 72 h mit Decitabine und Zebularine und für 48 h mit Tanespimycin behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen hinsichtlich der Oberflächenexpression von CD34, CD90 und dem OV6-Antigen, der mRNA-Expression der Pluripotenzmarker und der Zellviabilität untersucht.

6.4.1 Decitabine-Behandlung der HepG2-Zellen

Nach Titration der Decitabine-Konzentration konnte ein leichter Rückgang der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population der HepG2-Zellen nach 72 h Behandlung mit einer Decitabine-Konzentration von 0,25 μ M beobachtet werden (Abb. 17 A). Allerdings war dieser Trend auch nach mehrmaligen Wiederholungen (n=8) nicht signifikant (vgl. Abb. 17 B).

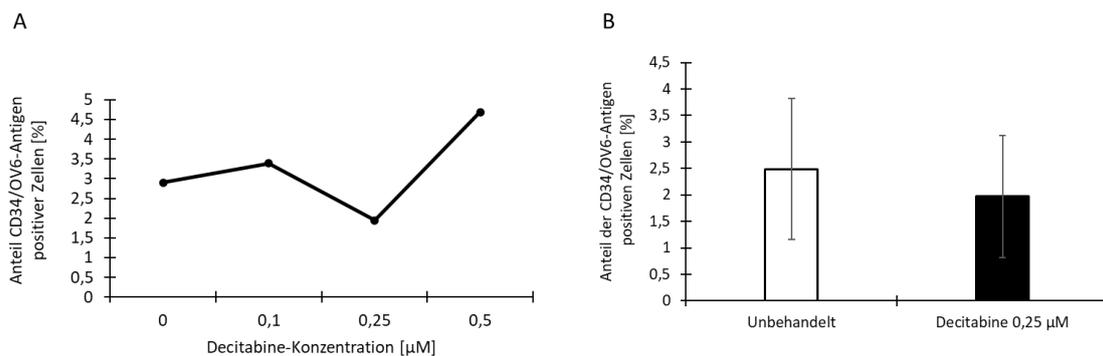


Abb. 17: Decitabine zeigt keine signifikante Verminderung der CD34+OV-6+CD90+ Population der HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden ausplattiert und 24 h später mit Decitabine behandelt; der Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population wurde nach 72 h im FACS ermittelt. **A** Titration der benötigten Decitabine-Konzentration. **B** Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=8).

Bei einer Behandlung mit 0,25 μM Decitabine zeigten die HepG2-Zellen nur einen sehr geringen Zelltod: Es fand lediglich eine Reduktion der Zellzahl um etwa 2 % statt. Decitabine schien somit keine zytotoxische Wirkung auf die meisten HepG2-Zellen zu haben. Vielmehr schien es relativ gezielt die $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+\text{CD90}^+$ Population zu treffen, auch wenn hier keine signifikante Verminderung ersichtlich ist (vgl. Abb. 18A). Auch auf mRNA-Ebene waren AID und der Pluripotenzmarker Oct4 nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 18B).

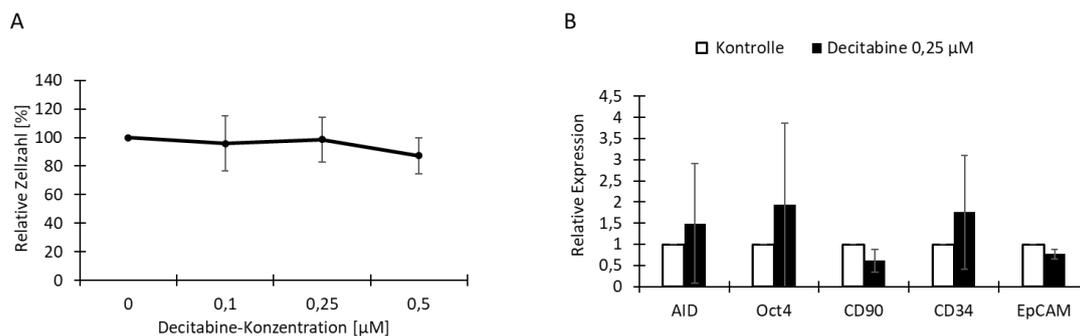


Abb. 18: Die Behandlung mit Decitabine bewirkt nur einen geringen Zelltod und hat keine signifikante Auswirkung auf die mRNA-Expression

A 72 h nach Behandlung wurde die Zellvitalität mittels MTT ermittelt. Die Zellzahlen der Versuchsgruppen wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle (0) gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=7$).

B Die mRNA-Level wurden nach 72 h Behandlung mit 0,25 μM Decitabine mittels qPCR bestimmt. Die Werte der Versuchsgruppen wurden in Relation zu unbehandelten HepG2-Zellen gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$).

6.4.2 Decitabine-Behandlung der HuH6-Zellen

Bei den HuH6-Zellen zeigte sich bei einer Decitabine-Konzentration von 0,1 μM eine Verminderung der $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+\text{CD90}^+$ Population nach 72 h Behandlung (vgl. Abb. 19 A). Die Behandlung der HuH6-Zellen mit dieser Decitabine-Konzentration führte zu einer signifikanten Reduktion des Anteiles der $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+\text{CD90}^+$ Zellen in der Bezugspopulation (vgl. Abb. 19 B).

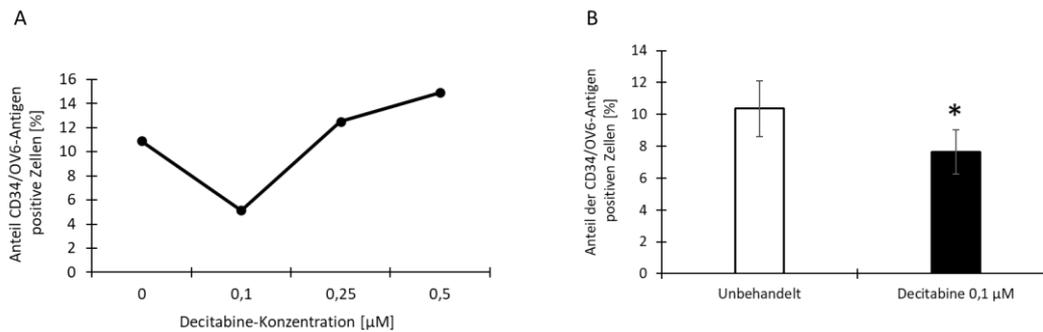


Abb. 19: Decitabine zeigt eine signifikante Verminderung der CD34⁺OV-6⁺ Population der HuH6-Zellen. HuH6-Zellen wurden ausplattiert und 24 h später mit Decitabine behandelt; der Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population wurde nach 72 h Behandlung im FACS ermittelt. **A** Titration der benötigten Decitabine-Konzentration **B** Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=9). Ein Wilcoxon-matched-pairs-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (* $p < 0,05$).

Im MTT zeigte sich bei einer Decitabine-Konzentration von 0,1 μM ein durchschnittliche Reduktion der Zellzahl um 38 %, wobei steigende Konzentrationen den Zelltod nicht wesentlich verstärkten (vgl. Abb. 20A). Auf mRNA-Ebene führte die Behandlung zu keiner signifikanten Verminderung von AID (vgl. Abb. 20B). Auch die Transkription des Pluripotenzmarkers Oct4 war nicht relevant verändert. Als Kontrolle dienten unbehandelte HuH6-Zellen.

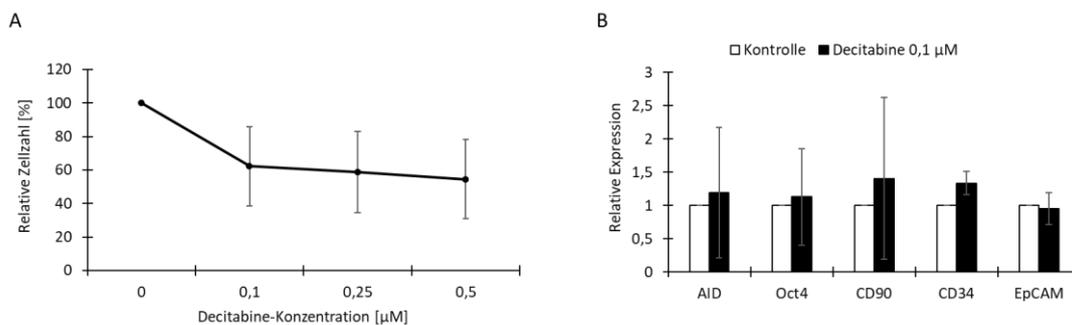


Abb. 20: Die Behandlung mit Decitabine bewirkt einen mäßig ausgeprägten Zelltod und hat keine Auswirkung auf mRNA-Ebene

A 72 h nach Behandlung der HuH6-Zellen wurde die Zellvitalität mittels MTT ermittelt. Die Zellzahlen der Versuchsgruppen wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle (0) gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

B Die mRNA-Mengen wurden nach 72 h Behandlung mit 0,1 μM Decitabine mittels qPCR bestimmt. Die Werte der Versuchsgruppen wurden in Relation zu unbehandelten HuH6-Zellen gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5).

6.4.3 Zebularine-Behandlung der HepG2-Zellen

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit verschiedenen Zebularine-Konzentrationen führte nicht zu einer Reduktion des Anteiles der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen (vgl. Abb. 21 A). Bei der Titration der Konzentrationen war sogar eher ein Anstieg dieser Population zu beobachten. Die MTT-Daten (vgl. Abb. 21 B) zeigten, dass Zebularine bei steigenden Konzentrationen einen zunehmenden Zelltod verursachte. Somit ist von einer allgemein zytotoxischen Wirkung auszugehen, die in Zusammenschau mit den oben aufgeführten FACS-Ergebnissen keinen gezielten Effekt auf die CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population aufweist.

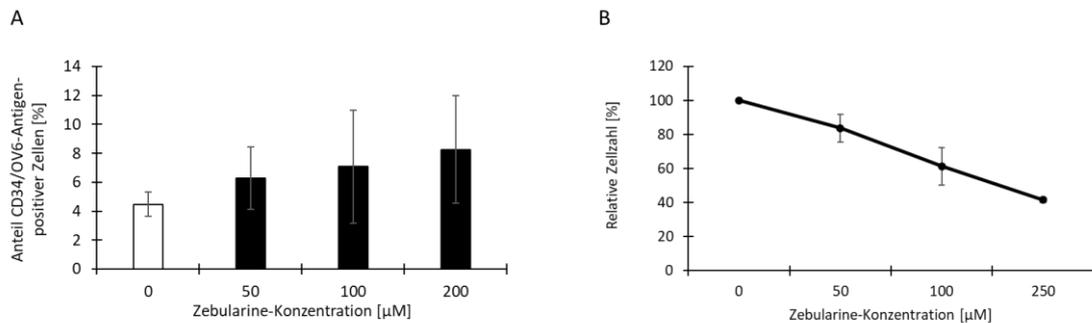


Abb. 21: Die Behandlung der HepG2-Zellen mit Zebularine führt bei starker zytotoxischer Wirkung zu keiner Reduktion der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population.

A HepG2-Zellen wurden für 72 h mit Zebularine behandelt und der Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen im FACS ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=2).

B 72 h nach Behandlung wurde der Anteil der überlebenden HepG2-Zellen im MTT ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

6.4.4 Zebularine-Behandlung der HuH6-Zellen

Des Weiteren wurden die HuH6-Zellen für 72 h mit unterschiedlichen Zebularine-Konzentrationen behandelt (vgl. Abb. 22 A). Dabei konnte ein maximaler Effekt bei einer Konzentration von 100 μM beobachtet werden. Wiederholungen mit dieser Zebularine-Konzentration zeigten eine signifikante Reduktion des Anteiles der $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+\text{CD90}^+$ Zellen (vgl. 22 B).

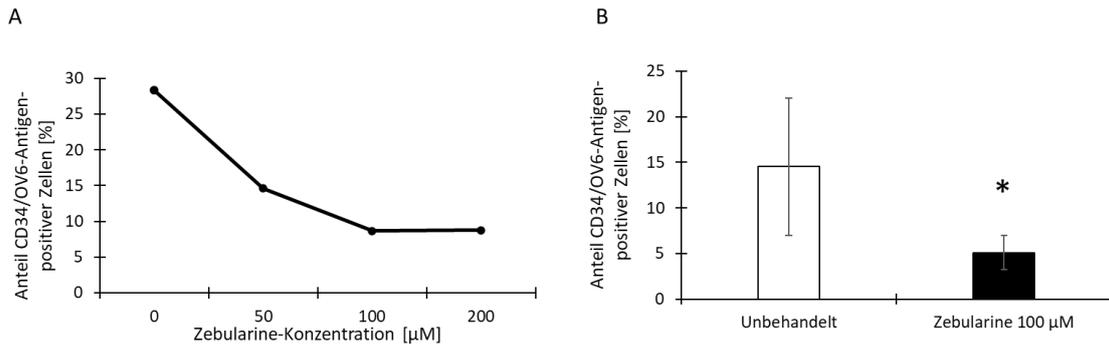


Abb. 22: Zebularine führt zu einer signifikanten Verminderung der $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+\text{CD90}^+$ Population der HuH6-Zellen. HuH6-Zellen wurden ausplattiert und 24 h später mit Zebularine behandelt, der Anteil der $\text{CD34}^+\text{OV-6}^+$ Population wurde nach 72 h Behandlung im FACS ermittelt. **A** Titration der benötigten Zebularine-Konzentration **B** Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=7). Ein Wilcoxon-matched-pairs-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (* $p < 0,05$).

Wie Decitabine veränderte Zebularine nicht das mRNA-Expressionsprofil der HuH6-Zellen hinsichtlich der Expression von AID oder Oct4 (vgl. Abb. 23B). Bei der hier wirksamen Konzentration von 100 μM reduzierte Zebularine die Gesamtzellzahl um etwa 30 %. Die Nutzung höherer Konzentrationen verstärkte auch den Zelltod (vgl. Abb. 23 A).

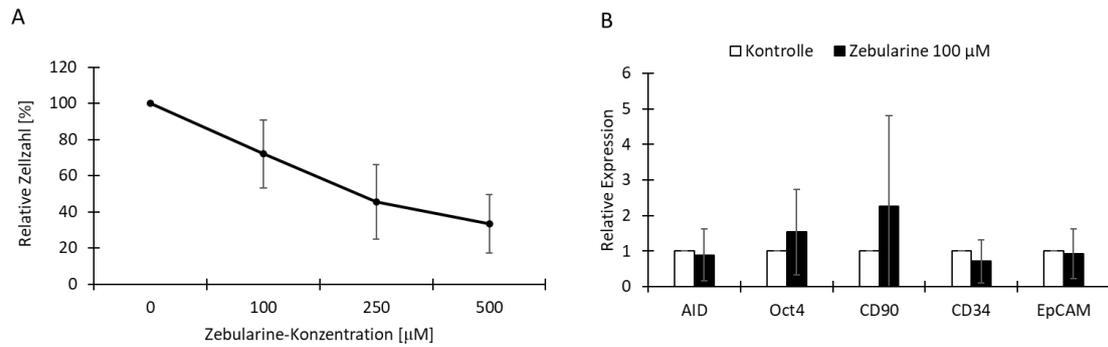


Abb. 23: Zebularine hat bei verstärkten Zelltod keinen signifikanten Einfluss auf mRNA-Ebene.

A Nach 72 h Behandlung wurde die RNA isoliert und das Expressionsprofil mittels qPCR bestimmt. Die Werte der Versuchsgruppen wurden in Relation zu unbehandelten HuH6-Zellen gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5).

B HuH6-Zellen wurden für 72 h mit Zebularine behandelt und der Anteil der überlebenden Zellen im MTT ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4).

6.4.5 Tanespimycin-Behandlung der HepG2-Zellen

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit verschiedenen Tanespimycin-Konzentrationen führte nicht zu einer Reduktion des Anteiles der CD34⁺OV-6⁺ Zellen (vgl. Abb. 24 A). Wieder zeigte sich eher ein Anstieg dieser Population bei steigenden Tanespimycin-Konzentrationen. Im MTT offenbarte Tanespimycin bereits bei niedrigen Konzentrationen eine starke allgemeine zytotoxische Wirkung (vgl. Abb. 24 B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im FACS war von keinem gezielten Effekt auf die dreifach-positive Population auszugehen.

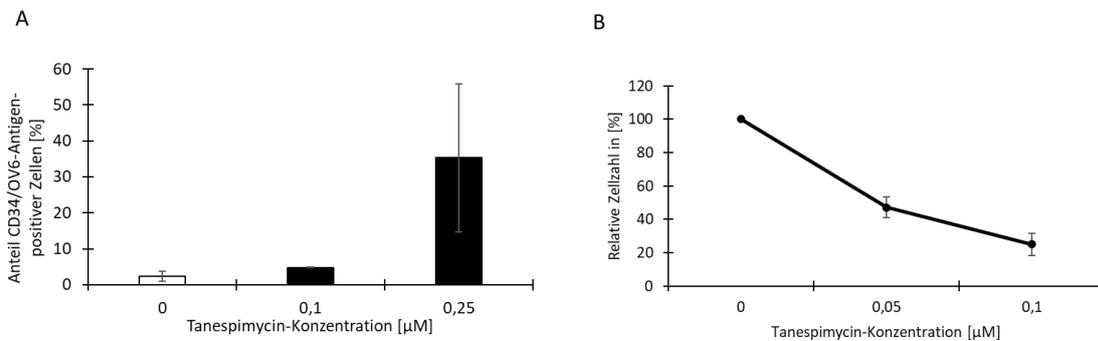


Abb. 24: Behandlung der HepG2-Zellen mit Tanespimycin führt bei starker zytotoxischen Wirkung zu einer Selektion der CD34⁺OV-6⁺ Population.

A HepG2-Zellen wurden für 48 h mit Tanespimycin behandelt und der Anteil der CD34⁺OV6⁺-Antigen+ Zellen im FACS ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

B Nach 48 h Behandlung wurde der Anteil der überlebenden Zellen im MTT ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2).

6.4.6 Tanespimycin-Behandlung der HuH6-Zellen

Die Behandlung der HuH6-Zellen mit Tanespimycin führte nach 48 h zu einer wirksamen Reduktion des CD34⁺OV-6⁺ Anteiles (vgl. Abb. 25 B). Dabei konnte durch die Nutzung von 0,1 μ M sowie von 0,25 μ M Tanespimycin ein vergleichbarer Effekt erzielt werden. Mit beiden Konzentrationen wurden CD34⁺OV-6⁺ Zellen signifikant reduziert.

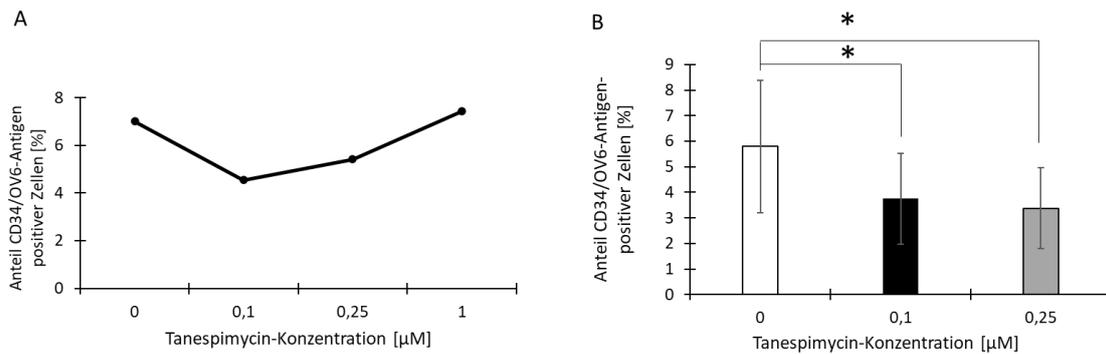


Abb. 25: Tanespimycin führt zu einer signifikanten Reduktion des Anteiles der CD34⁺OV-6⁺ Zellen.

HuH6-Zellen wurden ausplattiert und 24h später mit Tanespimycin behandelt, der Anteil der CD34/OV6-positiven Population wurde nach 48h Behandlung im FACS ermittelt. **A** Titration der benötigten Tanespimycin-Konzentration. **B** Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=6). Ein Wilcoxon-matched-pairs-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (* $p < 0,05$).

Im MTT zeigte Tanespimycin nur eine mäßig ausgeprägte zytotoxische Wirkung und reduzierte auch bei steigenden Konzentrationen nur gering die Zahl der vitalen Zellen (vgl. Abb. 26 A). Auf mRNA-Ebene führte die Behandlung mit 0,25 μ M Tanespimycin zu einer signifikant reduzierten Expression von AID und Oct4 im Vergleich zu unbehandelten HuH6-Zellen (vgl. Abb. 26 B). Bei der Nutzung von 0,1 μ M Tanespimycin lässt sich ebenfalls bereits ein absteigender Trend beobachten. Gleiches galt für die Oberflächenmarker CD90 und CD34, die ebenfalls eine fallende Tendenz zeigten.

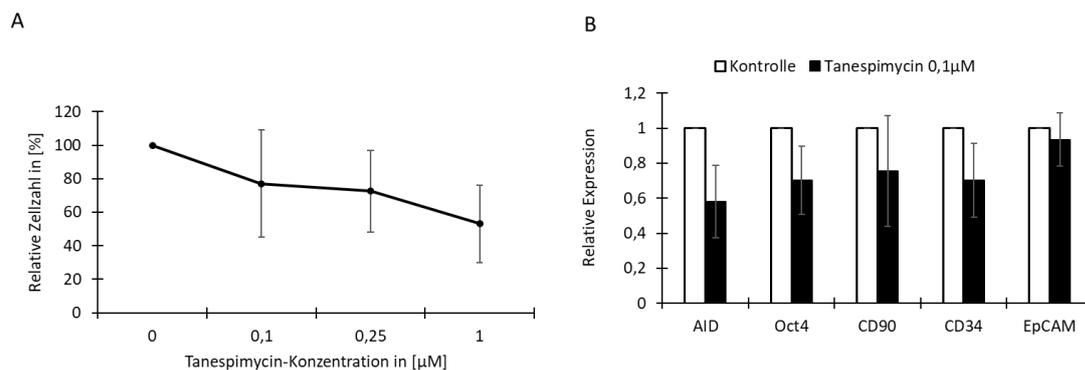


Abb. 26: Die Behandlung mit Tanespimycin bewirkt nur einen geringen Zelltod und führt zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Level.

A 72 h nach Behandlung der HuH6-Zellen wurde die Zellvitalität mittels MTT ermittelt. Die Zellzahlen der Versuchsgruppen wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle (0) gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4)

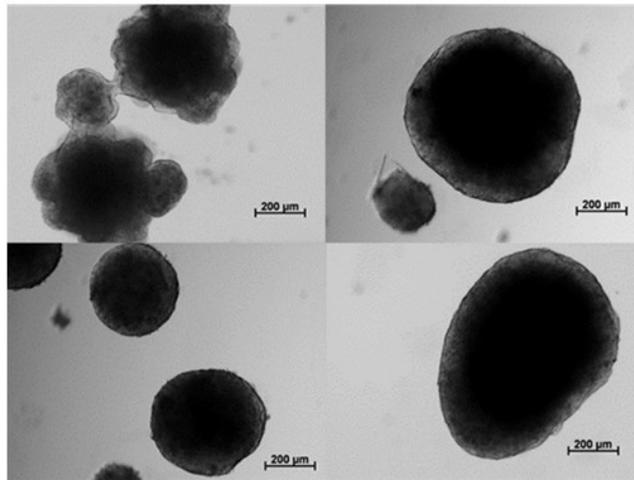
B HuH6-Zellen wurden 48 h mit 0,1 μ M Tanespimycin behandelt, danach erfolgte die Expressionsanalyse mittels qPCR. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung in Relation zur unbehandelten Kontrolle dar (n=5). Ein Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

6.4.7 Tumor-Sphäroid- Assay der HuH6-Zellen unter Zebularine- und Tanespimycin-Behandlung

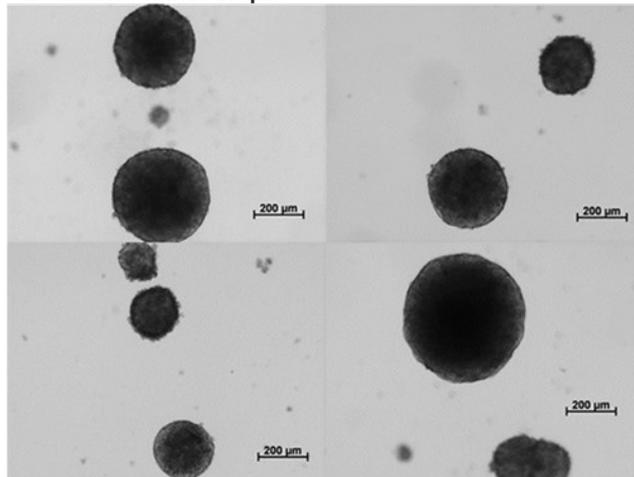
Um den Einfluss von Zebularine und Tanespimycin auf die Tumorstammzellpopulation näher zu charakterisieren, wurde die Fähigkeit analysiert, nach einer Behandlung mit Zebularine und Tanespimycin, Tumor-Sphäroide zu bilden.

Huh6-Zellen wurden dafür in Tumor-Sphäroid-Medium (s. Tab. 8) auf Low-Attachment-Platten mit oder ohne die Substanzen für 11 Tage kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der Größe der gebildeten Sphäroide. Dabei wurden nur Sphäroide berücksichtigt, die einen Durchmesser von ca. 50 μ m aufwiesen und nicht adhäriert waren.

Unbehandelt



Zebularine 100 µM



Tanespimycin 0,1 µM

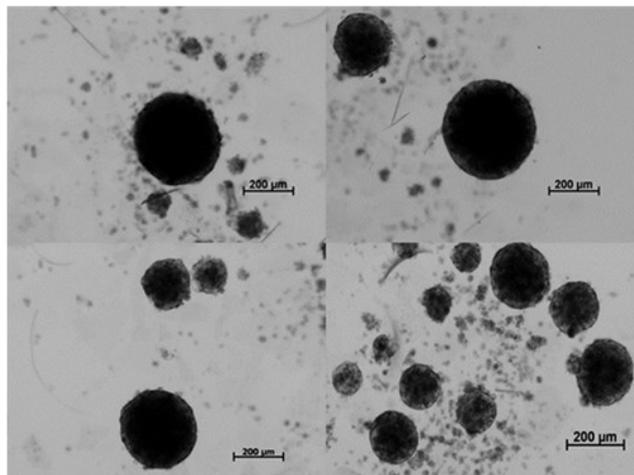


Abb. 27: Eine Behandlung mit Zebularine und Tanespimycin schränkt die Bildung von Tumor-Sphäroiden ein. Exemplarische Bilder von Sphäroiden nach 11-tägiger Kultivierung in Tumor-Sphäroid-Medium (n=3).

Bei Betrachtung der Sphäroide in Abb. 27 zeigte sich eine Beeinträchtigung der Sphäroid-Bildung bei den behandelten Zellen. Neben einer verminderten Größe waren die Sphäroide der behandelten Zellen weniger kompakt; oft bildeten sich lose zusammenhängende Zellmassen im Vergleich zur Kontrolle. Das Ausmessen der Sphäroide zeigte eine deutliche und signifikante Größenminderung der gebildeten Sphäroide bei den mit Zebularine und Tanespimycin behandelten Zellen (vgl. Abb. 28).

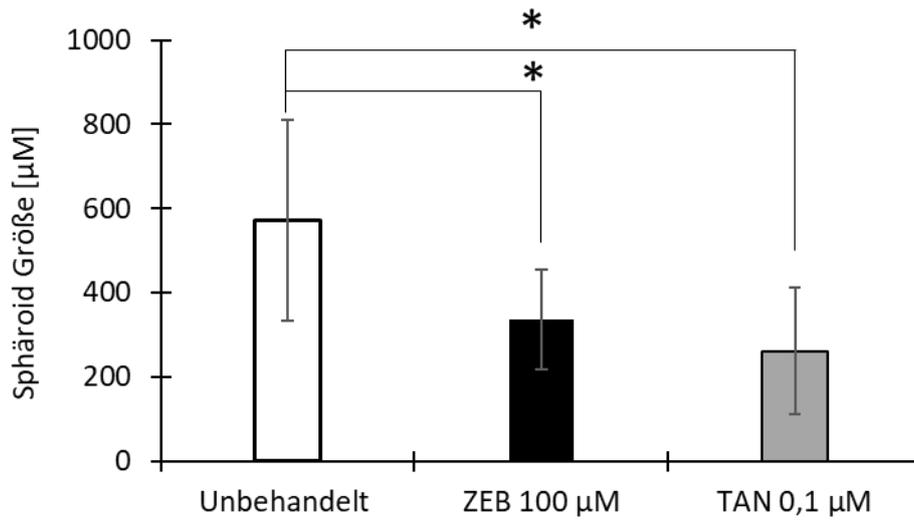


Abb. 28: Die Behandlung mit Zebularine und Tanespimycin führt zu einer reduzierten Größe der gebildeten Tumor-Sphäroide der HuH6-Zellen. HuH6-Zellen wurden in 500 µl Tumor-Sphäroid-Medium/ Well in 24-Well-Low-Attachment Platten kultiviert. Anteilig wurden Zellen mit 100 µM Zebularine und 0,1 µM Tanespimycin behandelt. Die Größe der Sphäroide wurde nach 11 Tagen ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Ein Kruskal-Wallis-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (* $p < 0,05$).

6.5 Konsekutive Kombinationsbehandlung mit Cisplatin

Das Standardzytostatikum bei der Behandlung von Hepatoblastomen ist Cisplatin. Wie bereits dargestellt, führte eine Behandlung mit Cisplatin zu der Eliminierung der meisten Zellen. Allerdings überlebte eine kleine Population, die zum größten Teil CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ war. Eine Behandlung der HuH6-Zellen mit den DNMT-Inhibitoren Decitabine und Zebularine sowie dem HSP90-Inhibitor Tanespimycin wiederum führte zu einer Reduktion dieser CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population. Nun sollte das Potential der einzelnen Substanzen im Zusammenspiel mit Cisplatin ermittelt werden. Fraglich war, inwiefern sie gemeinsam zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl und speziell der Tumorstammzellen führen.

6.5.1 Messung der Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mittels MTT-Assay

HuH6-Zellen wurden dafür 24 h nach Ausplattierung für 72 h mit Zebularine bzw. Decitabine und für 48 h mit Tanespimycin behandelt, bevor 2 µg/ml Cisplatin für weitere 72 h hinzugefügt wurden. Im Anschluss erfolgte die Viabilitätsbestimmung mittels MTT.

Die Anzahl der überlebenden Zellen variierte dabei stark zwischen den einzelnen Kombinationsbehandlungen. Zebularine zeigte mit Abstand die stärkste zytotoxische Wirkung im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung (vgl. Abb. 29 B). Die Kombination aus Decitabine und Cisplatin reduzierte ebenfalls tendenziell die überlebende Population im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin. Damit zeigte auch Decitabine einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt, wenn auch nicht so gravierend wie Zebularine (vgl. Abb. 29 A). Die Vorbehandlung mit Tanespimycin führte zu keinem verstärkten Zelltod: Der Anteil der überlebenden Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit Tanespimycin war vergleichbar mit der alleinigen Cisplatin-Behandlung (vgl. Abb. 29 C). Die zytotoxische Wirkung war somit vor allem auf den Effekt von Cisplatin zurückzuführen.

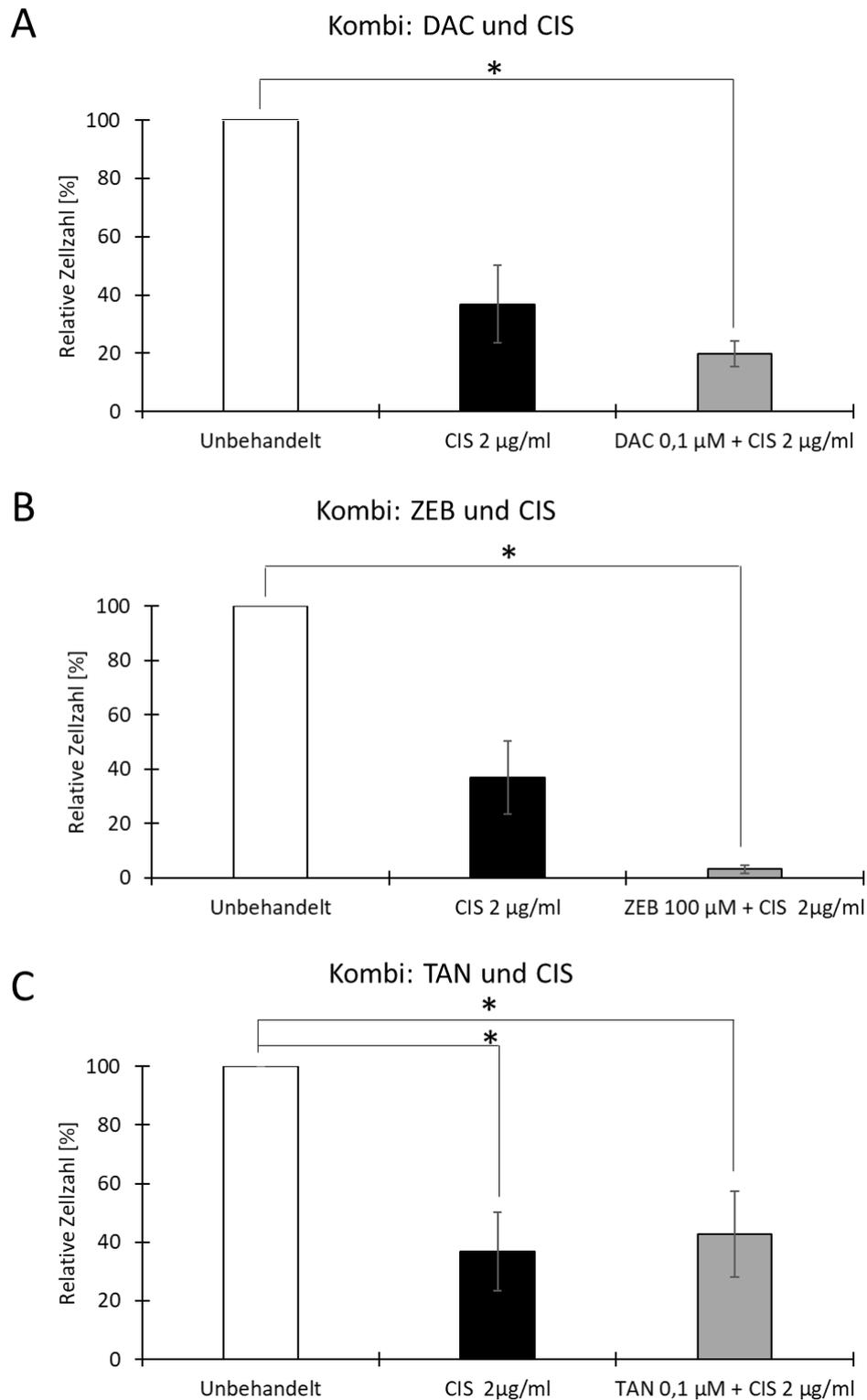


Abb. 29: Die Zellvitalitätsbestimmung nach der Kombination mit einzelnen Substanzen mit Cisplatin führt zu einem unterschiedlich ausgeprägten Zelltod. Die Zellen wurden entweder nur mit 2 µg/ml Cisplatin oder vorher für 72 h bzw. 48 h mit Zebularine und Decitabine bzw. Tanespimycin behandelt und der Anteil der überlebenden Zellen mittels MTT bestimmt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, die in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt wurden. **A** Kombination aus Decitabine und Cisplatin (n=8) **B** Kombination aus Zebularine und Cisplatin (n=7) **C** Kombination aus Tanespimycin und Cisplatin (n=12). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

6.5.2 FACS-Analyse nach Kombinationsbehandlung

Die Zellen, die die Kombinationsbehandlung nach oben aufgeführten Schema überlebt haben, wurden hinsichtlich der Expression der Marker CD90, CD34 und OV6-Antigen mittels FACS-Analyse untersucht. Abb. 30 zeigt den Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ an der überlebenden Gesamtpopulation. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen aus voneinander unabhängigen Experimenten.

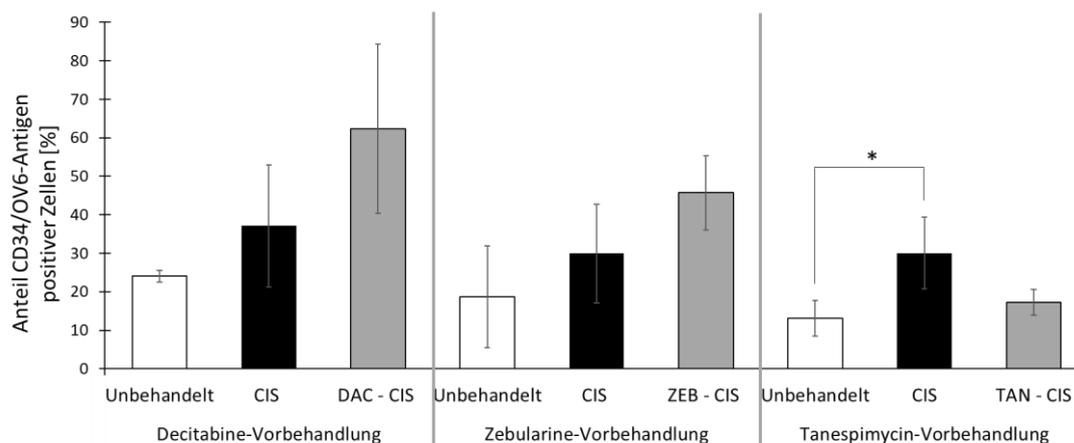


Abb. 30: Die Kombibehandlung von Cisplatin und Tanespimycin zeigt eine Verringerung des Anteils der CD34⁺OV-6⁺ positiven Population. Nach einer Vorbehandlung mit 0,1 μ M Decitabine (DAC) für 72 h, 100 μ M Zebularine (ZEB) für 72 h und 0,1 μ M Tanespimycin (TAN) für 48 h erfolgte die Hinzugabe von 2 μ g/ml Cisplatin (CIS) für weitere 72 h. Im Anschluss wurde das Oberflächenprofil im FACS ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (DAC-CIS n=3, ZEB-CIS n=3, TAN-CIS n=4). Ein Dunn's-multiple-comparisons-Test wurde für jede Substanz einzeln durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

Wie bereits in den vorherigen Experimenten beobachtet, führte eine Behandlung mit Cisplatin zur Anreicherung der CD34⁺OV-6⁺ Zellen (schwarze Balken), deren prozentualer Anteil in der überlebenden Population zunahm. Decitabine führte in Kombination mit Cisplatin unerwarteterweise zu einem erhöhten Anteil der CD34⁺OV-6⁺ Population und verstärkte die Selektion dieser Zellen im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung (vgl. Abb. 30 links). Auch eine Vorbehandlung der Zellen mit Zebularine verursachte einen Anstieg dieser Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. Die zuvor beobachtete relativ starke Wirkung auf die positive Population war nach der Cisplatin verursachten Anreicherung nicht mehr zu sehen, auch wenn die Kombination insgesamt zu einem beträchtlichen Zelltod führte (vgl. Abb. 29 B). Wurden die Zellen vor

der Cisplatin-Behandlung mit Tanespimycin behandelt, konnte eine tendenzielle Verringerung der Cisplatin-resistenten CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen erreicht werden. Der prozentuale Anteil dieser positiven Population zeigte im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung einen absteigenden Trend. (vgl. Abb. 30 rechts).

Zebularine und Decitabine zeigten eine neuartige Wirkung im Hinblick auf die bereits zuvor erwähnten High- und Low-positiven Populationen (vgl. Abb. 31 und 32 unten). Wie zuvor beobachtet, zeigte die alleinige Cisplatin-Behandlung einen erhöhten Anteil der Low-positiven Population, wobei der prozentuale Anteil der High-positiven Population wie bei den unbehandelten Zellen höher oder gleichwertig blieb. Eine Vorbehandlung mit Decitabine und auch mit Zebularine führte dazu, dass zwar der Anteil der High-positiven Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung abnahm, jedoch der Anteil der Low-positiven Population im Vergleich stärker zugenommen hat. Das Verhältnis der High-positiven Population änderte sich also zugunsten der Low-positiven Population.

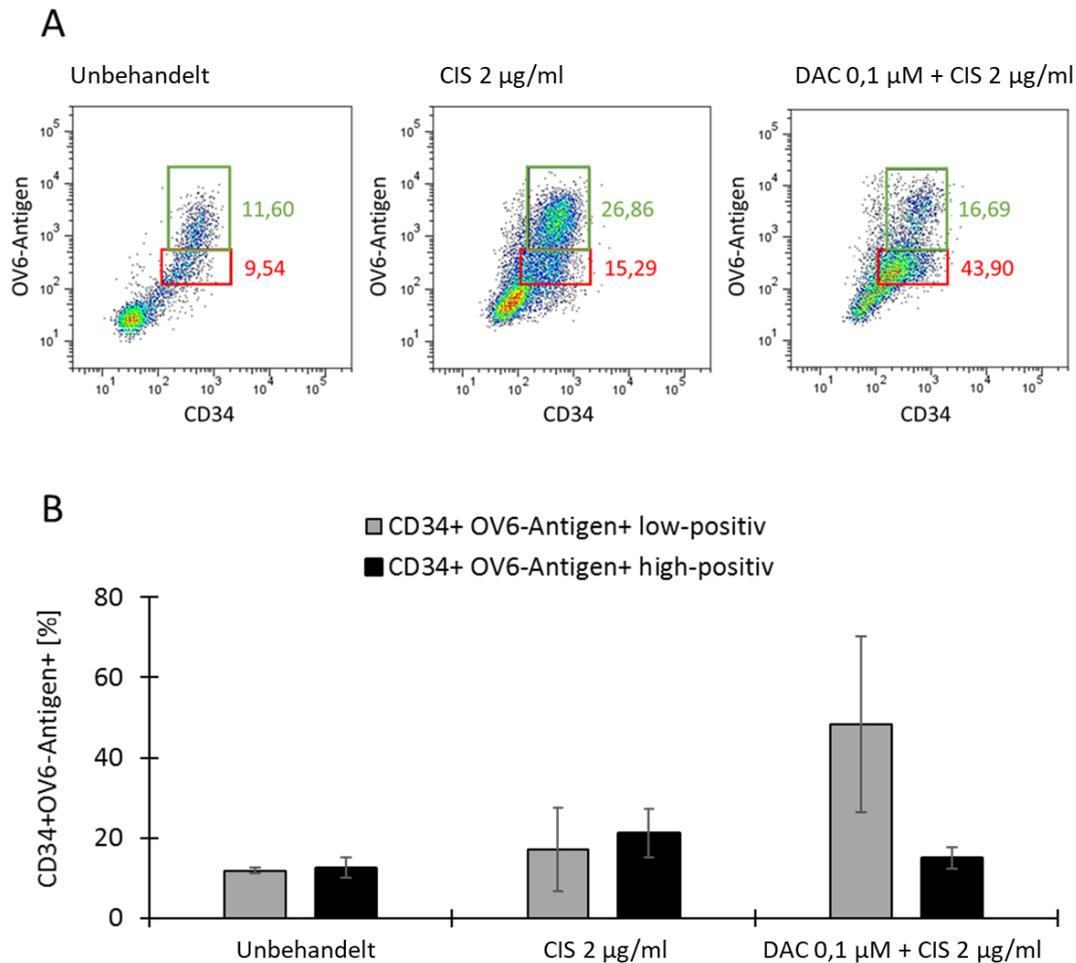


Abb. 31: Die Kombination von Decitabine und Cisplatin verursacht einen prozentualen Anstieg der Low-positiven Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. HuH6-Zellenn wurden nur mit 2 µg/ml Cisplatin oder 0,1 µM Decitabine und 2 µg/ml Cisplatin behandelt. Im Anschluss wurde das Oberflächenprofil für CD34 und das OV-6-Antigen mittels FACS-Messung bestimmt. Die doppelt-positive Population wurde nach high- und low-positiven Zellen gegatet. **A** Exemplarische Dotplot-Darstellung im Pacific Blue- (CD34) und APC-(OV6-Antigen) Kanal, in den roten Kästchen sind low CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen und in den grünen Kästchen sind high CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen. **B** Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

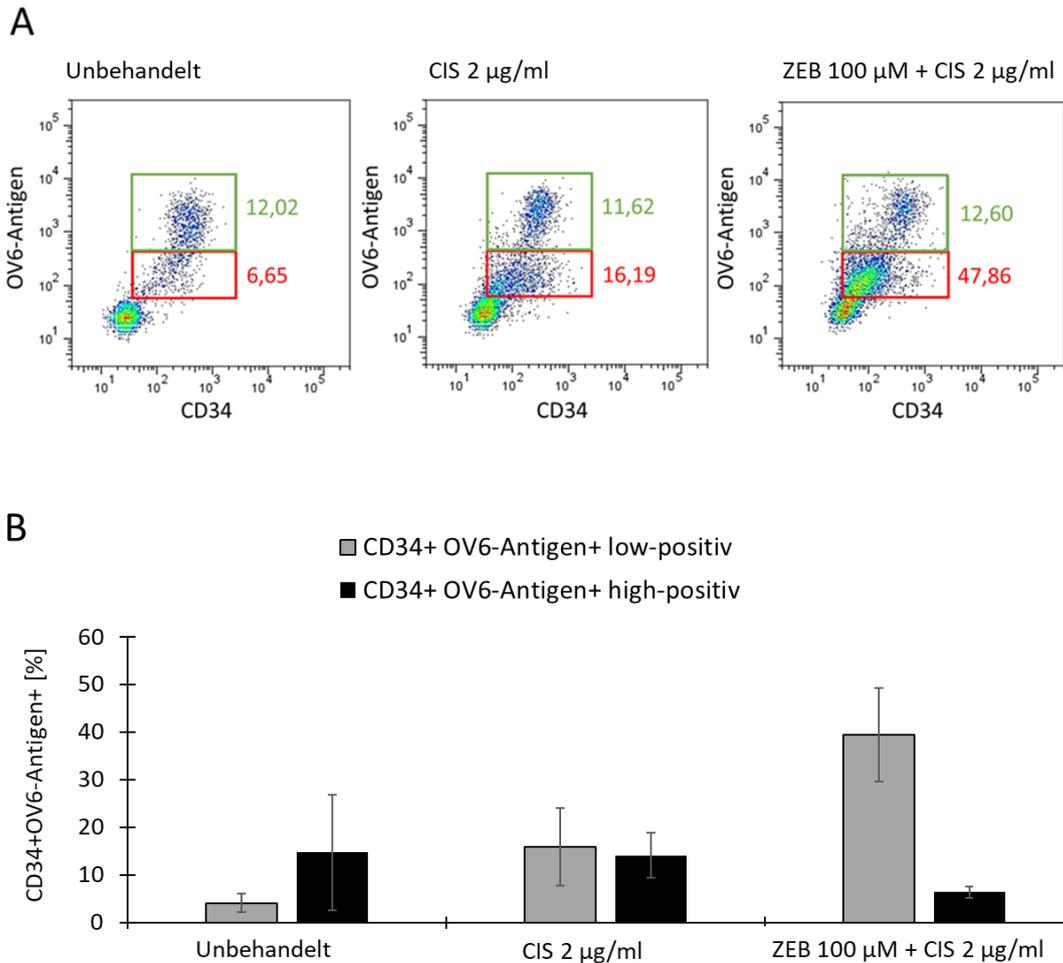


Abb. 32: Die Kombination von Zebularine und Cisplatin führt zu einer prozentualen Anreicherung der Low-positiven Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. HuH6-Zellen wurden nur mit 2 µg/ml Cisplatin oder 100 µM Zebularine und 2 µg/ml Cisplatin behandelt. Im Anschluss wurde das Oberflächenprofil für CD34 und das OV6-Antigen mittels FACS-Messung bestimmt. Die doppelt-positive Population wurde nach high- und low-positiven Zellen gegatet. **A** Exemplarische Dotplot-Darstellung im Pacific Blue- (CD34) und APC-(OV6-Antigen) Kanal, in den roten Kästchen sind low CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen und in den grünen Kästchen sind high CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen. **B** Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3)

Die Vorbehandlung mit Tanespimycin kehrte das Verhältnis der High- und Low-positiven Population nicht um. Im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung wurde der Anteil beider Populationen durch Tanespimycin reduziert (vgl. Abb. 33).

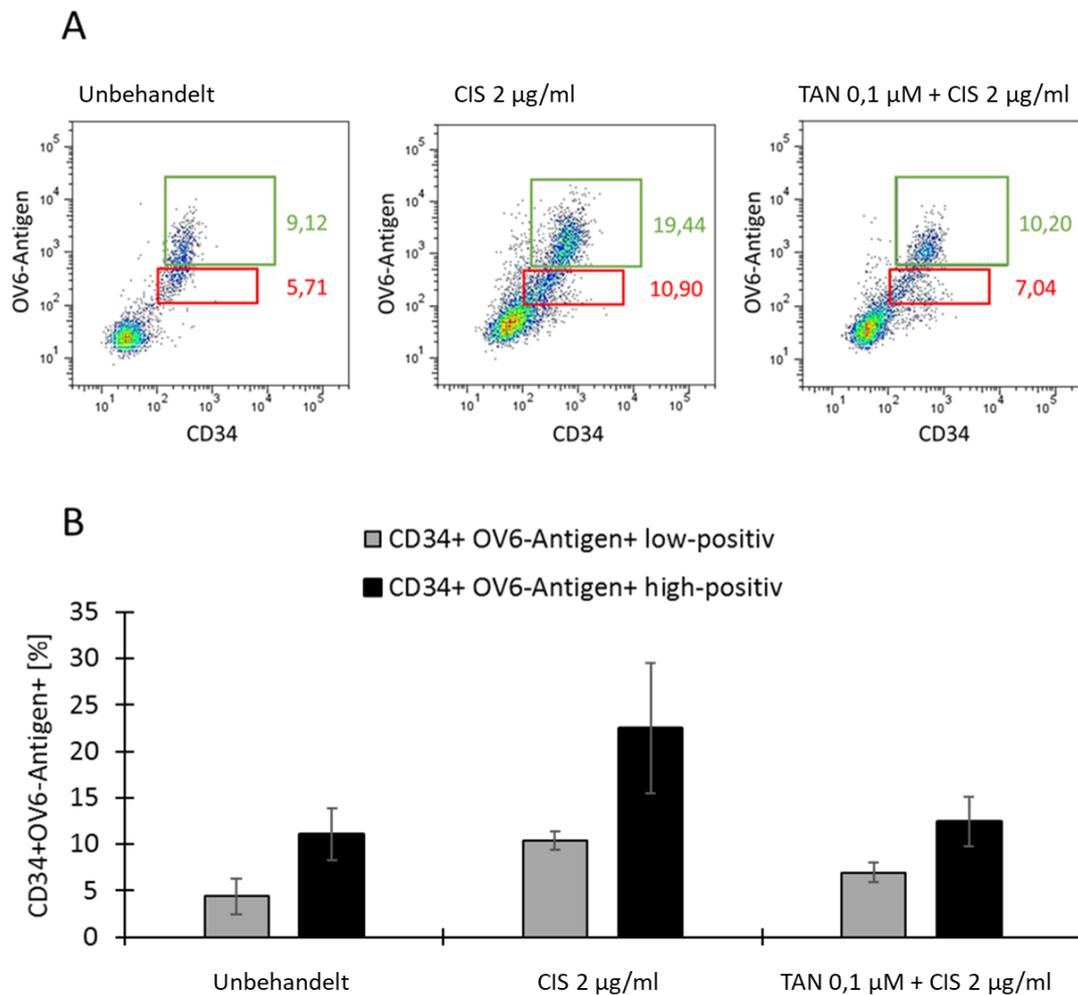


Abb. 33: Die Kombination von Tanespimycin und Cisplatin führt zu einer prozentualen Reduktion der Low- und High-positiven Population. HuH6-Zellen wurden nur mit 2 µg/ml Cisplatin oder 0,1 µM Tanespimycin und 2 µg/ml Cisplatin behandelt. Im Anschluss wurde das Oberflächenprofil für CD34 und das OV6-Antigen mittels FACS-Messung bestimmt. Die doppelt-positive Population wurde nach high- und low-positiven Zellen gegatet. **A** Exemplarische Dotplot-Darstellung im Pacific Blue- (CD34) und APC-(OV6-Antigen) Kanal, in den roten Kästchen sind low CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen und in den grünen Kästchen sind high CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen. **B** Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4).

6.5.3 Expressionsanalyse nach Kombinationsbehandlung mittels qPCR

Nach Kombinationsbehandlung erfolgte die Extraktion von mRNA und die Analyse der Genexpression der überlebenden Zellen.

Auf mRNA-Ebene führte eine Vorbehandlung mit Tanespimycin im Mittel zu einer signifikant reduzierten Transkription des Pluripotenzmarkers Oct4 sowie der Oberflächenmarker CD90 und CD34. Auch AID zeigte einen absteigenden Trend im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung.

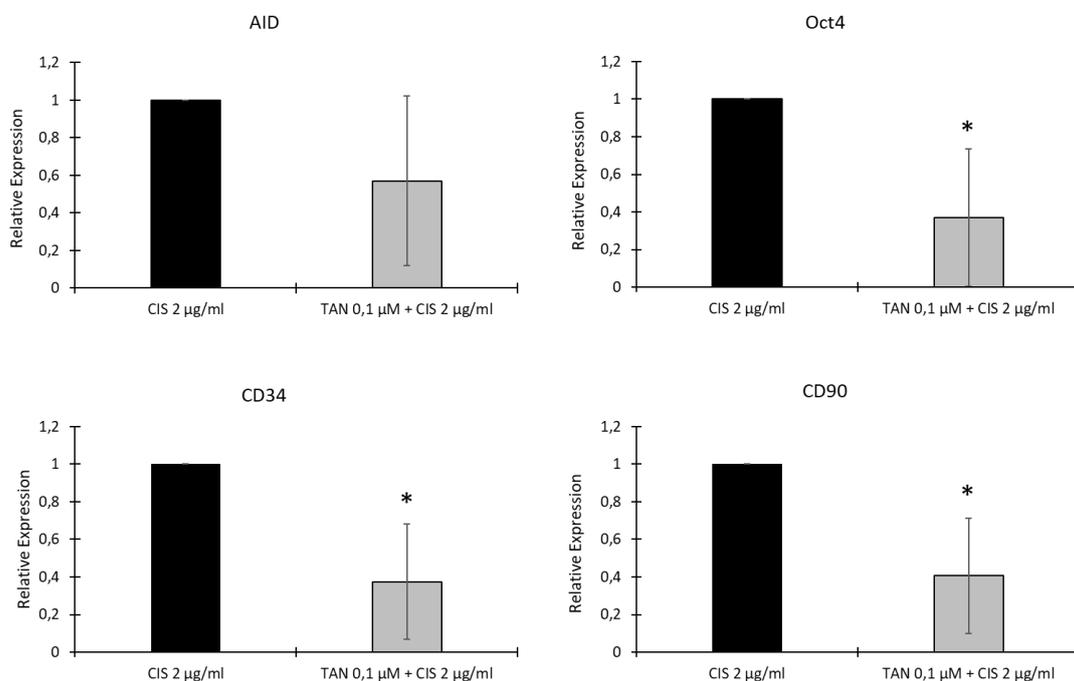


Abb. 34: Die Kombination von Tanespimycin und Cisplatin vermindert die Expression von AID und Oct4 im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. HuH6-Zellen wurden entweder mit einer Kombination aus 0,1 µM Tanespimycin und 2 µg/ml Cisplatin oder allein mit 2 µg/ml Cisplatin behandelt. Im Anschluss wurden die RNA isoliert und eine qPCR durchgeführt. Die Werte wurden in Relation zu mit 2 µg/ml Cisplatin behandelten Zellen ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=5). Ein Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu berechnen (*p < 0,05).

Die Vorbehandlung mit Zebularine und Decitabine hingegen führte im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung zu einer tendenziell erhöhten Expression von AID und Oct4 (Daten nicht gezeigt).

7 Diskussion

7.1 CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen als mögliche Krebsstammzellen im Hepatoblastom

Die Existenz einer Krebsstammzellpopulation hat Konsequenzen für eine zytostatische Therapie, da diese Zellen unbedingt eliminiert werden müssen, um einen Rückfall zu verhindern. Die Identifizierung von Krebsstammzellen im Hepatoblastom stellt sich allerdings als ein schwieriges Unterfangen dar. Hochgehandelte Krebsstammzellmarker wie CD133 oder EpCAM werden tatsächlich von den meisten Zellen einiger Hepatoblastom-Subtypen exprimiert. Dies beweist den allgemein unreifen Charakter der Zellen und unterstreicht die Schwierigkeit der Identifizierung einer noch unreiferen Krebsstammzellpopulation. Zusätzlich erschwert wird die Forschung am Hepatoblastom durch nur wenige charakterisierte Zelllinien sowie ihre begrenzte öffentliche Verfügbarkeit. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf alle oder auch nur auf einen durch die Zelllinie repräsentierten Subtypen des Hepatoblastoms ist bei den wenigen in Studien verwendeten Zelllinien daher schwierig. Besonders fehlt es an Zelllinien aus unreifen und damit häufig sehr aggressiven histologischen Subtypen. Bei diesen würden Betroffene sicherlich von einer gezielten Behandlungsmethode, wie zum Beispiel eine gegen die Krebsstammzellen gerichtete Therapie, profitieren.⁸⁵

Nichtsdestotrotz lässt sich mit der Markerkombination aus den vor allem hämatopoetischen Stammzellmarker, aber auch von vermutlichen Leberstammzellen exprimierten Marker CD34 und CD90 sowie dem Antigen zu dem „oval-cell“-Antikörper OV-6 in den etablierten Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 eine kleine Zellpopulation mit Stammzellcharakter detektieren. Der Anteil dieser Population variiert dabei mit dem Differenzierungsgrad der einzelnen Tumorsubtypen, aus denen die Zelllinien etabliert wurden. Während nur etwa 3-5 % der Zellen der HepG2-Zelllinie, die einem gut differenzierten, fetalen Subtypus des Hepatoblastoms entstammt, diese Markerkombination exprimieren, enthalten die HuH6-Zellen, die auf einen undifferenzierten, vornehmlich embryonalen Subtyp zurückzuführen sind, teilweise einen Anteil von 8-15 % dreifach-positiver Zellen. Vorarbeiten konnten darlegen, dass diese Zellen verstärkt Pluripotenzmarker auf mRNA-Ebene exprimieren und ein erhöhtes Migrationsverhalten aufweisen.

Aus HepG2-Zellen konnte der Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen in den in Tumor-Sphäroid-Assay gebildeten Sphäroiden erhöht werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass es sich bei dieser Population tatsächlich um eine Krebsstammzellpopulation des Hepatoblastoms handelt. Die dreifachpositiven Zellen bewiesen in drei aufeinander folgenden Sphäroid-Generationen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur anschließenden Differenzierung. Auch wenn eine deutliche Anreicherung der dreifachpositiven Population durch die Sphäroid-Bildung zu beobachten war, war ein gewisser Anteil der Sphäroid-Zellen negativ für die drei Oberflächenproteine. Dies könnte bedeuten, dass in den Sphäroiden nicht nur identische Klone generiert werden, sondern auch differenziertere Zellen die Gesamtzellmasse ausmachen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Sphäroid-Bildung einiger Brustkrebszelllinien gemacht.⁹² Die phänotypische Heterogenität könnte allerdings auch auf eine Dynamik der Oberflächenproteine hindeuten. Deren Expression kann z. B. vom Zellzyklus abhängig sein, sodass zwei augenscheinlich verschiedene Populationen tatsächlich ein und dieselbe Zellpopulation darstellen.^{93 94}

Nachdem die Sphäroid-Zellen wieder in normalen Medium aufgenommen wurden, kam es zu einer Reduktion der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen. Diese könnte als eine Re-Differenzierung gedeutet werden. Allerdings sollte dies kritisch betrachtet werden: Da die Sphäroide auch CD34⁻OV-6⁻CD90⁻ Zellen enthielten, ist fraglich, ob der Rückgang der dreifach-positiven Population unter Differenzierungsbedingungen tatsächlich auf eine Differenzierung derselben oder auf eine verstärkte Proliferation der dreifach-negativen Zellen zurückzuführen ist. Um dies näher zu untersuchen, könnte man die Zellen vor der Sphäroid-Bildung mittels MACS-Auftrennung nach ihrem Oberflächenprofil sortieren, um den Anteil dieser dreifach-positiven Population innerhalb der Sphäroide zu erhöhen und so die anschließende Differenzierung besser auf eine Population zurückführen zu können. Außerdem könnte eine längere Differenzierungszeit den beobachteten Effekt verstärken. Vor allem auf mRNA-Ebene zeigen Lineage- und Differenzierungsmarker, entgegen der Erwartung, unter Differenzierungsbedingungen keine erhöhte Transkription. Dies lässt vermuten, dass dieser Prozess einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt.

Neben der Fähigkeit zur Bildung von Tumor-Sphäroiden wiesen CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen auch eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Cisplatin-Therapie auf. Wie erwartet

führte die Behandlung der HuH6- und HepG2-Zellen mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen zu einem starkem Zelltod. Die wenigen überlebenden Zellen waren zum größten Teil positiv für das OV-6-Antigen sowie die Marker CD34, CD90, sodass die Behandlung wie vermutet zu einer Selektion dieser Krebsstammzellpopulation beigetragen hat. Diese Cisplatin-vermittelte Anreicherung von Krebsstammzellen ist auch in verschiedenen Krebsentitäten bekannt.^{95,96}

7.2 Low-positive Zellen- neue Krebsstammzellpopulation?

Interessanterweise teilten sich dabei die angereicherten CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen in zwei verschiedene Populationen auf: Neben der bereits bekannten Krebsstammzellpopulation wurde eine Population mit einer niedrigeren Oberflächenexpression der drei Marker CD90, CD34 und OV6-Antigen sichtbar, die sich jedoch deutlich von den dreifach-negativen Zellen abgrenzen lässt. Diese niedrig positive Population (in Ergebnissen auch „low-positive“ genannt) ist in unbehandelten Proben kaum zu erkennen. Erst eine MACS-Auftrennung, in der nach CD90-positiven und CD90-negativen Zellen sortiert wird, lässt die Existenz der Low-positiven Zellen erahnen. Die Cisplatin-Behandlung führt zu einem Zelltod von vornehmlich Nicht-Krebsstammzellen, sodass dadurch auch hier der Anteil dieser niedrig positiven Population schwerer ins Gewicht fällt und demaskiert wird. Hierbei überraschend ist der hohe prozentuale Anteil der Low-positiven Zellen an der überlebenden Population bei der Nutzung von besonders hohen Cisplatin-Konzentrationen, während der Anteil der bereits bekannten High-positiven Population eher abnehmend ist. Sie zeigen somit eine erhöhte Chemoresistenz und beweisen ihren Stammzellcharakter. Dabei scheint der stark erhöhte Anteil dieser Population nicht allein auf das Sterben der übrigen nicht-resistenten Zellen zurückführbar zu sein. Tatsächlich lässt die absolute Zunahme dieser Zellpopulation eher eine verstärkte Proliferation vermuten.

Ihre sichtbare Vermehrung führt nun zur Frage, woher diese niedrig positiven Zellen stammen. Handelt es sich dabei um Tochterzellen der High-positiven Zellen oder stellen sie eine eigene Population von Krebsstammzellen dar, die phänotypisch ein anderes Oberflächenprofil präsentieren? Im HCC lassen sich beispielsweise CD133⁺ ALDH^{high}, CD133⁺ EpCAM⁺, CD133⁻ ALDH^{low} und CD133⁻ EpCAM⁻ unterscheiden. Während die für die einzelnen Marker positiven Zellen effektiver Sphäroide bilden konnten, wiesen die

negativen Pendanten nicht nur eine erhöhte Chemoresistenz, sondern auch ein verstärktes Invasionsverhalten auf.⁹⁷ Auch bei anderen Entitäten wie in Brusttumoren konnten mehrere Populationen von Krebsstammzellen mit unterschiedlichen Phänotypen und Eigenschaften beschrieben werden.²³ Somit könnte die bereits bestehende und von der High-positiven Population zu unterscheidende Low-positive Population durch den externen Druck der Cisplatin-Behandlung zur Proliferation angeregt worden sein. Sollte die Low-positive Population keine eigenständige Krebsstammzellpopulation darstellen, sondern aus bestehenden Zellen hervorgehen, können zwei Theorien für den Ursprung herangezogen werden: Gemäß dem hierarchischen Prinzip nehmen die Krebsstammzellen eine übergeordnete Rolle ein. Sie sind der klonale Ursprung aller Zellen eines Tumors und sorgen über eine asymmetrische Teilung für ihre Selbsterneuerung und die Nachlieferung von differenzierten Zellen. Gerade Chemo- und Radiotherapien, die eigentlich zur Bekämpfung des Tumors durchgeführt werden, können die Krebsstammzellen zu Hochleistungen antreiben, die diese dank ihrer ausgereiften Resistenzmechanismen überstehen. Unter natürlichen Bedingungen zeigen die Krebsstammzellen einiger Tumorarten eine langsamere Proliferation im Vergleich zu den sich schnell teilenden, differenzierteren Tumorzellen und arretieren teilweise sogar im Zellzyklus. Doch vor allem Chemotherapien können die Krebsstammzellen zu einer gesteigerten Proliferation antreiben.⁹⁸ Wie die nativen Stammzellen im Körper können auch die Krebsstammzellen sich an die verändernden Umgebungsbedingungen anpassen und von einer asymmetrischen zu symmetrischen Teilung überwechseln, die in der Bildung zweier neuer Krebsstammzellen resultiert.⁹⁹ Dementsprechend könnte die Cisplatin-Behandlung die High-positive-Krebsstammzellpopulation zu einer verstärkten Proliferation drängen und gleichzeitig auch einen Wechsel zur symmetrischen Teilung antreiben. Da so zwei gleichwertige Zellen entstehen, müssen auch Proteine und weitere zelluläre Substanzen auf zwei Zellen gleichermaßen aufgeteilt werden. Dies könnte in der Entstehung von Low-positiven Zellen münden, die das Potential besitzen, sich in eine ausgereifte High-positive Zelle zu entwickeln, sich aber kurz nach der Teilung noch in einer Zwischenphase befinden. Auch der Zellzyklus könnte Einfluss auf die Expressionsmengen der einzelnen Marker nehmen, wie es bei der Replikation von Neuronen der Fall ist.⁹³ Jüngste Erkenntnisse allerdings stellen die übergeordnete Position der Krebsstammzellen und

die starre Ordnung des hierarchischen Prinzips für einige Tumorentitäten in Frage. In vielen etablierten Zelllinien konnte eine kleine, aber meist konstante Fraktion von Krebsstammzellen identifiziert werden. Gleichzeitig zeigen die einzelnen Zellsubtypen unterschiedliche Wachstumskinetiken und Verdopplungszeiten. Dieser Fakt würde während der regelmäßigen Passagierung der Zelllinien zu einer Extinktion von Populationen mit längeren Replikationszeiten, zu denen auch die Krebsstammzellen gezählt werden, führen. Die konstanten Anteile lassen daher vermuten, dass Krebsstammzellen entweder keine verlängerten Replikationszeiten haben oder diese Population kontinuierlich aus anderen Zellen generiert wird.¹⁰⁰ Letzteres unterstützend waren in mehreren Entitäten wie im Glioblastom, bei Melanomen, aber auch bei Brustkrebs sortierte, differenzierte Tumorzellen in der Lage, nicht nur die Heterogenität des Tumors wiederherzustellen, sondern vor allem auch die für die Stammzellmarker positive Krebsstammzellpopulation zu generieren.^{22,100} Der Phänotyp der einzelnen Tumorzellen wäre somit dynamisch und bidirektionale Umwandlungen von Krebsstammzellen und Nicht-Krebsstammzellen möglich.²³ So generieren zwar Krebsstammzellen durch asymmetrische Teilung differenzierte Nachfolgerzellen; gleichzeitig haben diese allerdings auch das Potential, durch entsprechende Stimuli zu dedifferenzieren und stammzellähnliche Fähigkeiten zu erwerben.^{22,100}

Mehrere Studien konnten darlegen, dass vor allem Chemo- und Radiotherapien dazu im Stande sind, diese Dedifferenzierung zu bewirken.^{101,102} Dies resultiert in „induzierten Krebsstammzellen“, die gleich den bereits existierenden Krebsstammzellen eine erhöhte Chemoresistenz aufweisen.^{99,103,104} Dementsprechend könnte die für CD34⁺OV-6⁺CD90⁻ Population während der Cisplatin-Behandlung durch Signale der umliegenden Zellen, eventuell sogar durch Stimuli der Krebsstammzellen selbst, zur Dedifferenzierung angeregt werden, um den Tumor und vor allem den Pool an Krebsstammzellen während der zytostatischen Therapie aufrechtzuerhalten. Welcher Mechanismus letztendlich für die Anreicherung der Krebsstammzellpopulation unter Cisplatin-Behandlung und die Generierung der Low-positiven Population verantwortlich ist, lässt sich nur schwer abschätzen. Tatsächlich vermuten viele Forscher, dass die Anreicherung von Krebsstammzellen unter Chemo- oder Radiotherapie auf drei Säulen fußt: Einerseits besteht eine relative Zunahme durch den Zelltod der nicht-resistenten Population, andererseits triggert die Therapie die bereits bestehenden

Krebsstammzellen zur verstärkten Proliferation und bewirkt gleichzeitig die Entstehung von induzierten Krebsstammzellen aus differenzierten Zellen. So könnte die Low-positive Population vielleicht sogar eine Schnittstelle der letzten beiden Mechanismen darstellen, die so zur Generierung dieser Population beitragen.¹⁰⁵

7.3 AID als Zielstruktur zur Eliminierung von Krebsstammzellen

Interessanterweise zeigten die Zellen, die hohen Cisplatin-Konzentrationen standhielten, auf mRNA-Ebene auch erhöhte Mengen von AID. Dass die Krebsstammzellen des Hepatoblastoms verstärkt AID transkribieren, ist mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten übereinstimmend. Es bestärkt die Vermutung, dass dieses Enzym tatsächlich einen Einfluss auf den Stammzellcharakter nimmt. Dies unterstützend führte ein Knock-Down von AID zu geringeren Transkriptmengen der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog im Vergleich zu den Kontrollzellen. Mithin wurde ihre AID-abhängige Expression, die bereits *Bhutani* et al. beschrieben haben, bestätigt.⁶⁸ Interessanterweise zeigte der Oberflächenmarker CD90 bei einem Knock-Down von AID auch eine signifikant verminderte Transkription und CD34 folgte diesem Trend. Der genaue Mechanismus, über den AID zu einer verminderten Transkription dieser Oberflächenproteine führt, müsste näher beleuchtet werden. Allerdings lassen diese Ergebnisse vermuten, dass AID auch auf den Stammzellcharakter der Krebsstammzellen im Hepatoblastom einen Einfluss nimmt und mitverantwortlich für den Erhalt der Pluripotenz ist.

Die alleinige Standardbehandlung mit Cisplatin hat die Selektion der Krebsstammzellen verursacht, die vor allem bei High-Risk-Hepatoblastomen für das schlechte Ansprechen auf die Behandlung und die hohen Rezidivraten verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grund müssen Strategien entwickelt werden, um diese Population gleichermaßen zu eliminieren. Dabei können zwei mögliche Mechanismen angestrebt werden: Entweder wird gezielt in den Krebsstammzellen der Zelltod induziert oder man führt eine Sensitivierung derselben für die Standardtherapie herbei. Bei der letzteren Strategie wird die Abhängigkeit des Erhalts der Pluripotenz von der Aktivität von AID interessant. Sollte dieses Enzym durch eine Behandlung ähnlich wie beim Knock-Down inhibiert werden, könnte das zur Einschränkung des Stammzellcharakters führen. Die

Zellen würden zur Differenzierung gezwungen werden und würden damit empfänglich für die Wirkung von Cisplatin.

Dafür wurden die Zellen zunächst mit dem DNMT-Inhibitor Decitabine behandelt, der in B-Lymphom Zellen auch eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität von AID erzielte und zur Degradierung des Enzyms führte. Deswegen konnte ein gezielter Effekt auf die Krebsstammzellpopulation vermutet werden. Obgleich auch eine allgemein zytotoxische Wirkung auf die HuH6-Zellen beobachtet werden konnte, zeigte sich tatsächlich die erhoffte prozentuale Reduktion der Krebsstammzellpopulation. Der sinkende Anteil dieser Zellen spricht dafür, dass Decitabine von diesen Zellen aufgenommen wird und hier wirksam ist, auch wenn die übrigen Tumorzellen ebenfalls von der Decitabine-Wirkung betroffen sind. Bei den HepG2-Zellen zeigte sich ebenfalls eine geringe Reduktion der dreifach positiven Population. Bei einer nur geringen zytotoxischen Wirkung unter den verwendeten Konzentrationen ist ebenfalls zu vermuten, dass Decitabine verstärkt von den Krebsstammzellen aufgenommen wurde. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien zeigte sich auf mRNA-Ebene keine Veränderung der AID-Transkriptmengen.⁷⁸ Überraschenderweise kam es aber auch nicht zu einer Reduktion der *Downstream*-Faktoren von AID, Oct4 und Nanog. So wurde geschlussfolgert, dass Decitabine in den Zellen nicht zu einer verstärkten Degradierung von AID geführt hat, sondern über einen anderen Mechanismus wie eventuell einer Reaktivierung von hypermethylierten Tumorsuppressorgenen den Zelltod der Krebsstammzellen bewirkt hat.

Zebularine stellt ebenfalls eine Substanz dar, die die DNMT hemmt. Allerdings ist Zebularine ursprünglich als ein Inhibitor für Zytidin-Desaminasen entwickelt worden. Daher wurde Zebularine ebenfalls eingesetzt, um die aktivierungsinduzierte Zytidin-Desaminase AID in den Krebsstammzellen zu degradieren und so den Stammzellcharakter herabzusetzen. Eine Induktion der Differenzierung konnte bereits bei einer Behandlung von pankreatischen Krebsstammzellen beobachtet werden. Damit bewies Zebularine dabei weniger eine zytotoxische, sondern eher ein reprogrammierende Wirkung auf die Krebsstammzellpopulation.⁸⁰ So zeigte Zebularine auch auf die HuH6-Zellen zunächst einen ähnlichen Effekt wie Decitabine. Der Anteil der Krebsstammzellen wurde dabei sogar stärker verringert. Da sich das Verhältnis der

Zellen zu Gunsten der dreifachnegativen Population veränderte, ist eine verstärkte Aufnahme durch die Krebsstammzellen zu vermuten. Trotzdem rief auch Zebularine eine allgemein zytotoxische Wirkung hervor. Zebularine nahm weder Einfluss auf die mRNA-Expression von AID noch auf die Pluripotenzmarker. Folglich ist auch hier von einer AID-unabhängigen zytotoxischen Wirkung auszugehen. Die mit Zebularine-behandelten Tumor-Sphäroide waren im Vergleich zu den aus unbehandelten Zellen gebildeten Sphäroiden deutlich kleiner, was auf einen gleichsam inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Krebsstammzellpopulation schließen lässt. Im Gegensatz zu den HuH6-Zellen hatte Zebularine keinen Effekt auf die Krebsstammzellpopulation der HepG2-Zellen; hier war sogar eine leichte Anreicherung zu beobachten. Da von einem AID-unabhängigen Mechanismus auszugehen ist, wäre eine Aktivität von Zebularine vornehmlich als DNMT-Inhibitor wahrscheinlich. Allerdings zeigten die Ergebnisse einer Studie, dass Zebularine-behandelte HepG2-Zellen keine vermehrte Demethylierung von bestimmten Genabschnitten aufwiesen. Zebularine induzierte in den Zellen vielmehr die Apoptose. Demnach ist ein gezielter Effekt auf die Krebsstammzellpopulation durch epigenetische Veränderungen unwahrscheinlich.¹⁰⁶

7.4 Kombinationsbehandlungen mit Standardtherapeutikum Cisplatin

Auch wenn bei beiden DNMT-Inhibitoren von einer AID-unabhängigen Wirkung auszugehen ist, zeigten die Substanzen vor allem bei den HuH6-Zellen einen Effekt auf die Krebsstammzellpopulation. Deshalb wurde die Wirksamkeit von Zebularine und Decitabine in einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin untersucht. Dabei war die Erwartung, dass die Vorbehandlung vor allem die Krebsstammzellen eliminiert, was aus den Einzelbehandlungen abzusehen war. Dadurch sollte während der anschließenden Cisplatin-Behandlung eine Selektion der Krebsstammzellen verhindert werden. Als Ergebnis war eine allgemein verminderte Zellzahl sowie ein reduzierter Anteil der Krebsstammzellpopulation an möglichen überlebenden Zellen zu erwarten, was mit den Ergebnissen aus anderen Kombinationsstudien übereinstimmen würde. Im Blasen-CA führte die Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor Decitabine zu einem verminderten Anteil der KRT14-positiven Krebsstammzellpopulation, die durch die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin oder Gemcitabine im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit diesen Substanzen weiter reduziert wurde.⁷⁷ Auch in Brustkrebszelllinien sensibilisierte

eine Behandlung mit Decitabine nicht nur die Gesamttumormasse für die Wirkung von Doxorubicin, sondern speziell die chemoresistenten Krebsstammzellen.¹⁰⁷ Überraschenderweise präsentierte sich bei der Kombinationsbehandlung der HuH6-Zellen das gegenteilige Ergebnis: Im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung war der Anteil der Krebsstammzellpopulation an den insgesamt überlebenden Zellen bei einer Vorbehandlung mit Decitabine und Zebularine deutlich erhöht. Auch wenn die Kombination insgesamt den Zelltod im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung verstärkte und im Falle einer Vorbehandlung mit Zebularine tatsächlich einen sogar sehr ausgeprägten Zelltod mit sich führte, selektierte dies trotzdem die resistenten Krebsstammzellen. Interessanterweise war vor allem der Anteil der Low-positiven Population stark erhöht. Während diese Zellen bei einer alleinigen Cisplatin-Behandlung erst bei sehr hohen Konzentrationen den größten Anteil der Krebsstammzellpopulation ausmachten, zeigte sich im Falle der Kombinationsbehandlungen bereits bei der vergleichsweise niedrigen Cisplatin-Konzentration von 2 µg/ml ein enormer prozentualer Anstieg dieser Population. Die Vorbehandlung mit Zebularine und Decitabine könnte die verstärkte Proliferation oder Bildung dieser Low-positiven Population triggern. Dies deutet sich bei den Einzelbehandlungen mit den beiden Substanzen zwar noch nicht an, wird aber durch den zusätzlichen Druck von Cisplatin demaskiert. Dies könnte weiterhin die erhöhte Chemoresistenz der Low-positiven Population unterstreichen, deren prozentualer Anteil vor allem durch die Eliminierung der übrigen Zellen unter der Kombinationstherapie ansteigt. Mögliche Mechanismen für diesen Zusammenhang bedürfen weiterer Untersuchung. Letztendlich kehrt sich das Verhältnis innerhalb der dreifach-positiven-Population zu Gunsten der Low-positiven Zellen um. Da dadurch im Gegensatz zur erhofften Reduktion der Krebsstammzellpopulation sogar eine relative Anreicherung der Low-positiven-Population im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung stattfindet, ist eine Ergänzung der Standardtherapie durch diese beiden Substanzen nicht zu empfehlen. Auch wenn Zebularine insgesamt in der Kombination mit Cisplatin einen enormen Zelltod auslöst und im ersten Moment ein effektives Substrat zu sein scheint, stellt die relative Anreicherung der vermutlich chemoresistenten Low-positiven Zellen einen großen Nachteil dar. Zusätzlich birgt die besonders starke zytotoxische Wirkung weitere

Gefahren. Letztendlich darf eine Therapie den schmalen Grat nicht überschreiten, den gewünschten Effekt zu bewirken, ohne eine zu starke toxische Wirkung zu haben.

7.5 Behandlung mit HSP90-Inhibitor Tanespimycin

Neben den beiden DNMT-Inhibitoren wurde ebenfalls die Wirkung des HSP90-Inhibitors Tanespimycin auf die Krebsstammzellpopulation untersucht. Auch mit dieser Substanz sollte eine Degradierung von AID verursacht werden, sodass der Krebsstammzellcharakter nicht länger aufrechterhalten werden kann. Dabei liegt der Angriffspunkt bei dem HSP90-Komplex, welcher AID im Zytoplasma stabilisiert und vor einer Degradierung schützt⁸⁴. Ähnlich wie Zebularine zeigte Tanespimycin keinen gezielten Effekt auf die Krebsstammzellpopulation der HepG2-Zellen. Es wäre denkbar, dass hier anti-apoptotische Faktoren, die eigentlich über den HSP90-Komplex stabilisiert werden, nun freigesetzt und zur Degradierung freigegeben werden und damit den Zelltod auslösen. Ähnliches konnte bereits bei Lungenkrebszellen unter Nutzung eines HSP90-Inhibitors festgestellt werden.¹⁰⁸ Auch in diesem Falle wäre von einem Überlebensvorteil der Krebsstammzellen auszugehen, da sie über ausgereifte anti-apoptotische Systeme verfügen.¹⁰⁹ Die Behandlung der HuH6-Zellen mit Tanespimycin hingegen zeigte tatsächlich den erwünschten Effekt. Der Anteil der Krebsstammzellen an der Gesamtpopulation nahm unter einer Tanespimycin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen ab. Dabei war die zytotoxische Wirkung von Tanespimycin auf die HuH6-Zellen geringer als die von Decitabine oder Zebularine. So könnte der verminderte Anteil der Krebsstammzellpopulation auf einen durch Tanespimycin verursachten Zelltod derselben zurückzuführen sein, aber auch auf eine durch Tanespimycin getriggerte Differenzierung der Zellen. Dadurch nimmt der Anteil der Krebsstammzellen zu Gunsten der dreifach-negativen Population ab. Darauf hindeutend ist auf mRNA-Ebene eine Reduktion der Transkriptmengen des Pluripotenzmarkers Oct4 zu beobachten. Zusätzlich wurde auch AID vermindert transkribiert. Einen ähnlich reduzierenden Effekt von Tanespimycin auf mRNA-Ebene von AID konnte in einigen chronischen lymphatischen Leukämien nachgewiesen werden, wohingegen in B-Zellen nur ein Effekt auf Proteinebene beschrieben ist.⁸³ Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der HSP90-Komplex auch Transkriptionsfaktoren stabilisiert, die für die Initiierung der Transkription des für AID kodierenden Genabschnitts notwendig sind.

Die Blockade des Komplexes würde damit nicht nur AID selbst destabilisieren, sondern auch seine Aktivatoren.⁸³ Unabhängig davon scheint Tanespimycin tatsächlich einen Effekt auf Proteinebene zu haben, da auch verminderte Transkriptmengen des von AID abhängigen Pluripotenzmarkers Oct4 zu beobachten sind. Die reduzierten Transkriptmengen könnten somit auf eine Modulation des Stammzellcharakters selbst hinweisen. Dies spiegelt sich auch bei der verminderten Fähigkeit der Tanespimycin behandelten Zellen zur Bildung von Tumor-Sphäroiden wider. Ihre Proliferation wird durch die Behandlung deutlich eingeschränkt, sodass sich im Vergleich kleinere Sphäroide bilden.

Leider scheiterte der Nachweis einer Wirkung von Tanespimycin auf die Proteinmengen von AID an technischen Gegebenheiten. Wie auch bei *Kou et al.* konnten in unbehandelten Proben keine nachweisbaren AID-Proteinmengen mittels Western Blot ermittelt werden.⁷² Auch FACS-Messungen mithilfe einer intrazellulären Färbung scheiterten vermutlich an den niedrigen Proteinmengen. Eine Möglichkeit, das Problem der niedrigen basalen Mengen zu überwinden, wäre eine Stimulation der Expression von AID mittels TGF β oder TNF α , um so detektierbare Proteinmengen zu erhalten.⁷² Trotzdem deuteten die Ergebnisse auf eine Inhibition von AID und eine Herabsetzung des Stammzellcharakters hin. Daher wurden die HuH6-Zellen mit einer Kombination aus Tanespimycin und Cisplatin behandelt. Tatsächlich konnte hier der erhoffte Effekt bei der Kombination beider Substanzen beobachtet werden. Eine Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor führte zu einem tendenziell deutlich reduzierten Anteil der Krebsstammzellen im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. Bei der genauen Analyse der überlebenden Zellen wurde der neuartige Effekt, den Decitabine und Zebularine verursacht hatten, durch die Vorbehandlung mit Tanespimycin nicht getriggert: Das Verhältnis der Low-positiven Zellen zu den High-positiven Zellen blieb unverändert. Tanespimycin verminderte daher gleichmäßig den Anteil beider Populationen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus dem MTT-Assay wird deutlich, dass es trotz einem verringerten Anteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Krebsstammzellpopulation zu keinem verstärkten Zelltod unter der Kombinationsbehandlung gekommen ist. Während beide DNMT-Inhibitoren in der Kombination mit Cisplatin die Zellzahl deutlich reduzierten, war die zytotoxische Wirkung von Tanespimycin und Cisplatin vergleichbar mit der alleinigen Cisplatin-

Standardtherapie. Dementsprechend kann die Reduktion des Anteiles der Krebsstammzellen nicht auf einen verstärkten Zelltod zurückgeführt werden. Vielmehr deutet dies auch in Verbindung mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene daraufhin, dass die Kombinationsbehandlung eine Differenzierung der Krebsstammzellen getriggert hat. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von Oct4, CD90 und CD34 im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. Auch AID folgte dem absteigenden Trend im Falle einer Kombinationsbehandlung. Eine ähnliche Modulation des Stammzellcharakters konnten *Shu et. al.* bei der Behandlung von Krebsstammzellen des Osteosarkoms mit Tanespimycin beobachten. Zusätzlich wiesen die Krebsstammzellen eine erhöhte Chemosensitivität auf und waren empfänglicher für die zytotoxische Wirkung von Standardchemotherapeutika wie Cisplatin.¹¹⁰

Über welchen genauen Mechanismus Tanespimycin hier den Stammzellcharakter der Krebsstammzellen herabsetzt und welche Rolle AID dabei spielt, bleibt weiter abzuklären.

Letztendlich jedoch präsentierte Tanespimycin sich als ein möglicher Inhibitor der Krebsstammzellpopulation im Hepatoblastom.

7.6 HSP90-Inhibitoren als Substanzklasse für pädiatrische Tumore

HSP90-Inhibitoren als eine mögliche Chemotherapie von pädiatrischen, embryonalen Tumoren Bedarf noch vieler Untersuchungen. Bis jetzt konnte eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation und das Überleben von Neuroblastomzellen *in vitro* sowie von Ewing Sarcoma Zellen *in vivo* festgestellt werden.¹¹¹⁻¹¹³ Dabei stellt die Inhibition des HSP90-Komplexes gerade im pädiatrischen Setting eine große Chance dar. Obwohl ein Knockout von HSP90 einen unweigerlichen Tod von eukaryotischen Zellen mit sich zieht, können HSP90-Inhibitoren gezielt Krebszellen eliminieren, ohne diese fatale allgemein zytotoxische Wirkung zu offenbaren. Dieser Umstand ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass HSP90 in Tumorzellen meist in einem Multi-Chaperon-Komplex vorliegt, während normale Zellen eher alleinstehende HSP90-Proteine aufweisen. Die HSP-Inhibitoren präferieren dabei vor allem HSP90 im Komplex mit anderen Chaperonen, wodurch hier eine selektive Wirkung ermöglicht ist. Zusätzlich ist zu betonen, dass HSP90-Inhibitoren keinen direkten Einfluss auf die Integrität des Genoms nehmen bzw. keinen direkten DNA-Schaden verursachen.^{112,114,115} Dadurch

kann das Risiko für die Entstehung von sekundären Malignitäten, wie sie häufig nach Chemotherapien zu beobachten ist,¹¹⁶ durch die schonendere Wirkung von HSP90-Inhibitoren reduziert werden. Eine synergistische Wirkung mit Cisplatin konnte ebenfalls in Osteosarkom- und Neuroblastom-Zellen nachgewiesen werden.^{112,117} Der hier beobachtete Effekt auf die Krebsstammzellpopulation ist in pädiatrischen Tumoren allerdings kaum untersucht und stellt unter Berücksichtigung der selektiven Wirkung der HSP90-Inhibitoren eine hoffnungsreiche Möglichkeit für zukünftige Behandlungen von embryonalen Tumoren dar. In adulten Tumoren der Brust¹¹⁸, Leber¹¹⁹ und Blase¹²⁰ sowie bei Glioma¹²¹ und Lymphomen¹²² konnte Tanespimycin bereits Wirkungen auf die Krebsstammzellpopulation unter Beweis stellen. Weiterhin wurde Tanespimycin in Phase I und II Studien für die Behandlung von fortgeschrittenen adulten Tumoren eingesetzt.¹²³⁻¹²⁵ Aktuell besitzt Tanespimycin den Status einer „Orphan Drug“, d. h. ein für seltene Erkrankungen zugelassenes Medikament mit wirtschaftlichen Erleichterungen und Vorteilen, für die Behandlung von multiplen Myelomen.¹²⁶ Eine Phase-I-Studie im pädiatrischen Setting bei refraktären Tumoren konnte richtungsweisend die tolerierte Dosierung und die Nebenwirkungen einer Tanespimycin-Behandlung in Kindern wie Leberschädigungen, Übelkeit und Erbrechen sowie Hypoxie bei vorgeschädigten Lungen abschätzen.¹²⁷ Auch wenn in adulten Tumoren ein inhibitorischer Effekt auf den HSP90-Komplex nachgewiesen werden konnte, ist dies in pädiatrischen Studien auf Grund der strikteren Regelungen zur Tumorbiopsie in Kindern schwieriger abzuschätzen. Die nachgewiesene biologische Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes lassen aber auch eine Wirkung in pädiatrischen Tumoren vermuten.¹²⁷ Trotzdem sind weitere Studien zur Wirkungsspezifität und Dosisfindung sowie eine Verbesserung des Therapieregimes notwendig, um Nebenwirkungen zu minimieren. Vor allem ist zu erforschen, ob die hier wirksamen Konzentrationen auch tatsächlich umsetzbar sind und den gewünschten Effekt *in vivo* erzielen. Aktuell wird die Forschung an Tanespimycin selbst nicht weitergeführt, was vor allem auf das ablaufende Patent des Substrates zurückzuführen ist.¹²⁸ Nichtsdestotrotz bietet die Substanzklasse der HSP90-Inhibitoren eine Perspektive für die Behandlung von pädiatrischen Tumoren. Wenn auch Tanespimycin selbst die Zulassung in Zukunft nicht erhalten sollte, könnten andere Substrate dieser

Substanzklasse, die eventuell auch besser verträglich sind und weniger Nebenwirkungen offenbaren, in Kombinationstherapien zum Einsatz kommen.

Vor allem Kinder mit schlecht ansprechenden und rekurrenten High-Risk-Hepatoblastomen, die ohnehin lange und schwere Behandlungszyklen über sich ergehen lassen müssen, könnten von einer Ergänzung der Therapie mit HSP90-Inhibitoren durch die gezieltere Wirkung auf Krebsstammzellen profitieren.

7.7 Ausblick

Die hier generierten Ergebnisse über die Eigenschaften und Fähigkeiten der Krebsstammzellen im Hepatoblastom sowie die Rolle der Zytidin-Desaminase AID für den Stammzellcharakter erfordern weitere Belege und Untersuchungen. Einerseits muss die Frage nach dem Charakter sowie der Entstehung der hier beobachteten Low-CD34⁺OV-6⁺ Population beantwortet werden. Über ein FACS-Sorting könnten die Zellen isoliert und hinsichtlich ihrer spezifischen Expression von Pluripotenzmarkern, ihrer Fähigkeit zur Bildung von Tumor-Sphäroiden und ihres Migrationsverhaltens untersucht werden. Zusätzlich muss eine getrennte Analyse sowohl der High-positiven als auch der dreifach-negativen Population erfolgen, um einen möglichen Ursprung der Low-positiven Zellen festmachen zu können. Weiterführend müssen die Mechanismen und Signalwege spezifiziert werden, die zu ihrer Anreicherung während einer Kombinationsbehandlung mit Zebularine oder Decitabine und Cisplatin geführt haben. Überdies muss die Rolle von AID für den Stammzellcharakter tiefergehend untersucht werden. Dafür könnten ein Knock-Out von AID mittels CRISPR und die anschließende Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens oder ihres Ansprechens auf eine Cisplatin-Behandlung wegweisend sein. Außerdem muss der AID-inhibierende Effekt von Tanespimycin auch auf Proteinebene bestätigt und die dadurch eventuell induzierte Differenzierung der Krebsstammzellen näher beleuchtet werden. Letztendlich können auch andere HSP90-Inhibitoren wie BIIB021 zum Einsatz kommen. Diese weisen bestenfalls ein verbessertes Wirkungsprofil und weniger Nebeneffekte auf und befinden sich bereits in der klinischen Testung, um so den Einfluss dieser Substanzklasse auf die Krebsstammzellen des Hepatoblastoms bestätigen zu können.

8 Zusammenfassung

Das Hepatoblastom ist ein embryonaler Lebertumor, dessen Zellen unterschiedliche unreife Stadien aufweisen. Aufgrund dieser Unreife ist die Identifizierung von Krebsstammzellen erschwert, die in diesem Tumor vermutet und für Rückfälle verantwortlich gemacht werden. In Vorarbeiten konnte eine Krebsstammzellpopulation mit der Kombination der hämatopoetischen Stammzellmarker CD90 und CD34 sowie dem „oval cell“ OV-6-Antikörper in den etablierten Hepatoblastomzelllinien HuH6 und HepG2 detektiert werden. Diese CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen wiesen eine erhöhte Expression von Pluripotenzfaktoren auf und zeichneten sich durch ein erhöhtes Migrationsverhalten aus.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden zunächst Tumor-Sphäroid-Assays durchgeführt um diese Population als Krebsstammzellen zu bestätigen, da nur Krebsstammzellen unter den gegebenen Umständen wachsen können. Diese waren im Anschluss wieder in der Lage, in „normalem Medium“ zu differenzieren. Des Weiteren wurden die Zelllinien mit dem Standardtherapeutikum Cisplatin behandelt. Da Krebsstammzellen als chemoresistent gelten, konnte in der überlebenden Zellpopulation auch eine Anreicherung der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Zellen beobachtet werden. Zusätzlich ließ sich eine weitere CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population identifizieren, deren Expression aller drei Marker schwächer war und die bei steigenden Cisplatin-Konzentrationen den Großteil der CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Population ausmachte.

Neben den erhöhten Transkriptmengen der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog zeichneten sich die CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Krebsstammzellen durch eine verstärkte Expression der aktivierungsinduzierten Zytidin-Desaminase AID aus. AID wirkt induzierend auf die Transkription beider Pluripotenzmarker. Daher könnte es auch bei Krebsstammzellen eine Rolle bei der Induktion von Pluripotenz und bei ihrer langfristigen Erhaltung spielen. Dies unterstützend legten die verminderten Transkriptmengen der Pluripotenzgene nach einem AID siRNA Knock-Down eine Abhängigkeit des Stammzellcharakters von diesem Faktor nahe. Um einen Effekt von Therapeutika, die inhibitorisch auf AID wirken, auf Krebsstammzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit den DNMT-Inhibitoren Decitabine und Zebularine sowie dem HSP90-Inhibitor Tanespimycin behandelt. Tatsächlich konnte vor allem in den HuH6-

Zellen ein verminderter Anteil der Krebsstammzellpopulation durch die drei Substanzen beobachtet werden. Wurden die Zellen im Anschluss mit dem Standardzytostatikum Cisplatin behandelt, führte allerdings eine Vorbehandlung mit Zebularine oder Decitabine zu einer starken Anreicherung von Krebsstammzellen. Dies war vor allem auf Zellen mit dem schwach positiven CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ Expressionsprofil zurückzuführen, die chemo-induziert zu sein scheinen. Zwar erscheint die Mehrheit der Tumorzellen eliminiert zu werden, jedoch lassen diese Ergebnisse die Entstehung von chemo-induzierten Krebsstammzellen vermuten, die langfristig für einen Rückfall verantwortlich sein könnten. Daher ist von einer Ergänzung der Therapie mit diesen Substanzen abzusehen. Eine Vorbehandlung mit Tanespimycin hingegen konnte im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung wirksam den Anteil der Krebsstammzellen reduzieren. Interessanterweise war dies nicht auf einen verstärkten Zelltod der Krebsstammzellen, sondern vielmehr auf eine durch Tanespimycin bewirkte Differenzierung derselben zurückzuführen. Diese spiegelte sich auch in einer verminderten Expression von Pluripotenzmarkern auf mRNA-Ebene im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung wider.

Somit präsentierte sich Tanespimycin als potenter Inhibitor von Krebsstammzellen. Auch wenn weitere vorklinische und klinische Tests und Untersuchungen erfolgen müssen, stellt Tanespimycin bzw. die Substanzklasse der HSP90-Inhibitoren einen interessanten und vielversprechenden Kandidaten für eine Ergänzung der Standardtherapie vor allem bei behandlungsresistenten und rekurrenten High-Risk-Hepatoblastomen dar.

9 Summary

Hepatoblastoma is an embryonal liver tumour whose cells show different immature stages. Due to this immaturity, it is difficult to identify cancer stem cells, which are suspected to be present in this tumour and responsible for relapses. In preliminary experiments, a cancer stem cell population could be detected with the combination of the haematopoietic stem cell markers CD90 and CD34 and the "oval cell" OV-6 antibody in the established hepatoblastoma cell lines HuH6 and HepG2. These CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ cells showed increased expression of pluripotency factors and were characterised by increased migration behaviour.

In the work presented here, tumour spheres assays were first performed to confirm this population as cancer stem cells, as only cancer stem cells are able to grow under the given circumstances. These cells could differentiate again in "normal media". Furthermore, the cell lines were treated with the standard therapeutic agent cisplatin. Since cancer stem cells are considered chemoresistant, an enrichment of CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ cells was also observed in the surviving cell population. In addition, another CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ population could be identified. Its expression of all three markers was lower and constituted the majority of the CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ population at increasing cisplatin concentrations.

In addition to the increased transcript levels of the pluripotency markers Oct4 and Nanog, the CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ cancer stem cells were characterised by increased expression of the activation-induced cytidine deaminase AID. This factor has an inducing effect on the transcription of both pluripotency markers. It may therefore play a role in the induction of pluripotency and its long-term maintenance in cancer stem cells as well. Also, the reduced transcript levels of pluripotency genes after AID siRNA knock-down suggested a dependency of stem cell character on this factor. To investigate an effect of therapeutics on cancer stem cells that inhibit AID, the cells were treated with the DNMT inhibitors decitabine and zebularine and the HSP90 inhibitor tanespimycin. In fact, a reduced proportion of the cancer stem cell population was observed in the HuH6 cells as a result of the three agents. However, when the cells were subsequently treated with the standard cytostatic drug cisplatin, pre-treatment with zebularine or decitabine led to a strong accumulation of cancer stem cells. This was mainly due to cells with the lower

positive CD34⁺OV-6⁺CD90⁺ expression profile, which seem to be chemo-induced. Although the majority of tumour cells appear to be eliminated, these results suggest the formation of chemo-induced cancer stem cells that may be responsible for relapse in the long term and thus, speaking clearly against a therapy with these agents.

In contrast, pre-treatment with tanespimycin was effective in reducing the proportion of cancer stem cells compared to cisplatin treatment alone. Interestingly, this was not due to increased cell death of the cancer stem cells, but rather to a differentiation caused by tanespimycin. This was also reflected in the reduced expression of pluripotency markers compared to cisplatin treatment alone. Therefore, tanespimycin seems to represent as a potent inhibitor of cancer stem cells. Even if further preclinical and clinical tests and investigations have to be performed, tanespimycin and the substance class of HSP9 inhibitors represent interesting and promising candidates for supplementing standard therapy, especially in treatment-resistant and recurrent high-risk hepatoblastomas.

10 Literaturverzeichnis

1. Schweinitz D von. Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin Pediatr Surg.* 2012;21(1):21-30. doi:10.1053/j.sempedsurg.2011.10.011.
2. awmf online. S1-Leitlinie 025/011: Hepatoblastom. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-011l_S1_Hepatoblastom_2016-06.pdf.
3. Litten JB, Tomlinson GE. Liver tumors in children. *Oncologist.* 2008;13(7):812-820. doi:10.1634/theoncologist.2008-0011.
4. Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(1):19-28. doi:10.1097/MOP.0000000000000046.
5. Tomlinson GE, Kappler R. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(5):785-792. doi:10.1002/pbc.24213.
6. Cairo S, Armengol C, Reyniès A de, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell.* 2008;14(6):471-484. doi:10.1016/j.ccr.2008.11.002.
7. Lim IIP, Bondoc AJ, Geller JI, Tiao GM. Hepatoblastoma-The Evolution of Biology, Surgery, and Transplantation. *Children (Basel).* 2018;6(1). doi:10.3390/children6010001.
8. 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. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):122-131. doi:10.1016/S1470-2045(16)30598-8.
9. Roebuck DJ, Aronson D, Clapuyt P, et al. 2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatr Radiol.* 2007;37(2):123-32; quiz 249-50. doi:10.1007/s00247-006-0361-5.
10. Kremer N, Walther AE, Tiao GM. Management of hepatoblastoma: an update. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(3):362-369. doi:10.1097/MOP.0000000000000081.
11. UKM. Kinder-und Neugeborenenchirurgie: Hepatoblastom. <https://www.ukm.de/index.php?id=7664>.

12. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Meyers RL, et al. Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2011;29(24):3301-3306. doi:10.1200/JCO.2010.29.3837.
13. Bilik R, Superina R. Transplantation for unresectable liver tumors in children. *Transplant Proc.* 1997;29(7):2834-2835. doi:10.1016/s0041-1345(97)00697-0.
14. Uchida H, Sakamoto S, Sasaki K, et al. Surgical treatment strategy for advanced hepatoblastoma: Resection versus transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(12):e27383. doi:10.1002/pbc.27383.
15. Schweinitz D von, Hecker H, Harms D, et al. Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *J Pediatr Surg.* 1995;30(6):845-852. doi:10.1016/0022-3468(95)90762-9.
16. Häberle B, Bode U, Schweinitz D von. Differenzierte Therapieansätze für Hoch- und Standardrisiko-Hepatoblastome--Ein Zwischenbericht der multizentrischen Studie HB 99 der GPOH. *Klin Padiatr.* 2003;215(3):159-165. doi:10.1055/s-2003-39375.
17. López-Terrada D, Zimmermann A. Current issues and controversies in the classification of pediatric hepatocellular tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(5):780-784. doi:10.1002/pbc.24214.
18. Yun WJ, Shin E, Lee K, et al. Clinicopathologic implication of hepatic progenitor cell marker expression in hepatoblastoma. *Pathol Res Pract.* 2013;209(9):568-573. doi:10.1016/j.prp.2013.06.015.
19. Fazlollahi L, Hsiao SJ, Kochhar M, Mansukhani MM, Yamashiro DJ, Remotti HE. Malignant Rhabdoid Tumor, an Aggressive Tumor Often Misclassified as Small Cell Variant of Hepatoblastoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(12). doi:10.3390/cancers11121992.
20. Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E. Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings. *Am J Pathol.* 1996;148(1):321-329.
21. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem.* 2013;59(1):168-179. doi:10.1373/clinchem.2012.184655.

22. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011;17(3):313-319. doi:10.1038/nm.2304.
23. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124-1134. doi:10.1038/nm.4409.
24. 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.
25. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-648. doi:10.1038/367645a0.
26. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755-768. doi:10.1038/nrc2499.
27. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100.
28. Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2876-2882. doi:10.1200/JCO.2007.15.2603.
29. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401. doi:10.1038/nature03128.
30. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 2006;124(6):1111-1115. doi:10.1016/j.cell.2006.03.011.
31. Prieto-Vila M, Takahashi R-U, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12). doi:10.3390/ijms18122574.
32. Angelis ML de, Francescangeli F, La Torre F, Zeuner A. Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance. *Front Oncol.* 2019;9:626. doi:10.3389/fonc.2019.00626.
33. Borst P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol.* 2012;2(5):120066. doi:10.1098/rsob.120066.

34. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002125.
35. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):780-783. doi:10.1038/nature07733.
36. Friedman GK, Gillespie GY. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):298-318. doi:10.3390/cancers3010298.
37. Ma S, Chan K-W, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2542-2556. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.025.
38. Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, et al. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology.* 2012;60(7):1144-1155. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04191.x.
39. Schiapparelli P, Enguita-Germán M, Balbuena J, Rey JA, Lázcoz P, Castresana JS. Analysis of stemness gene expression and CD133 abnormal methylation in neuroblastoma cell lines. *Oncol Rep.* 2010;24(5):1355-1362. doi:10.3892/or_00000993.
40. King FW, Ritner C, Liszewski W, et al. Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. *Stem Cells Dev.* 2009;18(10):1441-1450. doi:10.1089/scd.2009.0012.
41. 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.
42. Dollé L, Theise ND, Schmelzer E, Boulter L, Gires O, van Grunsven LA. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(4):G233-50. doi:10.1152/ajpgi.00069.2014.
43. Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* 2009;136(3):1012-1024. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.004.

44. Leng Z, Xia Q, Chen J, et al. Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(2):860-872. doi:10.1159/000488743.
45. Armeanu-Ebinger S, Hoh A, Wenz J, Fuchs J. Targeting EpCAM (CD326) for immunotherapy in hepatoblastoma. *Oncoimmunology*. 2013;2(1):e22620. doi:10.4161/onci.22620.
46. Dunsford HA, Sell S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res*. 1989;49(17):4887-4893.
47. Bisgaard HC, Parmelee DC, Dunsford HA, Sechi S, Thorgeirsson SS. 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.
48. Lanza RP, Atala A. *Handbook of stem cells*. 2nd ed. Amsterdam: Academic/Elsevier; 2013.
49. Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Schweinitz D von, Kaiserling E. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology*. 1997;31(4):324-329. doi:10.1046/j.1365-2559.1997.2750870.x.
50. Ruck P, Xiao J-C. Stem-like cells in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2002;39(5):504-507. doi:10.1002/mpo.10175.
51. 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.
52. Servida F, Soligo D, Caneva L, et al. Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 1996;14(4):430-438. doi:10.1002/stem.140430.
53. Lewis K, Yoshimoto M, Takebe T. Fetal liver hematopoiesis: from development to delivery. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):139. doi:10.1186/s13287-021-02189-w.
54. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. CD34(+)CD38(-) leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(5):1102-1112. doi:10.1038/s41375-018-0326-3.

55. Vessey CJ, La Hall PDM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology*. 2001;33(2):130-141. doi:10.1080/00313020124028.
56. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells*. 2006;24(12):2840-2850. doi:10.1634/stemcells.2006-0114.
57. Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*. 2008;47(3):919-928. doi:10.1002/hep.22082.
58. 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.
59. Sukowati CHC, Anfuso B, Torre G, Francalanci P, Crocè LS, Tiribelli C. The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *PLoS One*. 2013;8(10):e76830. doi:10.1371/journal.pone.0076830.
60. 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.
61. Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene*. 2001;20(56):8085-8091. doi:10.1038/sj.onc.1205088.
62. 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.
63. 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.
64. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
65. 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.
66. Zan H, Casali P. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity*. 2013;46(2):83-101. doi:10.3109/08916934.2012.749244.
67. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in

- pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52353-52360. doi:10.1074/jbc.M407695200.
68. Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature.* 2010;463(7284):1042-1047. doi:10.1038/nature08752.
69. Kumar R, DiMenna L, Schrode N, et al. AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature.* 2013;500(7460):89-92. doi:10.1038/nature12299.
70. Shinmura K, Igarashi H, Goto M, et al. Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(7):2084-2092. doi:10.1245/s10434-011-1568-8.
71. Li H, Li Q, Ma Z, et al. AID modulates carcinogenesis network via DNA demethylation in bladder urothelial cell carcinoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(4):251. doi:10.1038/s41419-019-1472-x.
72. Kou T, Marusawa H, Kinoshita K, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer.* 2007;120(3):469-476. doi:10.1002/ijc.22292.
73. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2006;66(5):2794-2800. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2821.
74. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002;21(35):5483-5495. doi:10.1038/sj.onc.1205699.
75. Lübbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;249:135-164. doi:10.1007/978-3-642-59696-4_9.
76. Tsai H-C, Li H, van Neste L, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell.* 2012;21(3):430-446. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.029.

77. Wu M, Sheng L, Cheng M, et al. Low doses of decitabine improve the chemotherapy efficacy against basal-like bladder cancer by targeting cancer stem cells. *Oncogene*. 2019;38(27):5425-5439. doi:10.1038/s41388-019-0799-1.
78. Tsai C-T, Yang P-M, Chern T-R, et al. AID downregulation is a novel function of the DNMT inhibitor 5-aza-deoxycytidine. *Oncotarget*. 2014;5(1):211-223. doi:10.18632/oncotarget.1319.
79. Nakamura K, Nakabayashi K, Htet Aung K, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120545. doi:10.1371/journal.pone.0120545.
80. Zagorac S, Alcalá S, Fernández Bayón G, et al. DNMT1 Inhibition Reprograms Pancreatic Cancer Stem Cells via Upregulation of the miR-17-92 Cluster. *Cancer Res*. 2016;76(15):4546-4558. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3268.
81. Lemaire M, Momparler LF, Raynal NJ-M, Bernstein ML, Momparler RL. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;63(3):411-416. doi:10.1007/s00280-008-0750-6.
82. Rebhandl S, Geisberger R. AIDing cancer treatment: Reducing AID activity via HSP90 inhibition. *Eur J Immunol*. 2015;45(8):2208-2211. doi:10.1002/eji.201545832.
83. Montamat-Sicotte D, Litzler LC, Abreu C, et al. HSP90 inhibitors decrease AID levels and activity in mice and in human cells. *Eur J Immunol*. 2015;45(8):2365-2376. doi:10.1002/eji.201545462.
84. Orthwein A, Patenaude A-M, Affar EB, Lamarre A, Young JC, Di Noia JM. Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J Exp Med*. 2010;207(12):2751-2765. doi:10.1084/jem.20101321.
85. Rikhi RR, Spady KK, Hoffman RI, Bateman MS, Bateman M, Howard LE. Hepatoblastoma: A Need for Cell Lines and Tissue Banks to Develop Targeted Drug Therapies. *Front Pediatr*. 2016;4:22. doi:10.3389/fped.2016.00022.
86. Tokiwa T, Doi I, Sato J. Preparation of single cell suspensions from hepatoma cells in culture. *Acta Med Okayama*. 1975;29(2):147-150.

87. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol.* 2009;40(10):1512-1515. doi:10.1016/j.humpath.2009.07.003.
88. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017;108(3):283-289. doi:10.1111/cas.13155.
89. Song J, Xie C, Jiang L, et al. Transcription factor AP-4 promotes tumorigenic capability and activates the Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Theranostics.* 2018;8(13):3571-3583. doi:10.7150/thno.25194.
90. Montoya JJ, Azorsa DO. Optimization of Transfection Conditions for siRNA Screening. *Methods Mol Biol.* 2016;1470:15-24. doi:10.1007/978-1-4939-6337-9_2.
91. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
92. Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, et al. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PLoS One.* 2013;8(6):e64388. doi:10.1371/journal.pone.0064388.
93. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):486-498. doi:10.1016/j.stem.2011.04.007.
94. Zhou X, Wang G, Sun Y. A reliable parameter to standardize the scoring of stem cell spheres. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127348. doi:10.1371/journal.pone.0127348.
95. Zhang Y, Wang Z, Yu J, et al. Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2012;322(1):70-77. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.010.
96. Zhang H, Chang WJ, Li XY, Zhang N, Kong JJ, Wang YF. 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.
97. Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance

- and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol.* 2011;55(4):838-845. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.043.
98. Liu Y, Yang M, Luo J, Zhou H. Radiotherapy targeting cancer stem cells "awakens" them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):19. doi:10.1038/s41368-020-00087-0.
99. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2012;30(5):833-844. doi:10.1002/stem.1058.
100. Cruz MH, Sidén A, Calaf GM, Delwar ZM, Yakisich JS. The stemness phenotype model. *ISRN Oncol.* 2012;2012:392647. doi:10.5402/2012/392647.
101. Debeb BG, Lacerda L, Xu W, et al. Histone deacetylase inhibitors stimulate dedifferentiation of human breast cancer cells through WNT/ β -catenin signaling. *Stem Cells.* 2012;30(11):2366-2377. doi:10.1002/stem.1219.
102. Vares G, Cui X, Wang B, Nakajima T, Nenoï M. Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines. *PLoS One.* 2013;8(10):e77124. doi:10.1371/journal.pone.0077124.
103. Chen X, Liao R, Li D, Sun J. Induced cancer stem cells generated by radiochemotherapy and their therapeutic implications. *Oncotarget.* 2017;8(10):17301-17312. doi:10.18632/oncotarget.14230.
104. Jandial R, Waters DJ, Chen MY. Cancer stem cells can arise from differentiated neoplastic cells. *Neurosurgery.* 2011;69(2):N22. doi:10.1227/01.neu.0000400017.39272.62.
105. Lee-Theilen M, Fadini DD, Hadhoud JR, et al. Hepatoblastoma Cancer Stem Cells Express PD-L1, Reveal Plasticity and Can Emerge upon Chemotherapy. *Cancers (Basel).* 2022;14(23). doi:10.3390/cancers14235825.
106. Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e54036. doi:10.1371/journal.pone.0054036.
107. Li S-Y, Sun R, Wang H-X, et al. Combination therapy with epigenetic-targeted and chemotherapeutic drugs delivered by nanoparticles to enhance the chemotherapy response and overcome resistance by breast cancer stem cells. *J Control Release.* 2015;205:7-14. doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.011.

108. Hasan A, Haque E, Hameed R, et al. Hsp90 inhibitor gedunin causes apoptosis in A549 lung cancer cells by disrupting Hsp90:Beclin-1:Bcl-2 interaction and downregulating autophagy. *Life Sci.* 2020;256:118000. doi:10.1016/j.lfs.2020.118000.
109. Zündorf I, Dingermann T. Resistente Tumorzellen-Krebswachstum trotz Therapie. Updated October 19, 2015. Accessed September 6, 2022.
110. Shu X, Liu H, Zhen R, et al. Hsp90 inhibitor 17-AAG inhibits stem cell-like properties and chemoresistance in osteosarcoma cells via the Hedgehog signaling pathway. *Oncol Rep.* 2020;44(1):313-324. doi:10.3892/or.2020.7597.
111. Whitesell L, Shifrin SD, Schwab G, Neckers LM. Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition. *Cancer Res.* 1992;52(7):1721-1728.
112. Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L. Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer.* 2005;113(2):179-188. doi:10.1002/ijc.20611.
113. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol.* 2003;14(8):1169-1176. doi:10.1093/annonc/mdg316.
114. Solárová Z, Mojžiš J, Solár P. Hsp90 inhibitor as a sensitizer of cancer cells to different therapies (review). *Int J Oncol.* 2015;46(3):907-926. doi:10.3892/ijo.2014.2791.
115. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003;425(6956):407-410. doi:10.1038/nature01913.
116. Scholz-Kreisel P, Kaatsch P, Spix C, et al. Second Malignancies Following Childhood Cancer Treatment in Germany From 1980 to 2014. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(23):385-392. doi:10.3238/arztebl.2018.0385.
117. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003;425(6956):407-410. doi:10.1038/nature01913.

118. Subramanian C, Grogan PT, Wang T, et al. Novel C-terminal heat shock protein 90 inhibitors target breast cancer stem cells and block migration, self-renewal, and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Oncol.* 2020;14(9):2058-2068. doi:10.1002/1878-0261.12686.
119. Yang R, Tang Q, Miao F, et al. Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:7345-7358. doi:10.2147/IJN.S93758.
120. Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, et al. Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells. *Int J Cancer.* 2012;131(4):987-996. doi:10.1002/ijc.26475.
121. Sauvageot CM-E, Weatherbee JL, Kesari S, et al. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro Oncol.* 2009;11(2):109-121. doi:10.1215/15228517-2008-060.
122. Newman B, Liu Y, Lee H-F, Sun D, Wang Y. HSP90 inhibitor 17-AAG selectively eradicates lymphoma stem cells. *Cancer Res.* 2012;72(17):4551-4561. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3600.
123. Goetz MP, Toft D, Reid J, et al. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(6):1078-1087. doi:10.1200/JCO.2005.09.119.
124. Solit DB, Ivy SP, Kopil C, et al. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1775-1782. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1863.
125. Pacey S, Gore M, Chao D, et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs.* 2012;30(1):341-349. doi:10.1007/s10637-010-9493-4.
126. Adis International. Tanespimycin - Kosan Biosciences. <https://adisinsight.springer.com/drugs/800023506>. Updated December 15, 2021. Accessed September 6, 2022.
127. Bagatell R, Gore L, Egorin MJ, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric oncology

experimental therapeutics investigators consortium study. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1783-1788. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1892.

128. The Myeloma Beacon Staff. Bristol-Myers Squibb Halts Development of Tanespimycin. Updated July 22, 2010. Accessed September 6, 2022.

11 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

Eliminierung der Krebsstammzellen des Hepatoblastoms durch die gezielte Inhibition der aktivierungsinduzierten Zytidin-Desaminase (AID)

Am Zentrum der Chirurgie in der Klinik Kinderchirurgie und Kinderurologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Henning Fiegel mit Unterstützung durch 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 (oder werden) 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. Ausgabe 10, 29.09.2021

Mieun Lee-Theilen, Delaine D.Fadini, Julia R. Hadhoud , Fleur van Dongen, Gabriela Kroll, Udo Rolle, Henning C. Fiegel. Hepatoblastoma Cancer Stem Cells Express PD-L1, Reveal Plasticity and Can Emerge upon Chemotherapy. Cancers. Ausgabe 23, 25.11.2022

(Ort, Datum)

(Unterschrift)