

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Immunhistologischer Nachweis der Zikavirus Rezeptoren und Stammzell-
spezifischer Marker in primären Zellkulturen des Glioblastoms**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Jana Sue Jonas



Hamburg, den 14.08.2023

Die Bachelorarbeit wurde in der Laborgruppe Schreiber in der Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg erstellt und betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Dr. Michael Schreiber (BNITM Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I	
Abkürzungsverzeichnis	II	
1	Einleitung	1
1.1	Das Glioblastom	1
1.2	Zelltypen des Glioblastoms	3
1.3	Die Zikavirus-Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$	6
1.3.1	Der Axl-Rezeptor	7
1.3.2	Der Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptor	8
1.4	Stammzell-spezifische Marker	9
1.4.1	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4	11
1.4.2	Der Transkriptionsfaktor Sox2	12
1.4.3	Der Transkriptionsfaktor Nanog	12
1.4.4	Das Intermediärfilament Nestin	13
1.5	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material und Ausrüstung	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Antikörper	16
2.1.4	Verbrauchsmittel	16
2.1.5	Phosphat-gepufferte Salzlösung	16
2.2	Zellkultivierung	17
2.3	Immunfärbung	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Immunhistologischer Nachweis des Axl-Rezeptors	19
3.2	Immunhistologischer Nachweis von Integrin $\alpha\beta 5$	22
3.3	Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Oct4	26
3.4	Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Sox2	29
3.5	Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Nanog	32
3.6	Immunhistologischer Nachweis des Intermediärfilaments Nestin	35
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Eidesstattliche Erklärung	I
8	Danksagung	II

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Magnetresonanztomographie eines Glioblastoms	2
Abb. 2	Zellen des Glioblastoms	3
Abb. 3	Schematische Darstellung der Zikavirus-Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$	6
Abb. 4	Die Lokalisation von Stamm- und Tumorzellen im Gehirn	10
Abb. 5	Immunfärbung des Axl-Rezeptors der AKH-Zelllinien	20
Abb. 6	Immunfärbung des Axl-Rezeptors in AKH-5/11 und U-87	21
Abb. 7	Immunfärbung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors der AKH-Zelllinien	24
Abb. 8	Immunfärbung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors in AKH-5 und AKH-11	25
Abb. 9	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Oct4 der AKH-Zelllinien	27
Abb. 10	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Oct4 in AKH-5/11 und U-87	28
Abb. 11	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Sox2 der AKH-Zelllinien	30
Abb. 12	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Sox2 in AKH-5/11 und U-87	31
Abb. 13	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Nanog der AKH-Zelllinien	33
Abb. 14	Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Nanog in AKH-5/11 und U-87	34
Abb. 15	Immunfärbung des Intermediärfilaments Nestin der AKH-Zelllinien	37
Abb. 16	Immunfärbung des Intermediärfilaments Nestin in AKH-5/11 und U-87	38

Abkürzungsverzeichnis

AKH	Asklepios Klinik Hamburg	
BSA	Rinderserumalbumin	<i>bovine serum albumin</i>
CSC	Krebsstammzelle	<i>cancer stem cell</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser	
ECM	extrazelluläre Matrix	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
ESC	embryonale Stammzelle	<i>embryonal stem cell</i>
FAS	fokale Adhäsionsstelle	<i>focal adhesion site</i>
FBS	fetales Kälberserum	<i>fetal bovine serum</i>
GFAP	saures Gliafaserprotein	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GSC	Glioblastoma-Stammzelle	<i>Glioblastoma stem cell</i>
hCSF	Cerebrospinalflüssigkeit	<i>human cerebrospinal fluid</i>
IFT	Immunfluoreszenztechnik	
iPS	induzierte pluripotente Stammzelle	
mAb	monoklonaler Antikörper	<i>monoclonal antibody</i>
MRT	Magnetresonanztomographie	
NPC	neuronale Vorläuferzelle	<i>neuronal precursor cell</i>
NSC	neuronale Stammzelle	<i>neuronal stem cell</i>
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle	<i>Oligodendrocyte precursor cell</i>
pAb	polyklonaler Antikörper	<i>polyclonal antibody</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	PBS + Tween 20	
PS	Phosphatidylserin	
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase	
Sox2	geschlechtsbestimmende Region Y-box2	<i>sex determining region Y – box2</i>
SVZ	Subventrikuläre Zone	<i>subventricular zone</i>
TK	Tyrosinkinase	
WHO	Weltgesundheitsorganisation	
ZIKV	Zikavirus	
ZNS	zentrales Nervensystem	

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Das Glioblastom, auch Glioblastoma Multiforme (GBM) Grad IV genannt, ist ein hochgradig maligner Gehirntumor und die häufigste Form von primären Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) ¹. Der Einstufungsgrad basiert auf der Einschätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Tumore des Grades I treten vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, wachsen relativ langsam und haben eine sehr geringe Neigung zur bösartigen Entartung. Die Gruppe der diffus in das Hirngewebe einwachsenden Tumoren besteht aus dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II), dem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) und dem Glioblastom (WHO-Grad IV) ². Die Tumore des Grades II-IV treten vornehmlich bei Erwachsenen auf und haben eine Neigung zur Bildung von bösartigeren Rezidivtumoren. Das Glioblastom ist weiter fortgeschritten als Tumore des Grades II und III und zeigt ein aggressives und diffuses Wachstum. Die Bezeichnung „Multiforme“ kommt von den unterschiedlichen Symptomen die das GBM je nach Lokalisation auslöst. Das GBM ist durch seine infiltrative Natur und aggressive Proliferation gekennzeichnet, bei gleichzeitig hoher Therapieresistenz, die insbesondere auf entsprechend resistente Formen der Glioblastoma-Stammzellen (*Glioblastoma stem cells*, GSCs) zurückzuführen ist ³⁻⁵.

Die derzeitige Standardbehandlung umfasst eine multimodale Therapie, welche die chirurgische Resektion mit anschließender adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie umfasst ⁶. Die Tumorentfernung stellt aufgrund der sensiblen Umgebung und der invasiven Natur eine besondere Problematik dar. Die einwandfreie Lokalisierung und Differenzierung von entartetem und gesundem Gewebe und die damit einhergehende vollständige Entfernung aller Tumorzellen ist während der Operation nicht möglich, sodass migrierte Tumorzellen und einzelne GSCs im Gehirn verbleiben. Insbesondere die verbleibenden GSCs forcieren angesichts ihrer stammzelltypischen Eigenschaften, wie der hohen Proliferationskapazität, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Arzneistofftransporter-Expression, das unweigerliche Auftreten von Rezidiven ⁷.

Eine anschließende Therapie mit Zytostatika soll das Tumorwachstum hemmen. Neben der allgemeinen Therapieresistenz der GSCs ist die Auswahl des Medikamentes angesichts der Blut-Hirn-Schranke beschränkt, welche als selektive Barriere auch den Übertritt zahlreicher Chemotherapeutika verhindert. Die Standardbehandlung sieht hier die Behandlung mit Temozolomid vor, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Alkylanzien, welches die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und die DNA-Replikation in Gliomzellen durch

Methylierung stört ⁴. Die Strahlentherapie soll die verbliebenen Tumorzellen eliminieren, jedoch ist auch hier der mögliche Einsatz durch die generelle Umgebung und genaue Lokalisation, wie beispielsweise einer Hirnstammeteiligung des Tumors, begrenzt. Insgesamt stellt die Kombinationstherapie nur eine Überlebenszeitverlängerung und keine Heilung im eigentlichen Sinn dar. Diese Kombinationsbehandlung führt zu einer medianen Überlebenszeit von 14 Monaten nach der Diagnose, während die 5-Jahres-Überlebensrate bei 5% liegt ^{1,8}. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten ist die Prognose nach der GBM-Diagnose nach wie vor sehr schlecht. Neue Ansätze in der Forschung sind notwendig, um den Patienten eine Wiederherstellung ihrer Gesundheit bieten zu können.

In Abbildung 1 sind zwei Magnetresonanzaufnahmen eines Glioblastoms dargestellt, welches sich im Gehirn im Kontakt mit der subventrikulären Zone (SVZ) entwickelt hat. Die subventrikuläre Zone bezieht sich auf eine Region im Gehirn, die in der Nähe der lateralen Ventrikel liegt, in der sich auch die gesunden Stammzellen befinden und für die Bildung neuer Gehirnzellen verantwortlich sind ⁹. Diese Stammzellen entarten und bilden die Vorläufer des GBM, die Glioblastoma-Stammzellen. Die vollständige Behandlung des Tumors im Bereich der subventrikulären Zone ist komplex, da sich die tumorauslösenden GSCs in der SVZ ansiedeln und sich dadurch dem operativen Zugriff entziehen ¹⁰.

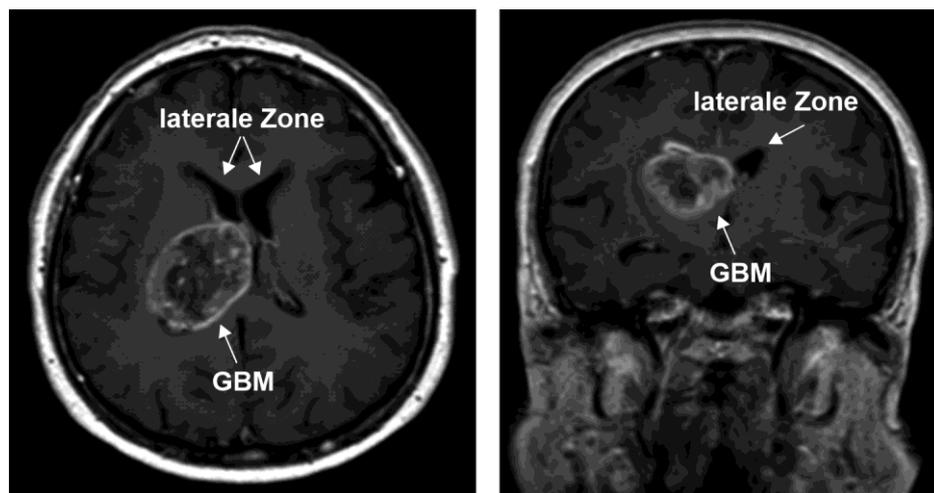


Abb. 1 Magnetresonanztomographie eines Glioblastoms

Der Tumor wurde mit dem Bildgebungsverfahren der Magnetresonanztomographie aufgenommen. Zur verbesserten Visualisierung wurde Kontrastmittel verwendet. Das Bild zeigt die ependymale Ausbreitung des Tumors an der lateralen Zone, welche das Ventrikel umschließt (schwarzer Bereich). Durch die verschiedenen Anreicherungs-dichten des Kontrastmittels wird die Inhomogenität des Tumors sichtbar. ¹¹

1.2 Zelltypen des Glioblastoms

Glioblastome sind eine Art von Gliomen, die sich aus den Gliazellen des ZNS bilden. Ihre Heterogenität stellt eine besondere Herausforderung bei deren Therapie dar, da das Therapeutikum auf viele verschiedene Zelltypen wirken muss. Gliazellen stellen einen Überbegriff für verschiedene Gruppen von Stützgeweben des Gehirns dar und lassen sich in drei Typen einteilen, den Ependymzellen, sowie Mikroglia und Makroglia, zu denen die Astrozyten und Oligodendrozyten zählen. Die morphologische Heterogenität des GBMs weist auf die Tumorgenese aus verschiedenen Zelltypen hin, den Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen, welche in Abbildung 2 dargestellt sind ¹².

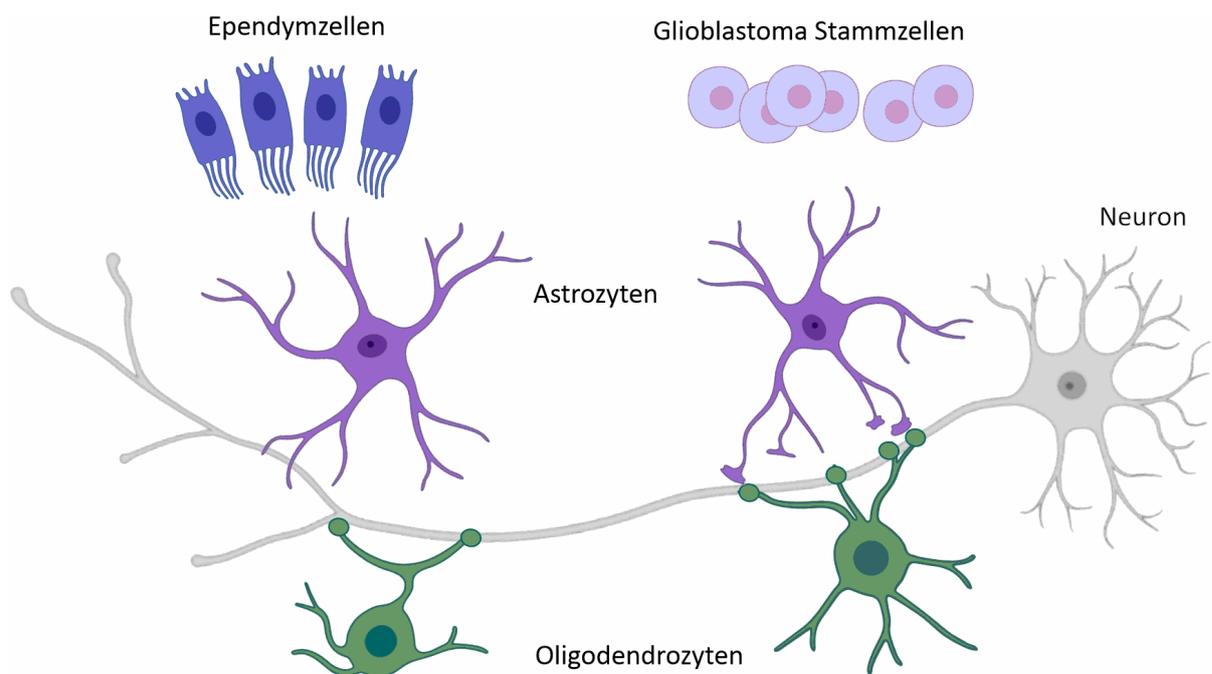


Abb. 2 Zellen des Glioblastoms

Das Glioblastoma Multiforme auch Glioblastom genannt, ist ein Hirntumor, der sich aus veränderten Stammzellen, den Glioblastoma-Stammzellen, entwickelt. Ein Glioblastom besteht aus drei Haupttypen von Gliazellen - Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen. Die Astrozyten, auch Astroglia genannt, bilden den größten Teil der Gliazellen im Zentralnervensystem. Sie besitzen sternförmig verzweigte Zellausläufer. Oligodendrozyten zählen ebenfalls zu den Gliazellen und kommen überwiegend in der weißen Hirnsubstanz vor. Ependymzellen bilden eine Zellschicht, die die Hohlräume des Gehirns auskleidet. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Die sternförmigen Astrozyten agieren in vielfältigen essenziellen Funktionen, die fundamentale Bedeutung für die Integrität und Funktion des neuronalen Gewebes aufweisen. Sie fungieren als architektonisches Stützgerüst, indem sie das strukturelle Geflecht bereitstellen, das sowohl Neuronen als auch zerebrale Blutgefäße umgibt und eine kohärente strukturelle Grundlage für das gesamte ZNS offeriert. Durch die Aufnahme von freigesetzten Kaliumionen und die Regulierung des pH-Wertes spielen sie eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewicht im extrazellulären Milieu des ZNS¹³. Eine Involvierung an der Nährstoffversorgung von Neuronen konnte ebenfalls gezeigt werden, sowie die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke als selektive Barriere, die das Nervengewebe vor toxischen und pathogenen Einflüssen schützt¹⁴. Darüber hinaus tragen Astrozyten zu Reparatur- und Regenerationsprozessen bei, indem sie mit ihrer Fähigkeit zur Proliferation geschädigte Gewebestrukturen wiederherstellen.

Eine weitere spezifische Klasse von Gliazellen sind Oligodendrozyten, deren primäre Funktion die Ausbildung der Myelinscheide um die Axone ist, um durch elektrische Isolierung eine effiziente und schnelle Weiterleitung von Nervenimpulsen zu ermöglichen. Ein einzelner Oligodendrozyt kann hierbei mehrere Axone myelinisieren. Die außerordentliche Wichtigkeit dieses Prozesses zeigt sich bei neurodegenerativen Erkrankungen. Der Abbau der Myelinschicht bei betroffenen Patienten äußert sich in verschiedenen neurologischen Ausfallerscheinungen, abhängig vom Abbaugrad und der betroffenen Gehirnregion. Oligodendrozyten entwickeln sich aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*Oligodendrocyte precursor cells*, OPCs). Diese Vorläuferzellen haben ihre Pluripotenz durch voranschreitende Differenzierung bereits verloren, zeigen jedoch noch ein höheres Entwicklungspotenzial als ausdifferenzierte somatische Zellen. Sie zeigen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in reife Oligodendrozyten. Unter bestimmten Bedingungen, meist pathologischer Herkunft, können sie sich auch in Astrozyten und Neuronen differenzieren. Eine Deregulation des Gleichgewichtes von OPC-Differenzierung und -Proliferation kann zu einer gestörten Myelinisierung oder zur Ausbildung von Gliomen führen¹⁵.

Ependymzellen sind epitheliale Zellen, die das Ependym bilden, eine monolagige Zellschicht, welche die Hirnventrikel auskleidet und so das Hirngewebe von der Cerebrospinalflüssigkeit (*human cerebrospinal fluid*, hCSF) trennt. Sie sind maßgeblich an der Produktion und Zirkulation der hCSF beteiligt. Gleichzeitig sind sie eine essenzielle Komponente der Blut-Hirn-Schranke und wirken so an der Aufrechterhaltung der neurologischen Integrität mit. Ependymzellen stellen im Allgemeinen eine morphologisch und funktionell heterogene Zellpopulation dar.

Die besonderen biologischen Eigenschaften des GBMs, wie ihr proliferatives und aggressives Verhalten, die Resistenz gegen Chemotherapeutika und die Invasion gesunder, vom Haupttumor weit entfernter Hirnareale, begründen den Verdacht, dass das Glioblastom eine Subpopulation von Stammzellen, auch Gliom-initiiierende Zellen, besitzt. Diese haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und weitere Glioblastomzellen zu bilden⁴. Diese These wird durch die Expression von Biomarkern gestützt, die als charakteristisch für Stammzellen gelten und auch auf Tumorzellen des GBMs gefunden werden¹⁶.

Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) teilen eine Vielzahl von Eigenschaften mit embryonalen und adulten Stammzellen. Hierzu zählen insbesondere die Resistenz gegenüber toxischen Medikamenten, bedingt durch eine ausgeprägte DNA-Reparaturkapazität, die Resistenz gegenüber apoptotischen Prozessen, das Ausbleiben von Ruhephasen im Zellzyklus, sowie einige ihrer biologischen Marker¹⁷⁻¹⁹. Die Tumormasse des malignen Gewebes resultiert sowohl aus der Proliferation von Tumorzellklonen als auch, insbesondere bei der Rezidivbildung nach umfangreicher Tumoresektion, aus der abnormalen Differenzierungsaktivität von CSCs. Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob CSCs sich aus normalen Stammzellen entwickeln oder ob sie aus schon differenzierten Krebszellen hervorgehen, indem diese Pluripotenzmerkmale wiedererwerben¹⁹.

Nach dem aktuellen Stand der Forschung sind die GSCs die Zellen, die es zu bekämpfen gilt, um Rezidive zu verhindern.

1.3 Die Zikavirus-Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$

Das Zikavirus (ZIKV) ist ein von Stechmücken auf den Menschen übertragenes Virus, das in der Schwangerschaft zu einer Fehlbildung des Gehirns bei Babys im Mutterleib, der Mikrozephalie, führen kann. Dabei werden Stammzellen des Gehirns befallen und dadurch die vollständige Entwicklung des Gehirns gestört²⁰. Für eine Infektion von Zellen benötigt das Virus bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen, um in diese Zellen einzudringen und sich zu vermehren²¹. Es wurde festgestellt, dass das ZIKV hauptsächlich an Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des menschlichen Nervensystems bindet. Die zwei untersuchten Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$ für ZIKV sind in Abbildung 3 dargestellt.

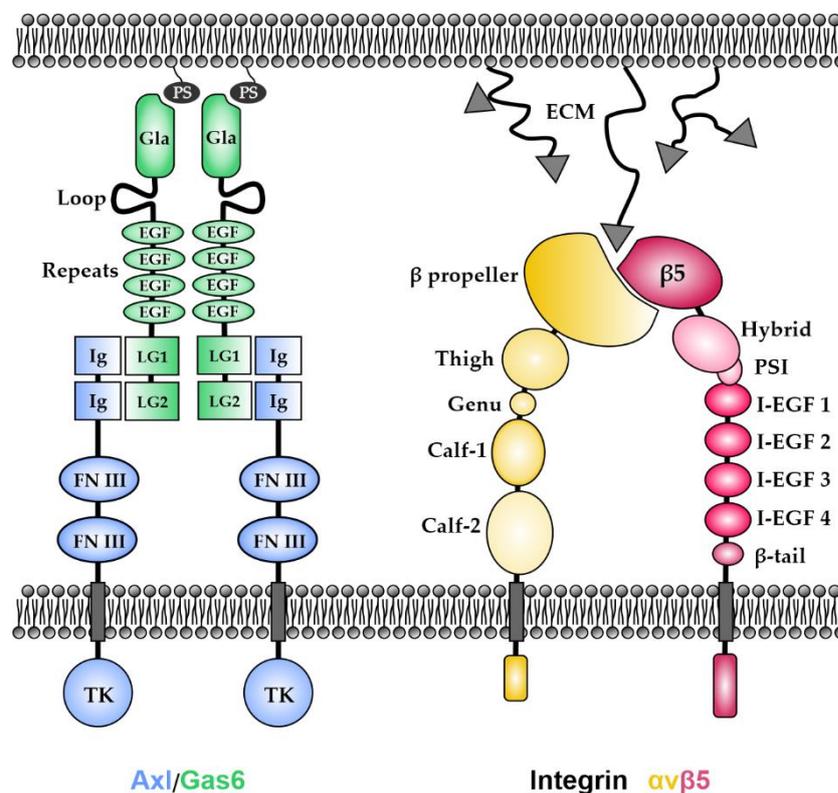


Abb. 3 Schematische Darstellung der Zikavirus-Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$
 Der AXL-Rezeptor ist ein Mitglied der TAM-Rezeptorfamilie (Tyro3, Axl, Mer), die zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen (TK) gehört. Axl (Blau) im Zusammenhang mit seinem Liganden Gas6 (Grün) bilden eine Struktur, die eine Bindung an die Phospholipidmembran bewirkt. Die Gla-Domäne des Gas6 bindet dabei an Phosphatidylserine (PS) auf der Oberfläche von Zellmembranen. Das Schema des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors zeigt in die α -Untereinheit (Gelb) und die $\beta 5$ -Untereinheit (Rot) im dimerisierten Zustand. Integrin $\alpha\beta 5$ bindet zum Beispiel an das Aminosäuremotiv RGD, welches ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) ist. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.3.1 Der Axl-Rezeptor

Der Axl-Rezeptor gehört neben Tyro3 und Mer zur TAM-Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK)²². Als Transmembranproteine übertragen RTK Signale aus der extrazellulären Matrix in das Cytoplasma und zum Zellkern. Diese Rezeptorfamilie ist maßgeblich an der Regulation vielfältiger zellulärer Prozesse beteiligt, wie der Zellproliferation, dem Zellüberleben, dem Freisetzen von Zytokinen als Teil der Immunantwort, sowie der Zelladhäsion und -migration^{22,23}. Tyrosinkinasen bewirken die reversible Phosphorylierung der Hydroxygruppe von Tyrosin von Proteinen, welche somit durch eine Konformationsänderung einen erheblichen Einfluss auf dessen Proteinaktivität hat und so zur Signaltransduktion beiträgt²⁴. Der Axl-Rezeptor wird an der Zelloberfläche exprimiert und unterteilt sich in drei in Abbildung 3 dargestellte Domänen: Der extrazellulären Domäne, welche die Bindung zum Liganden Gas6 ermöglicht, einer hydrophoben Transmembrandomäne zur Verankerung und Proteinstabilisierung und der intrazellulären Domäne, welche die Kinaseaktivität ermöglicht. Eine entscheidende Rolle spielt der Axl-Rezeptor insbesondere bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und der Immunantwort. Durch die Unterdrückung entzündlicher Signale und der Hemmung der Immunzellaktivierung, durch die Beseitigung abgestorbener Zellen und ihrer Überreste, kann Axl die Immunantwort modulieren und die Dauer der Immunreaktion begrenzen^{25,26}.

Im pathogenen Zustand können Axl-Mechanismen auch von Krebszellen genutzt werden, um zur Immunflucht der Tumorzellen beizutragen, indem die Zellmigration und das invasive Potenzial erhöht, während apoptotische Prozesse gehemmt werden^{23,25}. Eine Überexpression des Rezeptors im Tumorgewebe ist assoziiert mit einer erhöhten Therapieresistenz, Metastasierung und Tumorprogression²⁵. Bei zahlreichen Krebsarten wie zum Beispiel Lungen-, Brust- und insbesondere Hirntumoren wurde eine ektopische, also ungewöhnliche Verteilung und Überexpression beobachtet²⁴.

Ein besonderes Interesse in der Forschung gegen das Glioblastom hat der Axl-Rezeptor durch seine Identifikation als zelltypspezifischen Eingang für das Zikavirus in Zellen des ZNS erlangt. Der Eingangsmechanismus ist noch nicht abschließend aufgeklärt, es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ein funktionaler Axl-Rezeptor zur Infektion notwendig ist²⁶.

Der Axl-Rezeptor stellt potenziell einen selektiven Eingang für das Zikavirus zur Infektion von Astrozyten, Endothel- und Gliazellen dar, also den Zellen, die von Gliomen betroffen sind²⁶.

1.3.2 Der Integrin $\alpha\beta5$ -Rezeptor

Integrine sind eine Familie von transmembranen Zelladhäsionsmolekülen mit Rezeptorfunktion, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und eine wesentliche Rolle sowohl bei der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) als auch bei der homo- und heterotypen Adhäsion zwischen Zellen spielen^{27,28}. Integrin-Rezeptoren sind Heterodimere, die aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten bestehen und ihre Rezeptorspezifität von der α -Untereinheit erhalten^{27,29}. In Säugetieren wurden bisher 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert, die 24 verschiedene Heterodimere bilden können²⁹. Die meisten Integrine können verschiedene Liganden binden. Zellen exprimieren zumeist mehrere Integrine für gleiche Liganden. Ihre Expression ist somit redundant²⁷. Integrine haben im Vergleich zu anderen Rezeptoren die besondere Fähigkeit zur bidirektionalen Signalübertragung und sorgen so für die Interaktion zwischen ECM und dem Intrazellularraum²⁹. Die Assoziation von Signalmolekülen der ECM mit Integrin-Rezeptoren kann zytoplasmatisch eine Vielzahl von Signalketten aktivieren, welche beispielsweise die Proliferation, die Migration oder Invasion von Zellen bewirken^{27,29}. Auch spielen Integrin-Rezeptoren bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Die Integrin-Rezeptoren interagieren mit zytoplasmatischem Aktin, was zu einer Aggregation der Integrine und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionsstellen (*focal adhesion sites*, FAS) führt³⁰. Diese dienen als Schalt- und Verankerungsstellen, die eine stabile Adhäsion garantieren, zu einer Reorganisation des Aktingerüsts führen und Aktinfilamente in der Zellmembran verankern. Sie dienen auch dazu Integrin-vermittelte Signale weiterzuleiten, um so eine gerichtete Zellmigration, das Zellwachstum und das Zellüberleben zu regulieren.

Im Kontext des Glioblastoms sind Integrine bedeutsam bei der Pathogenese, der Bildung der Tumornische, der Infiltration des Hirngewebes und der Angiogenese. Während des Tumorwachstums werden bestimmte Integrine verstärkt exprimiert, welche Signalwege aktivieren, die zu einer gesteigerten Migrations- und Invasionsfähigkeit beitragen²⁹. Durch Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren der ECM tragen Integrine dazu bei, die Neubildung von Blutgefäßen zu stimulieren, um den Nährstoff- und Sauerstoffbedarf des Tumors zu decken²⁹.

Die spezifische Kombination der Untereinheit des Integrin $\alpha\beta5$ -Rezeptors erlangt in der Forschung am Glioblastom als potenzielles Angriffsziel eines onkolytischen Zikavirus fortschreitend an Bedeutung. Das Zikavirus zeigt onkolytische Aktivität und kann selektiv GSC aus humanen GBM-Zellkulturen eliminieren³¹. Es konnte gezeigt werden, dass für die Zikavirus-Infektion ein funktionsfähiger Integrin $\alpha\beta5$ -Rezeptor notwendig ist³¹.

1.4 Stammzell-spezifische Marker

Die voranschreitende Stammzellforschung konnte bereits einige Marker identifizieren, welche sich als charakteristisch für den Zellursprung und Differenzierungsgrad erwiesen haben. Unter diesen sind auch Biomarker, die sich als spezifisch sowohl für neuronale Stammzellen (*neuronal stem cells*, NSCs) als auch CSCs erwiesen haben. Das höchste Vorkommen von NSCs liegt in der Subventrikulären Zone (SVZ) des Gehirns^{9,32}. Die SVZ stellt eine 3-5 mm dicke Schicht dar, welche zwischen den lateralen Ventrikel, dem Striatum und dem Corpus Callosum lokalisiert ist und als wichtiges Stammzellreservoir fungiert⁹. Um neue und gezielte GBM-Therapien zu entwickeln, ist ein besseres Verständnis der Heterogenität des Tumors und seiner Ursprungszellen von Bedeutung. In dieser Arbeit sollten Tumorzellen des GBMs auf die Expression von vier Stammzellmarkern untersucht werden, die in Abbildung 4 aufgeführt sind.

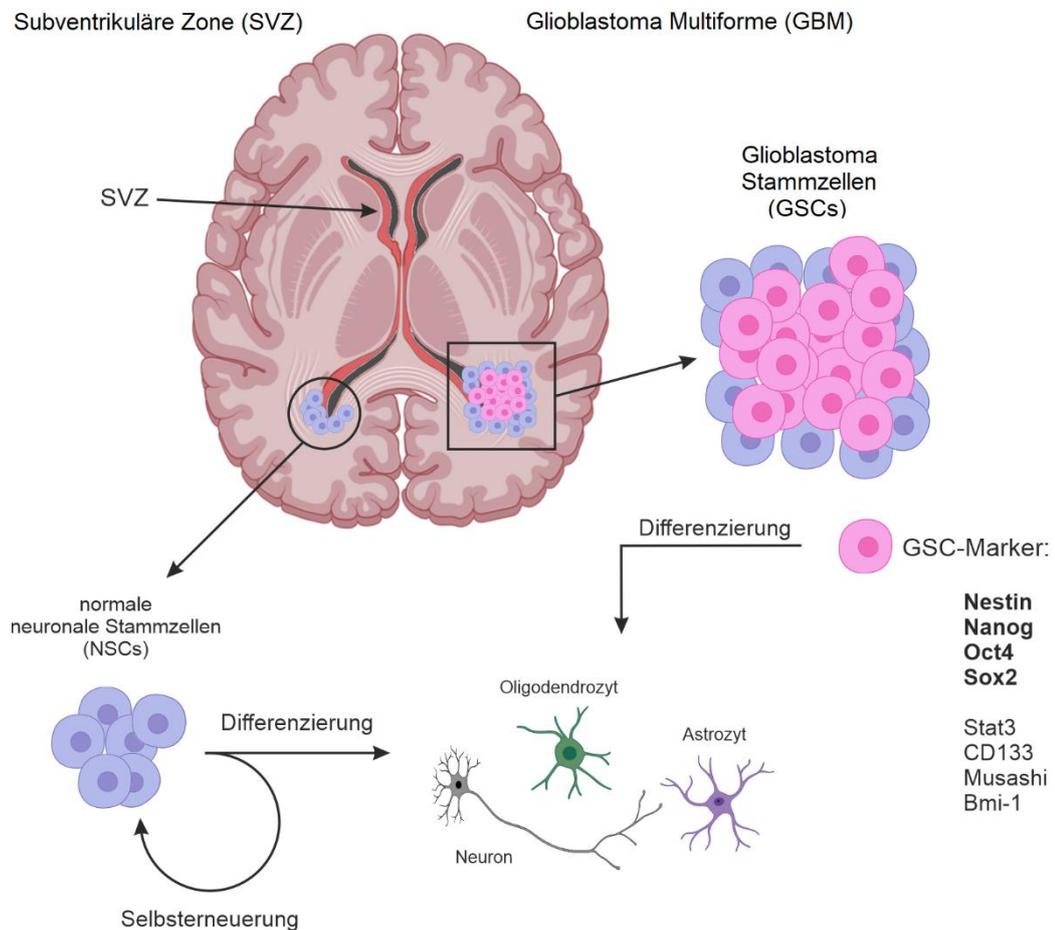


Abb. 4 Die Lokalisation von Stamm- und Tumorzellen im Gehirn

Das GBM befindet sich an den lateralen Ventrikeln (Schwarz) und der SVZ (Rot), dem größten Stammzellreservoir des Gehirns. Die GSCs des GBMs werden durch verschiedene Marker charakterisiert, wobei Nestin, Nanog, Oct4 und Sox2 zu den bedeutendsten Stammzellmarkern gehören. Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich in verschiedene Zelltypen differenzieren. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.4.1 Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4

Der Oktamer-bindende Transkriptionsfaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*, Oct4) ist an der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen beteiligt. Oct4 gehört zur POU-Familie von Transkriptionsfaktoren, wobei P für Pit-1 steht, einem Transkriptionsfaktor, der spezifisch für die Hypophyse ist. Das O steht für Faktoren, die an ein oktameres Sequenzmotiv (ATGCAAAT) in der Kontrollregion einiger Gene binden, von denen einige zellspezifisch sind (z. B. Gene für Immunglobuline) ³³. Das U steht für den *Caenorhabditis elegans*-spezifischen Faktor Unc-86, der für die Entwicklung neuronaler Zellen wichtig ist. Die POU-Familie zeichnet sich allgemein durch ihre gemeinsame konservierte POU-spezifische Subdomäne und die POU-Homöodomäne aus, die beide durch eine kurze nicht konservierte Linker-Region miteinander verbunden sind ^{33,34}. Während die POU-spezifische Subdomäne der Sequenzspezifität der DNA-Bindung dient, beeinflusst die Homöodomäne zusätzlich Protein-Protein-Interaktionen ³⁵. Oct4 reguliert die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen (*embryonal stem cells*, ESC), indem er sowohl als Repressor von Genen agiert, welche die Differenzierung bewirken, als auch als Transaktivator von Genen, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz bekannt sind ³⁶⁻³⁸. Der Transkriptionsfaktor ist an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt und kann beispielsweise über die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes von Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) dessen Aktivierung bewirken. Stat3 fördert die Expression zellulärer Protoonkogene, die für Proteine kodieren, die anti-apoptotisch, zellzyklusregulierend und proliferativ wirken und so das Tumorwachstum fördern ^{37,39}. In gesunden Zellen ist Oct4 nur im Status der Pluripotenz zu finden, nimmt mit zunehmender Differenzierung ab und ist in vollständig ausdifferenzierten gesunden Zellen, wie Astrozyten und Neuronen, nicht mehr nachweisbar ³⁷.

Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen gewinnt die Forschung zu Oct4 zunehmend an Bedeutung, da Studien gezeigt haben, dass Oct4 in CSCs hochreguliert und daher stark exprimiert wird ^{37,38,40,41}. Auch in humanen Gliomen wird Oct4 stark exprimiert, wobei eine positive Korrelation der Oct4-Expressionswerte mit dem Schweregrad des Glioms festgestellt werden konnte ^{37,42}. Im Unterschied dazu zeigte eine Suppression der Oct4-Expression in der konventionellen Glioblastom C6-Zelllinie eine Hemmung des Tumorwachstums ³⁷.

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Sox2

Sox2 (*sex determining region Y (SRY) - box2*) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen von wesentlicher Bedeutung ist. Sox2 enthält eine charakteristische high-mobility group Domäne (HMG-Domäne), die eine präzise Erkennung und Bindung von DNA ermöglicht^{43,44}. Sox2 gehört zu einer großen Proteinfamilie, welche die evolutionären Aspekte der Zellfunktion maßgeblich steuern. Sox2 beeinflusst insbesondere während der Embryonalentwicklung die Zellproliferation und die Differenzierung von Stammzellen und entscheidet so über die weitere Entwicklung und Differenzierung von Zellen³⁹. Er spielt bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen eine entscheidende Rolle, was sich auch daran zeigt, dass eine Zelldifferenzierung nur möglich ist, wenn Sox2 stark herunterreguliert ist^{43,45,46}. Eine weitere Bedeutung hat Sox2 als Reprogrammierungsfaktor, wobei terminal differenzierte somatische Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) zurückverwandelt werden^{39,43,46}.

In Bezug auf Krebserkrankungen und die Selbsterneuerung von CSCs ist Sox2 ebenfalls von großem Interesse, da Sox2 an Tumor-assoziierten Prozessen, wie der Proliferation, dem Zellüberleben durch die Umgehung apoptotischer Signale, sowie der Migration und Invasion von Zellen beteiligt ist^{43,46,47}. Eine vermehrte Sox2 Expression konnte bei vielen Krebsarten, darunter auch dem Glioblastom nachgewiesen werden^{48,49}. Im Unterschied dazu zeigte eine Verringerung der Sox2 Expression in der konventionellen GBM Laborzelllinie U-87 eine signifikante Abnahme der Invasions- und Migrationsfähigkeit⁴³. Die Expression von Sox2 zeigt eine positive Korrelation zum Schweregrad des Glioms. Die höchsten Sox2 Expressionswerte wurden in den hyperzellulären und hyperproliferativen Tumorbereichen nachgewiesen³⁹.

1.4.3 Der Transkriptionsfaktor Nanog

Der Name Nanog ist von *Tír na nÓg* (irisch für "Land der Jungen") abgeleitet worden und hat daher keinen weiteren wissenschaftlichen Bezug. Nanog ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Präimplantationsphase und der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle für die Differenzierung von ESCs spielt, in der Entscheidung über das Zellschicksal maßgeblich involviert ist und mit fortschreitender Differenzierung der Zellen immer weniger exprimiert wird^{50,51}. Nanog ist ein charakteristischer Marker für ein pluripotentes Zellstadium, welcher zusammen mit Sox2 und Oct4 einen Transkriptionskomplex bildet, der die pluripotente Stammzellidentität bewahrt, indem er die Genexpression reguliert und eine Ausdifferenzierung verhindert. Diese Fähigkeit wird auch in der Forschung an induzierten pluripotenten

Stammzellen ersichtlich, in welcher Nanog für die Induktion der Rückdifferenzierung eingesetzt wird ⁵¹.

Im Kontext von Krebserkrankungen ist Nanog von zentraler Bedeutung. In einigen Krebsarten, wie auch dem Glioblastom, wurde eine erhöhte Nanog Expression festgestellt, was darauf hinweist, dass dieser möglicherweise eine Rolle bei der Tumorphogenese spielt. Nanog hat das Potenzial den Krebszellen stammzellähnliche Eigenschaften zu verleihen, welche mit einer erhöhten Tumorprogression, Metastasierung, Therapieresistenz und Bildung konsekutiver Rezidive nach der Resektion assoziiert sind ^{50,51}. Im Zusammenhang mit Oct4 und Sox2 trägt Nanog zur Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen bei ^{39,46,52,53}.

1.4.4 Das Intermediärfilament Nestin

Nestin (**Neuroepitheliales Stammzellprotein**) ist ein Proteinmarker für neuronale Stammzellen und wird in sich teilenden Zellen in den frühen Entwicklungsstadien des Zentralnervensystems exprimiert. Nestin ist ein Intermediärfilament (IF), welches neben Aktinfilamenten und Mikrotubuli zu den drei Hauptkomponenten des Cytoskeletts gehört und somit Bestandteil des Cytoplasmas ist. Im Gegensatz zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli, welche exklusiv aus F-Aktin und Tubulin bestehen, besteht die Gruppe der Intermediärfilamente aus multiplen Proteinen, die mit Hinblick auf Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen in die Klassen I-VI unterteilt sind ⁵⁴. Nestin ist hier alleinständig in Klasse VI eingeteilt und kommt hauptsächlich im ZNS vor ^{55,56}. Zur Filamentbildung benötigt Nestin ein IF der Klasse III, wie zum Beispiel Vimentin oder α -Internexin, da es aufgrund eines zu kurzen N-Terminus selbst keine Homodimere ausbilden kann ⁵⁶.

Während der fortschreitenden Zelldifferenzierung wird Nestin zunehmend, je nach Zelltyp, zum Beispiel in Astrozyten durch saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) oder in Neuronen durch verschiedene Neurofilamente ersetzt ^{56,57}.

Bei Erwachsenen sind Nestin-positive Zellen an gewebespezifischen Stellen lokalisiert, wo sie eine ruhende Zellressource darstellen, die durch aktivierende Signale die Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Differenzierung erlangen ⁵⁷.

Nestin ist ein umfassend untersuchter Marker für NSCs, dessen Korrelation zwischen seiner Expression und dem klinischen Verlauf maligner Krankheiten mehrfach gezeigt wurde ⁵⁸. Daher ist Nestin ein wichtiger Biomarker für CSCs. Seine Expression wurde in vielen Tumoren des ZNS festgestellt, wie den Neuroblastomen, Astrozytomen und Glioblastomen ⁵⁸.

1.5 Ziel der Arbeit

Für die Arbeit standen verschiedene Zellkulturen, die aus Tumorproben von GBM-Patienten gewonnen wurden, zur Verfügung. Ziel war es, diese Zellkulturen weiterzuführen und für immunhistologische Untersuchungen vorzubereiten.

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die gegen die Stammzellmarker Oct4, Sox2, Nanog und Nestin gerichtet sind, sollte untersucht werden, ob und welche Zelltypen diese Marker exprimieren. Auch sollte untersucht werden, ob sich auf den Zellen die Zikavirus Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$ nachweisen lassen. Der Nachweis von Stammzellmarkern und ZIKV-Rezeptoren sollte mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IFT) durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Ausrüstung

2.1.1 Geräte

Diavert Durchlichtmikroskop	Leitz
EVOS FL Auto Fluoreszenz Mikroskop	Thermo Fisher
EVOS M7000 Fluoreszenz Mikroskop	Thermo Fisher
Inkubator CB 150	Binder
Multipetten	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf/Gilson
Sterilgard III Advance Sterilwerkbank	Baker Company

2.1.2 Chemikalien

Cerebrospinalflüssigkeit	AKH Neurochirurgie
	Ethikkommission PV6041
Dinatriumkaliumphosphat	Merck
DMEM	PAN-Biotech
Fetales Kälberserum	PAN-Biotech
Formaldehydlösung 37%	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Phalloidin-iFluor [®] 555 Konjugat	Biomol
ROTI [®] Mount FluorCare DAPI	Roth
Triton X-100	Merck
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02%	PAN-Biotech
Tween [®] 20	Roth

2.1.3 Antikörper

Maus anti-Axl IgG [C4-A8] mAb	Thermo Fisher MA5-32897
Maus anti-Integrin $\alpha\beta 5$ IgG1 [P1F6] mAb	Abcam ab177004
Maus anti-Nanog IgG [23D2-3C6] mAb	Abcam ab173368
Maus anti-Nestin IgG1 [2C1.3A11] mAb	Abcam ab18102
Maus anti-Oct4 IgG2b [GT486] mAb	Abcam ab184665
Maus anti-Sox2 IgG1 [9-9-3] mAb	Abcam ab79351
Ziege anti-Mouse IgG pAb	
Konjugat mit Alexa Fluor® 488	Abcam ab150113

2.1.4 Verbrauchsmittel

Biosphere Filter Pipetten Spitzen	Sarstedt
Cell+ T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt
Cell+ 96-Well Zellkulturplatte	Sarstedt
Dispenser Spitzen	Eppendorf
Laborflaschen	Schott Duran
Seal Safe Reaktionsgefäße	Sarstedt

2.1.5 Phosphat-gepufferte Salzlösung

NaCl	80,0 g	Carl Roth
KCl	2,0 g	Merck
Na ₂ KPO ₄ · 7 H ₂ O	26,8 g	Merck
KH ₂ PO ₄	2,4 g	Carl Roth

Für die phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) wurden die Komponenten in 800 mL ddH₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt und auf 1000 mL mit ddH₂O aufgefüllt.
PBS-T = PBS + 0,05% Tween 20.

2.2 Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe direkt nach chirurgischer Resektion in der Asklepios Klinik Hamburg aufbereitet und in die Kultivierung überführt. Für diese Arbeit wurden bereits bestehende Zellkulturen übernommen und diese entsprechend behandelt. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt, Cell+, Filterkappe) mit einem Volumen von 30 mL in einer 1:1 Mischung aus hCSF und DMEM/10% FBS bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ (Inkubator Binder, CB150) kultiviert. Die Zellsuspension wurde täglich im Durchlichtmikroskop (Leitz Diavert) auf die Zelladhärenz und -konfluenz untersucht. Beim Auswechseln des Mediums wurde die Zellsuspension mit losen, nicht adhärennten Zellen verworfen. Der Boden der Zellkulturflaschen wurde vorsichtig durch Schwenken mit 5 mL PBS gewaschen und das PBS wurde ebenfalls verworfen, um die Kultur von nicht adhärennten Zellen zu befreien. Anschließend wurden 30 mL neues Medium in einer 1:1 Mischung hCSF und DMEM/10% FBS zugegeben. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurde die Zellkultur geteilt, um ein Absterben der Zellen durch zu hohe Zelldichte zu verhindern. Hierzu wurde das Medium verworfen und 2 mL Trypsin/EDTA wurde auf den zellbedeckten Kulturflaschenboden pipettiert, durch sanftes Schwenken auf der gesamten Fläche verteilt und 5 min inkubiert, um die adhärennten Zellen vollständig von der Plastikoberfläche abzulösen. Anschließend wurden 8 mL DMEM/10% FBS hinzugegeben und die Zellen durch das vorsichtige Pipettieren gegen die Gefäßwand so lange vereinzelt, bis keine Zellansammlungen mehr zu sehen waren. Die so entstandene Zellsuspension wurde zum einen für die weitere Kultivierung aufgeteilt, indem je 2 mL der Zellsuspension in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit 14 mL DMEM/10% FBS und 14 mL hCSF überführt wurden. Für die Immunfärbungen wurden Zellen in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) überführt und ebenfalls mit der 1:1 Mischung aus hCSF und DMEM/10% FBS kultiviert, wobei die verschiedenen Zellkulturen entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden, um kontrolliertes Wachstum zu gewährleisten.

2.3 Immunfärbung

Die Immunfärbung wurde standardisiert durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Nach dem Zellwachstum wurden die 96-Well-Platten einmal mit PBS-T gewaschen. Für jeden einzelnen Waschschrift wurden jeweils 200 μL in die Wells pipettiert, 5 min stehen gelassen und vorsichtig seitlich aus dem Well, ebenfalls durch Pipettieren, abgezogen. Die Zellen wurden mit je 30 μL 3,7% Formaldehydlösung für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend einmal gewaschen. Um die innere Zellstruktur für die weiteren Reagenzien zugänglich zu machen, wurde die Zellmembran mit 0,1% Triton-X in PBS-T für 5 min bei RT permeabilisiert und zur vollständigen Entfernung des Detergens zweimal gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf Kunststoffoberflächen und Zellstrukturen wurden die Proben mit 5% Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) in PBS-T bei RT eine Stunde geblockt. Nach erneuter zweifacher Waschung wurden pro Well 30 μL eine Lösung bestehend aus Phalloidin (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in 1% BSA/PBS-T zur selektiven Färbung von filamentösen Aktin (F-Aktin) hinzugegeben und für 2,5 Stunden bei RT im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurde zweifach gewaschen, um nicht gebundene Phalloidin-Fluoreszenz Konjugate vollständig zu entfernen. Dann erfolgte jeweils über Nacht die Inkubation von 30 μL mit den in 2.1.3. aufgelisteten Maus monoklonalen primären Antikörpern bei 7 °C, welche in 1% BSA/PBS-T gelöst wurden. Am nächsten Tag wurde dreifach gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt folgte der Fluorophor (Alexa Fluor® 488) gekoppelte polyklonale anti-Maus Sekundärantikörper, welcher zur Konjugation mit dem Primärantikörper eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert wurde. Erneut folgte eine dreistufige Waschung, nach welcher im Anschluss ROTI® Mount FluorCare DAPI aufgetragen wurde, welches zum Anfärben der DNA dient und einen konservierenden Effekt auf die Probe und Färbung hat.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistologischer Nachweis des Axl-Rezeptors

Die Zelllinien U-87, AKH-5, AKH-11 und AKH-14 bis AKH-18 wurden, wie beschrieben kultiviert und mit dem Axl spezifischen IgG-Antikörper (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) markiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem sekundären Fluorophor konjugierten anti-Maus Antikörper (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) gefärbt. Da die verschiedenen Zelllinien ein sehr unterschiedliches Wachstum zeigten, wurden die in Abbildung 5 und in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse an verschiedenen Tagen mikroskopiert. Die gezeigten Bilder der Zelllinie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 und AKH-17 nach 7 Tagen Wachstum und die Bilder der Zelllinie AKH-18 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5, AKH-11, AKH-14 und AKH-15 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Ergebnisse der Detektion in Abb. 5 zeigen eine ubiquitäre Proteinexpression des Axl-Rezeptors in allen untersuchten Zellen der Zelllinien AKH-14-18. Die Zelllinie AKH-14 weist hier eine hohe Konfluenz von kleinen, morphologisch homogenen Zellen mit ausgeprägter Aktinstruktur auf, zwischen denen sich zwei um circa den Faktor 10 größere sphärische Zellen befinden, welche insbesondere um die Zellkerne eine hohe Antigendichte aufweisen aber eine gering ausgeprägte Aktinstruktur besitzen. AKH-15 zeigt eine Zelle mit langen Filopodien und einheitlicher Antigenverteilung über die gesamte Zellstruktur bei gleichzeitiger Aktin-Negativität. Die Zelllinie AKH-16 zeigt ähnlich wie AKH-14 eine hohe Konfluenz kleiner morphologisch ähnlicher Zellen mit starker Axl-Expression um eine deutlich größere sphärische Zelle, welche eine um ca. den Faktor 30 größere Fläche einnimmt. Die große Zelle zeigt eine starke Axl-Expression um den Zellkern mit strukturierten Ausläufern hoher Rezeptordichte. Zudem zeigt diese Zelle eine deutlich schwächere Ausprägung des Aktingerüsts im Vergleich zur übrigen Zellkultur. AKH-17 zeigt hier zwei verschiedene Zelltypen, mittig im Bild eine Zelle, die morphologisch einem Neuron ähnelt, sowie zwei Zellen globulärer Form ohne Zellfortsätze, welche Axl- und Phalloidin-Positivität zeigen. Die Zelllinie AKH-18 zeigt Zellen mit sehr feinen Filopodien, jedoch im Vergleich zu den filamentartigen Strukturen, die in den Zelllinien AKH-15 und AKH-17 beobachtet wurden, besitzt sie einen voluminöseren Zellkörper. Die gezeigten Zellen in AKH-18 sind alle schwach Aktin-positiv. Auch AKH-5 und AKH-11 zeigen in Abbildung 6 einen omnipräsente Axl-Expression, ebenso wie die Laborzelllinie U-87. drei Zelllinien in Abbildung 6 sind stark positiv in der Phalloidinfärbung, so dass im Unterschied zu den Zellen in Abbildung 5 keine Axl⁺/Aktin⁻ Zellen detektiert wurden.

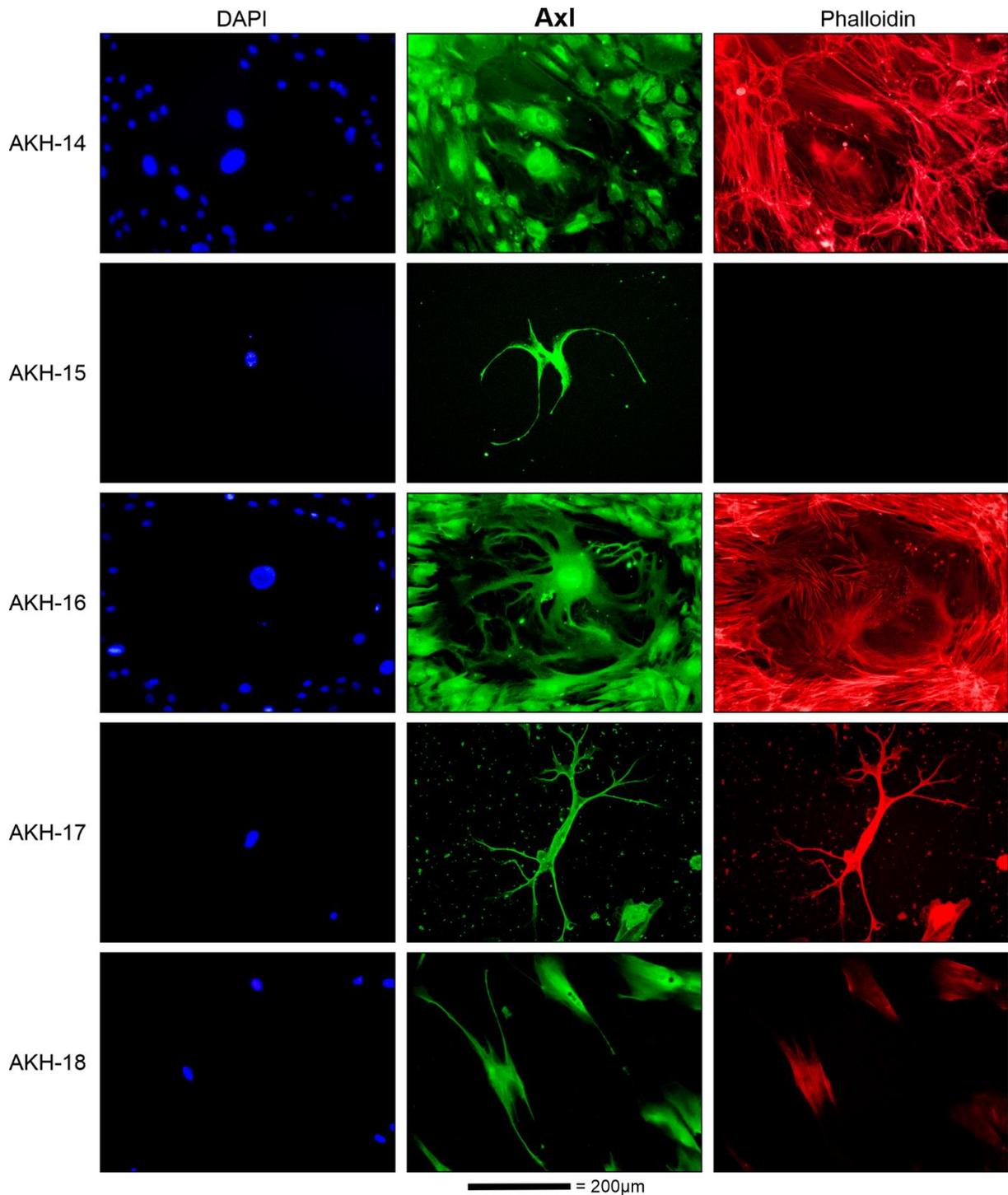


Abb. 5 Immunfärbung des Axl-Rezeptors der AKH-Zelllinien

Axl-Expression in den AKH-Zelllinien 14 - 18. Die Resektionen der Proben, aus denen die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Axl-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

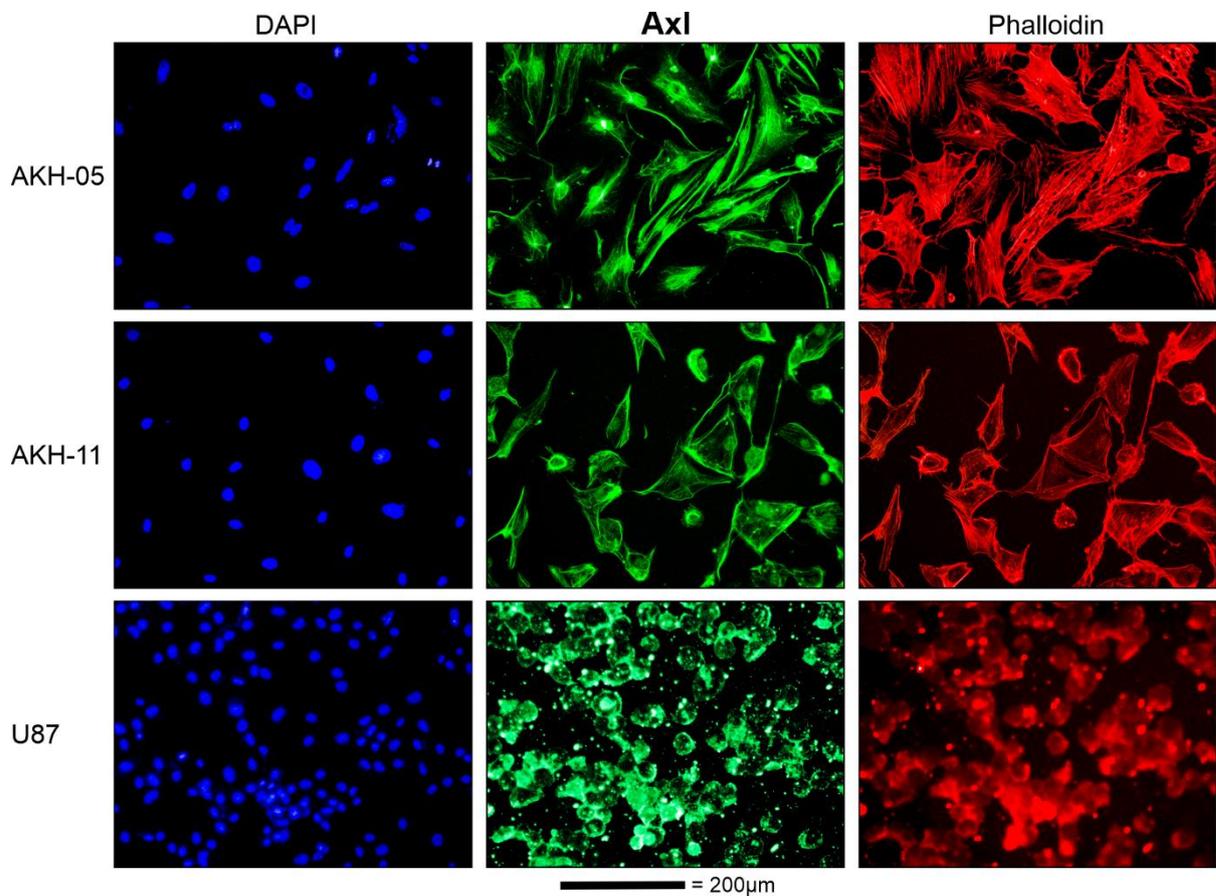


Abb. 6 Immunfärbung des Axl-Rezeptors in AKH-5/11 und U-87

Axl-Expression in den Zelllinien AKH-5/11 sowie in der Zelllinie U-87. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Axl-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörper unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

3.2 Immunhistologischer Nachweis von Integrin $\alpha\beta 5$

Die Zelllinien AKH-5, AKH-11 und AKH-14 bis AKH-18 wurden, wie in den Methoden beschrieben kultiviert und mit dem Maus monoklonalen Integrin $\alpha\beta 5$ -spezifischen IgG-Antikörper (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) markiert und mit dem Fluorophor konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) gefärbt. Da die verschiedenen Zelllinien ein sehr unterschiedliches Wachstum zeigten, wurden die in Abbildung 5 und in Abbildung 6 gezeigten Immunfluoreszenzen an verschiedenen Tagen der Kultivierung mikroskopiert. Die gezeigten Bilder der Linie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 und AKH-17 nach 7 Tagen Wachstum und die Bilder der Zelllinie AKH-18 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5, AKH-11, AKH-14 und AKH-15 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Expression des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors konnte, wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 gezeigt, in allen verwendeten Zelllinien außer in AKH-17 und U-87 im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Da der Nachweis des Rezeptors in der Zelllinie U-87 bereits ein halbes Jahr zuvor gezeigt werden konnte, ist das gezeigte Bild freundlicherweise von Jan Patrick Formanski (JPF, Laborgruppe Schreiber) zur Verfügung gestellt worden. In der Zelllinie AKH-14 in Abbildung 7 zeigt sich die Integrin $\alpha\beta 5$ -Expression zwar schwach, jedoch gleichmäßig über die Zellen verteilt. Die Zelle am linken unteren Rand weist keine Phalloidinfärbung auf, die anderen vorhandenen Zellen zeigen eine ausgeprägte Aktinstruktur. AKH-15 weist eine sehr granuläre, auf den Zellkörper fokussierte, Expression des Rezeptors mit einigen vereinzelt Vorkommen auf den Zellfortsätzen auf, deren Verlauf sich anhand der positiven Phalloidinfärbung nachvollziehen lässt. Es ist davon auszugehen, dass die Enden der Zellfortsätze aufgrund einer fehlenden Aktinstruktur nicht sichtbar gemacht werden konnte. Die Zelllinie AKH-16 in Abbildung 7 zeigt mittig, ähnlich wie in Abbildung 5 zu sehen, eine in Relation zur allgemeinen Zellkultur vielfach größere Zelle, welche Aktin-negativ ist und den Rezeptor insbesondere um den Zellkern exprimiert. Hierum befindet sich eine hohe Konfluenz vieler kleiner Zellen, die ein stark ausgebildetes Aktingerüst aufweisen. Bei der Zelllinie AKH-17 ist der negative Rezeptor-nachweis zu sehen, mit einer Phalloidinfärbung mehrerer filamentöser Zellen, sowie Zellen mit raumgreifenden Zellkörpern, ganz ohne Zellfortsätze. dem Bild der Zelllinie AKH-18 sind drei Zellen zu sehen, von denen zwei eine gemeinsame Aktinstruktur ausgebildet haben und Integrin $\alpha\beta 5$ granulär exprimieren, während die weitere abgebildete Zelle keinen Rezeptornachweis zeigt.

In Abbildung 8 zeigt AKH-5 eine hohe Konfluenz mit einer Rezeptor-Expression in wenigen mittig lokalisierten Zellen in vesikulärer Erscheinungsform. AKH-11 zeigt bei

ebenfalls hoher Konfluenz eine einzige Integrin $\alpha\beta 5$ -positive Zelle, mit einer sphärischen Expression direkt neben dem Zellkern. Die Aktinstrukturen beider Kulturen sind stark ausgeprägt, zeigen jedoch beide unterschiedliche Strukturierungen. Die Zelllinie AKH-11 zeigt besonders starke Phalloidinfärbungen an den äußeren Zellrändern und schwache Färbungen im Zellinneren, während die Zellen der Linie AKH-5 auch im Zellkörper eine stärkere Phalloidinfärbung, bei deutlich geringerer Heterogenität der Zellmorphologien, zeigen.

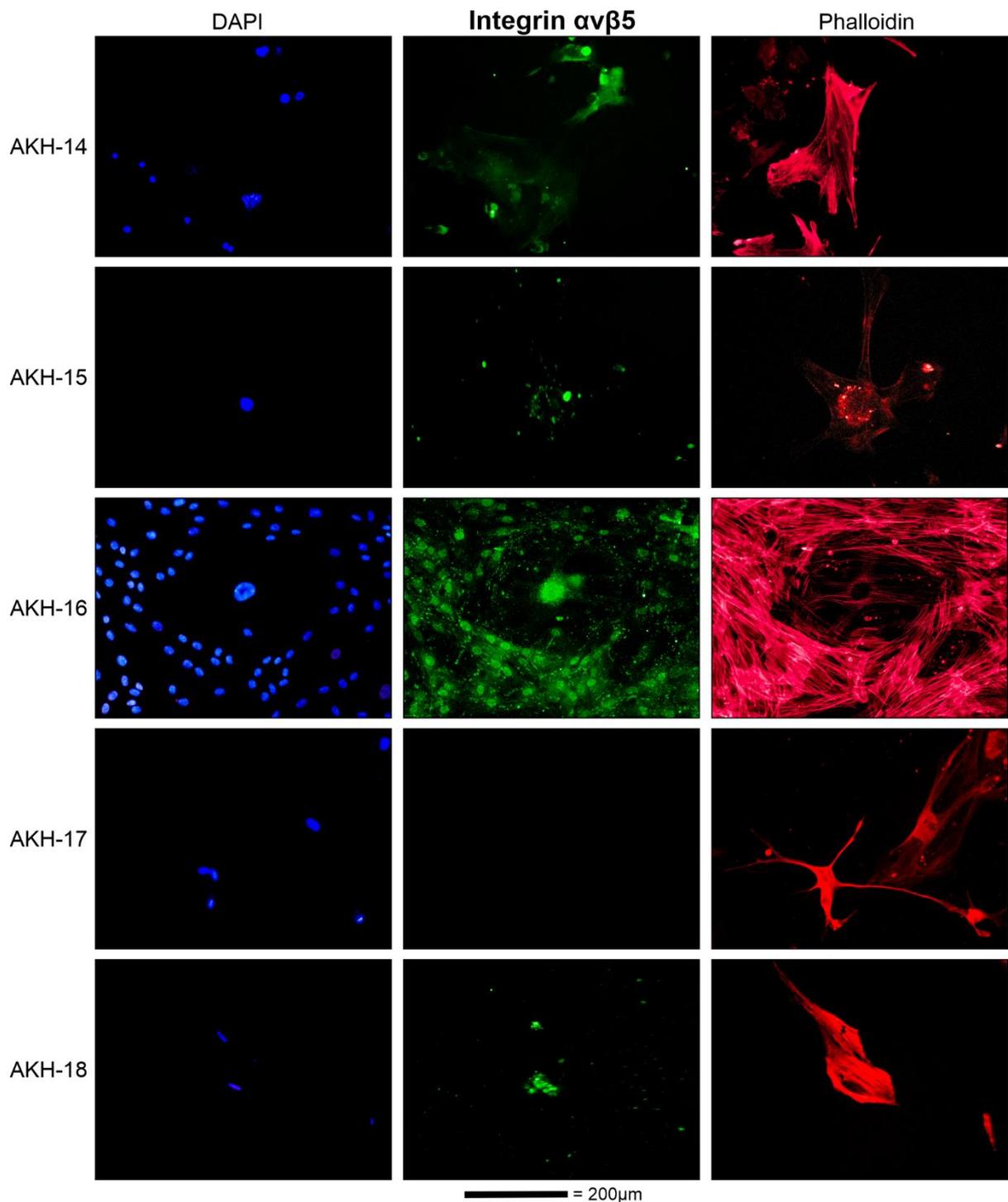


Abb. 7 Immunfärbung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors der AKH-Zelllinien
 Integrin $\alpha\beta 5$ -Expression in den AKH-Zelllinien 14 - 18. Die Resektionen der Proben, aus dem die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Integrin $\alpha\beta 5$ -spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

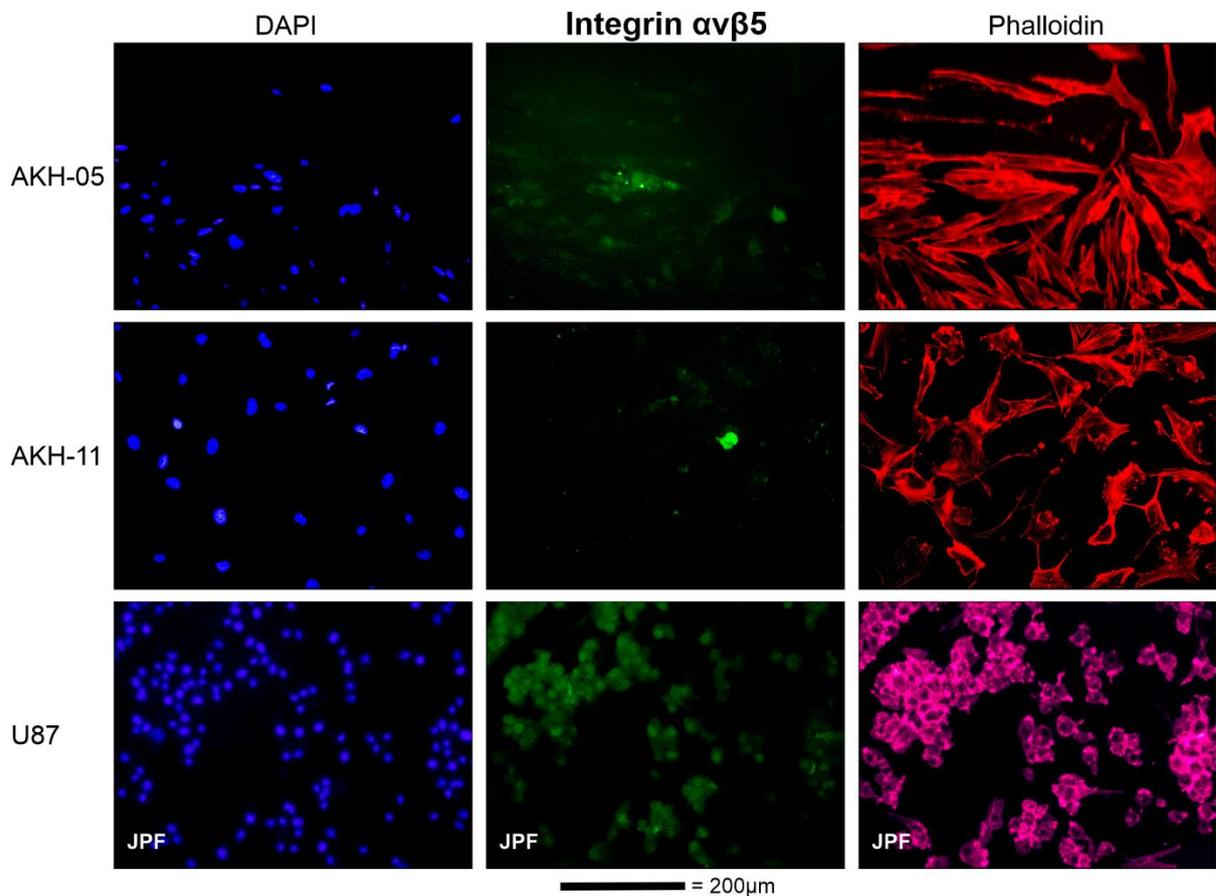


Abb. 8 **Immunfärbung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Rezeptors in AKH-5 und AKH-11**
 Integrin $\alpha\beta 5$ -Expression in den Zelllinien AKH-5 und AKH-11. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Integrin $\alpha\beta 5$ -spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht. JPF = Bilder von Jan Patrick Formanski.

3.3 Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Oct4

Die Zelllinien U-87, AKH-5, AKH-11 und AKH-14 bis AKH-18 wurden mit dem Maus monoklonalen Oct4 spezifischen IgG-Antikörper (4 µL/mL) markiert und mit dem Fluorophor konjugierten anti-Maus Antikörper (2 µL/mL) gefärbt. Die in Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigten Immunfluoreszenzbilder wurden an verschiedenen Tagen der Kultivierung mikroskopiert. Die gezeigten Bilder der Linie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 und AKH-17 nach 7 Tagen Wachstum und die Bilder der Zelllinie AKH-18 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5, AKH-11, AKH-14 und AKH-15 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Ergebnisse der Detektion in Abbildung 10 zeigen eine Expression von Oct4 in der Gesamtheit der Zellen der Zelllinien AKH-14 bis AKH-18. Die Zelllinien AKH-14 und AKH-15 zeigen große Zellen ohne Fortsätze. Die Oct4-Expression lässt sich bei AKH-14 über die gesamte Zelle beobachten, bei AKH-15 hingegen nur granulär und auf den inneren Zellkörper konzentriert. AKH-14 und AKH-15 zeigen in Abbildung 9 eine schwache Phalloidin färbung. AKH-16 weist eine hohe Konfluenz kleiner, morphologisch ähnlicher Zellen auf, welche um deutlich Größere angeordnet sind. Die Antigen-Expression zeigt sich in den verschiedenen Zellen in gleichartiger Verteilung und Konzentration, wobei die jeweils höchste Intensität in unmittelbarer Nähe des Zellkerns vorliegt. Das Phalloidin gefärbte Aktin zeigt bei AKH-16 in Abbildung 9, ähnlich wie bei AKH-14 und AKH-16 in Abbildung 5, deutlich geringere Intensitäten in den großen Zellen. Die Zellkultur AKH-17 in Abbildung 9 zeigt verschiedene Morphologien, darunter drei Zellen mit langen filamentösen Strukturen, welche eine starke Intensität der Oct4-Expression und Phalloidin-Positivität zeigen, sowie drei Zellen mit großen Zellkörpern ohne Ausläufer und schwacher Antikörperfärbung, welche ebenfalls Phalloidin-positiv sind. Der Stammzellmarker Oct4 wird in Abbildung 9 bei AKH-18 sehr granulär und auf den Zellkörper konzentriert exprimiert. In der Zelllinie AKH-18 lässt sich in dem Zusammenhang nur eine geringe Phalloidin färbung beobachten.

Die Zelllinien AKH-5 und AKH-11, sowie die Laborzelllinie U-87, zeigen in Abbildung 10 ebenfalls eine Oct4-Expression in allen Zellen der Kultur. Die Zelllinie AKH-5 zeigten eine sehr gleichmäßige Expressionsstärke. Bei AKH-11 hingegen gibt es einige Zellen, die Oct4 in Relation zu den umliegenden Zellen stärker und teilweise granulär exprimieren. Beide Zelllinien zeigen stark strukturierte Aktingerüste. Die Zelllinie U-87 zeigt eine granulierte Oct4-Expression gleichwertiger Intensität in allen Zellen der Kultur. Morphologisch unterscheidet sich die U-87 Zellkultur deutlich von den AKH-Zelllinien. U-87 zeigt keine filamentös auslaufenden Strukturen wie sie beispielsweise in Abbildung 9 bei AKH-17.

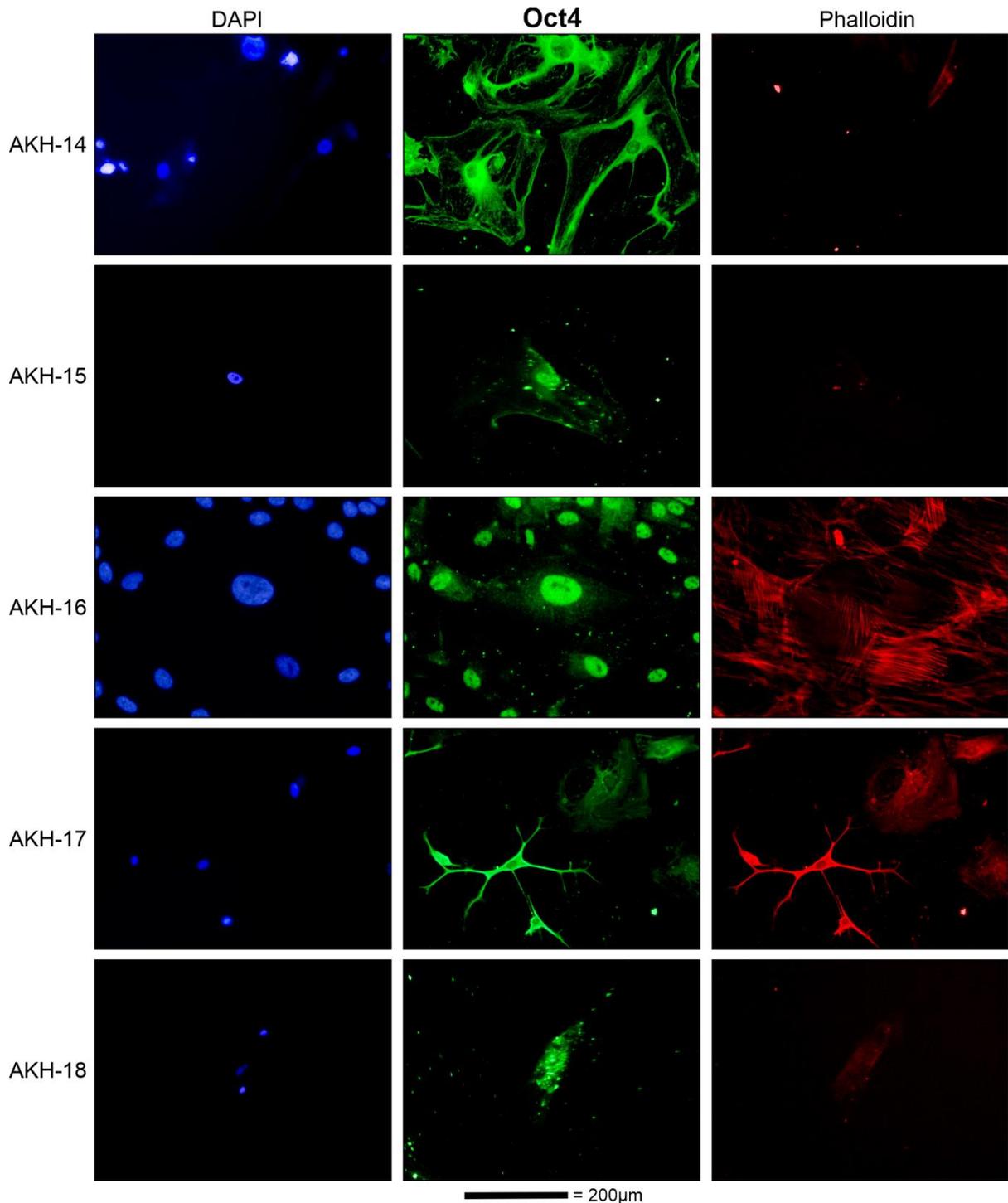


Abb. 9 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Oct4 der AKH-Zelllinien
 Oct4-Expression in den AKH-Zelllinien 14 - 18. Die Resektionen der Proben, aus denen die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Oct4-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

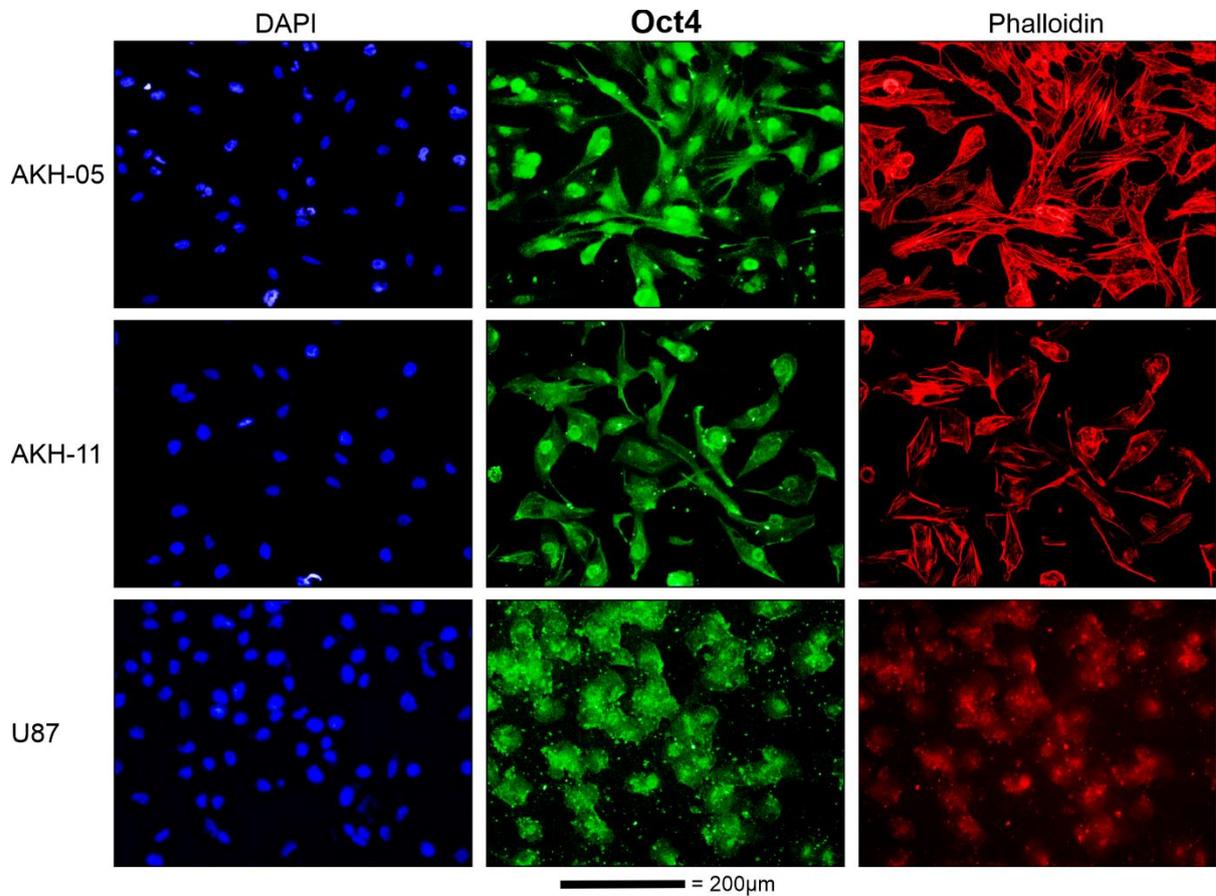


Abb. 10 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Oct4 in AKH-5/11 und U-87
 Oct4-Expression in den Zelllinien AKH-5/11, sowie in der Zelllinie U-87. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Oct4-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

3.4 Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Sox2

Die Zelllinien U-87, AKH-5/11 und AKH-14 bis AKH-18 wurden mit dem Maus monoklonalen Sox2-spezifischen IgG-Antikörper (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) markiert und ebenfalls mit dem Fluorophor konjugierten anti-Maus Antikörper (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) gefärbt. Die gezeigten Bilder der Linie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 und AKH-17 nach 7 Tagen Wachstum und die Bilder der Zelllinie AKH-14, AKH-15 und AKH-18 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5 und AKH-11 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Ergebnisse der Immunfärbungen in Abbildung 11 zeigen eine Expression von Sox2 in allen Zellen der AKH-14 bis AKH-18 Zellkulturen. In der AKH-14 Kultur zeigen sich sehr verschiedene Zellmorphologien, von großen raumgreifenden Zellen mit großen Zellkörpern ohne Zellfortsätze, über große Zellen mit sternförmig auslaufenden Zellfortsätzen bis hin zu kleinen Zellkörpern mit langen Zellfortsätzen. Die Phalloidin-färbung der großen Zelltypen in der AKH-14-Kultur zeigt in Abbildung 11 eine in Relation zu den kleinen Zellen deutlich geringere Fluoreszenzsignalstärke. Die bei AKH-15 gezeigte Zelle zeigt keine Phalloidin-Positivität. Die Sox2-Expression zeigt sich vereinzelt und granulär insbesondere um den Zellkern, ohne die vollständige Zellstruktur zu zeigen. Die Zelllinie AKH-16 in Abbildung 11 zeigt mittig eine sehr großflächige Zelle bei gleichzeitig sehr schwacher Phalloidin-färbung, welche jedoch eine starke und besonders um den Zellkern granuläre Sox2-Verteilung zeigt. Die Zelllinie AKH-17 weist eine Zellmorphologie, welche den strahlenförmigen Astrozyten sehr ähnlich ist, mit einer ubiquitären Sox2-Expression in allen filamentösen Ausläufern, auf. Zudem zeigt diese Zelle keine Phalloidin-Positivität. Bei der Zelllinie AKH-18 zeigen alle Zellen eine Sox2-Expression, mit einer hohen granulären Expressionsstärke im Zellkörper lokalisiert und geringer Expression in den Zellfortsätzen.

Auch die Zelllinien AKH-5 und AKH-11, sowie die Laborzelllinie U-87, zeigen in Abbildung 12 omnipräsente Sox2-Expression in allen Zellen der Kultur, mit einem morphologisch gleichartigen Erscheinungsbild der Zellkulturen AKH-5 und AKH-11, welche eine hohe Konfluenz aufweisen und oval gestreckte Zelltypen ohne Filamente zeigen. Die Zellen der Linie U-87 hingegen zeigen eine sehr sphärische Morphologie bei gleichmäßiger Sox2-Expression. Alle drei Zellkulturen waren positiv für Aktin.

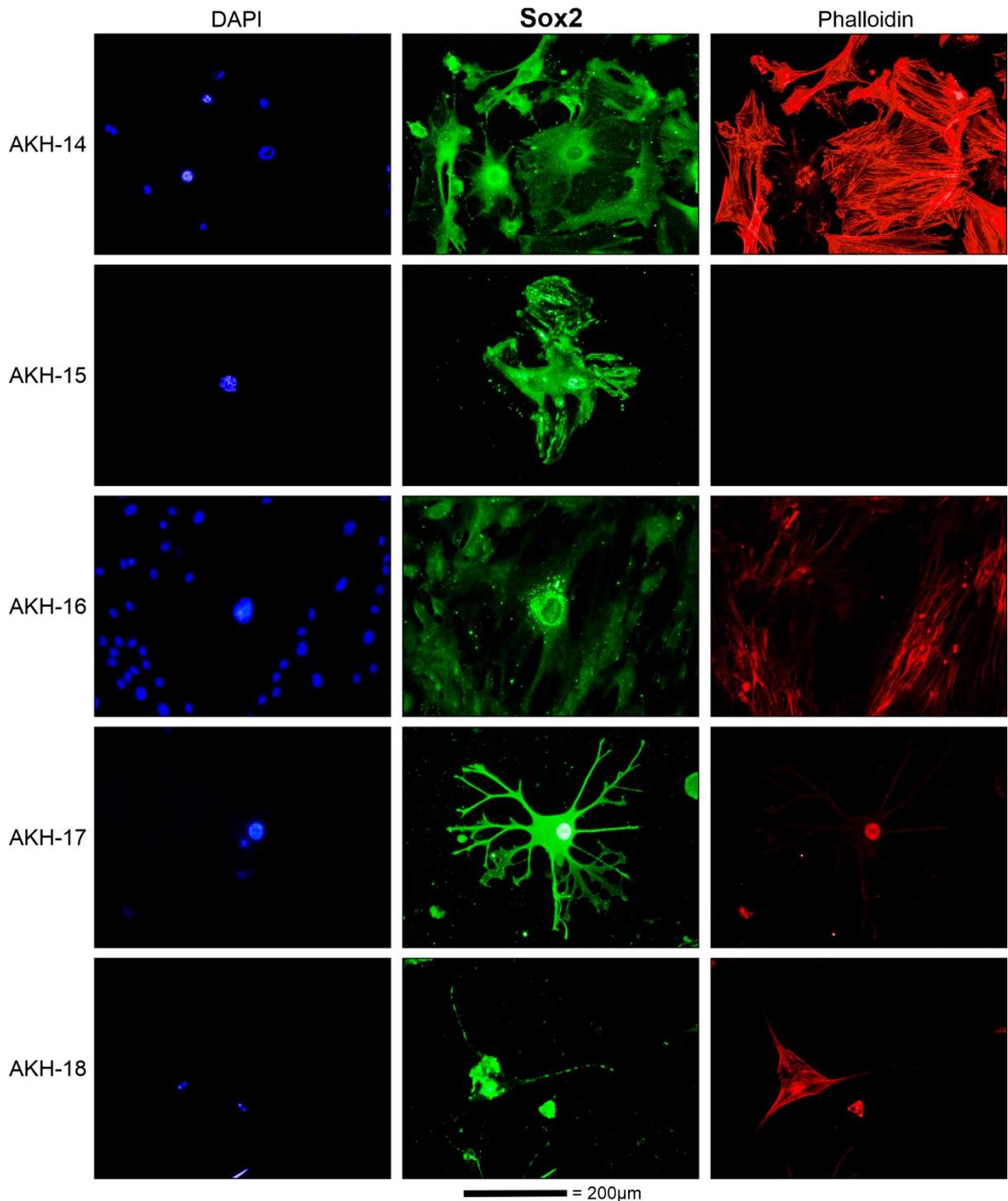


Abb. 11 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Sox2 der AKH-Zelllinien
 Sox2-Expression in den AKH-Zelllinien 14 - 18. Die Resektionen der Proben, aus denen die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Sox2-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

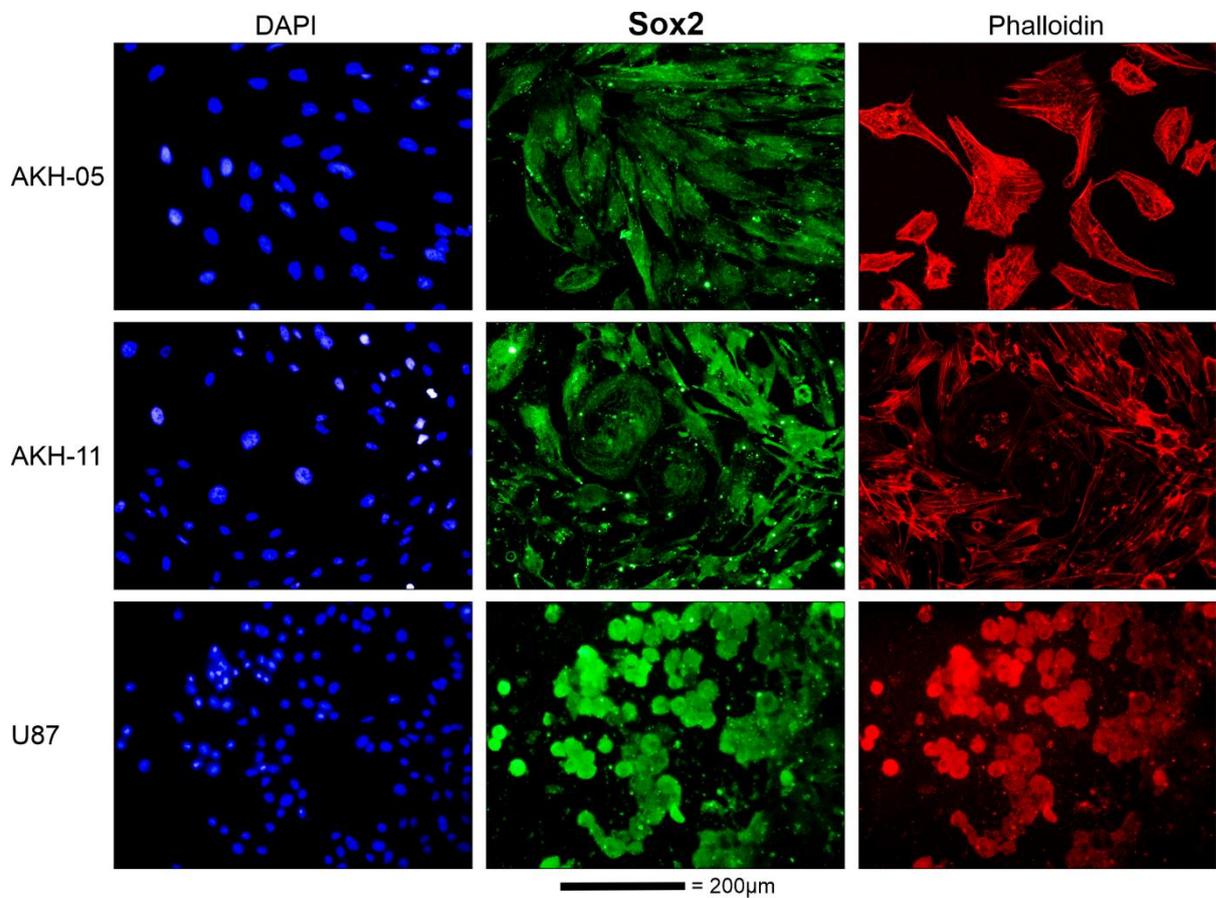


Abb. 12 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Sox2 in AKH-5/11 und U-87
 Sox2-Expression in den Zelllinien AKH-5/11, sowie in der Zelllinie U-87. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Sox2-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

3.5 Immunhistologischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Nanog

Die Zelllinien U-87, AKH-5/11 und AKH-14 bis AKH-18 wurden mit dem Maus monoklonalen Nanog-spezifischen IgG-Antikörper (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) markiert und mit dem Fluorophor konjugierten anti-Maus Antikörper (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) gefärbt. Die Bilder der Linie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 und AKH-17 nach 7 Tagen Wachstum und die Bilder der Zelllinie AKH-15 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5, AKH-11 AKH-18 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzdetektion in Abbildung 13 zeigen sehr unterschiedliche Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors Nanog. In der AKH-14 Zellkultur konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Fluoreszenz für Nanog nachgewiesen werden, sodass in Abbildung 13 der zur Verfügung gestellte Nachweis von JPF gezeigt wird. Die in Abbildung 13 der Zelllinie AKH-15 gezeigte Nanog-spezifische Färbung zeigt eine vereinzelte granuläre Nanog-Expression, mit höchster Intensität am Zellkern und vereinzelter vesikulärer Ausprägung im Zellkörper nah am Zellkern. Durch die positive Phalloidin färbung der gezeigten Zelle lässt sich erkennen, dass der Zellkörper in Relation zu dem Nanog exprimierenden Bereich deutlich größer ist und sich die Expression auf den inneren Zellkörper beschränkt. Die in Abbildung 13 gezeigte AKH-16 Zellkultur zeigt eine hohe Konfluenz mit Nanog-Expression an den Zellkernen und eine mitotische Zelle, die sich wahrscheinlich im Übergang von der Telophase in die Interphase befindet, mit erhöhter Nanog-Expression um die beiden gebildeten Zellkerne. Das Aktingerüst zeigt sich, außer in der mitotischen Zelle, gleichmäßig stark verteilt in der allgemeinen Zellkonfluenz. Die gezeigten Zellen der Linie AKH-17 in Abbildung 13 zeigen eine vesikuläre Fluoreszenz um drei der Zellkerne. Dieses Ergebnis ist jedoch bei den links und mittig lokalisierten Zellkernen kritisch zu betrachten, da die Phalloidin färbung dort auch eine gleichartige Farbstruktur und Intensität zeigt. Lediglich die drei zusammenliegenden fluoreszierenden Vesikel, auf der rechten Seite des Bildes der Zelllinie der AKH-17, können als positives Ergebnis betrachtet werden. In AKH-18 in Abbildung 13 zeigen zwei der drei abgebildeten Zellen granuläre Nanog-Expression mit einem Aktingerüst, das sich in unterschiedlicher Ausprägung über alle drei Zellen erstreckt.

Die Zelllinien AKH-5 und AKH-11 in Abbildung 14 zeigen eine Nanog-Positivität in einer Teilmenge der abgebildeten Zellen, die sich granulär und in unterschiedlicher Intensität zeigt. Das Aktingerüst beider Zelllinien ist ausgeprägt und strukturiert. In der Laborzelllinie U-87 zeigt sich eine Nanog-Expression in fast allen vorliegenden Zellen, sowie eine Phalloidin färbung in einem Großteil der Zellen, die jedoch keine Aktin-typische Strukturierung zeigen.

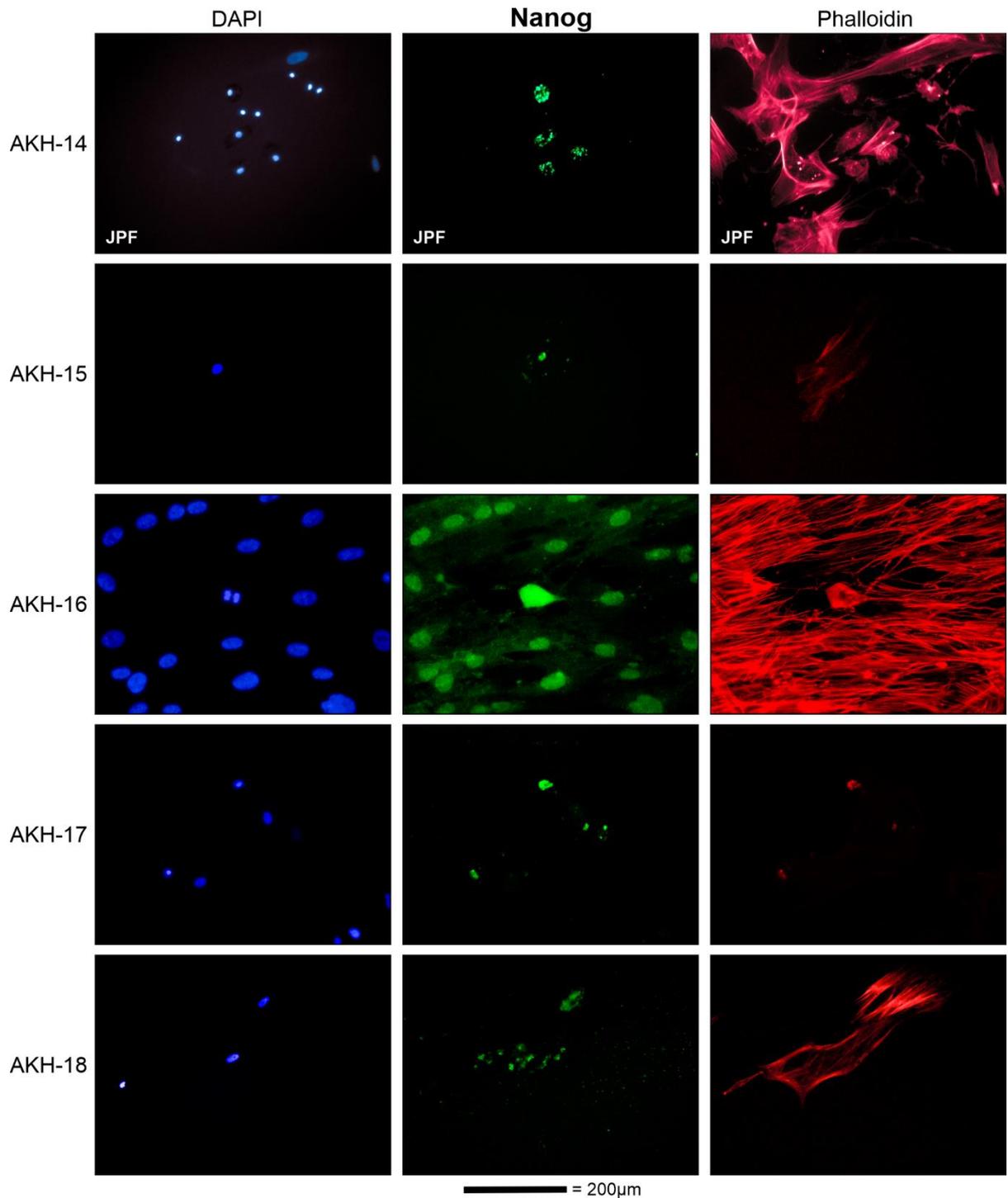


Abb. 13 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Nanog der AKH-Zelllinien
 Nanog-Expression in den AKH-Zelllinien 14 - 18. Die Resektionen der Proben, aus denen die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Nanog-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

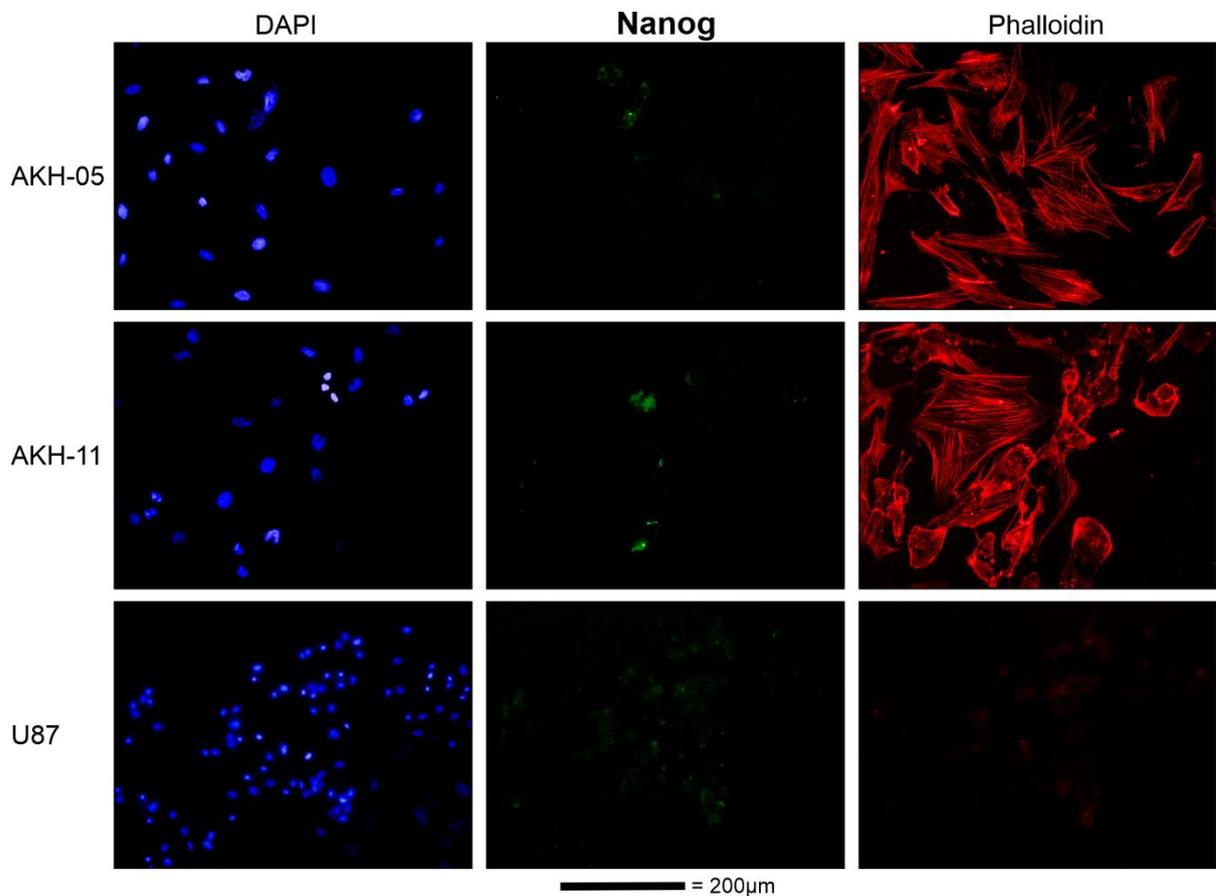


Abb. 14 Immunfärbung des Transkriptionsfaktors Nanog in AKH-5/11 und U-87
 Nanog-Expression in den Zelllinien AKH-5/11, sowie in der Zelllinie U-87. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Nanog-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörper unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

3.6 Immunhistologischer Nachweis des Intermediärfilaments Nestin

Die Zelllinien U-87, AKH-5/11 und AKH-14-18 wurden wie beschrieben kultiviert und mit dem Maus monoklonalen Nestin-spezifischen IgG-Antikörper (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) markiert und mit dem Fluorophor konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) gefärbt. Da die verschiedenen Zelllinien ein sehr unterschiedliches Wachstum zeigten, wurden die in Abbildung 15 und Abbildung 16 gezeigten Immunfluoreszenzbilder an verschiedenen Tagen der Kultivierung aufgenommen. Die gezeigten Bilder der Linie U-87 wurden nach 3 Tagen Wachstum, die der Zelllinien AKH-16 nach 10 Tagen Wachstum aufgenommen. Die Zelllinien AKH-5, AKH-11, AKH-15, AKH-17 und AKH-18 wurden nach 14 Tagen Wachstum mikroskopiert.

Die Ergebnisse der Detektion in Abbildung 15 zeigen ein sehr unterschiedliches Vorkommen des Intermediärfilaments Nestin in den einzelnen Zellkulturen. Bei der Zelllinie AKH-14 konnte in keiner der Kultivierungen innerhalb von 14 Tagen Wachstumszeit Nestin detektiert werden, sodass für diese Zelllinie in Abbildung 16 der Nachweis von JPF gezeigt wird. Die Zelllinie AKH-15 zeigt in Abbildung 16 eine Nestin-positive Zelle mit zwei langen Zellfortsätzen, welche, in Relation zum Zellkörper, Nestin sehr ausgeprägt ausgebildet haben, ohne die Ausbildung eines Aktingerüsts. Bei der AKH-16 Zellkultur zeigt sich eine allgemein hohe Zellkonfluenz kleiner Zellen, zwischen denen sich zwei deutlich größere Zellen befinden, von denen sich lediglich die linke als Nestin-positiv mit feinen Nestin-Filamenten herausstellt. Die sichtbare vesikuläre Fluoreszenz in der rechten Zelle ist hierbei ein falsch-positives Ergebnis, da sich auch die Phalloidin-Färbung an dieser Stelle intensiv vesikulär zeigt und davon auszugehen ist, dass sich beide Fluoreszenzstoffe in einer Gewebeansammlung angereichert haben. Die großen Zellen haben eine deutlich weniger ausgeprägte Aktinstruktur als die restliche Zellkultur. Die Zelllinie AKH-17 in Abbildung 15 zeigt eine Nestin-positive Zelle mit vielen ebenfalls stark Nestin-positiven Filamenten, die sich in alle Richtungen ausbreiten. Zudem weist sie zwei Zellkerne auf, die wahrscheinlich auf eine kurz zuvor durchlaufene Mitose zurückzuführen sind. Des Weiteren ragen die Filamente einer weiteren Nestin-positiven Zelle in Richtung der anderen Ausläufer. Außerdem sind weitere Nestin-negative Zellen vorhanden. Keine der Zellen zeigt Phalloidin-Positivität. Die Zelllinie AKH-18 in Abbildung 15 zeigt, ähnlich wie AKH-17, eine Nestin-positive Zelle mit langen ebenfalls positiven Filamenten, jedoch hat diese Zelle keine ausgebildete Aktinstruktur. Zwei weitere Zellen sind an den Zellkernen zu erkennen, die beide Nestin-negativ sind. Hier weist nur eine der Nestin-negativen Zellen Aktin auf.

Die Zelllinie AKH-5 in Abbildung 16 zeigt Nestin-Positivität in der gesamten Zellkultur bei sehr unterschiedlichen Zellmorphologien und -größen. Eine besonders starke Intensität des Signals zeigt sich vereinzelt um die Zellkerne, jedoch sieht man klar die filamentöse Struktur, die Nestin in den Zellen ausgebildet hat. Das Aktingerüst der Zellen der Zelllinie AKH-5 zeigt sich sehr ausgeprägt, mit einer gegensätzlichen Verteilungsintensität von Aktin und Nestin. Auch in den Zellen der Zelllinie AKH-11 in Abbildung 16 erscheinen alle gezeigten Zellen Nestin-positiv bei jeweils unterschiedlicher Signalintensität. Auch die zwei nur schlecht ersichtlichen Zellen unten rechts im Bild sind schwach Nestin-positiv, was sich jedoch nur mit einer Helligkeitserhöhung feststellen lässt, die das Bild am oberen linken Rand überblenden würde. Dies ist auf die Nähe zum Rand der 96-Well-Platten zurückzuführen, an welchem die Detektion erfolgt ist, sowie durch die Lichtstreuung, die zur Überblendung führt. Die Zellen der AKH-11 Kultur weisen alle eine Phalloidin-Positivität auf. Die Laborzelllinie U-87 zeigt ebenfalls eine Nestin-Positivität in allen Zellen der Kultur, bei gleichzeitig sehr schwacher und unstrukturierter Phalloidinfärbung.

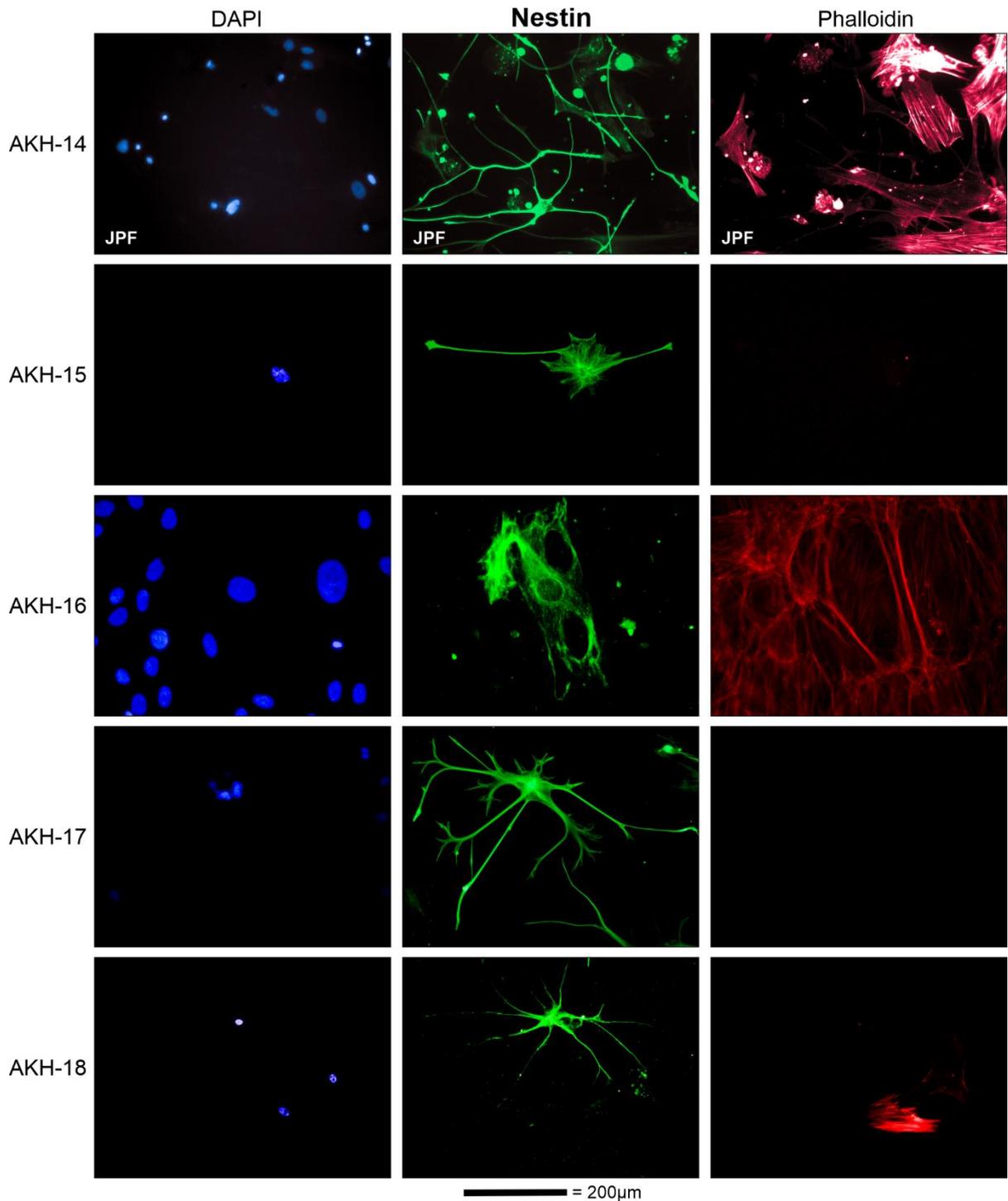


Abb. 15 Immunfärbung des Intermediärfilaments Nestin der AKH-Zelllinien

Die Resektionen der Proben, aus denen die Zelllinien kultiviert wurden, sind direkt an der Subventrikulären Zone erfolgt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Nestin-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten Anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht. JPF = Bilder von Jan Patrick Formanski.

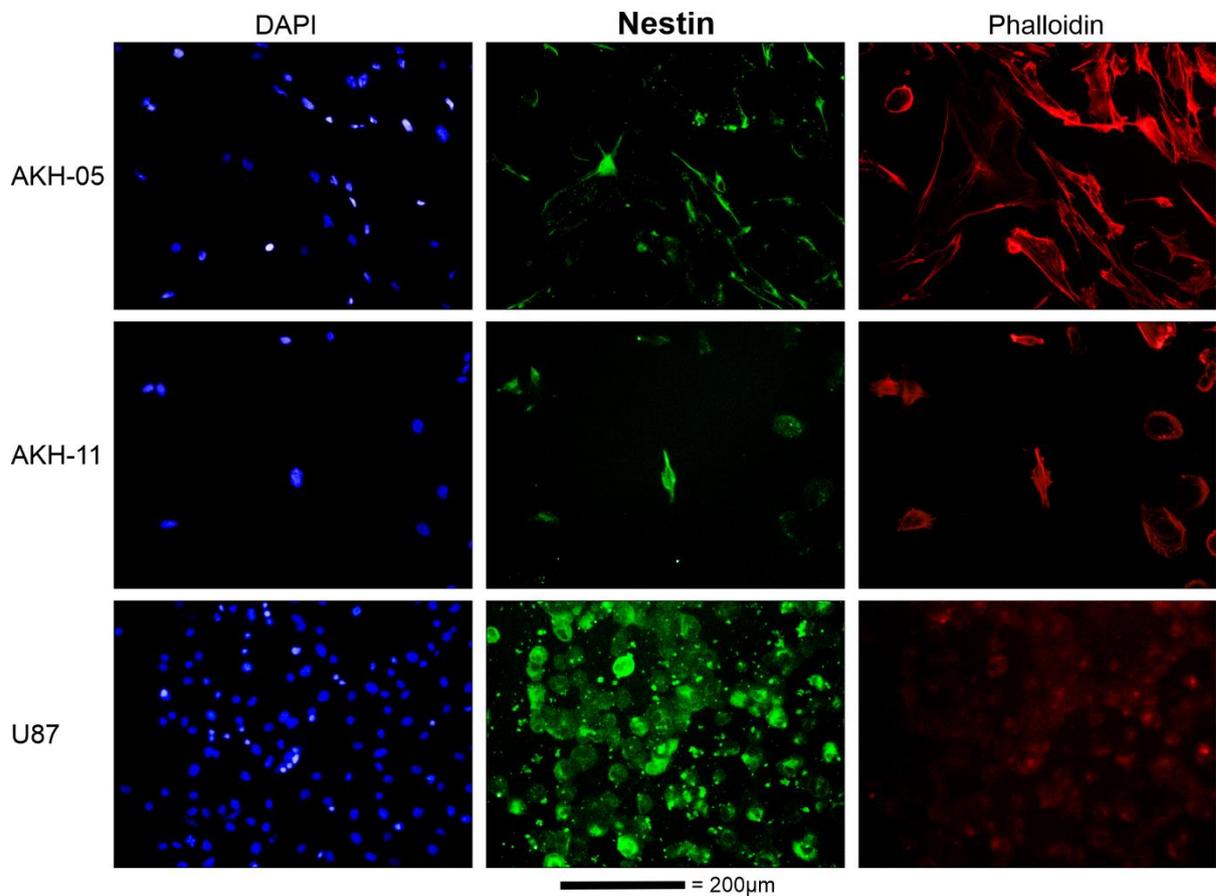


Abb. 16 Immunfärbung des Intermediärfilaments Nestin in AKH-5/11 und U-87
 Nestin-Expression in den Zelllinien AKH-5/11, sowie in der Zelllinie U-87. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt, Cell+) kultiviert, mit Formalin fixiert und mit Triton permeabilisiert. Der gebundene monoklonale Nestin-spezifische IgG-Antikörper wurde durch die Bindung des Alexa Fluor® 488 (Grün) konjugierten anti-Maus Antikörpers unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Das zytoplasmatische Aktin wurde mittels Phalloidin (Rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Blau) sichtbar gemacht.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Zellkulturlinien, die aus zwei verschiedenen Tumorregionen kultiviert worden waren, auf vier verschiedene Stammzellmarker und zwei Zikavirus-Rezeptoren untersucht und die unterschiedlichen Eigenschaften, die mit der Entnahmeregion und dem zeitlichen Aspekt der Kultivierung einhergehen, herausgestellt.

Der zeitliche Aspekt lässt sich anhand der Untersuchungen mit der Zelllinie AKH-14, welche in Abbildung 13 und Abbildung 15 dargestellt sind, verdeutlichen. Für das Intermediärfilament Nestin und den Transkriptionsfaktor Nanog konnte im Rahmen dieser Arbeit kein positiver Nachweis erbracht werden. Die gezeigten Bilder der Zelllinie in diesen zwei Abbildungen sind freundlicherweise von einem Arbeitskollegen zur Verfügung gestellt worden. Dieser konnte ein halbes Jahr zuvor einen positiven Nachweis für beide Marker erbringen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Genau in dieser zeitlichen Veränderung der Kultur zeigt sich ein wichtiger Aspekt. Der Tumor, aus dem die Zellkultur entstanden ist, wurde im November 2022 resektioniert und direkt in Kultur überführt. Der positive Nachweis auf Nanog und Nestin wurde im Dezember 2022 erbracht. Im Juni 2023 konnte trotz mehrfacher Versuchsdurchführung zu verschiedenen Wachstumszeiten kein positiver Nachweis mehr erbracht werden. Dieser Umstand betont die dynamische zeitliche Entwicklung dieser GBM-Zellkulturen, sowie die Notwendigkeit Experimente zum Nachweis von Stammzellmarkern möglichst unmittelbar nach der Anzüchtung der Tumorzellen durchzuführen. Damit soll erreicht werden, dass die experimentellen Befunde die *in vivo* Situation am besten beschreiben.

Die unterschiedliche Bedeutsamkeit der beiden nachgewiesenen Rezeptoren für die Infektion mit dem Zikavirus von normalem und malignem Gewebe ist beachtenswert. Das Zikavirus infiziert in gesunden Geweben diverse Zelltypen und weist eine Rezeptor-Redundanz auf, das heißt, die Virusvermehrung kann durch eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren moduliert und ermöglicht werden. Diese Redundanz konnte bei Mäusen mit TAM-Rezeptor *knockout* Mutanten und in humanen neuronalen Vorläuferzellen (*human neuronal precursor cells*, NPCs) durch die Antikörperblockade des Axl-Rezeptors gezeigt werden. Dabei zeigten Axl *-/-* Mäuse bei einer Infektion mit ZIKV keinen signifikanten Rückgang der Infektionsraten. Die Virusmengen waren in Axl *+/+* und Axl *-/-* Mäusen identisch ⁵⁹. In der Gliomzelllinie U-87 hingegen konnte gezeigt werden, dass durch ein Axl Knockout über die CRISPR Interferenz die Infektionsraten dieser Zelllinie signifikant sanken, welches die These unterstützte, dass die Zikavirus-Infektion in Gliomzellen Axl-abhängig ist ⁶⁰. Dies gilt auch für den ZIKV-Rezeptor Integrin $\alpha\beta 5$, durch die Rezeptor-Redundanz ist er zur Infektion gesunder Zellen nicht

zwingend erforderlich, im Gliomkontext konnte jedoch gezeigt werden, dass das Zikavirus bevorzugt Integrin $\alpha\beta 5$ exprimierende GSCs infiziert ³¹. Dies bedeutet, dass beide ZIKV-Rezeptoren eine wichtige Rolle für den Viruseintritt spielen und dass diese Rezeptoren gerade bei Tumorzellen und im Besonderen bei GSCs vermehrt exprimiert werden.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien konnten für AKH-14 und AKH-16 schon in vorausgegangenen Experimenten Infektionen mit pseudotypisierten ZIKV-HIV-Viren realisiert werden. Dies unterstützt beschriebene Ergebnisse der Literatur, da in beiden Zelllinien die Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$ exprimiert werden. Bei den bisher möglichen Infektionsraten zeigen die Zellkulturlinien jedoch ein unterschiedliches Verhalten, wobei in AKH-16 deutlich geringere Infektionsraten als in AKH-14 erreicht werden konnten. Dieses deutet zusammen daraufhin, dass zusätzlich Determinanten existieren, die eine maßgebliche Rolle während des Infektionsprozesses von neuronalen Tumorzellen spielen. In diesem Zusammenhang konnten aus den vorliegenden Ergebnissen Erkenntnisse gewonnen werden, deren experimentelle Vertiefung angezeigt ist. In der Zelllinie AKH-16 ist eine signifikant höhere Anzahl stark vergrößerter Zellen wie zum Beispiel in Abbildung 5 und in Abbildung 11 gezeigt festzustellen, welche nur sehr geringe bis gar keine Aktin Expression aufweisen. Viren sind obligate Parasiten, welche in allen Phasen ihres Lebenszyklus vom Eintritt, über die Replikation, bis zum Austritt von einer Beteiligung des ausgebildeten Aktingerüst abhängig sind ³¹. In Verbindung mit den niedrigen Infektionsraten bei der Zelllinie AKH-16 ist es denkbar, dass das vermehrte Auftreten Aktin negativer Zellen die Virusinfektion beeinflusst.

Interessanterweise zeigt sich in Abbildung 11 bei der Zelllinie AKH-14 eine im Vergleich zur allgemeinen Konfluenz stark vergrößerte Zelle, welche hingegen der allgemeinen Beobachtungen ein gut ausgebildetes Aktingerüst aufzeigt. Eine beginnende Adaption des Aktingerüsts der vereinzelt vorkommenden großen Zellen der Kultur AKH-14, welche die Infektion dieser Zelllinie möglicherweise positiv unterstützt, ist denkbar. Bei der Unterscheidung zwischen den Aktinausbildungen ist insbesondere auch die Zelllinie AKH-18 zu nennen, die in Abbildung 5 filamentös auslaufende Zellen zeigt, die einen Aktin-positiven Zellkörper und Aktin-negative Filamente haben.

Ein signifikanter Unterschied in den Zellkulturen zeigt sich in Abhängigkeit der Tumorentnahmeregion bei der Operation. Die Zelllinien AKH-14 bis AKH-18 wurden wie bereits beschrieben, unter Einbezug der SVZ entnommen und kultiviert, die Zelllinien AKH-5 und AKH-11 hingegen abseits der SVZ. Die AKH-14 bis AKH-18 zeigen sich morphologisch in ihren stammzellspezifischen Markerfärbungen und auch in ihren Aktinstrukturen, wenn sie vorhanden sind, sehr heterogen. Hier ist insbesondere die Zelllinie AKH-17 hervorzuheben,

welche besonders heterogene Morphologien aufzeigt, wie es in Abbildung 9 dargestellt ist. Dort sind Zellen gezeigt, die alle einen positiven Nachweis für Sox2 zeigen, jedoch in sehr unterschiedlicher Ausprägung. Drei Zellen mit langen Filopodien, die zueinander hinwachsen, sind direkt neben zwei Zellen mit sehr großen Zellkörpern, die komplett ohne Zellfortsätze. Diese verschiedenen Zelltypen repetieren sich Zelllinienabhängig in ähnlicher Häufigkeit.

Ein weiterer wichtiger Unterschied der Zellkultivierungen sind die häufig vorkommenden astrozytären Formen, welche unter Einbezug der SVZ in allen Zelllinien in verschiedenen phänotypischen Ausprägungen zu finden sind. Diese sieht man beispielsweise in Abbildung 5 bei AKH-15 ohne einen Nachweis auf Aktin, bei AKH-17 in Abbildung 5 hingegen mit einem Nachweis auf Aktin, jedoch ohne die übliche Aktinstrukturierung. Astrozyten bilden in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung eine ganze Reihe verschiedener intermediären Elemente des Zytoskeletts aus. Das legt die Vermutung nahe, dass sich die Zellen eindeutig astrozytärer Form in Entwicklungsstadien befinden, in denen sie vorwiegend Intermediate wie Vimentin, GFAP oder Nestin benötigen und das Aktin somit unter der Nachweisgrenze liegt ⁶¹. In Abbildung 15 lässt sich diese These bei Betrachtung der Zelllinien AKH-15, AKH-17 und AKH-18 unterstützen. Alle abgebildeten Astrozyten weisen kein nachweisbares Aktin auf, sie sind jedoch alle stark positiv für Nestin. In AKH-18 derselben Abbildung zeigt es sich besonders deutlich, insbesondere durch die stark Nestin-positive Zelle, die überhaupt kein Aktin zeigt, welche neben einer Nestin-negativen Zelle lokalisiert ist, die jedoch eine sehr ausgeprägte Aktinstruktur zeigt.

Die Zelllinien AKH-5 und AKH-11 hingegen zeigen sich in ihren Aktinstrukturen und Markerfärbungen sehr homogen. Sie zeigen nicht die beschriebenen astrozytären Formen und auch keine besonderen Unterschiede zwischen Markernachweis und Aktinstrukturen.

Die jüngsten Forschungsergebnisse gehen davon aus, dass an der SVZ lokalisierte Stammzellen den Tumor initiieren und sein aggressives und behandlungsresistentes Verhalten stützen ¹⁰. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich bei der Kultivierung des zentralen Tumorgewebes diese tumortreibenden Stammzellen in AKH-5 und AKH-11 nicht befunden haben und die neue Probengewinnung unter Einbezug der SVZ den entscheidenden Unterschied macht. Um ein onkolytisches Virus zu entwickeln, welches tumoriinitierende Zellen, zum Beispiel die GSCs, selektiv infiziert, ist es daher auch wichtig, dessen Eigenschaften an den entscheidenden Zellen zu testen. Die Ergebnisse unterstreichen die Heterogenität des Glioblastoma Multiformes und die allgemeine Notwendigkeit der Forschung an *in vivo* nahen Proben unter Einbeziehung der SVZ in Zellkulturlinien, sowie einer begrenzten Zeit der Kultivierung, um die charakteristischen Eigenschaften zu erhalten.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Tumorzellen, welche aus Gewebeproben von Glioblastoma Multiforme Grad IV Tumoren stammen, untersucht. Es sollten mittels der Immunfärbung die beiden potenziellen Rezeptoren Axl und Integrin $\alpha\beta 5$ für das Zikavirus und die vier Stammzellmarker Oct4, Sox2, Nanog und Nestin nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen standen zwei GBM-Kulturen, AKH-5 und AKH-11, die aus zentralem Tumorgewebe gewonnen waren, zur Verfügung. Zusätzlich standen fünf GBM-Kulturen zur Verfügung, AKH14-18, welche aus der Region des Tumors stammten, die an die subventrikuläre Zone (SVZ) grenzt. Als Vergleich wurde die Laborzelllinie U-87 verwendet die ebenfalls aus der zentralen Region eines solchen Tumors gewonnen worden war.

Mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern wurden die Zellen gefärbt und gebundene primäre Antikörper mit Hilfe eines sekundären Alexa 488 konjugierten Antikörpers detektiert. Die Proben wurden zusätzlich mit DAPI und Phalloidin gefärbt, um den Zellkern und die Aktin-Strukturen der Zellen sichtbar zu machen. Zur Detektion der Zellfärbungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit drei verschiedenen Anregungsfiltern genutzt.

In Tumorproben aus der SVZ zeigten sich verschiedene Zelltypen der Tumoren, die in den AKH-5 und AKH-11 Kulturen nicht nachweisbar waren. Dazu zählten vor allem ausgeprägte Formen von Astrozyten. Diese Zellen waren zum Teil positiv für Oct4, Sox2 und Nestin, zeigten in den meisten Fällen keine der sonst üblichen Aktin-Strukturen.

Ein wichtiger Unterschied war, dass in den fünf SVZ Tumorzell-Kulturen (AKH-14-18) Zellen nachgewiesen werden konnten, die positiv für Stammzellmarker waren und häufig negativ für Aktin, was sie von der allgemeinen Konfluenz unterschied. Diese Zellen sollten zukünftig noch weiter auf ihre mögliche Identität als tumortreibende Stammzellen charakterisiert werden und um ihren Einfluss auf die Permissivität des Zikavirus zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Tan, A. C. *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin* **70**, 299–312 (2020).
2. Deutsche Hirntumorhilfe e.V.: Aktuelle Version der WHO-Klassifikation 2016. <https://www.hirntumorhilfe.de/hirntumor/klassifikation/who/>.
3. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development* vol. 21 2683–2710 Preprint at <https://doi.org/10.1101/gad.1596707> (2007).
4. Altaner, C. *Glioblastoma and stem cells Minireview*. 369 *NEOPLASMA* vol. 55 (2008).
5. Dey, M., Ulasov, I. V., Tyler, M. A., Sonabend, A. M. & Lesniak, M. S. Cancer Stem Cells: The Final Frontier for Glioma Virotherapy. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 7 119–129 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9132-7> (2011).
6. Schmitz, M. *et al.* Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer* **96**, 1293–1301 (2007).
7. Denysenko, T. *et al.* Glioblastoma cancer stem cells: Heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochemistry and Function* vol. 28 343–351 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cbf.1666> (2010).
8. Delgado-López, P. D. & Corrales-García, E. M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clinical and Translational Oncology* vol. 18 1062–1071 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x> (2016).
9. Beiriger, J. *et al.* The Subventricular Zone in Glioblastoma: Genesis, Maintenance, and Modeling. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.790976> (2022).
10. Lee, J. H. *et al.* Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* **560**, 243–247 (2018).
11. Category:MRI of glioblastoma - Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:MRI_of_glioblastoma.
12. Wechsler-Reya, R. & Scott, M. P. *THE DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF BRAIN TUMORS*. www.annualreviews.org (2001).
13. Verkhratsky, A., Nedergaard, M. & Hertz, L. Why are Astrocytes Important? *Neurochemical Research* vol. 40 389–401 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1403-2> (2015).
14. Hasel, P. & Liddelow, S. A. Astrocytes. *Current Biology* **31**, R326–R327 (2021).

15. Marie, C. *et al.* Oligodendrocyte precursor survival and differentiation requires chromatin remodeling by Chd7 and Chd8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E8246–E8255 (2018).
16. Shapiro, J. R. & Shapiro, W. R. *The subpopulations and isolated cell types of freshly resected high grade human gliomas: Their influence on the tumor's evolution in vivo and behavior and therapy in vitro.* *Cancer and Metastasis Reviews* vol. 4 (1985).
17. Altaner, C. *Cancer stem cells [J] Molecular diagnostics of MEN2 View project Pro-drug gene therapy for cancer mediated by mesenchymal stem/stromal cells and by their exosomes View project.* <https://www.researchgate.net/publication/7483126> (2005).
18. Kang, M. K. & Kang, S. K. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev* **16**, 837–847 (2007).
19. Mohiuddin, I. S., Wei, S. J. & Kang, M. H. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1866 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005> (2020).
20. Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *Journal of Infectious Diseases* vol. 216 S935–S944 Preprint at <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515> (2017).
21. Agrelli, A., de Moura, R. R., Crovella, S. & Brandão, L. A. C. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 69 22–29 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018> (2019).
22. Linger, R. M. A., Keating, A. K., Earp, H. S. & Graham, D. K. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Advances in Cancer Research* vol. 100 35–83 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00002-X) (2008).
23. Zhang, G., Wang, M., Zhao, H. & Cui, W. Function of axl receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer (Review). *Oncology Letters* vol. 15 2726–2734 Preprint at <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7694> (2018).
24. Lemke, G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).
25. Auyez, A., Sayan, A. E., Kriajevska, M. & Tulchinsky, E. Axl receptor in cancer metastasis and drug resistance: when normal functions go askew. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13194864> (2021).
26. Zwernik, S. D. *et al.* AXL receptor is required for Zika virus strain MR-766 infection in human glioblastoma cell lines. *Mol Ther Oncolytics* **23**, 447–457 (2021).

27. Integrine - Lexikon der Neurowissenschaft. <https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/integrine/6136>.
28. Smiths, J. W., Vestals, D. J., Irwin, S. V, Burke, T. A. & Cheresch, D. A. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Purification and Functional Characterization of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ AN ADHESION RECEPTOR FOR VITRONECTIN**. vol. 265 (1990).
29. Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K., Pasierbinska, M. & Kaminska, B. Integrin signaling in glioma pathogenesis: From biology to therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21030888> (2020).
30. Ashcroft, F. M., Rorsman, P. & Fonseca, F. M. NEWS AND VIEWS for new avenues of research, including potential novel therapies for diabetes. Unanchoring integrins in focal adhesions. *Nat Cell Biol* **14**, 40604 (2012).
31. Zhu, Z. *et al.* Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Axis. *Stem Cell* **26**, 187-204.e10 (2020).
32. Comas, S. *et al.* Influence of glioblastoma contact with the subventricular zone on survival and recurrence patterns. *Clinical and Translational Oncology* **23**, 554–564 (2021).
33. Latchman, D. S. *POU Family Transcription Factors in the Nervous System. J. Cell. Physiol* vol. 179 (1999).
34. Zhao, F.-Q. *Octamer-binding transcription factors: genomics and functions. Frontiers in Bioscience* vol. 18 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids= (2013).
35. POU-Domäne - Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/pou-domaene/53375>.
36. Jin Pan, G., Chang, Z. Y., Sch, H. R. & Pei, D. *Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. Cell Research* vol. 12 <http://www.cell-research.com> (2002).
37. Du, Z. *et al.* Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* **57**, 724–733 (2009).
38. Wang, Y. J. & Herlyn, M. The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **309**, C709–C718 (2015).
39. Novak, D. *et al.* SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* vol. 67 74–82 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007> (2020).

40. Nichols, J. *et al.* Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4 cell types, including germ cells. The ICM and its successor the epiblast are highly regulative stem cell populations that can adjust to various perturbations including major alterations in cell number and cell position (Hogan *et al.*, 1994). The pool of stem cells remains pluripotent. *Cell* vol. 95 (1998).
41. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
42. Bradshaw, A. *et al.* Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg* **3**, (2016).
43. Weina, K. & Utikal, J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med* **3**, (2014).
44. HMG-Box-Domäne - Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/hmg-box-domaene/32110>.
45. Pevny, L. H. & Nicolis, S. K. Sox2 roles in neural stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 42 421–424 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.018> (2010).
46. Stevanovic, M., Lazic, A., Schwirtlich, M. & Stanisavljevic Ninkovic, D. The Role of SOX Transcription Factors in Ageing and Age-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24010851> (2023).
47. Drakulic, D. *et al.* The overexpression of SOX2 affects the migration of human teratocarcinoma cell line NT2/D1. *An Acad Bras Cienc* **87**, 389–405 (2015).
48. Alonso, M. M. *et al.* Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* **6**, (2011).
49. Mellai, M. & Valente, G. *SOX2 Expression and Amplification in Gliomas and Glioma Cell Lines*. <https://www.researchgate.net/publication/51075775> (2010).
50. Grubelnik, G., Boštjančič, E., Pavlič, A., Kos, M. & Zidar, N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Experimental Biology and Medicine* vol. 245 456–464 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1535370220905560> (2020).
51. Niu, C. S. *et al.* Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep* **26**, 593–601 (2011).
52. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947–956 (2005).

53. Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **9**, 625–635 (2007).
54. Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. G. *CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein*. vol. 60 (1990).
55. Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna & Nixon, R. A. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).
56. Gilyarov, A. V. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* **38**, 165–169 (2008).
57. Dahlstrand, J., Collins, V. P. & Lendahl, U. *Expression of the Class VI Intermediate Filament Nestin in Human Central Nervous System Tumors I*. *CANCER RESEARCH* vol. 52 <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/52/19/5334/2447904/cr0520195334.pdf> (1992).
58. Neradil, J. & Veselska, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* **106**, 803–811 (2015).
59. Hastings, A. K. *et al.* TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep* **19**, 558–568 (2017).
60. Retallack, H. *et al.* Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 14408–14413 (2016).
61. Potokar, M., Morita, M., Wiche, G. & Jorgačevski, J. The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells9071604> (2020).

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 14.08.2023

Name (Unterschrift)

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Ausarbeitung unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Dr. Michael Schreiber für die Aufnahme in seine Laborgruppe, die engagierte Betreuung und die Möglichkeit an dieser spannenden Thematik mitzuwirken, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und die Kontaktvermittlung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt den Arbeitskollegen in der Laborgruppe für die anregenden Gespräche, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt hier Jan Patrick Formanski für die Einführung in die Techniken der Zellkultivierung und Immunfluoreszenz.

Meine tiefste Verbundenheit gilt meiner Mutter, die mir dieses Studium ermöglicht und mich mit absolutem Selbstverständnis immer unterstützt hat. Meinen Großeltern, die mich auf diesem Weg stets ermutigt haben solange es ihnen möglich war, möchte ich von Herzen danken.

Abschließend möchte ich meinem Freund danken, der mir immer den Rücken freigehalten hat und Halt gab, wenn sich Herausforderungen auftaten.