

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie (Direktor Univ.-Prof. Dr. Henry W. S. Schroeder) und aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Direktor Univ.-Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov) der Universitätsmedizin Greifswald

Der Einfluss der Serin-Threonin-Kinase Pim1 auf das Stammzellverhalten von  
Glioblastomzellen

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)  
der Universitätsmedizin  
der  
Universität  
Greifswald  
2022

vorgelegt von:  
Carolin Seifert  
geb. am: 24.09.1988  
in: Mühlhausen/Thüringen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Henry W. S. Schroeder  
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz  
Tag der Disputation: 22.05.2023

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Das Glioblastom (GBM) .....	2
1.2 Diagnose und Therapie des GBM .....	5
1.3 Die Serin-Threonin-Kinase Pim1 .....	8
1.3.1 Expression und Struktur der onkogenen Kinase Pim1 .....	8
1.3.2 Regulation der Expression von Pim1 .....	10
1.3.3 Substrate und zelluläre Funktionen von Pim1 .....	10
1.4 Stammzellen und Tumorstammzellhypothese .....	15
1.4.1 Neurale Stammzellen, Stammzellmarker und stammzellähnliche Tumorzellen (CSLC)15	
1.5 Bedeutung von Pim1 im Stammzellgeschehen .....	18
1.6 Zielstellung dieser Arbeit .....	19
2 Material und Methoden .....	20
2.1 Material .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Geräte und Materialien.....	23
2.1.3 Medien.....	29
2.1.4 Zelllinien .....	29
2.1.5 Kits .....	30
2.1.6 Primer und Sonden ( <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Assay) .....	31
2.1.7 Antikörper .....	31
2.1.7.1 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen und Western Blots.....	31
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper für Western Blots .....	32
2.1.7.3 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen .....	32
2.1.8 Puffer und Lösungen .....	33
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Zellkultur .....	37
2.2.1.1 Anlegen einer Zellkultur .....	37
2.2.1.2 Passagierung von adhärenenten Zellen .....	37
2.2.1.3 Passagierung von Neurosphären .....	38
2.2.1.4 siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 .....	39
2.2.1.5 Pim1-Inhibition bei Neurosphären .....	40
2.2.1.6 Zellviabilitätsassay .....	41

2.2.1.7 Pim1- <i>knockout</i> mit dem CRISPR-Cas-System .....	41
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.2.1 Isolation von RNA .....	44
2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit.....	45
2.2.2.3 Reverse Transkription .....	46
2.2.2.4 <i>Real-Time-PCR</i> .....	47
2.2.3 Biochemische Methoden .....	49
2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten .....	49
2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinen .....	49
2.2.3.3 SDS-PAGE.....	50
2.2.3.4 Western Blot.....	51
2.2.3.5 Immundetektion und Proteinexpressionsanalyse .....	52
2.2.3.6 Immunfluoreszenz-Färbung .....	53
2.3 Software und statistische Analysen.....	54
3 Ergebnisse .....	56
3.1 Untersuchungen zur Expression von Pim1 sowie Stammzell- und Differenzierungsmarker von adhären wachsenden LN-18 Zellen im Vergleich zu LN-18 Neurosphären.....	56
3.2 siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 .....	67
3.2.1 siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 bei adhären wachsenden LN-18 Zellen .....	67
3.2.2 siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 bei LN-18 Neurosphären .....	70
3.3 Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf Bildung und Wachstum von LN-18 Neurosphären .....	75
3.4 Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären .....	80
4 Diskussion .....	82
4.1 Expression von Pim1 sowie Stammzell- und Differenzierungsmarker in adhären wachsenden LN-18 Zellen im Vergleich zu stammzellartigen Neurosphären.....	83
4.2 Einfluss eines siRNA-vermittelten <i>knockdown</i> von Pim1 auf die Expression von Stammzellmarker .....	96
4.3 Einfluss einer Pim1-Inhibition auf die Neurosphärenbildung und die Zellviabilität.....	99
5 Zusammenfassung.....	102
6 Literaturverzeichnis.....	104
Eidesstattliche Erklärung.....	142
Danksagung.....	143

## Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis umfasst alle häufig gebrauchten Abkürzungen. Für selten gebrauchte Abkürzungen befindet sich eine Erklärung an der jeweiligen Textstelle.

Aminosäuren, Nukleotide und physikalische Einheiten wurden nach den IUPAC-Regeln abgekürzt.

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
18S rRNA	18S Untereinheit der ribosomalen Ribonukleinsäure
A	Absorption
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Absorption bei 260 nm/Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ABCG2	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 2</i>
Acc.	Beschleunigung
ad	auffüllen auf/mit
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
adh.	adhärent
aFGF	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
AGT	O6-Alkyl-Guanin-Alkyl-Transferase
AKT	synonym zu Proteinkinase B (PKB)
AKT1	<i>RAC-<math>\alpha</math> serine/threonine-protein kinase</i> , Mitglied der AKT/Proteinkinase B (PKB)-Familie
APS	Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumperoxydisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
ASK1	<i>apoptosis signaling kinase 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	<i><math>\alpha</math>-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-chromosomal-linked</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP4	<i>bone morphogenic protein 4</i>
bp	Basenpaar/e
Br.	Bremse

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium(ionen)
Cas	<i>CRISPR-assoziierte</i> Gene beziehungsweise Effektorproteine
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
cCT	craniale Computertomographie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc	<i>cyclin division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>
CK2	<i>casein kinase-2</i>
c-Kit	CD117
cm	Zentimeter
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
crRNA	CRISPR RNA
CSLC	<i>cancer stem-like cells</i> , stammzellähnliche Krebszellen
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwert
c-TAK1	<i>Cdc25C-associated kinase 1</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
d	Tag/Tage
DAPI	4',6-Diamindin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Dcx	<i>doublecortin</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dlx2	<i>distal-less homeobox 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
Drp1	<i>dynamin-related protein 1</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
4E-BP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i> , eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E-Bindungsprotein
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte/verbesserte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGFRvIII	<i>epidermal growth factor receptor variant III</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Variante III
eIF-4B	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4B
eIF-4E	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPO	Erythropoetin
ERBB1	EGFR, <i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, HER1
ERBB2	HER2
ERBB3	HER3
ERBB4	HER4
ERCC	<i>excision repair cross complementing polypeptide-1</i>
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
et al.	et alii/aliae; und andere
ETK/BMX	<i>epithelial and endothelial tyrosin kinase/ bone marrow X kinase</i>
ETS	<i>erythroblast transformation specific</i>
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
Flk-1	<i>tyrosine kinase receptor fetal liver kinase</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
°C	Grad Celsius
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
g	g-Zahl (Zentrifuge)
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GBM	Glioblastom/e
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK3A	Glycogensynthasekinase-3 $\alpha$
GSK3B	Glycogensynthasekinase-3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	<i>Gray</i>
h	Stunde/n
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDR	<i>homology-directed repair</i> ; auf Homologie- ausgerichtete Reparatur
HIF1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HIF2 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 2 $\alpha$
HOXA9	<i>homeobox A9</i>
HP	Heterochromatin(-assoziiertes) Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich- Peroxidase
Hrsg.	Herausgeber/Herausgeberin[nen]
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IDH-1	Isocitrat-Dehydrogenase-1
IDH-2	Isocitrat-Dehydrogenase-2
IFN	Interferon
Inc.	incorporated, eingetragen
<i>in vitro</i>	im (Reagenz-)Glas
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
K	Kontrolle

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Ki-67	proliferationsassoziiertes Marker
KLF-5	<i>Kruppel-like factor-5</i>
l	Liter
LTP	<i>long-term potentiation</i> , Langzeit-Potenzierungen
LY	LY294002; dualer Pim1- und PI3K-Inhibitor
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute/n
µg	Mikrogramm
µg/µl	Mikrogramm pro Mikroliter
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MLL3	<i>mixed-lineage leukemia 3</i>
MLL4	<i>mixed-lineage leukemia 4</i>
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease/n
MoMuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
Msi-1	Musashi-1
MT1-MMP	<i>membrane type 1-matrix metalloproteinase</i>
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEAS	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essenzielle Aminosäuren
NEHJ	<i>nonhomologous end joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfung
NFATC1	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i> , nukleärer Faktor κB

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
NOD-SCID	<i>non-obese diabetic – severe combined immunodeficiency</i> ; nicht fettleibig-diabetisch – schwerer kombinierter Immundefekt
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>
NSC	<i>neuronal stem cell/s</i> ; neurale Stammzelle/n
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
Nsph.	Neurosphäre/n
NTC	<i>no template control</i> , Leerwert/Kontrolle
NuMA	<i>nuclear mitotic apparatus</i>
OD	optische Dichte
OD260 oder OD280	optische Dichte bei 260nm /optische Dichte bei 280 nm
Oct4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
P	Passage
%	Prozent
p16	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
p21	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
p27	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i>
p97/VCP	<i>p97/ valosin-containing protein</i>
p100	NFκB2; <i>nuclear factor κB 2</i>
p.a.	<i>pro analysi</i> , Reinheitsgrad
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i> , angrenzendes Motiv an den Protospacer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
P-gp	P-Glycoprotein
pH	von <i>potentia</i> (Kraft) und <i>hydrogenum</i> (Wasserstoff) abgeleitet
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit α</i>

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
Pim1	<i>proviral insertion site of Moloney murine leukemia virus 1</i>
Pim2	<i>proviral insertion site of Moloney murine leukemia virus 2</i>
Pim3	<i>proviral insertion site of Moloney murine leukemia virus 3</i>
Pim1S	Pim1 <i>short</i> (kurze Isoform)
Pim1L	Pim1 <i>long</i> (lange Isoform)
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PRAS40	<i>proline-rich AKT substrate 40 kDa</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
QT	Quercetagetin
®	<i>registered</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RMS	<i>rostral migratory stream, rostraler Migrationsfluss</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonukleinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute, Umdrehung pro Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Real-Time-Polymerase Chain Reaction/ Real-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
s	Sekunde
S100	<i>solubility in 100 % saturated ammonium sulfate at neutral pH, abgeleitet von seiner Löslichkeit in 100 % gesättigtem Ammoniumsulfat bei neutralem pH</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel(elektrophorese)
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
sog.	sogenannt/e
Sox2	<i>SRY[sex-determining region Y]-box 2</i>
Sox4	<i>SRY[sex-determining region Y]-box 4</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine, Osteonektin</i>
SRY	<i>sex determining region Y</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
TBP	TATA-binding protein
TBS	<i>Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline tween, Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung mit Tween-20</i>
TCS	TCS Pim1-1, spezifischer ATP-kompetitiver Pim1-Inhibitor; TCS PIM1, 3-Cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxy)phenyl-2(1H)-pyridone
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
™	<i>Trademark</i>
TMZ	Temozolomid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53 = p53	Tumorsuppressorgen/-protein 53
tracrRNA	<i>trans-activating RNA, trans-aktivierte RNA</i>
TRAF2/SNX6	<i>tumor necrosis factor receptor associated-factor 4-associated factor 2/sorting nexin 6</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
TTF	<i>tumor-treating fields</i>
TTP	Thymintriphosphat
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheit (bei Enzymen)
U/ $\mu$ l	U pro Mikroliter
U/ml	U pro Milliliter
u. a.	unter anderem

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
USP	Ubiquitin-spezifische Protease
UTR	<i>untranslated region</i>
U.S.A.	<i>United States of America</i>
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	<i>World Health Organization,</i> Weltgesundheitsorganisation
Wnt	zusammengesetzt aus <i>wingless</i> und <i>Int-1</i>
ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Todesursachen bösartiger Neuerkrankungen bei Frauen und bei Männern in Deutschland 2019. ....	1
Abb. 2: Das Glioblastom. ....	3
Abb. 3: Schematische Übersicht zu genetischen Alterationen von primären und sekundären Glioblastomen. ....	4
Abb. 4: Schematische Darstellung zur Regulation der Expression und Stabilität der onkogenen Kinase Pim1 sowie zu Substraten von Pim1 und deren Kontext zu zellulären Prozessen. ....	12
Abb. 5: Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von adhärennten Zellen und stammzellartigen Neurosphären der GBM-Zelllinie LN-18. ....	57
Abb. 6: mRNA-Expression ausgewählter Gene mit potentieller Bedeutung im Stammzellgeschehen in adhärennten (adh.) LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären (Nsph.).....	59
Abb. 7: Expression ausgewählter Proteine mit potentieller Bedeutung im Stammzellgeschehen in adhärennten (adh.) LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären (Nsph.).....	60
Abb. 8: Immunfluoreszenz-Färbung der Kinase Pim1 in humanen LN-18 Glioblastomzellen.....	62
Abb. 9: Immunfluoreszenz-Färbung der Stammzellmarker Nestin, CD44 und CD133 in humanen LN-18 Glioblastomzellen. ....	63
Abb. 10: Immunfluoreszenz-Färbung von Musashi-1 und SPARC in humanen LN-18 Glioblastomzellen.....	64
Abb. 11: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Pim1 mit Nestin bzw. CD133 oder CD44 in adhärent wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären. ....	65
Abb. 12: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Pim1 mit Musashi-1, Sox2 oder SPARC in adhärent wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären. ....	66
Abb. 13: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei adhärent wachsenden LN-18 Zellen. ....	68
Abb. 14: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die Proteinexpression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei adhärent wachsenden LN-18 Zellen. ....	69

Abb. 15: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 1. ....	71
Abb. 16: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 2. ....	72
Abb. 17: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die Proteinexpression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 2. ....	74
Abb. 18: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf Bildung und Wachstum von LN-18 Neurosphären. ....	77
Abb. 19: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition mit dem spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 auf die Bildung und das Wachstum von LN-18 Neurosphären. ....	79
Abb. 20: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären. ....	80
Abb. 21: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition mit TCS Pim1-1 auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären. ....	81

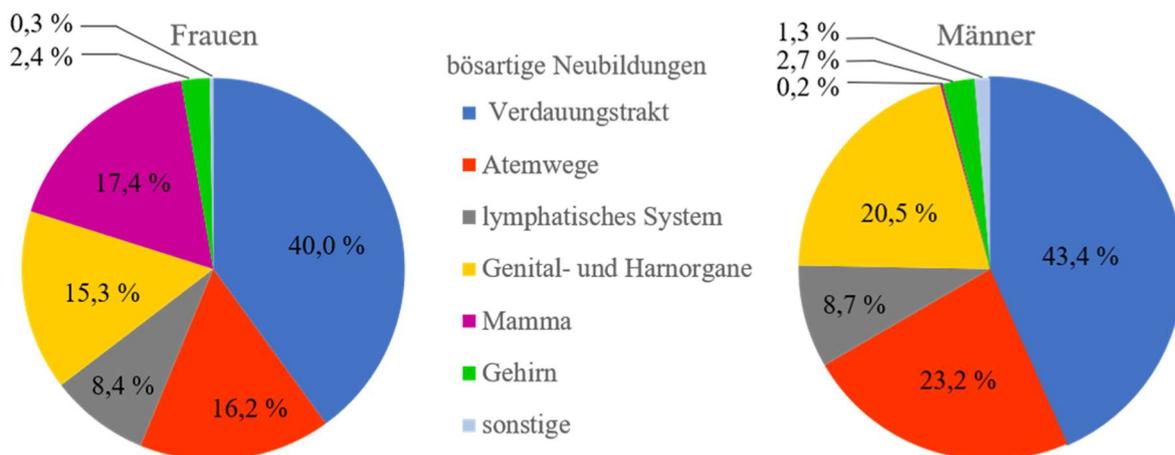
## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der Chemikalien, welche im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verwendet wurden. ....	20
Tab. 2: Verwendete Geräte und Materialien. ....	23
Tab. 3: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung. ....	29
Tab. 4: Auflistung der verwendeten Kits und Assays. ....	30
Tab. 5: Verwendete <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> - <i>Assays on Demand</i> (Fa. Applied Biosystems <sup>™</sup> , Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.).....	31
Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper. ....	31
Tab. 7: Verwendete sekundäre Antikörper für Western Blots. ....	32
Tab. 8: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbungen.....	32
Tab. 9: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die reverse Transkription. ....	46
Tab. 10: Zusammensetzung von Sammelgel (4,0 %) im Rahmen einer SDS-PAGE.....	50
Tab. 11: Zusammensetzung von Trenngel (10 %) im Rahmen einer SDS-PAGE. ....	51

## 1 Einleitung

Tumorerkrankungen zählen mit 24,6 % aller Todesfälle neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen (35,3 %) zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland<sup>1</sup>. Im mittleren Lebensalter (45- bis 65-Jährige) stellen Krebserkrankungen sogar die häufigste Todesursache dar<sup>1</sup>. Im Jahr 2019 verstarben rund 231.000 Menschen (etwa 125.000 Männer und 106.000 Frauen) an den Folgen einer bösartigen Neubildung, seit 1999 ist die Zahl der Krebstodesfälle um ca. 10 % gestiegen<sup>1,3</sup>. Am häufigsten traten bei Männern und Frauen Karzinome des Verdauungstraktes auf (Abb. 1)<sup>1</sup>. Bei Männern folgten bösartige Neuerkrankungen der Atemwege (29.099 Männer), des männlichen Genitaltraktes und der Harnorgane (25.714 Männer) sowie der lymphatischen Organe (10.851 Männer)<sup>1</sup>. Mammakarzinome (18.519 Frauen), Karzinome der Atemwege (17.212 Frauen), Karzinome der weiblichen Genitalorgane und der Harnorgane (16.267 Frauen) und bösartige Neubildungen der lymphatischen Organe (8.866 Frauen) stellten bei Frauen nach Karzinomen des Verdauungstraktes (42.461 Frauen) die häufigsten malignen Neoplasien dar<sup>1</sup>.

Insgesamt waren im Jahr 2019 in Deutschland 3.393 Männer und 2.527 Frauen von bösartigen Neubildungen des Gehirns betroffen<sup>2</sup>. Der Anteil der bösartigen Neubildungen des Gehirns am Gesamtanteil der malignen Neoplasien betrug bei Männern 2,7 % und bei Frauen 2,4 %<sup>1,2</sup>. Die meisten Todesfälle traten bei Erkrankten im Alter von 60 bis 80 Jahren auf<sup>2</sup>.



**Abb. 1:** Darstellung der Todesursachen bösartiger Neuerkrankungen bei Frauen und bei Männern in Deutschland 2019 (modifiziert nach<sup>1,2</sup>).

Zu den bösartigen Neubildungen des Gehirns zählen Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, embryonale Tumoren, ependymale Tumoren, Keimzelltumoren, Lymphome, Astrozytome und Glioblastome (GBM)<sup>232</sup>.

Glioblastome stellen mit 47,1 % den größten Anteil an primären malignen Neoplasien des Gehirns und des ZNS dar<sup>232</sup>. Das GBM ist somit der häufigste hirneigene maligne Tumor mit

einer Inzidenz von 3,2 pro 100.000 Einwohnern<sup>232</sup>. Werden sowohl gutartige als auch bösartige Neubildungen des ZNS betrachtet, so stellen Glioblastome 14,9 % aller Neoplasien dar, die insbesondere ältere (74 bis 85 Jahre), häufiger männliche Patienten betreffen<sup>232</sup>. Häufige Symptome der Erkrankten sind Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, fortschreitende Gedächtnis-, Persönlichkeits- und neurologische Defizite neben Müdigkeit und epileptischen Anfällen, seltener Schlaganfälle, Hemiparesen und Aphasien<sup>57,252,333</sup>.

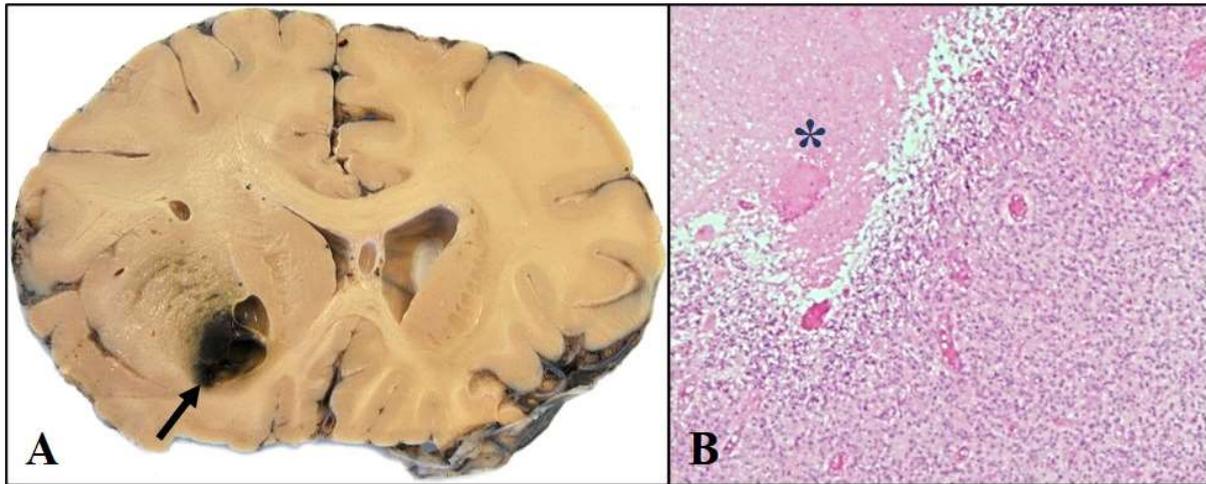
Die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung ist abhängig vom Alter des Patienten und mit 5,5 % gering<sup>232</sup>. Insbesondere bei jüngeren Patienten ist die mediane Überlebenszeit signifikant höher als bei älteren Patienten<sup>226,232</sup>.

### 1.1 Das Glioblastom (GBM)

Das GBM ist ein WHO Grad 4-Tumor und stellt rund 40 % aller Gliome<sup>239</sup>. Abgeleitet vom griechischen Wort *glia*, übersetzt „Leim“, wurden Gliazellen als Stütz- und extrazelluläre Matrix-produzierende Zellen von Rudolf Virchow zuerst beschrieben<sup>301</sup>.

Die Ätiologie des GBM ist weitestgehend ungeklärt<sup>318</sup>. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Glioms werden eine hochdosierte ionisierende Strahlung, fortschreitendes Alter sowie hereditäre Syndrome wie Neurofibromatose 1, tuberöse Sklerose, Turcot-Syndrom, multiple Hämangiome und das Li-Fraumeni-Syndrom diskutiert<sup>36,266,284,318</sup>. Hingegen sollen Allergien und hohe IgE-Spiegel der Entstehung von Gliomen entgegenwirken<sup>36,284,285</sup>. GBM sind häufig supratentoriell in einer Hemisphäre, vor allem im Temporallappen (31 %), Parietallappen (24 %), Frontallappen (23 %) und Occipitallappen (16 %) lokalisiert<sup>198</sup>. Bei den selteneren, im Hirnstamm und Corpus callosum vorkommenden Glioblastomen kann es zu einem symmetrischen, bilateralen Wachstum unter dem Bild eines sogenannten Schmetterlingsglioblastoms kommen<sup>198</sup>. Glioblastome zeigen makroskopisch (siehe Abb. 2A) eine inhomogene, sogenannte bunte Schnittfläche, die überwiegend aus grau-rosafarbenen, soliden Arealen, gelblichen, erweichten Nekrosearealen sowie grünlich verflüssigten Nekrosen in Form von zystischen Läsionen bestehen kann<sup>239,198</sup>. Daneben zeigen sich häufig frischere und ältere Blutungsresiduen in Form von roten oder schwärzlichen, teilweise stippchenförmigen Arealen<sup>239,198</sup>. Stellenweise zeigt sich ein massives Ödem<sup>239</sup>. Histologisch präsentieren diese zeldichten Tumoren neben einer Zellpolymorphie auch eine ausgeprägte Zellkernpolymorphie mit nuklearen Atypien in Form von hyperchromatischen und unregelmäßig geformten Zellkernen<sup>239,198</sup>. Die Tumoren können stellenweise auch spindelzellig konfiguriert sein oder aus kleinen, rundlichen, monomorphen Zellen bestehen<sup>239,198</sup>. Mitosen können in variabler Zahl auftreten<sup>239</sup>. Der proliferationsassoziierte Marker Ki-67 illustriert

häufig zwischen 15 bis 20 % der Tumorzellen und kann fokal deutlich gesteigert sein (> 50 %) <sup>198</sup>.



**Abb. 2: Das Glioblastom.** (A) Makroskopische Aufnahme eines Glioblastoms mit einer inhomogenen, teilweise erweichten Schnittfläche mit Blutungsresiduen (→). (B) Histologische Darstellung eines Glioblastoms (HE-Färbung) mit Nekrose (\*). (Die Abbildungen A und B wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. med. Monoranu, Abteilung für Neuropathologie am Institut für Pathologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.)

Häufig treten in Randbereichen von Glioblastomen dichte Lymphozyteninfiltrate auf <sup>239</sup>. Wesentliche Kriterien für die Diagnosestellung sind ein ausgeprägtes infiltratives Wachstum und flächenhafte Nekrosen (siehe Abb. 2B), die bis zu 80 % der Tumorfläche einnehmen können, sowie charakteristische strichförmige Nekrosen mit palisadenartiger Umrandung von dicht liegenden Tumorzellen neben ausgeprägten Gefäßproliferaten, die teils weitlumig, teils thrombosiert sind <sup>239,198</sup>. Mikroskopisch lässt sich eine Akkumulation von Tumorzellen subpial, subependymal, um Neurone (sog. Satellitosis) und um Blutgefäße herum nachweisen <sup>198</sup>.

GBM wurden schon 1940 von Scherer in zwei Typen, das primäre und das sekundäre Glioblastom, eingeteilt (Abb. 3) <sup>280</sup>.

Das primäre GBM kommt mit einem Anteil von ca. 90 % aller Glioblastome deutlich häufiger vor als das sekundäre Glioblastom (ca. 10 % aller Glioblastome) <sup>198,199</sup>. Bei Diagnose sind die Patienten mit einem primären GBM im Durchschnitt 62 Jahre, Patienten mit einem sekundären GBM sind meist jünger und durchschnittlich 45 Jahre alt <sup>230</sup>. Im Gegensatz zu primären, überwiegend supratentoriell gelegenen GBM, die *de novo* ohne Hinweise auf vorbestehende Tumoren niederen Grades entstehen, gehen sekundäre GBM aus diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) hervor und sind häufig im Frontallappen lokalisiert <sup>198,199</sup>. Eine Unterscheidung von primären und sekundären GBM ist anhand von makro- und mikroskopischen Diagnosekriterien nicht sicher möglich <sup>198,199</sup>. Da jedoch die Prognose von primärem und sekundärem GBM stark variiert, werden bei der

Klassifizierung von Glioblastomen nach WHO neben morphologischen Kriterien auch genetische Veränderungen betrachtet<sup>198,199</sup>.

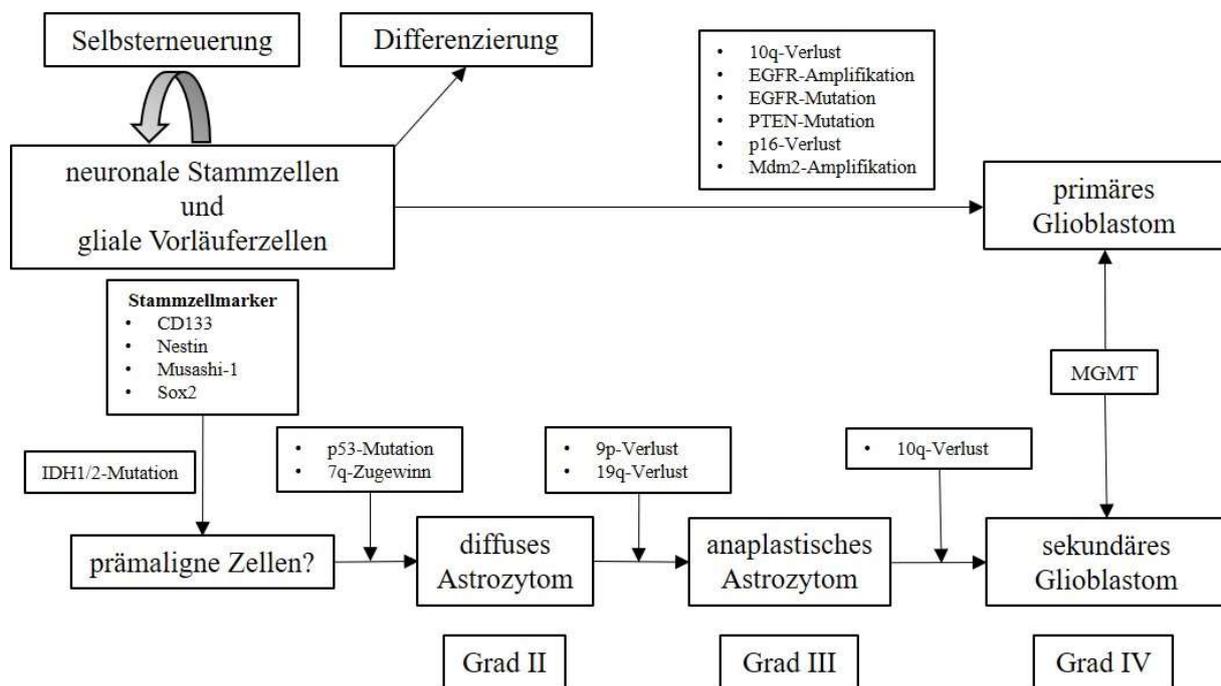


Abb. 3: Schematische Übersicht zu genetischen Alterationen von primären und sekundären Glioblastomen (modifiziert nach<sup>207</sup>).

Primäre Glioblastome weisen in 35 bis 45 % der Fälle eine Amplifikation bzw. Mutation des *EGF*-Rezeptor-Gens (*EGFR*; *epidermal growth factor receptor*) auf<sup>96,198,296</sup>. Etwa 10 % der primären GBM mit einem amplifizierten *EGF*-Rezeptor-Gen weisen eine mutierte Form des Rezeptors, die sogenannte Variante III (*EGFRvIII*) auf<sup>30</sup>. Zudem können bei primären GBM eine Mutation von der Phosphatase *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), eine Deletion von *p16* und ein Verlust des langen Arms von Chromosom 10 (10q) auftreten<sup>229,230</sup>.

Sekundäre Glioblastome weisen häufig ähnlich wie diffuse oder anaplastische Astrozytome Mutationen der Gene *IDH1* (Isocitratdehydrogenase; 70 bis 80 %), *TP53* (p53; über 50 %) und *ATRX* (*α-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-chromosomal-linked*, 57 %) auf<sup>189,226,230,331,349</sup>. Analysen des *IDH1*-Status haben gezeigt, dass Glioblastome mit einer Mutation desselben mit einer längeren Überlebensrate einhergehen<sup>330</sup>. Insgesamt treten *IDH1/2*-Mutationen in weniger als 10 % aller Glioblastome auf<sup>226,331,330</sup>.

In der zwischenzeitlich erschienenen fünften Auflage der WHO-Klassifikation (2021) der Tumoren des ZNS wird eine Unterteilung in primäre (vormals Glioblastom, *IDH-wildtype*) und sekundäre GBM (vormals Glioblastom, *IDH-mutant*) nicht mehr vorgenommen<sup>42,196,197</sup>.

Die aktuelle WHO-Klassifikation sieht eine Unterscheidung zwischen diffusen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und GBM mit einer Mutation im *IDH1*- oder *IDH2*-Gen nicht mehr vor und fasst die *IDH*-mutierten diffusen Astrozytome in einer Entität (*Astrozytom, IDH-*

*mutant*) zusammen<sup>197</sup>. Das Astrozytom, *IDH-mutant*, wird als diffus infiltrierendes *IDH1*- oder *IDH2*-mutiertes Gliom mit häufiger Mutation von *ATRX*- und/oder *TP53*-Gen und Abwesenheit einer 1p/19q-Kodeletion definiert<sup>42</sup>. Die Graduierung (Grad 2 bis 4) dieser Tumoren erfolgt anhand der Morphologie, wobei die Kriterien für ZNS WHO Grad 4-Tumoren die Ausbildung von Nekrosen, mikrovaskulären Proliferationen oder eine homozygote Deletion von *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* einschließen<sup>42</sup>.

Das Glioblastom, *IDH-wildtype*, wird in der aktuellen WHO-Klassifikation als diffuses astrozytäres *IDH*- und H3-Wildtyp Gliom definiert, das entweder eine mikrovaskuläre Proliferation, Nekrose, *TERT*-Promotermutation, *EGFR*-Genamplifikation oder Veränderungen der Kopienanzahl von Chromosom 7 (Trisomie 7) und Chromosom 10 (Monosomie), die häufig in Kombination auftreten (+7/-10), aufweist<sup>196</sup>.

Von besonderer prognostischer Relevanz ist der MGMT-Status. MGMT (O-6-Methyl-DNA-Methyltransferase), auch früher AGT (O6-Alkyl-Guanin-Alkyl-Transferase) genannt, kodiert auf Chromosom 10q26 für ein Exzisionsreparatur-Enzym, das Alkylgruppen von der O6-Position des Guanins entfernt<sup>120,221</sup>. MGMT wird im Gehirn nur gering exprimiert<sup>305</sup>. Die Expression von MGMT wird über die Promoter-Methylierung anhand von CpG-Inseln gesteuert<sup>120</sup>. Glioblastome mit einer Promoter-Methylierung und somit geringer MGMT-Expression zeigen sich sensitiv gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid (TMZ) und Carmustin<sup>120,305</sup>.

## 1.2 Diagnose und Therapie des GBM

Die Diagnostik eines GBM sollte eine craniale Magnetresonanztomographie (MRT), eine craniale Computertomographie (cCT) sowie bei epileptischen Anfällen eine Elektroenzephalographie (EEG) umfassen<sup>333</sup>. Durch ihr infiltratives und destruktives Wachstum können GBM eine gestörte Blut-Hirn-Schranke aufweisen<sup>328</sup>. Wird bei der MRT-Untersuchung zusätzlich Kontrastmittel appliziert, kommt es in vitalen Tumoranteilen zu einer Mehranreicherung an Kontrastmittel im Bereich der Läsion<sup>317</sup>. Bei der operativen Therapie gilt die mikrochirurgische Technik als Standard<sup>333</sup>. Sie sollte so viel Tumorgewebe wie möglich entfernen, jedoch ohne bleibende neurologische Defizite hervorzurufen<sup>333</sup>.

Der Erfolg der operativen Therapie kann mithilfe einer MRT innerhalb von 24 h bis 48 h postoperativ überprüft werden<sup>333,334</sup>. Lässt sich postoperativ kein Kontrastmittelaufnehmender Tumor mehr nachweisen, so ist von einer Totalresektion auszugehen<sup>303,304</sup>. Aufgrund des infiltrativen Wachstums von GBM können trotz Totalresektion einzelne Tumorzellen im Gehirn verbleiben und über sogenannte Membrankanäle und dendritische Verzweigungen

untereinander kommunizieren und in etwa 10 % zu Rezidiven u. a. in der kontralateralen Hemisphäre oder innerhalb der gleichen Hemisphäre abseits des Tumorbettes führen<sup>231,335</sup>. Ebenfalls konnten in der perivaskulären Nische, die als Sitz von ruhenden stammzellähnlichen Tumorzellen diskutiert wird, kleine Mengen an ruhenden Zellen mit Membrankanälen nachgewiesen werden<sup>231</sup>.

Ist eine operative Tumorreduktion nicht möglich, sollte zur weiteren Therapieplanung zumindest eine Biopsie angestrebt werden<sup>333</sup>. Am Tumormaterial erfolgt neben der Bestimmung des IDH-Status die Erhebung der MGMT-Promoter-Methylierung, die Überprüfung auf eine 1p/19q-Kodeletion sowie auf eine H3K27M-Histon-Mutation<sup>333</sup>. Abhängig vom Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchungen und der physischen und psychischen Voraussetzungen des Patienten erfolgt die anschließende weitere Therapieplanung, die eine Radiatio oder eine Radiochemotherapie nach dem Stupp-Schema beinhaltet<sup>333</sup>.

Bereits seit den 1980er Jahren stellt die Radiatio die Standardtherapie dar, welche eine Strahlendosis von insgesamt 60 Gy (Gray) umfasst, die in Fraktionen von 1,8 bis 2,0 Gy aufgeteilt werden<sup>306,307,327,333</sup>. Bei Patienten mit einer schlechten Prognose und bei Patienten, die älter sind als 70 Jahre, kann eine hypofraktionierte Radiotherapie erfolgen<sup>333</sup>. Diese kann eine Dosis von 40 Gy aufgeteilt in 15 Fraktionen oder eine Gesamtdosis von 60 Gy aufgeteilt in 30 Fraktionen umfassen<sup>333</sup>.

Wie bereits oben beschrieben ist hinsichtlich der Prognose und der Therapie die Erhebung des MGMT-Promoter-Methylierungsstatus von besonderer Relevanz. Eine Hypermethylierung der CpG-Inseln von MGMT führt zu einem sogenannten *Gene-Silencing* mit einhergehendem Proteinexpressionsverlust von MGMT<sup>120</sup>. Die geringe Expression von MGMT ist die Grundlage für ein Ansprechen gegenüber einer Therapie mit Temozolomid (TMZ)<sup>332,333</sup>. Temozolomid wurde in den 1980er Jahren entwickelt und zeichnet sich durch eine schnelle und komplette Absorption nach oraler Aufnahme mit einer maximalen Plasmakonzentration nach 30 bis 90 Minuten aus<sup>221,305</sup>. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die mit einer Radiochemotherapie mit Temozolomid behandelt wurden, ein signifikant verlängertes medianes Überleben zeigen<sup>72,306,332</sup>. Im Vergleich zu einer alleinigen Radiatio mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 12,1 Monaten konnte durch eine kombinierte Radiochemotherapie die durchschnittliche Überlebenszeit auf 14,6 Monate gesteigert werden<sup>306</sup>. Eine Langzeit-TMZ-Therapie (> sechs Zyklen) konnte das progressionsfreie Intervall sowie das mediane Überleben verlängern<sup>23,347</sup>.

Ein neuer therapeutischer Ansatz in Kombination mit Temozolomid stellen *tumor-treating fields* (TTF) dar, die über alternierende elektrische Felder die Ausbildung von Mitosespindeln unterbrechen sollen<sup>309,308,334</sup>.

In den letzten 15 Jahren haben sich die Therapieoptionen und das Gesamtüberleben für Patienten mit einem Glioblastom kaum geändert. Zunehmend wird dementsprechend an zielgerichteten Therapien (*targeted therapies*) geforscht. Aufgrund der ausgeprägten Angiogenese sowie einer hohen Expression des VEGFR (*vascular epithelial growth factor receptor*) innerhalb des Glioblastoms rückten in den letzten Jahren zielgerichtete Therapien gegen diesen Rezeptor in den Fokus<sup>144,200</sup>. Für den gegen den VEGFR-gerichteten monoklonalen Antikörper Bevacizumab konnte allerdings in Studien lediglich ein verlängertes progressionsfreies Intervall nachgewiesen werden, jedoch blieb ein Effekt im Hinblick auf ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Radiochemotherapie nach dem Stupp-Schema aus<sup>63,103</sup>. Daneben wird an *small molecule inhibitors* geforscht, die beispielsweise wie Vorinostat gegen die Histondeacetylase oder wie Sorafinib gegen Raf, VEGFR2 und PDGFR- $\beta$  gerichtet sind<sup>171,172</sup>. Eine andere Zielstruktur für *small molecule inhibitors* stellt der EGF-Rezeptor dar, da 30 bis 40 % aller Glioblastome eine Amplifikation des EGF-Rezeptors aufweisen, wobei darunter 10 % der Tumoren die mutierte Variante III (EGFRvIII) zeigen<sup>30,96,199,296</sup>. Bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small-cell lung cancer*; NSCLC) treten ebenfalls Mutationen des EGFR auf, die jedoch anders als bei Glioblastomen oft innerhalb der Tyrosinkinasedomäne liegen und gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren wie beispielsweise Gefitinib, Afatinib und Osimertinib bereits eingesetzt werden bzw. in der Erprobung sind<sup>12,100,155</sup>. Analog zum NSCLC wurden bei Patienten mit Glioblastom ebenfalls Tyrosinkinaseinhibitoren in Studien eingesetzt, jedoch mit geringem Erfolg<sup>55,155,233</sup>. Für ein schlechtes Ansprechen von Patienten mit einem Glioblastom auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren im Vergleich zu Patienten mit einem NSCLC werden auch die unterschiedlichen Lokalisationen der Mutationen im *EGF*-Rezeptor-Gen beider Tumoren diskutiert<sup>121</sup>. Allerdings konnte für Osimertinib gezeigt werden, dass der Kinaseinhibitor das Wachstum von Glioblastomen mit einer hohen EGFRvIII-Aktivität hemmen kann<sup>55</sup>. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der EGFR an der Regulation der onkogenen Kinase Pim1 im GBM beteiligt ist<sup>124</sup>. Zudem weisen GBM-Zellen, welche die EGFRvIII exprimieren, eine gegenüber EGFR-Wildtyp exprimierenden Zellen erhöhte Pim1-Expression auf<sup>124</sup>. Somit könnte die Kinase Pim1 ebenfalls eine interessante Zielstruktur für eine zielgerichtete Therapie darstellen.

### 1.3 Die Serin-Threonin-Kinase Pim1

Tumoren sind gekennzeichnet durch eine Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, eine Insensibilität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, das Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose), ein unbegrenztes replikatives Potenzial, eine unterstützende Angiogenese sowie durch ein invasives Tumorwachstum mit einhergehender Metastasierung<sup>118,119,289,290</sup>. Die Entstehung von Tumoren beruht auf einem mehrstufigen Prozess, der durch eine Vielzahl von genetischen Veränderungen wie beispielsweise Mutationen, Amplifikationen oder Translokationen von Genen verursacht wird<sup>118</sup>. Gene, die potenziell Krebs verursachen können, werden als Onkogene bezeichnet. Normale Gene, insbesondere jene, die für zellwachstums- und differenzierungsregulierende Proteine kodieren und die durch aktivierende Mutationen zu Onkogenen werden können, werden auch als Protoonkogene definiert. Insbesondere rücken im Hinblick auf zielgerichtete Therapien gegen Onkogene proliferationsfördernde Kinasen wie beispielsweise die EGFR-Tyrosinkinase oder Pim1 in den Fokus.

#### 1.3.1 Expression und Struktur der onkogenen Kinase Pim1

Die Serin-Threonin-Kinase Pim1 wurde ursprünglich als präferentielle provirale Insertionsstelle des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMuLV) in murinen T-Zell-Lymphomen entdeckt<sup>71,85,287</sup>. Pim1 ist eine Calcium-/Calmodulin-regulierte, konstitutiv aktive Kinase, die in embryonalen/fetalen Stammzellen sowie der embryonalen/fetalen Leber, Milz, Thymus, Knochenmark, Ovarien, Hoden, Brustdrüsengewebe, dem Herzen und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Gehirns exprimiert wird<sup>20,88,132,311</sup>. Nach der Geburt konnte bei Ratten insbesondere in Dünndarm, Lunge sowie in der Schilddrüse eine hohe Expression von Pim1 nachgewiesen werden, während im Herzmuskelgewebe sowie in den Nieren eine geringe Pim1-Expression vorliegt<sup>90</sup>.

Im Hirnstamm, Cerebellum, Kortex und Hippocampus konnte allenfalls eine geringe Expression von Pim1 nachgewiesen werden<sup>90</sup>.

Durch transgene, Pim1-überexprimierende Mäuse, die im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ein vermehrtes Auftreten von T-Zell-Lymphomen zeigten, was durch eine zusätzliche Infektion mit dem MoMuLV verstärkt werden konnte, wurde das onkogene Potenzial von Pim1 nachgewiesen<sup>321</sup>.

Das humane Gen Pim1 ist auf Chromosom 6 (6p21.1 bis 6p21.31) lokalisiert, weist 6 Exons sowie 5 Introns auf und umfasst ungefähr 5 kb, die ein mRNA-Transskript von 2684

Basenpaaren (bp) ergeben, das in 313 Aminosäuren transkribiert werden kann<sup>20,209,277</sup>. Die katalytische Domäne von Pim1 liegt im Bereich der Aminosäuren 38 bis 290 und weist ein konserviertes Glycerin-Schleifen-Motiv zwischen den Aminosäuren 45 und 50 auf<sup>20</sup>. Die Phosphat-Bindungsstellen wurden im Bereich der Aminosäuren 44 bis 52 sowie 67 beschrieben<sup>20</sup>.

Durch ein alternatives Startcodon kann das mRNA-Transkript in zwei Proteinisoformen, Pim1S und Pim1L, translatiert werden<sup>20,277</sup>. Die kurze Isoform (Pim1S) zeigt ein Molekulargewicht von 34 kDa und ist vorrangig im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert, während die lange Isoform (Pim1L) ein Molekulargewicht von 44 kDa aufweist und neben einer zytoplasmatischen Lokalisation auch in der Zellmembran vorkommt<sup>124,277,344</sup>. Neben dem Molekulargewicht und der zellulären Lokalisation unterscheiden sich beide Pim1-Isoformen hinsichtlich ihrer Halbwertszeit, die für die kurze Isoform (Pim1S) zehn Minuten und für die lange Isoform (Pim1L) eine Stunde beträgt<sup>277</sup>.

Die Serin-Threonin-Kinasen der Pim-Familie umfassen neben Pim1 auch Pim2 und Pim3 und sind in multizellulären Organismen evolutionär hoch konserviert<sup>10,211,223</sup>. Zwischen Pim1 und Pim3 besteht eine 71-prozentige Homologie, während Pim1 und Pim2 zu 61 % identisch sind<sup>223</sup>. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass ein *knockout* von Pim1 nicht letal ist und ohne offensichtlichen Phänotyp durch die beiden anderen Serin-Threonin-Kinasen der Pim-Familie, Pim2 und Pim3, kompensiert werden kann<sup>167,211</sup>. Lediglich *Pim-triple-knockout*-Mäuse zeigten einen signifikanten Phänotyp mit einer deutlich reduzierten Körpergröße und einhergehenden reduzierten Organgewichten, einer erniedrigten Zellzahl in Milz und Knochenmark, einer verminderten Proliferationsrate und erhöhten Apoptoserate von hämatopoetischen Stammzellen<sup>10,211</sup>.

In soliden Tumoren wie beispielsweise kolorektalen Adenokarzinomen, nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen, *triple*-negativen Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, adenoidzystischen Speicheldrüsenkarzinomen, klarzelligen Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, undifferenzierten nasopharyngealen Karzinomen und Glioblastomen konnte eine erhöhte Expression von Pim1 nachgewiesen werden<sup>32,41,124,234,288,346,362</sup>. Eine Überexpression von Pim1 kann eine genomische Instabilität durch einen Defekt im Mitosespindel-*Checkpoint*, abnormale Mitosespindeln, Zentrosomenamplifikation und fehlerhafte Trennung von Chromosomen begünstigen<sup>264</sup>.

### 1.3.2 Regulation der Expression von Pim1

Eine Induktion der Expression von Pim1 konnte für verschiedene Stimuli, wie Interleukin (IL)-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, Interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , EGF, G-CSF, GM-CSF, Erythropoetin (EPO), Prolaktin, Estradiol, *stem cell factor* (SCF) und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) sowie nach Schädigung der DNA (siehe Abb. 4) nachgewiesen werden<sup>129,191,205,210,223</sup>. Dabei spielen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wie beispielsweise JAK-STAT, NF $\kappa$ B, MAPK und PI3K/AKT eine Rolle<sup>37,129,191,223</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie die Expression von Pim1 induzieren kann<sup>59</sup>. Die Transkription von Pim1 kann beispielsweise über die Transkriptionsfaktoren HOXA9 sowie *Kruppel-like factor-5* (KLF5) reguliert werden, die direkt an den Promoter des Pim1-Gens binden können<sup>133,364</sup>. Darüber hinaus kann der Transkriptionsfaktor ERG über seine Promoterbindung Pim1 induzieren<sup>106,204</sup>.

Die 400 Nukleotid lange 5' *untranslated region* (5' UTR) der Pim1-mRNA weist mit 76 Prozent einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin auf und deutet auf einen hohen Grad an sekundären Strukturen hin, die die Effizienz der Translation deutlich reduzieren kann<sup>131</sup>. Die Translation der Pim1-mRNA kann durch den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF-4E) verstärkt werden<sup>131</sup>.

Für die Proteinphosphatase 2A (PP2A) konnte in Hinblick auf die Stabilität von Pim1 eine posttranslationale Regulation nachgewiesen werden<sup>193,201</sup>. Die Stabilisierung und der Schutz des Proteins Pim1 vor einer proteasomalen Degradierung wird durch die Bindung an *heat shock protein 90* (Hsp90) vermittelt<sup>213,291</sup>. Liegt die Serin-Threonin-Kinase Pim1 mit Ubiquitin konjugiert vor, so weist diese zusätzlich eine Assoziation mit Hsp70 auf<sup>291</sup>.

### 1.3.3 Substrate und zelluläre Funktionen von Pim1

Pim1 agiert in ihrer Funktion als Serin-Threonin-Kinase über die Phosphorylierung von Substraten überwiegend proliferationsfördernd, antiapoptotisch und migrationsfördernd. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über Zielstrukturen bzw. Substrate von Pim1 und verdeutlicht die vielgestaltige Funktion dieser onkogenen Kinase im zellulären Geschehen. Einige dieser Pim1-Substrate sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Zu den Substraten zählt unter anderem Cdc25A (*cyclin division cycle 25A*), das mit Pim1 interagiert und durch die Kinase phosphoryliert werden kann<sup>214</sup>. Eine Pim1-vermittelte Phosphorylierung von Cdc25A führt zu einer verstärkten Phosphatase-Aktivität und ermöglicht einen beschleunigten Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus<sup>214</sup>.

Pim1 kann ebenfalls Cdc25C (*cyclin division cycle 25C*) phosphorylieren und somit dessen Aktivität steigern, sodass der Übergang von der G2/M-Phase zur G1-Phase des Zellzyklus eingeleitet wird<sup>19</sup>. Eine weitere Zielstruktur von Pim1 ist die Kinase c-TAK1 (Cdc25C-associated kinase 1), die über die Phosphorylierung durch Pim1 inaktiviert wird<sup>18</sup>. Dadurch wird die Phosphorylierung von Cdc25C durch c-TAK1 und somit dessen Inaktivierung verringert<sup>18,242</sup>.

Die Progression des Zellzyklus kann Pim1 darüber hinaus über die Phosphorylierung des Zellzyklusinhibitors p27 fördern<sup>218</sup>. Durch die Pim1-vermittelte Phosphorylierung von p27 erfolgt dessen Bindung an das Protein 14-3-3 sowie der nukleäre Export des Proteins und seine proteasomale Degradierung<sup>218</sup>.

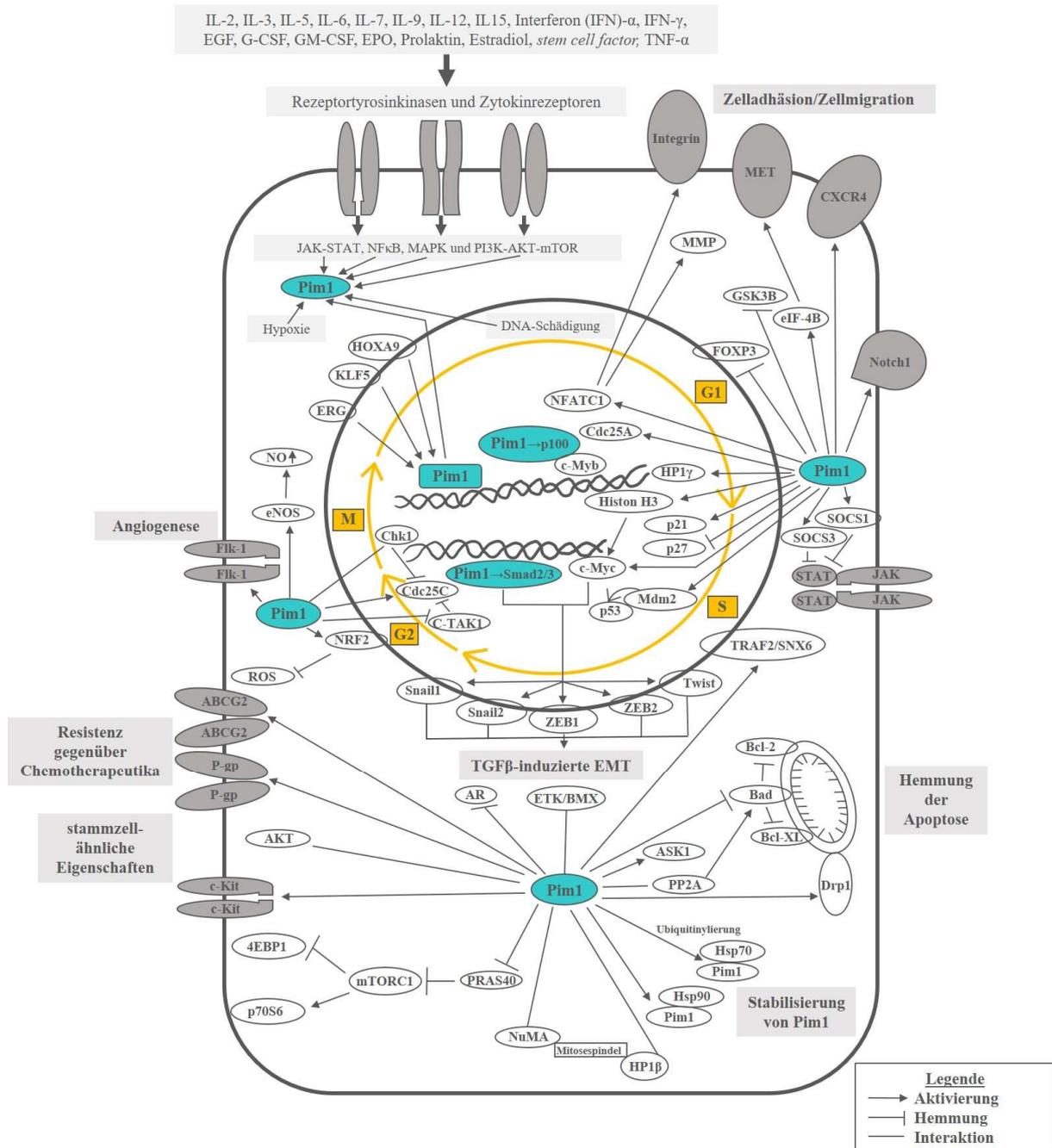
Pim1 interagiert und phosphoryliert auch den Zellzyklusinhibitor p21 an Threonin 145 oder Serin 146 mit unterschiedlichen Konsequenzen<sup>361</sup>. Durch die Phosphorylierung von p21 an Threonin 145 erfolgt dessen nukleäre Translokation, Stabilisation und eine Unterbrechung der Assoziation mit dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)<sup>361</sup>. Wird p21 an Serin 146 phosphoryliert, so bleibt p21 hingegen im Zytoplasma lokalisiert<sup>361</sup>.

Die Serin-Threonin-Kinase Chk1 (*checkpoint kinase 1*) kann durch Pim1 phosphoryliert und hinsichtlich ihrer Aktivität, unter anderem in Bezug auf den Zellzyklus, reguliert werden<sup>353</sup>.

Für Pim1 konnte während der Mitose an den Spindelpolen eine Assoziation mit dem Protein des nukleären mitotischen Apparates (*nuclear mitotic apparatus*; NuMA) sowie mit dem Heterochromatin-assoziierten Protein 1 $\beta$  (HP1 $\beta$ ) nachgewiesen werden<sup>28</sup>. Im Komplex mit NuMA kann Pim1 ebenfalls mit Dynein und Dynaktin interagieren<sup>28</sup>. Pim1 phosphoryliert darüber hinaus das Heterochromatin-Protein 1 $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) und kann dadurch auf die Chromatinstruktur Einfluss nehmen<sup>159</sup>.

Durch die Bildung eines Komplexes von Pim1 mit p100 sowie durch die Phosphorylierung von p100 wird eine Interaktion mit c-Myb vermittelt und dessen Aktivität stimuliert, die sich bei unreifen hämatopoetischen und lymphoiden Vorläuferzellen auf die Differenzierung und Proliferation auswirkt<sup>177</sup>. Dabei erfolgt die Regulation der Aktivität von c-Myb über die Phosphorylierung der DNA-Bindungsdomäne<sup>338</sup>.

Eine weitere Zielstruktur von Pim1 stellt der *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) dar, über dessen Phosphorylierung seine Stabilität reguliert und die JAK-STAT-Signalkaskade inhibiert werden kann<sup>61</sup>. Über die Interaktion mit SOCS1 und SOCS3 sowie die Phosphorylierung von SOCS3 durch Pim1 kann zudem die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT5 gehemmt werden<sup>241</sup>.



**Abb. 4: Schematische Darstellung zur Regulation der Expression und Stabilität der onkogenen Kinase Pim1 sowie zu Substraten von Pim1 und deren Kontext zu zellulären Prozessen** (Literatureinzelnachweise siehe 1.3.2, 1.3.3 sowie 83,139,344,365,366). Pim1 ist türkisfarben hinterlegt. In dunklem grau sind membranständige und in weiß intrazelluläre Proteine dargestellt. Die Zellzyklusphasen sind in orangebraun veranschaulicht.

Durch die Phosphorylierung von PRAS40 (*proline-rich AKT substrate 40 kDa*), eine von fünf Komponenten des mTORC1-Komplexes, kann Pim1 die Aktivität der mTOR-Signalkaskade regulieren und die Phosphorylierung von 4E-BP1 und p70S6-Kinase forcieren<sup>169,357</sup>. Pim1 kann des Weiteren die E3-Ubiquitinligase Mdm2 phosphorylieren und den p53-Signalweg induzieren<sup>128</sup>. Eine Korrelation zwischen der Expression von Pim1 und der an Serin 473 phosphorylierten proliferationsfördernden Kinase AKT1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden<sup>132,267</sup>.

Im Zusammenhang mit aggressiven Prostatakarzinomen wurde zudem eine Phosphorylierung des Androgenrezeptors (AR) durch Pim1 mit einhergehender Repression der Androgenrezeptor-vermittelten Transkription beschrieben<sup>116</sup>.

Pim1 nimmt auch Einfluss auf die Apoptosekaskade. Durch die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad (*Bcl-2-associated agonist of cell death*) durch Pim1 wird Bad reversibel inaktiviert und die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 sowie von Bcl-XL aktiviert<sup>5</sup>. Eine Hemmung der stressinduzierten Apoptose kann durch die Phosphorylierung von ASK1 (*apoptosis signaling kinase 1*) durch Pim1 hervorgerufen werden<sup>114</sup>. Als Folge dessen wird die ASK1-vermittelte Phosphorylierung von c-Jun und der Kinase p38 ebenso wie die Aktivierung von Caspase 3 unterbunden<sup>114</sup>.

Für Pim1 wurde außerdem eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3 im Zellkern sowie die Phosphorylierung beider Proteine beschrieben, die mit einer Steigerung der Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren wie ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*), ZEB2 (*zinc finger E-box binding homeobox 2*), Snail1, Snail2 und Twist einhergeht und zu einer TGF $\beta$ -induzierten epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), also einem Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, führt<sup>152,362</sup>. Die Pim1-vermittelte Phosphorylierung von c-Myc führt zu einer Stabilisierung von c-Myc und zu einer verstärkten transkriptionalen Aktivität, die konsekutiv ebenfalls die Expression der Transkriptionsfaktoren ZEB1, ZEB2, Snail1, Snail2 und Twist induzieren und eine Transformation der Tumorzellen vorantreiben kann<sup>360,362</sup>.

Zusätzlich ist bekannt, dass Pim1 den Transkriptionsfaktor NFATC1 (*nuclear factor of activated T-cells*) phosphorylieren und dessen transkriptionale Aktivität steigern kann, die sich auf die Aktivität von Matrixmetalloproteasen (MMP) sowie die Expression von Integrin  $\alpha 5$  und somit die Regulation der Zelladhäsion auswirken soll<sup>87,249</sup>.

Grundler et al. konnten nachweisen, dass Pim1 wichtig für die Oberflächenexpression von CXCR4 und die Migration von Zellen entlang eines CXCL12-Gradienten ist<sup>113</sup>. Darüber hinaus zeigten sie, dass Pim1 die intrazelluläre Domäne von CXCR4 phosphoryliert und dass primäre leukämische Blasten bei akuter myeloischer Leukämie neben einer hohen Expression von CXCR4 auch eine erhöhte Expression von Pim1 aufweisen, was mit einer erhöhten Retention im Knochenmark einhergeht<sup>44,113</sup>. Über die Phosphorylierung von Notch1 in der zweiten nukleären Lokalisationssequenz (NLS) der intrazellulären Domäne durch Pim1 wird eine nukleäre Lokalisation sowie eine erhöhte transkriptionale Aktivität von Notch1 herbeigeführt, die bei Prostatakarzinomen die Migration der Tumorzellen begünstigt<sup>274</sup>. Als weitere

Zielstrukturen von Pim1 konnten bezüglich einer Regulation von Zelladhäsion und -migration die Glycogensynthasekinase-3 $\beta$  (GSK3B) sowie der Transkriptionsfaktor *forkhead box P3* (FOXP3) identifiziert werden, deren tumorsuppressive Eigenschaften über die Phosphorylierung durch Pim1 herabgesetzt werden können<sup>275</sup>.

Des Weiteren kann Pim1 über die Phosphorylierung von eIF-4B (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4B) die Translation des Rezeptors MET, der ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Tumorzellmigration und Invasion spielt, regulieren<sup>54</sup>. Zudem wurde im Zusammenhang mit einer verstärkten MET-Expression eine erhöhte Expression von Stammzellmarker wie beispielsweise CD133, Sox2 (*SRY[sex-determining region Y]-box 2*) und Nestin in Glioblastomen beschrieben<sup>179</sup>.

Für Pim1 wurde zudem in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eine translationale Regulation von c-Kit (CD117) gezeigt, die zum Erhalt und zur Expansion deren Eigenschaften erforderlich ist<sup>9</sup>.

Interessant ist zudem, dass die Expression von Pim1 mit der Aktivierung von STAT3 und STAT5 sowie der Expression von P-Glycoprotein (P-gp)<sup>43</sup>, einem Efflux-Transporter der ABC-Familie, korreliert. Für P-gp konnte auch eine direkte Interaktion sowie Phosphorylierung durch Pim1 beschrieben werden, wobei dessen proteolytische und proteasomale Degradierung verhindert und seine Glykosylierung sowie membranäre Translokation eingeleitet wird<sup>343</sup>. Für Prostatakarzinome konnte gezeigt werden, dass die lange Isoform von Pim1 (Pim1L) eine membranäre Kollokalisierung mit ABCG2 aufweist und ABCG2 durch Pim1L phosphoryliert werden kann<sup>345</sup>. Damit kann Pim1 über die Regulation von ABC-Transportern Resistenzen gegenüber Tumorthérapeutika bewirken<sup>345</sup>. Ein weiterer Mechanismus, über den die Kinase Pim1 eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auslösen kann, wird über NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) sowie über eine Reduktion von ROS (*reactive oxygen species*) durch sogenannte ROS *scavenger proteins* vermittelt<sup>298</sup>. Pim1 kann darüber hinaus die Angiogenese über die Phosphorylierung von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) mit einhergehender gesteigerter Produktion von Stickstoffmonoxid beeinflussen<sup>60</sup>.

Insgesamt betrachtet vermittelt Pim1 somit pro-tumorigene Effekte wie Proliferation, Anti-Apoptose, Migration und Angiogenese. Daneben gibt es Hinweise, dass Pim1 auch eine Bedeutung im Rahmen des Stammzellgeschehens hat, was im folgenden Kapitel detailliert erläutert werden soll.

## 1.4 Stammzellen und Tumorstammzellhypothese

Zur Erhaltung der Gewebhomeostase, der lebenslangen Funktion und Flexibilität des Gewebes ist ein physiologischer, kontinuierlicher Umsatz von terminaldifferenzierten und reifen Zellen sowie die Genese von neuem Gewebe nach Schädigung unerlässlich<sup>31</sup>. Zur Genese neuer Zellen wird von einer hierarchischen Linienstruktur ausgegangen<sup>31</sup>. Die oberste Stufe der Zellhierarchie stellen sogenannte Stammzellen dar<sup>31</sup>. Stammzellen sind durch Proliferation, Selbsterneuerung, der Produktion einer hohen Anzahl an differenzierten, funktionellen Vorläuferzellen, die Regeneration von Gewebe nach Verletzung sowie die Flexibilität, diese Option zu nutzen, gekennzeichnet<sup>247</sup>. Gleichzeitig beschreiben Potten und Löffler ruhende Zellen, die keine Stammzellen darstellen, aber das Potenzial besitzen, sich in Stammzellen umzuwandeln<sup>247</sup>.

### 1.4.1 Neurale Stammzellen, Stammzellmarker und stammzellähnliche Tumorzellen (CSLC)

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Neurogenese des ZNS von Säugetieren mit der Geburt abgeschlossen ist<sup>258</sup>. Reynolds und Weiss gelang 1992 erstmals die Isolation von Zellen aus dem adulten Striatum von Mäusen, die *in vitro* zur Bildung und Proliferation von Neuronen und Astrozyten angeregt werden konnten<sup>258</sup>. Als weitere Areale der adulten Neurogenese werden die subventrikuläre Zone (SVZ), der Gyrus dentatus des Hippocampus, die weiße Substanz im Bereich des Großhirns, das Rückenmark, das Cerebellum, der Riechkolben und die subcallosale Zone beschrieben<sup>8,31,192,228</sup>. Es konnte bewiesen werden, dass proliferierende Zellen der SVZ neurale und gliale Vorläuferzellen bilden<sup>8</sup>. Diese können sich radial und über den RMS (*rostral migratory stream*) ausbreiten<sup>8</sup>. Sie werden als neurale Stammzellen (NSC) diskutiert und stellen eine heterogene Zellpopulation dar<sup>56,68</sup>. Charakterisiert werden NSC über sogenannte Stammzellmarker, wie beispielsweise CD133, Nestin und CD44<sup>175,194</sup>.

Unterschieden werden aktive NSC mit einer hohen Zellteilungsrate und einer Expression von CD133, Nestin, EGFR und GFAP von ruhenden NSC mit einer langsamen Kinetik und einer Expression von CD133 bei fehlender Expression von EGFR und Nestin, wobei ruhende NSC nach Aktivierung EGFR und Nestin exprimieren<sup>56,68</sup>. Die adulten NSC der SVZ können zusätzlich in multipotente Typ B-Zellen (GFAP<sup>+</sup>), Typ A-Zellen (sogenannte Neuroblasten; GFAP<sup>-</sup>, Dlx2<sup>+</sup>, Dcx<sup>+</sup>) und Typ C-Zellen (sich schnell teilende, transitamplifizierende, multipotente Vorläuferzellen) eingeteilt werden<sup>31,262</sup>. NSC zeichnen sich durch Selbsterneuerung aus und können durch Proliferation Vorläuferzellen sowie durch Differenzierung Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten bilden<sup>31,192,259,316,329</sup>. Die

Implantation von NSC in das Gehirn von Ratten und Mäusen zeigt die Generierung von kompetenten Neuronen und Gliazellen<sup>228,316</sup>. Oligodendrozytäre Vorläuferzellen können zudem durch Reprogrammierung multipotente NSC erzeugen, die im Anschluss wiederum Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten generieren können<sup>160</sup>.

Zur Identifizierung von Stammzellen wird unter anderem der Nachweis bestimmter Proteine, sogenannter Stammzellmarker wie beispielsweise CD133 und Nestin, herangezogen. CD133 (vormals AC133), ein Protein mit fünf Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von 97 kDa (glykosyliert: 120 kDa), wurde zunächst als Antigen auf CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen beschrieben<sup>212,351</sup>. Darüber hinaus wurde CD133 in humanen Stammzellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen, jedoch ohne gleichzeitige Expression von CD34<sup>316</sup>. Verschiedene Studien haben zudem einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD133 und der Chemoresistenz von Glioblastomen sowie dem Überleben der betroffenen Patienten gezeigt<sup>185,340,355</sup>. Der Stammzellmarker Nestin ist ein Typ VI Intermediärfilamentprotein, das erstmalig im ZNS von embryonalen Rattengehirnen nachgewiesen und mit schnell teilenden Vorläuferzellen der Neurogenese assoziiert wurde<sup>94,175</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Nestin im Hinblick auf die Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen eine entscheidende Rolle einnimmt<sup>236</sup>. Für Nestin wird ebenfalls eine Rolle am Überleben und der Proliferation von Tumorstammzellen diskutiert und seine Expression wird als prognostischer Faktor bei Gliomen angesehen<sup>302</sup>.

Basierend auf dem Nachweis von CD44, dem Rezeptor für das Glykoaminoglykan Hyaluronsäure, in adulten Stammzellen sowie embryonalen Vorläuferzellen wird CD44 ebenfalls als Stammzellmarker eingeordnet<sup>13,190,283</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass CD44 mit CD133 in stammzellartigen Glioblastom-Neurosphären co-exprimiert wird und dass eine Hemmung von CD44 die Tumorprogression in einem Glioblastom-Rattenmodell beeinträchtigt<sup>46,188</sup>.

Daneben werden zahlreiche weitere Proteine als neuronale Stammzellmarker diskutiert wie beispielsweise Sox2 (*SRY[sex-determining region Y]-box 2*)<sup>49,110</sup>. Sox2 erhält durch die Hemmung der neuronalen Differenzierung die Vorläufereigenschaften der Zellen aufrecht<sup>110</sup>. Eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Sox2 wurde ebenfalls in Glioblastompatientenproben nachgewiesen und konnte mit einer schlechten Prognose assoziiert werden<sup>101</sup>. Adulte und embryonale Stammzellen des ZNS sowie neuronale Vorläuferzellen können des Weiteren eine gesteigerte Expression von Musashi-1 (Msi-1) zeigen<sup>271-273</sup>. Musashi-1 fördert die Stammzeleigenschaften von Glioblastomzellen sowie deren migratorische Aktivität<sup>182,350</sup>.

Aufgrund der histologischen Ähnlichkeit von embryonalem Gewebe und Tumorgewebe vermutete Rudolph Virchow bereits 1855 in dem sogenannten hierarchischen Modell, das auch als Stammzellmodell bezeichnet wird, dass Tumoren von embryonalen Überbleibseln des Ursprungsgewebes ausgehen könnten<sup>105,248</sup>. Ähnlich wie Stammzellen besitzen sogenannte stammzellähnliche Tumorzellen (*cancer stem-like cells*, CSLC) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation und Bildung von Vorläuferzellen<sup>66,67,293</sup>. Dieses Modell kann insbesondere zur Erklärung von Tumorrezidiven genutzt werden<sup>248</sup>. Trotz vermeintlichem positiven Ansprechen des Patienten auf eine Therapie überleben CSLC als ruhende Zellen oder besitzen die Fähigkeit, sich von der Toxizität der Behandlung zu erholen<sup>248</sup>.

Es konnten CSLC beispielsweise bei akuter myeloischer Leukämie und aus soliden Tumoren wie Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen, Pankreaskarzinomen und Hirntumoren isoliert werden<sup>7,168,178,260,294</sup>. Ignatova et al. zeigten 2002, dass Gewebe von adulten kortikalen glialen Tumoren eine kleine Population an Zellen besitzen, welche die gleichen Charakteristika wie neurale Stammzellen aufwiesen<sup>136</sup>. Vergleichbar mit NSC werden bei CSLC heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlicher Proliferation und differenter Genexpression vermutet<sup>66,67,104,293,294</sup>. Ebenfalls wird die Aktivierung der gleichen Signalwege, wie beispielsweise Notch, Wnt, Shh, und der regulatorische Einfluss einer Stammzellnische auf NSC und CSLC diskutiert<sup>156,255</sup>.

Aufgrund des häufigen Auftretens des GBM in Regionen mit NSC könnten ruhende Typ B-Stammzellen der SVZ als tumorinitiierende Zellen fungieren, die Veränderungen in zellulären und genetischen Mechanismen aufweisen, welche die adulte Neurogenese kontrollieren<sup>105,293,322</sup>. Initial wurden CSLC beziehungsweise tumorinitiierende Zellen als CD133<sup>+</sup>- und Nestin<sup>+</sup>- sowie Neurosphären-bildende Zellen charakterisiert, wobei von Dahlstrand et al. bereits 1992 eine erhöhte Nestinexpression bei Glioblastomen beschrieben wurde<sup>74,294,295</sup>. Der Anteil von CD133 exprimierenden Zellen innerhalb eines GBM beträgt 19 bis 29 Prozent<sup>295</sup>. Nur 100 CD133<sup>+</sup>-Zellen sind ausreichend, um einen Tumor in NOD-SCID-Mäusen zu initiieren, der wiederum eine heterogene Expression von CD133 zeigt, während CD133-negative Zellen auch bei Injektion einer hohen Zellzahl von 10<sup>5</sup> bzw. 10<sup>6</sup> Zellen keine Tumoren bilden können<sup>295</sup>.

Neben CD133 und Nestin wurden, wie oben erwähnt, CD44, Sox2 und Musashi-1 im Zusammenhang mit stammzellähnlichen Eigenschaften von Hirntumoren beschrieben<sup>115,123,147,348</sup>.

CSLC des GBM können bezüglich ihres transkriptionalen Profils in Typ I- und Typ II-CSLC eingeteilt werden<sup>194</sup>. Typ I-CSLC zeichnen sich durch die hohe Expression von CD133,

PDGFR $\alpha$  und EGFR sowie von Sox2 und Dcx bei fehlender CD44-Expression aus und werden als proneuraler Typ bezeichnet<sup>194</sup>. Typ II-CSLC weisen eine erhöhte CD44-Expression bei fehlender Expression von CD133, Sox2, PDGFR $\alpha$  und Dcx auf, jedoch konnten Singh et al. nachweisen, dass die Fähigkeit von CD133 negativen Zellen zur Proliferation und Selbsterneuerung, eine Eigenschaft von Stammzellen, nicht gegeben ist<sup>194,294</sup>. Sie werden auch als mesenchymaler Typ bezeichnet<sup>194</sup>. Sowohl Typ I- als auch Typ II-CSLC ist die Expression von Nestin zu Eigen<sup>194</sup>. Die Ergebnisse von Expressionsanalysen lassen vermuten, dass Typ I-beziehungsweise Typ II-CSLC erworbene oder konservierte Eigenschaften vergleichbar mit fetalen oder adulten NSC haben<sup>194</sup>.

Undifferenzierte CSLC des GBM weisen ein ähnliches transkriptionales Profil wie fetale NSC auf<sup>45,194</sup>. Neben der Expression von Nestin, CD133 und Dcx weisen beide eine hohe Expression von EGFR und PDGFR $\alpha$  auf<sup>194</sup>.

Neben dem hierarchischen Modell existiert das sogenannte stochastische Modell der Tumorstammzellgenese<sup>248</sup>. Dieses Modell geht davon aus, dass der Tumor relativ homogen ist und jede Zelle eines Tumors zu einer tumorinitiierenden Zelle werden kann<sup>80,248</sup>.

### 1.5 Bedeutung von Pim1 im Stammzellgeschehen

Zur funktionellen Relevanz von Pim1 im Stammzellgeschehen existieren sowohl Studien in physiologischer als auch pathophysiologischer Hinsicht. Die onkogene Kinase Pim1 reguliert sowohl die Anzahl als auch die Funktion von murinen hämatopoetischen Stammzellen und embryonalen Stammzellen<sup>6,11</sup>, wobei hierzu keine humanen Studien vorliegen. Bislang existierten auch keine publizierten Daten zur Bedeutung von Pim1 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Glioblastom-Stammzellen, jedoch konnten Xie und Kollegen zeigen, dass Pim1-vermittelte Signalwege mit dem Auftreten von Stammzellen beim Prostatakarzinom assoziiert werden können<sup>342</sup>. Daneben wurde erst kürzlich nachgewiesen, dass die Überexpression von Pim1 bei Brust-, Gebärmutter- und Eierstockkrebs sowohl mit den inflammatorischen Eigenschaften als auch dem Stammzellprofil der Tumoren korreliert, während eine Hemmung von Pim1 die stammzellartigen Charakteristika der Brustkrebszellen vermindert<sup>148,186</sup>. Zudem ist bekannt, dass Pim1 mit der Proteinkinase AKT1 interagiert, für welche bereits eine Bedeutung hinsichtlich des Stammzellverhaltens von GBM-Zellen gezeigt wurde<sup>98,132,145,216,217</sup>. Basierend auf diesen Daten scheint eine Beteiligung von Pim1 an der Stammzellpopulation von Glioblastomen ebenfalls denkbar.

## 1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Das Glioblastom (GBM) ist ein WHO Grad 4-Tumor mit einer äußerst schlechten Prognose und einer medianen Überlebenszeit von 14,6 Monaten sowie einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung von nur 5,5 %<sup>232,306</sup>. Das GBM ist gekennzeichnet durch eine hohe zelluläre Proliferation, ein infiltratives Wachstum, Angiogenese und genetische Alterationen beispielsweise von *EGFR*, *PTEN* und *p16*<sup>198,230</sup>.

Zunehmend rücken sogenannte *cancer stem-like cells* in den Fokus einer antitumoralen Therapie, da diese für Tumorinitiation, Invasion und Migration sowie Therapieresistenz verantwortlich zu sein scheinen. Zudem stellen zielgerichtete Strategien gegen onkogen wirkende Proteine und Signalkaskaden eine wichtige Therapieoption bei Tumorerkrankungen dar.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Serin-Threonin-Kinase Pim1, deren Expression im GBM erhöht ist und deren Blockade sowohl *in vitro* als auch im *in vivo*-Mausmodell das Wachstum von GBM-Zellen beeinträchtigt<sup>124</sup>. Derzeit liegen jedoch noch keine Erkenntnisse zur Expression und Bedeutung von Pim1 in stammzell-ähnlichen GBM-Zellen vor.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der Serin-Threonin-Kinase Pim1 auf das Stammzellverhalten von GBM-Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde die anerkannte Glioblastomzelllinie LN-18 verwendet und die Expression von Pim1 und ausgewählten Stammzellmarkern (Nestin, CD133, CD44, Sox2 und Musashi-1) sowie dem Differenzierungsmarker (SPARC) analysiert. Die LN-18 Zellen wurden zunächst sowohl als adhärenz Kultur als auch als stammzellartige Neurosphären kultiviert und hinsichtlich der Expression von Pim1 und den obig genannten Stammzellmarkern verglichen. Die mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR und die Proteinexpression mithilfe von Western Blots und Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. Außerdem sollte der Einfluss eines siRNA-vermittelten Pim1-*knockdowns* auf die Expression von Stammzellmarker untersucht werden. Bei bereits nachgewiesener Reduktion der Viabilität von adhärenz wachsenden LN-18 Zellen nach Applikation von Pim1-Inhibitoren sollte in dieser Arbeit zudem der Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Blockade auf die Bildung und das Überleben von stammzellartigen Neurosphären analysiert werden<sup>124</sup>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tab. 1:** Auflistung der Chemikalien, welche im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verwendet wurden.

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Aceton, `BAKER ANALYZED`	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid 4x, analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent RPN 2235	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, U.K.
Ammoniumperoxodisulfat, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfate, analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aprotinin sc-3595	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.A.
Aprotinin (bovine lung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Biozidal ZF™	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts.
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau, ACS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
BSA US Origin Fraction V	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
CASY clean	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CASY ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMEM	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
DPBS (Dulbecco`s Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
ECL PLUS Western Blotting Reagenz	Thermo Scientific, Rockford, USA
EGF, Human Protein, Recomb., active	Sino Biological, Peking, China
Essigsäure (Eisessig) p.a.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Essigsäure 96 % ROTIPURAN®, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut, p. a.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Ethanol ROTIPURAN <sup>®</sup> , p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70 Vol.-% (MEK-vergällt)	Universitätsapotheke, Greifswald
Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum; FCS)	GIBCO <sup>®</sup> by life technologies <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Glow Writer <sup>™</sup> for Chemiluminescent & Radioisotope Autography	Diversified Biotech, Dedham, Massachusetts, U.S.A.
Stable Glutamine (200 mM)	PAN <sup>™</sup> -Biotech GmbH, Aidenbach
Glycerin ROTIPURAN <sup>®</sup> , p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin, PUFFERAN <sup>®</sup> , p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heparin-Lösung (0,2 %)	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln
Jung Tissue Freezing Medium <sup>®</sup> (Einbettmedium)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchloridlösung (3N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaninchenserum (steril filtriert)	PAN <sup>™</sup> -Biotech GmbH, Aidenbach
Leupeptin	Sigma Aldrich Co, Deisenhofen
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000 Reagent	Invitrogen AG by life technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Lipofectamine <sup>®</sup> LTX and PLUS <sup>™</sup> Reagent	Invitrogen AG by life technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
LIQUID BLOCKER SUPER PAP PEN	Daidoe Sangyo Co. Ltd. Tokyo, Japan
LY294002	Calbiochem, EMD Chemicals, Merck KGaA, Darmstadt; Inc. San Diego, U.S.A.
Lyoformin <sup>®</sup> 3000	Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin
Magermilchpulver (Skimmed Milk Powder)	Krüger GmbH & Co KG, Bergisch Gladbach
Mausserum (steril filtriert)	PAN <sup>™</sup> -Biotech GmbH, Aidenbach
MEM NEAA (100x)	PAN <sup>™</sup> -Biotech GmbH, Aidenbach
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (Ultra) Gradient HPLC Grade "BAKER HPLC ANALYZED"	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid, p. a.	Merck KGaA, Darmstadt

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Natronlauge (4N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NeuroCult™ NS-A Proliferation Kit (Human)	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln
Opti-MEM® I (1 x)	Gibco®, by life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Orthovanadat	Sigma Aldrich Co, Deisenhofen
Paraformaldehyd, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
Ponceau S solution BioReagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol, p.a.	CHEM SOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen
Protein Marker VI (10 - 245) prestained	AppliChem GmbH, Darmstadt
Puromycin dihydrochloride, 25 mg	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
Quercetagenin	Calbiochem, EMD Chemicals, Merck KGaA, Darmstadt; Inc. San Diego, U.S.A.
Rekombinantes humanes FGFb (AA 10-155)	Invitrogen AG, Gibco, Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
RNase-Inhibitor (2.000 U)	applied biosystems™ Inc., Forster City, Kalifornien, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Roti®-Mount FluorCare DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure, rauchend (37 Prozent)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (4N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS Pellets (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Stable Glutamine	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
TCS PIM1-1	Tocris biosciences, Wiesbaden Nordenstadt
TEMED, reinst	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trichlormethan/Chloroform ROTIPURAN® ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS, PUFFERAN®, Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS-hydrochlorid, p. a. (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100, analytic grade	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Trypsin/EDTA Solution	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck KGaA, Darmstadt
Ziegen Serum (Herkunft: Neuseeland)	GIBCO® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

## 2.1.2 Geräte und Materialien

**Tab. 2:** Verwendete Geräte und Materialien.

<u>Gerät/Material</u>	<u>Firma</u>
Adhesive Clear qPCR Seals, Sheets	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Alu-Folie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BD Discardit™ II, 20 ml	BD, Heidelberg
BIOBLOCK SCIENTIFIC	Thermolyne Corp., Dubuque, Texas, U.S.A.
Blotapparatur	Biometra®, Göttingen
Brutschrank	memmert, Schwabach
Brutschränke: Heraeus (mit Schüttler); Heraeus Function Line (ohne Schüttler)	Heraeus Instruments, Hanau
Capsulefuge TOMY PMC-060	BioSurplus, Inc., San Diego, Kalifornien, U.S.A.
CASY® Zellzählgerät	Innovatis AG, CASY-Technology, Reutlingen
Centrifuge 5430 R Rotor: F-35-6-30 Rotor: FA-45-24-11-HS	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Centrifuge 5804 R Rotor: A-4-44 für 50 ml- und 25 ml- Reaktionsgefäße Rotor: A2-MTP für Mikrotiterplatten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Cryo.S™, 2 ml (Kryoröhrchen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cryo-Tech 1500 Series – 190, MVE Tec 3000 (Stickstofftank)	Cryo-Tech, Geilnau
Deckgläser 14 mm Ø	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda- Königshofen
Deckgläser 24 mm x 24 mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Deckgläser 24 mm x 50 mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

<u>Gerät/Material</u>	<u>Firma</u>
Domed Cap Strips	peqlab, VWR Life Science Competence Center, Heidelberg; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
epT.I.P.S. <sup>®</sup> Standard 2 µl - 200 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
epT.I.P.S. <sup>®</sup> Standard 50 µl- 1.000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Explorer Waage	OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Falcon <sup>®</sup> 15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube	Corning Science Mèxica S. A. de C. V., Tamaulipas, México
Falcon <sup>®</sup> 50 ml Polypropylene Conical Tube	Corning Science Mèxica S. A. de C. V., Tamaulipas, México
Feather <sup>®</sup> Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Feather <sup>®</sup> Microtome Blades A35 Type	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Feinwaage M-pact	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen
Feuchte Kammer	Simport <sup>®</sup> , 2588 Bernard-Pilon Beloeil, QC J3G 4S5, Canada
Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM780	Carl Zeiss, Jena
96F Without Lid SH Microwell Plate nunc <sup>™</sup>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde Denmark; Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Galaxy MiniStar (Tischzentrifuge)	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Gefrierschrank LIEBHERR Premium (-20 °C)	Lauda Dr. K. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Gefrierschrank Sanyo ULTRA-LOW	EWALD Innovationstechnik GmbH, Rodenberg
Heizrührgerät IKA <sup>®</sup> RT 5 Power	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Heraeus FRESCO 21 (Zentrifuge) Rotor: Ch. 500030PP, 75003424	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Heraeus instruments BBD 6220 (Inkubator)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Heraeus Multifuge 3S-R (Zentrifuge) Rotor: Ch. 011675, S1442 (96-Kavitäten-Platten)	Thermo Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
HeraSafe KS Typ KS 12 (Sterilbank)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

<u>Gerät/Material</u>	<u>Firma</u>
ImageQuant™ TL	Amersham Biosciences Corp, Piscataway, New Jersey, U.S.A.
Julabo SW22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kryotom Leica CM 1900	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
KuF LAB LABO PORT (Absaugpumpe)	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Kühlschrank LIEBHERR Komfort (5 °C)	Lauda Dr. K. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Küvetten	Glaswerk, Wertheim
Magnetrührgerät MR3001	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
membraPure	membraPure GmbH, Henningsdorf/Berlin
MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml) (RT-PCR)	applied biosystems by life technologies™, Forster City, Kalifornien, U.S.A. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Mikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Minisart® (PESv0,22)	Sartorius stedim biotech GmbH, Göttingen
Minisart® (0,45 µm)	Sartorius stedim biotech GmbH, Göttingen
Mini Star silverline Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.
NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene Nunc International Corporation, Rochester, New York, U.S.A.
Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nikon Eclipse TS 100 (Mikroskop)	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
OM Oriental Motor	Oriental Motor Europa GmbH, Düsseldorf
Parafilm "M" Laboratory Film	American National Can™, Chicago, U.S.A.

<u>Gerät/Material</u>	<u>Firma</u>
Pasteurpipetten (150 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Pinzette	F.S.T. Fine Science Tools, Heidelberg
Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter pHenomenal	VWR, Darmstadt
Plattenschüttler Titramax	Heidolph, Schwabach
Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly-Clark® Professional, Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen; Kimberly-Clark® Professional, Roswell, U.S.A.
Precision-Capillary, 60 µm	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Precision-Capillary, 150 µm	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primo Vert (Mikroskop)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
QuantStudio 12K Flex ( <i>TaqMan</i> ® PCR-Gerät)	applied biosystems by life technologies™, Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
ratiolab® Pipettenspitzen 100 µl – 1000 µl	ratiolab® GmbH, Dreieich
Rührgerät MR1000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 500 EPPENDORF TUBES®	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 500 EPPENDORF TUBES®	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Safe-Lock Tubes 2,0 ml, 500 EPPENDORF TUBES®	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
SafeSeal SurPhob® Spitzen, 10 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
SafeSeal SurPhob® Spitzen, 100 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
SafeSeal SurPhob® Spitzen, 1.000 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Schüttler Rocking Platform Standard Wipptisch WT 15	Biometra® GmbH, Göttingen

Gerät/Material	Firma
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	Biometra® GmbH, Göttingen
Serologische Pipette 2 ml	Falcon®, Corning Incorporated - Life Science, Dunham, U.S.A.
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Software Axio Vision Documentation	Carl Zeiss Vision, Jena
Software EndNote™ X7.8	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main
Software GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, U.S.A.
Software i-control 1.6 (for infinite reader)	Tecan GmbH, Crailsheim
Software ND-1000 V3.8.1	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Software Microsoft® Office	Microsoft, Redmond, U.S.A.
Software PalmRobo V4.5, Axio Vision RE. 4.8	Carl Zeiss Vision, Jena
Software Quantity One®	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.
Spritze (2 ml; BD Discardit™ II)	BD, Heidelberg
Spritze (20 ml/Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze (60 ml): Omnifix® 50 ml Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Standard 96 Well PCR Plate	peqlab, VWR Life Science Competence Center, Heidelberg; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Standard Power Pack 25	Biometra®, Göttingen
Stripping-Apparatur Compact Line OV4	Biometra®, Göttingen
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
TC-Platte, 96 Vertiefungen	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Tecan infinite M200	Tecan GmbH, Crailsheim
T100 Thermal Cycler (cDNA-Synthese)	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.

<u>Gerät/Material</u>	<u>Firma</u>
Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Tissue-Tek <sup>®</sup> Cryomold <sup>®</sup> Biopsy 10 mm x 10 mm x 5 mm	Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, U.S.A.
Vacuubrand CVC 3000 (Absaugpumpe)	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim
Vortexer Reax control	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
VWR ULTRASONIC CLEANER (Ultraschallbad)	VWR International GmbH, Darmstadt; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Whatman <sup>™</sup> Protran BA 83, 0,2 µm	GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, U.K.
WTC binder (Trocken- und Wärmeschrank)	BINDER, Tuttlingen
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen (Multiwell 6 Well)	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturplatte, 12 Vertiefungen (MULTIWELL <sup>™</sup> 12 well)	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturplatte, 24 Vertiefungen (Multiwell 24 Well)	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturschale (150 mm x 25 mm)	Falcon <sup>®</sup> , Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande

### 2.1.3 Medien

**Tab. 3:** Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.

<u>Medium</u>	<u>mit Zusatz von (nach Herstellerangaben)</u>
DMEM	4,5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, L-Glutamin, 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat
NeuroCult™	Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben
Opti-MEM® I (1 x)	reduziertes Medium, Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben
RPMI 1640	L-Glutamin, 2,0 g/l Natriumhydrogencarbonat

### 2.1.4 Zelllinien

Die nachfolgend beschriebenen Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, U.S.A.) bezogen und wurden vor der Verwendung in flüssigem Stickstoff (zwischen -184,9 °C und -192,1 °C) gelagert (Cryo-Tech 1500 Series – 190, MVE Tec 3000; Cryo-Tech, Geilnau).

#### Die Zelllinie LN18

Die LN-18 Zelllinie wurde aus dem rechten Temporallappen eines 61 Jahre alten, männlichen Patienten generiert<sup>84</sup>. Morphologisch präsentieren sich die adhärent wachsenden epithelialen Zellen als bi- oder tripolar, stellenweise sternförmig und zeigen einen prominenten Nukleolus<sup>84</sup>. LN-18 Zellen weisen eine *TP53*-Mutation (TGT(Cys)→TCT(Ser)) im Codon 238<sup>93,238</sup> sowie Gen-Mutationen von *PTEN*<sup>238</sup>, *ADAM 29*<sup>238</sup>, *MLL3*<sup>238</sup>, *MLL4*<sup>238</sup>, *BRCA2*<sup>238</sup>, *ERCC*<sup>238</sup> auf und zeigen sich negativ gegenüber GFAP<sup>84</sup> und S100<sup>84</sup>. Im Vergleich zu anderen Glioblastom-Zelllinien weisen LN-18 Zellen einen unmethylierten *MGMT*-Gen-Promoter auf und dementsprechend eine erhöhte Expression von *MGMT*<sup>65,323</sup>. Die LN-18 Zellen wurden bei 37 °C, einem atmosphärischen Luftgehalt von 95 % sowie einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % in *Dulbecco`s modified Eagle`s medium* (DMEM) versetzt mit 10 % FCS inkubiert<sup>84</sup>.

#### Die Zelllinien K562 und PC-3

Für die Etablierung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurde auf K562- und PC-3 Zellen aufgrund ihrer hohen Expression von Pim1 zurückgegriffen<sup>14</sup>. Zusätzlich zeigen PC-3 Zellen eine deutliche Expression von Nestin<sup>15</sup>.

Die Zelllinie K562 wurde aus dem Knochenmark einer 53-jährigen Patientin mit einer Blastenkrise einer chronischen myeloischen Leukämie isoliert<sup>69,158</sup>. Morphologisch zeigt sich die als Suspension vorliegende Zelllinie als undifferenzierte Blasten<sup>69,158</sup>. Die K562-Zellen

wurden bei 37 °C, einem atmosphärischen Luftgehalt von 95 % sowie einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % inkubiert<sup>69</sup>.

Die Zelllinie PC-3 wurde aus dem Knochen eines 62-jährigen Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom der Prostata (Grad IV) isoliert<sup>70</sup>. Die Zellen dieser Zelllinie sind adhären wachsend und wurden bei 37 °C, einem atmosphärischen Luftgehalt von 95 % sowie einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % in RPMI-Medium versetzt mit 10 % FCS inkubiert<sup>70</sup>.

### 2.1.5 Kits

**Tab. 4:** Auflistung der verwendeten Kits und Assays.

<u>Kits</u>	<u>Firma</u>
Control Double Nickase Plasmid: sc-437281	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
control siRNA-A sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	applied biosystems™, Weiterstadt; Warrington Cheshire, U.K.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
peqGOLD RNApure™	peqlab, Erlangen; VWR Life Science Competence Center, Heidelberg; Avantor Performance Materials, LLC. Global Headquarters, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, U.S.A.; Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Pim-1 Double Nickase Plasmid (h): sc-400376	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
Pim-1 siRNA Kit	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, U.S.A.
Resazurin-Lösung	PromoCell GmbH, Heidelberg
TaqMan® Gene Expression Mastermix	applied biosystems™, Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

## 2.1.6 Primer und Sonden (*TaqMan*<sup>®</sup>-Assay)

**Tab. 5:** Verwendete *TaqMan*<sup>®</sup>-Assays on Demand (Fa. Applied Biosystems<sup>™</sup>, Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.).

<u>Gen/Zielstruktur</u>	<u>Primer/Sonden-Assay</u>	<u>Reporterfarbstoff</u>
β-Aktin	4310881E-0910026	VIC-TAMRA
CD44	Hs01075861_m1	FAM
EGFR	Hs01076068_m1	FAM
GAPDH	Hs02758991_g1	FAM
MSI1	Hs00159291_m1	FAM
NES	Hs04187831_g1	FAM
PIM1	Hs01065498_m1	FAM
PIM2	Hs00179139_m1	FAM
PIM3	Hs00420511_g1	FAM
PROM1 (CD133)	Hs01009250_m1	FAM
18S rRNA	Hs03003631_g1	FAM
SPARC	Hs00234160_m1	FAM
TBP	Hs00427620_m1	FAM

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen und Western Blots

**Tab. 6:** Verwendete primäre Antikörper.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Molekulargewicht des Zielproteins</u>	<u>Firma</u>
Anti-CD44 (156-3C11)	Maus	monoklonal	80 kDa	Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A.
Anti-CD133 (17A6.1)	Maus	monoklonal	~97 kDa	Merck Millipore, Temecula, California, USA; Merck KGaA, Darmstadt
Anti-CD133 (NBP2-44248)	Kaninchen	polyklonal	~97 kDa	NOVUS BIOLOGICALS, Littleton, CO, U.S.A.
Anti-GAPDH (B2534M und B2463M)	Maus	monoklonal	~ 36 kDa	Meridian Life Science <sup>®</sup> , Inc. Memphis, USA
Anti-Musashi-1 (D46A8) XP(R)	Kaninchen	monoklonal	35 kDa	Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Molekulargewicht des Zielproteins</u>	<u>Firma</u>
Anti-Nestin (AMO5803PU-M)	Maus	monoklonal	~ 220 kDa – 250 kDa	Acris Antibodies GmbH, Herford
Anti-Nestin (10C2)	Maus	monoklonal	~ 220 kDa – 250 kDa	BioLegend, Inc., San Diego, Kalifornien, U.S.A.
Anti-Nestin (G-20)	Ziege	polyklonal	~ 220 kDa – 250 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
Anti-Nestin (10C2)	Maus	monoklonal	~ 220 kDa – 250 kDa	StemCell Technologies Germany GmbH, Köln
Anti-Pim1 (EP2645Y)	Kaninchen	monoklonal	~ 34 kDa ~ 44 kDa	abcam®, Cambridge, UK
Anti-Pim1 (C93F2)	Kaninchen	monoklonal	~ 34 kDa ~ 44 kDa	Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A.
Anti-Pim1 (LS-C164530)	Kaninchen	polyklonal	~ 34 kDa ~ 44 kDa	LS Bio, LifeSpan Technologies, Inc, Seattle, Washington, U.S.A.
Anti-Pim1 (E-16)	Ziege	polyklonal	~ 34 kDa ~ 44 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.
Anti-Sox2 (L1D6A2)	Maus	monoklonal	35 kDa	Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A.
Anti-SPARC (D10F10)	Kaninchen	monoklonal	42 kDa	Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A.

### 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper für Western Blots

**Tab. 7:** Verwendete sekundäre Antikörper für Western Blots.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Firma</u>
Anti-Kaninchen	Ziege	HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Anti-Maus	Ziege	HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Anti-Ziege	Pferd	HRP	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, U.K.

### 2.1.7.3 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

**Tab. 8:** Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbungen.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Firma</u>
Anti-Kaninchen	Esel	Alexa-Fluor® 568	life technologies™, Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Firma</u>
Anti-Kaninchen	Huhn	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488	invitrogen MOLECULAR PROBES <sup>®</sup> , Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 568	life technologies <sup>™</sup> und invitrogen MOLECULAR PROBES <sup>®</sup> , Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Anti-Maus	Huhn	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488	life technologies <sup>™</sup> und invitrogen MOLECULAR PROBES <sup>®</sup> , Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Anti-Maus	Ziege	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488	life technologies <sup>™</sup> und invitrogen MOLECULAR PROBES <sup>®</sup> , Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Anti-Ziege	Esel	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 568	life technologies <sup>™</sup> , Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Anti-Ziege	Huhn	Alexa-Fluor <sup>®</sup> 488	life technologies <sup>™</sup> und invitrogen MOLECULAR PROBES <sup>®</sup> , Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Aprotinin	3 µg Aprotinin ad 1 ml Aqua dest.
Blockierungspuffer Immunfluoreszenz	5 % Serum 0,3 % Triton-X-100 in PBS (1X)
Blockierungspuffer Western Blot (5 %-ig)	5 g Magermilchpulver ad 100 ml TBST (1X)

dNTP-Lösung	100 µl 100 mM dATP 100 µl 100 mM dCTP 100 µl 100 mM dGTP 100 µl 100 mM dTTP ad 1 ml Aqua ad iniectabilia
Kulturmedium DMEM	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % Glutamin 1 % NEAS
Kulturmedium NeuroCult™	50 ml NeuroCult™ NSC Basal Medium 5 ml NeuroCult™ Proliferation Supplement 50 µl Heparin [2 mM] 10 µl rh bFGF [Endkonzentration: 10 ng/ml] 10 µl rh EGF [Endkonzentration: 20 ng/ml]
Kulturmedium RPMI 1640	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5,5 ml Glutamin 5,5 ml NEAS
Laemmli-Puffer (4x)	4 ml Tris-HCl [0,5 M], pH 6,8 1,2 g SDS 4 ml Glycerin eine Spatelspitze Bromphenolblau 0,4 g DTT ad 20 ml Aqua dest.
Leupeptin [1 mM]	2 mg Leupeptin ad 14 ml Aqua dest.

Lysepuffer-Stammlösung pH 7,4	0,606 g Tris-HCl [50 mM] 0,584 g NaCl [100 mM] 100 µl Triton X-100 (0,1 %) 2,5 ml EDTA [5 mM] ad 100 ml Aqua dest.
Lysepuffer zur Proteinaufarbeitung	1 µl Leupeptin (1 M; Cysteinproteaseinhibitor <sup>195</sup> ) 1 µl Aprotinin (1 M; Serinproteaseinhibitor <sup>195</sup> ) 1 µl Orthovanadat (250 µg/ml; Phosphataseinhibitor) ad 1 ml Lysepuffer-Stammlösung pH 7,4
PBS (10X) pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l Aqua dest.
PBS (1X) pH 7,4	100 ml PBS (10X) ad 1 l Aqua dest.
Sammelgelpuffer pH 6,8 (Western Blot)	7,8 g Tris-HCl [0,5 M] ad 100 ml Aqua dest.
SDS (10 %-ig)	1 g SDS ad 10 ml Aqua dest.
Stripping-Puffer-Stammlösung pH 6,8	7,57 g Tris-Ultra [62,5 mM] 20 g SDS ad 1 l
Stripping-Puffer pH 6,8	350 µl β-Mercaptoethanol 50 ml Stripping-Puffer-Stammlösung

Tank-Puffer (10X; Western Blot)	60 g Tris-Base 288 g Glycin 20 g SDS ad 2 l Aqua dest.
TBS-Puffer (10X) pH 7,4	30 g Tris-Ultra 80 g NaCl 2 g KCl ad 1 l Aqua dest.
TBS-Puffer (1X) pH 7,4	100 ml TBS-Puffer (10X) ad 1 l Aqua dest.
TBST (1X)	400 µl Tween 20 ad 1 l TBS (1X)
Towbin-Puffer (10X)	30,3 g Tris-HCl 144 g Glycin ad 1 l Aqua dest.
Trenngelpuffer pH 8,8 (Western Blot)	59,1 g Tris-HCl ad 250 ml Aqua dest.
Triton-X-100 (0,1 %)	1 ml Triton-X-100 ad 1 l PBS
Tris-Puffer [5 mM] pH 7,4	60,57 mg Tris-Base ad 100 ml Aqua dest.
Verdünnungspuffer für Antikörper (Immunfluoreszenz)	1 % BSA 0,3 % Triton-X-100 in (1 X) PBS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von sterilen Materialien und vorgewärmten, sterilen Medien und Lösungen an einer Sterilwerkbank (HERASAFE KS, Fa. Thermo Scientific) bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Anlegen einer Zellkultur

Soweit nicht schon eine Stammflasche mit Zellen vorhanden war, wurden Zellen der entsprechenden Zelllinie aus einem zwischen  $-184,9\text{ °C}$  und  $-192,1\text{ °C}$  (in flüssigem Stickstoff) gelagerten Kryogefäß aufgetaut (Cryo-Tech 1500 Series – 190, MVE Tec 3000; Cryo-Tech, Geilnau) und mit DMEM-Medium (LN-18 Zellen, K562-Zellen) oder RPMI-Medium (PC3) versetzt mit einer Penicillin-Streptomycin-Lösung in einer Endkonzentration von 1:1.000 überführt. Nach lichtmikroskopischer Sichtkontrolle und einem erneuten Mediumwechsel nach 2-3 Stunden (h) wurden die Zellen nach konfluentem Wachstum und erneuter Passagierung für die weiteren Experimente verwendet.

#### 2.2.1.2 Passagierung von adhärenenten Zellen

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Stammflaschen (Zellkulturflasche  $75\text{ cm}^2$ ) bzw. der 6-Kavitäten-Platte wurden das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) 10 ml in der Zellkulturflasche ( $75\text{ cm}^2$ ) und 2 ml je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte) gewaschen. Nach Entfernung des DPBS von den Zellen, wurden diese mit 3 ml Trypsin-Lösung für die Zellkulturflasche und 300  $\mu\text{l}$  Trypsin-Lösung je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte für 3 min bis 5 min bei  $37\text{ °C}$  versetzt, gefolgt von einer lichtmikroskopischen Sichtkontrolle. Die Trypsinreaktion wurde mit 7 ml (Zellkulturflasche) beziehungsweise 1 ml Medium (je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte) abgestoppt. Nachdem 20 ml frisches Medium in eine neue Zellkulturflasche vorgelegt wurden, erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension.

Für weiterführende Experimente wurden die übrigen Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9), mit DPBS gewaschen, erneut zentrifugiert (Fa. Eppendorf,

5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. 50 µl der resuspendierten Zellen wurden mit 10 ml Casyton<sup>®</sup>-Lösung versetzt und die Zellzahl mithilfe des Zellzählgerätes Casy<sup>®</sup> (Fa. Innovatis AG, Reutlingen) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Grundlage einer Widerstandsmessung<sup>281</sup>. In eine Messkapillare, an der eine Spannung angelegt ist, wird ein Aliquot der Zellsuspension angesaugt<sup>281</sup>. Passiert eine Zelle die Messpore, wird über die Auslösung eines elektrischen Impulses eine Änderung des Widerstandes herbeigeführt<sup>281</sup>.

Für die gewünschte Zellzahl pro Vertiefung und Anzahl der Kavitäten wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits das erforderliche Restvolumen an DMEM für adhärente Zellen und NeuroCult<sup>™</sup>-Medium zur Generierung von stammzellähnlichen Zellen vorgelegt wurde. Nach erneuter Resuspension der Zellen wurden diese mit 2 ml je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte verteilt.

Zur Bestimmung der Zellzahl bei der Passagierung von Zellen in 6-Kavitäten-Platten wurden diese nach dem Abstoppen der Trypsinierungsreaktion von der Platte abgenommen und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation der Zellen, Waschen mit DPBS, erneuter Zentrifugation und Resuspension der Zellen in 10 ml DMEM wurden 50 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton<sup>®</sup>-Lösung überführt, resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät (Fa. Innovartis AG, Reutlingen) bestimmt. Für die gewünschte Zellzahl pro Vertiefung und Anzahl der Kavitäten wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits das erforderliche Restvolumen an Medium vorgelegt wurde. Nach erneuter Resuspension der Zellen wurden diese mit 2 ml je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte verteilt.

Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9), der Überstand abgesaugt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.3 Passagierung von Neurosphären

Zur Passagierung von Neurosphären wurden aus jeder Vertiefung der 6-Kavitäten-Platte zunächst 750 µl der Zellsuspension abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden mit der verbliebenen Menge an Medium die Neurosphären mit einer serologischen Pipette abgespült und die Vertiefung zusätzlich mit 1 ml DPBS gespült, um eine möglichst große Anzahl an Neurosphären der Passagierung zuzuführen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9) wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest von etwa 100 µl abgesaugt und

die Zellen der Neurosphären durch Auf- und Abpipettieren (mindestens 150 x) mit einer auf 80 µl eingestellten Pipette resuspendiert, um eine optimale Vereinzelung der Zellen zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml NeuroCult™-Medium. Nach Zugabe von 50 µl der Zellsuspension zu 10 ml Casyton®-Lösung und anschließender Resuspension der Zellen wurde die Zellzahl mithilfe des Zellzählgerätes (Fa. Innovartis AG, Reutlingen) bestimmt.

Für die gewünschte Zellzahl pro Vertiefung und Anzahl der Kavitäten wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits das erforderliche Restvolumen an NeuroCult™-Medium vorgelegt wurde. Nach erneuter Resuspension der Zellen wurden diese mit 2 ml je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte verteilt. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9), der Überstand abgesaugt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.1.4 siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1

Zur Untersuchung der Effekte eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von Pim1 auf die Expression von Stammzellmarkern wurden adhärente LN-18 Zellen (75.000 Zellen je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte) und Neurosphären der Passagen 1 und 2 (500.000 Zellen je Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte) ausgesät. Nach lichtmikroskopischer Sichtkontrolle der Zellen und der Feststellung einer Konfluenz von circa 70 % bei den adhärennten LN-18 Zellen waren die Voraussetzungen für den siRNA-vermittelten *knockdown* gegeben. Es erfolgte die Transfektion der Zellen mit Lipofectamine®LTX & PLUS™ Reagenz in Opti-MEM (Gibco® by life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) nach Standardprotokoll mit einer Endkonzentration der Pim1-siRNA (Fa. OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, U.S.A.) und der Kontroll-siRNA (Fa. OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, U.S.A.; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.) von 30 nM. Dazu wurde das Lipofectamine®LTX-Reagenz in Opti-MEM vorverdünnt. Separat davon wurde das PLUS™-Reagenz ebenfalls gemeinsam mit der entsprechenden Menge siRNA in Opti-MEM vorverdünnt. Beides wurde anschließend 5 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Anschließend wurde das Lipofectamine®LTX-Opti-MEM-Gemisch zum PLUS™-Reagenz mit der siRNA gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die adhärennten LN-18 Zellen mit DPBS gewaschen und in Opti-MEM überführt, während die Neurosphären weiter in NeuroCult™-Medium inkubiert wurden.

Es erfolgte anschließend eine tropfenweise Zugabe des Transfektionsreagenzes und die Inkubation der Zellen für 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Danach wurde das Medium von den adhären Zellen abgenommen, neues DMEM-Medium hinzugefügt und die Zellen nach 24 h retransfiziert. Die Neurosphären wurden ohne Mediumwechsel weiter bei 37 °C inkubiert und ebenfalls nach 24 h retransfiziert. Nach weiteren 24 h beziehungsweise 48 h erfolgte die Zellernte zur Analyse der RNA- beziehungsweise Proteinexpression wie unter 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben.

#### 2.2.1.5 Pim1-Inhibition bei Neurosphären

Um die Bedeutung von Pim1 im Hinblick auf stammzellähnliche LN-18 Zellen (Neurosphären) zu untersuchen, wurden diese nach 7-tägiger Kultivierung in NeuroCult™-Medium, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, passagiert und in 6-Kavitäten-Platten (200.000 Zellen je Vertiefung) in jeweils 2 ml NeuroCult™-Medium ausgesät und das Medium mit den folgenden Inhibitoren versetzt: dem dualen Pim1- und PI3K-Inhibitor<sup>143</sup> LY294002 (Endkonzentration: 50 µM; Fa. Calbiochem, Bad Soden), dem selektiven Pim1-Inhibitor<sup>130</sup> QT (Endkonzentration 50 µM; Fa. Calbiochem, Bad Soden), dem spezifischen Pim1-Inhibitor<sup>62</sup> TCS Pim1-1 (Endkonzentrationen: 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 5 µM, 1 µM; Fa. Tocris biosciences, Wiesbaden Nordenstadt) und dem Standardtherapeutikum Temozolomid (100 µM; Sigma Aldrich, München) sowie mit DMSO (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) als Kontrolle. Zum Erhalt der Dosis wurde das Medium der Zellen erneut am Tag 3 und Tag 5 mit den gleichen Konzentrationen der Inhibitoren beziehungsweise DMSO versetzt.

Die 6-Kavitäten-Platten wurden an den Tagen 3, 5 und 7 mit dem Axio Observer Z1 (Fa. Carl Zeiss, Jena) unter Nutzung der Software PalmRobo V4.5, Axio Vision RE. 4.8 und Axio Vision Documentation gescannt und dokumentiert, wobei in dieser Arbeit exemplarisch die Ergebnisse für die Tage 3 und 7 (DMSO, LY294002, QT, TCS Pim1-1 und Temozolomid) bzw. für die Tage 5 und 7 (DMSO und verschiedene Endkonzentrationen von TCS Pim1-1) gezeigt wurden. Anschließend wurden die Zellen an Tag 7 in einem Zellviabilitätsassay (vergleiche 2.2.1.6) analysiert.

#### Lichtmikroskopische Auswertung

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden jeweils 16 Quadranten in der Mitte der Vertiefungen festgesetzt. Es erfolgte eine Analyse des Durchmessers der Neurosphären in Mikrometern mit der Axio Vision Software von Zeiss (Axio Vision SE 64 Rel. 4.9, Carl Zeiss, Jena). Dazu wurde der Maßstabsbalken des Mikroskops als µm-Maßstab in der Software festgelegt.

### 2.2.1.6 Zellviabilitätsassay

Zellviabilitätsassays beruhen auf der Grundlage, dass entweder nur vitale oder nur tote Zellen Farbstoffe aufnehmen beziehungsweise nur vitale Zellen den aufgenommenen Farbstoff verstoffwechseln können.

Basierend auf der Reduktion des blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoffs Resazurin zum roten, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin in vitalen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Viabilität der Zellen getestet, wobei sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl der vitalen Zellen verhält<sup>310,315</sup>.

Die Messung der Zellviabilität erfolgte 7 Tage (d) nach der Gabe der Inhibitoren mithilfe des Tecan infinite M200 (Fa. Tecan GmbH, Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. In Vorbereitung der Messung wurden unter sterilen Bedingungen die Neurosphären aus den Vertiefungen einer 6-Kavitäten-Platte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (Fa. Heraeus, FRESCO 21, 6.000 rpm, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde vom Zellpellet abgesaugt und die Zellen jeweils in frischem, sterilem NeuroCult™-Medium versetzt mit 10 % Resazurin (PromoCell, Heidelberg) resuspendiert und als Triplikate von jeweils 100 µl in eine 96-Kavitäten-Platte überführt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messungen der Fluoreszenz von Resorufin erfolgte nach 1,5 h, 2 h und 3h, wobei in der vorliegenden Arbeit exemplarisch das Ergebnis nach 2 h gezeigt wurde. Zusätzlich wurde eine Leerwert-Bestimmung ohne Zellen mitgeführt, um eine Verfälschung der Messung durch die Eigenfluoreszenz des Mediums beziehungsweise den Reaktionsprodukten des Mediums mit der Resazurin-Lösung zu verhindern. Der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensität des Leerwertes wurde von allen erhobenen Messwerten abgezogen.

### 2.2.1.7 Pim1-*knockout* mit dem CRISPR-Cas-System

Das von Ishino et al. 1987 in *Escherichia coli* K12 entdeckte CRISPR-Cas-System ist ein Zwei-Komponenten-System, das in rund 45 % aller Bakterien- und rund 90 % der Archaeengenome vorkommt und als adaptives Immunsystem für Prokaryonten dient<sup>126,127,141,142,320</sup>. Es besteht aus alternierenden identischen *repeats* (Wiederholungen) und einem einzigartigen *spacer* (Platzhalter), dessen Sequenz sich homolog zu der von mobilen genetischen Elementen, wie beispielsweise Bacteriophagen, Prophagen und Plasmide, verhält<sup>126,127,141</sup>. Insgesamt existieren zwei Klassen von CRISPR-Systemen, die jeweils drei weitere Typen umfassen<sup>141,320</sup>. Typ I, III

und IV werden der Klasse 1 CRISPR-Systeme, Typ II, V und VI werden der Klasse 2 CRISPR-Systeme zugeordnet<sup>141,320</sup>.

Zusätzlich wurden vier mit CRISPR-assoziierte (Cas-) Gene entdeckt, die für vier Proteine codieren<sup>141</sup>. Für Cas1 und Cas2 konnte keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in der funktionellen Domäne gefunden werden, während für Cas3 sieben charakteristische Motive für die Helicase 2-Superfamilie und für Cas4 eine Verwandtschaft zur RecB-Exonuklease nachgewiesen werden konnten<sup>141</sup>.

Um eine Immunantwort bei Bakterien und Archaeen hervorzurufen, sind drei Schritte notwendig. Im ersten Schritt wird die eingedrungene DNA in kurze Sequenzen fragmentiert und als sogenannter *spacer* mithilfe von Cas1- und Cas2-Proteinen in den Wirts-eigenen *crRNA-Array* (Anordnung, Matrize) zwischen die CRISPR RNA *repeats* integriert<sup>320</sup>.

In einem zweiten Schritt wird durch Cas-Proteine der *CRISPR-Array* in prä-crRNA transkribiert<sup>320</sup>. Die prä-crRNA wird anschließend von Cas-Proteinen gespalten, prozessiert und in reife crRNA umgewandelt<sup>320</sup>. Insbesondere in Typ II CRISPR-Systemen, wie beispielsweise das CRISPR-Cas9-System, ist für die prä-crRNA-Prozessierung eine nicht-kodierende *trans*-aktivierende crRNA, eine sogenannte *tracrRNA*, essentiell<sup>141,320</sup>. Zusätzlich ist die *tracrRNA* für die Bindung von Cas-Proteinen und die Spaltung der Ziel-DNA-Sequenz erforderlich<sup>320</sup>. Für die Reifung der prä-RNA werden eine Cas6-verwandte Ribonuklease (in Typ I und Typ II-CRISPR-Systemen) oder eine *housekeeping* RNase III (Typ II CRISPR-System) benötigt<sup>320</sup>. Diese schneiden spezifisch doppelsträngige RNA-Hybridisierungen der prä-crRNA und der *tracrRNA*<sup>320</sup>. Die reife crRNA dient gemeinsam mit der *tracrRNA* als Leitstruktur (sogenannte *guide RNA*; gRNA) für die Cas-Proteine und enthält eine *spacer*-Sequenz, die für die Erkennung eines eingedrungenen Genoms durch die Cas-Proteine essentiell ist<sup>320</sup>.

Im dritten Schritt erkennen die Cas-Proteine anhand der reifen crRNA ihre Ziel-DNA, induzieren die Spaltung des eingedrungenen Genoms und schützen somit ihren Wirt vor einer Infektion<sup>320</sup>.

Das Effektorprotein Cas9 ist eine crRNA-abhängige Endonuklease, die den DNA-Zielstrang beziehungsweise den nicht komplementären DNA-Strang schneidet<sup>141,150,320</sup>. Cas9 bildet mit der crRNA-*repeat*-Sequenz, auf die eine sogenannte crRNA-*spacer*-Sequenz folgt, einen Komplex<sup>141</sup>. Die crRNA-*spacer* Sequenz umfasst 20 Nukleotide, dient als Adapter zur Ziel-DNA und verhält sich komplementär zu derselben<sup>203,320</sup>. Für die Aktivierung der Endonuklease ist zusätzlich das sogenannte PAM (*protospacer adjacent motif*, an den Protospacer angrenzendes Motiv) entscheidend<sup>203</sup>. Das PAM umfasst eine bestimmte Nukleotidsequenz,

bestehend aus einem beliebigem Nukleotid gefolgt von zwei Guaninen<sup>203</sup>. Schneidet die Endonuklease die doppelsträngige, zur crRNA-*spacer*-Sequenz komplementäre DNA, werden Doppelstrangbrüche erzeugt<sup>122,320</sup>. Um dieses System zum Modifizieren des Genoms, sogenanntes *genome editing*, zu nutzen, kann es in Plasmide integriert werden<sup>320</sup>. Dabei kann der crRNA-tracrRNA-Duplex zu einer chimären *single guide RNA* (sgRNA) fusioniert werden, die dann als Leitstruktur für die Cas-Proteine dient und gemeinsam mit diesen einen DNA-Doppelstrangbruch induzieren kann<sup>320</sup>. In eukaryoten Zellen werden die Doppelstrangbrüche entweder mittels nicht homologer Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) oder Homologie-gerichteter Reparatur (*homology directed repair*, HDR) korrigiert<sup>122,320</sup>. In Abwesenheit eines *templates* wird die NHEJ aktiviert und führt zu Insertionen und/oder Deletionen, die den Zielgen-Lokus unterbrechen<sup>203</sup>. Liegt ein Donor-*template* mit Homologie zum Zielgen-Lokus vor, so kann über eine HDR eine präzise Mutation in demselben eingeführt werden<sup>203</sup>.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *CRISPR-Cas Pim-1 Double Nickase* Plasmid-System von Santa Cruz Biotechnology (Texas, U.S.A.) weist die Cas9-Endonuklease nach Herstellerangaben eine Mutation (D10A) in der katalytischen Domäne RuvC der Cas9-Endonuklease auf, was zu einer Konvertierung der Endonuklease in eine Nickase führt<sup>250</sup>. Durch die Verwendung von Nickasen kann eine *off-target*-Mutagenese minimiert und die Spezifität erhöht werden<sup>250</sup>. Nach Herstellerangaben enthält dieses *CRISPR-Cas Pim-1 Double Nickase* Plasmid-System ein Plasmid mit einer GFP-Markierung und ein anderes Plasmid mit einem Puromycinresistenzgen. Anhand der GFP-Markierung kann die Effizienz der Transfektion überprüft werden; mithilfe des Puromycinresistenzgens können negative Zellklone selektiert werden.

Um einen stabilen Pim1 *knockout* zu erzielen, wurden LN-18 Zellen in einer 6-Kavitäten-Platte (350.000 Zellen/Vertiefung) ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von circa 70 % mit Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 in Opti-MEM nach dem Standardprotokoll transfiziert. Dazu wurden jeweils 1 µg, 2 µg und 3 µg des Pim1-Double-Nickase-Plasmids und des Kontroll-Plasmids (beides Fa. Santa Cruz Biotechnology; Texas, U.S.A.) sowie eine entsprechende Menge an Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 jeweils in Opti-MEM vorverdünnt und 5 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Zu den Plasmiden wurde anschließend jeweils eine entsprechende Menge des Lipofectamine<sup>®</sup> 2000-Opti-MEM-Gemisches hinzugegeben, gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde von den Zellen das Medium abgesaugt und frisches DMEM hinzugegeben. Nach der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die tropfenweise Zugabe des Plasmid-Lipofectamine<sup>®</sup> 2000-Opti-MEM-Gemisches zu

den Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C wurde das Plasmid-haltige Medium durch frisches DMEM ersetzt und die Transfektionseffizienz anhand des GFP-markierten Plasmids durch Fluoreszenzmikroskopie (Axio Observer Z1; Fa. Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung der Software PalmRobo V4.5, Axio Vision RE. 4.8 überprüft. Um von dem transfizierten Zellgemisch Einzelzellklone zu erhalten, wurden diese nach weiterer 2-tägiger Inkubation bei 37 °C passagiert (vergleiche 2.2.1.2) und in einer Verdünnung von 1:2.000 sowie 1:4.000 in Zellkulturschalen (150 mm x 25 mm, Falcon<sup>®</sup>, Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande) überführt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das DMEM durch Puromycin-haltiges DMEM (2 µg/µl) ersetzt. Nach einer weiteren 2-wöchigen Inkubation der Zellen bei 37 °C unter Standardbedingungen wurden Zellkolonien gepickt, die im Idealfall von einer einzigen Ursprungszelle ausgehen, und in 24-Kavitäten-Platten mit überführt wurden. Nach regelmäßigem Mediumwechsel wurden die Zellklone nach Erreichen der Konfluenz in 6-Kavitäten-Platten beziehungsweise kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, Falcon<sup>®</sup>, Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande) überführt. Zellklone, die auch nach 12-wöchiger Inkubation bei 37 °C und regelmäßigem Mediumwechsel kein Wachstum zeigten, konnten nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen werden und wurden vernichtet. Die übrig gebliebenen Zellklone wurden anschließend auf den *knockout* von Pim1 mithilfe von RT-PCR und Western Blot (vergleiche 2.2.2 und 2.2.3) untersucht.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA erfolgte mithilfe des peqGOLD RNAPure<sup>™</sup>-Kits (Fa. peqlab, Erlangen; VWR Life Science Competence Center, Heidelberg). Von den zu präparierenden Zellen wurden durch Zentrifugieren (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9) Zellpellets erzeugt, der Überstand abgesaugt und die Zellpellets, falls nicht direkt die RNA-Extraktion erfolgen konnte, bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Zellyse wurden die Zellpellets mit 250 µl peqGOLD RNAPure<sup>™</sup> versetzt, resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Inkubation der Zellpellets für 7 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 50 µl Chloroform mit anschließendem Schwenken der Reaktionsgefäße für 15 Sekunden sowie eine erneute Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation (Fa. Heraeus, FRESCO 21, 12.000 g, 5 min, 4 °C) wurde die obere Phase des Zellysates in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 125 µl

Isopropanol versetzt, geschwenkt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Fa. Heraeus, FRESCO 21, 12.000 g, 10 min, 4 °C) und dem Abdekantieren beziehungsweise Abpipettieren des Isopropanols erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 350 µl Ethanol, Vortexen und Zentrifugieren (Fa. Heraeus, FRESCO 21, 12.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand vom entstandenen RNA-Pellet abpipettiert. Die Trocknung der RNA-Pellets erfolgte unter dem Abzug. Je nach Größe wurden die Pellets in 30 µl bis 80 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

#### 2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Grundlage der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit sind aromatische Basen der Nukleinsäuren und deren Absorptionsmaximum (A) bei 260 nm<sup>151</sup>.

Eine A<sub>260</sub>-Einheit einzelsträngiger RNA wird definiert als 33 µg/ml H<sub>2</sub>O<sup>151</sup>. Zur Überprüfung der Reinheit der RNA wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen, bei der Proteine mit ihren aromatischen Aminosäureresten ihr Absorptionsmaximum besitzen<sup>151</sup>. Durch die Bildung des Quotienten aus A<sub>260</sub> und A<sub>280</sub> lässt sich eine Aussage zur Reinheit der Nukleinsäure-Lösung treffen. Liegt ein Quotient von 1,8 vor, so kann von reiner DNA ausgegangen werden<sup>151</sup>. Bei einer reinen RNA-Lösung ergibt das Verhältnis aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 2,0, da Nukleinsäuren ohne Basenpaarung eine höhere Absorption besitzen (Effekt der Hyperchromie)<sup>151</sup>. Bei Verunreinigung der RNA-Lösung mit Proteinen oder anderen aromatischen Substanzen wie beispielsweise Phenol ist der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> signifikant kleiner als 2,0<sup>151</sup>.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte unter Verwendung des Programms „Nucleic Acid“ mithilfe des Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000, V3.8.1 Spectrophotometer (Fa. peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Dieses küvettenfreie Spektrophotometer zeichnet sich durch einen geringen Verbrauch an RNA-Lösung aus. Auf die untere optische Oberfläche des Systems wurde 1 µl Probe zur Konzentrationsbestimmung pipettiert und ohne Lufteinschluss mit der oberen optischen Messfläche in Berührung gebracht. Es wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≥ 2,0 liegt.

### 2.2.2.3 Reverse Transkription

Voraussetzung für eine Expressionsanalyse von mRNA ist die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA), da einsträngige RNA nicht als Matrize für die PCR (*polymerase chain reaction*) fungieren kann<sup>154</sup>.

RNA-abhängige DNA-Polymerasen, sogenannte reverse Transkriptasen, können unter Zugabe von Oligo(dT)- oder *Random*-Primern sowie von Nukleotiden, den zur mRNA komplementären DNA-Strang und anschließend cDNA bilden<sup>154</sup>.

Für die cDNA-Synthese wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Fa. applied biosystems™, Weiterstadt; Warrington Cheshire U. K.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) verwendet, dessen Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes in Tabelle 9 zusammengestellt wurde. Durch die Verwendung von *Random*-Primern werden laut Herstellerangaben alle Arten von RNA in cDNA umgeschrieben, sodass bei der Normalisierung der Genexpression neben den *housekeeping*-Genen GAPDH,  $\beta$ -Actin und TBP auch auf 18S rRNA zurückgegriffen werden konnte.

**Tab. 9:** Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die reverse Transkription.

<u>Komponente</u>	<u>Volumen im Ansatz</u>
10X RT-Puffer	2 $\mu$ l
25X dNTP Mix [100 mM]	0,8 $\mu$ l
10X RT <i>Random</i> -Primer	2 $\mu$ l
MultiScribe™ Reverse Transcriptase [50 U/ $\mu$ l]	1 $\mu$ l
RNase-Inhibitor	1 $\mu$ l
RNA (500 ng)	variabel
Aqua ad injectabilia	ad 20 $\mu$ l

Die reverse Transkription wurde in einem T100 Thermal Cycler (Fa. Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.) durchgeführt, bei der im ersten Schritt für 10 min bei einer Temperatur von 25 °C die Anlagerung der Primer an die RNA, das sogenannte *Annealing*, erfolgte. Im nächsten Schritt wurde für 120 min bei 37 °C die reverse Transkription mit anschließender Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei 85°C durchgeführt. Bis zur Entnahme der cDNA aus dem Thermal Cycler wurde diese bei 4 °C gekühlt. Die Lagerung der cDNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.2.2.4 Real-Time-PCR

Die *Real-Time-PCR* (RT-PCR) ist eine äußerst empfindliche Nachweismethode zur Detektion eines spezifischen RNA-Moleküls nach reverser Transkription eines RNA-Gemisches in cDNA<sup>326</sup>. Zur Ermittlung von Genexpressionsstärken und somit korrespondierenden RNA-Mengen sollte sich die Menge an amplifizierter cDNA proportional zur Menge der ursprünglich im Probenmaterial vorhandenen Menge an RNA verhalten<sup>326</sup>. Die RT-PCR basiert auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), bei dem ein Fluorochrom 1 mit einer Anregungswellenlänge A1 und einer Emissionswellenlänge E1 einem Fluorochrom 2, dessen Anregungswellenlänge A2 der Emissionswellenlänge E1 entspricht, aufgrund der räumlichen Nähe Energie übertragen kann<sup>219</sup>. Das Fluorochrom 2 kann die erhaltene Energie über seine Emissionswellenlänge E2 abgeben<sup>219</sup>. Je nachdem welche Emissionswellenlänge gemessen wird, werden die Fluorochrome als Reporter und Quencher oder als Donor und Akzeptor bezeichnet<sup>219</sup>.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten PCR nach dem 5'-Nuclease-Prinzip (*TaqMan*<sup>®</sup>-Prinzip) befinden sich der Reporter und der Quencher auf dem 5'- und 3'-Ende desselben Oligonukleotids<sup>219</sup>. Ist das Oligonukleotid intakt, ist die gemessene Emissionswellenlänge des Fluorochroms (Reporter) aufgrund der räumlichen Nähe zum sogenannten Quencher gering. Wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase freigesetzt, steigt die Signalstärke des Reporters an<sup>153,219</sup>. Diese Kinetik stellt die Grundlage für die Quantifizierung der cDNA und dementsprechend RNA durch die PCR dar<sup>219</sup>. In frühen Zyklen liegt eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente und dementsprechend des Reportersignals vor. Mit einer zunehmenden Anzahl an PCR-Zyklen findet eine Akkumulation der Reaktionsprodukte, wie beispielsweise Pyrophosphat, statt, die einen zunehmend störenden Einfluss auf die PCR nehmen können<sup>219</sup>. Daneben werden mit einer steigenden Anzahl an Zyklen die Primer sowie Oligonukleotide aufgebraucht und die Polymerase sowie die Oligonukleotide können durch die hohe Temperatur ihre Funktion verlieren, sodass sich die PCR zu einem linearen Wachstum bis hin zum Stillstand verlangsamt<sup>219</sup>. Als Grundlage für die Auswertung der PCR nach dem *TaqMan*<sup>®</sup>-Prinzip dient diejenige Zellzykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt und die Vermehrung exponentiell ist, der sogenannte  $C_T$ -Wert (*cycle threshold*)<sup>219</sup>. Dieser korreliert negativ mit der Menge an cDNA und folglich mit der Menge an RNA-Transkripten. Als interner Standard können sogenannte *housekeeping*-Gene, die in allen Zellen annähernd gleich exprimiert werden und keiner transkriptionellen Regulation unterliegen, verwendet werden<sup>154</sup>.

Die hier verwendeten Primer-/Sonden-Gemische besaßen als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff entweder 6-Carboxyfluorescein (FAM<sup>153</sup>) oder 4,7,2'-Trichloro-7'-Phenyl-6-Carboxyfluorescein (VIC) (vergleiche Tabelle 5). Als Quencher dieses Systems fungierte Tetramethylrhodamin (TAMRA)<sup>153</sup>.

Für die Analyse der Proben wurde ein Mastermix bestehend aus 5 µl *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Mastermix* (Fa. Applied Biosystems<sup>™</sup>, Foster City, U.S.A.; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.), 3,5 µl *Aqua ad iniectabilia* (Fa. B. Braun, Melsungen) und 0,5 µl des Primer-/Sonden-Gemisches je Reaktionskavität hergestellt.

In die Reaktionsvertiefungen wurde jeweils 1 µl cDNA in Doppelbestimmung vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9 µl Mastermix je Reaktionsvertiefung einer 96-Kavitäten-Platte. Bei jeder RT-PCR wurde eine *no-template-control* (NTC), hier *Aqua ad iniectabilia*, mitgeführt, um Verunreinigungen des Mastermixes mit DNA auszuschließen. Die PCR konnte nur ausgewertet werden, wenn innerhalb der NTC keine DNA amplifiziert wurde. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit für die Auswertung der Genexpressionsanalyse als *housekeeping*-Gene 18S rRNA, β-Actin, TBP und GAPDH mitgeführt.

Die Analyse der PCR nach dem *TaqMan*<sup>®</sup>-Prinzip erfolgte mithilfe des *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* unter Verwendung der systemeigenen Software (QuantStudio 12K Flex Software.Ink) von Thermo Fisher Scientific. Für die Genexpressionsanalyse wurde nach Standardprotokoll verfahren. Dieses umfasste eine einmalige Präinkubation der Proben bei 50 °C für 2 min, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation der Proben bei 95 °C. Das Temperaturprofil setzte sich anschließend aus 45 Zyklen von jeweils 15 s bei 95 °C und jeweils einer einminütigen Inkubation bei 60 °C fort.

Mittels eines Amplifikationsblots wurde der Zeitpunkt anhand eines Schwellenwertes bestimmt, bei dem sich alle Proben in der linearen Phase der logarithmischen Darstellung befinden.

Die Auswertung basiert auf der sogenannten  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, mit der die relative Veränderung der Genexpression bezogen auf die Kontrolle analysiert werden kann. Zuerst wurde von den  $C_T$ -Werten der *housekeeping*-Gene der Mittelwert gebildet und dieser vom gemittelten  $C_T$ -Wert des Zielgens (Doppelbestimmung) subtrahiert ( $\Delta C_T$ -Wert). Anschließend wurde der Mittelwert für den gesamten Versuch gebildet und dieser vom  $\Delta C_T$ -Wert subtrahiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Wert). Danach erfolgte die Berechnung des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wertes. Eine statistische Auswertung sowie eine graphische Darstellung erfolgte mithilfe der GraphPadPrism<sup>®</sup>-Software.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Vor der Präparation der Proteinlysate wurden die bei  $-20\text{ °C}$  gelagerten Zellpellets auf Eis aufgetaut, erneut zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5804 R, Rotor: A-4-44, 1.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur, Acc. 9, Br. 9) und der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  bis 150  $\mu\text{l}$  Lysepuffer je nach Größe des Zellpellets. Der Lysepuffer beinhaltete jeweils in einer Verdünnung von 1:1.000 die Proteaseinhibitoren<sup>195</sup> Aprotinin (1 M) und Leupeptin (1 M) sowie den Phosphataseinhibitor Orthovanadat (250 mg/ml). Der Zellaufschluss erfolgte für mindestens 30 min auf Eis unter mehrfachem Aufschlemmen mit dem Vortexer. Die Zelllysate wurden anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5430 R, Rotor: FA-45-24-11-HS, 12.000 rpm, 3 min,  $4\text{ °C}$ , Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Bestimmung des Gehaltes an Proteinen in den Zelllysaten erfolgte mithilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays, der von Smith et al. 1985 zuerst beschrieben wurde<sup>92</sup>. Grundlage dieser Methode ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen in alkalischer Lösung, die mit BCA einen spezifischen Farbkomplex bilden können, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm liegt<sup>92,253</sup>. Die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen kann durch Cystein, Cystin, Tryptophan und die Peptidbindung erfolgen<sup>92</sup>. Für die Proteinbestimmung wurden die Proben 1:10 mit *Aqua ad iniectabilia* verdünnt und in Duplikaten auf eine 96-Kavitäten-Platte aufgetragen. Als Eichgerade diente eine mitgeführte Verdünnungsreihe einer BSA (*bovine serum albumin*)-Standardlösung (1 mg/ml), die in einer Konzentrationsreihe von 0  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$  in Duplikaten zur Doppelbestimmung ebenfalls in die 96-Kavitäten-Platte pipettiert wurde. Die Proben wurden mit einer frisch angesetzten BCA-Färbereagenz-Lösung (Fa. Thermo Scientific, Rockford, Illinois, U.S.A.; Waltham, Massachusetts, U.S.A.), die aus 50 Teilen einer BCA-Lösung (1 %) und einem Teil Kupfersulfatlösung (4 %) bestand, für 45 min bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm am Tecan infinite M200 (Fa. Tecan GmbH, Crailsheim) gemessen und die Daten mithilfe der linearen Regression in Microsoft<sup>®</sup> Excel ausgewertet.

### 2.2.3.3 SDS-PAGE

SDS, *sodium dodecyl sulfate*, ein anionisches Detergenz, kann die Eigenladung der Proteine effektiv maskieren, wenn es in einer Konzentration von 1,4 g pro 1 g Protein eingesetzt wird<sup>109</sup>. Es entstehen somit Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit<sup>109</sup>.

Aufgrund der Aufspaltung der Wasserstoffbrücken durch das Erhitzen der Proben mit einem Überschuss an SDS sowie die Aufspaltung der Schwefelbrücken durch  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgehoben<sup>109</sup>.

Nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich mit SDS beladene, gestreckte Aminosäureketten im Acrylamid-Gel vom Minus- zum Plus-Pol<sup>109</sup>. Aufgrund der über bestimmte Bereiche linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und der Wanderungsstrecke der SDS-Polypeptid-Mizellen erfolgt die Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe bei einem Polyacrylamid-Gel mit 0,1 % SDS fast ausschließlich nach der molaren Masse<sup>109</sup>. Anhand eines mitgeführten Proteinstandards können die Molmassen der Proteine der aufgetragenen Proben festgestellt werden<sup>109</sup>.

Zur Auftrennung von Proteinen dienen in dieser Arbeit SDS-PAGEs nach dem diskontinuierlichen Laemmli-System<sup>166</sup> unter der Verwendung des SDS-Gelelektrophorese-Systems der Firma Biometra® und unter Einsatz von zwei unterschiedlichen Gelen, einem 4-%igen Sammel- und einem 10-%igen Trenngel, deren Zusammensetzung der folgenden Tabellen 10 und 11 zu entnehmen ist.

**Tab. 10:** Zusammensetzung von Sammelgel (4,0 %) im Rahmen einer SDS-PAGE.

Lösungen	Sammelgel
Acrylamid	455 $\mu$ l
Sammelgelpuffer	861 $\mu$ l
Aqua dest.	2,1 ml
10 % SDS	35 $\mu$ l
10 % APS	35 $\mu$ l
TEMED	3,5 $\mu$ l

Das niedrig konzentrierte Sammelgel dient der Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteine, während im Trenngel die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgrund des Siebeffekts des Polyacrylamidgels erfolgt.

**Tab. 11:** Zusammensetzung von Trenngel (10 %) im Rahmen einer SDS-PAGE.

Lösungen	Trenngel
Acrylamid	2,5 ml
Trenngelpuffer	1,9 ml
Aqua dest.	3,0 ml
10 % SDS	75 µl
10 % APS	75 µl
TEMED	7,5 µl

Das Trenngel (vergleiche Tabelle 11) wurde rasch nach dem Ansetzen zwischen zwei Glasplatten bis zu einer Höhe von circa 75 % des Gesamtvolumens pipettiert. Um eine gerade Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten, wurde das Trenngel nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen und das Trenngel mit Sammelgel (vergleiche Tabelle 10) überschichtet. Zur Erzeugung von Probestaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Sammelgels konnten die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt und der Laufpuffer (1-fach konzentrierter Tank-Puffer), hergestellt aus 10-fach konzentriertem Tank-Puffer (Stammlösung), in das System überführt werden. Der Kamm wurde anschließend aus dem Sammelgel entfernt. Bei Luftblasen innerhalb des Taschenlumens wurden diese mit einer Hamiltonspritze entfernt, bevor die Proben mit derselben aufgetragen wurden. Es wurden 30 µg Protein sowie 5 µl Marker (Protein Marker VI (10 - 245) prestained, AppliChem GmbH, Darmstadt) aufgetragen. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit dem vierfach konzentrierten Laemmli-Puffer (Zusammensetzung vergleiche 2.1.8) im Verhältnis 1:4 versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 90 Volt (V) gestartet und nach dem Übertritt der Proben in das Trenngel auf eine Spannung von 130 V erhöht.

#### 2.2.3.4 Western Blot

Das von Towbin et al. und ebenfalls von Renart et al. 1979 entwickelte Western Blot-Verfahren ermöglicht den Transfer der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran, über die ein spezifischer Nachweis durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgen kann<sup>109,314</sup>. Neben dem *Semidry*-Blotting-Verfahren existiert das in dieser Arbeit verwendete Tank-Blotting-Verfahren, auch Nassblotverfahren genannt<sup>109</sup>. In

Vorbereitung des Blotting-Verfahrens wurden sechs Filterpapiere sowie eine Nitrocellulosemembran (Whatman™ Protran BA 83, 0,2 µm, Fa. GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, U.K.) auf eine Größe von 8 cm x 10 cm beziehungsweise 7 cm x 9 cm zugeschnitten und gemeinsam mit den Schwämmen in eiskaltem Towbin-Puffer für circa 10 min äquilibriert. Anschließend wurden auf die schwarze Fläche der Blotkassette in der folgenden Reihenfolge ein Schwamm, drei Filterpapiere, die SDS-PAGE, die Nitrocellulose-Membran, drei Filterpapiere und ein Schwamm aufgelegt, mit einer Rolle mögliche Luftblasen entfernt und die Kassette geschlossen. Nachdem die Blotting-Vorrichtung einschließlich der Kühlakkus zusammengesetzt sowie der eisgekühlte Towbin-Puffer eingefüllt wurde, konnte der Proteintransfer für 2 h bei 370 mA auf Eis durchgeführt werden. Die Effizienz des Transfers wurde durch das im Towbin-Puffer enthaltene Methanol verstärkt. Zur Überprüfung der Effizienz und der Qualität des Transfers diente eine Ponceau S-Lösung, die eine unspezifische Färbung von Proteinen ermöglicht. Anschließend wurde die Membran durch mehrmaliges Spülen mit *Aqua dest.* entfärbt.

#### 2.2.3.5 Immundetektion und Proteinexpressionsanalyse

Für den spezifischen Proteinnachweis wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran für 1 bis 2 h mit 5 % Milchpulver in TBST (1X) bei Raumtemperatur unter Schwenken gesättigt. Durch viermaliges Waschen der Membran mit TBST (1X) für jeweils 5 min wurde die Blockierlösung entfernt. Nach Zugabe der in TBST (1X)-Lösung, versetzt mit 0,05 % Natriumazid und 1 % BSA, verdünnten monoklonalen oder polyklonalen Primärantikörpers (vergleiche Tab. 6) erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C unter Schwenken. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch viermaliges Waschen der Membran mit TBST (1X) unter Schwenken entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe der in 1 % BSA-TBST (1X)-Lösung verdünnten, HRP (engl. *horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase)-gekoppelten sekundären Antikörpers (vergleiche Tab. 7) und die Inkubation für 1 bis 1,5 h unter Schwenken. Nach weiterem viermaligen Waschen der Membran konnte mithilfe des *ECL PLUS Western Blotting Reagenz* (Fa. Thermo Scientific, Rockford, U.S.A.), *Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagenz* (Fa. GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, U.K.) oder des *Clarity™ Western ECL Substrate* (Fa. Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.) unter Lichtausschluss das Chemilumineszenzsignal mit dem *Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System* detektiert und mit der *QuantityOne®*-Software (Fa. Bio-Rad Feldkirchen; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules,

Kalifornien, U.S.A.) quantifiziert werden. Die Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der GraphPadPrism<sup>®</sup>-Software.

Um einen weiteren spezifischen Proteinnachweis auf der Membran zu ermöglichen, ist es erforderlich den gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Die Membran wurde dazu bei einer Temperatur von 52 °C in 50 ml Stripping-Puffer versetzt mit 350 µl β-Mercaptoethanol für 5 min inkubiert.

#### 2.2.3.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Detektion der zellulären Lokalisation von Pim1, Nestin, CD133, CD44, Musashi-1, SPARC und Sox2 wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen von adhären Zellen im Vergleich zu Neurosphären der Glioblastom-Zelllinie LN-18 verschiedener Passagen durchgeführt.

Für die Etablierung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurde auf K562- und PC3-Zellen zurückgegriffen, die laut *The Human Protein Atlas*<sup>16</sup> als Positivkontrollen für die zu untersuchenden Proteine herangezogen werden können. Es wurden unterschiedliche Fixierungen, wie 4 % Paraformaldehyd, Aceton, Methanol und 5 % Eisessig in Ethanol getestet. Die besten Färbeergebnisse wurden mit der 5 % Eisessig in Ethanol-Fixierung erreicht.

Für jede Passage wurden die LN-18 Zellen 7 d in NeuroCult<sup>TM</sup>-Medium (Neurosphären) oder DMEM (adhärente Zellen) kultiviert und, wie unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, geerntet und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1X) wurden die Zellen mit 5 % Eisessig in Ethanol für 10 min bei -20 °C fixiert, erneut dreimal mit PBS (1X) gewaschen und zentrifugiert (Fa. Eppendorf, 5430R, Rotor: FA-45-24-11-HS, 1.000 rpm, 4 °C, 3 min, Acc. 9, Br. 9). Das entstandene Zellpellet wurde anschließend mit Jung Freezing Medium<sup>®</sup>, welches mit 1 µl einer 0,05-prozentigen Trypanblau-Lösung versetzt war, vorsichtig resuspendiert. Durch den Zusatz von Trypanblau konnten die Zellen während der Anfertigung von Kryoschnitten visualisiert werden<sup>34</sup>. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend in entsprechende Aussparungen von in Förmchen (Cryomolds, Fa. Sakura Finetek, U.S.A.) gefrorenem Jung Freezing Medium<sup>®</sup> pipettiert und bei -20 °C gelagert. Danach erfolgte die Anfertigung von ultradünnen Schnitten (5 µm - 7 µm) mit einer Feather-Mikrotomklinge (Typ A35) am Leica CM1900 Kryostat. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger für eine Immunfärbung des Zielproteins und eine mitgeführte Kontrolle transferiert, mit einem Fettstift (Liquid Blocker Super Pap Pen; Daido Sangyo Co., Ltd Tokyo, Japan) umrandet und anschließend lichtmikroskopisch (Nikon Eclipse TS100) kontrolliert,

bevor sie bei -20 °C gelagert wurden. Das übrige Zellblock-Material wurde ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Nach dem Auftauen der Schnitte auf Raumtemperatur erfolgte ein zweiter Fixierungsschritt mit 5 % Eisessig in Ethanol für 10 min bei -20 °C in einer Küvette, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS (1X). Anschließend wurden die Schnittpräparate in Blockierungspuffer (Zusammensetzung vergleiche 2.1.8) für 3 h in einer feuchten Kammer inkubiert und dieser anschließend abgenommen. Nach der Zugabe der wie folgt in Antikörper-Verdünnungspuffer (Zusammensetzung vergleiche 2.1.8) angesetzten primären Antikörper wurden die Schnittpräparate bei 4 °C über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert: 1:100 (anti-CD133); 1:50 (anti-CD44, anti-Musashi-1, anti-Nestin (Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford; BioLegend, Inc., San Diego, Kalifornien, U.S.A., StemCell Technologies Germany GmbH, Köln) sowie anti-Sox2 und anti-SPARC); 1:30 anti-Nestin (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.); 1:50 jeweils 1:1 gemischt anti-Pim1 (Fa. Cell Signaling Technology, Boston, U.S.A. und LS Bio, LifeSpan Technologies, Inc, Seattle, Washington, U.S.A.) und 1:30 anti-Pim1 (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, U.S.A.).

Als Kontrolle wurde zeitgleich auf demselben Objektträger ein Schnittpräparat mit Antikörper-Verdünnungspuffer ohne Zusatz eines primären Antikörpers mitgeführt.

Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper beziehungsweise der Antikörper-Verdünnungspuffer von den Schnittpräparaten abgenommen, diese erneut dreimal für 10 min mit PBS (1X) in einer Küvette gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit den entsprechenden 1:150 in Antikörper-Verdünnungspuffer (vergleiche 2.1.8) angesetzten sekundären Antikörpern (vergleiche Tabelle 8) für 2,5 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in der feuchten Kammer inkubiert, bevor die Schnitte erneut dreimal für 10 min in PBS (1X) unter Lichtausschluss in einer Küvette gewaschen wurden. Nach dem Trocknen der Schnittpräparate unter Lichtausschluss erfolgte das Eindeckeln der Schnittpräparate mit einem DAPI-haltigen Eindeck-Medium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Schnittpräparate wurden über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet, bevor sie mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780; Carl Zeiss, Jena) analysiert wurden.

### 2.3 Software und statistische Analysen

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte mit Microsoft® Word, Microsoft® Excel und Microsoft® PowerPoint. Für die statistischen Analysen der Daten sowie deren Präsentation wurde GraphPadPrism® verwendet. Die statistischen Analysen der Daten bei paarweisen Vergleichen

erfolgten unter Verwendung des *Student's t-Testes* oder des *Mann-Whitney U-Testes*. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde der *OneWay ANOVA* mit dem *Dunnnett's multiple comparison Test* genutzt. Zur Literaturverwaltung diente EndNote™ X7.8.

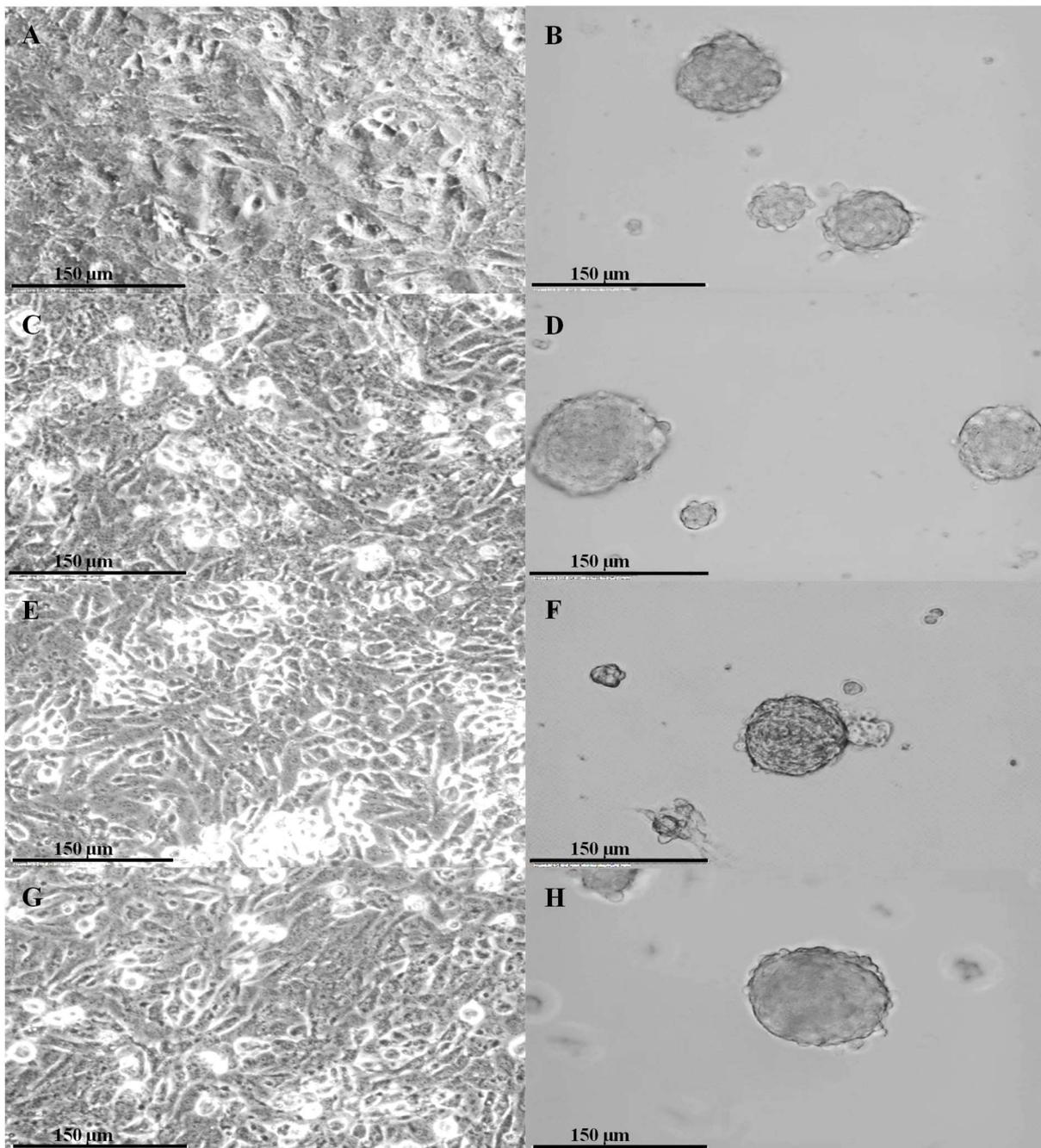
### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte der Einfluss der Pim1-Kinase auf die Stammzeleigenschaften von Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18 untersucht werden. Die Zellen wurden hierfür als adhärenente Kultur sowie als dreidimensionale Neurosphären, denen Stammzeleigenschaften zugeschrieben werden, kultiviert<sup>17,258,322</sup>. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind nachfolgend aufgeführt und graphisch dargestellt.

#### 3.1 Untersuchungen zur Expression von Pim1 sowie Stammzell- und Differenzierungsmarker von adhärent wachsenden LN-18 Zellen im Vergleich zu LN-18 Neurosphären

Zum Vergleich von adhärenenten Tumorzellen der Glioblastomzelllinie LN-18 mit stammzellähnlichen Tumorzellen, sogenannten Neurosphären, wurden LN-18 Zellen zum einen in DMEM-Medium (adhärent wachsende Zellen) und zum anderen in serumfreiem Medium (NeuroCult™-Medium, StemCell Technologies Inc.) zur Erzeugung von Neurosphären kultiviert und nach jeweils sieben Tagen passagiert. Aufgrund der zunehmenden Neurosphärengröße bei steigender Anzahl an Passagen wurden die Experimente auf vier Passagen beschränkt, da die Neurosphärengröße laut Herstellerangaben (StemCell Technologies Inc.) 200 µm nicht überschreiten sollte. Von jeder Passage wurden von den adhärent wachsenden LN-18 Zellen und den LN-18 Neurosphären jeweils Proben zur Isolation von mRNA und von Proteinen gewonnen. Abb. 5 zeigt repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von adhärent wachsenden LN-18 Zellen (A, C, E, G) sowie von Neurosphären (B, D, F, H) der Passagen 1 bis 4.

Für die Analyse der relativen mRNA-Expression von Pim1, Pim2, Pim3, EGFR sowie der Stammzellmarker (CD44, CD133, Nestin, Musashi-1) wurde RNA aus adhärenenten LN-18 Zellen sowie aus Neurosphären der entsprechenden Passagen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen *Real-Time-PCR* nach dem *TaqMan*<sup>®</sup>-Prinzip untersucht. Die erhobenen Expressionsdaten der Zielgene wurden auf den Mittelwert der *housekeeping*-Gene 18S rRNA, β-Aktin, TBP und GAPDH normalisiert und als relative mRNA-Expression angegeben. Hinsichtlich der Kinase Pim1 zeigten die Neurosphären eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den Passagen 1 bis 3, während beim Vergleich der Neurosphären der Passage 4 mit den entsprechenden adhärent wachsenden LN-18 Zellen lediglich eine tendenzielle Erhöhung der Pim1-mRNA-Expression in Neurosphären zu erkennen war (Abbildung 6A).



**Abb. 5: Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von adhären Zellen und stammzellartigen Neurosphären der GBM-Zelllinie LN-18.** Dargestellt sind die Passagen 1 (A+B), 2 (C+D), 3 (E+F) und 4 (G+H) von adhären LN-18 Zellen (A, C, E, G) sowie LN-18 Neurosphären (B, D, F, H). Die Messachse kennzeichnet 150 µm. Phasenkontrastmikroskopie (Axio Observer Z1, Fa. Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 20x).

Die relative Pim1-mRNA-Expression war im Vergleich zu den adhären wachsenden LN-18 Zellen um das 4,8-fache in der Passage 1 gesteigert. In den Neurosphären der Passagen 2 und 3 war die Pim1-mRNA-Expression 7,3- beziehungsweise 8,3-mal so hoch wie bei den adhären LN-18 Zellen.

Die Analyse der relativen mRNA-Expression der Kinase Pim2 erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen adhären wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären (Abbildung 6B). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant 7,4-fach höhere mRNA-Expression der Kinase Pim3

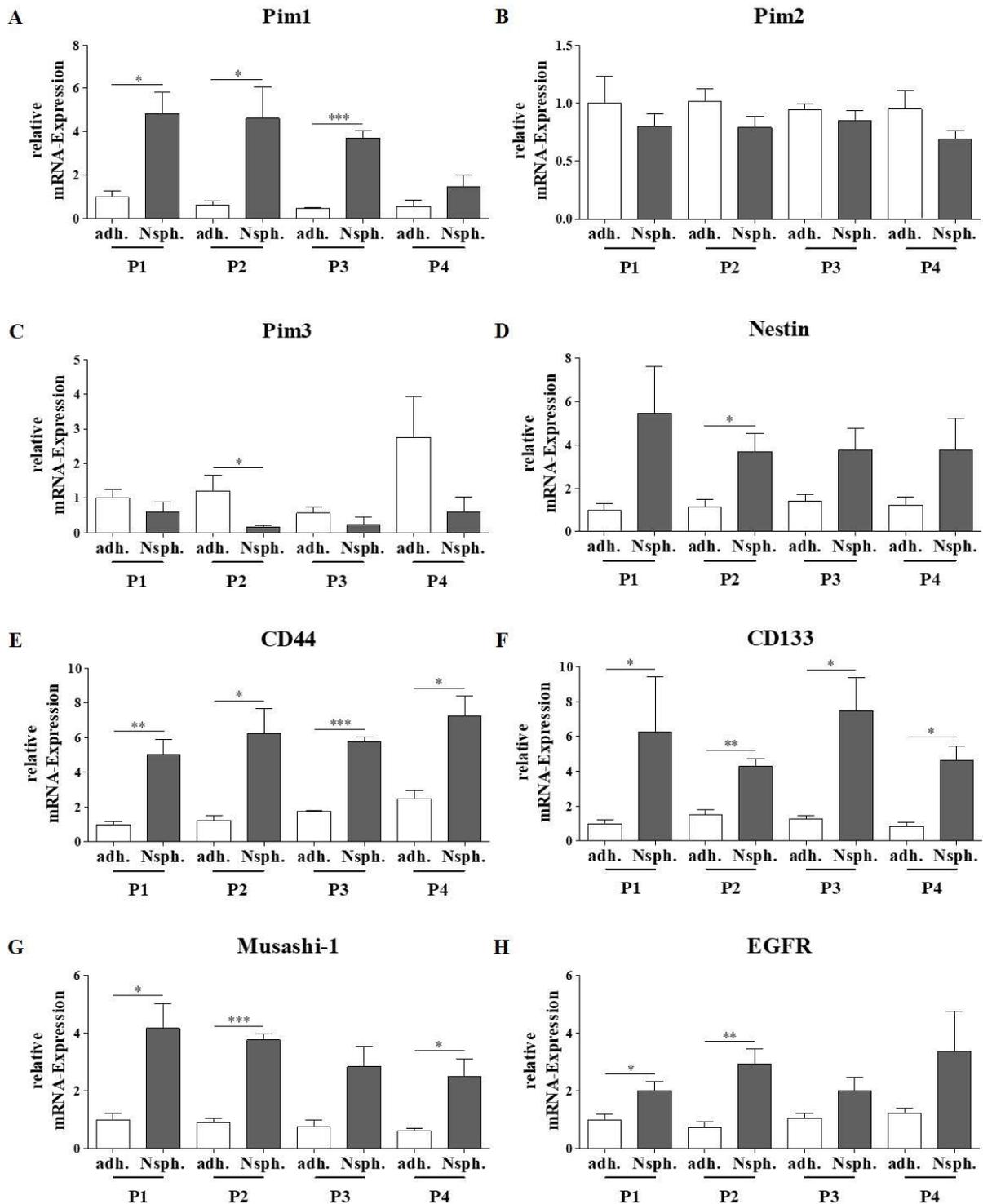
in adhärennten LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären der Passage 2 nachgewiesen werden (Abbildung 6C). Statistisch signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Expression von Pim3 konnten für die Passagen 1, 3 und 4 nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich auch hier eine tendenzielle Verringerung der mRNA-Expression in Neurosphären.

Hinsichtlich der potentiellen Stammzellmarker Nestin, CD44 und Musashi-1 zeigten die Neurosphären eine etwa vierfach gesteigerte mRNA-Expression im Vergleich zu adhärennt wachsenden LN-18 Zellen (Abbildung 6D, E und G). Die CD133-mRNA-Expression war in den Neurosphären etwa fünffach höher als in adhärennten LN-18 Zellen (Abbildung 6F), während die Expression von EGFR in Neurosphären um das zwei- bis dreifache im Vergleich zu adhärennten LN-18 Zellen gesteigert war (Abbildung 6H).

In Abb. 7 ist die relative Expression ausgewählter Proteine mit potentieller Bedeutung im Stammzellgeschehen von adhärennten LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären dargestellt. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte über die densitometrische Auswertung von Western Blots mithilfe der QuantityOne<sup>®</sup>-Software (Fa. BioRad) unter Normalisierung auf die GAPDH-Expression als Ladungskontrolle. Oberhalb der Diagramme ist jeweils eine repräsentative Darstellung von Western Blots zu sehen, die obere Bande zeigt das jeweilige Zielprotein, die untere Bande GAPDH als interner Standard (Proteinladungskontrolle).

Für adhärennte LN-18 Zellen und für Neurosphären konnten jeweils sowohl die kurze (Pim1S; 34 kDa) als auch die lange (Pim1L; 44 kDa) Isoform der Pim1-Kinase mithilfe des Western Blots nachgewiesen werden. Während für die Pim1S-Proteinexpression keine signifikante Änderung in Neurosphären im Vergleich zu adhärennt wachsenden LN-18 Zellen vorlag (Abb. 7A), konnte für Pim1L in Neurosphären eine signifikante, etwa 6-fach erhöhte Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 7B).

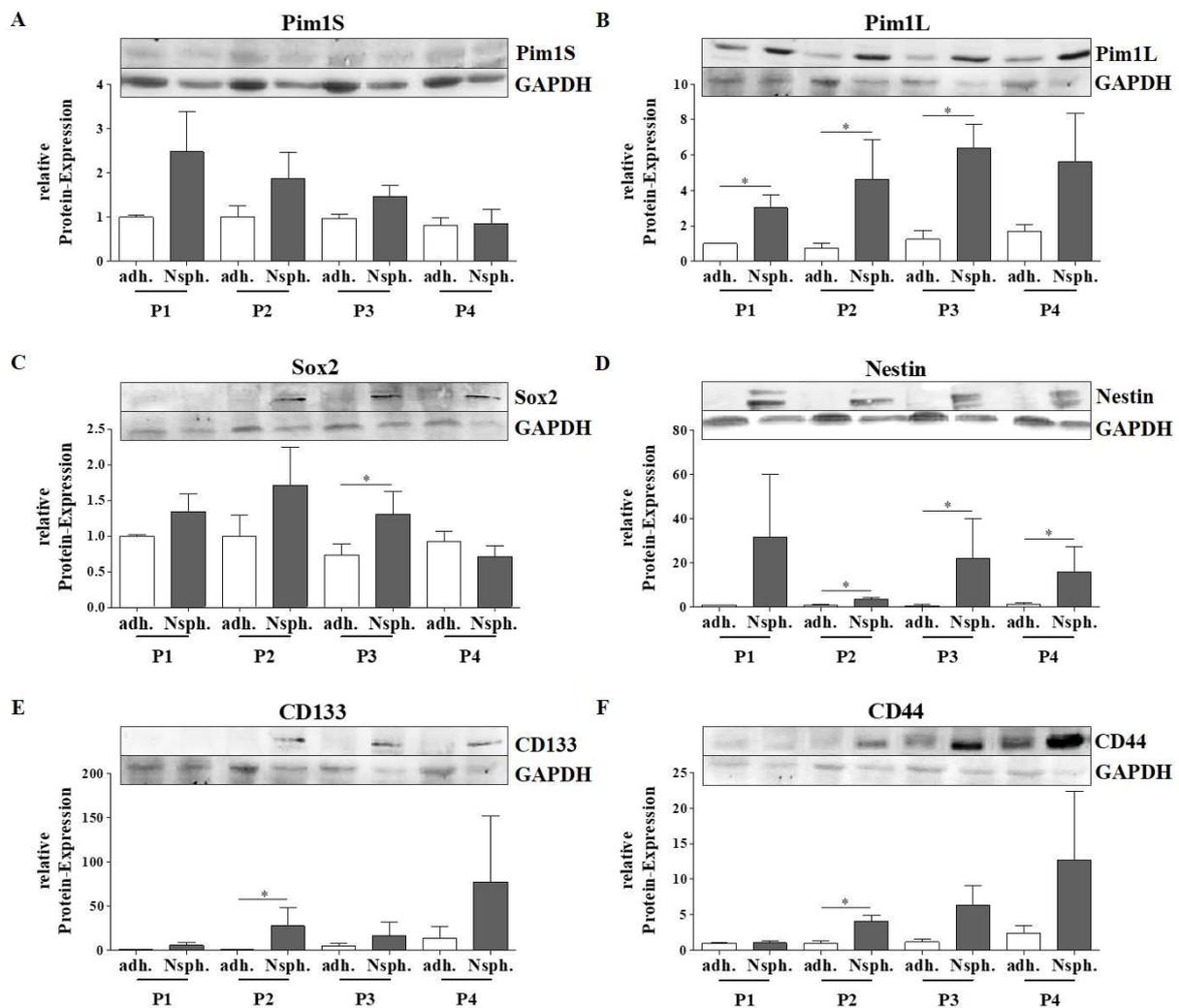
Bei Betrachtung der relativen Proteinexpression von Nestin und CD44 ließen sich in Neurosphären der Passage 2 im Vergleich zu adhärennten LN-18 Zellen signifikant, etwa 3,7-fach beziehungsweise 4,1-fach gesteigerte Werte nachweisen (Abb. 7D, 7F). Die relative Proteinexpression von Nestin und CD44 unterlag in der Passage 3 stärkeren Schwankungen, dennoch zeigte sich auch hier eine 36,2-fach bzw. 5,5-fach erhöhte Proteinexpression in Neurosphären im Vergleich zu adhärennt wachsenden LN-18 Zellen.



**Abb. 6: mRNA-Expression ausgewählter Gene mit potentieller Bedeutung im Stammzellgeschehen in adhären (adh.) LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären (Nsph.).** Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von Pim1 (A), Pim2 (B), Pim3 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133 (F), Musashi-1 (G) und EGFR (H), ermittelt durch quantitative RT-PCR und normalisiert auf den Mittelwert von 18S rRNA,  $\beta$ -Aktin, TBP und GAPDH. Die Diagramme setzen sich für die Passagen 1 und 2 aus jeweils vier unabhängigen Experimenten (n=4), für die Passagen 3 und 4 aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (n=3) zusammen. Mittelwert + SD, \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Statistisch signifikante Unterschiede in der relativen Proteinexpression konnten auch für CD133 beobachtet werden (Abb. 7E). Bei erhöhten interexperimentellen Schwankungen in der relativen Proteinexpression war eine bis zu 40-fache Steigerung der CD133-Proteinexpression

in Neurosphären im Vergleich zu den adhärennten LN-18 Zellen in der Passage 2 zu verzeichnen. In den Passagen 3 und 4 lag ebenfalls eine hohe Variabilität zwischen den drei unabhängig durchgeführten Experimenten vor, sodass die etwa 3,4- bzw. 5,5-fache Steigerung der CD133 Protein-Expression nicht signifikant ausfiel. Im Gegensatz dazu war für den Transkriptionsfaktor Sox2 in der Passage 3 eine signifikante 1,8-fache Steigerung der relativen Proteinexpression in Neurosphären im Vergleich zu adhärennten LN-18 Zellen erkennbar (Abb. 7C). Für die Passagen 1 und 2 zeigte sich ebenfalls eine leicht erhöhte Sox2 Protein-Expression in Neurosphären, die statistisch jedoch nicht signifikant war, während in Passage 4 kein Expressionsunterschied zwischen Neurosphären und adhärennten LN-18 Zellen erkennbar war.



**Abb. 7: Expression ausgewählter Proteine mit potentieller Bedeutung im Stammzellgeschehen in adhärennten (adh.) LN-18 Zellen im Vergleich zu Neurosphären (Nsph.).** Die Quantifizierung der relativen Proteinexpression von Pim1S (A), Pim1L (B), Sox2 (C), Nestin (D), CD133 (E) und CD44 (F) in Zellysaten von adhärennt wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären erfolgte mithilfe von Western Blots. Oberhalb der jeweiligen Diagramme wurden repräsentative Western Blots dargestellt: der obere Anteil zeigt das jeweilige Zielprotein, der untere Anteil die GAPDH-Expression als Ladungskontrolle. Die Analyse der Western Blots erfolgte durch eine densitometrische Auswertung mithilfe der QuantityOne®-Software (Fa. Bio-Rad). In den Diagrammen ist die relative Expression der Zielproteine bezogen auf GAPDH als internen Standard gezeigt. Die Diagramme setzen sich für die Passage 1 und 2 aus jeweils vier unabhängigen Experimenten (n=4), für die Passage 3 und 4 aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (n=3) zusammen. Mittelwert + SD, \*p < 0,05.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Western Blot-Untersuchungen wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (vergleiche Abbildungen 8 bis 12) im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert, bei der die Detektion des Zielproteins über einen primären zielgerichteten Antikörper und einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI, ein in die DNA interkalierender Farbstoff. Für die Erzeugung von Schnittpräparaten wurden LN-18 Zellen zum einen als adhärent wachsende Zellen und zum anderen als Neurosphären für jeweils 7 d je Passage kultiviert.

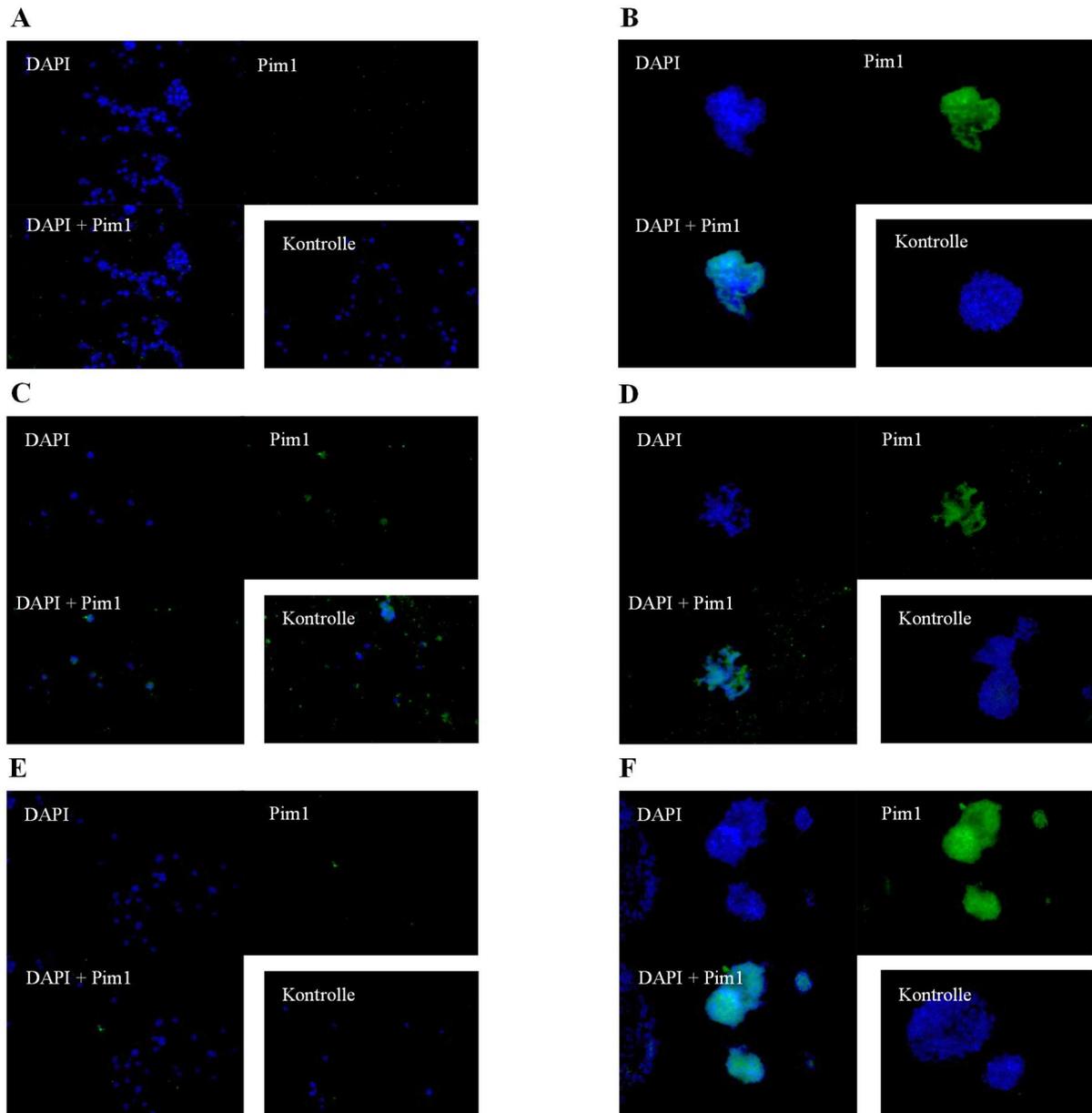
In Abb. 8A bis F sind repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen der Kinase Pim1 dargestellt. Analog zu den Ergebnissen der Western Blots für Pim1L zeigten die Neurosphären eine deutlich erhöhte Expression von Pim1, während die adhärent wachsenden LN-18 Zellen der entsprechenden Passagen nur eine geringe Immunfluoreszenz-Färbung aufwiesen.

Des Weiteren erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen zur Detektion bedeutsamer Stammzell- (Nestin, CD44, CD133, Musashi-1, Sox2) und Differenzierungsmarker (SPARC) an den LN-18 Glioblastomzellen. Die LN-18 Neurosphären zeigten in der Immunfluoreszenz-Färbung für Nestin (Abb. 9A und B) eine starke, konsistente Expression des Stammzellmarkers im Vergleich zu adhärent wachsenden LN-18 Zellen, in denen Nestin kaum nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war sowohl bei den adhärent wachsenden LN-18 Zellen als auch den Neurosphären bei identischer Belichtungsintensität und -dauer eine deutliche CD44- und CD133-Expression erkennbar (vergleiche Abb. 9C und D für CD44, 9E und F für CD133). Die Färbung von CD44 und CD133 war jedoch insbesondere im äußeren Bereich der Neurosphären verstärkt, während die Zellen im Zentrum der Neurosphären eine geringere und lokal fehlende Expression der Stammzellmarker zeigten.

Auch für das als Stammzellmarker diskutierte Musashi-1 ergab sich für die Neurosphären im Vergleich zu den adhärent wachsenden LN-18 Zellen eine wesentlich stärkere Immunfluoreszenz-Färbung des Proteins (vergleiche Abb. 10A und B). Hinsichtlich des Differenzierungsmarkers SPARC wiesen die Neurosphären eine ähnlich starke Färbung wie die adhärent gewachsenen LN-18 Zellen auf (Abb. 10C und D).

In den Abb. 11 und 12 sind Doppelfärbungen für Pim1 und Nestin bzw. CD44, CD133, Musashi1, Sox2 oder SPARC von LN-18 Zellen dargestellt.

Für Pim1 (roter Kanal; Abbildung 11A und B) und Nestin (grüner Kanal; Abb. 11A und B) konnte eine partielle Überlappung der Immunfluoreszenz-Färbung anhand der auftretenden gelben Fluoreszenzsignale bei Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle innerhalb der Neurosphären nachgewiesen werden.

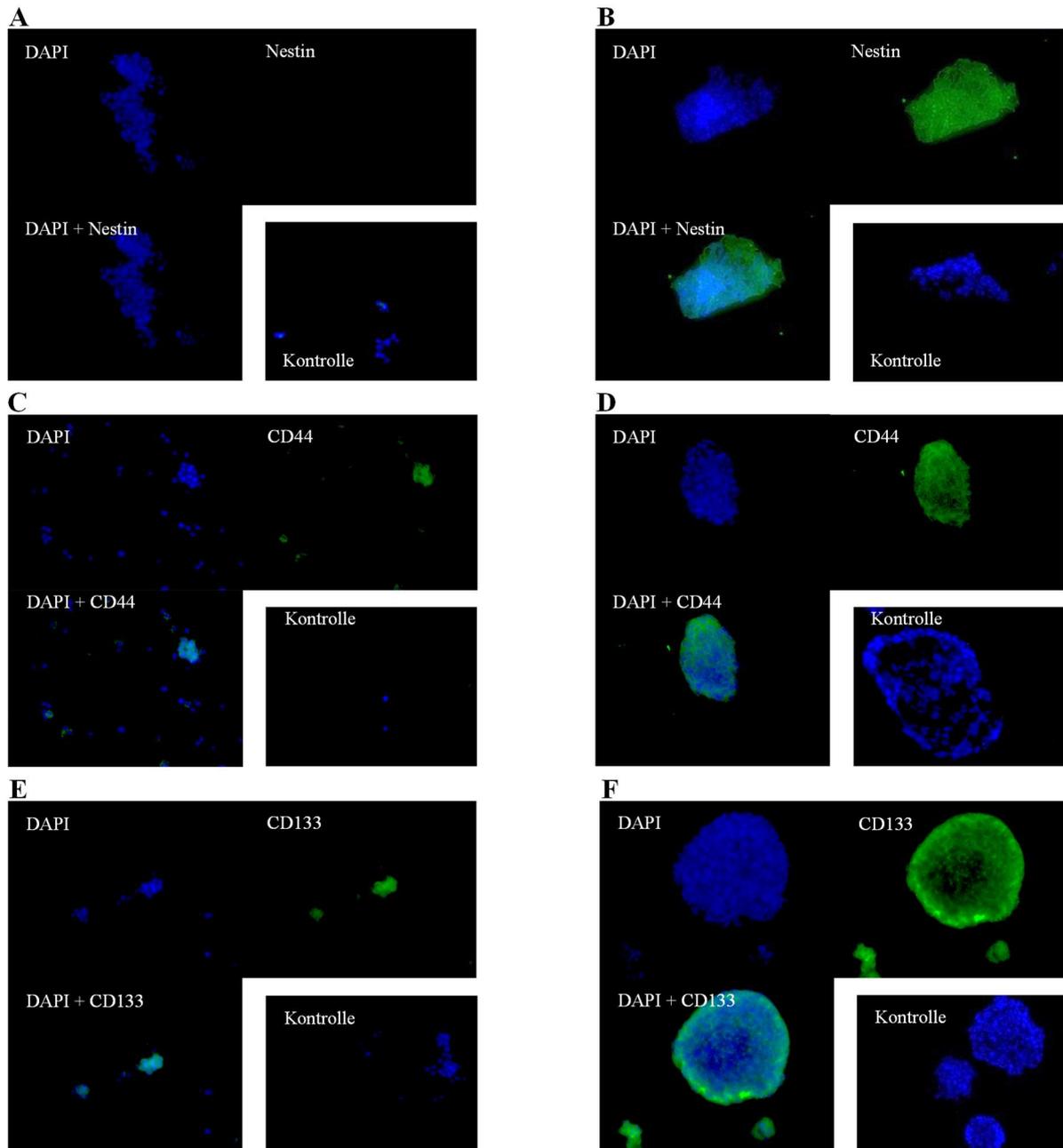


**Abb. 8: Immunfluoreszenz-Färbung der Kinase Pim1 in humanen LN-18 Glioblastomzellen.** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbungen der Kinase Pim1 (grün) von adhären wachsenden LN-18 Zellen (A, C, E) und Neurosphären (B, D, F) der Passagen 1 (A+B), 3 (C+D) und 4 (E+F). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Kontrolle beinhaltet keine Inkubation mit dem primären anti-Pim1-Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 40x/1.4 DIC (oil)).

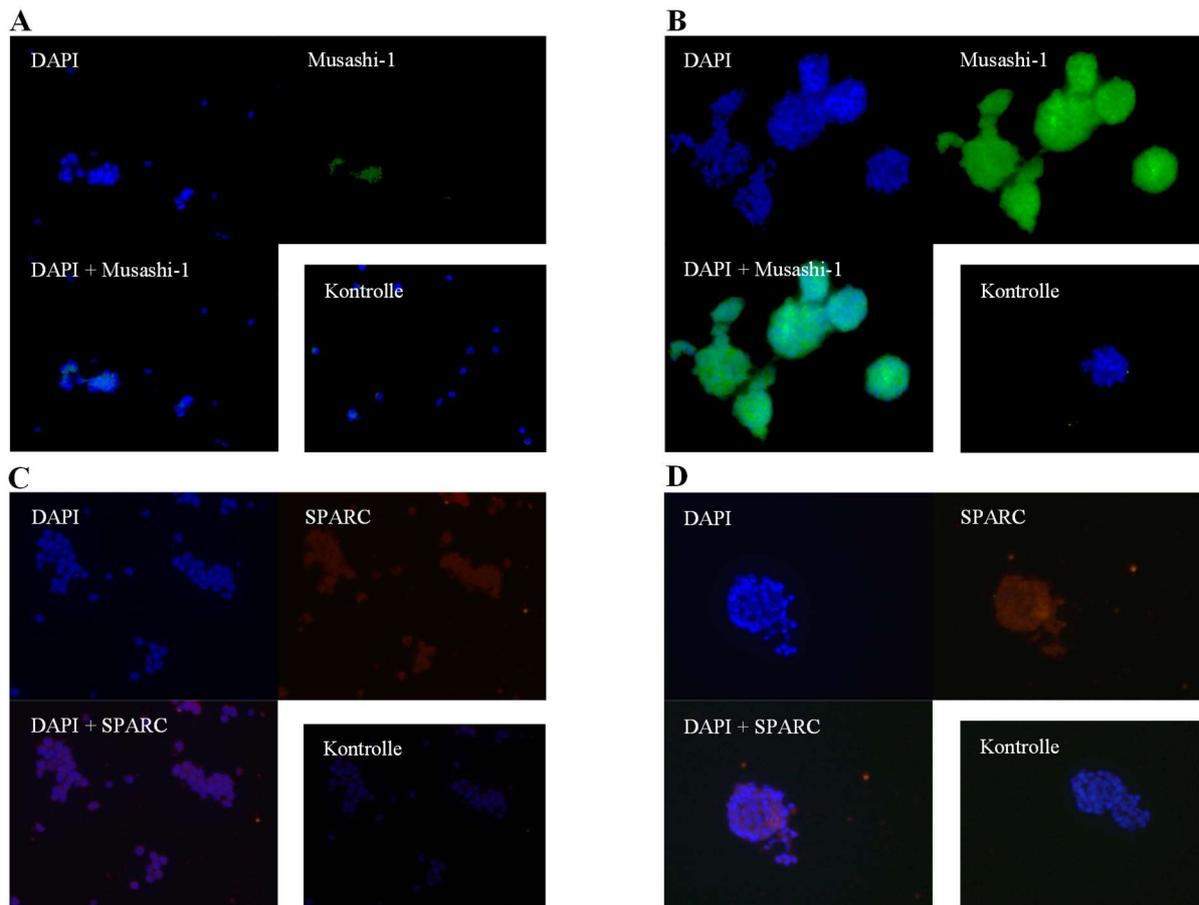
Die adhären wachsenden LN-18 Zellen zeigten eine derartige Überlappung der Immunfluoreszenzsignale von Pim1 und Nestin nicht, möglicherweise aufgrund einer deutlich schwächeren Immunfluoreszenz-Färbung beider Proteine.

In der Doppelfärbung von Pim1 (grüner Kanal; Abb. 11C und D) und CD133 (roter Kanal; Abb. 11C und D) zeigte sich eine starke und konsistente Expression beider Proteine in den LN-18 Neurosphären, während die adhären wachsenden LN-18 Zellen nur eine schwache Färbung von Pim1 und CD133 aufwiesen. Jedoch konnte keine deutliche Überlappung der Fluoreszenzsignale von Pim1 und CD133 für adhären gewachsene LN-18 Zellen oder

Neurosphären nachgewiesen werden. Adhärenent wachsende LN-18 Zellen präsentierten in der Doppelfärbung für CD44 und Pim1 (Abb. 11E) eine schwache Expression von CD44 (grüner Kanal) sowie eine mäßige Expression von Pim1 (roter Kanal). Die Neurosphären (Abb. 11F) zeigten hingegen eine starke Expression von CD44 (grüner Kanal) sowie von Pim1 (roter Kanal). Eine Kolokalisation von Pim1 und CD44 ließ sich basierend auf fehlender gelber Immunfluoreszenzsignale nach Überlagerung beider Kanäle nicht nachweisen.



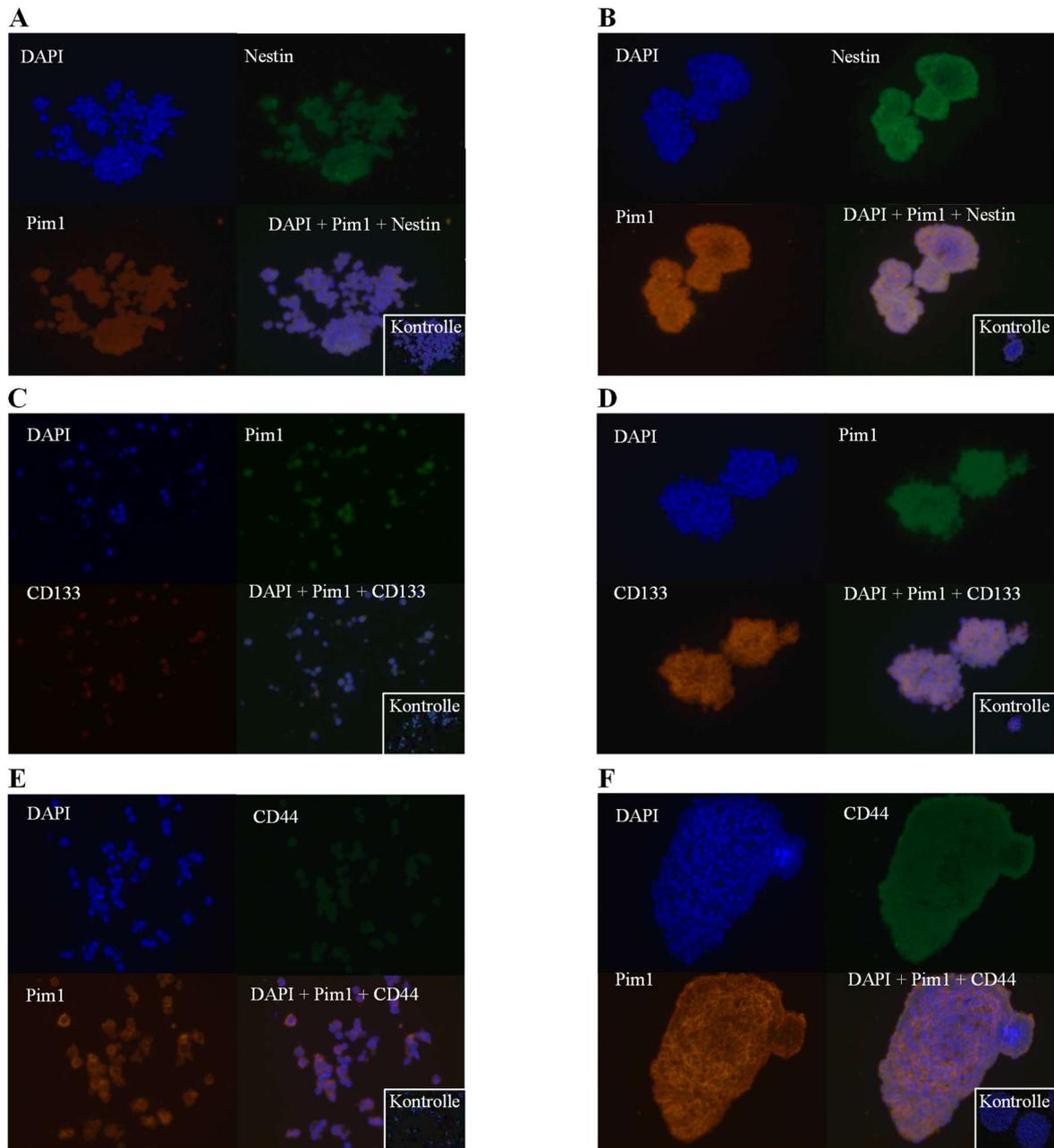
**Abb. 9: Immunfluoreszenz-Färbung der Stammzellmarker Nestin, CD44 und CD133 in humanen LN-18 Glioblastomzellen.** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbungen von Nestin (A+B, Passage 2; Belichtungszeit: 950 ms, grün) von adhärenent wachsenden LN-18 Zellen (A) und Neurosphären (B), von CD44 (C+D, Passage 3; Belichtungszeit: 300 ms, grün) von adhärenent wachsenden LN-18 Zellen (C) und Neurosphären (D) sowie von CD133 (E+F, Passage 3; Belichtungszeit: 700 ms, grün) von adhärenent wachsenden LN-18 Zellen (E) und Neurosphären (F). Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blauer Kanal). Die Kontrolle beinhaltete keine Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 40x/1.4 DIC (oil)).



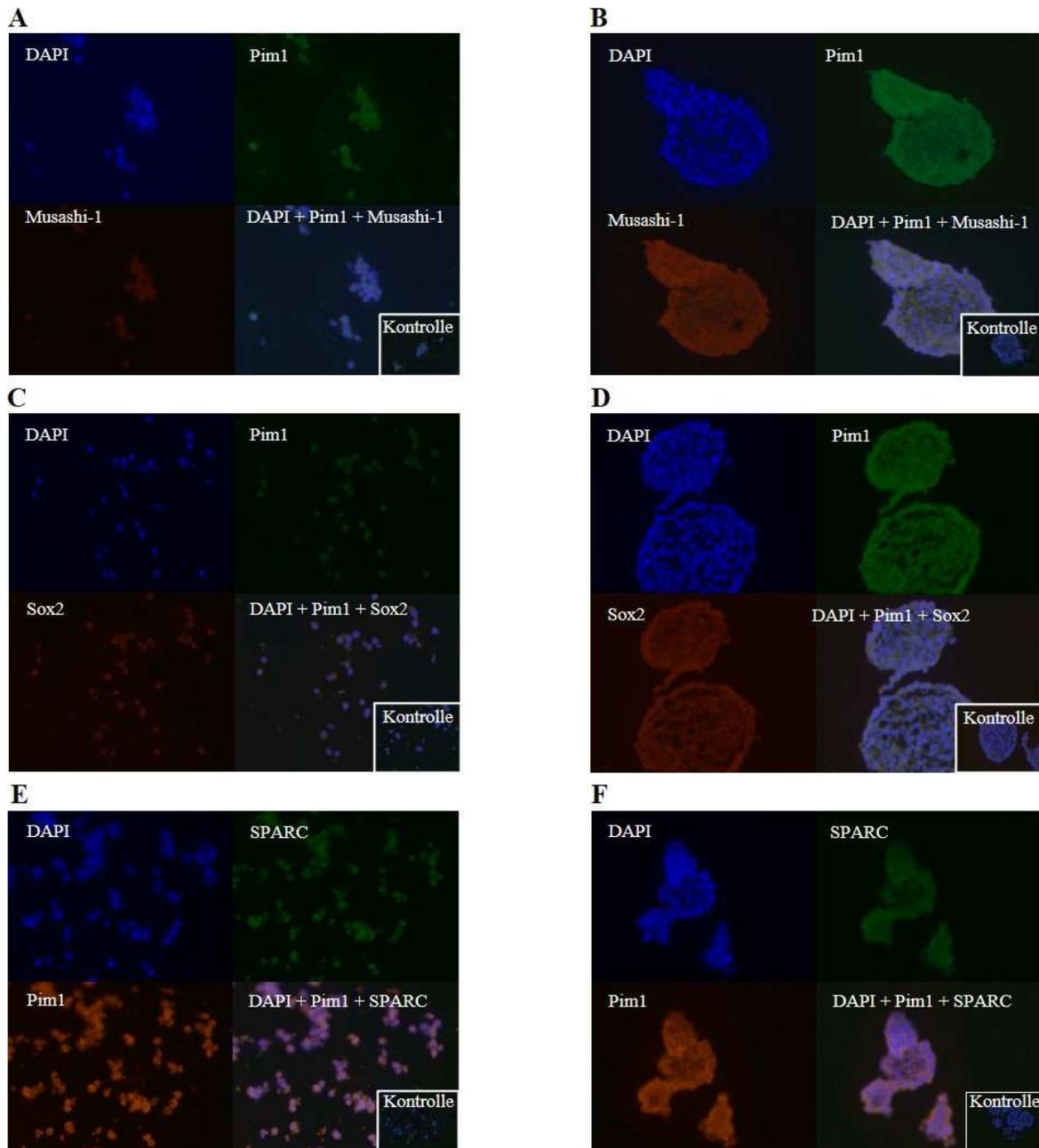
**Abb. 10: Immunfluoreszenz-Färbung von Musashi-1 und SPARC in humanen LN-18 Glioblastomzellen.** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbungen von Musashi-1 (A+B, Passage 2; Belichtungsdauer: 300 ms, grün) von adhären wachsenden LN-18 Zellen (A) und Neurosphären (B) sowie von SPARC (C+D, Passage 2; Belichtungsdauer: 200 ms, rot) von adhären wachsenden LN-18 Zellen (C) und Neurosphären (D). DAPI (blauer Kanal) wurde für die Färbung der Zellkerne genutzt. Die Kontrolle beinhaltete keine Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 40x/1.4 DIC (oil)).

In den Doppelfärbungen von Pim1 (grüner Kanal; Abb. 12A, B, C und D) mit Musashi-1 (roter Kanal; Abb. 12A und B) bzw. mit Sox2 (roter Kanal; Abb. 12C und D) zeigte sich ebenfalls eine stärkere Expression der genannten Proteine in den Neurosphären im Vergleich zu den adhären wachsenden LN-18 Zellen. Bei der Überlagerung der Immunfluoreszenzkanäle von Musashi-1 mit Pim1 bzw. von Sox2 mit Pim1 konnte weder für Musashi-1 noch für Sox2 eine Kolo-kalisation mit Pim1 nachgewiesen werden.

Die Kofärbungen für Pim1 und SPARC (Abb. 12E und F) zeigten sowohl für die adhären wachsenden LN-18 Zellen als auch für die Neurosphären hinsichtlich SPARC eine ähnliche Fluoreszenz mittlerer Intensität. Eine zumindest partielle Kolo-kalisation beider Proteine kann aufgrund der beobachteten leichten Gelbfärbung bei Überlagerung des roten (Pim1) und des grünen (SPARC) Fluoreszenzkanals nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 11: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Pim1 mit Nestin bzw. CD133 oder CD44 in adhären wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären.** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbungen von adhären wachsenden LN-18 Zellen (**A, C und E**) sowie von Neurosphären (**B, D und F**). In **A+B** ist die Doppelfärbung von Pim1 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 15 ms) und Nestin (grüner Kanal; Belichtungsdauer 98 ms) dargestellt. Sowohl die adhären wachsenden LN-18 Zellen als auch die Neurosphären zeigen für beide Proteine eine Expression, jedoch imponiert diese stärker für die Neurosphären. Bei Überlagerung der Immunfluoreszenzkanäle kommt innerhalb der Neurosphären ein gelbes Signal zur Darstellung, sodass eine partielle Kolokalisation von Pim1 und Nestin angenommen werden kann. **C+D** zeigt die Doppelfärbung für Pim1 (grüner Kanal; Belichtungsdauer: 41 ms) und CD133 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 58 ms), die ebenfalls eine stärkere Expression beider Proteine innerhalb von Neurosphären zeigt (**D**). In **E+F** zeigt sich eine stärkere Expression von CD44 (grüner Kanal; Belichtungsdauer: 90 ms) innerhalb der Neurosphären im Vergleich zu den adhären wachsenden LN-18 Zellen. Sowohl die Neurosphären als auch die adhären wachsenden LN-18 Zellen zeigen eine Expression von Pim1 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 20 ms). DAPI (blauer Kanal) wurde für die Färbung der Zellkerne genutzt. Die Kontrollen beinhalteten keine Inkubation mit dem primären Antikörper und sind jeweils unten rechts dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 40x/1.4 DIC (oil)).



**Abb. 12: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Pim1 mit Musashi-1, Sox2 oder SPARC in adhären wachsenden LN-18 Zellen und Neurosphären.** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbungen von adhären wachsenden LN-18 Zellen (**A, C und E**) sowie von Neurosphären (**B, D und F**). **A+B** zeigt die Immunfluoreszenz-Färbung von Pim1 (grüner Kanal; Belichtungsdauer: 22 ms) und Musashi-1 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 80 ms). In **C+D** kommen die Immunfluoreszenz-Färbungen von Pim1 (grüner Kanal; Belichtungsdauer 66 ms) und Sox2 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 88 ms) zur Darstellung. **E+F** zeigt die Immunfluoreszenz-Färbungen von Pim1 (roter Kanal; Belichtungsdauer: 40 ms) und SPARC (grüner Kanal; Belichtungsdauer: 70 ms). DAPI (blauer Kanal) wurde für die Färbung der Zellkerne genutzt. Die Kontrollen beinhalteten keine Inkubation mit dem primären Antikörper und sind jeweils unten rechts dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Vergrößerung: 40x/1.4 DIC (oil)).

### 3.2 siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1

Nachdem in Neurosphären eine signifikant erhöhte Expression von Pim1 sowie von Stammzellmarkern wie Nestin, CD133, CD44 und Musashi-1 nachgewiesen werden konnte, sollte in den nachfolgenden Experimenten der Einfluss eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von Pim1 auf die Expression von Stammzellmarkern in Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18 näher untersucht werden.

#### 3.2.1 siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 bei adhärent wachsenden LN-18 Zellen

Zur Untersuchung der Effekte eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von Pim1 auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker wurden adhärente LN-18 Zellen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 % mit Pim1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert (vergleiche 2.2.1.4).

In Abb. 13 ist die relative mRNA-Expression von Pim1 und Stammzell- sowie Differenzierungsmarker 48 Stunden nach der Transfektion dargestellt. Durch den siRNA-vermittelten *knockdown* von Pim1 konnte die relative mRNA-Expression von Pim1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 36,6 % reduziert werden (Abb. 13A). Der siRNA-vermittelte *knockdown* von Pim1 führte im Vergleich zur Kontrolle zu keinen signifikanten Unterschieden in der mRNA-Expression von Pim2 und Pim3 sowie CD44 und CD133 (vergleiche Abb. 13B, C, E und F). Interessanterweise kam es nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von Pim1 zu einer geringfügig, aber signifikant auf das 1,5-fache gesteigerten Expression von Nestin auf mRNA-Ebene (Abb. 13D). Die relative mRNA-Expression von Musashi-1 und SPARC war ebenfalls 48 Stunden nach dem siRNA-vermittelten *knockdown* von Pim1 signifikant auf das 1,6-fache bzw. 1,4-fache erhöht (Abb. 13G und H).

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse zur relativen Proteinexpression nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von Pim1 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle ließen die LN-18 Zellen 72 Stunden nach Transfektion bzw. 48 Stunden nach der Retransfektion mit der Pim1-siRNA keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinexpression von Pim1S und Pim1L erkennen (Abb. 14A und B). Auch die relative Proteinexpression der Stammzell- und Differenzierungsmarker zeigte keine signifikanten Veränderungen nach Einsatz von Pim1-spezifischer siRNA im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (Abb. 14C-H).

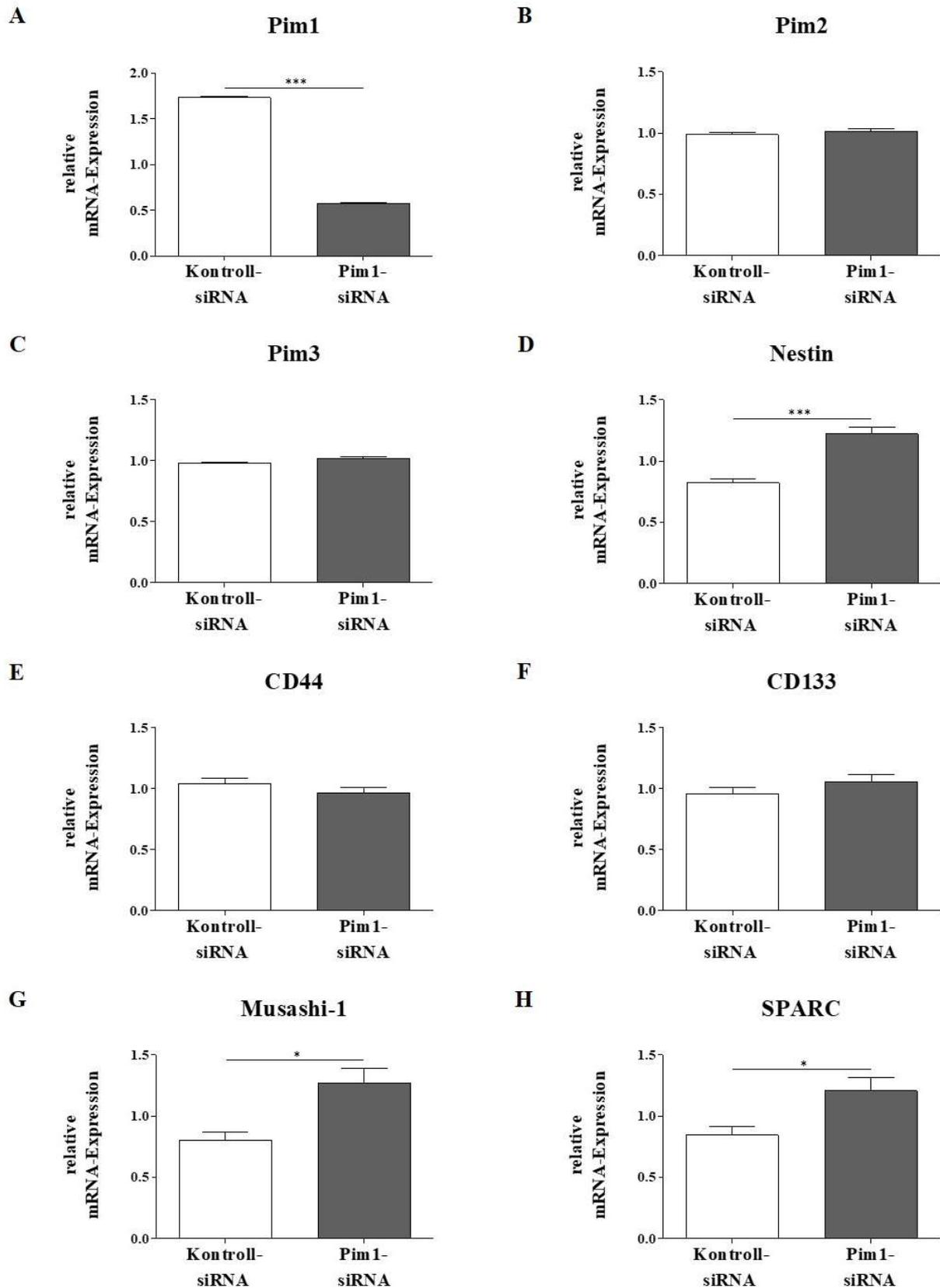
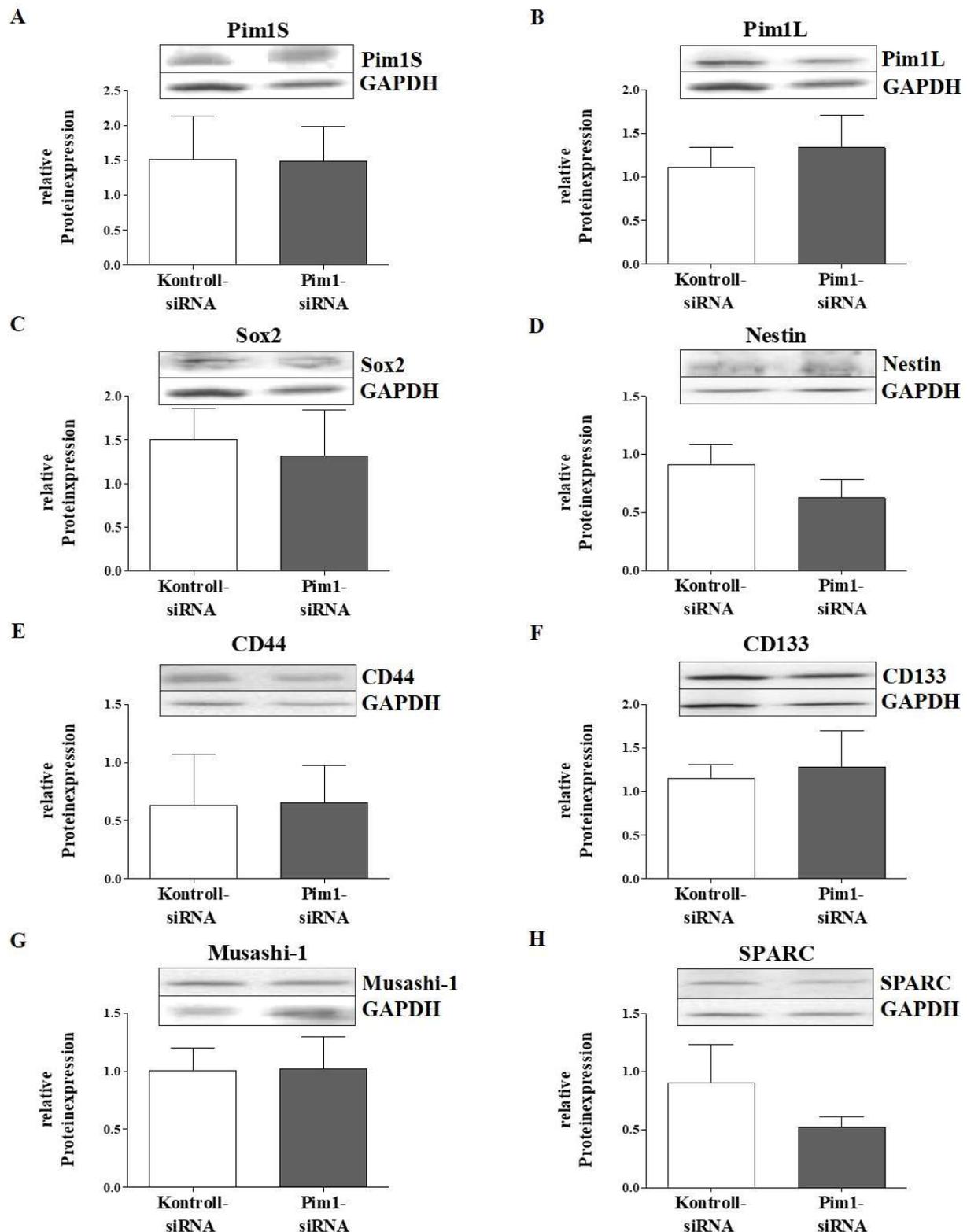


Abb. 13: siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei adhären wachsenden LN-18 Zellen. Darstellung der relativen mRNA-Expressionen, ermittelt durch quantitative RT-PCR und normalisiert auf den Mittelwert von 18S rRNA, TBP,  $\beta$ -Aktin und GAPDH, 48 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Pim1-spezifischer siRNA. Pim1 (A), Pim2 (B), Pim3 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133 (F), Musashi-1 (G) und SPARC (H). Mittelwert + SD, n = 4, t-test \*p < 0,05, \*\*\* p < 0,001.



**Abb. 14:** siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die Proteinexpression von Stammzell- und Differenzierungsmarker bei adhären wachsenden LN-18 Zellen. Darstellung der durch Immunoblot-Analysen ermittelten relativen Proteinexpression von Pim1S (A), Pim1L (B) sowie der Stammzell- bzw. Differenzierungsmarker Sox2 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133 (F), Musashi-1 (G) und SPARC (H) 72 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Pim1-spezifischer siRNA. Die erhobenen Expressionsdaten wurden auf GAPDH (interne Ladungskontrolle, *housekeeping*-Protein) normalisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mithilfe der QuantityOne®-Software. Mittelwert + SD, n = 4. Repräsentative Western Blots eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von adhären LN-18 Zellen sind jeweils über den Graphen dargestellt.

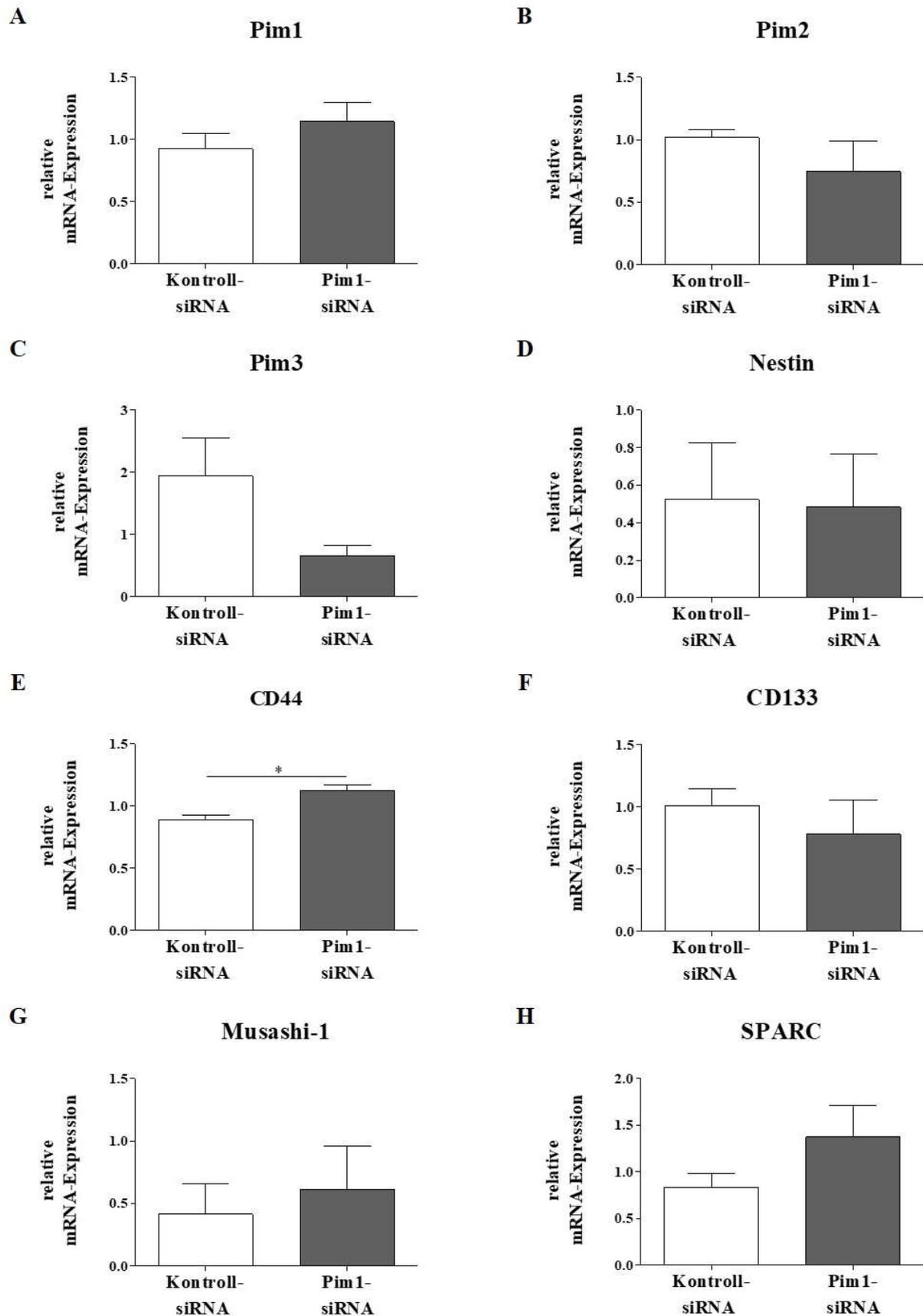
### 3.2.2 siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 bei LN-18 Neurosphären

Aufgrund der signifikant erhöhten Expression von Pim1 sowie von Stammzellmarker in Neurosphären im Vergleich zu adhären gewachsenen Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18 (vergleiche 3.1) sollte des Weiteren der Effekt eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von Pim1 auf die Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in Neurosphären der Passagen 1 und 2 untersucht werden.

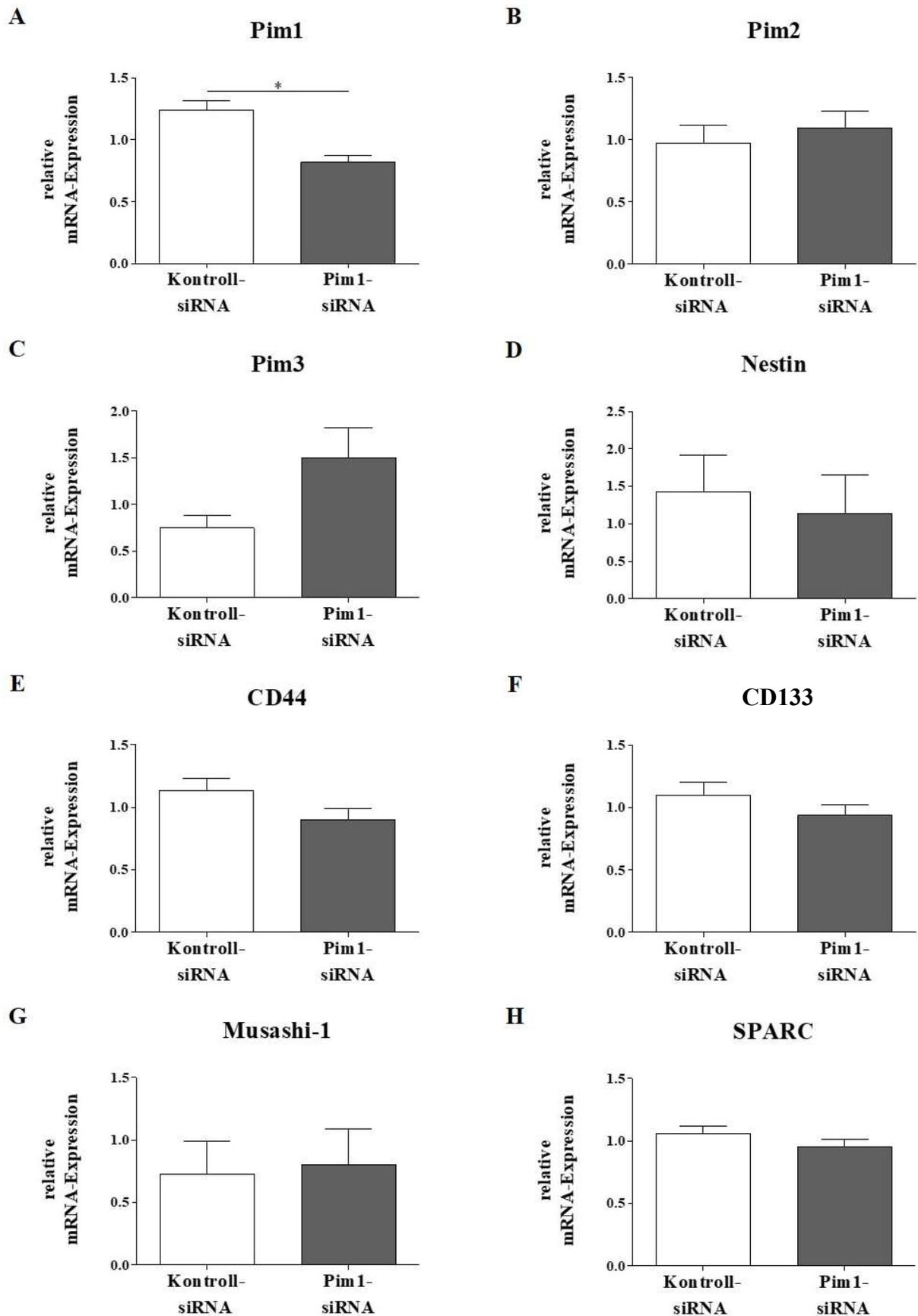
Wie Abb. 15 zeigt, konnte keine signifikante Reduktion der Pim1-mRNA-Expression durch Transfektion einer spezifischen Pim1-siRNA in Neurosphären der Passage 1 erzielt werden. Die relative mRNA-Expression von Pim2 sowie Pim3 war ebenfalls nicht signifikant verändert (Abb. 15B und C). Dementsprechend wiesen die Neurosphären der Passage 1 nach Transfektion mit der spezifischen Pim1-siRNA ebenfalls keinen veränderten mRNA-Gehalt an CD133 (Abb. 15F), Nestin (Abb. 15D) sowie Musashi-1 und SPARC auf (Abb. 15G und H). Im Vergleich zur Kontrolle zeigten Neurosphären der Passage 1 nach Transfektion mit der spezifischen Pim1-siRNA eine geringfügige, aber signifikant auf das 1,2-fache gesteigerte mRNA-Expression von CD44 (Abb. 15E). Auch auf Proteinebene konnte kein siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 72 Stunden nach Transfektion in den Neurosphären der Passage 1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zur Passage 1 wurden auch Neurosphären der Passage 2 einer Transfektion mit Kontroll- und spezifischer Pim1-siRNA unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abb. 16 (mRNA-Daten) und 17 (Protein-Daten) dargestellt. Im Vergleich zu den LN-18 Neurosphären der Passage 1 konnte 48 Stunden nach Transfektion mit der spezifischen Pim1-siRNA bei Neurosphären der Passage 2 eine um etwa 30 % signifikant reduzierte Pim1-mRNA-Expression von 1,24 (Kontrolle) auf 0,82 (Pim1-siRNA) nachgewiesen werden (Abb. 16A). Für Pim2 und Pim3 konnte eine derartige Reduktion der mRNA-Expression nicht beobachtet werden (Abb. 16 B und C). Auch die relative mRNA-Expression der Stammzell- und Differenzierungsmarker CD44, CD133, Nestin, Musashi-1 sowie SPARC zeigte keine signifikante Änderung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 16 D-H).

In Abb. 17 sind repräsentative Western Blots sowie der Einfluss der Transfektion von Neurosphären der Passage 2 mit einer spezifischen Pim1-siRNA nach 72 h auf die Proteinexpression von Pim1 sowie Stammzell- und Differenzierungsmarker dargestellt. Die erhobenen Daten der densitometrischen Auswertung der Western Blots sind auf die interne Ladungskontrolle GAPDH normalisiert und als relative Proteinexpression veranschaulicht.

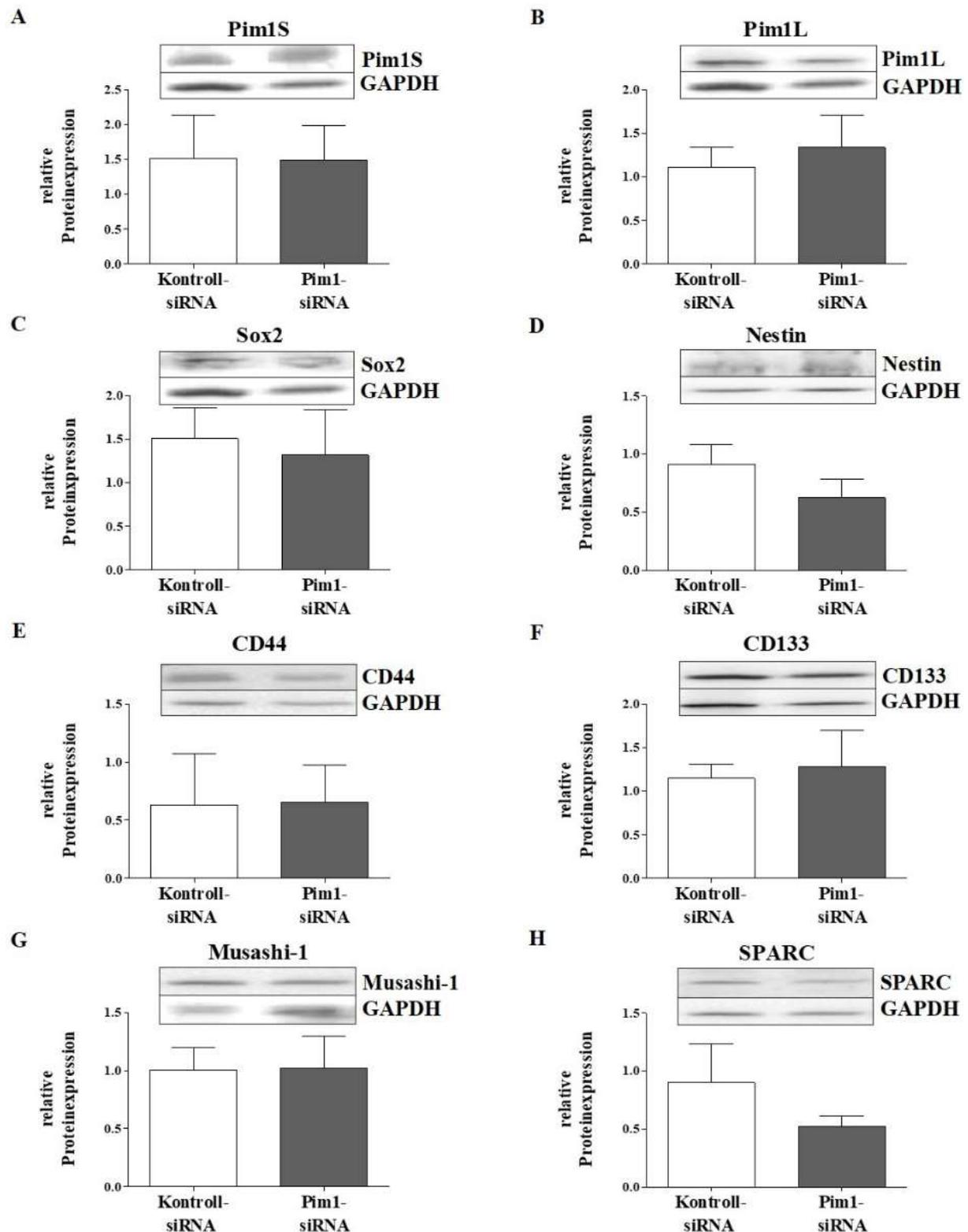


**Abb. 15:** siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 1. Darstellung der relativen mRNA-Expression, ermittelt durch quantitative RT-PCR und normalisiert auf den Mittelwert von 18S rRNA, TBP,  $\beta$ -Aktin und GAPDH, 48 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Pim1-spezifischer siRNA. Pim1 (A), Pim2 (B), Pim3 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133 (F), Musashi-1 (G) und SPARC (H). Mittelwert + SD, n = 4, t-test \*p < 0,05.



**Abb. 16:** siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die mRNA-Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 2. Darstellung der relativen mRNA-Expression, ermittelt durch quantitative RT-PCR und normalisiert auf den Mittelwert von 18S rRNA, TBP,  $\beta$ -Aktin und GAPDH, 48 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Pim1-spezifischer siRNA. Pim1 (A), Pim2 (B), Pim3 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133(F), Musashi-1 (G) und SPARC (H). Mittelwert + SD, n = 4, t-Test \* p < 0,05.

Wie bereits bei der Transfektion von adhärennten LN-18 Zellen beobachtet, konnte trotz reduziertem Pim1-mRNA-Gehalt keine Abnahme der Pim1-Proteinexpression 72 Stunden nach Transfektion mit der spezifischen Pim1-siRNA erzielt werden (Abb. 17A und B). Tendenziell zeigte sich sogar eine leichte Zunahme der Proteinexpression von Pim1S und Pim1L sowie von Sox2 in den mit Pim1-siRNA transfizierten Zellen, die allerdings nicht signifikant ausfiel. Dementsprechend waren auch keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinexpression der Stammzell- und Differenzierungsmarker in den mit Pim1-siRNA transfizierten Neurosphären im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar (Abb. 17C-H). Die relative Proteinexpression von Nestin und CD44 war in den mit Pim1-siRNA transfizierten Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle zwar verringert (Nestin: 0,63 im Vergleich zur Kontrolle mit 0,83; CD44: 0,33 im Vergleich zur Kontrolle mit 1,11), jedoch war dies nicht statistisch signifikant. Die Proteinexpression von CD133 (Abb. 17F) sowie von Musashi-1 und SPARC (Abb. 17G und H) zeigte im Mittel vergleichbare Werte in Kontrollzellen und mit Pim1-siRNA transfizierten Neurosphären der Passage 2.



**Abb. 17:** siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 und dessen Auswirkungen auf die Proteinexpression von Stammzell- und Differenzierungsmarker in LN-18 Neurosphären der Passage 2. Darstellung der durch Immunoblot-Analysen ermittelten relativen Proteinexpression von Pim1S (A), Pim1L (B) sowie der Stammzell- bzw. Differenzierungsmarker Sox2 (C), Nestin (D), CD44 (E), CD133 (F), Musashi-1 (G) und SPARC (H) 72 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Pim1-spezifischer siRNA. Die erhobenen Expressionsdaten wurden auf GAPDH (interne Ladungskontrolle, *housekeeping*-Protein) normalisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mithilfe der QuantityOne®-Software. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 4. Repräsentative Western Blots eines siRNA-vermittelten *knockdowns* sind jeweils über den Graphen dargestellt.

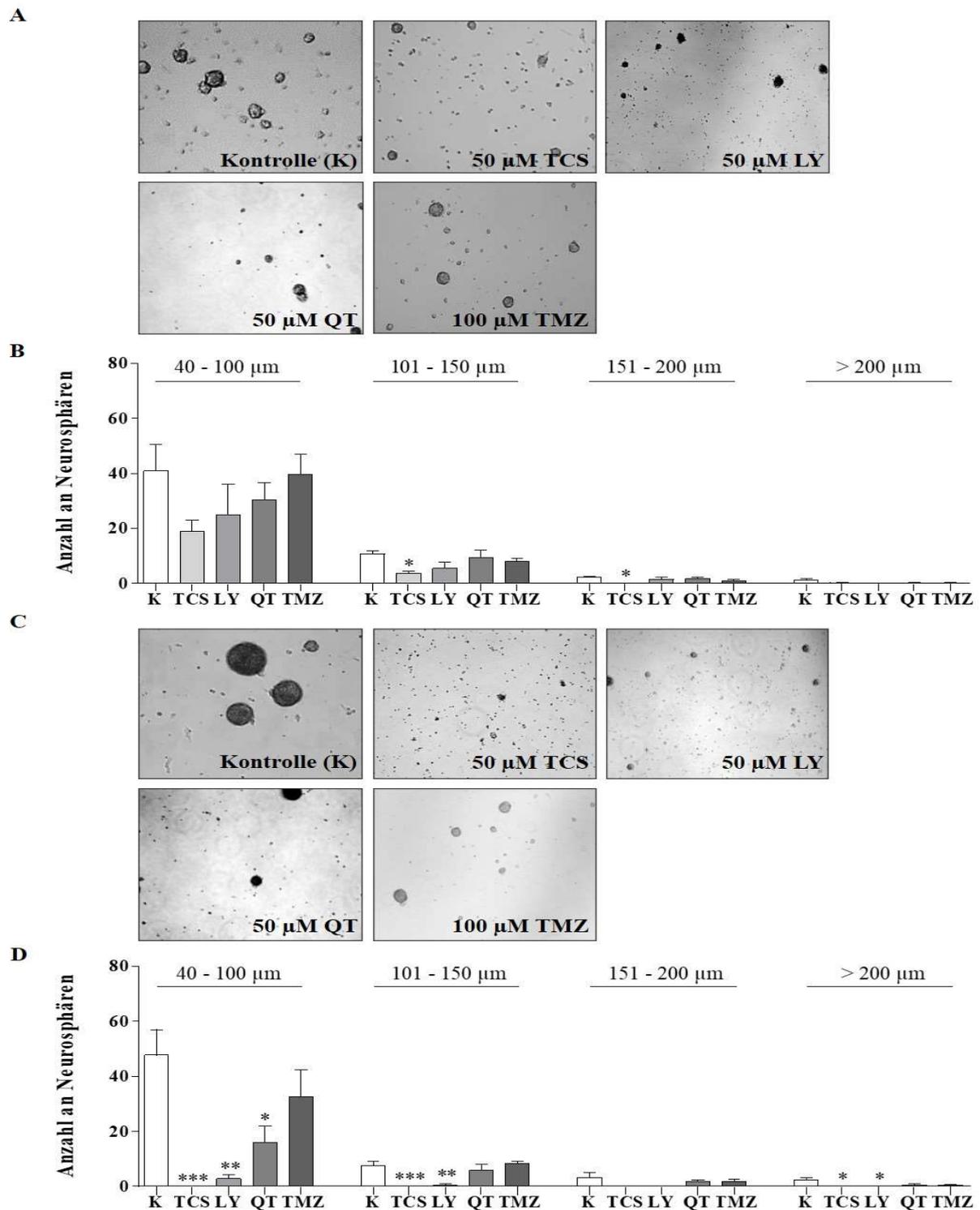
### 3.3 Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf Bildung und Wachstum von LN-18 Neurosphären

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine pharmakologische Pim1-Inhibition die Expression von Stammzellmarkern in GBM-Zellen reduziert (Dissertation Ellen Balz, 2017<sup>21</sup>) und in stammzellartigen Neurosphären der GBM-Zelllinie LN-18 die mRNA- und Proteinexpression von Pim1 erhöht ist (vergleiche 3.1), sollte der Einfluss einer pharmakologischen Hemmung von Pim1 auf das Wachstum von Neurosphären untersucht werden. Hierfür wurden Neurosphären der Zelllinie LN-18 nach 7-tägiger Kultivierung in NeuroCult™-Medium passagiert, in 6-Kavitäten-Platten in NeuroCult™-Medium ausgesät und das Medium zeitgleich mit folgenden Inhibitoren versetzt: dem dualen Pim1- und PI3K-Inhibitor<sup>143</sup> LY294002 (LY; 50 µM), dem selektiven Pim1-Inhibitor<sup>130</sup> Quercetagenin (QT; 50 µM), dem spezifischen Pim1-Inhibitor<sup>62</sup> TCS Pim1-1 (TCS; 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 5 µM, 1 µM) sowie dem Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ; 100 µM). Als Kontrolle wurden Neurosphären mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) inkubiert. Die mit den Inhibitoren behandelten LN-18 Neurosphären wurden an den Tagen 3 und 7 mit dem Axio Observer Z1 (Fa. Carl Zeiss, Jena) unter der Nutzung der Software PalmRobo V4.5, Axio Vision RE. 4.8 und Axio Vision Documentation zur Dokumentation der Effekte der Inhibitoren gescannt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an jeweils 16 Quadranten in der Mitte der Vertiefung durch die Analyse der Anzahl und des Durchmessers der Neurosphären in Mikrometern mit der Axio Vision Software von Zeiss (vergleiche 2.2.1.5). Anhand des gemessenen Durchmessers der Neurosphären wurden diese einer von vier Gruppen zugeordnet: 40-100 µm, 101-150 µm, 151-200 µm und > 200 µm. Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Abbildungen 18A und C zeigen repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Neurosphären, die mit LY294002, QT, TCS oder Temozolomid behandelt wurden, nach 3 und 7 Tagen Inkubationszeit. Anhand der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen erfolgte, wie obig beschrieben, die Bestimmung der Anzahl und des Durchmessers der Neurosphären. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 18B dargestellt. Nach 3-tägiger Behandlung der Neurosphären mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) ergab sich für die Neurosphären, die mit TCS Pim1-1 behandelt wurden, eine signifikant verringerte Anzahl gegenüber mit DMSO-behandelten Neurosphären (Kontrolle) in der Gruppe zwischen 101 und 150 µm ( $3,75 \pm 1,71$ ; Kontrolle:  $10,75 \pm 2,217$ ) sowie in der Gruppe zwischen 151 und 200 µm, bei der keine Neurosphären unter Applikation mit TCS Pim1-1 mit einem entsprechenden Durchmesser mehr nachweisbar waren (Kontrolle:  $2,25 \pm 0,96$ ). Auch

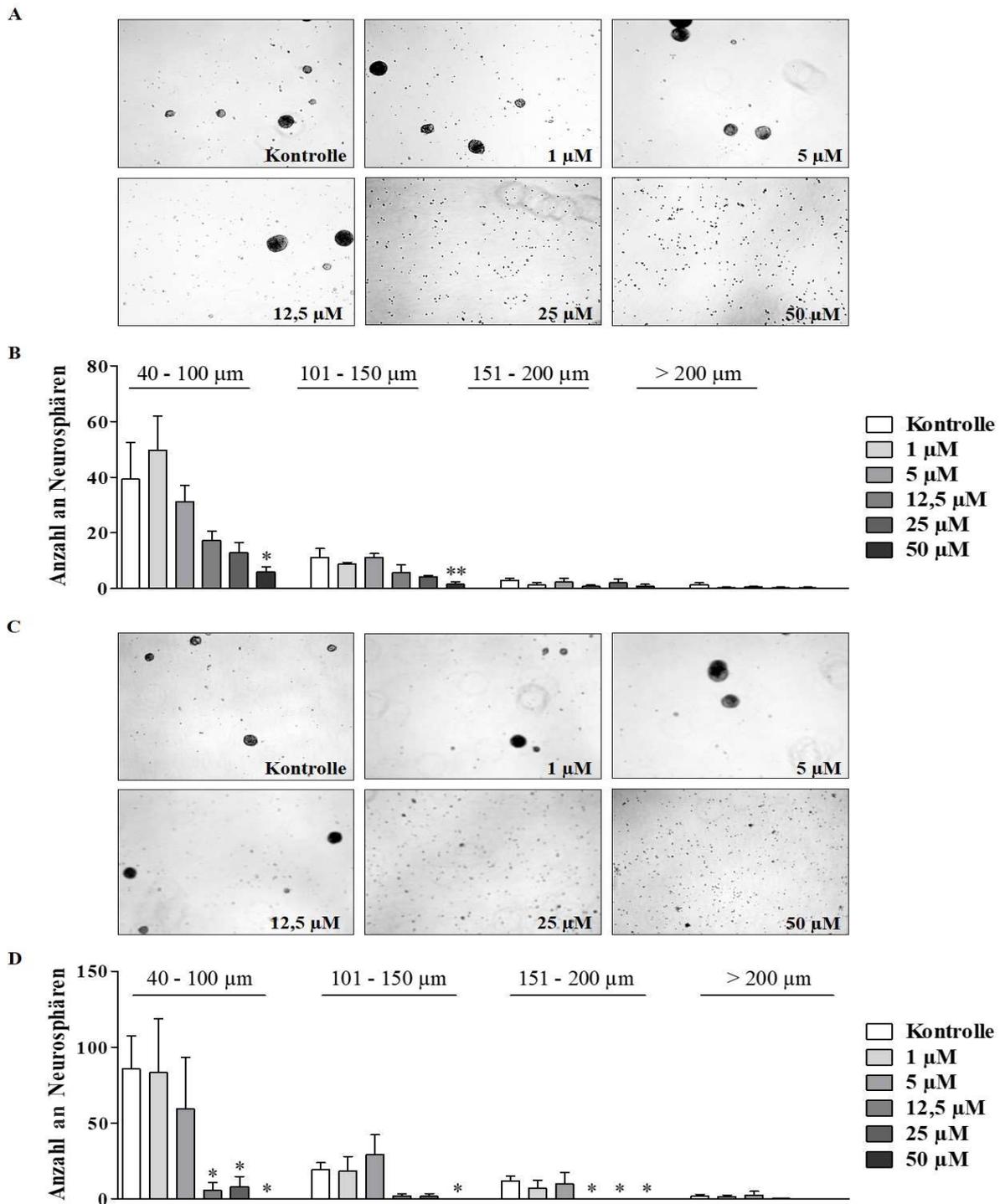
in der Gruppe mit den kleinsten Neurosphären (40 bis 100  $\mu\text{m}$ ) konnte eine Reduktion der Anzahl auf etwa die Hälfte unter der Behandlung mit TCS Pim1-1 beobachtet werden, jedoch fiel dies nicht statistisch signifikant aus. Die übrigen Inhibitoren (LY294002, QT und Temozolomid) ließen nach 3-tägiger Behandlung der LN-18 Neurosphären keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle erkennen, allerdings zeigte sich auch unter Applikation des dualen PI3K/Pim1-Inhibitors eine verminderte Anzahl an Neurosphären in der Gruppe 101 bis 150  $\mu\text{m}$ , dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant.

Nach 7-tägiger Inkubation (Abb. 18C und D) mit TCS konnten fast keine Neurosphären in den vier Gruppen und damit eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden, während bei den DMSO-behandelten Kontrollen zahlreiche Neurosphären in den Gruppen von 40-100  $\mu\text{m}$  ( $47,8 \pm 18,5$ ), 101-150  $\mu\text{m}$  ( $7,5 \pm 3,5$ ), 151-200  $\mu\text{m}$  ( $3,3 \pm 3,9$ ) sowie  $> 200$   $\mu\text{m}$  ( $2,3 \pm 2,1$ ) vorhanden waren. Eine signifikante Abnahme in der Anzahl an Neurosphären bestand zudem bei Betrachtung der Gruppe zwischen 40 und 100  $\mu\text{m}$  für den dualen PI3K/Pim1-Inhibitor LY294002 ( $2,8 \pm 3,1$ ) und QT ( $16,0 \pm 12,0$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $47,8 \pm 18,5$ ). Die Anzahl an Neurosphären war in der Gruppe zwischen 40 und 100  $\mu\text{m}$  für TMZ ( $32,5 \pm 19,8$ ) ebenfalls, jedoch nicht statistisch signifikant, im Vergleich zur Kontrolle ( $47,8 \pm 18,5$ ) vermindert. Die Anzahl der Neurosphären, die mit LY294002 behandelt wurden, war in der Gruppe zwischen 101 und 150  $\mu\text{m}$  bei einem nahezu kompletten Fehlen von Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle ( $7,5 \pm 3,5$ ) signifikant vermindert. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Neurosphären (Kontrolle:  $2,3 \pm 2,1$ ) zeigte sich nach der Inkubation mit LY294002 eine signifikante Reduktion der Neurosphärenanzahl mit einem Durchmesser von  $> 200$   $\mu\text{m}$ , da keine Neurosphären mit einem entsprechenden Durchmesser unter Applikation von LY294002 festgestellt werden konnten.



**Abb. 18: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf Bildung und Wachstum von LN-18 Neurosphären.** Neurosphären der Zelllinie LN-18 wurden nach 7-tägiger Kultivierung in NeuroCult™-Medium passagiert, in 6-Kavitäten-Platten in NeuroCult™-Medium ausgesät und das Medium zeitgleich mit folgenden Inhibitoren versetzt: dem dualen Pim1- und PI3K-Inhibitor LY294002 (LY; 50 µM), dem selektiven Pim1-Inhibitor Quercetagenin (QT; 50 µM), dem spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 (TCS; 50 µM) sowie dem Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ; 100 µM). Als Kontrolle (K) wurden Neurosphären mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. (A+C) phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Neurosphären nach 72 h (A) und 7 d (C). (B + D) grafische Darstellung der Anzahl an Neurosphären nach 72-stündiger (B) und 7-tägiger (D) Inkubation mit den genannten Substanzen im Vergleich zur Kontrolle (K; DMSO). Die mikroskopische Auswertung erfolgte an jeweils 16 Quadranten in der Mitte der Vertiefung durch die Analyse der Anzahl und des Durchmessers der Neurosphären in Mikrometern mit der Axio Vision Software von Zeiss (vergleiche 2.2.1.5). Anhand des gemessenen Durchmessers der Neurosphären wurden diese einer von vier Gruppen zugeordnet: 40-100 µm, 101-150 µm, 151-200 µm und > 200 µm. Mittelwert + SD, n = 4. *OneWay Anova* mit dem *Dunnnett's multiple comparison Test*; \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Nachdem unter 50  $\mu\text{M}$  TCS Pim1-1 eine starke und signifikante Abnahme der stammzellähnlichen Neurosphären der GBM-Zelllinie LN-18 beobachtet wurde, sollte anhand einer Konzentrationsreihe ermittelt werden, welche Konzentration des Pim1-Inhibitors TCS Pim1-1 für die wachstumshemmende Wirkung auf Neurosphären ausreichend ist. Hierfür wurde die Größe der Neurosphären nach 5-tägiger (Abb. 19A+B) und 7-tägiger (Abb. 19C+D) Inkubation mit TCS unterschiedlicher Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 12,5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) bestimmt und erneut die Anzahl einer der vier Größengruppen (40-100  $\mu\text{m}$ , 101-150  $\mu\text{m}$ , 151-200  $\mu\text{m}$  und > 200  $\mu\text{m}$ ) zugeordnet. Die Ergebnisse hierzu wurden in Abb. 19 zusammengestellt. Die Abbildungen 19A und 19C zeigen repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Neurosphären nach 5- bzw. 7-tägiger Inkubation mit TCS in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu DMSO-behandelten Neurosphären (Kontrollen). Nach 5-tägiger Inkubation mit TCS (50  $\mu\text{M}$ ) konnte in der Gruppe von 101-150  $\mu\text{m}$  eine signifikante Reduktion ( $1,5 \pm 1,7$ ) der Anzahl an Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle (DMSO;  $11,3 \pm 6,2$ ) nachgewiesen werden (Abb. 19B). Nach 7-tägiger Inkubation der Neurosphären mit 50  $\mu\text{M}$  TCS waren keine vitalen Zellverbände mehr phasenkontrastmikroskopisch abgrenzbar, sodass sich in den Gruppen von 40-100  $\mu\text{m}$ , 101-150  $\mu\text{m}$  und 151-200  $\mu\text{m}$  eine signifikante Reduktion der Neurosphärenanzahl im Vergleich zur Kontrolle (DMSO:  $85,8 \pm 43,1$ ;  $19,3 \pm 9,5$  bzw.  $12,0 \pm 5,0$ ) ergab (Abb. 19D). In den Gruppen von 40-100  $\mu\text{m}$  bzw. 151-200  $\mu\text{m}$  konnte ebenfalls für TCS der Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$  ( $5,5 \pm 10,3$  bzw. 0) und 25  $\mu\text{M}$  ( $8,0 \pm 13,5$  bzw. 0) eine signifikante Verringerung der Anzahl an Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle (DMSO:  $85,8 \pm 43,1$  bzw.  $12,0 \pm 5,0$ ) festgestellt werden (Abb. 19D). Für Neurosphären, die mit 1  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  TCS behandelt wurden, ergaben sich in den einzelnen Gruppen (40-100  $\mu\text{m}$ , 101-150  $\mu\text{m}$ , 151-200  $\mu\text{m}$ , > 200  $\mu\text{m}$ ) keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Neurosphärenanzahl.

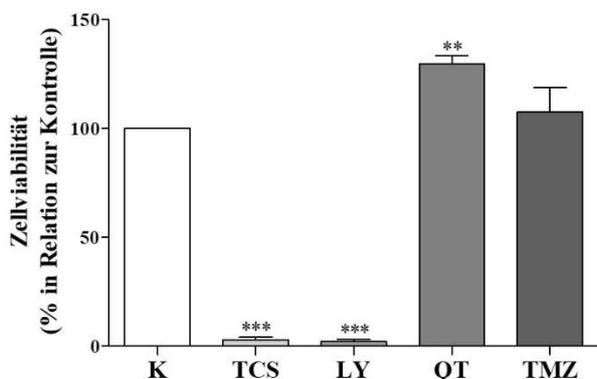


**Abb. 19: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition mit dem spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 auf die Bildung und das Wachstum von LN-18 Neurosphären.** Neurosphären der Zelllinie LN-18 wurden nach 7-tägiger Kultivierung in NeuroCult™-Medium passagiert, in 6-Kavitäten-Platten in NeuroCult™-Medium ausgesät und das Medium zeitgleich mit unterschiedlichen Konzentrationen des spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 (TCS: 1 µM; 5 µM; 12,5 µM; 25 µM und 50 µM) versetzt. Als Kontrolle wurden Neurosphären mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. (A+C) phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Neurosphären nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des spezifischen Pim1-Inhibitors TCS Pim1-1 (TCS: 1 µM; 5 µM; 12,5 µM; 25 µM und 50 µM) für 5 d (A) und 7 d (C) im Vergleich zu DMSO behandelten Neurosphären (Kontrolle). (B+D) grafische Darstellung der Anzahl an Neurosphären nach 5-tägiger (B) und 7-tägiger (D) Inkubation mit 1 µM TCS, 5 µM TCS, 12,5 µM TCS, 25 µM TCS und 50 µM TCS im Vergleich zur Kontrolle (DMSO, Lösungsmittel). Die mikroskopische Auswertung erfolgte an jeweils 16 Quadranten in der Mitte der Vertiefung durch die Analyse der Anzahl und des Durchmessers der Neurosphären in Mikrometern mit der Axio Vision Software von Zeiss (vergleiche 2.2.1.5). Anhand des gemessenen Durchmessers der Neurosphären wurden diese einer von vier Gruppen zugeordnet: 40-100 µm, 101-150 µm, 151-200 µm und > 200 µm. Mittelwert + SD, n = 4. *OneWay Anova* mit dem *Dunnnett's multiple comparison Test*; \*p < 0,05, \*\* p < 0,01.

### 3.4 Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären

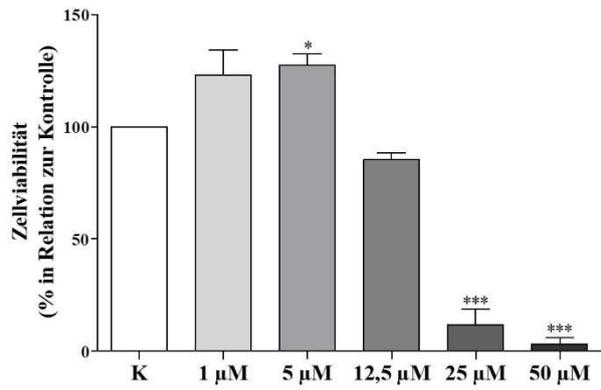
Neben der Analyse der Anzahl an Neurosphären verschiedener Durchmesser wurde zusätzlich eine Untersuchung der Zellviabilität nach 7-tägiger Inkubation der Neurosphären mit dem dualen Pim1- und PI3K-Inhibitor<sup>143</sup> LY294002 (LY; 50  $\mu$ M), dem selektiven Pim1-Inhibitor<sup>130</sup> Quercetagenin (QT; 50  $\mu$ M), dem spezifischen Pim1-Inhibitor<sup>62</sup> TCS Pim1-1 (TCS; 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) sowie dem Standardchemotherapeutikum Temozolomid (TMZ; 100  $\mu$ M) durchgeführt. Als Kontrolle wurden Neurosphären für sieben Tage mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert.

Eine äußerst starke und signifikante Reduktion der Zellviabilität (\*\*\*) konnte nach einer 7-tägigen Inkubation der Neurosphären mit TCS (50  $\mu$ M) sowie LY (50  $\mu$ M) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) nachgewiesen werden (Abb. 20) mit einer Abnahme der Zellviabilität von 100 % (Kontrolle) auf 2,8 %  $\pm$  2,3 % (TCS) und 2,0 %  $\pm$  1,7 % (LY). Im Gegensatz dazu führte QT zu einer leichten, signifikanten Verbesserung der Zellviabilität der LN-18 Neurosphären auf 129,5 %  $\pm$  6,9 %. Hinsichtlich der Behandlung mit dem Standardtherapeutikum Temozolomid (100  $\mu$ M) zeigten die Neurosphären keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (DMSO).



**Abb. 20: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären.** Darstellung der Zellviabilität (Resazurin-Assay) von Neurosphären der Zelllinie LN-18 nach 7-tägiger Inkubation mit dem dualen Pim1- und PI3K-Inhibitor LY294002 (LY; 50  $\mu$ M), dem selektiven Pim1-Inhibitor Quercetagenin (QT; 50  $\mu$ M), dem spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 (TCS; 50  $\mu$ M) und dem Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ; 100  $\mu$ M) im Vergleich zur Kontrolle (K; Lösungsmittel DMSO). Mittelwert + SD, n = 4, *OneWay Anova* mit dem *Dunnnett's multiple comparison Test*, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Zusätzlich wurde die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des spezifischen Pim1-Inhibitors TCS Pim1-1 (TCS: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M) betrachtet (Abb. 21). Eine signifikante Reduktion der Zellviabilität konnte erneut für 50  $\mu$ M TCS (3,1 %  $\pm$  5,0 %) und 25  $\mu$ M TCS (11,6 %  $\pm$  12,3 %) nachgewiesen werden. Die 7-tägige Inkubation mit 12,5  $\mu$ M TCS hatte hingegen keinen Einfluss auf die Viabilität der LN-18 Neurosphären. Im Gegensatz dazu trat eine leichte, aber signifikante Steigerung der Zellviabilität bei Neurosphären auf, die mit 5  $\mu$ M TCS behandelt wurden (127,4 %  $\pm$  8,6 %).



**Abb. 21: Einfluss einer pharmakologischen Pim1-Inhibition mit TCS Pim1-1 auf die Zellviabilität von LN-18 Neurosphären.** Darstellung der Zellviabilität (Resazurin-Assay) von LN-18 Neurosphären nach 7-tägiger Inkubation mit dem spezifischen Pim1-Inhibitor TCS Pim1-1 unterschiedlicher Konzentration (1 µM, 5 µM, 12,5 µM, 25 µM und 50 µM) im Vergleich zur Kontrolle (K; Lösungsmittel, DMSO). Mittelwert + SD, n = 4. *OneWay Anova* mit dem *Dunnnett's multiple comparison Test* \*p < 0,05, \*\*\* p < 0,001.

## 4 Diskussion

In den letzten 15 Jahren hat sich die Therapie des Glioblastoms und das Gesamtüberleben der Patienten trotz intensiver Forschung kaum geändert. Große Herausforderungen in der Behandlung von Glioblastomen liegen in der Entwicklung von zielgerichteten und effektiven Therapien, welche auch gegen sogenannte stammzellähnliche Tumorzellen gerichtet sind, die zunehmend als Ursache für Rezidive diskutiert werden und die die Fähigkeit besitzen, sich von einer Behandlung mit toxischen Substanzen zu erholen<sup>248</sup>. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Therapieoptionen essentiell.

Für viele Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einzelner Rezeptoren oder Kinasen für den malignen und aggressiven Phänotyp von Bedeutung ist, sodass die zielgerichtete Inhibition dieser Kinasen eine Therapieoption darstellen könnte. Bei NSCLC konnten im Hinblick auf zielgerichtete Therapien, die beispielsweise gegen EGFR gerichtet sind, bereits Erfolge erzielt werden. Seit längerem finden *small molecule inhibitors* wie beispielsweise Afatinib, Gefitinib und Osimertinib Anwendung bzw. sind in der Erprobung für die Behandlung von NSCLC mit einer Mutation im *EGFR*-Gen<sup>12,100</sup>.

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Blockade einer Kinase einhergehend mit einer Hemmung des Tumorwachstums stellen die Bcr-Abl Tyrosinkinase-Inhibitoren dar, wie zum Beispiel Imatinib oder Dasatinib<sup>173,265,279</sup>.

Bei der Behandlung von Glioblastomen haben bislang zielgerichtete Therapien gegen Rezeptoren oder Kinase noch keinen maßgeblichen Therapieerfolg gebracht<sup>55,155,233</sup>. Der Einsatz einer zielgerichteten Blockade des VEGF mittels Bevacizumab hat zwar das progressionsfreie Überleben von Patienten mit Glioblastom verlängert, jedoch blieb das Gesamtüberleben unverändert<sup>63,103</sup>. Ebenso bewirkten Antikörper und Kinaseinhibitoren gegen EGFR beim Glioblastom keine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit, sodass die Suche nach weiteren potentiellen Zielstrukturen essentiell ist<sup>35,99,261,299,312</sup>. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression der Serin-Threonin-Kinase Pim1 im Glioblastom erhöht ist und deren Blockade sowohl *in vitro* als auch im *in vivo*-Mausmodell das Wachstum von GBM-Zellen reduziert<sup>124</sup>. Eine funktionelle Beziehung zwischen der onkogenen Kinase Pim1 und Krebs wurde in den letzten Jahren gut etabliert, jedoch ist wenig über die präzise Rolle dieser Serin-Threonin-Kinase innerhalb von Glioblastomen und den Einfluss auf das Stammzellverhalten von Glioblastomen bekannt.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Pim1 eine entscheidende Rolle in Bezug auf Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika spielt, eine Eigenschaft, die auch

stammzellähnlichen Tumorzellen (CSLC) zugeschrieben wird<sup>254,342</sup>. Es wird angenommen, dass eine erfolgreiche Therapie des Glioblastoms nur möglich ist, wenn die Therapie auch gegen die hoctumorigenen und therapieresistenten CSLC gerichtet ist<sup>66,146,235</sup>.

In einer präklinischen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass eine pharmakologische Hemmung von Pim1 die Tumorzellviabilität reduziert und eine signifikante Tumorreduktion im orthotopen Mausmodell hervorruft<sup>124</sup>. Pim1 könnte somit eine mögliche Zielstruktur zur Überwindung einer Therapieresistenz beim Glioblastom darstellen, wobei bislang die Rolle dieser onkogenen Serin-Threonin-Kinase in Bezug auf das Stammzellverhalten und das Überleben von Glioblastomzellen unklar ist und in dieser Dissertation untersucht werden sollte.

#### 4.1 Expression von Pim1 sowie Stammzell- und Differenzierungsmarker in adhärent wachsenden LN-18 Zellen im Vergleich zu stammzellartigen Neurosphären

Für die *in vitro* Versuche zur Untersuchung der Expression von Pim1 in stammzellartigen GBM-Zellen wurde die Zelllinie LN-18 verwendet, die aus dem rechten Temporallappen eines 61 Jahre alten, männlichen Patienten generiert wurde und deren Zellen ein adhärentes Wachstum zeigen<sup>84</sup>. LN-18 Zellen besitzen eine Hirntumor-Stammzellkapazität, können stammzellähnliche Neurosphären bilden und stellen ein gutes *in vitro* Modell zum Studium von Glioblastomeigenschaften dar<sup>47,95,251</sup>.

Für den Vergleich von Tumorzellen der Glioblastomzelllinie LN-18 mit stammzellähnlichen Tumorzellen wurden LN-18 Zellen einerseits in DMEM-Medium (adhärent wachsende LN-18 Zellen) und andererseits in serumfreiem Medium (NeuroCult™-Medium) zur Erzeugung von Neurosphären (sogenannter Neurosphärenassay) über vier Wochen kultiviert und nach jeweils sieben Tagen passagiert.

Der Neurosphärenassay wurde von Reynolds und Weiss im Zusammenhang mit der Isolation von neuronalen Stammzellen aus dem Striatum von adulten Mäusen als serumfreie Zellkulturmethode etabliert und stellt die Grundlage für die Erforschung von embryonalen und adulten Stammzellen sowie CSLC dar<sup>78,97,256-259,322</sup>. Diese selektive Zellkulturmethode dient der Isolation, Expansion und Identifikation von Stammzellen bzw. stammzellähnlichen Zellen, die sich unter Zusatz von Mitogenen teilen und Neurosphären formen<sup>111,112,174,258</sup>. Für Neurosphären, die von Hirntumoren generiert wurden, konnte die Fähigkeit zur Proliferation, der Bildung einer großen Anzahl an Vorläuferzellen, die Tumorinitiation sowie die Migration und die Infiltration nachgewiesen werden<sup>77,97,174</sup>.

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung zur mRNA- und Proteinexpression von Pim1 sowie von Stammzellmarker in stammzellähnlichen Neurosphären der Glioblastomzelllinie LN-18 im Vergleich zu adhären wachsenden LN-18 Zellen.

Beim Vergleich von adhären wachsenden LN-18 Zellen mit Neurosphären konnte eine signifikant gesteigerte relative mRNA-Expression von Pim1 in Neurosphären der Passagen 1 bis 3 nachgewiesen werden. Die Neurosphären wiesen sowohl im Western Blot-Verfahren mit anschließender Immundetektion als auch in Immunfluoreszenz-Färbungen eine gesteigerte Pim1-Proteinexpression im Vergleich zu adhären wachsenden LN-18 Zellen auf. Sowohl adhären wachsende LN-18 Zellen als auch Neurosphären exprimierten im Western Blot-Verfahren beide Pim1-Isoformen, Pim1S (34 kDa) und Pim1L (44 kDa), die eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen<sup>20,277</sup>. Die kurze Isoform Pim1S ist vorrangig im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert, während die lange Isoform Pim1L neben einer zytoplasmatischen Lokalisation auch in der Zellmembran vorkommt<sup>124,277,344</sup>. Die unterschiedliche Lokalisation beider Isoformen könnte das umfangreiche Substratspektrum von Pim1 erklären.

Einen ersten Hinweis, dass Pim1 eine Rolle im Stammzellverhalten von Glioblastomen spielen könnte, geben somit die Untersuchungen an stammzellähnlichen Neurosphären, die eine erhöhte mRNA-Expression von Pim1 sowie eine erhöhte Pim1-Proteinexpression zeigten. Interessanterweise konnte im Western Blot eine deutlich stärkere und signifikante Heraufregulation von Pim1L in den Neurosphären beobachtet werden, während die Zunahme von Pim1S eher gering ausfiel und nicht signifikant war. Das könnte bedeuten, dass Pim1L eine größere Bedeutung im Rahmen von Stammzeleigenschaften zukommt als Pim1S. Demgegenüber blieb die relative mRNA-Expression von Pim2 unverändert, während die relative mRNA-Expression von Pim3 herabreguliert war, sodass diesen beiden Mitgliedern der Pim-Familie vermutlich keine Rolle im Stammzellgeschehen des Glioblastoms zukommt. Die Funktion der beiden Pim1-Isoformen wurde beim Prostatakarzinom bereits ausführlich untersucht<sup>183</sup>. Im Prostatakarzinom sind beide Isoformen von Pim1 heraufreguliert und nehmen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Stabilität und transkriptionalen Aktivität des Androgenrezeptors ein, wobei die lange Isoform Pim1L über die Phosphorylierung von Threonin 850 zu einer Stabilisierung des Androgenrezeptors führt, während Pim1S über die Phosphorylierung von Serin 213 seine Degradation einleitet<sup>183</sup>. Eine isoformabhängige Funktion von Pim1S und Pim1L wäre auch für das GBM vorstellbar, indem die beobachtete verstärkte Expression von Pim1L Proteine, die für das Stammzellverhalten wichtig sind, oder Stammzellmarker selbst durch Phosphorylierung analog zum Androgenrezeptor stabilisiert.

In der Literatur ist beschrieben, dass Pim1 eine genomische Instabilität, die auch im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren eine Rolle spielt und in deren Zusammenhang stammzellähnliche Tumorzellen als Initiatoren diskutiert werden, durch einen Defekt im Mitosespindel-Checkpoint, abnormale Mitosespindeln, Zentrosomenamplifikation und eine fehlerhafte Trennung von Chromosomen begünstigen kann<sup>176,180,264</sup>. Diese Effekte könnten einerseits durch die Phosphorylierung von Heterochromatin-Protein 1 $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) durch Pim1 und andererseits durch die Assoziation von Pim1 mit dem Protein des nukleären mitotischen Apparates (NuMA) vermittelt werden, wobei Pim1 innerhalb dieses Komplexes mit Dynein und Dynaktin interagieren kann<sup>28,159</sup>.

Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Radiatio stellt ein großes Problem in der Behandlung von Glioblastomen und insbesondere von Tumorstammzellen dar, wobei sich der Resistenzmechanismus aus einer Kombination aus Zellzyklusveränderungen, Resistenz gegenüber DNA-Schäden und Hypoxie sowie einer durch Effluxtransporter vermittelten Multiresistenz gegenüber Chemotherapeutika zusammensetzen kann<sup>22,81,82,125</sup>. Die Serin-Threonin-Kinase Pim1 könnte hier über ihr breites Substratspektrum eine zentrale Rolle einnehmen. So konnte für Pim1 beispielsweise eine Regulation der Aktivität von ABCG2 sowie Chk1 gezeigt werden<sup>345,353</sup>. Die Expression beider Proteine kann darüber hinaus durch eine Schädigung der DNA, wie beispielsweise im Rahmen einer Radiatio, mit einhergehender genomischer Instabilität induziert werden<sup>22,180</sup>. Denkbar wäre dementsprechend ein synergistischer Resistenzeffekt einer Pim1 vermittelten Regulation und der über die genomische Instabilität hervorgerufenen Induktion von ABCG2 sowie Chk1. Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-/Halsbereich zeigen nach einer Radiatio eine EGFR-abhängige Induktion von Pim1, die auch bei Glioblastomen denkbar wäre, da dem EGFR beim Glioblastom eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben wird, sodass die Radiatio neben der Expression von ABCG2 sowie Chk1 auch die Expression von Pim1 induzieren könnte<sup>30,96,199,240,296</sup>. Somit könnte eine Überexpression von Pim1 hier ebenfalls einen additiven Effekt zwischen Expression und Aktivität von ABCG2 sowie Chk1 verursachen. Durch die Induktion von Pim1 im Rahmen einer Radiatio könnte das Überleben der Tumorzellen zusätzlich insbesondere durch dessen antiapoptotische Wirkung gefördert werden, die über die Phosphorylierung von Bad, ASK1 und Drp1 vermittelt wird<sup>5,83,114</sup>. Darüber hinaus wirkt Pim1 über die Phosphorylierung von Cdc25A, Cdc25C, c-TAK1, p27 und p21 proliferationsfördernd<sup>18,19,214,218,361</sup>.

Für chemotherapieresistente Prostatakarzinome konnte eine gleichzeitige Hochregulation von Pim1L und ABCG2 sowie eine Kolokalisation und Interaktion beider Proteine gezeigt werden,

wobei ein *knockdown* von Pim1L eine Multimerformation von ABCG2 unterband und die Zellen gegenüber Chemotherapeutika sensibilisierte<sup>345</sup>. Für Glioblastomzellen ist eine solche Interaktion zwischen Pim1 und ABCG2 bislang nicht beschrieben und sollte daher in weitergehenden Analysen berücksichtigt werden. ABCG2 wird eine Zellprotektion unter Hypoxie bei unreifen hämatopoetischen Stammzellen sowie bei stammzellähnlichen Prostatakarzinomzellen zugeschrieben und kann zugleich durch Hypoxie induziert werden<sup>79,134,263</sup>. Einen Zellschutz kann ABCG2 über seine Transportfunktion von beispielsweise Chemotherapeutika und Tyrosinkinaseinhibitoren vermitteln, wobei Glioblastome einschließlich ihrer Blutgefäße eine erhöhte Expression von ABCG2 zeigen<sup>263,359</sup>. Außerdem wird eine gesteigerte Expression von ABCG2 in Glioblastom-Stammzellen beobachtet<sup>64,149</sup>. Denkbar wäre dementsprechend, dass der geringe Therapieerfolg von Tyrosinkinaseinhibitoren bei Patienten mit GBM mit der hohen Expression und Aktivität von ABCG2 in Zusammenhang stehen könnte. ABCG2 kann insbesondere auch zur Identifikation und Isolation von sogenannten *side populations* über den Farbstoffexport von Hoechst 33342 genutzt werden<sup>33</sup>. Bleau et al. beschreiben darüber hinaus eine AKT-induzierte Aktivierung von ABCG2 über eine Translokation zur Plasmamembran<sup>33</sup>. Bezüglich Pim1 wäre denkbar, dass eine Überexpression von Pim1 multiple Effekte hinsichtlich der Aktivität und Expression von ABCG2 ausübt. Einerseits könnte Pim1 über die Phosphorylierung der Kinase AKT deren Aktivität steigern und dementsprechend die Translokation von ABCG2 zur Plasmamembran vorantreiben und andererseits, wie bereits oben beschrieben, gleichzeitig die Phosphorylierung von ABCG2 durch Pim1 und damit dessen Transportaktivität beeinflussen<sup>267,276,324,345</sup>. Darauf basierend könnte Pim1 einen nicht unerheblichen Effekt im Hinblick auf stammzellähnliche Eigenschaften von Tumorzellen haben.

Für astrozytäre Hirntumoren, einschließlich GBM, wurden sehr lange Zellmembranprotrusionen, sogenannte Tumormikroschläuche (*tumour microtubes*), als Routen für Invasion und Proliferation nachgewiesen, die auch als Verbindungen von Tumorzellen über lange Distanzen genutzt werden, um dynamische Netzwerke zu generieren<sup>231</sup>. Diese *tumour microtubes* bestehen unter anderem aus Aktin sowie Mikrotubuli und weisen eine partielle Expression von  $\beta$ -Catenin auf<sup>231</sup>. Für den Stammzellmarker CD133 ist ebenfalls eine Lokalisation innerhalb von Zellprotrusionen beschrieben, über die die Zellmigration vorangetrieben werden kann<sup>25,184</sup>. Zusätzlich konnten ausgedehnte, weitreichende interzelluläre Calciumwellen innerhalb des Tumorzellnetzwerkes nachgewiesen werden<sup>231</sup>. Über Connexin 43 reguliert kann dieses System erhöhte Calciumkonzentrationen, wie sie nach Bestrahlungen auftreten, über eine erhöhte Calciumkommunikation und eine erhöhte

*microtubule*-Formation ausgleichen und somit vor einem Zelltod schützen<sup>231</sup>. Bei bereits nachgewiesener erhöhter Expression von Pim1 nach Langzeitpotenzierung im Gehirn von Mäusen wäre es denkbar, dass auch die Expression von Pim1 als Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase durch die von Osswald et al. beschriebenen Calciumwellen induziert werden könnte<sup>20,161,231</sup>. Die ausgedehnten *microtubule*-Formationen können das Gehirn infiltrieren und die Tumorzell dissemination begünstigen, wodurch auch Pim1 bei einer Assoziation zu Microtubuli beitragen könnte<sup>161,231</sup>. Nach Bestrahlung eines größeren Tumorzellvolumens konnten Osswald et al. eine schnelle Ausdehnung der *tumour microtubes*, gefolgt von einer deutlich gesteigerten Tumorzell dichte innerhalb des bestrahlten Areal nachweisen, wobei, wie bereits oben diskutiert, analog zu Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereiches durch die Radiatio eine Induktion der Expression von Pim1 denkbar wäre, die wiederum die Proliferation und die Migration von Tumorzellen fördern könnte<sup>231,240</sup>. Eine erhöhte Expression von Pim1 kann über Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFATC1 dessen transkriptionale Aktivität steigern, die sich womöglich auf die Aktivität der Matrixmetalloproteasen und die Expression von Integrin  $\alpha 5$  auswirkt, die zur Regulation der Zelladhäsion beitragen<sup>87,249</sup>. Zudem kann Pim1 via Phosphorylierung c-Myc stabilisieren und somit dessen transkriptionale Aktivität steigern und über die Expression von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise ZEB1, ZEB2, Snail1, Snail2 und Twist die epitheliale-mesenchymale Transition vorantreiben<sup>362</sup>. Im Hinblick auf die Tumorzellmigration und das infiltrative Wachstum von Glioblastomen spielt zudem die gesteigerte Expression von CXCR4 in Verbindung mit CXCL12 eine Rolle, wobei gezeigt werden konnte, dass Pim1 für die Oberflächenexpression von CXCR4 wichtig ist und dass die intrazelluläre Domäne von CXCR4 durch Pim1 phosphoryliert werden kann<sup>113,341</sup>. Zudem kann die Aktivierung der CXCR4/CXCL12-Kaskade den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen<sup>341</sup>. Es wäre somit denkbar, dass durch die Einwirkung der CXCR4/CXCL12-Kaskade auf den intrazellulären Calciumspiegel Einfluss auf das von Osswald et al. beschriebene Tumorzellnetzwerk genommen werden kann.

Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Tumorzellmigration und -invasion spielt der Rezeptor MET, dessen Translation über die Phosphorylierung von eIF-4B (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4B) durch Pim1 reguliert werden kann<sup>54</sup>. Im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von MET wurde in der Literatur eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern wie beispielsweise CD133, Sox2 und Nestin beschrieben<sup>179</sup>.

Die gleichzeitig mit den Stammzellmarkern erhöhte Expression von Pim1 in Neurosphären im Vergleich zu adhären wachsenden LN-18 Zellen könnte auf eine Assoziation der Kinase Pim1 mit dem Stammzellverhalten von Glioblastomen hindeuten, wobei Pim1L bei signifikant

gesteigerter Proteinexpression im Vergleich zu Pim1S mutmaßlich eine tragendere Rolle zukommen könnte. Diesbezüglich könnte auch die deutlich längere Halbwertszeit von Pim1L von etwa einer Stunde im Vergleich zu Pim1S von nur zehn Minuten eine Rolle spielen<sup>277</sup>.

Neben einer signifikant gesteigerten Expression von Pim1 weisen die Neurosphären im Vergleich zu den adhären wachsenden LN-18 Zellen eine erhöhte Expression von CD133 auf, wobei die Ergebnisse der mRNA-Analyse mit den Daten der Proteinexpression korrelieren. CD133 ist ein Transmembranprotein, das sowohl von hämatopoetischen als auch von Stammzellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird<sup>212,316,351</sup>. Zudem wurden innerhalb von Glioblastomen CD133<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen, die als tumorstammzellähnliche Zellen oder tumorinitiierende Zellen gelten<sup>294,295</sup>.

Als Faktoren, die die Expression von CD133 beeinflussen, sind Hypoxie sowie die Transkriptionsfaktoren p53, Sp1 und Myc (auch c-Myc genannt) anzuführen<sup>48,108,237,297</sup>. Darüber hinaus konnte bei Melanomen eine Regulation der CD133-Expression über Notch1 beobachtet werden<sup>164</sup>. Für GBM-Neurosphären wurde von Fan et al. ebenfalls eine Abhängigkeit der CD133-Expression vom Notch-Signalweg beschrieben<sup>89</sup>.

Bei gleichzeitig zur CD133-Expression gesteigerter Expression von Pim1 in Neurosphären und fehlendem Kollokalisierungssignal in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung wäre es vorstellbar, dass die Serin-Threonin-Kinase Pim1 trotz fehlender direkter Interaktion mit CD133 indirekt Einfluss auf dessen Expression und somit auf das Stammzellverhalten von Glioblastomen nimmt. Pim1 könnte über die Phosphorylierung von Proteinen, die in die De-/Stabilisierung von CD133 involviert sind, zur posttranskriptionalen und (post)translationalen Regulation von CD133 beitragen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs), die, wie beispielsweise USP22, Proteine stabilisieren können, in die Regulation der Stammzellmarker CD133 und Sox2 involviert sind<sup>202</sup>. Zu den Substraten von Pim1 zählen, wie in 1.3.3 beschrieben, zudem unter anderem c-Myc und Notch1, deren transkriptionale Aktivität durch Phosphorylierung gesteigert werden kann<sup>274,360</sup>. Vorstellbar wäre somit, dass über die gesteigerte transkriptionale Aktivität von c-Myc und/oder Notch1 die Expression von CD133 ebenfalls erhöht wird, wobei c-Myc bereits als Regulator der CD133-Expression beschrieben ist<sup>108</sup>. Differenzierter ist der Effekt von p53 auf die Expression von CD133 zu betrachten. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass p53 die Expression von CD133 senkt, jedoch wurde auch beobachtet, dass bei Überexpression von p53 die Expression von CD133 erhalten bleibt<sup>237</sup>. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass Pim1 über die Phosphorylierung von Mdm2 so stark in die p53-Signalkaskade eingreift, dass die CD133-Expression nicht reprimiert wird.

Zudem ist kritisch anzumerken, dass die in diesen Experimenten verwendeten LN-18 Zellen mutiertes p53 aufweisen, wodurch der Einfluss von p53 auf die Expression von CD133 aufgrund dieser Alteration eine untergeordnete Rolle einnehmen könnte<sup>93,140,238</sup>.

In den durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen konnte eine deutliche Expression von CD133 in den Neurosphären nachgewiesen werden, wobei die äußeren Zellen der Neurosphären kräftiger mit CD133 illustriert schienen, während die Zellen im Zentrum der Neurosphären teilweise eine schwächere Färbung für CD133 aufwiesen. Die starke Expression von CD133 in den äußeren Zellen der Neurosphären könnte für die in der Literatur beschriebene Lokalisation von CD133 innerhalb von Zellprotrusionen sprechen und die Zellmigration vorantreiben<sup>25,184</sup>. Denkbar wäre zudem, dass Zellen im Inneren der Neurosphären entweder kleine Zellprotrusionen bis an die Oberfläche der Neurosphären ausbilden oder eine andere Zellpopulation mit einem divergenten Genexpressionsmuster darstellen. Ausgeschlossen werden kann auch nicht, dass der verwendete CD133-Antikörper die inneren Bereiche der Neurosphären möglicherweise nicht erreicht hat, da andere publizierte Studien sowohl eine gleichmäßige CD133-Färbung als auch regionale Unterschiede in Neurosphären zeigen<sup>222,245,354,356</sup>.

Für die Expression des Stammzellmarkers CD133 konnte bereits eine Korrelation mit der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie einer schlechteren Prognose beim Glioblastom nachgewiesen werden<sup>340</sup>. Im Hinblick auf stammzellähnliche Tumorzellen konnten Bao et al. bei Glioblastomen zeigen, dass der Anteil an CD133-positiven Tumorzellen nach einer Radiatio gesteigert ist und diese Tumorzellen eine effiziente Reparatur der DNA-Schäden zeigten<sup>22</sup>. Diese Resistenz gegenüber der Radiatio konnte durch die Gabe eines Chk1-Inhibitors umgangen werden<sup>22</sup>. Vorstellbar wäre, wie bereits oben diskutiert, dass durch die Radiatio einerseits die Expression der Kinase Chk1 sowie der Kinase Pim1 induziert wird und andererseits die erhöhte Expression von Pim1 einen Einfluss auf die Aktivität von Chk1 sowie auf die Expression von CD133 hat. Zugleich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression von Pim1 im ersten und zweiten Rezidiv bei Patienten mit Glioblastom deutlich gesteigert ist<sup>124</sup>. Somit könnte die gesteigerte Expression von Pim1 auf einen erhöhten Anteil von CSLC hindeuten. Außerdem haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine verminderte CD133-Expression nach pharmakologischer Pim1-Blockade in LN-18 GBM-Zellen gezeigt, was für eine direkte oder indirekte Regulation von CD133 durch Pim1 sprechen könnte<sup>286</sup>.

Für CD133-positive GBM-Neurosphären konnte eine Koexpression mit CD44, einem weiteren Stammzellmarker in Glioblastomen und stammzellähnlichen Tumorzellen, nachgewiesen

werden<sup>147,188,243</sup>. Eine Hemmung von CD44 kann die Progression von Glioblastomen in Ratten verhindern<sup>46</sup>. Eine Assoziation zwischen einer hohen CD44-Expression und der Überlebenszeit von GBM-Patienten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden<sup>29</sup>.

Eine signifikante Steigerung von CD44 fand sich in Western Blot-Analysen in LN-18 Neurosphären im Vergleich zu adhären wachsenden LN-18 Zellen, die sich auch in den Immunfluoreszenz-Färbungen widerspiegelte. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von CD44 sowie dessen Interaktion mit beispielsweise Ankyrin und den ERM-Proteinen (Ezrin, Radixin, Moesin) phosphorylierungsabhängig ist<sup>86,244</sup>. Die Proteinkinase C (PKC), eine Serin-Threonin-Kinase, deren Aktivität unter anderem von  $Ca^{2+}$  abhängig ist, kann Einfluss auf die Phosphorylierung von CD44 nehmen<sup>224,244</sup>. Eine Phosphorylierung von CD44 durch die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Serin-Threonin-Kinase Pim1 ist bislang nicht beschrieben, wäre aber durchaus vorstellbar. Jedoch zeigte sich in den durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen keine Kollokalisierung von CD44 und Pim1. In Erwägung zu ziehen wäre ein indirekter Einfluss von Pim1 auf CD44 über die Phosphorylierung und Aktivierung der PKC. Die PKC weist drei Phosphorylierungsstellen auf, über die die Aktivität der Kinase reguliert wird<sup>225</sup>. Bislang ist aber keine Phosphorylierung und Aktivierung von PKC durch Pim1 bekannt.

CD44 kann als Ligandenbindungsrezeptor eine Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix, insbesondere zu Hyaluronan, sowie zu Matrixmetalloproteasen und Wachstumsfaktoren vermitteln, wobei diskutiert wird, dass diese Interaktion durch mitogene Stimuli, intrazelluläre Signalkaskaden und durch Serinproteasen vermittelt werden könnte<sup>244</sup>. Zugleich kann über die Wechselwirkung von CD44 mit den phosphorylierten ERM-Proteinen eine Quervernetzung mit dem Aktin-Zytoskelett hergestellt werden<sup>244</sup>. Damit stellt eine Aufregulation von CD44, wie in der vorliegenden Arbeit für GBM-Neurosphären beobachtet, eine wichtige Voraussetzung für Zelladhäsion und Zellmigration dar und könnte die Invasion von Glioblastom(stamm)zellen vorantreiben<sup>206,339,352</sup>.

Pim1 kann außerdem über die Phosphorylierung von eIF-4B (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4B) die Translation des Rezeptors MET regulieren, dessen Interaktion mit CD44 die Ras-Signaltransduktionskaskade in Gang setzt und so die Proliferation von Tumorzellen begünstigt<sup>54,244</sup>. CD44 kann darüber hinaus als Korezeptor für ERBB1 (EGFR, *epithelial growth factor receptor*), ERBB2 (Her2), ERBB3 (Her3) und ERBB4 fungieren<sup>244</sup>. Insbesondere für den EGFR konnten im Glioblastom Amplifikationen und Mutationen nachgewiesen werden, sodass eine pro-tumorigene Zusammenarbeit beider Proteine denkbar ist<sup>30,96,199,296</sup>. Der hier durchgeführte Vergleich zwischen stammzellähnlichen

LN-18 Neurosphären und adhären wachsender LN-18 Zellen erbrachte eine z.T. signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von EGFR in Neurosphären, sodass eine verstärkte Interaktion zwischen CD44 und EGFR vorstellbar ist. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von Pim1 über den EGFR induziert werden kann<sup>124,240</sup>. Bei nachgewiesener partieller Kolo-kalisation von Pim1S und Pim1L mit dem phosphorylierten EGFR könnte Pim1 einerseits in einem positiven Rückkopplungsmechanismus seine eigene Expression steigern, andererseits wäre es denkbar, dass durch eine mutmaßliche Wechselwirkung mit EGFR dessen Interaktion mit CD44 verstärkt werden könnte, die sich auf die Aktivität des Rezeptors auswirkt<sup>124,244</sup>. Darüber hinaus könnten die erhöhte EGFR- und CD44-Expression mit einer erhöhten Aggressivität und Invasivität von CSLC einhergehen, deren Bedeutung auch im Hinblick auf Rezidive diskutiert wird<sup>248</sup>. Insbesondere in Bezug auf die Invasivität könnte CD44 eine Schlüsselrolle einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass CD44 mit Matrixmetalloproteasen (MMP), wie MMP9 und MMP7, assoziiert ist, die die Invasion der Tumorzellen über die Degradation von kollagenen Fasern vorantreiben können<sup>244,300</sup>. Darüber hinaus konnte für aus Neurosphären gewonnene sogenannte Tumor-initiiierende Zellen gezeigt werden, dass diese in die kontralaterale Hemisphäre sowie entlang der subkortikalen weißen Substanz bis in das Ventrikelsystem migrieren und somit den kontralateralen zerebralen Kortex infiltrieren können<sup>77</sup>.

Als weiterer Stammzellmarker im GBM wird der Transkriptionsfaktor Musashi-1 diskutiert<sup>170</sup>. Dahlrot et al. fanden bei WHO Grad III Gliomen eine Assoziation zwischen der Expression von Musashi-1 mit einer schlechten Prognose<sup>73</sup>. Hingegen ließ sich in einer Subpopulation von Glioblastomen mit einem hohen Expressionslevel an Musashi-1 eine bessere Überlebensprognose nachweisen<sup>73</sup>. Toda et al. haben beim Vergleich von Glioblastomen mit diffusen Astrozytomen eine höhere Inzidenz an Musashi-1-positiven Zellen und eine stärkere Färbeintensität innerhalb von Glioblastomzellen nachweisen können<sup>313</sup>. Zudem konnte eine Assoziation zwischen einer hohen Musashi-1 Expression und einer hohen Proliferationsrate nachgewiesen werden<sup>313</sup>. Musashi-1 ist ein RNA-Bindungsprotein, das über die Stabilisierung von mRNA die Translation von Proteinen regulieren kann<sup>163</sup>. Die Stabilität der mRNA von Musashi-1 wird unter anderem von HuR reguliert, das zugleich die Translation von Musashi-1 vorantreibt<sup>325</sup>. Als Zielstrukturen von Musashi-1 konnten unter anderem TGF $\beta$ , Smad2/3, Mdm2, cMET, Myc, Notch, PTEN, p21 und p27 identifiziert werden, wobei Musashi-1 insbesondere über die Aktivierung der Notch- sowie der PI3K/AKT-Signalkaskade die Selbsterneuerung und das Überleben von Gliomzellen steuern kann<sup>24,163,220</sup>. Eine Stabilisierung

der mRNA von Cyclin D1, Cdk6 und Sox4 durch Musashi-1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden<sup>51</sup>. Als weitere Zielstrukturen von Musashi-1 wurden zudem Src, EGFR, PDGFR $\alpha$  und verschiedene Integrine, wie beispielsweise Integrin- $\alpha$ 1, Integrin- $\alpha$ V und Integrin- $\beta$ 8 identifiziert, die auf eine zentrale Rolle von Musashi-1 als Regulator der Zelladhäsion hindeuten<sup>319</sup>. Eine besonders hohe Expression von Musashi-1 konnte nach einer Radiatio oder einer Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin nachgewiesen werden<sup>76</sup>. Musashi-1 in seiner Rolle als RNA-Bindungsprotein kann die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase, ein Schlüsselprotein des *non homologous end joining* nach DNA-Doppelstrangbrüchen, stabilisieren und somit eine Therapieresistenz begünstigen<sup>76</sup>. Daneben ist bekannt, dass Musashi-1 mit CD44 interagieren kann<sup>319</sup>. Kürzlich konnten Pötschke et al. neben einer erhöhten Expression von Musashi-1 in Glioblastomrezidiven auch eine verstärkte Expression von CD44 nachweisen<sup>246</sup>.

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich von LN-18 Neurosphären mit adhären wachsenden LN-18 Zellen zeigten die Neurosphären eine gesteigerte mRNA-Expression von Musashi-1. In den Immunfluoreszenz-Färbungen exprimierten sowohl die LN-18 Neurosphären als auch die adhären wachsenden LN-18 Zellen Musashi-1, jedoch zeigten die Neurosphären eine wesentlich stärkere Signalintensität. Ein Kollokalisierungssignal zwischen Musashi-1 und Pim1 ließ sich jedoch nicht nachweisen. Bei partiell überlappenden Zielstrukturen von Musashi-1 und Pim1 wie beispielsweise Myc<sup>163,360,362</sup>, Smad2/3<sup>163,362</sup> oder Mdm2<sup>128,319</sup> wäre eine synergistische Regulation von Tumorzellen über beide Proteine vorstellbar, wobei Musashi-1 durch die Stabilisierung der mRNA und seinen Einfluss auf die Translation der Proteine den Ausgangspunkt für Pim1 stellen könnte, diese Proteine anschließend über Phosphorylierung zu beeinflussen.

Ein weiterer Stammzellmarker, der eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen einnimmt, ist das Typ VI Intermediärfilamentprotein Nestin<sup>236</sup>. In neuronalen Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Nestin-Expression mit einer Suppression der PI3K-Signalkaskade einhergeht, während eine Überexpression von Nestin neben einer erhöhten Zellproliferation zu einer Aktivierung der PI3K-Signalkaskade sowie der Proteinkinase B (AKT) führte<sup>27</sup>. In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression von Nestin mit dem Differenzierungsgrad von Gliomen sowie mit der Prognose der Patienten korreliert, wobei gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen mit einer hohen Expression von Nestin häufig nahe von Blutgefäßen lokalisiert sind<sup>74,358</sup>. Gleichzeitig konnte bei als Neurosphären kultivierten Hirntumorstammzellen eine

konsistente Expression von Nestin nachgewiesen werden, sodass Nestin neben seiner Rolle als Stammzellmarker als Faktor für das Überleben und die Proliferation von Tumorstammzellen diskutiert wird<sup>294,295,302</sup>.

Die Expression von Nestin unterliegt Veränderungen in den Zellkontakten sowie dem Einfluss extrazellulärer Faktoren wie beispielsweise NGF, aFGF oder BMP4<sup>336</sup>. Nestin selbst kann unter anderem von Cdc2 sowie Cdk5 phosphoryliert werden<sup>268,269</sup>. In neuronalen Progenitorzellen konnte eine Reduktion der Nestin-Expression durch oxidativen Stress im Einklang mit einer verstärkten Aktivierung von Cdk5 und einer Cdk5-abhängigen Apoptose beobachtet werden<sup>270</sup>. Eine Überexpression von Nestin hingegen hemmte die Induktion der Apoptose<sup>270</sup>. Intrazellulär akkumuliert Nestin stark perinukleär<sup>175</sup>.

Nestin spielt hinsichtlich der Migration und Invasion von Tumorzellen eine Rolle. Bei Prostatakarzinomen konnten Kleeberger et al. durch eine Verminderung der Nestin-Expression eine Hemmung der Migration und Invasion sowie eine fünffache Reduktion der Metastasen nachweisen<sup>157</sup>. Beispielsweise konnte ein Anstieg der  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression im Zusammenhang mit einer verminderten Nestin-Expression nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig ein Anstieg der Matrixdegeneration und Zellinvasion beschrieben wurde, der jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kleeberger et al. steht<sup>135,157</sup>.

Im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Expression von Nestin in stammzellähnlichen Tumorzellen zeigten die LN-18 Neurosphären eine starke und konsistente Expression von Nestin, wohingegen die adhärent wachsenden LN-18 Zellen lediglich eine minimale Expression des Stammzellmarkers aufwiesen. Bei Nachweis einer partiellen Überlappung der Fluoreszenzsignale von Nestin und Pim1 in LN-18 Neurosphären könnte eine Interaktion zwischen beiden Proteinen vorliegen. Die adhärent wachsenden LN-18 Zellen zeigten eine derartige Überlappung der Immunfluoreszenzsignale nicht, was aber möglicherweise einer deutlich schwächeren Signalintensität beider Proteine geschuldet sein könnte. Vorstellbar wäre, dass Pim1 analog zu Cdc2 und Cdk5 eine Phosphorylierung von Nestin vermittelt, jedoch ist Nestin bislang nicht als Pim1-Substrat beschrieben, allerdings haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine Abnahme der Expression von Nestin nach pharmakologischer Pim1-Blockade in LN-18 GBM-Zellen gezeigt, was für eine direkte oder indirekte Regulation von Nestin durch Pim1 sprechen könnte<sup>286</sup>.

Sox2 (SRY[sex-determining region Y]-box 2) stellt einen weiteren Stammzellmarker dar, dessen Expression die neurale Differenzierung von Vorläuferzellen hemmt<sup>110</sup>. Eine Expression von Sox2 wurde darüber hinaus in stammzellähnlichen Tumorzellen beschrieben<sup>26,117,187</sup>.

Zudem bewirkt eine Verringerung der Expression von Sox2 eine Reduktion der Sphärenformation von GBM-Zellen<sup>117</sup>. Die Expression von Sox2 kann über TGF $\beta$  vermittelt durch Sox4 und Oct4 induziert werden<sup>137,138</sup>. Zudem spielt STAT3 hinsichtlich der Expression von Sox2 eine Rolle<sup>227</sup>. Ebenso findet eine Regulation von Sox2 über die EGFR/PI3K/AKT- oder EGFR/Src/AKT-Signalkaskade statt<sup>187</sup>. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  sind ebenfalls in der Lage, die Expression von Sox2 zu induzieren, was wiederum die Expression des Stammzellmarkers CD133 durch eine direkte Interaktion von Sox2 mit der P1 Promoterregion fördert<sup>187</sup>. Die Aktivität von Sox2 kann auf posttranslationaler Ebene durch SUMOylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitylierung reguliert werden<sup>187,278</sup>. Sox2 beeinflusst als Regulator von verschiedenen *microRNAs* die Expression von c-Myc, Wnt1, Wnt2, Notch1 sowie Cyclin E, Cyclin D1, p27, Nanog, Oct4, TGF $\beta$  und Survivin<sup>181,187</sup>. Zwar wurde Sox2 als Transaktivator von PTEN, einem Inhibitor der PI3K/AKT-Signalkaskade, beschrieben, jedoch zeigen Tumoren mit einer hohen Sox2-Expression eine deutlich erhöhte Mutationsrate in den Genen *PIK3CA* und *PTEN*<sup>278</sup>. Für primäre Glioblastome sind ebenfalls Mutationen im *PTEN*-Gen beschrieben<sup>229,230</sup>. Darüber hinaus kann Hyaluronan die Interaktion von CD44v3 mit den Stammzellmarkern Sox2, Oct4 und Nanog fördern, wodurch eine Komplexbildung sowie die nukleäre Translokation dieser Transkriptionsfaktoren eingeleitet wird<sup>38</sup>.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich von adhärennten LN-18 Zellen mit stammzellähnlichen Tumorzellen war für Sox2 bei der Western Blot-Analyse eine gesteigerte Expression in LN-18 Neurosphären erkennbar. Anders als in der Immunfluoreszenz-Einzelfärbung für Sox2 konnte in der Doppelfärbung von Pim1 und Sox2 für beide Marker eine stärkere Expression in den Neurosphären beobachtet werden. Eine Kolokalisation von Pim1 mit Sox2 ließ sich allerdings nicht nachweisen.

Im Zusammenhang mit einer erhöhten Pim1-Expression konnte eine Induktion von Stammzellmarkern wie Sox2, Oct4 und Nanog bereits nachgewiesen werden, wobei Pim1 über die Kontrolle des *long noncoding RNA H19*-Levels die Transkription von Stammzellmarkern wie Sox2 reguliert<sup>292</sup>. Somit wäre es denkbar, dass die in den LN-18 Neurosphären beobachtete Aufregulation von Sox2 über eine Pim1-vermittelte Regulation der *long noncoding RNA H19* erfolgt. Sox2 kann, wie oben beschrieben, die Expression des Stammzellfaktors CD133 fördern<sup>187</sup>, wodurch Pim1 eine tragende Rolle in der Induktion des Stammzellverhaltens von Glioblastomzellen spielen könnte. Gleichzeitig können Sox2 und Pim1 synergistisch über eine Hemmung von p27 die Progression des Zellzyklus vorantreiben und über c-Myc die Expression

von Transkriptionsfaktoren wie ZEB1, ZEB2, Snail1, Snail2 und Twist sowie die transkriptionale Aktivität von Notch1 steuern<sup>187,218,274,360,362</sup>.

Neben Stammzellmarkern wurde in dieser Arbeit auch das Protein SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*, Osteonektin) untersucht, welches einen Marker für Astrozyten und Gliazellen darstellt, von Gliomen stark exprimiert wird und dessen Expression mit der Tumorprogression sinkt<sup>52</sup>.

In den Immunfluoreszenz-Färbungen für SPARC ließen sich Expressionsunterschiede zwischen LN-18 Neurosphären und adhärent wachsenden Tumorzellen nicht nachweisen. In den Kofärbungen für Pim1 und SPARC zeigten sowohl die adhärent wachsenden LN-18 Zellen als auch die Neurosphären für SPARC eine ähnliche Fluoreszenz mittlerer Intensität. Eine zumindest partielle Kolo-kalisation beider Proteine kann aufgrund der beobachteten leichten Gelbfärbung bei Überlagerung des roten (Pim1) und des grünen (SPARC) Fluoreszenzkanals nicht ausgeschlossen werden, wobei eine direkte Modulation von SPARC durch Pim1 in der Literatur bislang nicht beschrieben wurde, allerdings haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine Induktion von SPARC nach pharmakologischer Pim1-Blockade in LN-18 GBM-Zellen gezeigt, was für eine Differenzierung der Zellen sprechen könnte<sup>286</sup>. Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter SPARC-Expression und verringerter Tumorzellproliferation festgestellt, andererseits wurde aber auch gezeigt, dass SPARC die Migration von GBM-Zellen fördert<sup>52,165</sup>.

SPARC ist ein matrizelluläres Protein, das Calcium-abhängig Kollagen bindet und Einfluss auf die Zusammensetzung der Basallamina nehmen kann<sup>39</sup>. Eine Bindung von SPARC mit PDGF oder VEGF vermindert deren mitogenes Potenzial durch die Aufhebung der Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren<sup>40</sup>. Daneben kann SPARC die Aktivität von TGF $\beta$  modulieren<sup>40</sup>. Neben einer Änderung der Zellform wurde in Anwesenheit von SPARC eine Dissoziation von fokalen Adhäsionen beobachtet, die auch im Zusammenhang mit metastasierten Tumoren beschrieben wurden<sup>40,58</sup>. SPARC kann die Expression von Regulatoren der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), wie beispielsweise Snail und Twist, vermutlich über die Aktivierung von AKT induzieren<sup>58</sup>. Darüber hinaus scheint die Wnt-Signalkaskade, die von SPARC induziert werden kann und zu einer Suppression von E-Cadherin führt, im Hinblick auf die EMT eine Rolle zu spielen<sup>91</sup>. Golembieski et al. beobachteten einhergehend mit der Expression von SPARC eine Elongation des Zellkörpers sowie eine erhöhte Migration und Invasion vermittelt von HSP27, einem Regulator der Aktinpolymerisierung<sup>107</sup>. SPARC kann darüber hinaus über die Hochregulation von MT1-MMP (*membrane type 1-matrix*

*metalloproteinase*) und MMP2 die Hirntumorinvasion vorantreiben<sup>208</sup>. Insgesamt betrachtet scheint die Expression von SPARC in Tumorzellen zwar deren Proliferation zu reduzieren, jedoch ihre Invasion und Migration zu stimulieren. Die durch unsere Arbeitsgruppe gefundene Zunahme der SPARC-Expression in LN-18 GBM-Zellen nach pharmakologischer Pim1-Blockade könnte somit ein zweiseitiges Schwert sein<sup>286</sup>: Sie könnte die Proliferation verringern, aber die Invasivität von GBM-Zellen erhöhen.

#### 4.2 Einfluss eines siRNA-vermittelten *knockdown* von Pim1 auf die Expression von Stammzellmarker

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Modulation der Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarker nach pharmakologischer Pim1-Blockade in LN-18 GBM-Zellen nachweisen<sup>286</sup>. Um den Einfluss von Pim1 auf das Stammzellverhalten von GBM zu untermauern, sollte im Rahmen dieser Arbeit bei adhären wachsenden LN-18 Zellen sowie bei stammzellähnlichen LN-18 Neurosphären ein siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 durchgeführt werden. Seit der Entdeckung der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) sind *Gene-targeting*-Strategien auch im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika im Mittelpunkt des Interesses<sup>4,282,337</sup>. RNAi basiert letztlich auf dem Einschleusen von siRNA und der intrazellulären Wirkung dieser kleinen doppelsträngigen RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch durch Hybridisierung an die Ziel-mRNA binden<sup>4,53,337</sup>. Unter Beteiligung des RISC (*RNA-induced silencing complex*) mit seinen RNA-Helicase- und Nuklease-Aktivitäten erfolgt die Entwindung und Spaltung der Ziel-mRNA, die daraufhin rasch durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut wird<sup>4,53,337</sup>.

Im Rahmen der siRNA-Experimente konnte die relative Pim1-mRNA-Expression in adhären LN-18 Zellen zwar signifikant, allerdings lediglich auf 36,6 % gesenkt werden, wohingegen ein Effekt auf die relative Proteinexpression von Pim1S und Pim1L ausblieb. Dementsprechend konnten auch keine signifikanten mRNA-Expressionsunterschiede von anderen untersuchten Genen wie Pim2, Pim3, CD44 und CD133 nachgewiesen werden. Unerwarteterweise fand sich jedoch eine geringfügig um 25-30 %, jedoch signifikant gesteigerte relative mRNA-Expression von Nestin, Musashi-1 und SPARC, die jedoch keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinexpression dieser Marker bewirkte. Da dieser Expressionsunterschied nur sehr schwach ausgeprägt war und Pim1 auf Proteinebene durch den siRNA-Transfer nicht reduziert werden konnte, muss an einem spezifischen Effekt gezweifelt werden. Außerdem kann die Möglichkeit von *off-target*-Effekten, bei denen siRNAs die

Expression von Nicht-Zielgenen beeinflussen, nicht ausgeschlossen werden. Da aber eine kommerziell erworbene, validierte siRNA eingesetzt wurde, sollten solche *off-target*-Effekte minimiert sein.

Aufgrund der signifikant erhöhten relativen Expression von Pim1 sowie von Stammzellmarker in Neurosphären im Vergleich zu adhären wachsenden Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18 sollte darüber hinaus der siRNA-vermittelte *knockdown* von Pim1 in LN-18 Neurosphären untersucht werden.

Dabei konnte bei Neurosphären der Passage 1 durch die Transfektion einer spezifischen Pim1-siRNA keine signifikante Reduktion der relativen Pim1-mRNA-Expression erzielt werden. Auf Proteinebene ließ sich ebenfalls kein *knockdown* von Pim1 nachweisen. Dementsprechend zeigte sich auch keine signifikante Änderung des relativen mRNA-Gehaltes für CD133, Nestin, Musashi-1 und SPARC. Hingegen war die relative mRNA-Expression von CD44 geringfügig, aber signifikant auf das 1,2-fache gesteigert. Ob es sich dabei um einen *off-target*-Effekt handelt, kann aktuell nicht beurteilt werden.

Neurosphären der Passage 2 wurden ebenfalls einer Transfektion mit Kontroll- und spezifischer Pim1-siRNA unterzogen, jedoch wurde lediglich eine 30-prozentige Reduktion des relativen Pim1-mRNA-Gehaltes erzielt. Effekte auf den relativen mRNA-Gehalt der anderen untersuchten Gene Pim2, Pim3, CD44, CD133, Nestin, Musashi-1 und SPARC konnten dementsprechend nicht nachgewiesen werden, da vermutlich ein so gering ausfallender *knockdown* keine signifikanten Konsequenzen für die Zelle hat und das verbleibende Pim1 ausreicht, um die von ihm abhängigen zellulären Prozesse aufrecht zu erhalten. Denkbar wäre auch, dass lediglich die äußeren Zellschichten der Neurosphären effizient die siRNA aufgenommen haben, da sie eine größere medium- und damit siRNA-exponierte Fläche aufweisen, während Zellen im Inneren der Neurosphären wenig Kontakt zum siRNA-haltigen Medium besitzen dürften.

Ein signifikanter Effekt des siRNA-vermittelten *knockdowns* von Pim1 auf Proteinebene ließ sich nicht nachweisen, tendenziell erschien die relative Proteinexpression von Pim1S und Pim1L geringfügig erhöht zu sein. Ein kompensatorischer Effekt wäre hier vorstellbar, bei dem durch die um 30% verminderte Pim1 mRNA-Expression ein Rückkopplungsmechanismus in Gang gesetzt werden könnte, über den letztlich die relative Proteinexpression gesteigert wurde, beispielsweise durch verstärkte Translation oder Stabilisierung des Pim1-Proteins. Statistisch signifikante Veränderungen hinsichtlich der relativen mRNA- und Proteinexpression von Nestin, CD44, CD133, Musashi-1 und SPARC blieben aus. Tendenziell zeigten jedoch die Neurosphären der Passage 2 eine leicht verringerte relative Proteinexpression von CD44 und

Nestin. Da jedoch auf Proteinebene keine Reduktion von Pim1 vorlag, handelt es sich hier vermutlich nicht um einen spezifischen Effekt. Vorstellbar wären auch hier wieder *off-target*-Effekte oder aber eine starke interexperimentelle Streuung, die den Anschein einer Regulation erwecken lässt.

Warum der Einsatz der Pim1-spezifischen siRNA nicht den gewünschten Erfolg gebracht hat, bleibt ungeklärt. Eine Überprüfung der Transfektionseffizienz der Zellen ließ sich nicht direkt durchführen, da die verwendete siRNA nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt vorlag. Wäre dies der Fall gewesen, hätte man im Fluoreszenzmikroskop prozentual einschätzen können, wie viele Zellen überhaupt erfolgreich transfiziert wurden. Daher konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen über die Transfektionseffizienz, die wesentlich für einen erfolgreichen siRNA-basierten Gen-*knockdown* ist, getroffen werden. Bei Vorliegen einer sehr geringen Transfektionseffizienz könnte beispielweise durch Testung und Vergleich verschiedener Transfektionsverfahren eine Optimierung erreicht werden.

Aufgrund des fehlenden Effektes des siRNA-vermittelten *knockdown* von Pim1 auf die Proteinexpression sollte in einem nächsten Schritt ein stabiler Pim1-*knockout* in der Glioblastomzelllinie LN-18 mithilfe des CRISPR-Cas-Systems erzielt werden. Dazu wurden die LN-18 Zellen, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, mit dem Pim1-Double-Nickase-Plasmid beziehungsweise dem Kontrollplasmid transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde am Immunfluoreszenzmikroskop überprüft, da die verwendeten Plasmide einen GFP (*Green Fluorescent Protein*)-Marker enthielten, um die Transfektion visuell bestätigen zu können. Anschließend wurden die Zellen in sehr geringer Zellzahl auf großen Zellkulturschalen ausgesät, um entsprechende Zellklone, die im Idealfall von einer einzigen Ursprungszelle ausgehen, zu erzeugen. Zellklone, die auch nach 12-wöchiger Kultivierung bei 37 °C und regelmäßigem Mediumwechsel kein Wachstum zeigten, konnten nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen werden und wurden vernichtet. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wachstumshemmung dieser Zellklone auf einem erfolgreichen *knockout* und damit dem Verlust von Pim1 basiert, da Pim1 Zellzyklus- und Proliferations-stimulierende Effekte vermittelt. Die Selektion positiv transfizierter Klone erfolgte unter Einsatz von Puromycin, da die verwendeten Plasmide ein Puromycin-Resistenzgen enthielten. Die nötige zytotoxische Puromycinkonzentration wurde in vorher durchgeführten Zellviabilitätsanalysen ermittelt. Die übrig gebliebenen Zellklone wurden anschließend auf den *knockout* von Pim1 mithilfe von RT-PCR und Western Blot untersucht. Jedoch konnte in allen analysierten Zellklonen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene kein *knockout* von Pim1S und Pim1L festgestellt werden

(Daten nicht gezeigt). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass ein *knockout* von Pim1 nicht letal ist und ohne offensichtlichen Phänotyp durch die beiden anderen Serin-Threonin-Kinasen der Pim-Familie, Pim2 und Pim3, kompensiert werden kann<sup>167,211</sup>. Dementsprechend war anzunehmen, dass auch in Tumorzellen ein stabiler *knockout* von Pim1 zu erzielen ist ohne einen kompletten wachstumshemmenden oder letalen Effekt auszulösen. Möglicherweise könnten jedoch die Zellklone, die nach 12-wöchiger Kultivierung kein Wachstum zeigten und in die weiteren Analysen nicht eingeschlossen werden konnten, den entsprechenden Pim1-*knockout* aufgewiesen haben. Dies würde die zentrale Rolle, die die Serin-Threonin-Kinase Pim1 im Tumorgeschehen womöglich einnimmt, unterstreichen. Wenn sich eine solche Hypothese bestätigen ließe, könnte eine zielgerichtete Behandlung von Glioblastomen mit einem Pim1-Inhibitor Erfolg versprechend sein.

#### 4.3 Einfluss einer Pim1-Inhibition auf die Neurosphärenbildung und die Zellviabilität

Um den Einfluss einer pharmakologischen Inhibition von Pim1 auf das Stammzellverhalten von GBM-Zellen zu untersuchen, wurden LN-18 Zellen als Neurosphären kultiviert und mit drei verschiedenen Pim1-Inhibitoren behandelt. LY294002 ist als Inhibitor von Pim1 sowie von PI3K beschrieben, wobei auch eine Hemmung anderer Enzyme wie die Inhibition der Proteinkinase CK2, der Serin-Threonin-Kinasen GSK3A und B, p97/VCP, ein Mitglied der Typ II AAA ATPase-Familie, sowie anderer Chaperone mit ATPase-Aktivität beobachtet wurde<sup>75,102,143</sup>. Neben LY294002 (LY) wurden der selektive Pim1-Inhibitor Quercetagenin (QT), der spezifische Pim1-Inhibitor TCS PIM1-1 (TCS) sowie das Standardchemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) analysiert<sup>62,130</sup>. Der Einsatz von LY sowie von TCS bewirkte bereits 72 h nach der Applikation der Substanzen eine deutliche Reduktion der Zellviabilität bei den LN-18 Neurosphären. Diese Ergebnisse ergänzen die von unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten zu viabilitätshemmenden Effekten von LY und TCS an adhärent wachsenden Glioblastomzellen<sup>124</sup>. Demgegenüber konnten durch Applikation von QT keine negativen Effekte auf die Neurosphärenbildung und die Zellviabilität beobachtet werden. Dies könnte auf einer schwächer ausgeprägten Pim1-Blockade beruhen, da Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass unter QT eine deutlich geringere Hemmung der Phosphorylierung des Pim1-Substrates BAD im Vergleich zu LY und TCS erfolgt<sup>124</sup>. Auch das Standardchemotherapeutikum TMZ war, mutmaßlich bedingt durch einen unmethylierten MGMT-Gen-Promoter in LN-18 Zellen<sup>65</sup>, ineffektiv. Bei Vorhandensein eines methylierten MGMT-Gen-Promoters wird die Expression der MGMT, einem DNA-Reparaturenzym,

unterdrückt und der alkylierenden und somit zytotoxischen Wirkung von TMZ kann nicht entgegengewirkt werden<sup>334</sup>. Interessant wäre daher in weiteren Analysen den Effekt von TMZ in Neurosphären, welche aus GBM-Zellen mit einem methylierten MGMT-Promoter hervorgegangen sind, zu untersuchen.

Der wachstumshemmende Effekt der Pim1-Inhibition wurde durch die Anfertigung von mikroskopischen Bildern und dem Auszählen von Neurosphären bestätigt. Während die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollen zahlreiche kleine und auch große Neurosphären zeigten, war sowohl die Anzahl als auch die Neurosphärengroße nach Behandlung mit den Pim1-Inhibitoren LY und TCS signifikant reduziert. Aufgrund der nahezu komplett reduzierten Zellviabilität nach sieben Tagen Substanzbehandlung war eine Expressionsanalyse von Stammzell- und Differenzierungsmarker nicht mehr möglich, da nicht ausreichend Protein gewonnen werden konnte. Hilfreich zur Klärung der Regulation von Stammzellmarkern in Neurosphären durch Pim1-Inhibition könnten daher kürzere Inkubationszeiten sein. Die hemmende Wirkung von LY auf die Größe sowie die Zellviabilität wurde bereits bei als neurale Stammzellen kultivierten Neurosphären nachgewiesen<sup>50,363</sup>. Es existiert eine steigende Evidenz, dass Pim1 eine Rolle im Stammzellverhalten spielt. Pim1 treibt beispielsweise die Fähigkeit zur Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen an<sup>6</sup>. Mohsin et al. konnten in Experimenten zu humanen kardialen Stammzellen/Vorläuferzellen durch eine Transduktion von Pim1 eine verminderte Seneszenz sowie eine erhöhte Telomerlänge neben einer verstärkten Telomeraseaktivität nachweisen<sup>215</sup>. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass eine Überexpression von Pim1 einen Anstieg der Proliferationsrate sowie des Überlebens der Zellen bewirkte<sup>215</sup>.

Bis heute wurde die Rolle von Pim1 bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Glioblastomstammzellen jedoch nicht beschrieben, obwohl Pim1-Signalwege mit Krebsstammzellen beim Prostatakrebs in Verbindung gebracht werden<sup>342</sup>. Vor kurzem haben Jiménez-García und Kollegen gezeigt, dass Pim1 in menschlichen Brust-, Gebärmutter- und Eierstocktumoren verstärkt exprimiert wird und mit entzündlichen Merkmalen sowie Stammzellmarkern korreliert<sup>148</sup>. Außerdem schwächt die Hemmung von Pim1 die stammzellähnlichen Eigenschaften von Brustkrebszellen ab<sup>186</sup>. Interessant ist zudem, dass Pim1 mit der AKT1-Signalgebung interagiert, von der bereits gezeigt wurde, dass sie an den Stammzeleigenschaften von Glioblastomstammzellen beteiligt ist<sup>132,145,162,217</sup>. Insgesamt betrachtet untermauern die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde die Bedeutung von Pim1 für das Stammzellverhalten von Glioblastomzellen und eine zielgerichtete Hemmung dieser onkogenen Kinase könnte damit eine neue therapeutische Option darstellen, wie bereits

*in vivo* Analysen unserer Arbeitsgruppe in einem orthotopen Glioblastom-Modell der Maus bewiesen haben<sup>124</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist ein WHO Grad 4-Tumor und einer der häufigsten und zugleich aggressivsten Hirntumoren im Erwachsenenalter. Trotz multimodaler Therapie, die eine neurochirurgische Resektion sowie eine adjuvante Radiochemotherapie und als neuen Therapieansatz eine Kombination aus Temozolomid und *tumor treating fields* umfasst, ist die Prognose weiterhin schlecht, sodass der Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen eine maßgebliche Bedeutung zukommt. Für verschiedene Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einzelner onkogener Kinasen die Tumorprogression vorantreibt, wobei bei Glioblastomen gezeigt werden konnte, dass die Serin-Threonin-Kinase Pim1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese einnimmt.

In den Fokus rücken zunehmend auch stammzellähnliche Tumorzellen, die eine Subpopulation innerhalb von Glioblastomen darstellen und das aggressive biologische Verhalten sowie die Resistenz gegenüber der Standardtherapie und eine hohe Rezidivrate vermitteln können.

In dieser Arbeit sollte dementsprechend basierend auf den bisherigen Erkenntnissen zu Pim1 sowie zur Bedeutung von Tumorstammzellen im malignen Geschehen der Einfluss der Serin-Threonin-Kinase Pim1 auf das Stammzellverhalten von Glioblastomzellen näher untersucht werden.

Durch den Vergleich von adhärent wachsenden Tumorzellen der Glioblastomzelllinie LN-18 mit stammzellähnlichen LN-18 Neurosphären konnte eine erhöhte relative mRNA-Expression von Pim1 und EGFR sowie der potentiellen Stammzellmarker Nestin, CD44, CD133 und Musashi-1 nachgewiesen werden. Die relative Proteinexpression von Pim1 sowie der Stammzellmarker Nestin, CD44, CD133 und Sox2 war in den Neurosphären im Vergleich zu den adhärent wachsenden LN-18 Zellen ebenfalls gesteigert. Diese Daten konnten durch die Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt werden.

Ein effizienter siRNA-vermittelter *knockdown* von Pim1 auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit nicht erzielt werden, sodass keine Aussagen zu einer Regulation von Stammzell- und Differenzierungsmarker nach zielgerichteter genetischer Abschaltung von Pim1 getroffen werden konnten. Hier sind weiterführend Optimierungen notwendig oder der Einsatz spezieller CRISPR-Cas9-Verfahren zur genetischen Ausschaltung sinnvoll.

Die pharmakologische Inhibition von Pim1 mit LY294002 und TCS Pim1-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Neurosphärenformation sowie der Zellviabilität bei LN-18 Zellen, wodurch die in Vorarbeiten an adhärennten Glioblastomzellen gewonnenen Daten um Untersuchungen an stammzellartigen Glioblastomzellen erweitert wurden.

Zusammenfassend legen die in dieser Arbeit erhobenen Daten nahe, dass Pim1 das Stammzellverhalten von Glioblastomzellen beeinflusst, indem Pim1 Einfluss auf die Expression von Stammzellmarkern nimmt und seine Inhibition die Aufrechterhaltung einer Glioblastomstammzellpopulation beeinträchtigt, indem die Neurosphärenformation und die Viabilität der Zellen stark reduziert werden. Somit stellt Pim1 eine geeignete Zielstruktur für eine zielgerichtete Therapieoption beim Glioblastom dar, beispielsweise in Kombination mit der klassischen Radiochemotherapie. Zukünftige Studien müssen zeigen, inwieweit eine selektive Pim1-Inhibition tatsächlich Einfluss auf die Prognose von Patienten mit Glioblastom nimmt.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Statistisches Bundesamt (Destatis). (2020). Kopie von 23211-0004-1. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0004#abreadcrumb> (abgerufen am 25.09.2021).
- 2 Statistisches Bundesamt (Destatis). (2020). Kopie von todesursachenstatistik-5232101197015.xlsx;jsessionid=4C58E559CA38EEABF07292B2FB3B1295.live711. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/todesursachenstatistik-5232101197015.html>, **5232101197015** (abgerufen am 25.09.2021).
- 3 Statistisches Bundesamt (Destatis). (2021). 23211\_0004. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=1&levelid=1632582842490&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0004&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb> (abgerufen am 25.09.2021).
- 4 N. Agrawal, P. V. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, S. K. Mukherjee. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, **67**(4):657-685.
- 5 T. L. Aho, J. Sandholm, K. J. Peltola, H. P. Mankonen, M. Lilly, P. J. Koskinen. (2004). Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS letters*, **571**(1-3):43-49.
- 6 I. Aksoy, C. Sakabedoyan, P. Y. Bourillot, A. B. Malashicheva, J. Mancip, K. Knoblauch, M. Afanassieff, P. Savatier. (2007). Self-renewal of murine embryonic stem cells is supported by the serine/threonine kinases Pim-1 and Pim-3. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **25**(12):2996-3004.
- 7 M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, M. F. Clarke. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(7):3983-3988.
- 8 A. Alvarez-Buylla, C. Lois. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **13**(3):263-272.
- 9 N. An, B. Cen, H. Cai, J. H. Song, A. Kraft, Y. Kang. (2016). Pim1 kinase regulates c-Kit gene translation. *Experimental hematology & oncology*, **5**:31:1-8.

- 10 N. An, A. S. Kraft, Y. Kang. (2013). Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice. *Journal of hematology & oncology*, **6**:12:1-10.
- 11 N. An, Y. W. Lin, S. Mahajan, J. N. Kellner, Y. Wang, Z. Li, A. S. Kraft, Y. Kang. (2013). Pim1 serine/threonine kinase regulates the number and functions of murine hematopoietic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **31**(6):1202-1212.
- 12 V. Aran, J. Omerovic. (2019). Current Approaches in NSCLC Targeting K-RAS and EGFR. *International journal of molecular sciences*, **20**(22):1-24.
- 13 A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**(7):1303-1313.
- 14 The Human Protein Atlas. (2020). CELL ATLAS CAB017040 PIM1. <https://v15.proteinatlas.org/ENSG00000137193-PIM1/cell/CAB017040> (zuletzt abgerufen am 16.07.2022).
- 15 The Human Protein Atlas. (2020). CELL ATLAS HPA007007 NES. <https://v15.proteinatlas.org/ENSG00000132688-NES/cell/HPA007007> (zuletzt abgerufen am 16.07.2022).
- 16 The Human Protein Atlas, "<https://v15.proteinatlas.org/>" (zuletzt abgerufen am 16.07.2022).
- 17 H. Azari, B. A. Reynolds. (2016). In Vitro Models for Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **8**(6):1-11.
- 18 M. Bachmann, H. Hennemann, P. X. Xing, I. Hoffmann, T. Moroy. (2004). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *The Journal of biological chemistry*, **279**(46):48319-48328.
- 19 M. Bachmann, C. Kosan, P. X. Xing, M. Montenarh, I. Hoffmann, T. Möröy. (2006). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **38**(3):430-443.
- 20 M. Bachmann, T. Moroy. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**(4):726-730.
- 21 E. Balz. (2016). (Inaugural-Dissertation). Untersuchungen zur Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern im Glioblastom sowie deren Modulation durch Inhibitoren der Kinase Pim1. [https://epub.uni-greifswald.de/files/1970/diss\\_balz\\_ellen.pdf](https://epub.uni-greifswald.de/files/1970/diss_balz_ellen.pdf) (zuletzt abgerufen am 31.07.2022).

- 22 S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, J. N. Rich. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**(7120):756-760.
- 23 G. M. Barbagallo, S. Paratore, R. Caltabiano, S. Palmucci, H. S. Parra, G. Privitera, F. Motta, S. Lanzafame, G. Scaglione, A. Longo, V. Albanese, F. Certo. (2014). Long-term therapy with temozolomide is a feasible option for newly diagnosed glioblastoma: a single-institution experience with as many as 101 temozolomide cycles. *Neurosurgical focus*, **37**(6):E4:1-13.
- 24 M. Baroni, C. Yi, S. Choudhary, X. Lei, A. Kosti, D. Grieshaber, M. Velasco, M. Qiao, S. S. Burns, P. R. Araujo, T. DeLambre, M. Y. Son, M. Plateroti, M. A. R. Ferreira, P. Hasty, L. O. F. Penalva. (2021). Musashi1 Contribution to Glioblastoma Development via Regulation of a Network of DNA Replication, Cell Cycle and Division Genes. *Cancers*, **13**(7):1-23.
- 25 A. Barzegar Behrooz, A. Syahir, S. Ahmad. (2019). CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of drug targeting*, **27**(3):257-269.
- 26 O. J. Becher, E. C. Holland. (2014). Sox2, a marker for stem-like tumor cells in skin squamous cell carcinoma and hedgehog subgroup medulloblastoma. *The EMBO journal*, **33**(18):1984-1986.
- 27 A. Bernal, L. Arranz. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **75**(12):2177-2195.
- 28 N. Bhattacharya, Z. Wang, C. Davitt, I. F. McKenzie, P. X. Xing, N. S. Magnuson. (2002). Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma*, **111**(2):80-95.
- 29 S. Bien-Moller, E. Balz, S. Herzog, L. Plantera, S. Vogelgesang, K. Weitmann, C. Seifert, M. A. Fink, S. Marx, A. Bialke, C. Venugopal, S. K. Singh, W. Hoffmann, B. H. Rauch, H. W. S. Schroeder. (2018). Association of Glioblastoma Multiforme Stem Cell Characteristics, Differentiation, and Microglia Marker Genes with Patient Survival. *Stem cells international*, **2018**:9628289:1-19.
- 30 W. Biernat, H. Huang, H. Yokoo, P. Kleihues, H. Ohgaki. (2004). Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **14**(2):131-136.
- 31 E. Binda, B. A. Reynolds, A. L. Vescovi. (2014). Glioma stem cells: turpis omen in nomen? (The evil in the name?). *Journal of internal medicine*, **276**(1):25-40.

- 32 C. Blanco-Aparicio, A. Carnero. (2013). Pim kinases in cancer: diagnostic, prognostic and treatment opportunities. *Biochemical pharmacology*, **85**(5):629-643.
- 33 A. M. Bleau, D. Hambarzumyan, T. Ozawa, E. I. Fomchenko, J. T. Huse, C. W. Brennan, E. C. Holland. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell stem cell*, **4**(3):226-235.
- 34 A. M. Bleau, B. M. Howard, L. A. Taylor, D. Gursel, J. P. Greenfield, H. Y. Lim Tung, E. C. Holland, J. A. Boockvar. (2008). New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurgical focus*, **24**(3-4):E28:1-8.
- 35 U. Bode, M. Massimino, F. Bach, M. Zimmermann, E. Khuhlaeva, M. Westphal, G. Fleischhack. (2012). Nimotuzumab treatment of malignant gliomas. *Expert opinion on biological therapy*, **12**(12):1649-1659.
- 36 M. L. Bondy, M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'yasova, C. Kruchko, B. J. McCarthy, P. Rajaraman, J. A. Schwartzbaum, S. Sadetzki, B. Schlehofer, T. Tihan, J. L. Wiemels, M. Wrensch, P. A. Buffler. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, **113**(7 Suppl):1953-1968.
- 37 K. E. Borg, M. Zhang, D. Hegge, R. L. Stephen, D. J. Buckley, N. S. Magnuson, A. R. Buckley. (1999). Prolactin regulation of pim-1 expression: positive and negative promoter elements. *Endocrinology*, **140**(12):5659-5668.
- 38 L. Y. Bourguignon, G. Wong, C. Earle, L. Chen. (2012). Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of biological chemistry*, **287**(39):32800-32824.
- 39 A. D. Bradshaw. (2009). The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *Journal of cell communication and signaling*, **3**(3-4):239-246.
- 40 A. D. Bradshaw, E. H. Sage. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *The Journal of clinical investigation*, **107**(9):1049-1054.

- 41 F. Braso-Maristany, S. Filosto, S. Catchpole, R. Marlow, J. Quist, E. Francesch-Domenech, D. A. Plumb, L. Zakka, P. Gazinska, G. Llicardi, P. Meier, A. Gris-Oliver, M. C. Cheang, A. Perdrix-Rosell, M. Shafat, E. Noel, N. Patel, K. McEachern, M. Scaltriti, P. Castel, F. Noor, R. Buus, S. Mathew, J. Watkins, V. Serra, P. Marra, A. Grigoriadis, A. N. Tutt. (2016). PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer. *Nature medicine*, **22**(11):1303-1313.
- 42 D. J. Brat, D. P. Cahill, P. J. Cimino, J. T. Huse, B. K. Kleinschmidt-DeMasters, T. Komori, D. E. Reuss, M. L. Suvà, A. von Deimling, M. Weller. "Astrocytoma, IDH-mutant" in *WHO Classification of Tumours: Central Nervous System Tumours*, edited by The WHO Classification of Tumours Editorial Board (Expert members: D. J. Brat, D. W. Ellison, D. Figarella-Branger, C. E. Hawkins, D. N. Louis, H. K. Ng, A. Perry, S. M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffieti, A. von Deimling, P. Wesseling) [IARC editors: I. A. Cree, D. Lokuhetty, L. A. N. Peferoen, V. A. White] (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2021), 5. Auflage:19-27.
- 43 L. Brault, T. Menter, E. C. Obermann, S. Knapp, S. Thommen, J. Schwaller, A. Tzankov. (2012). PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of cancer*, **107**(3):491-500.
- 44 L. Brault, A. Rovo, S. Decker, C. Dierks, A. Tzankov, J. Schwaller. (2014). CXCR4-SERINE339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **28**(3):566-576.
- 45 P. Brescia, C. Richichi, G. Pelicci. (2012). Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? *Journal of oncology*, **2012**:376894:1-10.
- 46 R. Breyer, S. Hussein, D. L. Radu, K. M. Putz, S. Gunia, H. Hecker, M. Samii, G. F. Walter, A. C. Stan. (2000). Disruption of intracerebral progression of C6 rat glioblastoma by in vivo treatment with anti-CD44 monoclonal antibody. *Journal of neurosurgery*, **92**(1):140-149.
- 47 K. W. Broadley, M. K. Hunn, K. J. Farrand, K. M. Price, C. Grasso, R. J. Miller, I. F. Hermans, M. J. McConnell. (2011). Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **29**(3):452-461.

- 48 D. V. Brown, G. Filiz, P. M. Daniel, F. Hollande, S. Dworkin, S. Amiridis, N. Kountouri, W. Ng, A. P. Morokoff, T. Mantamadiotis. (2017). Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PloS one*, **12**(2):e0172791:1-17.
- 49 J. Cai, Y. Wu, T. Mirua, J. L. Pierce, M. T. Lucero, K. H. Albertine, G. J. Spangrude, M. S. Rao. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Developmental biology*, **251**(2):221-240.
- 50 M. Cai, Y. Zhou, B. Zhou, S. Lou. (2014). Hypoxic conditioned medium from rat cerebral cortical cells enhances the proliferation and differentiation of neural stem cells mainly through PI3-K/Akt pathways. *PloS one*, **9**(11):e111938:1-10.
- 51 F. M. Cambuli, B. R. Correa, A. Rezza, S. C. Burns, M. Qiao, P. J. Uren, E. Kress, A. Boussouar, P. A. Galante, L. O. Penalva, M. Plateroti. (2015). A Mouse Model of Targeted Musashi1 Expression in Whole Intestinal Epithelium Suggests Regulatory Roles in Cell Cycle and Stemness. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **33**(12):3621-3634.
- 52 D. Capper, M. Mittelbronn, B. Goeppert, R. Meyermann, J. Schittenhelm. (2010). Secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) expression in astrocytic tumour cells negatively correlates with proliferation, while vascular SPARC expression is associated with patient survival. *Neuropathology and applied neurobiology*, **36**(3):183-197.
- 53 R. W. Carthew, E. J. Sontheimer. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **136**(4):642-655.
- 54 B. Cen, Y. Xiong, J. H. Song, S. Mahajan, R. DuPont, K. McEachern, D. J. DeAngelo, J. E. Cortes, M. D. Minden, A. Ebens, A. Mims, A. C. LaRue, A. S. Kraft. (2014). The Pim-1 protein kinase is an important regulator of MET receptor tyrosine kinase levels and signaling. *Molecular and cellular biology*, **34**(13):2517-2532.
- 55 G. Chagoya, S. G. Kwatra, C. W. Nanni, C. M. Roberts, S. M. Phillips, S. Nullmeyergh, S. P. Gilmore, I. Spasojevic, D. L. Corcoran, C. C. Young, K. V. Ballman, R. Ramakrishna, D. A. Cross, J. M. Markert, M. Lim, M. R. Gilbert, G. J. Lesser, M. M. Kwatra. (2020). Efficacy of osimertinib against EGFRvIII+ glioblastoma. *Oncotarget*, **11**(22):2074-2082.
- 56 Z. Chaker, P. Codega, F. Doetsch. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, **5**(6):640-658.

- 57 S. R. Chandana, S. Movva, M. Arora, T. Singh. (2008). Primary brain tumors in adults. *American family physician*, **77**(10):1423-1430.
- 58 C. H. Chang, M. C. Yen, S. H. Liao, Y. L. Hsu, C. S. Lai, K. P. Chang, Y. L. Hsu. (2017). Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Enhances Cell Proliferation, Migration, and Epithelial Mesenchymal Transition, and SPARC Expression is Associated with Tumor Grade in Head and Neck Cancer. *International journal of molecular sciences*, **18**(7):1-12.
- 59 J. Chen, M. Kobayashi, S. Darmanin, Y. Qiao, C. Gully, R. Zhao, S. Kondo, H. Wang, H. Wang, S. C. Yeung, M. H. Lee. (2009). Hypoxia-mediated up-regulation of Pim-1 contributes to solid tumor formation. *The American journal of pathology*, **175**(1):400-411.
- 60 M. Chen, B. Yi, N. Zhu, X. Wei, G. X. Zhang, S. Huang, J. Sun. (2016). Pim1 kinase promotes angiogenesis through phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser-633. *Cardiovascular research*, **109**(1):141-150.
- 61 X. P. Chen, J. A. Losman, S. Cowan, E. Donahue, S. Fay, B. Q. Vuong, M. C. Nawijn, D. Capece, V. L. Cohan, P. Rothman. (2002). Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(4):2175-2180.
- 62 I. W. Cheney, S. Yan, T. Appleby, H. Walker, T. Vo, N. Yao, R. Hamatake, Z. Hong, J. Z. Wu. (2007). Identification and structure-activity relationships of substituted pyridones as inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **17**(6):1679-1683.
- 63 O. L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A. F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A. A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, T. Cloughesy. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine*, **370**(8):709-722.
- 64 L. Chu, Q. Huang, D. Z. Zhai, Q. Zhu, H. M. Huo, J. Dong, Z. Y. Qian, A. D. Wang, Q. Lan, Y. L. Gao. (2007). [Expression and significance of ABCG2 in human malignant glioma]. [Abstrakt]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*, **26**(10):1090-1094.
- 65 I. A. Ciechomska, M. P. Marciniak, J. Jackl, B. Kaminska. (2018). Pre-treatment or Post-treatment of Human Glioma Cells With BIX01294, the Inhibitor of Histone Methyltransferase G9a, Sensitizes Cells to Temozolomide. *Frontiers in pharmacology*, **9**:1271:1-13.

- 66 M. F. Clarke, J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. Jamieson, D. L. Jones, J. Visvader, I. L. Weissman, G. M. Wahl. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*, **66**(19):9339-9344.
- 67 M. F. Clarke, M. Fuller. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, **124**(6):1111-1115.
- 68 P. Codega, V. Silva-Vargas, A. Paul, A. R. Maldonado-Soto, A. M. Deleo, E. Pastrana, F. Doetsch. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, **82**(3):545-559.
- 69 American Type Culture Collection. (2020). ATCC Product Sheet K-562 (ATCC<sup>R</sup> CCL-243<sup>TM</sup>). [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-243.aspx?geo\\_country=de#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-243.aspx?geo_country=de#documentation) (abgerufen am 04.07.2020).
- 70 American Type Culture Collection. (2020). PC-3 (ATCC<sup>R</sup> CRL-1453<sup>TM</sup>). <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx#documentation> (abgerufen am 04.07.2020).
- 71 H. T. Cuypers, G. Selten, W. Quint, M. Zijlstra, E. R. Maandag, W. Boelens, P. van Wezenbeek, C. Melief, A. Berns. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell*, **37**(1):141-150.
- 72 R. H. Dahlrot, J. Dowsett, S. Fosmark, A. Malmstrom, R. Henriksson, H. Boldt, K. de Stricker, M. D. Sorensen, H. S. Poulsen, M. Lysiak, P. Soderkvist, J. Rosell, S. Hansen, B. W. Kristensen. (2017). Prognostic value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression in glioblastoma excluding nontumour cells from the analysis. *Neuropathology and applied neurobiology*:1-13.
- 73 R. H. Dahlrot, S. Hansen, J. Herrstedt, H. D. Schroder, J. Hjelmberg, B. W. Kristensen. (2013). Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. *Journal of neuro-oncology*, **115**(3):453-461.
- 74 J. Dahlstrand, V. P. Collins, U. Lendahl. (1992). Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer research*, **52**(19):5334-5341.
- 75 S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*, **351**(Pt 1):95-105.

- 76 P. R. de Araujo, A. Gorthi, A. E. da Silva, S. S. Tonapi, D. T. Vo, S. C. Burns, M. Qiao, P. J. Uren, Z. M. Yuan, A. J. Bishop, L. O. Penalva. (2016). Musashi1 Impacts Radio-Resistance in Glioblastoma by Controlling DNA-Protein Kinase Catalytic Subunit. *The American journal of pathology*, **186**(9):2271-2278.
- 77 L. P. Deleyrolle, A. Harding, K. Cato, F. A. Siebzehnrubl, M. Rahman, H. Azari, S. Olson, B. Gabrielli, G. Osborne, A. Vescovi, B. A. Reynolds. (2011). Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain: a journal of neurology*, **134**(Pt 5):1331-1343.
- 78 L. P. Deleyrolle, B. A. Reynolds. (2009). Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **549**:91-101.
- 79 E. Desuzinges-Mandon, O. Arnaud, L. Martinez, F. Huché, A. Di Pietro, P. Falson. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *The Journal of biological chemistry*, **285**(43):33123-33133.
- 80 J. E. Dick. (2003). Breast cancer stem cells revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(7):3547-3549.
- 81 M. Diehn, R. W. Cho, M. F. Clarke. (2009). Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Seminars in radiation oncology*, **19**(2):78-86.
- 82 M. Diehn, R. W. Cho, N. A. Lobo, T. Kalisky, M. J. Dorie, A. N. Kulp, D. Qian, J. S. Lam, L. E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M. J. Kaplan, I. Wapnir, F. M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S. K. Lau, S. R. Quake, J. M. Brown, I. L. Weissman, M. F. Clarke. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, **458**(7239):780-783.
- 83 S. Din, M. Mason, M. Volkens, B. Johnson, C. T. Cottage, Z. Wang, A. Y. Joyo, P. Quijada, P. Erhardt, N. S. Magnuson, M. H. Konstandin, M. A. Sussman. (2013). Pim-1 preserves mitochondrial morphology by inhibiting dynamin-related protein 1 translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(15):5969-5974.
- 84 A. C. Diserens, N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A. C. Gaide, J. F. Schnegg, S. Carrel. (1981). Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta neuropathologica*, **53**(1):21-28.
- 85 J. Domen, N. M. van der Lugt, D. Acton, P. W. Laird, K. Linders, A. Berns. (1993). Pim-1 levels determine the size of early B lymphoid compartments in bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, **178**(5):1665-1673.

- 86 J. Dzwonek, G. M. Wilczynski. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**:175:1-9.
- 87 S. K. Eerola, N. M. Santio, S. Rinne, P. Kouvonen, G. L. Corthals, M. Scaravilli, G. Scala, A. Serra, D. Greco, P. Ruusuvaori, L. Latonen, E. M. Rainio, T. Visakorpi, P. J. Koskinen. (2019). Phosphorylation of NFATC1 at PIM1 target sites is essential for its ability to promote prostate cancer cell migration and invasion. *Cell communication and signaling: CCS*, **17**(1):148:1-16.
- 88 A. Eichmann, L. Yuan, C. Breant, K. Alitalo, P. J. Koskinen. (2000). Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene*, **19**(9):1215-1224.
- 89 X. Fan, L. Khaki, T. S. Zhu, M. E. Soules, C. E. Talsma, N. Gul, C. Koh, J. Zhang, Y. M. Li, J. Maciaczyk, G. Nikkhah, F. Dimeco, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, C. G. Eberhart. (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **28**(1):5-16.
- 90 J. D. Feldman, L. Vician, M. Crispino, G. Tocco, M. Baudry, H. R. Herschman. (1998). Seizure activity induces PIM-1 expression in brain. *Journal of neuroscience research*, **53**(4):502-509.
- 91 J. Feng, L. Tang. (2014). SPARC in Tumor Pathophysiology and as a Potential Therapeutic Target. *Current pharmaceutical design*, **20**(39):6182-6190.
- 92 L. Fischer. "Proteinbestimmungen" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:35-46.
- 93 J. M. Flaman, T. Frebourg, V. Moreau, F. Charbonnier, C. Martin, P. Chappuis, A. P. Sappino, I. M. Limacher, L. Bron, J. Benhattar, M. Tada, E. G. van Meir, A. Estreicher, R. D. Iggo. (1995). A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(9):3963-3967.
- 94 K. Frederiksen, R. D. McKay. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **8**(4):1144-1151.
- 95 M. D. Friedman, D. S. Jeevan, M. Tobias, R. Murali, M. Jhanwar-Uniyal. (2013). Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-trans retinoic acid. *Oncology reports*, **30**(4):1645-1650.

- 96 G. N. Fuller, S. H. Bigner. (1992). Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutation research*, **276**(3):299-306.
- 97 R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, A. Vescovi. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research*, **64**(19):7011-7021.
- 98 G. L. Gallia, B. M. Tyler, C. L. Hann, I. M. Siu, V. L. Giranda, A. L. Vescovi, H. Brem, G. J. Riggins. (2009). Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Molecular cancer therapeutics*, **8**(2):386-393.
- 99 H. K. Gan, A. H. Kaye, R. B. Luwor. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, **16**(6):748-754.
- 100 J. Gao, H. R. Li, C. Jin, J. H. Jiang, J. Y. Ding. (2019). Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, **21**(10):1287-1301.
- 101 L. Garros-Regulez, I. Garcia, E. Carrasco-Garcia, A. Lantero, P. Aldaz, L. Moreno-Cugnon, O. Arrizabalaga, J. Undabeitia, S. Torres-Bayona, J. Villanua, I. Ruiz, L. Egana, N. Sampron, A. Matheu. (2016). Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Frontiers in oncology*, **6**:222:1-7.
- 102 S. I. Gharbi, M. J. Zvelebil, S. J. Shuttleworth, T. Hancox, N. Saghir, J. F. Timms, M. D. Waterfield. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal*, **404**(1):15-21.
- 103 M. R. Gilbert, J. J. Dignam, T. S. Armstrong, J. S. Wefel, D. T. Blumenthal, M. A. Vogelbaum, H. Colman, A. Chakravarti, S. Pugh, M. Won, R. Jeraj, P. D. Brown, K. A. Jaeckle, D. Schiff, V. W. Stieber, D. G. Brachman, M. Werner-Wasik, I. W. Tremont-Lukats, E. P. Sulman, K. D. Aldape, W. J. Curran, Jr., M. P. Mehta. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine*, **370**(8):699-708.
- 104 R. J. Gilbertson, D. H. Gutmann. (2007). Tumorigenesis in the brain: location, location, location. *Cancer research*, **67**(12):5579-5582.
- 105 N. Goffart, J. Kroonen, B. Rogister. (2013). Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers*, **5**(3):1049-1071.

- 106 L. Goldberg, M. R. Tijssen, Y. Birger, R. L. Hannah, S. J. Kinston, J. Schutte, D. Beck, K. Knezevic, G. Schiby, J. Jacob-Hirsch, A. Biran, Y. Kloog, G. Marcucci, C. D. Bloomfield, P. D. Aplan, J. E. Pimanda, B. Gottgens, S. Izraeli. (2013). Genome-scale expression and transcription factor binding profiles reveal therapeutic targets in transgenic ERG myeloid leukemia. *Blood*, **122**(15):2694-2703.
- 107 W. A. Golembieski, S. L. Thomas, C. R. Schultz, C. K. Yunker, H. M. McClung, N. Lemke, S. Cazacu, T. Barker, E. H. Sage, C. Brodie, S. A. Rempel. (2008). HSP27 mediates SPARC-induced changes in glioma morphology, migration, and invasion. *Glia*, **56**(10):1061-1075.
- 108 G. Gopisetty, J. Xu, D. Sampath, H. Colman, V. K. Pudevalli. (2013). Epigenetic regulation of CD133/PROM1 expression in glioma stem cells by Sp1/myc and promoter methylation. *Oncogene*, **32**(26):3119-3129.
- 109 A. Görg, R. Westermeier. "Elektrophoretische Verfahren" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:235-268.
- 110 V. Graham, J. Khudyakov, P. Ellis, L. Pevny. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, **39**(5):749-765.
- 111 A. Gritti, P. Frölichsthal-Schoeller, R. Galli, E. A. Parati, L. Cova, S. F. Pagano, C. R. Bjornson, A. L. Vescovi. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**(9):3287-3297.
- 112 A. Gritti, E. A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D. J. Morassutti, F. Roisen, D. D. Nickel, A. L. Vescovi. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**(3):1091-1100.
- 113 R. Grundler, L. Brault, C. Gasser, A. N. Bullock, T. Dechow, S. Woetzel, V. Pogacic, A. Villa, S. Ehret, G. Berridge, A. Spoo, C. Dierks, A. Biondi, S. Knapp, J. Duyster, J. Schwaller. (2009). Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *The Journal of experimental medicine*, **206**(9):1957-1970.
- 114 J. J. Gu, Z. Wang, R. Reeves, N. S. Magnuson. (2009). PIM1 phosphorylates and negatively regulates ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, **28**(48):4261-4271.

- 115 D. B. Gursel, R. T. Beyene, C. Hofstetter, J. P. Greenfield, M. M. Souweidane, M. Kaplitt, M. Arango-Lievano, B. Howard, J. A. Boockvar. (2011). Optimization of glioblastoma multiforme stem cell isolation, transfection, and transduction. *Journal of neuro-oncology*, **104**(2):509-522.
- 116 S. Ha, N. J. Iqbal, P. Mita, R. Ruoff, W. L. Gerald, H. Lepor, S. S. Taneja, P. Lee, J. Melamed, M. J. Garabedian, S. K. Logan. (2013). Phosphorylation of the androgen receptor by PIM1 in hormone refractory prostate cancer. *Oncogene*, **32**(34):3992-4000.
- 117 D. Hagerstrand, X. He, M. Bradic Lindh, S. Hoefs, G. Hesselager, A. Ostman, M. Nister. (2011). Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro-oncology*, **13**(11):1178-1191.
- 118 D. Hanahan, R. A. Weinberg. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**(1):57-70.
- 119 D. Hanahan, R. A. Weinberg. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5):646-674.
- 120 P. Hau, R. Stupp, M. E. Hegi. (2007). MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Disease markers*, **23**(1-2):97-104.
- 121 M. E. Hegi, P. Rajakannu, M. Weller. (2012). Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Current opinion in neurology*, **25**(6):774-779.
- 122 M. Heidenreich, F. Zhang. (2016). Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, **17**(1):36-44.
- 123 H. D. Hemmati, I. Nakano, J. A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D. H. Geschwind, M. Bronner-Fraser, H. I. Kornblum. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(25):15178-15183.
- 124 S. Herzog, M. A. Fink, K. Weitmann, C. Friedel, S. Hadlich, S. Langner, K. Kindermann, T. Holm, A. Bohm, E. Eskilsson, H. Miletic, M. Hildner, M. Fritsch, S. Vogelgesang, C. Havemann, C. A. Ritter, H. E. Meyer zu Schwabedissen, B. Rauch, W. Hoffmann, H. K. Kroemer, H. Schroeder, S. Bien-Moller. (2015). Pim1 kinase is upregulated in glioblastoma multiforme and mediates tumor cell survival. *Neuro-oncology*, **17**(2):223-242.
- 125 T. Hide, K. Makino, H. Nakamura, S. Yano, S. Anai, T. Takezaki, J. Kuroda, N. Shinojima, Y. Ueda, J. Kuratsu. (2013). New treatment strategies to eradicate cancer stem cells and niches in glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*, **53**(11):764-772.

- 126 F. Hille, E. Charpentier. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **371**(1707):1-12.
- 127 F. Hille, H. Richter, S. P. Wong, M. Bratovič, S. Ressel, E. Charpentier. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, **172**(6):1239-1259.
- 128 C. Hogan, C. Hutchison, L. Marcar, D. Milne, M. Saville, J. Goodlad, N. Kernohan, D. Meek. (2008). Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma. *The Journal of biological chemistry*, **283**(26):18012-18023.
- 129 S. L. Holder, S. A. Abdulkadir. (2014). PIM1 kinase as a target in prostate cancer: roles in tumorigenesis, castration resistance, and docetaxel resistance. *Current cancer drug targets*, **14**(2):105-114.
- 130 S. Holder, M. Zemskova, C. Zhang, M. Tabrizizad, R. Bremer, J. W. Neidigh, M. B. Lilly. (2007). Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase. *Molecular cancer therapeutics*, **6**(1):163-172.
- 131 D. S. Hoover, D. G. Wingett, J. Zhang, R. Reeves, N. S. Magnuson. (1997). Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, **8**(12):1371-1380.
- 132 X. F. Hu, J. Li, S. Vandervalk, Z. Wang, N. S. Magnuson, P. X. Xing. (2009). PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *The Journal of clinical investigation*, **119**(2):362-375.
- 133 Y. L. Hu, E. Passegue, S. Fong, C. Largman, H. J. Lawrence. (2007). Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood*, **109**(11):4732-4738.
- 134 W. J. Huss, D. R. Gray, N. M. Greenberg, J. L. Mohler, G. J. Smith. (2005). Breast cancer resistance protein-mediated efflux of androgen in putative benign and malignant prostate stem cells. *Cancer research*, **65**(15):6640-6650.
- 135 C. L. Hyder, G. Lazaro, J. W. Pylvänäinen, M. W. Roberts, S. M. Qvarnström, J. E. Eriksson. (2014). Nestin regulates prostate cancer cell invasion by influencing the localisation and functions of FAK and integrins. *Journal of cell science*, **127**(Pt 10):2161-2173.

- 136 T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis, D. A. Steindler. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, **39**(3):193-206.
- 137 H. Ikushima, T. Todo, Y. Ino, M. Takahashi, K. Miyazawa, K. Miyazono. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell stem cell*, **5**(5):504-514.
- 138 H. Ikushima, T. Todo, Y. Ino, M. Takahashi, N. Saito, K. Miyazawa, K. Miyazono. (2011). Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *The Journal of biological chemistry*, **286**(48):41434-41441.
- 139 Y. Ishibashi, H. Maita, M. Yano, N. Koike, K. Tamai, H. Ariga, S. M. Iguchi-Ariga. (2001). Pim-1 translocates sorting nexin 6/TRAF4-associated factor 2 from cytoplasm to nucleus. *FEBS letters*, **506**(1):33-38.
- 140 N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. C. Diserens, E. G. Van Meir. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **9**(3):469-479.
- 141 Y. Ishino, M. Krupovic, P. Forterre. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology*, **200**(7):e00580-17:1-17.
- 142 Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, **169**(12):5429-5433.
- 143 M. D. Jacobs, J. Black, O. Futer, L. Swenson, B. Hare, M. Fleming, K. Saxena. (2005). Pim-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. *The Journal of biological chemistry*, **280**(14):13728-13734.
- 144 R. K. Jain, E. di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen, T. T. Batchelor. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**(8):610-622.
- 145 M. Jhanwar-Uniyal, L. Albert, E. McKenna, M. Karsy, P. Rajdev, A. Braun, R. Murali. (2011). Deciphering the signaling pathways of cancer stem cells of glioblastoma multiforme: role of Akt/mTOR and MAPK pathways. *Advances in enzyme regulation*, **51**(1):164-170.

- 146 M. Jhanwar-Uniyal, M. Labagnara, M. Friedman, A. Kwasnicki, R. Murali. (2015). Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers*, **7**(2):538-555.
- 147 M. Jijiwa, H. Demir, S. Gupta, C. Leung, K. Joshi, N. Orozco, T. Huang, V. O. Yildiz, I. Shibahara, J. A. de Jesus, W. H. Yong, P. S. Mischel, S. Fernandez, H. I. Kornblum, I. Nakano. (2011). CD44v6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway. *PloS one*, **6**(9):e24217:1-12.
- 148 M. P. Jiménez-García, A. Lucena-Cacace, M. J. Robles-Frías, I. Ferrer, M. Narlik-Grassow, C. Blanco-Aparicio, A. Carnero. (2017). Inflammation and stem markers association to PIM1/PIM2 kinase-induced tumors in breast and uterus. *Oncotarget*, **8**(35):58872-58886.
- 149 Y. Jin, Z. Q. Bin, H. Qiang, C. Liang, C. Hua, D. Jun, W. A. Dong, L. Qing. (2009). ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **135**(10):1369-1376.
- 150 M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, **337**(6096):816-821.
- 151 M. Jurk. "Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:633-651.
- 152 Y. Katsuno, S. Lamouille, R. Derynck. (2013). TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression *Current opinion in oncology*, **25**(1):76-84.
- 153 C. Kessler. "Hybridisierung und Nachweistechiken" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:701-741.
- 154 C. Kessler, "Polymerasekettenreaktion" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:743-775.
- 155 G. Kim, Y. T. Ko. (2020). Small molecule tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma. *Archives of pharmacal research*, **43**(4):385-394.

- 156 J. B. Kim, H. Zaehres, G. Wu, L. Gentile, K. Ko, V. Sebastiano, M. J. Arauzo-Bravo, D. Ruau, D. W. Han, M. Zenke, H. R. Scholer. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, **454**(7204):646-650.
- 157 W. Kleeberger, G. S. Bova, M. E. Nielsen, M. Herawi, A. Y. Chuang, J. I. Epstein, D. M. Berman. (2007). Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer research*, **67**(19):9199-9206.
- 158 H. P. Koefler, D. W. Golde. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*, **56**(3):344-350.
- 159 N. Koike, H. Maita, T. Taira, H. Ariga, S. M. Iguchi-Ariga. (2000). Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS letters*, **467**(1):17-21.
- 160 T. Kondo, M. Raff. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, **289**(5485):1754-1757.
- 161 U. Konietzko, G. Kauselmann, J. Scafidi, U. Staubli, H. Mikkers, A. Berns, M. Schweizer, R. Waltereit, D. Kuhl. (1999). Pim kinase expression is induced by LTP stimulation and required for the consolidation of enduring LTP. *The EMBO journal*, **18**(12):3359-3369.
- 162 N. Krishnan, H. Pan, D. J. Buckley, A. Buckley. (2003). Prolactin-regulated pim-1 transcription: identification of critical promoter elements and Akt signaling. *Endocrine*, **20**(1-2):123-130.
- 163 A. E. Kudinov, J. Karanicolas, E. A. Golemis, Y. Boumber. (2017). Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **23**(9):2143-2153.
- 164 D. Kumar, S. Kumar, M. Gorain, D. Tomar, H. S. Patil, N. N. V. Radharani, T. V. S. Kumar, T. V. Patil, H. V. Thulasiram, G. C. Kundu. (2016). Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133(+) Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. *The Journal of investigative dermatology*, **136**(12):2462-2474.
- 165 S. Kunigal, C. S. Gondi, M. Gujrati, S. S. Lakka, D. H. Dinh, W. C. Olivero, J. S. Rao. (2006). SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. *International journal of oncology*, **29**(6):1349-1357.

- 166 U. K. Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259):680-685.
- 167 P. W. Laird, N. M. van der Lugt, A. Clarke, J. Domen, K. Linders, J. McWhir, A. Berns, M. Hooper. (1993). In vivo analysis of Pim-1 deficiency. *Nucleic acids research*, **21**(20):4750-4755.
- 168 T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, J. E. Dick. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**(6464):645-648.
- 169 M. Laplante, D. M. Sabatini. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*, **122**(Pt 20):3589-3594.
- 170 J. D. Lathia, S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. Valentim, J. N. Rich. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & development*, **29**(12):1203-1217.
- 171 E. Q. Lee, J. Kuhn, K. R. Lamborn, L. Abrey, L. M. DeAngelis, F. Lieberman, H. I. Robins, S. M. Chang, W. K. Yung, J. Drappatz, M. P. Mehta, V. A. Levin, K. Aldape, J. E. Dancey, J. J. Wright, M. D. Prados, T. F. Cloughesy, M. R. Gilbert, P. Y. Wen. (2012). Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro-oncology*, **14**(12):1511-1518.
- 172 E. Q. Lee, V. K. Puduvalli, J. M. Reid, J. G. Kuhn, K. R. Lamborn, T. F. Cloughesy, S. M. Chang, J. Drappatz, W. K. Yung, M. R. Gilbert, H. I. Robins, F. S. Lieberman, A. B. Lassman, R. M. McGovern, J. Xu, S. Desideri, X. Ye, M. M. Ames, I. Espinoza-Delgado, M. D. Prados, P. Y. Wen. (2012). Phase I study of vorinostat in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 04-03. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **18**(21):6032-6039.
- 173 H. Lee, I. N. Basso, D. D. H. Kim. (2021). Target spectrum of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *International journal of hematology*, **113**(5):632-641.
- 174 J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N. M. Donin, S. Pastorino, B. W. Purow, N. Christopher, W. Zhang, J. K. Park, H. A. Fine. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell*, **9**(5):391-403.

- 175 U. Lendahl, L. B. Zimmerman, R. D. McKay. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, **60**(4):585-595.
- 176 C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**(6712):643-649.
- 177 J. D. Levenson, P. J. Koskinen, F. C. Orrico, E. M. Rainio, K. J. Jalkanen, A. B. Dash, R. N. Eisenman, S. A. Ness. (1998). Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Molecular cell*, **2**(4):417-425.
- 178 C. Li, D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke, D. M. Simeone. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, **67**(3):1030-1037.
- 179 Y. Li, A. Li, M. Glas, B. Lal, M. Ying, Y. Sang, S. Xia, D. Trageser, H. Guerrero-Cazares, C. G. Eberhart, A. Quinones-Hinojosa, B. Scheffler, J. Lathia. (2011). c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(24):9951-9956.
- 180 Y. Liang, Z. Zhong, Y. Huang, W. Deng, J. Cao, G. Tsao, Q. Liu, D. Pei, T. Kang, Y. X. Zeng. (2010). Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, **285**(7):4931-4940.
- 181 F. Lin, P. Lin, D. Zhao, Y. Chen, L. Xiao, W. Qin, D. Li, H. Chen, B. Zhao, H. Zou, X. Zheng, X. Yu. (2012). Sox2 targets cyclinE, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell proliferation*, **45**(3):207-216.
- 182 J. C. Lin, J. T. Tsai, T. Y. Chao, H. I. Ma, W. H. Liu. (2019). Musashi-1 Enhances Glioblastoma Migration by Promoting ICAM1 Translation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **21**(5):459-468.
- 183 D. E. Linn, X. Yang, Y. Xie, A. Alfano, D. Deshmukh, X. Wang, H. Shimelis, H. Chen, W. Li, K. Xu, M. Chen, Y. Qiu. (2012). Differential regulation of androgen receptor by PIM-1 kinases via phosphorylation-dependent recruitment of distinct ubiquitin E3 ligases. *The Journal of biological chemistry*, **287**(27):22959-22968.
- 184 C. Liu, Y. Li, Y. Xing, B. Cao, F. Yang, T. Yang, Z. Ai, Y. Wei, J. Jiang. (2016). The Interaction between Cancer Stem Cell Marker CD133 and Src Protein Promotes Focal Adhesion Kinase (FAK) Phosphorylation and Cell Migration. *The Journal of biological chemistry*, **291**(30):15540-15550.

- 185 G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, J. S. Yu. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer*, **5**:67:1-12.
- 186 H. Liu, C. Chen, D. Ma, Y. Li, Q. Yin, Q. Li, C. Xiang. (2020). Inhibition of PIM1 attenuates the stem cell-like traits of breast cancer cells by promoting RUNX3 nuclear retention. *Journal of cellular and molecular medicine*, **24**(11):6308-6323.
- 187 K. Liu, B. Lin, M. Zhao, X. Yang, M. Chen, A. Gao, F. Liu, J. Que, X. Lan. (2013). The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular signalling*, **25**(5):1264-1271.
- 188 Q. Liu, D. H. Nguyen, Q. Dong, P. Shitaku, K. Chung, O. Y. Liu, J. L. Tso, J. Y. Liu, V. Konkankit, T. F. Cloughesy, P. S. Mischel, T. F. Lane, L. M. Liau, S. F. Nelson, C. L. Tso. (2009). Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *Journal of neuro-oncology*, **94**(1):1-19.
- 189 X. Y. Liu, N. Gerges, A. Korshunov, N. Sabha, D. A. Khuong-Quang, A. M. Fontebasso, A. Fleming, D. Hadjadj, J. Schwartzentruber, J. Majewski, Z. Dong, P. Siegel, S. Albrecht, S. Croul, D. T. Jones, M. Kool, M. Tonjes, G. Reifenberger, D. Faury, G. Zadeh, S. Pfister, N. Jabado. (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta neuropathologica*, **124**(5):615-625.
- 190 Y. Liu, S. S. Han, Y. Wu, T. M. Tuohy, H. Xue, J. Cai, S. A. Back, L. S. Sherman, I. Fischer, M. S. Rao. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Developmental biology*, **276**(1):31-46.
- 191 Z. Liu, M. Han, K. Ding, R. Fu. (2020). The role of Pim kinase in immunomodulation. *American journal of cancer research*, **10**(12):4085-4097.
- 192 C. Lois, A. Alvarez-Buylla. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(5):2074-2077.
- 193 J. A. Losman, X. P. Chen, B. Q. Vuong, S. Fay, P. B. Rothman. (2003). Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, **278**(7):4800-4805.
- 194 C. Lottaz, D. Beier, K. Meyer, P. Kumar, A. Hermann, J. Schwarz, M. Junker, P. J. Oefner, U. Bogdahn, J. Wischhusen, R. Spang, A. Storch, C. P. Beier. (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer research*, **70**(5):2030-2040.

- 195 F. Lottspeich. "Proteinreinigung" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:13-33.
- 196 D. N. Louis, K. D. Aldape, D. Capper, C. Giannini, C. M. Horbinski, H. K. Ng, A. Perry, G. Reifenberger, C. Sarkar, R. Soffietti, M. L. Suvà, W. Wick. "Glioblastoma, IDH-wildtype" in *WHO Classification of Tumours: Central Nervous System Tumours*, edited by The WHO Classification of Tumours Editorial Board (Expert members: D. J. Brat, D. W. Ellison, D. Figarella-Branger, C. E. Hawkins, D. N. Louis, H. K. Ng, A. Perry, S. M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffietti, A. von Deimling, P. Wesseling) [IARC editors: I. A. Cree, D. Lokuhetty, L. A. N. Peferoen, V. A. White] (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2021), 5. Auflage:39-55.
- 197 D. N. Louis, D. J. Brat, D. W. Ellison, D. Figarella-Branger, C. E. Hawkins, A. Perry, S. M. Pfister, G. Reifenberger, A. von Deimling. "Gliomas, glioneuronal tumours, and neuronal tumours: Introduction" in *WHO Classification of Tumours: Central Nervous System Tumours*, edited by The WHO Classification of Tumours Editorial Board (Expert members: D. J. Brat, D. W. Ellison, D. Figarella-Branger, C. E. Hawkins, D. N. Louis, H. K. Ng, A. Perry, S. M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffietti, A. von Deimling, P. Wesseling) [IARC editors: I. A. Cree, D. Lokuhetty, L. A. N. Peferoen, V. A. White] (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2021), 5. Auflage:16-18.
- 198 D. N. Louis, D. J. Brat, H. Ohgaki, R. Stupp, M. L. Suvà, W. Biernat, W. K. Cavenee, C. Hawkins, P. C. Burger, D. D. Bigner, W. Wick, R. G. W. Verhaak, A. Perry, Y. Nakazato, J. Barnholtz-Sloan, D. W. Ellison, P. Kleihues, K. H. Plate, M. K. Rosenblum, A. von Deimling, K. D. Aldape, F. Giangaspero und M. Hegi. "Glioblastoma, IDH-wildtype" in *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, edited by D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee [series editors: F. T. Bosman, E. S. Jaffe, S. R. Lakhani, H. Ohgaki] (WHO Press, Lyon, 2016), 4. überarbeitete Auflage:28-45.
- 199 D. N. Louis, H. Ohgaki, G. Reifenberger, P. Kleihues, H. Yan, A. von Deimling, M. Weller. "Glioblastoma, IDH mutant" in *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, edited by D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee [series editors: F. T. Bosman, E. S. Jaffe, S. R. Lakhani, H. Ohgaki] (WHO Press, Lyon, 2016), 4. überarbeitete Auflage:52-56.
- 200 E. L. Lund, M. Spang-Thomsen, H. Skovgaard-Poulsen, P. E. Kristjansen. (1998). Tumor angiogenesis--a new therapeutic target in gliomas. *Acta neurologica Scandinavica*, **97**(1):52-62.

- 201 J. Ma, H. K. Arnold, M. B. Lilly, R. C. Sears, A. S. Kraft. (2007). Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56beta subunit of PP2A. *Oncogene*, **26**(35):5145-5153.
- 202 Y. Ma, H. L. Fu, Z. Wang, H. Huang, J. Ni, J. Song, Y. Xia, W. L. Jin, D. X. Cui. (2017). USP22 maintains gastric cancer stem cell stemness and promotes gastric cancer progression by stabilizing BMI1 protein. *Oncotarget*, **8**(20):33329-33342.
- 203 Y. Ma, L. Zhang, X. Huang. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS journal*, **281**(23):5186-5193.
- 204 V. Magistroni, L. Mologni, S. Sanselicio, J. F. Reid, S. Redaelli, R. Piazza, M. Viltadi, G. Bovo, G. Strada, M. Grasso, M. Gariboldi, C. Gambacorti-Passerini. (2011). ERG deregulation induces PIM1 over-expression and aneuploidy in prostate epithelial cells. *PloS one*, **6**(11):e28162:1-9.
- 205 M. Malinen, T. Jääskeläinen, M. Pelkonen, S. Heikkinen, S. Väisänen, V. M. Kosma, K. Nieminen, A. Mannermaa, J. J. Palvimo. (2013). Proto-oncogene PIM-1 is a novel estrogen receptor target associating with high grade breast tumors. *Molecular and cellular endocrinology*, **365**(2):270-276.
- 206 T. A. Martin, G. Harrison, R. E. Mansel, W. G. Jiang. (2003). The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical reviews in oncology/hematology*, **46**(2):165-186.
- 207 K. Masui, T. F. Cloughesy, P. S. Mischel. (2012). Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathology and applied neurobiology*, **38**(3):271-291.
- 208 H. M. McClung, S. L. Thomas, P. Osenkowski, M. Toth, P. Menon, A. Raz, R. Fridman, S. A. Rempel. (2007). SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neuroscience letters*, **419**(2):172-177.
- 209 T. C. Meeker, L. Nagarajan, A. ar-Rushdi, C. M. Croce. (1987). Cloning and characterization of the human PIM-1 gene: a putative oncogene related to the protein kinases. *Journal of cellular biochemistry*, **35**(2):105-112.
- 210 A. L. Merkel, E. Meggers, M. Ocker. (2012). PIM1 kinase as a target for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, **21**(4):425-436.
- 211 H. Mikkers, M. Nawijn, J. Allen, C. Brouwers, E. Verhoeven, J. Jonkers, A. Berns. (2004). Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Molecular and cellular biology*, **24**(13):6104-6115.

- 212 S. Miraglia, W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller, D. W. Buck. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, **90**(12):5013-5021.
- 213 K. Mizuno, T. Shirogane, A. Shinohara, A. Iwamatsu, M. Hibi, T. Hirano. (2001). Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochemical and biophysical research communications*, **281**(3):663-669.
- 214 T. Mochizuki, C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Muramatsu, A. Asai, Y. Kuchino. (1999). Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, **274**(26):18659-18666.
- 215 S. Mohsin, M. Khan, J. Nguyen, M. Alkatib, S. Siddiqi, N. Hariharan, K. Wallach, M. Monsanto, N. Gude, W. Dembitsky, M. A. Sussman. (2013). Rejuvenation of human cardiac progenitor cells with Pim-1 kinase. *Circulation research*, **113**(10):1169-1179.
- 216 J. R. Molina, Y. Hayashi, C. Stephens, M. M. Georgescu. (2010). Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **12**(6):453-463.
- 217 S. H. Moon, D. K. Kim, Y. Cha, I. Jeon, J. Song, K. S. Park. (2013). PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line. *International journal of oncology*, **42**(3):921-928.
- 218 D. Morishita, R. Katayama, K. Sekimizu, T. Tsuruo, N. Fujita. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer research*, **68**(13):5076-5085.
- 219 C. Mülhardt. "Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)" in *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, edited by C. Mülhardt (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2013), 7., aktualisierte Auflage:81-114.
- 220 J. Muto, T. Imai, D. Ogawa, Y. Nishimoto, Y. Okada, Y. Mabuchi, T. Kawase, A. Iwanami, P. S. Mischel, H. Saya, K. Yoshida, Y. Matsuzaki, H. Okano. (2012). RNA-binding protein Musashi 1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways. *PloS one*, **7**(3):e33431:1-14.
- 221 N. Mutter, R. Stupp. (2006). Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? *Expert review of anticancer therapy*, **6**(8):1187-1204.

- 222 M. Nakada, E. Nambu, N. Furuyama, Y. Yoshida, T. Takino, Y. Hayashi, H. Sato, Y. Sai, T. Tsuji, K. I. Miyamoto, A. Hirao, J. I. Hamada. (2013). Integrin  $\alpha 3$  is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *British journal of cancer*, **108**(12):2516-2524.
- 223 M. Narlik-Grassow, C. Blanco-Aparicio, A. Carnero. (2014). The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. *Medicinal research reviews*, **34**(1):136-159.
- 224 A. C. Newton. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, **270**(48):28495-28498.
- 225 A. C. Newton. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology*, **9**(2):161-167.
- 226 S. Nobusawa, T. Watanabe, P. Kleihues, H. Ohgaki. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**(19):6002-6007.
- 227 D. Novak, L. Hüser, J. J. Elton, V. Umansky, P. Altevogt, J. Utikal. (2020). SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in cancer biology*, **67**(Pt 1):74-82.
- 228 M. C. Nunes, N. S. Roy, H. M. Keyoung, R. R. Goodman, G. McKhann, 2nd, L. Jiang, J. Kang, M. Nedergaard, S. A. Goldman. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nature medicine*, **9**(4):439-447.
- 229 H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schüler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lütolf, P. Kleihues. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*, **64**(19):6892-6899.
- 230 H. Ohgaki, P. Kleihues. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, **170**(5):1445-1453.
- 231 M. Osswald, E. Jung, F. Sahm, G. Solecki, V. Venkataramani, J. Blaes, S. Weil, H. Horstmann, B. Wiestler, M. Syed, L. Huang, M. Ratliff, K. Karimian Jazi, F. T. Kurz, T. Schmenger, D. Lemke, M. Gömmel, M. Pauli, Y. Liao, P. Häring, S. Pusch, V. Herl, C. Steinhäuser, D. Kronic, M. Jarahian, H. Miletic, A. S. Berghoff, O. Griesbeck, G. Kalamakis, O. Garaschuk, M. Preusser, S. Weiss, H. Liu, S. Heiland, M. Platten, P. E. Huber, T. Kuner, A. von Deimling, W. Wick, F. Winkler. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, **528**(7580):93-98.

- 232 Q. T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, T. Vecchione-Koval, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J. S. Barnholtz-Sloan. (2017). CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro-oncology*, **19**(suppl\_5):v1-v88.
- 233 P. C. Pan, R. S. Magge. (2020). Mechanisms of EGFR Resistance in Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, **21**(22):1-21.
- 234 W. Pang, X. Tian, F. Bai, R. Han, J. Wang, H. Shen, X. Zhang, Y. Liu, X. Yan, F. Jiang, L. Xing. (2014). Pim-1 kinase is a target of miR-486-5p and eukaryotic translation initiation factor 4E, and plays a critical role in lung cancer. *Molecular cancer*, **13**:240:1-15.
- 235 D. M. Park, J. N. Rich. (2009). Biology of glioma cancer stem cells. *Molecules and cells*, **28**(1):7-12.
- 236 D. Park, A. P. Xiang, F. F. Mao, L. Zhang, C. G. Di, X. M. Liu, Y. Shao, B. F. Ma, J. H. Lee, K. S. Ha, N. Walton, B. T. Lahn. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **28**(12):2162-2171.
- 237 E. K. Park, J. C. Lee, J. W. Park, S. Y. Bang, S. A. Yi, B. K. Kim, J. H. Park, S. H. Kwon, J. S. You, S. W. Nam, E. J. Cho, J. W. Han. (2015). Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell death & disease*, **6**(11):e1964:1-12.
- 238 V. Patil, J. Pal, K. Somasundaram. (2015). Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget*, **6**(41):43452-43471.
- 239 W. Paulus, M. Hasselblatt. "Glioblastom" in *Pathologie: Neuropathologie*, edited by W. Paulus, J. M. Schröder (Bandherausgeber) und G. Klöppel, H. H. Kreipe, W. Remmele (Werkherausgeber) (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2012), 3. neubearbeitete Auflage:504-505.
- 240 K. Peltola, M. Hollmen, S. M. Maula, E. Rainio, R. Ristamäki, M. Luukkaa, J. Sandholm, M. Sundvall, K. Elenius, P. J. Koskinen, R. Grenman, S. Jalkanen. (2009). Pim-1 kinase expression predicts radiation response in squamocellular carcinoma of head and neck and is under the control of epidermal growth factor receptor. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **11**(7):629-636.
- 241 K. J. Peltola, K. Pauku, T. L. Aho, M. Ruuska, O. Silvennoinen, P. J. Koskinen. (2004). Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*, **103**(10):3744-3750.

- 242 C. Y. Peng, P. R. Graves, S. Ogg, R. S. Thoma, M. J. Byrnes, 3rd, Z. Wu, M. T. Stephenson, H. Piwnica-Worms. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, **9**(3):197-208.
- 243 A. Pietras, A. M. Katz, E. J. Ekstrom, B. Wee, J. J. Halliday, K. L. Pitter, J. L. Werbeck, N. M. Amankulor, J. T. Huse, E. C. Holland. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell stem cell*, **14**(3):357-369.
- 244 H. Ponta, L. Sherman, P. A. Herrlich. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **4**(1):33-45.
- 245 M. W. Poon, J. T. Zhuang, S. T. Wong, S. Sun, X. Q. Zhang, G. K. Leung. (2015). Co-expression of Cytoskeletal Protein Adducin 3 and CD133 in Neurospheres and a Temozolomide-resistant Subclone of Glioblastoma. *Anticancer research*, **35**(12):6487-6495.
- 246 R. Pötschke, J. Haase, M. Glaß, S. Simmermacher, C. Misiak, L. O. F. Penalva, C. D. Kühnöl, S. Hüttelmaier. (2020). MSI1 Promotes the Expression of the GBM Stem Cell Marker CD44 by Impairing miRNA-Dependent Degradation. *Cancers*, **12**(12):1-18.
- 247 C. S. Potten, M. Loeffler. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*, **110**(4):1001-1020.
- 248 M. Rahman, L. Deleyrolle, V. Vedam-Mai, H. Azari, M. Abd-El-Barr, B. A. Reynolds. (2011). The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery*, **68**(2):531-545; discussion 545.
- 249 E. M. Rainio, J. Sandholm, P. J. Koskinen. (2002). Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **168**(4):1524-1527.
- 250 F. A. Ran, P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang, F. Zhang. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**(6):1380-1389.
- 251 M. Rasper, A. Schafer, G. Piontek, J. Teufel, G. Brockhoff, F. Ringel, S. Heindl, C. Zimmer, J. Schlegel. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro-oncology*, **12**(10):1024-1033.

- 252 S. Ray, M. M. Bonafede, N. A. Mohile. (2014). Treatment Patterns, Survival, and Healthcare Costs of Patients with Malignant Gliomas in a Large US Commercially Insured Population. *American health & drug benefits*, **7**(3):140-149.
- 253 H. Rehm, T. Letzel. "BCA-Test" in *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, edited by H. Rehm, T. Letzel (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010), 6. Auflage:2-4.
- 254 J. Remy, B. Linder, U. Weirauch, J. Konovalova, R. Marschalek, A. Aigner, D. Kogel. (2019). Inhibition of PIM1 blocks the autophagic flux to sensitize glioblastoma cells to ABT-737-induced apoptosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, **1866**(2):175-189.
- 255 T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414**(6859):105-111.
- 256 B. A. Reynolds, R. L. Rietze. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nature methods*, **2**(5):333-336.
- 257 B. A. Reynolds, A. L. Vescovi. (2009). Brain cancer stem cells: Think twice before going flat. *Cell stem cell*, **5**(5):466-467; author reply 468-469.
- 258 B. A. Reynolds, S. Weiss. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, **255**(5052):1707-1710.
- 259 B. A. Reynolds, S. Weiss. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental biology*, **175**(1):1-13.
- 260 L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, R. De Maria. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**(7123):111-115.
- 261 J. N. Rich, B. K. Rasheed, H. Yan. (2004). EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *The New England journal of medicine*, **351**(12):1260-1261; author reply 1260-1261.
- 262 P. A. Riquelme, E. Drapeau, F. Doetsch. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **363**(1489):123-137.
- 263 R. W. Robey, K. K. To, O. Polgar, M. Dohse, P. Fetsch, M. Dean, S. E. Bates. (2009). ABCG2: a perspective. *Advanced drug delivery reviews*, **61**(1):3-13.

- 264 M. Roh, B. Gary, C. Song, N. Said-Al-Naief, A. Tousson, A. Kraft, I. E. Eltoum, S. A. Abdulkadir. (2003). Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer research*, **63**(23):8079-8084.
- 265 F. Rossari, F. Minutolo, E. Orciuolo. (2018). Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *Journal of hematology & oncology*, **11**(1):84:1-14.
- 266 S. Sadetzki, R. Bruchim, B. Oberman, G. N. Armstrong, C. C. Lau, E. B. Claus, J. S. Barnholtz-Sloan, D. Il'yasova, J. Schildkraut, C. Johansen, R. S. Houlston, S. Shete, C. I. Amos, J. L. Bernstein, S. H. Olson, R. B. Jenkins, D. Lachance, N. A. Vick, R. Merrell, M. Wrench, F. G. Davis, B. J. McCarthy, R. Lai, B. S. Melin, M. L. Bondy. (2013). Description of selected characteristics of familial glioma patients - results from the Gliogene Consortium. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **49**(6):1335-1345.
- 267 V. Sagar, S. Caldarola, V. Aria, V. Monteleone, C. Fuoco, C. Gargioli, S. Cannata, F. Loreni. (2016). PIM1 destabilization activates a p53-dependent response to ribosomal stress in cancer cells. *Oncotarget*, **7**(17):23837-23849.
- 268 C. M. Sahlgren, A. Mikhailov, J. Hellman, Y. H. Chou, U. Lendahl, R. D. Goldman, J. E. Eriksson. (2001). Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *The Journal of biological chemistry*, **276**(19):16456-16463.
- 269 C. M. Sahlgren, A. Mikhailov, S. Vaitinen, H. M. Pallari, H. Kalimo, H. C. Pant, J. E. Eriksson. (2003). Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Molecular and cellular biology*, **23**(14):5090-5106.
- 270 C. M. Sahlgren, H. M. Pallari, T. He, Y. H. Chou, R. D. Goldman, J. E. Eriksson. (2006). A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *The EMBO journal*, **25**(20):4808-4819.
- 271 S. Sakakibara, T. Imai, K. Hamaguchi, M. Okabe, J. Aruga, K. Nakajima, D. Yasutomi, T. Nagata, Y. Kurihara, S. Uesugi, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba, H. Okano. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Developmental biology*, **176**(2):230-242.

- 272 S. Sakakibara, Y. Nakamura, T. Yoshida, S. Shibata, M. Koike, H. Takano, S. Ueda, Y. Uchiyama, T. Noda, H. Okano. (2002). RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(23):15194-15199.
- 273 S. Sakakibara, H. Okano. (1997). Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**(21):8300-8312.
- 274 N. M. Santio, S. K. Landor, L. Vahtera, J. Ylä-Pelto, E. Paloniemi, S. Y. Imanishi, G. Corthals, M. Varjosalo, G. B. Manoharan, A. Uri, U. Lendahl, C. Sahlgren, P. J. Koskinen. (2016). Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. *Oncotarget*, **7**(28):43220-43238.
- 275 N. M. Santio, M. Salmela, H. Arola, S. K. Eerola, J. Heino, E. M. Rainio, P. J. Koskinen. (2016). The PIM1 kinase promotes prostate cancer cell migration and adhesion via multiple signalling pathways. *Experimental cell research*, **342**(2):113-124.
- 276 D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, **307**(5712):1098-1101.
- 277 C. J. Saris, J. Domen, A. Berns. (1991). The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *The EMBO journal*, **10**(3):655-664.
- 278 T. Schaefer, C. Lengerke. (2020). SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene*, **39**(2):278-292.
- 279 S. Schenone, O. Bruno, M. Radi, M. Botta. (2011). New insights into small-molecule inhibitors of Bcr-Abl. *Medicinal research reviews*, **31**(1):1-41.
- 280 H. J. Scherer. (1940). A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. *Journal of neurology and psychiatry*, **3**(2):147-177.
- 281 S. Schmitz, C. Desel, "Automatische Zellzählung mit einem Zellzählgerät" in *Der Experimentator: Zellbiologie*, edited by S. Schmitz, C. Desel (Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2018, Berlin, Heidelberg 2018), 1. Auflage: 42-44.

- 282 N. Schütze. (2004). siRNA technology. *Molecular and cellular endocrinology*, **213**(2):115-119.
- 283 P. H. Schwartz, P. J. Bryant, T. J. Fuja, H. Su, D. K. O'Dowd, H. Klassen. (2003). Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *Journal of neuroscience research*, **74**(6):838-851.
- 284 J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, M. Wrensch. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice. Neurology*, **2**(9):494-503; quiz 491 p following 516.
- 285 J. A. Schwartzbaum, K. Huang, S. Lawler, B. Ding, J. Yu, E. A. Chiocca. (2010). Allergy and inflammatory transcriptome is predominantly negatively correlated with CD133 expression in glioblastoma. *Neuro-oncology*, **12**(4):320-327.
- 286 C. Seifert, E. Balz, S. Herzog, A. Korolev, S. Gaßmann, H. Paland, M. A. Fink, M. Grube, S. Marx, G. Jedlitschky, M. V. Tzvetkov, B. H. Rauch, H. W. S. Schroeder, S. Bien-Möller. (2021). PIM1 Inhibition Affects Glioblastoma Stem Cell Behavior and Kills Glioblastoma Stem-like Cells. *International journal of molecular sciences*, **22**(20):1-21.
- 287 G. Selten, H. T. Cuypers, M. Zijlstra, C. Melief, A. Berns. (1984). Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *The EMBO journal*, **3**(13):3215-3222.
- 288 N. Shah, B. Pang, K. G. Yeoh, S. Thorn, C. S. Chen, M. B. Lilly, M. Salto-Tellez. (2008). Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - a molecular and therapeutic appraisal. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, **44**(15):2144-2151.
- 289 J. W. Shay, W. E. Wright. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **1**(1):72-76.
- 290 J. W. Shay, W. E. Wright. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature reviews. Genetics*, **20**(5):299-309.
- 291 K. P. Shay, Z. Wang, P. X. Xing, I. F. McKenzie, N. S. Magnuson. (2005). Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular cancer research: MCR*, **3**(3):170-181.
- 292 N. Singh, S. K. R. Padi, J. J. Bearss, R. Pandey, K. Okumura, H. Beltran, J. H. Song, A. S. Kraft, V. Olive. (2020). PIM protein kinases regulate the level of the long noncoding RNA H19 to control stem cell gene transcription and modulate tumor growth. *Molecular oncology*, **14**(5):974-990.

- 293 S. K. Singh, I. D. Clarke, T. Hide, P. B. Dirks. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, **23**(43):7267-7273.
- 294 S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P. B. Dirks. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, **63**(18):5821-5828.
- 295 S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, P. B. Dirks. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**(7015):396-401.
- 296 M. Snuderl, L. Fazlollahi, L. P. Le, M. Nitta, B. H. Zhelyazkova, C. J. Davidson, S. Akhavanfard, D. P. Cahill, K. D. Aldape, R. A. Betensky, D. N. Louis, A. J. Iafrate. (2011). Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer cell*, **20**(6):810-817.
- 297 A. Soeda, M. Park, D. Lee, A. Mintz, A. Androutsellis-Theotokis, R. D. McKay, J. Engh, T. Iwama, T. Kunisada, A. B. Kassam, I. F. Pollack, D. M. Park. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, **28**(45):3949-3959.
- 298 J. H. Song, N. Singh, L. A. Luevano, S. K. R. Padi, K. Okumura, V. Olive, S. M. Black, N. A. Warfel, D. W. Goodrich, A. S. Kraft. (2018). Mechanisms Behind Resistance to PI3K Inhibitor Treatment Induced by the PIM Kinase. *Molecular cancer therapeutics*, **17**(12):2710-2721.
- 299 S. M. Sorscher. (2004). EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *The New England journal of medicine*, **351**(12):1260-1261; author reply 1260-1261.
- 300 W. G. Stetler-Stevenson, A. E. Yu. (2001). Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminars in cancer biology*, **11**(2):143-152.
- 301 G. S. Stoyanov, D. L. Dzhenkov. (2018). On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia medica*, **60**(1):48-66.
- 302 T. Strojnik, G. V. Rosland, P. O. Sakariassen, R. Kavalar, T. Lah. (2007). Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical neurology*, **68**(2):133-144.
- 303 W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, H. J. Reulen. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial [Abstrakt]. *The Lancet. Oncology*, **7**(5):392-401.

- 304 W. Stummer, H. J. Reulen, T. Meinel, U. Pichlmeier, W. Schumacher, J. C. Tonn, V. Rohde, F. Oppel, B. Turowski, C. Woiciechowsky, K. Franz, T. Pietsch. (2008). Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, **62**(3):564-576; discussion 564-576.
- 305 R. Stupp, M. Gander, S. Leyvraz, E. Newlands. (2001). Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *The Lancet. Oncology*, **2**(9):552-560.
- 306 R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, **352**(10):987-996.
- 307 R. Stupp, N. Pavlidis, S. Jelic. (2005). ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, **16 Suppl 1**:i64-65.
- 308 R. Stupp, S. Taillibert, A. A. Kanner, S. Kesari, D. M. Steinberg, S. A. Toms, L. P. Taylor, F. Lieberman, A. Silvani, K. L. Fink, G. H. Barnett, J. J. Zhu, J. W. Henson, H. H. Engelhard, T. C. Chen, D. D. Tran, J. Sroubek, N. D. Tran, A. F. Hottinger, J. Landolfi, R. Desai, M. Caroli, Y. Kew, J. Honnorat, A. Idbaih, E. D. Kirson, U. Weinberg, Y. Palti, M. E. Hegi, Z. Ram. (2015). Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, **314**(23):2535-2543.
- 309 R. Stupp, S. Taillibert, A. Kanner, W. Read, D. Steinberg, B. Lhermitte, S. Toms, A. Idbaih, M. S. Ahluwalia, K. Fink, F. Di Meco, F. Lieberman, J. J. Zhu, G. Stragliotto, D. Tran, S. Brem, A. Hottinger, E. D. Kirson, G. Lavy-Shahaf, U. Weinberg, C. Y. Kim, S. H. Paek, G. Nicholas, J. Bruna, H. Hirte, M. Weller, Y. Palti, M. E. Hegi, Z. Ram. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, **318**(23):2306-2316.
- 310 R & D Systems®. (11/12/07). Resazurin (Product Data Sheet). [https://www.rndsystems.com/products/resazurin\\_ar002](https://www.rndsystems.com/products/resazurin_ar002) (abgerufen am 05.07.2020).
- 311 H. te Riele, E. R. Maandag, A. Clarke, M. Hooper, A. Berns. (1990). Consecutive inactivation of both alleles of the pim-1 proto-oncogene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **348**(6302):649-651.

- 312 B. Thiessen, C. Stewart, M. Tsao, S. Kamel-Reid, P. Schaiquevich, W. Mason, J. Easaw, K. Belanger, P. Forsyth, L. McIntosh, E. Eisenhauer. (2010). A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **65**(2):353-361.
- 313 M. Toda, Y. Iizuka, W. Yu, T. Imai, E. Ikeda, K. Yoshida, T. Kawase, Y. Kawakami, H. Okano, K. Uyemura. (2001). Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia*, **34**(1):1-7.
- 314 H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**(9):4350-4354.
- 315 R. S. Twigg. (1945). Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature*, **155**:401-402.
- 316 N. Uchida, D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage, I. L. Weissman. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(26):14720-14725.
- 317 D. Uhlenbrock, J. Reinartz, S. Rohde. "Wichtige Krankheitsbilder - von der Diganose zum Befund" in *Duale Reihe Radiologie*, edited by M. Reiser, F. Kuhn, J. Debus (Thieme, Stuttgart, 2017), 4., vollständig überarbeitete Auflage:601-655.
- 318 K. Urbanska, J. Sokolowska, M. Szmidt, P. Sysa. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, **18**(5):307-312.
- 319 P. J. Uren, D. T. Vo, P. R. de Araujo, R. Potschke, S. C. Burns, E. Bahrami-Samani, M. Qiao, R. de Sousa Abreu, H. I. Nakaya, B. R. Correa, C. Kuhnol, J. Ule, J. L. Martindale, K. Abdelmohsen, M. Gorospe, A. D. Smith, L. O. Penalva. (2015). RNA-Binding Protein Musashi1 Is a Central Regulator of Adhesion Pathways in Glioblastoma. *Molecular and cellular biology*, **35**(17):2965-2978.
- 320 M. T. Valenti, M. Serena, L. D. Carbonare, D. Zipeto. (2019). CRISPR/Cas system: An emerging technology in stem cell research. *World journal of stem cells*, **11**(11):937-956.
- 321 M. van Lohuizen, S. Verbeek, P. Krimpenfort, J. Domen, C. Saris, T. Radaszkiewicz, A. Berns. (1989). Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell*, **56**(4):673-682.

- 322 A. L. Vescovi, R. Galli, B. A. Reynolds. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer*, **6**(6):425-436.
- 323 T. Viel, P. Monfared, S. Schelhaas, I. B. Fricke, M. T. Kuhlmann, C. Fraefel, A. H. Jacobs. (2013). Optimizing glioblastoma temozolomide chemotherapy employing lentiviral-based anti-MGMT shRNA technology. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **21**(3):570-579.
- 324 I. Vivanco, C. L. Sawyers. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, **2**(7):489-501.
- 325 D. T. Vo, K. Abdelmohsen, J. L. Martindale, M. Qiao, K. Tominaga, T. L. Burton, J. A. Gelfond, A. J. Brenner, V. Patel, D. Trageser, B. Scheffler, M. Gorospe, L. O. Penalva. (2012). The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by HuR via mRNA translation and stability in glioblastoma cells. *Molecular cancer research: MCR*, **10**(1):143-155.
- 326 Renate Voit. "Analyse von Promoterstärke und aktiver RNA-Synthese" in *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich, J. W. Engels (Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006), 2. Auflage:901-922.
- 327 M. D. Walker, T. A. Strike, G. E. Sheline. (1979). An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, **5**(10):1725-1731.
- 328 S. Watkins, S. Robel, I. F. Kimbrough, S. M. Robert, G. Ellis-Davies, H. Sontheimer. (2014). Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nature communications*, **5**:4196:1-15.
- 329 S. Weiss, B. A. Reynolds, A. L. Vescovi, C. Morshead, C. G. Craig, D. van der Kooy. (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends in neurosciences*, **19**(9):387-393.
- 330 M. Weller, R. Stupp, M. E. Hegi, M. van den Bent, J. C. Tonn, M. Sanson, W. Wick, G. Reifenberger. (2012). Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-oncology*, **14 Suppl 4**:iv100-108.
- 331 M. Weller, R. Stupp, M. Hegi, W. Wick. (2012). Individualized targeted therapy for glioblastoma: fact or fiction? *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, **18**(1):40-44.

- 332 M. Weller, G. Tabatabai, B. Kastner, J. Felsberg, J. P. Steinbach, A. Wick, O. Schnell, P. Hau, U. Herrlinger, M. C. Sabel, H. G. Wirsching, R. Ketter, O. Bahr, M. Platten, J. C. Tonn, U. Schlegel, C. Marosi, R. Goldbrunner, R. Stupp, K. Homicsko, J. Pichler, G. Nikkhah, J. Meixensberger, P. Vajkoczy, S. Kollias, J. Husing, G. Reifenberger, W. Wick. (2015). MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **21**(9):2057-2064.
- 333 M. Weller, M. van den Bent, J. C. Tonn, R. Stupp, M. Preusser, E. Cohen-Jonathan-Moyal, R. Henriksson, E. Le Rhun, C. Balana, O. Chinot, M. Bendszus, J. C. Reijneveld, F. Dhermain, P. French, C. Marosi, C. Watts, I. Oberg, G. Pilkington, B. G. Baumert, M. J. B. Taphoorn, M. Hegi, M. Westphal, G. Reifenberger, R. Soffietti, W. Wick. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology*, **18**(6):e315-e329.
- 334 W. Wick, M. Bendszus, R. Goldbrunner, A. Grosu, E. Hattingen, P. Hau, U. Herrlinger, T. Kessler, M. Platten, T. Pukrop, G. Reifenberger, F. Sahm, S. Schaaf, U. Schlegel, J. Steinbach, G. Stockhammer, W. Stummer, G. Tabatabai, J. C. Tonn, M. Weller. (2021). Gliome, S2k-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie* (abgerufen am 23.09.2021).
- 335 W. Wick, R. Stupp, A. C. Beule, J. Bromberg, A. Wick, U. Ernemann, M. Platten, C. Marosi, W. P. Mason, M. van den Bent, M. Weller, C. Rorden, H. O. Karnath. (2008). A novel tool to analyze MRI recurrence patterns in glioblastoma. *Neuro-oncology*, **10**(6):1019-1024.
- 336 C. Wiese, A. Rolletschek, G. Kania, P. Blyszczuk, K. V. Tarasov, Y. Tarasova, R. P. Wersto, K. R. Boheler, A. M. Wobus. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **61**(19-20):2510-2522.
- 337 R. C. Wilson, J. A. Doudna. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, **42**:217-239.
- 338 L. M. Winn, W. Lei, S. A. Ness. (2003). Pim-1 phosphorylates the DNA binding domain of c-Myb. [Abstrakt]. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **2**(3):258-262.

- 339 K. J. Wolf, P. Shukla, K. Springer, S. Lee, J. D. Coombes, C. J. Choy, S. J. Kenny, K. Xu, S. Kumar. (2020). A mode of cell adhesion and migration facilitated by CD44-dependent microtentacles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**(21):11432-11443.
- 340 B. Wu, C. Sun, F. Feng, M. Ge, L. Xia. (2015). Do relevant markers of cancer stem cells CD133 and Nestin indicate a poor prognosis in glioma patients? A systematic review and meta-analysis. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, **34**:44:1-12.
- 341 R. Würth, A. Bajetto, J. K. Harrison, F. Barbieri, T. Florio. (2014). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in cellular neuroscience*, **8**:144:1-19.
- 342 Y. Xie, S. Bayakhmetov. (2016). PIM1 kinase as a promise of targeted therapy in prostate cancer stem cells. *Molecular and clinical oncology*, **4**(1):13-17.
- 343 Y. Xie, M. Burcu, D. E. Linn, Y. Qiu, M. R. Baer. (2010). Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Molecular pharmacology*, **78**(2):310-318.
- 344 Y. Xie, K. Xu, B. Dai, Z. Guo, T. Jiang, H. Chen, Y. Qiu. (2006). The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, **25**(1):70-78.
- 345 Y. Xie, K. Xu, D. E. Linn, X. Yang, Z. Guo, H. Shimelis, T. Nakanishi, D. D. Ross, H. Chen, L. Fazli, M. E. Gleave, Y. Qiu. (2008). The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, **283**(6):3349-3356.
- 346 J. Xu, X. Zhu, Q. Li, C. Chen, Z. Guo, Z. Tan, C. Zheng, M. Ge. (2018). Loss of PIM1 correlates with progression and prognosis of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC). *Cancer cell international*, **18**:22:1-11.
- 347 W. Xu, T. Li, L. Gao, J. Zheng, A. Shao, J. Zhang. (2017). Efficacy and safety of long-term therapy for high-grade glioma with temozolomide: a meta-analysis. *Oncotarget*, **8**(31):51758-51765.
- 348 Y. Xu, I. Stamenkovic, Q. Yu. (2010). CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer research*, **70**(6):2455-2464.

- 349 H. Yan, D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, D. D. Bigner. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*, **360**(8):765-773.
- 350 A. A. Yarmishyn, Y. P. Yang, K. H. Lu, Y. C. Chen, Y. Chien, S. J. Chou, P. H. Tsai, H. I. Ma, C. S. Chien, M. T. Chen, M. L. Wang. (2020). Musashi-1 promotes cancer stem cell properties of glioblastoma cells via upregulation of YTHDF1. *Cancer cell international*, **20**(1):597:1-15.
- 351 A. H. Yin, S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, D. W. Buck. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **90**(12):5002-5012.
- 352 T. Yoshida, Y. Matsuda, Z. Naito, T. Ishiwata. (2012). CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration. *Pathology international*, **62**(7):463-470.
- 353 L. L. Yuan, A. S. Green, S. Bertoli, F. Grimal, V. Mansat-De Mas, C. Dozier, J. Tamburini, C. Recher, C. Didier, S. Manenti. (2014). Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **28**(2):293-301.
- 354 X. Yuan, J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black, J. S. Yu. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, **23**(58):9392-9400.
- 355 F. Zeppernick, R. Ahmadi, B. Campos, C. Dictus, B. M. Helmke, N. Becker, P. Lichter, A. Unterberg, B. Radlwimmer, C. C. Herold-Mende. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **14**(1):123-129.
- 356 C. Zhang, L. Hai, M. Zhu, S. Yu, T. Li, Y. Lin, B. Liu, X. Zhou, L. Chen, P. Zhao, H. Zhou, Y. Huang, K. Zhang, B. Ren, X. Yang. (2017). Actin cytoskeleton regulator Arp2/3 complex is required for DLL1 activating Notch1 signaling to maintain the stem cell phenotype of glioma initiating cells. *Oncotarget*, **8**(20):33353-33364.
- 357 F. Zhang, Z. M. Beharry, T. E. Harris, M. B. Lilly, C. D. Smith, S. Mahajan, A. S. Kraft. (2009). PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer biology & therapy*, **8**(9):846-853.

- 358 M. Zhang, T. Song, L. Yang, R. Chen, L. Wu, Z. Yang, J. Fang. (2008). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, **27**:85:1-7.
- 359 W. Zhang, J. Mojsilovic-Petrovic, M. F. Andrade, H. Zhang, M. Ball, D. B. Stanimirovic. (2003). The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**(14):2085-2087.
- 360 Y. Zhang, Z. Wang, X. Li, N. S. Magnuson. (2008). Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. *Oncogene*, **27**(35):4809-4819.
- 361 Y. Zhang, Z. Wang, N. S. Magnuson. (2007). Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells. *Molecular cancer research: MCR*, **5**(9):909-922.
- 362 B. Zhao, L. Liu, J. Mao, Z. Zhang, Q. Wang, Q. Li. (2018). PIM1 mediates epithelial-mesenchymal transition by targeting Smads and c-Myc in the nucleus and potentiates clear-cell renal-cell carcinoma oncogenesis. *Cell death & disease*, **9**(3):307:1-14.
- 363 L. R. Zhao, Y. J. Du, L. Chen, Z. G. Liu, X. Y. Jia, Y. H. Pan, J. F. Liu, B. Liu. (2015). Omentin-1 promotes the growth of neural stem cells via activation of Akt signaling. *Molecular medicine reports*, **11**(3):1859-1864.
- 364 Y. Zhao, M. S. Hamza, H. S. Leong, C. B. Lim, Y. F. Pan, E. Cheung, K. C. Soo, N. G. Iyer. (2008). Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells. *Oncogene*, **27**(1):1-8.
- 365 A. Zippo, A. De Robertis, M. Bardelli, F. Galvagni, S. Oliviero. (2004). Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*, **103**(12):4536-4544.
- 366 A. Zippo, A. De Robertis, R. Serafini, S. Oliviero. (2007). PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nature cell biology*, **9**(8):932-944.

## Eidesstattliche Erklärung

hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Recht herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Vorbereitung und dem Schreiben meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Herrn Uni.-Prof. Dr. med. Henry W. S. Schroeder möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie durchführen zu dürfen sowie für sein entgegengebrachtes Vertrauen danken.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. rer. nat. Sandra Bien-Möller für die hervorragende praktische und theoretische Betreuung und ihre stets entgegengebrachte Zeit für mich und meine nicht wenigen Fragen. Durch die von ihr gegebenen Hinweise und Vorschläge konnte ich meine praktischen Fertigkeiten im Rahmen der Labortätigkeit verbessern.

Herzlichen Dank an die Mitarbeiter/-innen der allgemeinen Pharmakologie, die mich ebenfalls bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

