

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Roosen

# Der Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das biologische Verhalten von Medulloblastomen

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Nicole Höhlriegel**  
aus Schweinfurt

Würzburg, September 2002

Referent: Prof. Dr. med. K. Roosen

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2003

Die Promovendin ist Ärztin

**Für meine Schwester Tanja**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Tumoren des ZNS.....	1
1.2	Medulloblastome.....	2
1.2.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>2</i>
1.2.2	<i>Entstehung von Medulloblastomen.....</i>	<i>4</i>
1.2.3	<i>Symptome / Therapie / Prognose.....</i>	<i>6</i>
1.3	Neurotrophe Faktoren.....	8
1.3.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>8</i>
1.3.2	<i>Nerve growth factor (NGF) .....</i>	<i>10</i>
1.3.3	<i>Wirkmechanismen der verwendeten Faktoren .....</i>	<i>14</i>
1.4	Matrix-Metalloproteinasen .....	18
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
3.1	Material .....	22
3.1.1	<i>Geräte .....</i>	<i>22</i>
3.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>23</i>
3.1.3	<i>Chemikalien.....</i>	<i>23</i>
3.1.4	<i>Reagenzien für die Zellkultur.....</i>	<i>24</i>
3.1.5	<i>Enzyme, Puffer, Antikörper.....</i>	<i>25</i>
3.1.6	<i>Nukleinsäuren.....</i>	<i>25</i>
3.1.7	<i>Zelllinien / Primärkulturen.....</i>	<i>26</i>

3.2 Methoden .....	29
3.2.1 <i>Zellbiologisch</i> .....	29
3.2.1.1 ALLGEMEINES .....	29
3.2.1.2 ZELLKULTUR .....	30
3.2.1.3 COATEN DER PLATTEN .....	33
3.2.1.4 ANLEGEN VON FETALEN RATTENHIRNAGGREGATEN .....	35
3.2.1.5 KONFRONTATIONSKULTUREN .....	37
3.2.1.6 MIGRATIONSSASSAY .....	38
3.2.2 <i>Molekularbiologisch</i> .....	40
3.2.2.1 RNA .....	40
3.2.2.2 REVERSE TRANSKRIPTION (CDNA-SYNTHESE) .....	41
3.2.2.3 PCR .....	42
3.2.3 <i>Proteinbiologisch</i> .....	48
3.2.3.1 ZYMOGRAPHIE .....	48
3.2.3.2 IMMUNHISTOCHEMIE: APOPTOSE-, TRK-, KI-67-FÄRBUNGEN .....	51
3.2.3.3 WESTERN BLOT .....	54
3.2.3.4 ELISA .....	57
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
4.1 Kultur der Medulloblastome .....	58
4.2 Überleben in serumfreiem Medium .....	60
4.3 Wachstumsverhalten in sfM unter Faktorenbehandlung .....	62
4.4 Invasionsassay .....	64
4.5 Migrationsassay .....	68
4.6 Trk-Rezeptorstatusanalyse mittels PCR .....	74
4.7 Nachweis der MMP-Expression durch Zymographie .....	76

4.8 Immunhistochemische Untersuchung von Apoptose, Ki-67 und Rezeptorbesatz.....	78
4.9 Nachweis der MAP-Kinase in MB.....	81
4.10 BDNF- und NT-3-Bestimmung mittels ELISA.....	81
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>8 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
<b>10 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Tumoren des ZNS

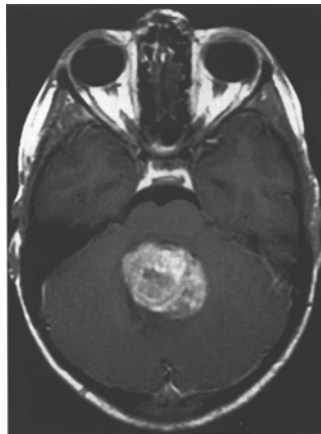
Als primären Hirntumor bezeichnet man eine Neoplasie mit Ursprung im Hirngewebe. Auf der Basis histologischer Befunde werden diese Tumoren entsprechend den Empfehlungen der WHO in vier Gruppen eingeteilt. Dieses Schema geht von Grad I bis IV mit einer Zunahme der Malignität einher, was sich klinisch in vermehrter Rezidivneigung widerspiegelt.

In Folge des Tumors kann es zu erhöhtem Hirndruck, mit entsprechenden Allgemeinsymptomen und lokaler Symptomatik, ebenso wie zu Funktionsstörungen durch synchronisierte Neuronenentladung (mit generalisierten und fokalen Krampfanfällen), neurologischen Ausfallserscheinungen, Bewußtseinsstörungen und Wesensänderung kommen (SCHLEGEL/WESTPHAL 1998).

## 1.2 Medulloblastome

### 1.2.1 Allgemeines

Medulloblastome (MB) stellen den häufigsten Hirntumor im Kindesalter dar, mit einer jährlichen Inzidenz von 5/1.000.000 Kindern. Die häufigste Lokalisation ist das Cerebellum, seltener auch die Pinealisregion. In der Computertomographie bzw. auf MRT-Bildern imponieren MB als solides, intensiv und homogen Kontrastmittel aufnehmendes Gewebe.

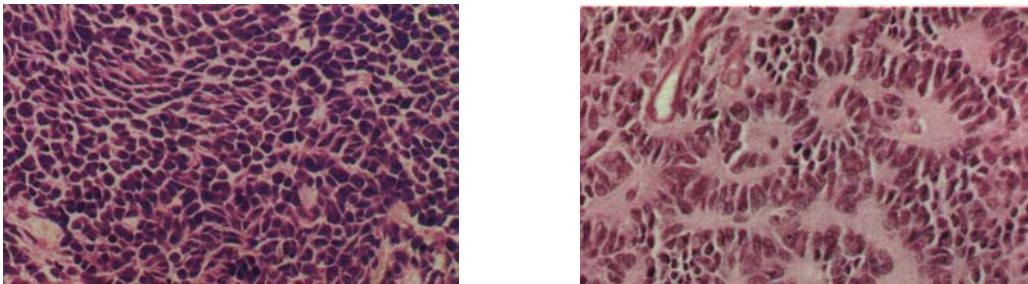


**Abbildung 1: Medulloblastom – MRT (BLASER/HARWOOD-NASH 1996)**

Es handelt sich um eine sehr strahlen- und chemotherapiesensible Neoplasie, die häufig in Richtung des IV. Ventrikels wächst und neben der Gefahr eines Okklusionshydrocephalus auch Liquormetastasen ausbilden kann (KÜHL 2000 a/b).



Histologisch besteht das klassische MB aus dicht gepackten Zellen mit rundem bis ovalem hyperchromatischem Zellkern, umgeben von wenig Cytoplasma. Weiterhin werden neuroblastische Rosetten beschrieben, die aus Tumorzellkernen bestehen, welche zirkulär um Cytoplasmastränge angeordnet sind. Diese Rosetten sind assoziiert mit Kernpolymorphismen und hoher mitotischer Aktivität.



**Abbildung 2: Histopathologie von Medulloblastomen: typische Anordnung undifferenzierter Tumorzellen (links), neuroblastische Rosetten als histologisches Kennzeichen (rechts) (KLEIHUES/CAVENE 1997)**

In der Immunhistochemie fällt das MB durch die Expression von Synaptophysin auf, was die Ausbildung von Synapsen ermöglicht und in glialen oder mesenchymalen Hirntumoren nicht vorkommt. Wie in Astrozytomen, Glioblastomen und Meningiomen kommt auch im MB Nestin vor. Dies beschreibt ein Klasse VI IF-Protein, welches von neuroepithelialen Stammzellen des sich entwickelnden ZNS gebildet wird. Es ist somit ein Marker für ZNS-Vorläuferzellen, wobei es auch von embryonalen Zellen außerhalb des Nervensystems exprimiert wird. Klassische MB sind zusätzlich streng immunoreaktiv für Vimentin, ein Klasse III IF-Protein und die Mehrheit der MB enthält auch GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positive Zellen. Die Expression von N-CAMs (neural cell adhesion molecules) wurde für MB, ebenso wie für Glioblastome und verschiedene andere Hirntumoren beschrieben (KLEIHUES 1997).

Somit bilden Medulloblastome eine gut abzugrenzende Gruppe innerhalb der hirneigenen Tumoren, gekennzeichnet durch die Zusammensetzung aus Zellen embryonaler Entwicklungsstadien des ZNS und hier insbesondere des Kleinhirns.

### 1.2.2 Entstehung von Medulloblastomen

Auf molekularbiologischer Ebene ist die Entstehung von MB, wie auch von anderen Hirntumoren nicht monogen bedingt. Als auslösende Mechanismen stehen einerseits die **Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen** und andererseits die **Aktivierung von Protoonkogenen** zur Diskussion. Beim MB, ebenso wie bei anderen PNET's, sind besonders Gene betroffen, die zur Nervensystementwicklung notwendig sind; diese werden auch Entwicklungs-Kontroll-Gene genannt (REIFENBERGER 2000, SERFLING 1998).

Die häufigste spezifische Abnormität in MB, welche in 50% der Fälle zu finden ist, betrifft das **Chromosom 17**. Im proximalen Bereich des kurzen Arms werden deletierte oder amplifizierte Regionen beschrieben, woraus eine Instabilität in diesem Bereich als plausible Erklärung für die Tumorphogenese besteht. Diese Chromosomenaberration scheint relativ typisch und spezifisch für MB zu sein, da sie in anderen PNETs bisher nicht nachgewiesen werden konnte (GIORDANA 1998, BURNETT 1997, COGEN 1996).

Bei MB-Patienten finden sich auch häufig Veränderungen an **Chromosom 1**, wobei in diesem Bereich die Aberrationen zahlreicher und sehr verschiedenartig sein können. Beispielsweise konnte ein auffallend häufiger interstitieller Verlust der Heterozygotität an Chromosom 1q nachgewiesen werden (KLEIHUES 1997, PIETSCH 1997).

---

Die **PAX (paired-box containing) -Gen-Familie** besteht aus neun Transkriptionsfaktoren, die in Gehirnzellen exprimiert werden. Im MB kommen besonders die Proteine *PAX 5* und *6* vor. Sie scheinen eine Rolle in der Entwicklung des Tumors zu spielen. Erste Polymorphismen im *PAX 3*- Gen konnten bereits im Codon 43 nachgewiesen werden (WANG 1998).

Bei 10-15% der MB-Patienten wird eine Mutation auf dem **PTCH-Tumor-Suppressorgen** beobachtet, welches auf Position 9q22 lokalisiert ist. Dieses *PTCH*-Gen beschreibt ein Rezeptorprotein innerhalb der Zellmembran; es kodiert für Shh und ist mit Smoh assoziiert. Veränderungen im *PTCH*-Gen führen durch Punktmutationen zur Aktivierung im Smoh-Protein (vergleichbar mit dem ras-System). Dies scheint ein wichtiger Hinweis dafür zu sein, dass Entwicklungs-Kontroll-Gene bzw. deren Veränderungen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von MB spielen. Ebenso wie in MB konnten auch in Basalzellsarkomen Mutationen in diesem Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden (ZURAWEL 2000, REIFENBERGER 2000, SMYTH 1999, PIETSCH 1997).

Prognostisch bedeutsam ist weiterhin eine auffallend häufige Vermehrung des **c-myc-Protoonkogens**. Diese Amplifikation ist über den gesamten Zellkern verteilt, was auf eine Veränderung in mehreren Chromosomen hinweisen könnte. Oft waren gerade bei Kindern mit einer c-myc-Amplifikation ausgedehnte Rückenmarks- und Hirnmetastasen nachweisbar (REIFENBERGER 2000, RUTKA 1996).

### 1.2.3 Symptome / Therapie / Prognose

Das MB, welches den häufigsten PNET darstellt und als im Kleinhirn lokalisierter primitiver neuroektodermaler Hirntumor definiert ist, kann einerseits durch einen Hydrocephalus internus mit folgender Hirndrucksymptomatik und andererseits direkt durch die Raumforderung in der hinteren Schädelgrube eine lebensbedrohliche Situation darstellen.

Erste Therapieoption ist die **Operation**, wobei man im Würzburger Krankengut eine Fünfjahres-Überlebensrate von 61% bei radikaler Operation und von 34% bei Belassung eines Resttumors erreicht hat. Ein Problem stellt hierbei besonders die relativ frühe Metastasierung über den Liquor dar. Die so genannten „PNET-Zellen“ bilden spinale Abtropfmetastasen. Seltener findet man extraneurale Metastasen, vor allem in Skelett und Lunge. Die der Operation folgende Therapieoption ist somit die **Radiatio** der gesamten kraniospinalen Achse. An dritter Stelle steht dann die **Chemotherapie**, wobei man je nach verwendeter Substanz unterschiedliche Ansprechraten findet:

<b>Substanz</b>	<b>Response</b>
Cisplatin	64%
Endoxan	59%
„8 in 1“	48%
BCNU/CCNU	46%

**Tabelle 1: Ansprechraten unterschiedlicher Chemotherapien.**

Insgesamt muss allerdings die Problematik der jeweils einzelnen Therapiemethoden beachtet werden. Allein durch chirurgisches Vorgehen ist oft keine radikale Tumorentfernung möglich. Bei der Radiatio ist die Dosis limitiert, da kindliches – noch in der Entwicklung befindliches – Gehirn betroffen ist; und

die Wirkkonzentration der Cytostatika wird vor Ort durch die Blut-Liquor-Schranke vermindert. Dennoch kann heute durch die Kombination dieser drei Therapieoptionen eine Fünfjahres-Überlebensrate von etwa 80% erreicht werden.

Durch diese erfolgreichen Ansätze im Vergleich zu vorherigen Studien muss allerdings das Auftreten von Residualschäden durch die Therapie immer größere Beachtung finden. In Abhängigkeit von Alter und Bestrahlungsdosis werden sowohl intellektuelle Defizite, psychosoziale Probleme, neuroendokrine Störungen als auch Leukoencephalopathien und Zweitmalignome beobachtet. Bei Erwachsenen treten diese „Nebenwirkungen“ weitaus seltener, ab dem 30. Lebensjahr sogar nur noch in Einzelfällen auf.

Konsequenz aus dieser Erkenntnis ist, dass Kinder bis zum dritten Lebensjahr primär nur operiert und chemotherapiert werden und eine Radiatio erst ab dem vierten Lebensjahr zum Einsatz kommt. Bei diesen jungen Kindern wird eine Fünfjahres-Überlebensrate von 50% erreicht (JENKIN 2000, KÜHL 2000 a/b, PACKER 1999, SUTTON 1996, JENKIN 1996).

Ein großer Prozentsatz von MB exprimiert neuronengebende Marker und Kleinhirn-Körnerzell-spezifische Transkriptionsfaktoren. Auch Neurotrophine, unter anderem BDNF und seine spezifische Rezeptortyrosinkinase TrkB, ebenso wie NT-3 und dessen bevorzugter Rezeptor TrkC werden von MB gebildet. Sie regulieren die Entwicklung von Körnerzellen.

Somit stellt das MB den Prototyp multipotenter primitiver neuroektodermaler Tumoren des Cerebellums dar. Sowohl auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene, als auch in der Immunhistochemie können MB verschiedene Differenzierungslinien beschreiten. Sie enthalten Marker neuronaler, astrozytärer, ependymaler, retinaler und muskulärer Differenzierung (KIM 1999, PROVIAS 1996, ALBRECHT 1995).

## 1.3 Neurotrophe Faktoren

### 1.3.1 Allgemeines

Unter neurotrophen Faktoren können alle Peptide zusammengefasst werden, die bei der Entwicklung des Nervensystems eine prägende Rolle besitzen. Sie stimulieren – zumindest im **embryonalen** Gehirn – die Proliferation, unterstützen die Zellmigration und stellen letztlich den Kontakt von Neuronen mit ihrem Zielgewebe her. Im **adulten** Gehirn scheinen die neurotrophen Faktoren andere Aufgaben zu haben; hier sorgen sie für eine Regeneration der Neuronen nach Verletzungen.

Eine kleine Gruppe dieser Faktoren weist auf molekularer Ebene große Gemeinsamkeiten auf. Diese werden als Neurotrophine (NT) im engeren Sinne bezeichnet. Inzwischen sind fünf NT bekannt: NGF, BDNF, NT-3; NT-4/5 und NT-6 (siehe Tab.2). Die Erkenntnisse sind beim NGF am weitest reichenden, können aber durch hohe Homologien zu BDNF und NT-3 auf die anderen Faktoren übertragen werden (CHIAPPA 1999, CONOVER 1997, YUEN 1996).

Während der Ontogenese geht ein großer Teil unreifer Neurone wieder zugrunde („spontaner Zelltod“). Offensichtlich steuern die Zielorgane (Neurone, Muskulatur) dieser Neurone die Größe der Population der überlebenden Nervenzellen.

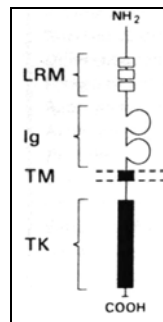
Den verschiedenen trophischen Faktoren können bevorzugte Zielneurone zugeordnet werden, was in nachfolgender Tabelle dargestellt ist.

<b>Faktor</b>	<b>Zielneurone</b>
NGF (nerve growth factor)	Cholinerge Neurone des Septums, Sympathikusneurone, Spinalganglionzellen
BDNF (brain-derived neurotrophic factor)	Embryonale dopaminerge Neurone des Mesencephalons, embryonale Ganglienzellen der Retina, embryonale Neurone des Ganglion nodosum
bFGF (basic fibroblastic growth factor)	Embryonale dopaminerge Neurone des Mesencephalons
NT-3 (neurotrophin-3)	Embryonale Neurone des Ganglion nodosum
EGF (epidermal growth factor)	Embryonale dopaminerge Neurone des Mesencephalons
CNTF (ciliary neurotrophic factor)	Embryonale Neurone des Ganglion ciliare, Neurone des Nucleus nervi facialis

**Tabelle 2: Bevorzugte Zielneurone der einzelnen trophischen Faktoren  
(ZILLES 1994).**

### 1.3.2 Nerve growth factor (NGF)

NGF (beispielhaft für alle NT) entsteht durch Splicing aus einem Pro-Protein. Es wird von drei antiparallelen Faltblattstrukturen gebildet, die durch Loops miteinander verbunden sind. Vor allem durch diese Loops unterscheiden sich die verschiedenen NT. Die Wirkung der NT wird über vier transmembranöse Rezeptoren vermittelt: **TrkA, -B und -C** sind hoch affine membrangebundene Tyrosinkinassen, die auf spezifische Weise NT binden: TrkA bindet NGF, TrkB geht mit BDNF, NT-3 und NT-4/5 Bindungen ein; TrkC bindet NT-3 (BARBACID 1995).

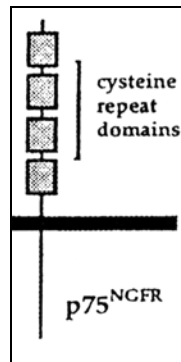


**Abbildung 3: Trk-Rezeptor (SNIDER 1994)**

Der vierte Rezeptor, **p75**, welcher zur Tumor-Nekrosefaktor-Superfamilie gehört, bindet mit niedriger Affinität alle NT. Im extrazellulären Bereich ist der p75-Rezeptor durch cysteinreiche Wiederholungen gekennzeichnet und intrazellulär fehlt - im Vergleich zu den Trk-Rezeptoren - die Tyrosinkinase-Aktivität.



Seine Wirkungsvermittlung geschieht wahrscheinlich über G-Proteine, die er mittels einer Konsensussequenz binden kann. Im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren wird der  $p75^{\text{NTR}}$  nur in einem geringen Prozentsatz von Medulloblastomen exprimiert.

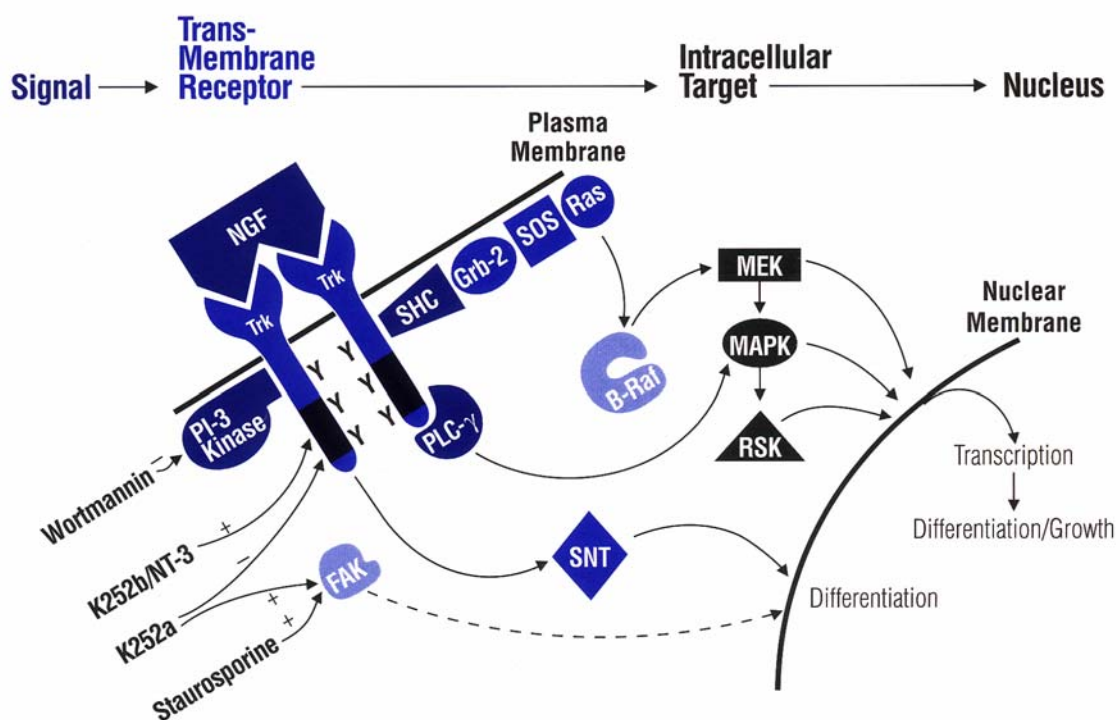


**Abbildung 4: p75-Rezeptor der neurotrophen Faktoren (CHAO 1992)**

Die NT stellen Polypeptide dar, deren biologische Aktivität (Wirkung) größtenteils über hoch affine Rezeptortyrosinkinasen vermittelt wird. Die Bindung eines Faktors führt zur Dimerisierung zweier Rezeptormonomere. Es kommt zur Konformationsänderung des Rezeptors. Nach der Dimerisierung phosphorylieren die zwei Untereinheiten sich gegenseitig an charakteristischen Stellen. Genau an diese Phosphatgruppen binden anschließend unterschiedliche Proteine. Sie verfügen alle über ein **SH2-Motiv** (Src-homology), welches eine hoch-konservierte Aminosäuresequenz darstellt. Diese Proteine lassen sich in zwei Gruppen aufteilen:

Zur ersten Gruppe zählt man **Proteine mit katalytischen Fähigkeiten**, wie beispielsweise die Phospholipasen C- $\gamma$ 1 und C- $\gamma$ 2. Sie katalysieren die Hydrolyse von Phosphoinositolphosphat zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>). Dies führt zu einem Ausstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Kompartimenten, wodurch unter anderem die Aktivitäten bestimmter Proteinkinasen beeinflusst werden. Das andere Spaltprodukt, Diacylglycerol (DAG), gilt als Aktivator der Proteinkinase C (PK-C).

Der zweiten Gruppe von Proteinen mit SH2-Motiven **fehlt die katalytische Aktivität**. Hierzu zählen beispielhaft Grb2 und die p85-Untereinheit der PI-3 Kinase. Sie dienen als Adaptermoleküle für Kinasen, welche ihrerseits z.B. im ras-vermittelten Signalweg in Aktion treten. Ras seinerseits hat Einfluss auf unterschiedlichste Proteine im Cytoplasma. Hierzu zählt Raf, eine Kinase, die Phosphatgruppen auf Serin/Threonin-Reste einiger Kinasen überträgt; und auch die MAP-Kinase (Mitogen-Activated-Protein-Kinase), die nach Translokalisierung in den Zellkern in der Lage ist, Transkriptionsfaktoren an Serin/Threoninreste zu phosphorylieren. Die MAP-Kinase leitet somit das Signal der NT in den Zellkern weiter, wo spezifisch Gene reguliert werden (VESA 2000, DAVIES 1997, KAPLAN 1997, MURAGAKI 1997, RASOULY 1995, ULLRICH 1990).



**Abbildung 5: Signalkaskade der neurotrophen Faktoren (RASOULY/STEPHANS 1995)**

---

Die vielfältige Wirkung der neurotrophen Faktoren wird unter anderem durch eine differenzierte Verteilung der Rezeptoren hervorgerufen. Während man TrkA ausschließlich auf neuronalen Zellen findet, werden TrkB und -C auch auf nicht neuronalen Zellen exprimiert. Darüber hinaus werden die NT zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Entwicklung des Nervensystems gebildet. So z.B. zeigt NT-3-mRNA einen Peak kurz nach der Geburt, BDNF-mRNA nach etwa zwei Wochen und NGF-mRNA ungefähr drei Wochen postnatal.

Neurone innerhalb jeder der Schichten des cerebralen Cortex exprimieren multiple Mitglieder der NT-Familie und ihrer korrespondierenden Rezeptoren. Hierdurch werden die Richtung des kortikalen Wachstums und die Gehirnentwicklung bestimmt. BDNF und NT-3 können direkt auf dieselben Neuronenpopulationen einwirken und haben meist einen entgegengesetzten Effekt auf das Dendritenwachstum in pyramidalen Neuronen.

Somit haben NT eine Reihe von Effekten in der Entwicklung und Reifung des Nervensystems. Zusätzlich zu ihrer gut etablierten Rolle als Promotor und Regulator für das Überleben sich entwickelnder Neurone, beeinflussen diese Polypeptide die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen. Außerdem regulieren sie die Neurotransmitter- und Neuropeptidsynthese und haben Einfluss auf die Morphologie von Neuronen und die Funktion der Synapsen. Fehlfunktionen in den NGF-, BDNF- und NT-3-Genen resultieren in unterschiedlichen neuronalen Defiziten und einem frühen postnatalen Tod (DAVIES 2000, KOKUNAI 1999, GOUMNEROVA 1996, SNIDER 1994).

### 1.3.3 Wirkmechanismen der verwendeten Faktoren

**NT-3 (neurotrophin-3)** führt über eine Aktivierung des TrkC-Rezeptors in MB zur Beeinflussung des Tumorwachstums, im Sinne einer Apoptose-Induktion. Auch eine hohe Korrelation zwischen spontaner Apoptose und TrkC-Expression wird beschrieben. In ausgereiften Körnerzellen sind erhöhte Mengen an TrkC nachweisbar, was Hinweise darauf gibt, dass sich im Laufe der Entwicklung – also von neonatal zu adult – das Verhältnis von TrkC zu TrkB in Richtung TrkC verändert. Über NT-3 wird in diesen Zellen besonders die axonale Ausreifung reguliert. Innerhalb des Cerebellums wird eine NT-3-Antwort vor allem durch reife Neurone der inneren Schichten beschrieben. NT-3 zeigt seine neurotrophe Aktivität besonders an sensorischen Neuronen und inhibiert durch BDNF-stimuliertes Dendritenwachstum.

**BDNF (brain-derived neurotrophic factor)** fördert innerhalb der normalen Hirnentwicklung das Überleben und die Differenzierung früher postmitotischer Körnerzellen. Des Weiteren stimuliert BDNF das Axonwachstum dieser frühen Körnerzellen und bietet Schutz vor p75-induzierter Apoptose.

Über Aktivierung des TrkB-Rezeptors, welcher überwiegend neonatal exprimiert wird, wirkt BDNF besonders in der initialen proliferativen Phase der Kleinhirnzellen. Eine BDNF-Antwort geschieht somit überwiegend durch primitive Neurone des äußeren Stratum germinativum. BDNF inhibiert weiterhin ein durch NT-3 stimuliertes Dendritenwachstum.

**CNTF (ciliary neurotrophic factor)** verhindert im Ciliarneuron des Huhns die Apoptose. Seine Struktur ähnelt der von  $\alpha$ -helikalen Cytokinen wie IL-6, IL-11, LIF (leukemia-inhibitory-factor), OSM (Oncostatin M) und G-CSF (granulozyte-colony-stimulation-factor). Der entsprechende Rezeptor gehört zur Familie der Cytokinrezeptoren und bildet mit CNTF einen stabilen Komplex aus vier Komponenten (CNTF, welches an CNTFR- $\alpha$  bindet. CNTF und CNTFR- $\alpha$  interagieren dann mit den beiden  $\beta$ -Einheiten gp130 und LIFR- $\beta$ ; hierdurch kommt es zur Phosphorylierung der  $\beta$ -Einheiten). Keiner der Bestandteile

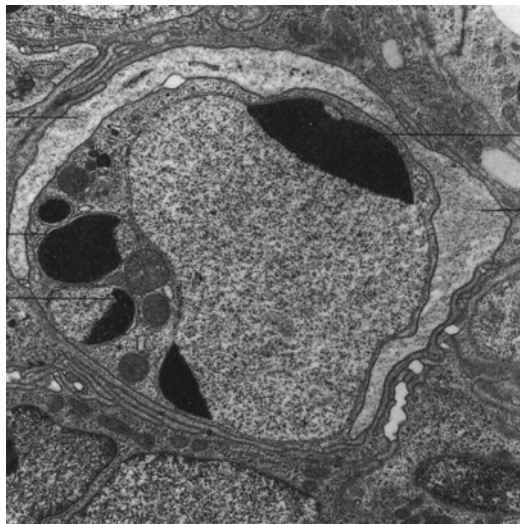
besitzt eine Tyrosinkinase-Aktivität. Allerdings wird vermutet, dass Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Jak/Tyk-Familie) fortwährend mit den  $\beta$ -Einheiten des Rezeptors assoziiert sind (STAHL 1994).

Alle Mitglieder der Cytokinfamilie induzieren die Phosphorylierung eines sehr ähnlichen Pools von Proteinen; es handelt sich hierbei um PLC $\gamma$ , PI3-Kinase, Raf-1 und folgend MAP-Kinase.

Die Variation der  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors spiegelt sich in der unterschiedlichen biologischen Wirkung von CNTF wider. CNTF inhibiert *in vitro* die Proliferation von Vorläuferzellen sympathischer Neurone. Im Weiteren kooperiert CNTF mit FGF und NGF, um die Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen zu differenzieren. Eben diese drei Faktoren beeinflussen auch reife Neuronen, indem sie über die Stimulation der Neuropeptidproduktion eine cholinerge Funktion der Neuronen induzieren. Neben Gliazellen und sympathischen Neuronen stehen auch Motoneurone unter dem Einfluss von CNTF. Es wirkt auch hier der Apoptose entgegen.

Man findet CNTF nur in geringen Mengen im Embryo. In adulten Organismen befindet sich die höchste Konzentration in den Schwannschen Zellen des Peripheren Nervensystems oder in reaktiven Astrozyten nach einer Verletzung des Zentralen Nervensystems. Die Rolle von CNTF in der Entwicklung des Nervensystems scheint hingegen geringer zu sein (KIM 1999, McALLISTER 1997, TOLKOWSKY 1997, LAMBALLE 1991).

**Apoptose** ist definiert als programmierter Zelltod und wird gekennzeichnet durch die Aktivierung von Endonukleasen. Im Verlauf der Apoptose kommt es zu typischen Veränderungen, wie DNA-Fragmentierung, Chromatin- und Cytoplasma-Kondensation und vor allem zur Phagozytose (ohne Entzündungsreaktion).



**Abbildung 6: Apoptotische Zelle mit Chromatinschollen, umschlossen von einem Makrophagen (KÜHNEL 1995)**

Die Funktion des programmierten Zelltodes besteht innerhalb der Embryogenese in der Gewebsmodellierung. Bedeutung hat die Apoptose weiterhin in der Ausbildung und Reifung des Immunsystems und beim physiologischen Zellumsatz des Oberflächenepithels des Gastrointestinaltrakts. Im Medulloblastom leistet die Apoptose einen großen Beitrag zum Zellverlust (KLEIHUES 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch gesteigerte Expression des NT-3-Rezeptors TrkC die Rate an zugrunde gegangenen Zellen erhöht ist. Als Mechanismen werden einerseits die Aktivierung verschiedener paralleler Signalkaskaden angenommen, und andererseits kann die Induktion der Gen-Expression von *c-jun* und *c-fos* beobachtet werden.

Klinische Bedeutung gewinnt diese Erkenntnis dadurch, dass in MB mit gesteigerter TrkC-Expression ein verbessertes clinical-outcome der betroffenen Kinder nachgewiesen werden konnte (KIM 1999). Innerhalb neuronaler Zellpopulationen scheinen besonders p75<sup>NTR</sup>-vermittelte Signale Apoptose zu induzieren; modifiziert allerdings durch parallele Stimulation bzw. Hemmung der Tyrosinkinase (besonders des TrkA-Rezeptors). Hierdurch wird unter anderem das axonale Wachstum moduliert (KAPLAN 1997). NGF seinerseits wird dafür verantwortlich gemacht, dass es unreife Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems – in Abhängigkeit des Zellzyklus– vor dem programmierten Zelltod schützt (MURAGAKI 1997).

Die Apoptose grenzt sich damit deutlich von der Nekrose ab, die durch eine entzündliche Abräumung mit Zerstörung der Cytoplasmabestandteile gekennzeichnet ist.

	<b>Nekrose</b>	<b>Apoptose</b>
<b>Ablauf</b>	passiv	programmiert
<b>Endonukleasen</b>	Aktivierung nach Zelltod	Aktivierung vor Zelltod
<b>Folgen</b>	Entzündungsreaktion	Phagozytose ohne Entzündung
<b>DNA-Fragmente</b>	beliebige Fragmentlänge	180-200 bp

***Tabelle 3: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (KUMAR 1997).***

Neurotrophe Faktoren wurden mittlerweile auch als Verursacher bzw. Protektor von psychiatrischen Erkrankungen erkannt. In Tierexperimenten erscheint ihr Einsatz zur Vermeidung bzw. Therapie der diabetischen Neuropathie als sehr Erfolg versprechend, wobei die Suche nach der geeigneten Applikationsform noch in vollem Gange ist. Auch durch diese beiden Beispiele wird die Vielseitigkeit der Bedeutung der NT deutlich.

## 1.4 Matrix-Metalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bilden eine homologe Familie Zink-abhängiger Proteasen. Sie werden als inaktive Zymogene sezerniert und bedürfen daher zur Entfaltung ihrer biologischen Aktivität der Aktivierung durch z.B. andere Proteasen.

Charakteristisch für MMPs ist das Vorkommen der natürlichen, körpereigenen Inhibitoren, den TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase). Diesen wird die Hauptrolle bei der Regulation der MMP-Aktivität *in vivo* zugeschrieben.

In fast allen Arten von Tumoren wird den MMPs eine Förderung der Tumorprogression zugeordnet, unter anderem durch Starten der Carcinogenese, Steigern der Tumor-Angiogenese, Zerstören der lokalen Gewebsarchitektur und der Degradation von Basalmembranbarrieren zur Metastasierung. Einige MMPs wie MMP-7, MMP-13 und auch Gelatinase A werden häufig von den jeweiligen Tumorzellen exprimiert, wohingegen die meisten der Zink-abhängigen Proteinasen von umliegenden Stroma- und infiltrierten Entzündungszellen als Antwort auf vom Tumor sezernierte lösliche Faktoren produziert werden. So bindet MMP-2 z.B. mit seiner Carboxy-terminalen Domäne an das  $\alpha v \beta 3$ -Integrin von Tumorzellen und Blutgefäßen und vermag so das Tumorwachstum zu steigern. Andererseits kann das autolytische Processing von MMP-2 durch Freisetzung der Carboxy-terminalen Domäne die Gefäßeinsprossung in den Tumor und das Tumorwachstum inhibieren.



Die Matrixmetalloproteinasen sind eine Gruppe von bisher 25 bekannten Subtypen. Die folgende Tabelle zeigt einen Ausschnitt der in dieser Arbeit untersuchten MMPs und ihrer bevorzugten Substrate.

<b>Enzymname</b>	<b>MMP-Nr.</b>	<b>Protein (kDa)</b>	<b>Substrate</b>
72 kDa Typ IV Kollagenase bzw. Gelatinase A	MMP-2	72 S 60 A	Kollagen IV, V, VII,X, Fibronektin, Gelatine
Stromelysin	MMP-3	60 S 52 A	Kollagen III, IV, V, Laminin, Fibronektin, Proteoglykane
92 kDa Typ IV Kollagenase bzw. Gelatinase B	MMP-9	92 S 86 A	Kollagen I, III IV, V, Gelatine

***Tabelle 4: Eigenschaften der MMPs und zugehörige Substrate  
(WAGNER 1999).***

## 2 FRAGESTELLUNG

Medulloblastome sind hochmaligne primitive neuroektodermale Tumore, die besonders in der Mittellinie des Cerebellums bei Kindern vorkommen.

Es wird angenommen, dass das MB von der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns ausgeht. Aus diesem Grund besteht ein Interesse daran, die Expression von Neurotrophinen und deren Rezeptoren in MB zu untersuchen. Diese Faktoren und Überträgerproteine sind entscheidend an Zellteilung, Entwicklung und Differenzierung des menschlichen Kleinhirns beteiligt. Die Entwicklung der Körnerzellen ist durch NT in einem exakt koordinierten zeitlichen Ablauf reguliert. Entscheidend sind hierbei die Einflüsse der einzelnen Mitglieder der NT-Familie, nämlich NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 in Abhängigkeit der Anwesenheit und Konformation der jeweiligen hoch affinen Tyrosinkinase-Rezeptoren und auch des niedrig affinen p75-Rezeptors.

Es ist bereits erwiesen, dass BDNF und NT-3 ihren Einfluss auf in der Entwicklung befindliche Körnerzellen in genau definierten Stadien der Differenzierung ausüben. Embryonale Körnerzellen führen besonders eine BDNF-Antwort aus, wohingegen reife Körnerzellen vor allem auf NT-3 reagieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des TrkC-Rezeptors in MB mit der Tumorprogression und dem clinical-outcome korreliert (KIM 1999, McALLISTER 1997, POMEROY 1997, SEGAL 1995).

Bis dato konnte noch nicht gezeigt werden, welchen konkreten Einfluss die neurotrophen Faktoren auf die infratentoriellen kindlichen Hirntumore ausüben.

Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit sich das biologische Verhalten von Medulloblastom-Zelllinien bzw. –Primärkulturen verändert, wenn sie mit neurotrophen Faktoren stimuliert werden.

Verwendet wurden die Neurotrophine BDNF und NT-3, sowie deren blockierende Antikörper und das Cytokin CNTF. Unter variierten Zellkulturbedingungen und besonders nach NT-Stimulation werden zunächst das Wachstums-, Invasions- und Migrationsverhalten untersucht. Im Folgenden sollen durch Proteinnachweis Hinweise auf autokrine Loops gefunden werden und zusätzlich wird durch DNA-Untersuchung der Besatz der Zelllinien an Neurotrophin-Rezeptoren untersucht. Anschließend wird die Einordnung der beobachteten Effekte durch immunhistochemische Untersuchungen vervollständigt.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank (IR Autoflow CO <sub>2</sub> Water–Jacketed Incubator)	Nuaire, Plymouth, U.S.A.
Elektrophorese Power Supply ST 305	Gibco-BRL-Life Technologies, Eggenstein
ELISA–Reader Titertek Multiskan Plus	Labsystem, Finnland
Gelelektrophoresekammern, Horizon 11-14 und Horizon 58	Gibco-BRL-Life Technologies, Eggenstein
Gene Amplifier PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop, Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrotom 1208	Leitz, Wetzlar
Mikrowellenherd R-2V26	Sharp, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophorese-Apparatur Mini-V8-10 Vertical	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
pH-Meter 525	WTW, Weilheim
Photometer Ultraspec III	Pharmacia-Biotech, Freiburg
Pipettor (Stripettor)	Costar, Bodenheim
Speed vac (DNAplus)	Heto, Allerød, DK
Sterilbank (Biol. Safety Cabinet)	Nuaire, Plymouth, U.S.A.
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
UV-Illuminator	Konrad Benda, Wiesloch
Videodokumentationssystem	Intas, Göttingen

---

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, U.S.A.
Waage Sartorius BP 300 S	Sartorius, Göttingen

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safelock, 0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Nalgene, Brüssel, Belgien
Objektträger	Menzel-Glaser, Braunschweig
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Greiner, Würzburg
Pipettenspitzen mit Filter Safe Seal Tips (10, 100, 1000 µl)	Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße für PCR (0.2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> ) mit 2 µm-Filterkappe	Costar, Bodenheim
Zellkultur-6-well-Platten	Costar, Bodenheim
Zellkultur-24-well-Platten	Costar, Bodenheim
Zellkultur-96-well-Platten	Costar, Bodenheim

### 3.1.3 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar Noble	Difco, Detroit, U.S.A.
Agarose Qualex Gold	AGS, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Gibco-BRL-LifeTechnologies, Eggenstein
Eisessig (100% Essigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut (EtOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Deisenhofen

Ethylendinitrilotetraacetat- dinatriumsalz (EDTA)	Boehringer, Mannheim
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol (MetOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, St.Louis, U.S.A.
Poly-L-Lysin, Mol.Wt. 150000-300000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase Erase	ICN, Eschwege
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.4 Reagenzien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose	Cytogen, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Cytogen, Berlin
Humanserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	Cytogen, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Bio Whittaker über Boehringer Ingelheim
Trypanblau (0,4%)	Sigma, Deisenhofen
Ultra-reines Wasser (Seromed)	Biochrom, Berlin

### 3.1.5 Enzyme, Puffer, Antikörper

Anti-BDNF-Antikörper (monoklonal)	Calbiochem
Anti-NT-3-Antikörper (polyklonal)	Calbiochem
BDNF (Brain-derived-Neurotrophic Factor)	AG Prof. Sendtner, Würzburg
CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor)	AG Prof. Sendtner, Würzburg
5x Erststrangpuffer	Gibco-BRL-LifeTechnologies, Eggenstein
Kollagen S	Boehringer, Mannheim
Laminin	Boehringer, Mannheim
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25mM)	USB-AmershamLifeScience, Braunschweig
M-MLV-Reverse Transkriptase	Gibco-BRL-LifeTechnologies; Eggenstein
NT-3 (Neurotrophin-3)	AG Prof. Sendtner, Würzburg
10x PCR-Puffer	USB-AmershamLifeScience, Braunschweig
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
rRNasin, RNase-Inhibitor	Promega, Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase	USB-AmershamLifeScience, Braunschweig

### 3.1.6 Nukleinsäuren

DNA-Längenstandard X (0.07-12.2 kb)	Boehringer, Mannheim
Primer für RT-PCR	TIB Molbiol, Berlin
Oligo-p-d(dT) <sub>12-18</sub>	Pharmacia-Biotech, Freiburg
Primer-Mix	USB-AmershamLifeScience, Braunschweig
Random-Hexamer-Primer (50 mM)	Promega, Heidelberg
Ultrapure dNTP Set (je 100 mM)	Promega, Heidelberg

### 3.1.7 Zelllinien / Primärkulturen

Zelllinien:

DAOY, humane Medulloblastomzelllinie	AG PD Dr. Pietsch, Bonn
MHH-Med 2, humane Medulloblastomzelllinie	AG PD Dr. Pietsch, Bonn
MHH-Med 4, humane Medulloblastomzelllinie	AG PD Dr. Pietsch, Bonn
MEB-Med 8S, humane Medulloblastomzelllinie	AG PD Dr. Pietsch, Bonn

Die humanen Medulloblastom-Zelllinien MHH-Med 2 und – 4 und MEB-Med 8S, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. Pietsch aus Bonn zur Verfügung gestellt wurden, wachsen im mit Humanserum angereicherten Medium als dreidimensionale Sphäroide oder als leicht adhärierende Zellen. Sie bestehen aus undifferenzierten Zellen, die keine Marker später neuronaler oder glialer Linien exprimieren, wie etwa Neurofilamente oder das „glial fibrillary acidic protein“. Weiterhin fehlt ihnen die Expression von MHC-I- und –II-Antigenen auf der Zelloberfläche.

MHH-Med 2 und 4 wurden kontinuierlich für länger als zwei Jahre in Kultur gehalten, öfter als 50 mal passagiert und können somit als permanente Zelllinien (ZL) klassifiziert werden.

**MHH-Med 2** ist die einzige MB-ZL, die im Northern-Blot ein positives Signal für Transthyretin-mRNA zeigt. Auch Vimentin und Marker für eine frühe neuronale Differenzierung (wie neuronenspezifische Enolase, Synaptophysin, GD2 und A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> Ganglioside) werden exprimiert. Dagegen besteht keine Expression von Neurofilamenten, die Marker für eine späte neuronale Differenzierung sind. Ebenso sind GFAP und Keratin nicht nachweisbar. So hat MHH-Med 2 den Phänotyp einer neuronalen/retinalen Precursor-Zelle und kann als *in vitro*-Modell für deren Differenzierung angesehen werden (PIETSCH 1994).



**MHH-Med 4** ist gekennzeichnet durch eine fehlende Produktion des c-myc-Proteins als nukleäres Antigen. Auch das Gangliosid A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> wird im Vergleich zur Linie MHH-Med 2 in viel geringerer Menge exprimiert. Adhäsionsmoleküle und andere Oberflächenmarker fehlen weitgehend.

**MEB-Med 8S** ist als schnell wachsende Medulloblastom-Zelllinie besonders durch den positiven Besatz an TrkB gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu fehlen ihr die weiteren, für Neurotrophine kennzeichnenden Rezeptoren, wie TrkA, TrkC und p75.

Auch die MB-Zelllinie DAOY kann nach mehr als 50 Passagen als permanente Linie betrachtet werden. Die Einzelzellen erscheinen polyklonal, haben einen prominenten Zellkern und multiple Nukleoli. Sie exprimieren geringe Mengen an Fibronektin und auch neuronenspezifische Enolase, wohingegen GFAP immunocytochemisch nicht nachgewiesen werden konnte (JACOBSEN 1985).

Außer den oben genannten Zelllinien von humanen MB wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Primärkulturen von Medulloblastomen in niedriger Passage (<P5) verwendet. Dazu erfolgte in jedem Fall die Einverständniserklärung der Patienten nach genereller Zustimmung der Ethikkommission.

Die histologische Begutachtung des Tumormaterials erfolgte routinemäßig im Neuropathologischen Labor des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg.

Die im Folgenden aufgelisteten und im weiteren Rahmen dieser Arbeit benutzten Tumornummern stellen eine interne Bezeichnung des Tumorgewebes im tumorbiologischen Labor dar.

Tumor-Nr.	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht	Rezidivfreies Intervall	Oberflächenmarker - Strukturproteine	ÜLZ nach Diagnosestellung
1557	5 Jahre	m	Bei Diagnose bereits metastasiert	Desmin, GFAP, Actin, PAS, Keratin, Melanin, hoher Proliferationsindex	4 Monate
1580	5 Jahre	w	Bei Diagnose bereits metastasiert	GFAP, Synaptophysin, Neurofilamente	8 Monate
1680	7 Jahre	m	3 Jahre, dann Lokalrezidiv + diffuse supratentorielle Metastasierung	nicht bestimmt	nicht bekannt
1913	11 Jahre	w	2 Jahre, dann Lokalrezidiv + Meningeose	nicht bestimmt	nicht bekannt
1962	7 Jahre	m	Bisher rezidivfrei	GFAP, Synaptophysin, Neurofilamente, Actin, Desmin, NSE, Proliferationsindex 20 – 30%	2 Jahre
2123	> 40 Jahre	m	MB - Rezidiv	nicht bestimmt	nicht bekannt

**Tabelle 5: Klinische Daten zu den in dieser Arbeit untersuchten Tumorbiopsien/Patienten.**

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologisch

#### 3.2.1.1 *Allgemeines*

Sterile Bedingungen waren die Voraussetzung für alle Zellkulturarbeiten. Wenn im Folgenden von Zelllinien die Rede ist, so sind damit die Medulloblastom-ZL gemeint, die von der Bonner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden. Diese werden dort schon länger in Kultur gehalten und sind entsprechend genau charakterisiert.

Bei Primärmaterial handelt es sich um MB, die entweder im OP der Neurochirurgischen Universitätsklinik operiert wurden und deren Proben zur weiteren Aufarbeitung in das tumorbiologische Labor der Neurochirurgie transferiert wurden, oder um bereits asservierte Tumorproben der Hirntumorbank des tumorbiologischen Labors.

### 3.2.1.2 Zellkultur

Zellkulturmedien:

**für humane MB-Zelllinien und MB-Primärkulturen („Medullomedium“):**

- 500 ml DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium)  
mit 4,5 g/l Glukose
- 50 ml Humanserum (zentrifugiert mit 4000 rpm für 10 min  
bei 4°C mit Bremse
- 10 ml L-Glutamin (= 3,5 mM)

**für DAOY und Brain-Aggregates:**

- 500 ml DMEM mit 1 g/l Glukose
- 60 ml FCS (fetales Kälberserum), hitzeinaktiviert
- 10 ml NEA`s (nicht-essentielle Aminosäuren)
- 2 ml Penicillin (= 36 U/ml) / Streptomycin (= 35 µg/ml)

**für Versuchsansätze: serumfreies Medium:**

- 500 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose
- 10 ml L-Glutamin

**20 %-iges Medium:**

- 100 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose
- 20 ml Humanserum
- 2 ml L-Glutamin

Tumore, die im OP der Neurochirurgie Würzburg operiert werden, kommen zum Schockgefrieren direkt in flüssigen Stickstoff. Sie werden entweder als Nativproben in der Tumorbank der Neurochirurgischen Universitätsklinik asserviert oder in Zellkulturmedium zur weiteren Verarbeitung ins tumorbiologische Labor transferiert. Hier wird die Tumorprobe mit Skalpell vorsichtig mechanisch zerkleinert. Das so gewonnene Zellmaterial wird zusammen mit dem jeweiligen Medium in Zellkulturflaschen gegeben.

Die MB-Zellen werden je nach Zellmenge in 25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 5 bzw. 15 ml Medullomedium kultiviert. Die Inkubation der Zellen wird bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rel. Luftfeuchtigkeit im Brutschrank durchgeführt.

Da die MB-Zellen im Gegensatz zu z.B. Glioblastomen nicht auf der Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße wachsen, sondern als dreidimensionale Zellaggregate in Suspension, lässt man sie zum Mediumwechsel absetzen und nimmt zwei Drittel des Mediums vorsichtig ab. Mit Medullomedium wird die Flasche dann wieder auf 5 bzw. 15 ml aufgefüllt.

Zum Passagieren splittet man im Verhältnis 2:1, indem die Hälfte des Mediums mit den darin befindlichen MB-Sphäroiden in eine neue Flasche umgesetzt und dann wieder mit frischem Medium aufgefüllt wird. Auch in der Flasche, aus der die Zellen entnommen wurden, wird das Medium wieder ergänzt.

#### **Einfrieren und Auftauen von MB-Zellen:**

Einfriermedium: 45 ml Medullomedium  
5 ml DMSO (= 10% DMSO)

Die Zellen bzw. Sphäroide lässt man absetzen (nie zentrifugieren). Das Medium wird, soweit möglich, abpipetiert und entweder verworfen oder für weitere Versuche bei -20°C gelagert. Kryoröhrchen werden beschriftet und das Einfriermedium auf Eis angesetzt. Die Zellen werden, abhängig von der Zelldichte, in 1 bis 3 ml Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wird zu je 1 ml pro Kryoröhrchen verteilt und sofort auf Eis gestellt. Die Röhrchen werden bei -80°C zwischengelagert und später zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen der MB-Zellen werden die Kryoröhrchen in 37°C warmes Wasser getaucht. Die Zellen werden in vorgewärmtes Medullomedium aufgenommen und zunächst in einer kleinen Flasche weiterkultiviert. Um das toxische DMSO wieder zu entfernen, wird bereits nach 30 min ein Mediumwechsel durchgeführt. Besonders in den ersten drei Tagen nach dem Auftauen ist darauf zu achten, dass ein sich evtl. bildender MB-Zellhaufen sofort aufsuspendiert wird, um den Zellen eine Sphäroidbildung zu ermöglichen.

### **Stimulation der MB-Sphäroide:**

Die Stimulation der MB erfolgte in ungecoateten 6-well-Platten oder 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen über einen Zeitraum von 24, 48 bzw. 96 h. Die Konzentration der neurotrophen Faktoren betrug hierbei für BDNF und NT-3 jeweils 50 ng/ml und für das Cytokin CNTF 10 ng/ml. Die blockierenden Antikörper wurden in den Versuchsansätzen im zehnfachen Überschuss (500 ng/ml) zugegeben.

### 3.2.1.3 Coaten der Platten

Die verwendeten 6- bzw. 96-well-Platten wurden vor dem Versuchsansatz mit verschiedenen Beschichtungsgrundlagen gecoatet, um den Zellen ein Anhaften auf der Unterlage zu ermöglichen.

#### **Agar:**

1g Agar Noble wird in 20 ml ultra-pure water durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 80 ml vorgewärmtem serumfreiem bzw. 10- oder 20%-igem Medullomedium. Je 100 µl dieses Gemisches werden in ein well einer 96-well-Platte pipettiert und für etwa 10 min in der Sterilbank stehen gelassen, bis es fest geworden ist.

Die mit serumfreiem Medium gecoateten 96-well-Platten wurden für die Kokultur-Experimente mit Brain-Aggregates verwendet.

#### **ECM-Komponenten:**

##### Kollagen S und Laminin:

Nach dem langsamen Auftauen der Beschichtungsgrundlagen auf Raumtemperatur wird die jeweilige Versuchskonzentration durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Die vom Hersteller angegebene optimale Konzentration für Kollagen S (Mischung aus Kollagen I und III) liegt bei 3 mg/ml und für Laminin bei 20 µg/ml. Für die Medulloblastom-Migrationsversuche stellte sich allerdings im Laufe dieser Arbeit eine effektivere Arbeitskonzentration für Laminin von 30 µg/ml heraus. Es werden je 100 µl der auf Eis vorbereiteten und gut gemischten Lösung in ein well einer 96-well-Platte pipettiert. Vorsichtig werden die so beschichteten Platten für 60 min zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wird der noch flüssige Überstand abgesaugt. Nun können die gecoateten Platten im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder auch sofort für Versuchsansätze verwendet werden.

Matrigel:

Zur Vorbereitung müssen alle notwendigen Materialien auf 4°C vorgekühlt werden. Das bei –20°C gelagerte Matrigel (= Basalmembranextrakt mit verschiedenen Bestandteilen der ECM) wird langsam auf Eis aufgetaut. Unverdünnt und zügig werden 25 µl der Lösung pro well einer 96-well-Platte pipettiert. Besonders sollte darauf geachtet werden, in die Mitte des jeweiligen wells zu pipettieren und eine Luftblasenbildung zu vermeiden. Die so beschichtete Platte bleibt für etwa 30 min unter dem Flow liegen, bis das Matrigel fest ist. Danach muss die gecoatete Platte sofort für Versuchsansätze verwendet werden.

Für die Migrationsversuche finden Laminin-, Kollagen S- und Matrigel-beschichtete 96-well-Platten Verwendung.



### 3.2.1.4 Anlegen von fetalen Rattenhirnaggregaten

Ziel dieses Verfahrens ist, Sphäroide mit definierter Zusammensetzung aus fetalem Rattenhirn anzulegen, um diese im Folgenden für Konfrontationsassays zu verwenden. Diese Rattenhirnaggregate (brain aggregates = BA`s) werden wie folgt angelegt:

Trächtige BD IX-Ratten werden am 18.Tag nach Befruchtung dekapitiert. Die Embryonalschläuche werden aus der Bauchhöhle entfernt und anschließend die Embryonen entnommen. Nach dem Freipräparieren werden die embryonalen Hirne gepoolt und dann sorgfältig mit Skalpellen zerkleinert. Dadurch wird der Zellverband aufgelockert. Diese homogene Hirnzellmasse wird nun zur Reaggregation zu BA`s nach folgendem Schema verarbeitet:

- Die Hirnzellmasse wird in 5 ml steriler PBS aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationstube überführt.
- Fünf bis zehn min stehen lassen; hierbei sinkt das Hirngewebe als Pellet ab und Detritus und Meningen können mit dem Überstand abpipettiert werden.
- Das Pellet wird in 4 ml 37°C warme Trypsin-Lösung (0,025% [0,05% Normaltrypsin 1:1 mit steriler PBS verdünnt]) aufgenommen und gevortext.
- Fünf min im Wasserbad bei 37°C stehenlassen; (hierbei nach zwei min schütteln bzw. vortexen und die restlichen drei min ruhig im Wasserbad lassen).
- Den klaren, die gewünschten Hirnzellen enthaltenden Überstand in ein 15 ml-Tube überführen, in das 2 ml vorgewärmtes 10%-iges Medium vorpipettiert sind.
- Zum Rest erneut Trypsin geben und diese Prozedur viermal wiederholen.
- Anschließend die in Medium vorliegenden vier Fraktionen Zellen 5 min. bei 1200 rpm ungebremst zentrifugieren.
- Das gesamte Zellpellet aufnehmen und poolen.

- 
- Die gewonnene Einzelzellsuspension auf eine mit Agar gecoatete 24-well-Platte verteilen; pro well Zellen eines Embryos in 2 ml Medium.
  - Im Brutschrank unberührt 2d stehen lassen; danach je nach Zelldichte grob vereinzeln.
  - Am 4.Tag werden die sich bildenden BA`s vereinzelt, das heißt in Agar-gecoatete 24-well-Platten wird pro well vorsichtig ein BA mit Hilfe einer Pasteurpipette pipettiert.
  
  - Im Brutschrank über insgesamt 21Tage reifen lassen; dabei einmal pro Woche Mediumwechsel; nach drei Wochen haben die BA`s die Reifung abgeschlossen und können zu Experimenten benutzt werden.

### 3.2.1.5 Konfrontationskulturen

Dieser Kokulturassay dient der Untersuchung des Invasionsverhaltens von dreidimensionalen Zellkulturen. Im Rahmen dieser Arbeit werden Tumorsphäroide aus MB-Zelllinien bzw. aus Primärmaterial mit BA`s kokultiviert.

Für die Konfrontationsexperimente nimmt man vitale Sphäroide bzw. BA`s mit einem Durchmesser von 200-250  $\mu\text{m}$  unter dem Mikroskop mit einer Pasteurpipette auf und setzt sie in ein well einer mit Agar gecoateten 96-well-Platte. Im Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  pro well (serumfreies Medullomedium incl. Zusätze in der jeweiligen Konzentration) werden die beiden Sphäroide mit der Spitze einer sterilen Kanüle einander angenähert, sodass ein leichter Kontakt besteht.

Das Invasionsverhalten wird im 12h-Abstand fotografisch festgehalten (in der Regel bis 96h nach Versuchsansatz) und anschließend ausgewertet. Alle 24h fanden Medium- und Faktorenwechsel statt.

### 3.2.1.6 Migrationsassay

Für Zellwanderungsversuche werden Einzelsphäroide in wells einer 96-well-Platte gegeben und zentriert. In unterschiedlichen Versuchsansätzen fanden MB-Sphäroide nach 0-, 24-, 48- und 96-stündiger Faktorenvorbereitung Verwendung. Es wurde bis zu vier Tage lang auf der jeweiligen Beschichtungsgrundlage inkubiert. Sowohl das Volumen des Sphäroids am Tag 0, als auch das Areal der von ihm auswandernden Zellen nach 24, 48 und 72h werden mit dem Videodokumentationssystem aufgenommen und gespeichert. Anhand dieser Bilder kann mit Hilfe des Computerprogramms „Vermessung von Zellkulturen“ Version 1.0 (B. Bögel und O. Hoffmann, 1996) die Auswertung erfolgen. Zunächst wird die ebenfalls aufgezeichnete Messskala eingelesen. Alle bei entsprechendem Objektiv aufgenommenen Bilder werden anschließend der Reihe nach aufgerufen und immer nach dem gleichen Verfahren ausgewertet. Die Sphäroide werden mit einer Ellipse umrandet und im Anschluss das Migrationsareal markiert. Das Computerprogramm gibt für jede Aufnahme den Median der von den auswandernden Zellen zurückgelegten Strecke an. Durch Subtraktion der Werte nach 72h bzw. am Tag 0 lässt sich auch hier die Steigerung des Migrationsareals berechnen und der jeweilige Mittelwert bestimmen.

#### **Methylenblaufärbung:**

Um eine Auswanderung der MB-Zellen optisch gut darstellen zu können, werden die Sphäroide aus dem Migrationsassay nach Inkubationsende mit 1x PBS gespült, dann mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) für 10 min fixiert und anschließend nochmals mit 1x PBS gewaschen. Nun kann für etwa 20 sec mit Methylenblau gefärbt und dann sofort mit Wasser gespült werden. Diese gefärbten Kokulturen sind fotografisch auswertbar und können gelagert werden.

### **Invasionsassay (Kersch-Kammer):**

Um sich der physiologischen Situation weiter anzunähern, wird im folgenden Versuchsansatz weiße Hirnsubstanz (fetales Schweinehirn) als Grundlage zur weiteren Untersuchung des Wanderungsverhaltens von MB verwendet. Hierauf werden MB-Späroide aufgebracht und unter variierten Bedingungen kultiviert.

Im Vergleich zum Migrationsassay z.B. auf Matrigel sind hier sowohl Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Laminin, Kollagen IV, Entactin) als auch zelluläre Komponenten wie Myelinscheiden enthalten. Besonders ist auf die dreidimensionale Architektur hinzuweisen, wodurch zusätzlich zur Migration auch ein Invadieren der Zellen ermöglicht wird. Es wurden Ansätze der MB-Zelllinien MHH-Med 4 und MEB-Med 8S im serumfreien, 10%-igen und 20%-igen Medullomedium unterschieden. In den Invasionskammern (Costar™) wird ein Versuch wie folgt angesetzt:

- Medium: 100 µl je Invasionskammer
- Porengröße: 8 µm
- Vorbereitung im Kryostaten bei -20°C
- Schnittdicke der weißen Hirnsubstanz: 60 µm
- Aufbringen von 3 MB-Sphäroiden und Auffüllen mit 100 µl Medium und Inkubation im Brutschrank für 24h.
- Anschließend Methylenblau-Färbung und lichtmikroskopische Analyse.

## 3.2.2 Molekularbiologisch

### 3.2.2.1 RNA

Zur RNA-Isolierung wird der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die MB-Zellen werden in 15 ml-Tubes für 5 min bei 2000 rpm und 4°C mit Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet kurz trocknen gelassen und dann in 350 µl RLT-Lysispuffer aufgenommen und durch Vortexen völlig gelöst. Nach Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol (= 1%) wird erneut gevortext und entweder direkt weiter aufgearbeitet oder bis zur im Folgenden beschriebenen Aufarbeitung bei –20°C zwischengelagert.

- Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) und mischen mit der Pipette.
- Homogenisat auf Säule geben, 15 sec bei 10000 rpm zentrifugieren und Durchlauf verwerfen.
- 700 µl Waschpuffer RW1 auf die Säule geben, 15 sec bei 10000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen.
- Säule in neues 2 ml-Tube stellen.
- 500 µl Waschpuffer RPE auf die Säule geben, 15 sec bei 10000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen.
- Erneut 500 µl RPE-Puffer zugeben, 2 min bei 14000 rpm zentrifugieren.
- Säule in neues 1,5 ml-Tube stellen.
- 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Mitte der Säule pipettieren, 5 min stehenlassen und dann bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Erneut 50 µl RNase-freies Wasser zugeben, 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren.

Es liegt nun RNA gelöst in 100 µl RNase-freiem Wasser vor.

Die **photometrische Quantifizierung** der aufgereinigten RNA wird an einer Quecksilberniederdrucklampe als Lichtquelle durchgeführt. Das Extinktionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm im Vergleich zu Proteinen, die ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Nach Lambert-Beer ist hierbei die

Extinktion als Produkt aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ( $[\varepsilon]$  = ml/g cm) der Konzentration der Lösung ( $[c]$  = g/100ml) und der Schichtdicke ( $[d]$  = cm) definiert. Diese unterschiedlichen spektralen Eigenschaften finden ihre Anwendung in der Reinheitskontrolle der RNA (optimal:  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0).

Zuerst wird mit einem Leerwert (Küvette mit Wasser) die Referenz am Photometer auf 0 eingestellt und anschließend die Absorption (= OD) der Proben bei 260 nm gemessen. Hierfür werden 10  $\mu$ l der frisch isolierten RNA-Lösung mit 990  $\mu$ l Wasser verdünnt. Die Absorption, bei der  $OD_{260} = 1$ , beträgt bei einer Schichtdicke von 1 cm für RNA 40  $\mu$ g/ml.

Somit lässt sich nach der folgenden Formel der Gehalt an RNA in der Ausgangslösung in  $\mu$ g/ml berechnen:

$$c(\text{RNA}) = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung} (=100) \times \text{Menge der RNA-Lösung} (=0,1\text{ml}) / 100 \mu\text{l}$$

### 3.2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Mit Hilfe von Reversen Transkriptasen kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierbei wird ein Enzym verwendet, das aus dem murinen Maloney-Leukämie-Virus (M-MLV) isoliert wurde.

Zur cDNA-Synthese wird 1  $\mu$ g gesamtzelluläre RNA in 5  $\mu$ l DEPC-Wasser gelöst eingesetzt. (Falls die Konzentration der RNA zu gering ist, muss ein größeres Volumen an gelöster RNA in der Speedvac eingedampft werden, um das Ausgangsvolumen von 5  $\mu$ l zu erhalten). Hierzu werden 3  $\mu$ l Primer-Mix (= 2 $\mu$ l Oligo-dT-Primer [1  $\mu$ g/ $\mu$ l] + 1  $\mu$ l Random-Hexamer-Primer) gegeben, 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Hierdurch heften sich auf der gesamten RNA zufallsmäßig Startsequenzen (Primer) für eine folgende Strangverlängerung an.

Es folgt die Zugabe von 17  $\mu$ l des unten beschriebenen Mastermixes und eine Inkubation für 70 min bei 37°C.

1x Mastermix: 5,0 µl 5x Erststrangpuffer  
2,5 µl DTT (0,1 M)  
2,5 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
0,8 µl rRNasin (40 U/µl)  
1,0 µl M-MLV. Reverse Transkriptase (200 U/µl)  
ad 17µl DEPC-Wasser

Anschließend wird das Enzym durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und 1-2 min auf Eis abgeschreckt.

Somit erhält man cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl, welche bei -20°C gelagert und zur PCR eingesetzt werden kann.

### 3.2.2.3 PCR

Mit der Entdeckung und Isolierung der thermostabilen DNA-Polymerase Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (SAIKI 1988), wurde die Voraussetzung geschaffen, um bestimmte cDNA-Sequenzen mit hoher Spezifität und Ausbeute bei einer stringenten Temperatur von 72°C mit der PCR zu amplifizieren. In der Polymerase-Ketten-Reaktion wird die Eigenschaft der DNA-Polymerasen genutzt, matrizenabhängig neue DNA-Stränge zu synthetisieren und zwar durch Katalysieren einer schrittweisen Addition von frei vorliegenden Desoxyribonukleotid-Einheiten (dNTP`s) an eine DNA-Kette.

Zwei einzelsträngige Oligonukleotid-Einheiten aus 20-30 Basen (=Primer), die im Abstand von etwa 150-700 bp an jeweils einen der beiden komplementären DNA-Stänge binden, dienen als Starter für die Polymerase. Die Kettenverlängerung erfolgt in 5'-3'-Richtung. Voraussetzung hierfür ist, dass die Base des neuen Nukleotids zu der Base auf dem Matrizenstrang komplementär ist. Zusätzlich benötigt das Enzym Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Mit Hilfe eines Mikroprozessors wird die matrizenabhängige Synthese in Zyklen wiederholt. Dadurch verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Zahl der spezifischen DNA-Fragmente (= exponentielle Amplifikation: n Zyklen → 2<sup>n</sup> Kopien). Allerdings nimmt die Aktivität



der Taq-Polymerase mit der Zeit ab und ihre Konzentration im Verhältnis zur Menge der amplifizierten Matrizen-DNA sinkt stark ab, sodass die Effektivität in der Praxis geringer ist.

Ein Zyklus der PCR-Reaktion besteht aus drei Phasen:

- **Denaturierung** der cDNA bei 95°C, um die Doppelstränge aufzulösen und die Anlagerung zu ermöglichen.
- **Anlagerungsphase**, in der sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen anlagern. Die optimale Temperatur ergibt sich dabei aus der Zahl der Wasserstoff-Brückenbindungen, die die Primer mit ihrer komplementären Sequenz eingehen können (=GC-Anteil der Primer). Die Anlagerungstemperatur lässt sich für 20mere Oligosequenzen wie folgt berechnen:  $T = [(GC\text{-Gehalt}) \times 4 + (AT\text{-Gehalt}) \times 2] - 5$ . Wird die Temperatur niedriger als berechnet angesetzt, so sinkt die Stringens der Reaktion.
- **Polymerisationsphase**: hierbei werden die komplementären Stränge durch die Taq-Polymerase bei 72°C vervielfältigt.

### **Semiquantitative PCR:**

Um die Effizienz der cDNA-Synthese nachzuweisen und die jeweiligen cDNA-Mengen darauf aufbauend einander anzugleichen, wird zuerst eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA wird ubiquitär in einer recht konstanten Menge exprimiert, da das Stoffwechsellenzym an der Glykolyse beteiligt ist („Housekeeping-Gen“). Aus diesem Grund wird diese spezifische cDNA als interner Konzentrationsstandard für die Gesamt-cDNA verwendet.

Für die PCR werden 3 µl der zu testenden cDNA bzw. als Negativkontrolle H<sub>2</sub>O und als Positivkontrolle bereits getestete cDNA mit 47 µl Mastermix vermischt. Ein PCR-Ansatz besteht aus einem Gesamtvolumen von 50 µl. Dabei setzt sich der Mastermix pro Ansatz wie folgt zusammen:

---

1x Mastermix:	5,0 µl 10x PCR-Puffer
	5,0 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	4,0 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)
	0,5 µl GAPDH-sense Primer (20 µM)
	0,5 µl GAPDH-antisense Primer (20 µM)
	0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
	ad 47 µl H <sub>2</sub> O

Ein Mastermix in diesem Ansatz wird mit PCR-Puffer und MgCl<sub>2</sub> des sogenannten Amersham-Sets angesetzt. Dieser Mastermix wird zur cDNA gegeben und im Thermocycler amplifiziert (Bedingungen siehe Tab. 6). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA werden die erhaltenen Banden entweder densitometrisch ausgewertet oder durch Einschätzung der unterschiedlichen Bandenintensitäten miteinander verglichen und die cDNA-Mengen derart variiert, dass bei einer erneuten PCR von gleichen Ausgangsmengen in jedem Ansatz ausgegangen werden kann. Dies wird durch erneute PCRs für GAPDH überprüft, bis die Bandenintensitäten der jeweiligen Ansätze übereinstimmen. Davon kann man in allen folgenden PCRs ausgehen, so dass sich wegen resultierender Unterschiede in den Bandenintensitäten der untersuchten Gene Aussagen über die Stärke bzw. Schwäche der Expression eben dieser treffen lassen. Diese potentiellen Unterschiede werden densitometrisch ausgewertet.

Ein weiterer Unterschied in den PCR-Bedingungen liegt in der unterschiedlichen Annealing- (Anlagerungs-) Temperatur der einzelnen Primerpaare, aber auch in den Amplifikationszyklen. Die Amplifikation verläuft nur bis zu einem bestimmten Punkt exponentiell, dann wird ein Plateau erreicht. Nach Erreichen dieser Plateauphase können die Banden von Produkten, denen eine gleiche cDNA-Menge zugrunde liegt, gleiche Intensitäten trotz unterschiedlicher Expressionsstärke aufweisen. Der Zeitpunkt des Überganges in die Plateauphase ist wiederum von der Ausgangszahl der amplifizierten Moleküle abhängig (KELLOGG 1990).

Da die mRNA bzw. cDNA der GAPDH in hoher Anzahl vorliegt, ist hier die Plateauphase schneller erreicht als bei geringer exprimierten mRNAs. Um potentiell quantitative Unterschiede in der mRNA-Expression analysieren zu können, muss eine Anzahl von Zyklen durchlaufen werden, bei der einerseits das Produkt nachweisbar ist, bei der aber andererseits die Plateauphase noch nicht erreicht ist. Deshalb werden in vorgeschalteten Experimenten die PCR-Produkte mit unterschiedlichen Zykluszahlen amplifiziert und analysiert. Die für die jeweiligen Gene optimierten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

	Primersequenz	Annealing Temperatur	Konz. MgCl <sub>2</sub>	Zyklen zahl	Amplifi- kation
<b>GAPDH</b>	s GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG a TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG	68°C	2,5 mM	20	567 bp
<b>Trk B</b> (carboxy)	s TTGGCATCACCAACAGTCAGCTC a CATCTGCGACTGCGTCAGTTCC	65°C	2,5 mM	30	409 bp
<b>Trk B</b> (amino)	s AGACACTCAGGATTTGTAAGTCC a TCCGTGTGATTGGTAACATGTATT	65°C	2,5 mM	30	470 bp
<b>Trk C</b> (carboxy)	s GTCAGGGACACAAGTCCACAAG a GTGGCTGTCCATCCACAAGGATCATT	65°C	2,5 mM	30	380 bp
<b>Trk C</b> (amino)	s CCCCCATTTGCGTTATATAAACC a CACACGTGGGGGATAGTAGACA	65°C	2,5 mM	30	500 bp

**Tabelle 6: Zusammenfassung der eingesetzten PCR-Parameter.**

### **Gelelektrophorese von DNA:**

Bei der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach dem Molekulargewicht, da die Wanderungsrate der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld zum dekadischen Logarithmus ( $\log_{10}$ ) der Anzahl der Basenpaare umgekehrt proportional ist. Dies bedeutet, dass ein DNA-Fragment umso schneller im Gel wandert, desto kleiner es ist. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  proportional zum Produkt der elektrischen Parameter  $E$  (Feldstärke),  $e$  (Elementarladung),  $Z$  (Ladungszahl) und indirekt proportional zu den geometrisch-mechanischen Größen  $\eta$  (dynamische Viskosität) und  $r$  (Radius).

Somit ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit:  $v = (E \cdot Z \cdot e) / (6 \pi \cdot \eta \cdot r)$

Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen laufen die Nukleinsäuren in Richtung Anode. Durch Zugabe von interkalierendem Ethidiumbromid (EtBr) in das Gel kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Verfolgung der Lauffront wird Bromphenolblau in den Laufpuffer gegeben. Um die Größe der PCR-Produkte später bestimmen zu können, läuft in jedem Gelansatz ein Molekulargewichtsmarker mit.

Zur Herstellung eines 1,5%-igen Agarosegels werden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gegeben und die Mischung in der Mikrowelle solange aufgekocht, bis sie klar ist. Nach kurzem Erkalten und Zusetzen von EtBr-Lösung (10  $\mu$ l pro 100ml) wird sie luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wird die Gelkammer mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllt, bis das Gel gerade bedeckt ist. 17  $\mu$ l des PCR-Amplifikationsprodukts werden mit 3  $\mu$ l des sechsfach konzentrierten DNA-Ladepuffers gemischt und die Geltaschen damit beladen. Zusätzlich wird der DNA-Längenstandard X aufgetragen.

Durch Anlegen einer Spannung von 80-100 Volt erfolgt eine Auftrennung der DNA-Fragmente. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolblaubande des Ladepuffers beinahe am Gelende angelangt ist. Mit Hilfe des Videodokumentationssystems kann das Ergebnis im Bild festgehalten werden.

50x TAE-Stammpuffer:	242 g Tris, 51 ml Eisessig, 100 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)
EtBr-Stammlösung	(10 ml/ml H <sub>2</sub> O)
6x DNA-Ladepuffer	(30% Glycerin, je 0,25% BPB und XC)
DNA-Längenstandard X	

### 3.2.3 Proteinbiologisch

#### 3.2.3.1 Zymographie

Bei der Zymographie wird eine Proteinlösung bzw. ein Zellkulturüberstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, in dem zusätzlich das Substrat des zu untersuchenden Enzyms gelöst ist. Während der Elektrophorese werden die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Herauswaschen des denaturierenden SDS wird das Gel in einem enzymespezifischen Puffer inkubiert und anschließend angefärbt. Bei der Zymographie von Proteasen wird das nicht abgebaute Proteinsubstrat im Gel durch den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue-R250 angefärbt, während die Aktivität der Proteasen eine klare Bande erzeugt, da hier das entsprechende Proteinsubstrat abgebaut wurde.

**Konditionierung von Medium:** Bei der Zymographie von konditioniertem Medium wird untersucht, ob ein Zusatz wie z.B. NT-3 oder ein entsprechender Antikörper Einfluss auf die Menge an sezernierten Proteasen und/oder auf das Verhältnis inaktiver zu aktiver Proteasenform hat. Zur Gewinnung der Zellkulturüberstände werden die Zellen in serumfreiem Medium mit Zusätzen in der gewünschten Konzentration inkubiert. Kontrollzellen bleiben unbehandelt bzw. werden mit dem jeweiligen Faktor-Antikörper versetzt. Nach einer bestimmten Konditionierungszeit wird das Medium abgenommen und in Reaktionsgefäßen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

**Proteinbestimmung:** Um die in der Zymographie erhaltenen Ergebnisse einschätzen und Vergleiche mit anderen Proben ziehen zu können, ist es notwendig die eingesetzten Proteinmengen der einzelnen Proben einander anzugleichen. Man kann die Proteinmenge des konditionierten Mediums bestimmen und so die Proteinmenge, die man in die Zymographie einsetzt, angleichen. Zur Proteinbestimmung nach Bradford wird ein Zehntel des gewonnenen Konzentrates eingesetzt. Diese Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue-G250 an basische Aminosäuren bindet und in diesem Zustand Licht der Wellenlänge 595 nm absorbiert. Diese Absorption

ist über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration. Um Aufschluss über die absolute Proteinmenge zu erhalten wird eine Eichgerade mit Hilfe von BSA-Standardlösungen erstellt.

Diese Lösungen werden mit der entsprechenden Menge 5x Färbelösung nach Bradford gemischt, 30 min bei RT inkubiert und daraufhin die Absorption der Proben bei Licht von 595 nm Wellenlänge gemessen. Die Proteinmengen der verschiedenen Proben können nun mit Hilfe der BSA-Eichgerade bestimmt und einander angeglichen werden.

**SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):** Die angeglichenen Proteinmengen des konditionierten Mediums werden mittels Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gellösung wird zwischen zwei Glasplatten gegossen (10 x 12 cm):

Gel vorbereiten:    Glasplatten mit EtOH reinigen  
                         mit Klemmen beide Platten befestigen,  
                         Spacer am Rand  
                         1%-Agarose im 1x SDS-Laufpuffer kochen  
                         Platten mit Agarose abdichten  
                         (unten Strich, aufsetzen, Seiten)

Lösung für 2 Untergele:    4,66 ml 30% bis-Acrylamid  
   3,5 ml 1,5 M Tris pH 8.8/4% SDS  
   4,66 ml angewärmte Typ 1 Gelatine  
   1 ml dH<sub>2</sub>O  
   140 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)  
   7 µl TEMED

Dieses Gel wird bis ca. 1 cm unter der Kammkante zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine gerade Oberfläche ohne Luftblasen zu erhalten wird mit ca.

1 ml H<sub>2</sub>O ausgegossen, so dass das Sammelgel gegossen werden kann. Dazu mischt man für zwei Gele folgende Substanzen:

1 ml Bis-Acryamid (30%)  
2,75 ml H<sub>2</sub>O  
1,25 ml 4x Puffer 0,5 M Tris-HCl/4% SDS; pH 6.8  
50 µl APS  
2,5 µl TEMED

Direkt nach Überschichten des Untergels mit dem Sammelgel wird der Kamm eingesteckt. Nach 30-45 min Polymerisation wird das Gel in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS) übergossen. Der Kamm wird gezogen und pro Laufbahn werden 15 µl Proteinlösung gemischt mit 5 µl Probenpuffer (0,25 M Tris, 50% Glycerin, 3% SDS, 0,1% BPB) aufgetragen. Die Elektrophorese wird unter Kühlung des Puffers bei 30 bis 80 mA für 3 bis 5 h durchgeführt. Das Gel wird anschließend von den Glasplatten gelöst und weiterbehandelt (s.u.)

**Gelatinezymographie:** Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gelatinezymographien durchgeführt, zum Nachweis der Gelatinasen A und B (MMP-2 bzw. -9). Dazu wird das Substrat Gelatine (1 mg/ml) in das SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt. Unter den vorliegenden Bedingungen werden allerdings auch die normalerweise inaktiven Proformen der Protease durch das SDS aktiviert. Das Gelatinegel wird 30 min in 2,5% Triton-X 100 geschwenkt, um das denaturierende SDS herauszuwaschen. Danach wird das Gel in Enzympuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 5 mM CaCl<sub>2</sub>) für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wird das Gel für 45 min in Färbe-/Fixierlösung (50% MetOH, 10% HAc, 0,1% Coomassie-Blue-R250) geschwenkt und anschließend 60 min mit Entfärbelösung (10% EtOH, 7% HOAc in dH<sub>2</sub>O) behandelt. Auf einem hellen Untergrund (starke Lampe) werden nun die durch die Enzymaktivität erzeugten hellen Banden des ansonsten blauen Gels analysiert.



Die Verwendung des vorgefärbten Molekulargewicht-Standards ermöglicht die Zuordnung der Banden zur entsprechenden Gelatinase.

**Caseinzymographie:** Der Ablauf entspricht dem der Gelatinezymographie, außer dass anstatt Gelatine das Substrat Casein für den Nachweis von MMP-3 verwendet wird. Außerdem verbleiben die Gele für 48- statt für 24h im Substratpuffer.

### *3.2.3.2 Immunhistochemie: Apoptose-, Trk-, Ki-67-Färbungen*

#### **Beschichten von Objektträgern mit Poly-L-Lysin:**

Materialien: Aceton  
Poly-L-Lysin

Die Objektträger werden zur Vorbereitung 15 min in Aceton gestellt. Auf diese Weise sollen sie von störenden Fetten befreit werden. Anschließend lässt man sie an der Luft trocknen.

Das Poly-L-Lysin wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einer Gebrauchskonzentration von 1 mg/ml gelagert. Direkt nach dem Auftauen werden 10 $\mu\text{l}$  dieser Lösung auf einen Objektträger pipettiert und dort ausgestrichen. Bevor man die beschichteten Objektträger bei Raumtemperatur lagern kann, werden sie abermals an der Luft getrocknet.

**Cytospins:**

Materialien: Mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger  
1x PBS

Die in den Versuchen verwendeten MB-Zelllinien MHH-Med2, MHH-Med4, MEB-Med8S und DAOY sollen für spätere Färbungen per Cytospin – also über eine Zentrifugation – auf die beschichteten Objektträger transferiert werden. Etwa 15 Sphäroide werden in 500µl PBS gesammelt. Sie werden in entsprechende Vorrichtungen des Cytospins pipettiert. Man zentrifugiert die Zellen 5 min bei 1200 rpm ohne Bremse. Die Sphäroide befinden sich nun auf dem Objektträger und werden für mindestens 4h an der Luft getrocknet. Anschließend werden sie 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und ebenfalls an der Luft 15 min getrocknet. Dann können sie, verpackt in Alufolie, bei –20°C gelagert werden.

Das Auftauen sollte langsam, während einer Stunde, bei 4°C erfolgen.

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um zelluläre Antigene nachzuweisen und zu lokalisieren. Dabei bindet ein primärer Antikörper an das Protein, welches man nachweisen möchte. In einer weiteren Reaktion bindet ein markierter sekundärer Antikörper an den Primär-AK. Nach Zugabe eines Substrates kommt es durch den markierten Sekundär-AK zu einer Farbreaktion, die damit ein Signal an der Stelle des nachgewiesenen Proteins abgibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IHC an Cytospins eingesetzt, dementsprechend also an auf Objektträgern fixierten Einzelzellsuspensionen der entsprechenden MB-Zelllinien. Dabei wurde die Expression von Ki-67, TrkB und –C und der Apoptoseindex untersucht. Zur Durchführung aller immunhistochemischen Stainings wurde die Avidin-Biotin Peroxidase Methode benutzt (Vector Laboratories Kit). Die Peroxidase Reaktion wurde mit 0,5% Diaminobenidin entwickelt. Die Avidin Methode beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglycoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu

binden. Die freien Stellen des Avidin Moleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird mit dem Chromogen DAB sichtbar gemacht. Die Konzentration der angewendeten Primärantikörper war wie folgt:

MIB 1	70 ng/ml
TrkB	50 ng/ml
TrkC	50 ng/ml
Apoptose	lt. AP-Kit

Als Positivkontrolle dienten für die Ki-67 Färbung Glioblastomschnitte mit bekannter Proliferation, für die TrkB- bzw. TrkC-Färbungen die Zelllinie MHH-Med 4 (nach Angaben der AG Pietsch in Bonn) und für die Apoptosefärbung wurden mit DNase behandelte Schnitte verwendet. Für Negativkontrollen wurde die sekundäre Antikörperreaktion nicht durchgeführt.

Die Cytospins wurden innerhalb einer Stunde langsam aufgetaut und anschließend in Aceton für 10 min fixiert. Nach Waschen und Lufttrocknen wurden die Schnitte mit Pap-Pen abgegrenzt. Endogene Peroxidase Aktivität wurde sowohl in MetOH/0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch durch Auftragen von 10% normalem Pferdeserum für 30 min blockiert. Überschüssiges Serum wurde abgetupft, bevor mit dem Primär-AK (etwa 30 µl/Cytospin) für 12h in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert wurde. Die Cytospins wurden anschließend in PBS (pH 7,5) für fünf min gewaschen und mit einem biotinylierten Pferde-anti-Maus IgG Sekundär-AK für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen für 5 min in frischem PBS folgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex.

Die Peroxidase Reaktion wurde mit 0,5% Diaminobenzidin (80 µl/Schnitt) für 5-10 min entwickelt. Nach zehn min spülen mit Wasser wurden die Objektträger abschließend leicht mit frisch filtriertem Hämatoxylin gegengefärbt und dann mit Xylol eingedeckt. Die endgültige Auswertung der unterschiedlichen

Färbereaktionen erfolgte durch die Autorin und die Herren Dres. Vince und Herbold semiquantitativ an einem histologischen Mikroskop. Unabhängig davon erfolgte für die KI-67-Färbung ein Rating und erneute pathologische Begutachtung durch Herrn PD Dr. T. Pietsch am Pathologischen Institut der Universität Bonn.

### 3.2.3.3 *Western Blot*

Mit dem Western Blot werden Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, mit einer Antikörperreaktion nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Western Blot benutzt, um die Proteinexpression der phosphorylierten MAP-Kinase verschiedener stimulierter MB-Zelllinien zu bestimmen.

Nach einer Proteinbestimmung mit der zu untersuchenden Probe und Testgelen mit verschiedenen Verdünnungen, um so die Konzentration der besten Proteinauftrennung zu bestimmen, wird anschließend die jeweilige optimale Antikörperkonzentration für die zu untersuchende Probe bestimmt. Mit dieser ermittelten Konzentration wurden die Antikörpertests wie folgt durchgeführt:

Die Gelelektrophorese läuft als SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, ähnlich wie im Absatz 3.2.3.1 Zymographie beschrieben, ab. Eine Menge für zwei Gele wird vorpipettiert:

Trenngel:	30% Polyacrylamid/bis	4,2 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS	0,1 ml
	dH <sub>2</sub> O	3,1 ml
	APS	0,1ml
	TEMED	10 µl

---

Sammelgel: 30% Polyacrylamid/bis	1 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
dH <sub>2</sub> O	2,75 ml
APS	50 µl
TEMED	2,5 µl

und das polymerisierte Gel mit den Proben beladen (Proben vorher 5 min bei 95°C erhitzen, 20 µl pro lane laden). Die Gele werden für etwa 90 min bei 150 V (SDS-Laufpuffer; 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf werden die Gele für 30 min im gekühlten Transferpuffer bei RT auf einem Schüttler equilibriert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wird vorbehandelt:

10 sec Methanol	
2 min dH <sub>2</sub> O	
5 min Transferpuffer	(24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol (v/v), pH 8,3)

Der Tankblot wird aufgebaut und läuft für etwa 70 min bei 150 V. Das Ergebnis des Blots wird mit Ponceau-Rot-Färbung überprüft. Anschließend wird der Filter in Blocking-Lösung (PBS, 5% fettfreie Trockenmilch, 0,05% Tween20) über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

Am zweiten Tag wird die Membran gewaschen, 2x kurz in Waschpuffer, dann 2x 5 min, jeweils in frischem Waschpuffer (PBS-Tween20 Waschpuffer: 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20). Während dessen wird der Primärantikörper in frisch angesetzter Blocking-Lösung in der gewünschten und ausgetesteten Konzentration verdünnt. Nach Inkubation für 60 min bei RT oder 4°C auf dem Schüttler wird mit Waschpuffer wie oben beschrieben gewaschen. Mit dem sekundären AK des ECL-Kits, verdünnt in Blocking-Lösung, wird für 60 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wird mit Waschpuffer 15 min, gefolgt von 4 x 5 min gewaschen. Die Detektion der Antikörperreaktion erfolgt nicht-radioaktiv mit dem ECL-Kit:

- Lösung 1 und 2 (aus ECL-Kit) im Verhältnis 1:1 mischen, genug für 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Gel
- Waschpuffer entfernen (d.h. mit Pinzette an Kleenex halten, Lösung läuft ab); Auf Klarsichtfolie legen
- Detektionsreagenz auftragen, genau eine min inkubieren
- Detektionsreagenz wie vorher beschrieben entfernen
- Filter mit Proteinseite nach oben auf Klarsichtfolie legen, darin einwickeln
- In Dunkelkammer Film einlegen
- Nach etwa 20-30 min entwickeln (ECL-Peak nach ca. 5-20 min,  $t_{1/2} = 60$  min). Die Länge der Exposition des Filters auf den Film hängt vom erwarteten Signal ab.

### 3.2.3.4 ELISA

Mit einem ELISA weist man Proteine ebenfalls mittels einer Antikörperreaktion nach. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 in Zellkulturüberständen von MB-Zelllinien und –Primärmaterial mit einem so genannten Sandwich-ELISA untersucht. Die in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen konditionierten Medien der stimulierten Zellen wurden kurz vor der Messung aufgetaut.

Zur Vorbereitung wurden 96-well Mikrotiter-Platten über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem Antikörper spezifisch gegen humanes BDNF (Anti-BDNF mAb) bzw. NT-3 (Anti-NT-3 mAb) gecoatet. Die Platten werden dann mit TBST-Waschpuffer gewaschen und nicht-spezifische Bindungsstellen mit Block&Sample-Puffer für 1h blockiert. Nach einem Waschschrift wird die Standardkurve direkt in der ELISA-Platte angesetzt (Verdünnung von 0 bis 500pg/ml) und die Proben zügig aufgetragen und 2h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift werden die Platten mit einem sekundären biotinylierten anti-BDNF- bzw. NT-3-Detektionsantikörper (Anti-Human BDNF bzw Anti-Human NT-3) für 2h inkubiert und erneut mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wird für eine Stunde mit dem sekundären Anti-Ig-HRP Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wird für etwa 10 min das Peroxidase-Substrat aufgetragen und dann die Reaktion mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt.

Die optische Dichte (OD) jedes wells wurde bei 450 nm mit einem Multiskan EX Photometer bestimmt und die BDNF bzw. NT-3 Proteinkonzentrationen mit der Software Genesis Lite V2.16 der Firma Life Science in Anlehnung an die Standardkurve kalkuliert.

## 4 ERGEBNISSE

Ziel dieses Projekts war die Untersuchung, inwieweit Medulloblastom-Zelllinien bzw. –Primärkulturen ihr biologisches Verhalten durch Behandlung mit neurotrophen Faktoren *in vitro* ändern.

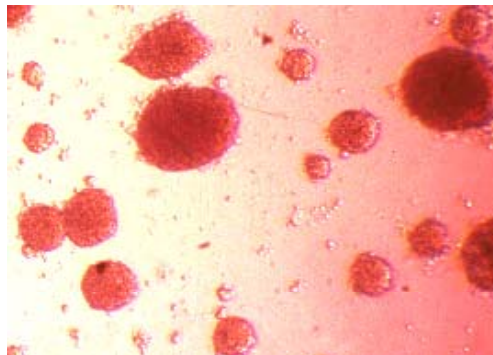
### 4.1 Kultur der Medulloblastome

Es wurden die drei Zelllinien MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S ebenso wie die Primärkulturen 1557, 1580, 1680, 1913, 1962 und 2123 kultiviert.

Die drei aus Bonn zur Verfügung gestellten MB-Zelllinien unterschieden sich bereits durch ihr individuelles Verhalten innerhalb der Zellkultur. Die Linie **MHH-Med 2** wuchs zwar in dreidimensionalen Verbänden, bei der Mikroskopaufsicht auf die Kulturflaschen hatte man jedoch den Eindruck eines mehr flächigen, denn kugeligen Zellverbandes. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit war unter den drei Zelllinien am geringsten, sodass im Mittel alle zehn Tage gesplittet werden konnte. Die Zelllinie **MHH-Med 4** wuchs dagegen eindeutig in Sphäroidform, wobei man hier eine leichte Adhärenz am ungecoateten Kulturflaschenboden feststellte. Durch vorsichtiges Aufsuspendieren konnten die Zellaggregate problemlos gelöst werden. Die Zellverdopplungszeit dieser Linie lag bei etwa fünf bis sieben Tagen, wobei hier die größte Anfälligkeit gegenüber Außenfaktoren beobachtet werden konnte. Trotz gleicher Kultur- und Medienbedingungen aller MB-Zellen kamen nur bei der Linie MHH-Med 4 immer wieder Phasen des Sphäroidzerfalls und des Stagnierens der Zellvermehrung vor.



Bezüglich des Verhaltens in Kultur konnte die Zelllinie **MEB-Med 8S** als am robustesten bezeichnet werden. Es wurde eine schnelle Sphäroidbildung aus Einzelzellen beobachtet und im Abstand von drei bis fünf Tagen konnte gut passagiert werden.



**Abbildung 7: Medulloblastom-Zelllinie MEB-Med 8S in Kultur**

Die MB-Primärkulturen wurden in gleicher Weise wie die oben genannten Zelllinien in Kultur gehalten. Durch die noch höhere Empfindlichkeit dieser Zellen und die Eigenschaft nach unterschiedlicher Kulturzeit in Einzelzellen zu zerfallen, musste besonders sorgsam kultiviert und die Experimente sehr zügig angesetzt werden.

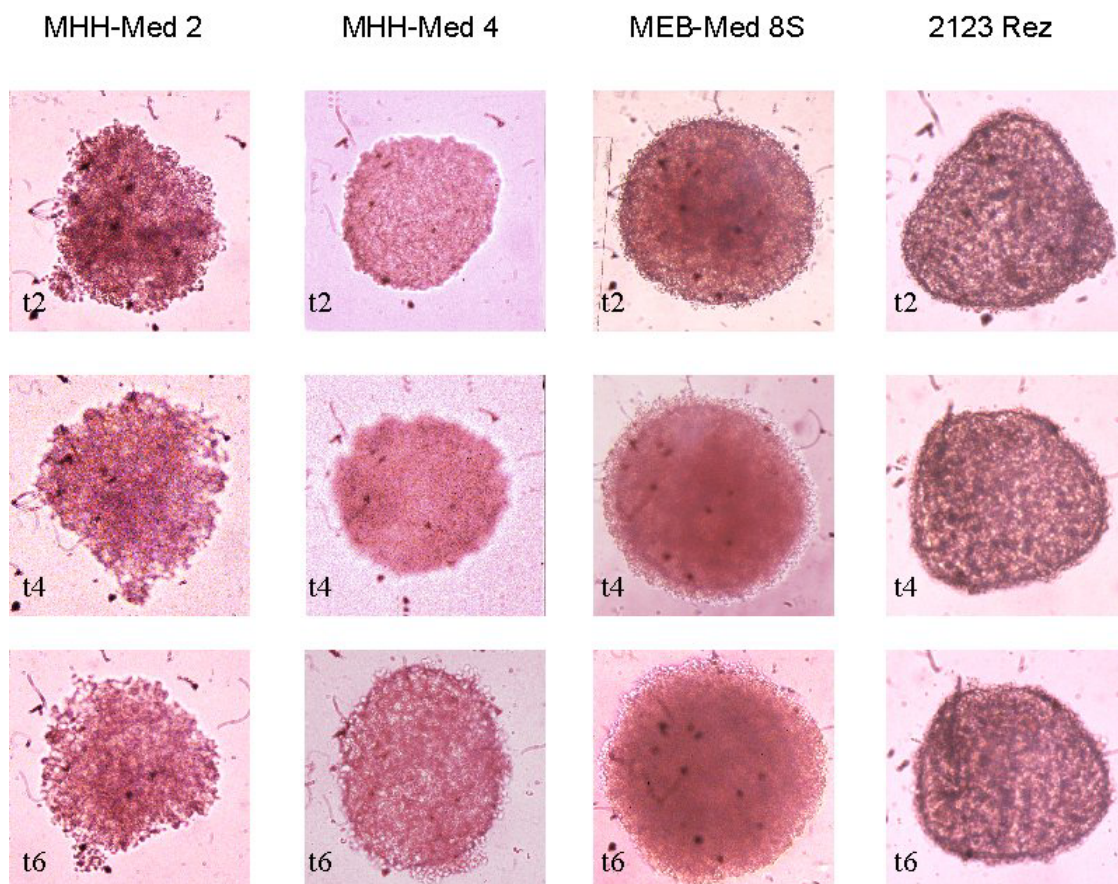
Für alle MB erfolgte die normale Zellkultur in zu 10% mit Humanserum angereichertem DMEM. Zweimal pro Woche fand bei laufenden Zellkulturen ein Mediumwechsel statt, bei frisch aufgetauten Zellen und evtl. auch bei den Primärkulturen häufiger. Wegen der Empfindlichkeit der MB-Sphäroide und dem Fehlen von Antibiotika im Medium waren sorgfältiges und vorsichtiges Arbeiten die Voraussetzung aller folgenden Experimente. In regelmäßigem Abstand wurden die Medien und Zellen auf Mykoplasmen getestet

An dieser Stelle soll noch kurz auf die Unterschiede in der Handhabung im Vergleich zu kultivierten Glioblastomzellen eingegangen werden, da dies die besonderen Eigenschaften der MB-Zellen zusätzlich unterstreicht. Zunächst ist auf den hohen Glukosegehalt von 4,5 g/l im Vergleich zu sonst verwendeten 1,0 g/l zu achten. Weiterhin ist der Zusatz von Humanserum anstelle von FCS nötig, wobei im Verlauf der Arbeit ein verbessertes Wachstumsverhalten in 20%-igem statt 10%-igem Zusatz beobachtet werden konnte. Durch das Wachstum der MB als Sphäroide und nicht adhärent, wird ein Trypsinieren, wie es zum Passagieren der Glioblastomzellen üblich ist, überflüssig. Während der gesamten Zellkultur ist darauf zu achten, dass MB nie zentrifugiert werden dürfen.

## 4.2 Überleben in serumfreiem Medium

Primäre Fragestellung dieser Arbeit ist es, die Auswirkung von Stimulationen der MB mit unterschiedlichen Neurotrophinen bzw. Cytokinen zu untersuchen. Hierfür ist es notwendig, die jeweiligen Faktoren unter genau definierten Bedingungen und Konzentrationen zuzuführen. Dies wäre unter normalen MB-Kulturbedingungen durch den Zusatz des Humanserums, mit unbestimmten und unterschiedlichen Proteinzusätzen, nicht realisierbar.

Erstes Ziel dieser Arbeit war zu testen, ob die MB-Zelllinien auch im serumfreien Medium (sfM) zu kultivieren sind, zumindest für die Zeitdauer der jeweiligen Experimente. Im Ansatz mit Einzelsphäroiden, die in 24-well-Platten ohne Humanserum, d.h. nur im DMEM mit L-Glutamin-Zusatz, kultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass bei einem Mediumwechsel im Abstand von zwei Tagen sowohl die MB-Zelllinien als auch –Primärkulturen bis zu 15 Tage überleben.



**Abbildung 8: Überleben der Medulloblastomsphäroide in serumfreiem Medium**

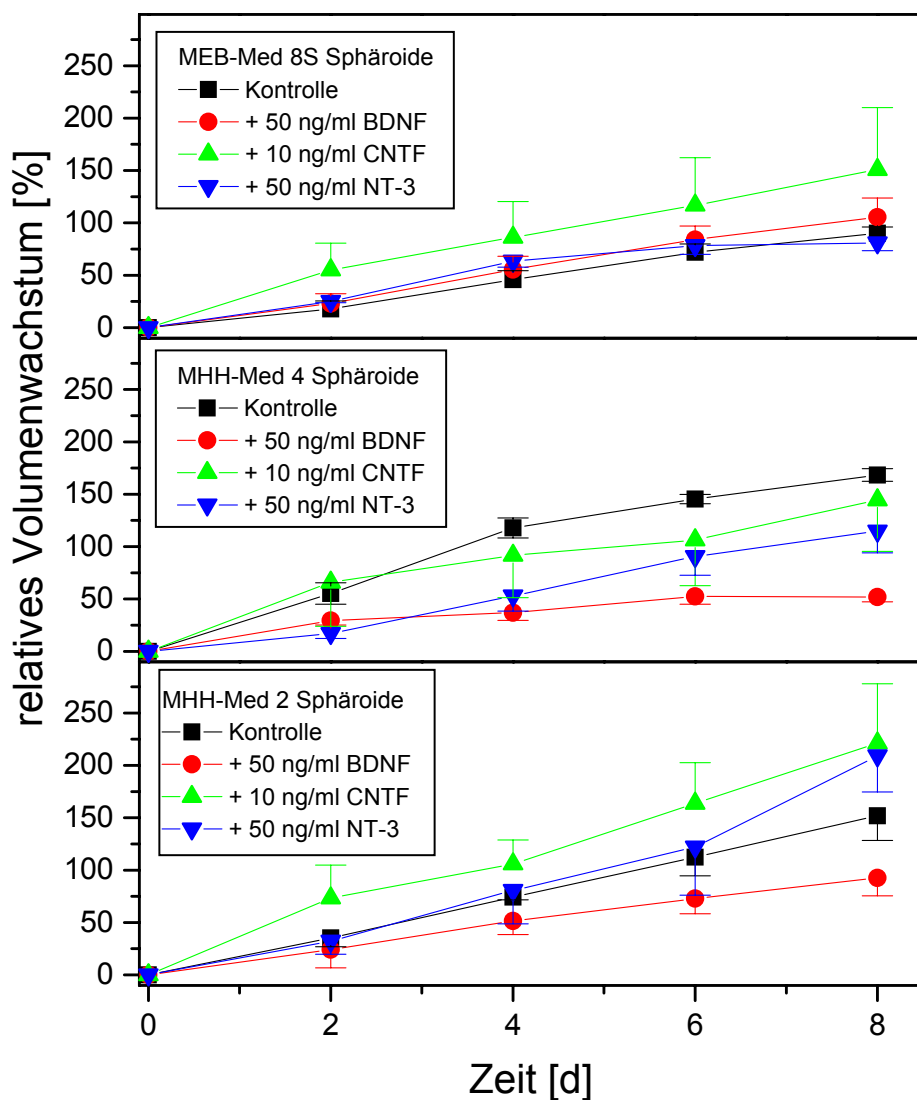
Dies bedeutet, dass im Verlauf dieses Experimentes weder morphologische Veränderungen der Sphäroide auffielen, noch Anzeichen zentraler Nekrosen mikroskopisch zu erkennen waren. Zum Teil wuchsen die Sphäroide sogar. Somit konnten alle folgenden Versuchsansätze in serumfreiem Medullomedium stattfinden und die zu untersuchenden Faktoren in genau definierten Konzentrationen zugegeben werden.

### 4.3 Wachstumsverhalten in sfM unter Faktorenbehandlung

Als nächstes sollte die Entwicklung/das Wachstum der Einzelsphäroide unter dem Einfluss der verschiedenen Faktoren (BDNF, NT-3 und CNTF) bestimmt werden. Anhand von Wachstumskurven sollten Faktoreinflüsse deutlich werden.

Hierfür wurden Einzelsphäroide der Zelllinien MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S in ungecoateten 96-well-Platten mit Faktoren stimuliert. Es fanden die Neurotrophine BDNF und NT-3 in einer Versuchskonzentration von jeweils 50 ng/ml und das Cytokin CNTF mit 10 ng/ml Verwendung. Zur Kontrolle dienten unstimulierte Einzelsphäroide im sfM.

Rein morphologisch sind während des zehntägigen Versuchsablaufs keine Veränderungen sichtbar geworden.



**Abbildung 9: Wachstumskurven der Zelllinien MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S unter Faktorenstimulation**

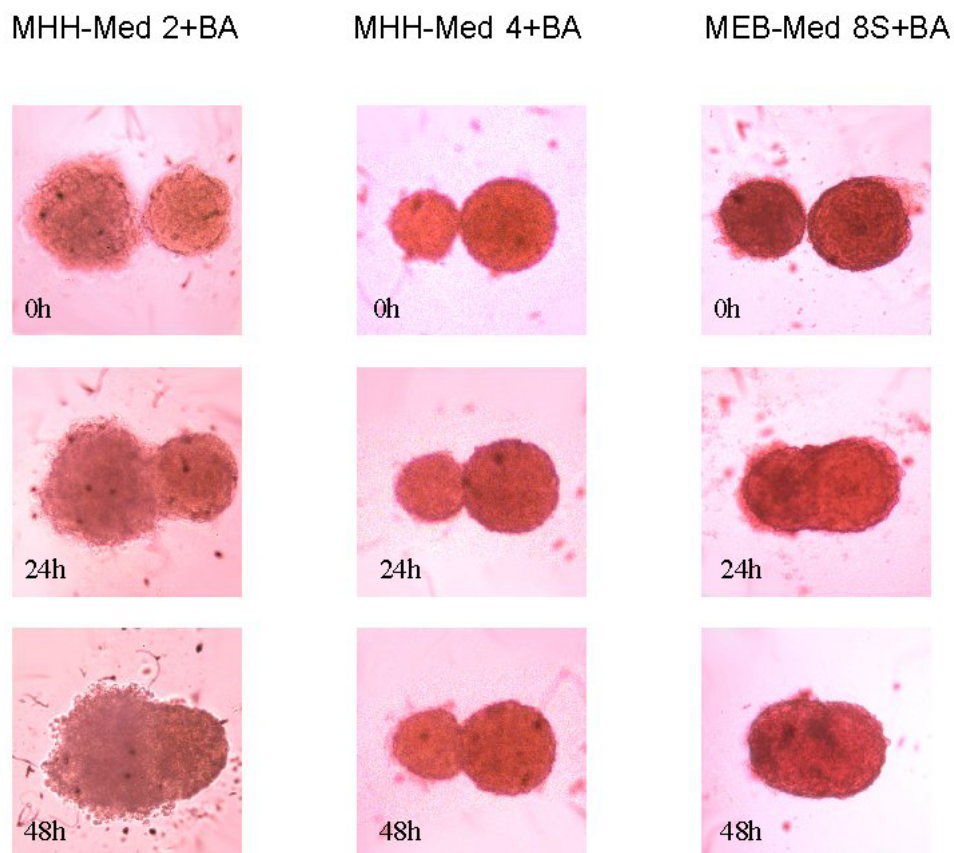
Nach Auswertung der Einzelsphäroide im Videodokumentationssystem und Darstellung der Ergebnisse in Wachstumskurven, wurde unter BDNF-Behandlung eine Wachstumshemmung der Zelllinien MHH-Med 2 und MHH-

Med 4 deutlich. Unter NT-3-Stimulation ließ sich bei der Zelllinie MHH-Med 4 eine diskrete Hemmung des Wachstumsverhaltens annehmen.

#### 4.4 Invasionsassay

Mithilfe von Rattenhirnaggregaten wurden Konfrontationskulturen durchgeführt, um unterschiedliches Invasionsverhalten der Zelllinien und Primärkulturen im Vergleich miteinander und zusätzlich unter Faktoren- und Antikörperbehandlung zu untersuchen.

Bereits in den Vorversuchen, in denen Einzelsphäroide der drei Zelllinien und einer Primärkultur mit brain aggregates kokultiviert wurden, fiel ein differentes Verhalten der einzelnen Linien auf.



**Abbildung 10: Kokultur von Medulloblastomen mit brain aggregates**

Trotz gleicher Kulturbedingungen – alle Ansätze fanden im sfM statt und wurden gleichzeitig unter denselben äußeren Bedingungen durchgeführt – war auffällig, dass die Zelllinie MHH-Med 4 kein Invasionsverhalten in das Rattenhirnaggregat erkennen ließ. Nach über 80 Stunden lagen beide Sphäroide zwar direkt aneinander, aber die jeweiligen Sphäroidgrenzen waren noch deutlich abgrenzbar. Die Linie MEB-Med 8S hingegen zeigte ein sehr schnelles Invasionsverhalten, sodass bereits nach 24 Stunden die Sphäroidgrenzen nicht mehr deutlich auszumachen waren und nach 48 Stunden nur noch ein einzelner kugeliger Zellverband zu erkennen war. Die MHH-Med 2 Zelllinie zeigte ein Verhalten, das sich als Mittelweg zwischen den beiden anderen beschreiben lässt. Sie invadierte zwar in den BA, jedoch erst nach etwa 80 Stunden vollständig.

Anlehnend an diese Ergebnisse folgten entsprechende Versuchsansätze unter Stimulation mit den jeweiligen Faktoren. Der Aufbau soll mit folgender Skizze veranschaulicht werden:

	<b>Ko</b> sfM	<b>BDNF</b> 50ng/ ml	<b>NT-3</b> 50ng/ ml	<b>CNTF</b> 10ng/ ml	<b>BDNF</b> 50ng/ml + <b>AK(B)</b> 500ng/ml	<b>NT-3</b> 50ng/ml + <b>AK(N)</b> 500ng/ml	<b>AK(B)</b> 500ng/ml	<b>AK(N)</b> 500ng/ml
MHH- Med 2	6	4	4	4	4	4	4	4
MHH- Med 4	6	4	4	4	4	4	4	4
MEB- Med 8S	6	4	4	4	4	4	4	4

**Tabelle 7: Veranschaulichung des Aufbaus der Kokulturrexperimente mit Darstellung der jeweils eingesetzten Sphäroidanzahl.**

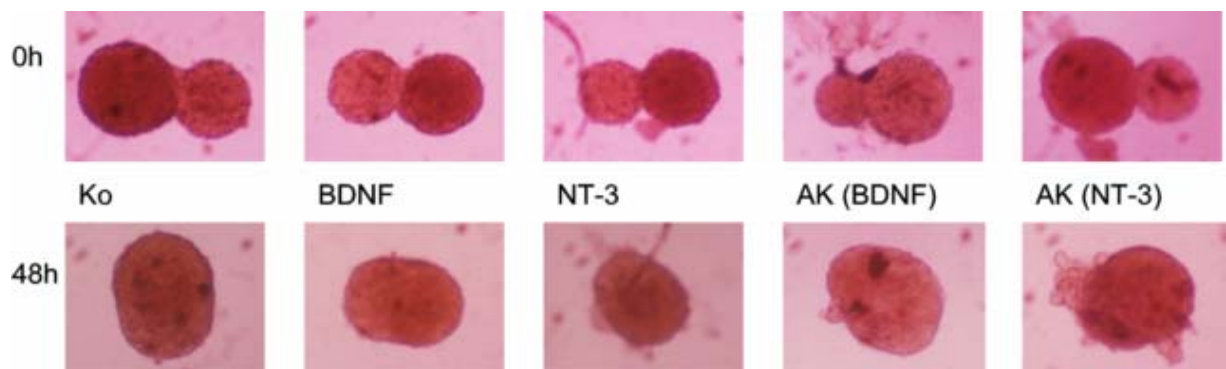
Bereits hier wird deutlich, welche großen Sphäroidmengen nötig sind, um eine dieser Kokulturen mit den nötigen Antikörperkontrollen durchzuführen. Die etwa gleich großen (200-250  $\mu\text{m}$ ) MB-Einzelsphäroide wurden auf mit sfM-gecoateten 96-well-Platten mit ebenso großen brain aggregates kokultiviert. Alle 48 Stunden wurden vorsichtig Medium- bzw. Faktorenwechsel und im sechs- bzw. 12-Stunden-Abstand Diadokumentationen durchgeführt. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn die Sphäroide vollständig invadiert waren bzw. spätestens nach 108 Stunden.

Da zunächst keine Veränderungen durch die Faktorenbehandlung sichtbar wurden – weder die Invasionsgeschwindigkeit, noch das Invasionsverhalten konnten beeinflusst werden – wurde der Versuch unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Die MB-Zelllinien wurden vor dem Einsatz in den Kokulturassay zur Konditionierung für 48 Stunden in 6-well-Platten mit dem jeweiligen Faktor bzw. Antikörper oder Antikörper plus Faktor vorbehandelt. Hiermit sollte den Zellen genügend Zeit gegeben werden, um auch auf Proteinebene auf eine eventuelle faktorenbedingte Veränderung reagieren zu können. Auch mit den vorhandenen MB-Primärkulturen konnte – mit einigen materialbedingten Abstrichen – dieser Versuchsaufbau durchgeführt werden.

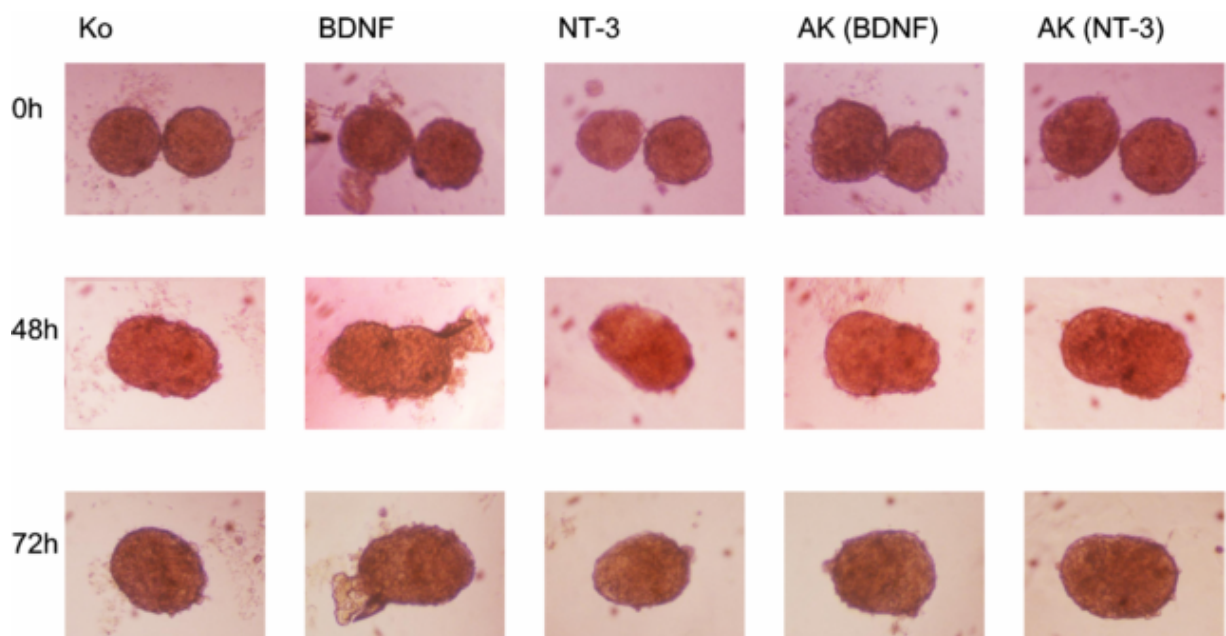
Zusammenfassend zeigte sich, dass durch die Stimulation mit neurotrophen Faktoren bzw. Antikörpereinsatz das Invasionsverhalten der Medulloblastomzellen nicht sichtbar beeinflusst werden konnte. Das zu Beginn deutlich gewordene differente Verhalten der Zelllinien bestätigte sich in allen Versuchsansätzen, sodass die Zelllinie MHH-Med 4 nicht und die Linie MEB-Med 8S sehr schnell invadierte, was auch unter Faktorenstimulation nicht zu beeinflussen war.



Auch innerhalb der verschiedenen Primärkulturen fiel die unterschiedliche Invasionsgeschwindigkeit auf. Beispielsweise war der Tumor 1913 bereits nach 48 Stunden vollständig mit dem BA verschmolzen, beim Tumor 2123 dauerte es jedoch mindestens 72 Stunden. Durch die Faktorenbehandlung änderte sich jedoch innerhalb der einzelnen Primärkulturpopulationen in Bezug auf ihr Invasionsverhalten nichts.



**Abbildung 11: Kokultur der MB-Primärkultur 1913 mit brain aggregates**



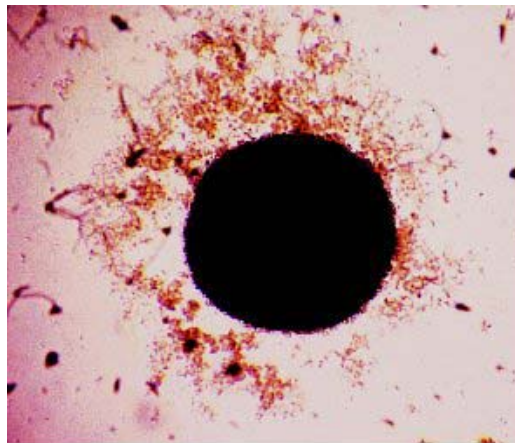
**Abbildung 12: Kokultur der MB-Primärkultur 2123 mit brain aggregates**

## 4.5 Migrationsassay

Auf verschiedenen Beschichtungsgrundlagen (Kollagen, Laminin, Matrigel) und in der Invasionskammer wurde bei unterschiedlichen Kulturbedingungen und unter Stimulation durch neurotrophe Faktoren das Migrationsverhalten der MB untersucht.

Zunächst wurden MB-Sphäroide der drei zu untersuchenden Zelllinien in das Zentrum mit Kollagen S bzw. Laminin beschichteter 96-well-Platten pipettiert. Es wurden primär die durch den Hersteller angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Beschichtungsgrundlagen verwendet, d.h. für Kollagen 3 mg/ml und für Laminin 20 µg/ml. Die Sphäroide wurden wie bei allen Versuchsansätzen in serumfreiem Medullomedium kultiviert. Auch unter variierten Kollagen- bzw. Lamininkonzentrationen konnte zunächst keine Zellwanderung beobachtet werden und selbst der Versuch auf mit Matrigel-beschichteten Platten blieb erfolglos. Weder die MB-Zelllinien noch –Primärkulturen konnten auf diese Weise zum Migrieren gebracht werden. Auch eine Stimulation mit den Faktoren BDNF, NT-3 und CNTF hatte keinen Effekt bzgl. des Migrationsverhaltens.

Von den primär definierten Versuchsbedingungen abweichend wurden zusätzlich Ansätze im 10- bzw. 20%-igen Medium durchgeführt. Unter zusätzlich variierten Beschichtungskonzentrationen konnten schließlich im 20%-igen Medium, sowohl bei der Zelllinie MEB-Med 8S als auch MHH-Med 4 Zellwanderungen beobachtet werden.

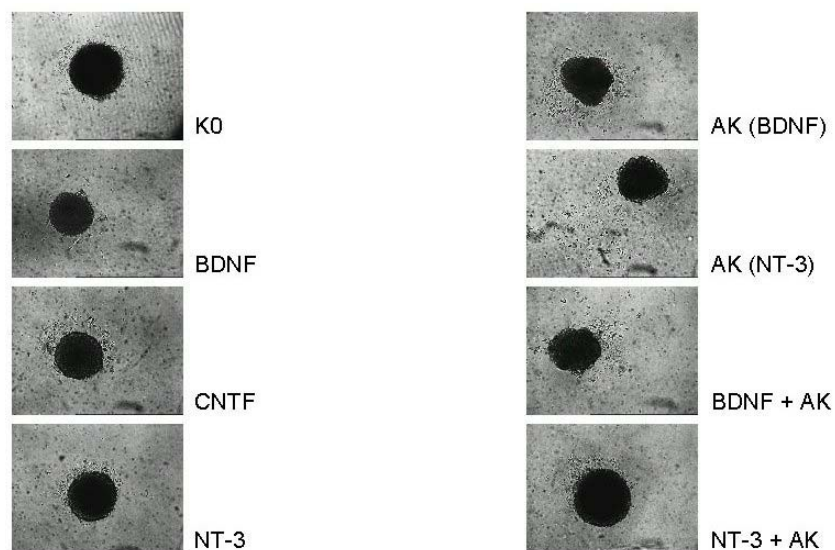


**Abbildung 13: Migration aus einem Medulloblastomsphäroid**

Im Folgenden wurde immer in 20%-igem Medium, mit der Kollagen-Konzentration von 3 mg/ml und der Laminin-Konzentration von 30 µg/ml gearbeitet. Nach 48-stündiger Faktorenstimulation vor dem Einsatz der Sphäroide im Assay und auch während des Versuchsablaufes, konnten einige unterschiedliche Verhaltensmuster beobachtet werden, obwohl natürlich durch den Ansatz in Humanserum-haltigem Medium die Konzentrationsangaben der jeweiligen Faktoren und Antikörper nicht mehr exakt definiert sind (da die Inhaltsstoffe des Humanserums nicht genau bekannt sind bzw. chargenbedingt variieren können).

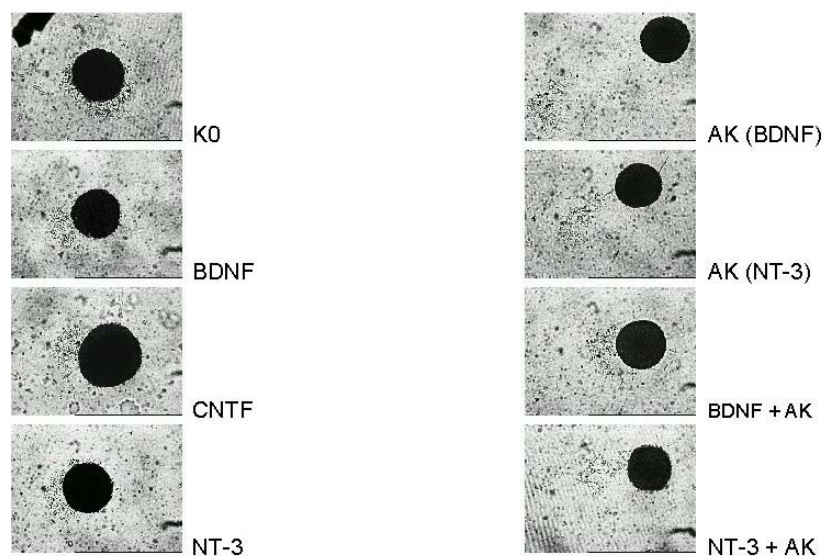
Bei beiden migrierenden MB-Zelllinien fiel auf, dass eine Zellwanderung vom Ausgangssphäroid in eine Richtung stattfindet im Vergleich zu Glioblastomzellen, welche homogen um den Sphäroid auswanderten. Einige Zellen schienen hierbei eine Art Vorläuferposition einzunehmen, um dann weitere hinterherzuziehen. Nach makroskopischer Begutachtung und Auswertung der Daten des Photodokumentationssystems ließen sich folgende Ergebnisse erkennen.

Bei der Zelllinie MHH-Med 4 schien die Zellwanderung unter NT-3-Behandlung leicht gehemmt und unter der Stimulation mit dem Antikörper gegen NT-3 diskret gesteigert zu sein.



**Abbildung 14: Migration der Zelllinie MHH-Med 4**

Bei der MEB-Med 8S-Linie konnten keine Unterschiede durch die Faktorenbehandlung ausgemacht werden. Im Falle der alleinigen Antikörperbehandlung – unabhängig davon, ob es sich um den AK gegen BDNF oder NT-3 handelte – entstand ein deutlicher Abstand zwischen dem Ausgangssphäroid und dem ausgewanderten Zellschweif. Dies war in der Mehrzahl der eingesetzten Sphäroide und ausschließlich in der Zelllinie MEB-Med 8S unter Antikörperstimulation der Fall.



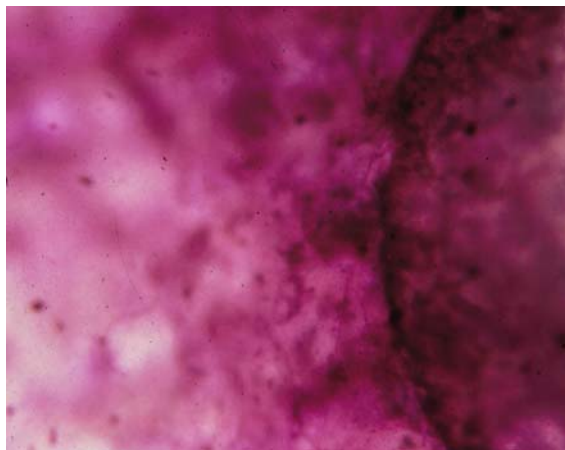
**Abbildung 15: Migration der Zelllinie MEB-Med 8S**

Die Zelllinie MHH-Med 2 konnte auch unter variierten Versuchsbedingungen nicht zur Migration gebracht werden. Auch nach mehreren Tagen lösten sich keine Einzelzellen aus dem Sphäroidverband.

Abschließend fiel auf, dass nur zwei von fünf untersuchten Primärkulturen unter den oben genannten Bedingungen ein Zellwanderungsverhalten zeigten. Aus Materialgründen konnte jedoch ein Versuchsansatz unter Stimulation mit neurotrophen Faktoren nicht durchgeführt werden.

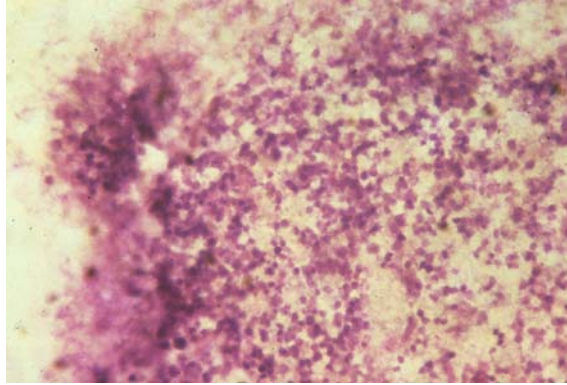
**In der Invasionskammer (Boyden-Chamber)** wurde zunächst die ZL MEB-Med 8S im serumfreien Medium eingesetzt. Es konnte weder nach 48- noch nach 72-stündiger Inkubationszeit ein Anhaften der Medulloblastomsphäroide auf der weißen Hirnsubstanz beobachtet werden.

Beim Versuch, die Invasionskammern zu öffnen schwammen die eingesetzten Sphäroide weg. Erst beim Ansatz im 10%-igen Medullomedium ließ sich eine leichte Adhärenz der MB-Zellen feststellen, welche im 20%-igen Medium noch ausgeprägter war. Zum Teil schienen einzelne, aus dem Sphäroidverband gelöste Zellen in den Hirnschnitt eingewandert zu sein und sich nicht nur auf der Oberfläche der weißen Hirnsubstanz fortbewegt zu haben.



**Abbildung 16: MEB-Med 8S – Sphäroid auf weißer Hirnsubstanz (Schwein)**

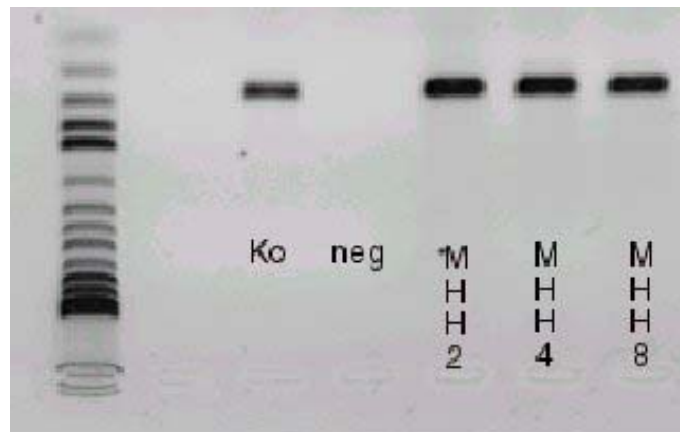
Auch für die Zelllinie MHH-Med 4 wurde ein Anheften im 20%-igen Medium beobachtet, was allerdings geringer ausgeprägt war als bei der ZL MEB-Med 8S.



**Abbildung 17: MHH-Med 4 – Sphäroid auf weißer Hirnsubstanz (Schwein)**

## 4.6 Trk-Rezeptorstatusanalyse mittels PCR

Unter den in 3.2.2.3 beschriebenen Bedingungen wurde zunächst die Polymerasekettenreaktion für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Die unterschiedlichen Bandenintensitäten der Zelllinien MHH-Med 2, -4 und MEB-Med 8S wurden durch angepassten Einsatz der cDNA-Mengen ausgeglichen, sodass in den folgenden PCRs eine Aussage über die Intensität der Expression der untersuchten Gene getroffen werden konnte.



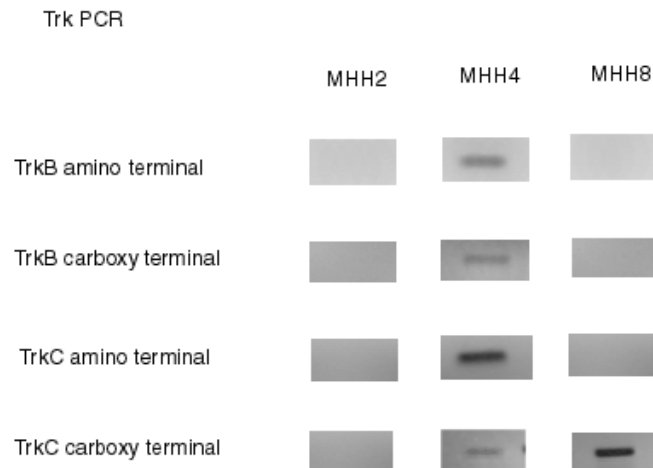
**Abbildung 18: GAPDH-PCR der Medulloblastom-Zelllinien**

Hiernach folgte die Untersuchung des Trk-Rezeptorstatus einerseits mit von der AG Pietsch aus Bonn zur Verfügung gestellten Primern und deren ausgetesteten PCR-Bedingungen. Nachzuweisen waren hier Banden für alle drei untersuchten Medulloblastom-Zelllinien bzgl. des TrkB-Rezeptors.

Für den Tyrosinkinase-C-Rezeptor war nur bei den ZL MHH-Med 2 und -4 ein eindeutig positives Signal sichtbar. Keine Bande ergab die PCR bei der ZL MEB-Med 8S.



Andererseits wurde eine genauere Rezeptorstatusanalyse durchgeführt. Es wurden (von CHIAPPA 1999 angegebene) Primer verwendet, durch welche der jeweilige amino- bzw. carboxyterminale Rezeptoranteil getrennt voneinander amplifiziert werden konnte.

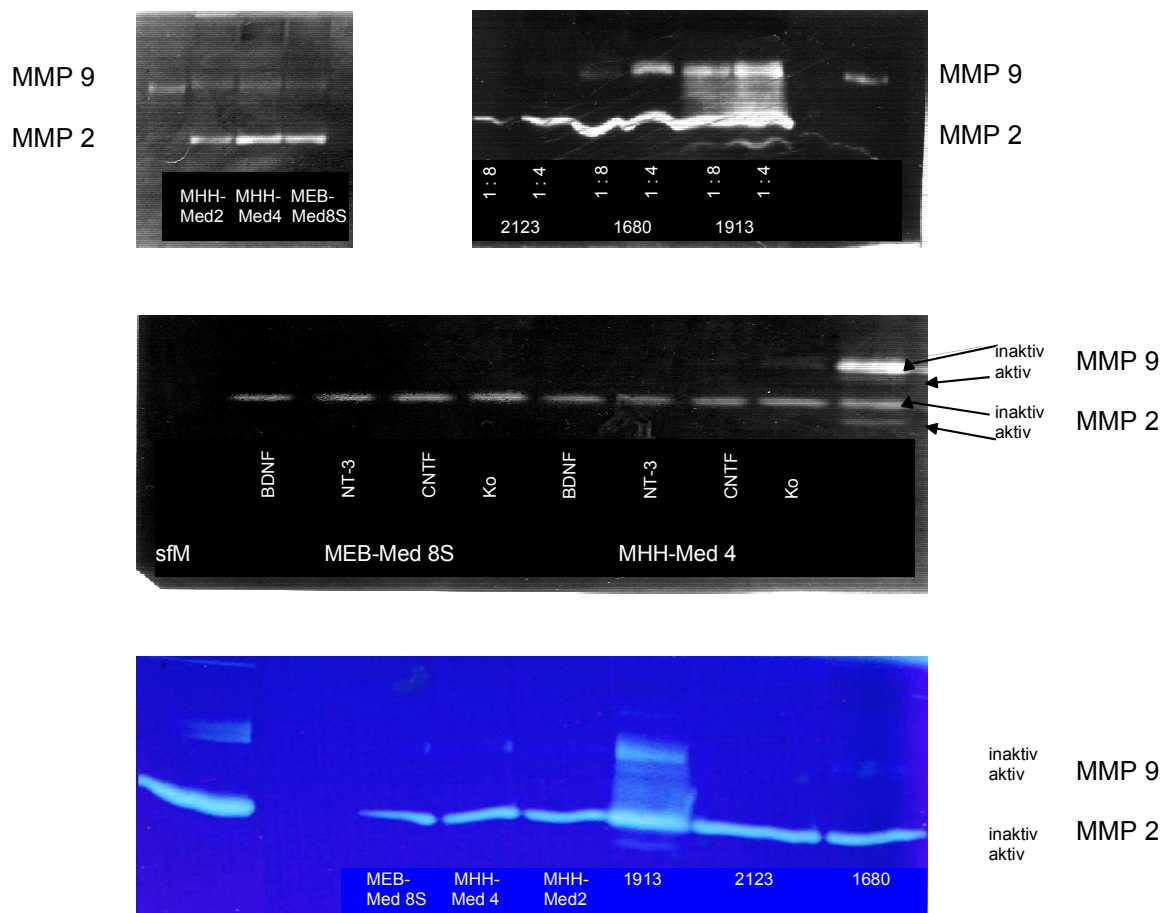


**Abbildung 19: Trk – PCR der Medulloblastom-Zelllinien**

Es stellte sich heraus, dass nur die ZL MHH-Med 4 über einen vollständigen TrkB- und TrkC-Rezeptorbesatz verfügt. Demnach stellte sich sowohl eine Bande für den jeweiligen intrazellulären (carboxy-terminalen) als auch für den extrazellulären Amino-Bereich dar. Nur in diesem Fall konnte von einem funktionstüchtigen Rezeptor mit signaltransduzierender Wirkung ausgegangen werden. In unseren Untersuchungen konnte für die MB-Zelllinie MHH-Med 2 kein Rezeptorprodukt und für MEB-Med 8S nur der intrazelluläre Anteil der TyrosinkinaseC nachgewiesen werden.

### 4.7 Nachweis der MMP-Expression durch Zymographie

Durch Gelatine- (Nachweis von MMP-2 und -9) und Casein- (MMP-3-Nachweis) Zymographien sollten MMP-Expressionsmuster der MB erarbeitet werden. Der im tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik Würzburg bisher vor allem für Glioblastom- und Endothelzellen etablierte Proteinnachweis wurde für Medulloblastome modifiziert.



**Abbildung 20: Gelatine-Zymographien der MB-Zelllinien und – Primärkulturen**

---

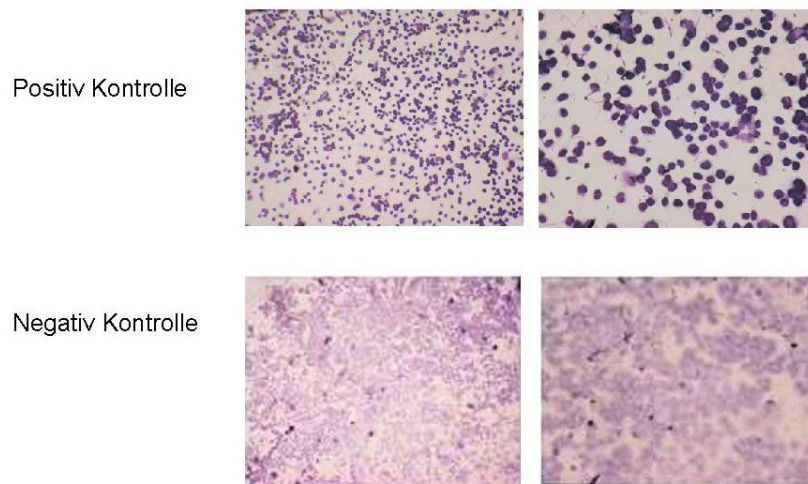
Da MB-ZL und –Primärkulturen sehr große Proteinmengen exprimieren, wurde nach mehrfachem Austesten mit Verdünnungsreihen eine optimale Proteinkonzentration von 10 µg/ml für die Gelatine-Zymographie gefunden und folgend für alle Ansätze verwendet. Für den MMP-3-Nachweis werden zurzeit noch die Bedingungen für MB überarbeitet, sodass über dieses Expressionsmuster noch keine Aussage getroffen werden kann.

Im Vergleich zwischen Zelllinien und Primärkulturen fiel eine höhere Expressionsrate an Matrixmetalloproteinasen durch die untersuchten Primärkulturen auf. Besonders im Primärtumor 1913 stellten sich eindeutig dickere Banden dar; außerdem war dies das einzige untersuchte Medulloblastom, welches sowohl die inaktive als auch die aktive Form der Proteinase exprimierte. Für die drei ZL und auch die restlichen Primärkulturen wurden lediglich Banden der inaktiven MMP-2 und –9 – Formen sichtbar.

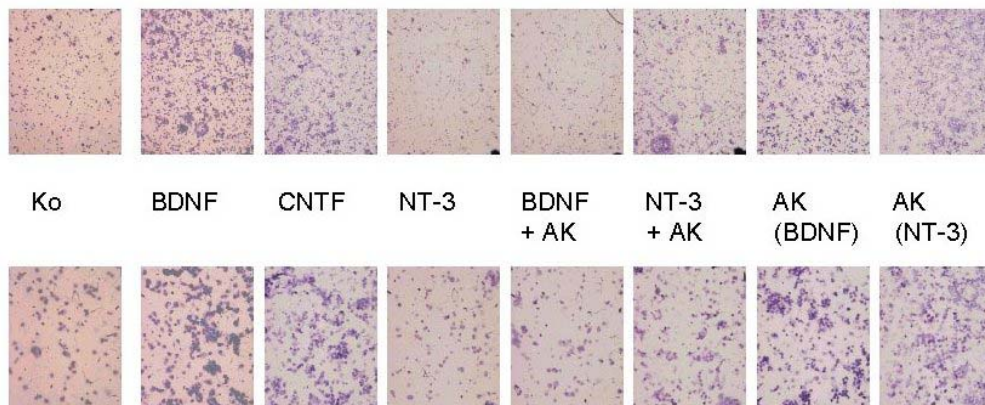
Durch die Stimulation mit neurotrophen Faktoren konnten keine signifikanten Unterschiede bzgl. des MMP-Expressionsmusters beobachtet werden. Unter Faktorenbehandlung war keinerlei MMP-9 - Expression nachweisbar.

## 4.8 Immunhistochemische Untersuchung von Apoptose, Ki-67 und Rezeptorbesatz

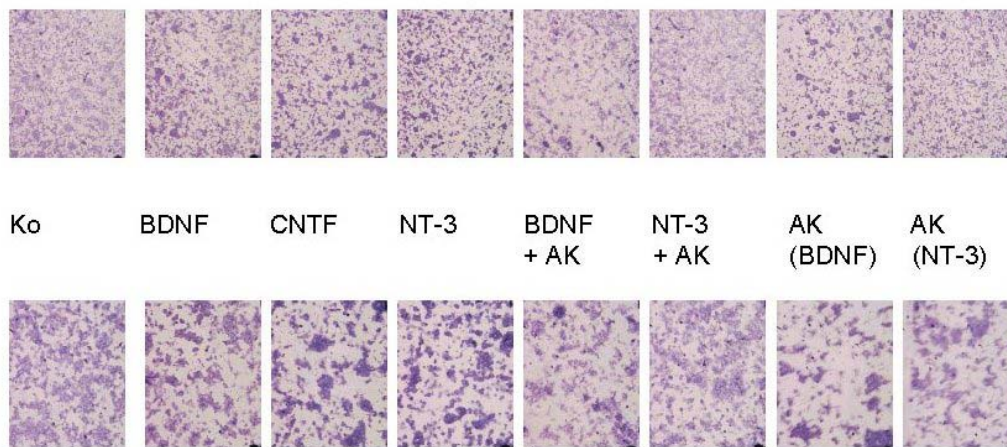
Die Zelllinien MHH-Med 4 und MEB-Med 8S zeigten nach Stimulation mit Neurotrophinen bzw. dem Cytokin CNTF nur sehr dezente Veränderungen bzgl. der Apoptoserate. Lediglich bei der Linie MHH-Med 4 gewann man den Eindruck, dass durch BDNF-Behandlung die Menge apoptotischer Zellen gesteigert ist. Unter Einfluss der anderen Faktoren bzw. Antikörper und auch in der Zelllinie MEB-Med 8S fielen keine Veränderungen auf.



**Abbildung 21: Apoptosefärbung**



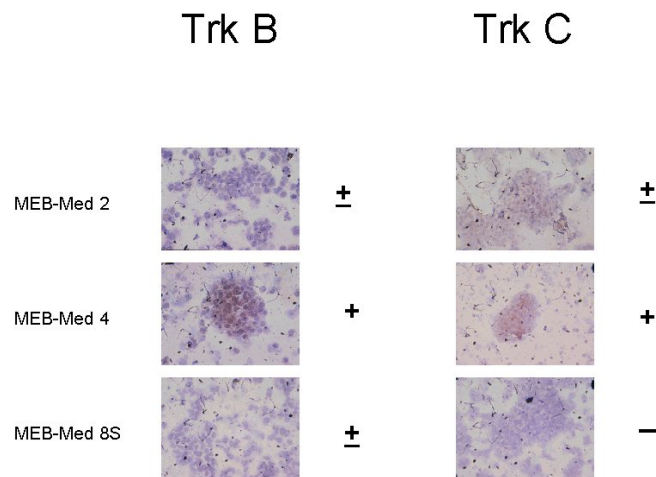
**Abbildung 22: Apoptosefärbung der Zelllinie MHH-Med 4**



**Abbildung 23: Apoptosefärbung der Zelllinie MEB-Med 8S**

Auch die Auswertung (durchgeführt von der AG Pietsch aus Bonn) der Färbung mit dem monoklonalen Antikörper MIB 1 gegen das Ki-67 Protein erwies keine deutlich unterschiedlichen Ki-67 Anteile unter den verschiedenen Kulturbedingungen. Bei der ZL MHH-Med 2 lag die Proliferationsrate sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den mit NT bzw. CNTF und auch mit den jeweiligen Antikörpern behandelten Zellen immer zwischen 10 und 20%. In der ZL MHH-Med 4 fiel auf, dass unter BDNF-Stimulation die Ki-67 Rate im Vergleich zur Kontrolle leicht absank und dagegen nach Zugabe des Antikörpers gegen BDNF im Vergleich zur Kontrolle sogar verstärkt war. Auch nach der Behandlung mit dem Antikörper gegen NT-3 stieg die Proliferationsrate im Vergleich zur alleinigen Faktorenstimulation an. Bei der ZL MEB-Med 8S fiel lediglich auf, dass der Anteil an Ki-67 positiven Zellen generell signifikant höher war als bei den beiden anderen Zelllinien.

Bezüglich des Trk-Rezeptorbesatzes der drei untersuchten Zelllinien ließ sich feststellen, dass wie auch in der PCR-Analyse lediglich die Linie MHH-Med 4 positiv sowohl für den TrkB- als auch den TrkC- Rezeptor war.

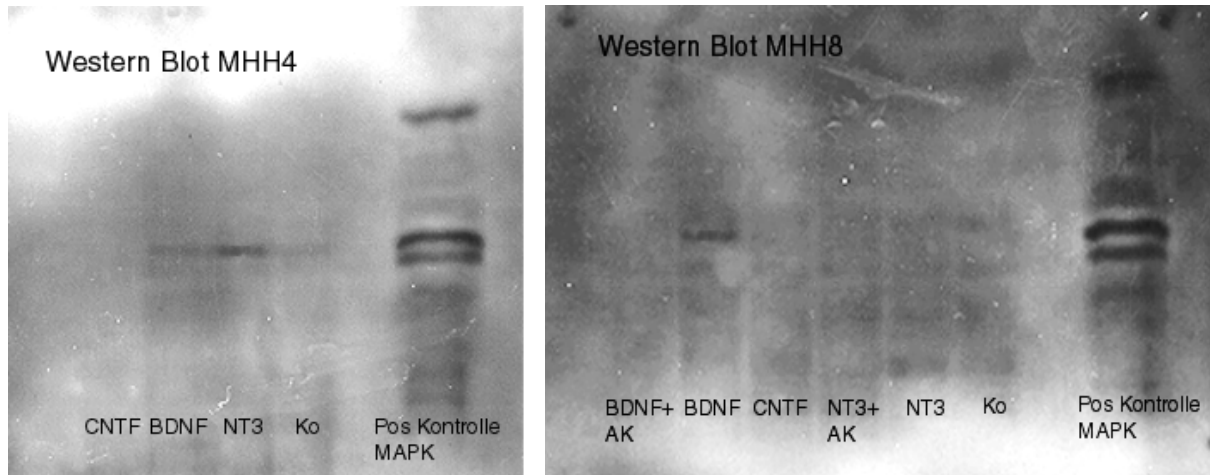


**Abbildung 24: Trk-Färbungen der Medulloblastom-Zelllinien**

Die Linie MHH-Med 2 gab für beide Rezeptoren ein schwach positives Signal, sodass der Besatz an Tyrosinkinase nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Die 8er-ZL war eindeutig negativ für den TrkC-Rezeptor und gab ein schwaches Signal in der TrkB-Färbung.

## 4.9 Nachweis der MAP-Kinase in MB

Im Western-Blot konnten phosphorylierte Zustandsformen der MAP-Kinase nachgewiesen und eventuelle Veränderungen unter NT-Behandlung aufgedeckt werden.



**Abbildung 25: Western-Blots für die MAP-Kinase**

In der untersuchten ZL MHH-Med 4 wurde ein deutliches Signal nach Stimulation mit NT-3 sichtbar. Leicht angedeutet trat dieses Signal der aktiven MAP-Kinase auch unter BDNF-Behandlung dieser ZL auf. Bei MEB-Med 8S trat nur unter BDNF-Behandlung ein geringes Signal als Hinweis für die Aktivierung dieses Signaltransduktions-Pathways auf.

## 4.10 BDNF- und NT-3-Bestimmung mittels ELISA

Weiterhin sollte durch einen spezifischen BDNF - bzw. NT-3 - ELISA eine Stimulation der Faktorproduktion durch die behandelten MB-Zelllinien untersucht werden. Im NT-3 ELISA fiel auf, dass die NT-3 Produktion aller drei untersuchten ZL (MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S) nach Stimulation mit BDNF erhöht war. Im BDNF ELISA dagegen wurden keine Faktoreinflüsse deutlich.

## 5 DISKUSSION

Die Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems und speziell auch des Kleinhirns wird durch neurotrophe Faktoren in exakt koordiniertem zeitlichem Ablauf gesteuert. Mehrere Faktoren bestimmen die Wege dieser Zellen. Hierzu zählen unter vielen anderen auch die neurotrophen Faktoren. Sie vermitteln nicht nur Signale, die den Zelltyp von Vorläuferzellen bestimmen, sondern auch solche, die vor dem programmierten Zelltod retten. Die in dieser Arbeit untersuchten Neurotrophine BDNF und NT-3 übernehmen hierbei oft entgegengesetzte Funktionen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine BDNF - Antwort besonders durch primitive Neurone des äußeren *Stratum germinativum* erfolgt. Der zugehörige TrkB-Rezeptor wird vor allem neonatal exprimiert, sodass BDNF überwiegend in der initialen proliferativen Phase der Kleinhirnzellen wirkt. Hieraus resultiert einerseits ein Axonwachstum der frühen Körnerzellen, andererseits scheint BDNF als Überlebensfaktor eben dieser Zellpopulationen zu dienen, unter anderem durch einen Schutz vor p75-induzierter Apoptose.

NT-3 hingegen induziert über die Aktivierung des TrkC-Rezeptors Apoptose und fördert andererseits eine axonale Ausreifung (Änderung der Morphologie von Axonen), sowie deren Migration bzw. Differenzierung. Eine NT-3 - Antwort erfolgt besonders durch reife Neuronen der inneren Cerebellumschichten. Es wird eine vermehrte Expression des zugehörigen TrkC-Rezeptors im Laufe der Entwicklung – demnach eine Steigerung der Produktion von neonatal zu adult – beobachtet. Die neurotrophe Aktivität findet besonders an den sensiblen Neuronen statt und es fällt eine hohe Korrelation zwischen spontaner Apoptose und TrkC-Expression auf.

Das Cytokin CNTF hingegen scheint vor allem den natürlichen Zelltod verhindern zu können. Über Proteinphosphorylierungen werden Zell-



differenzierungen reguliert und die Neuropeptidproduktion stimuliert (KIM 1999, SEGAL 1995, SNIDER 1994).

Das in der Zellkultur auffällige unterschiedliche Verhalten der drei untersuchten MB-Zelllinien könnte bereits ein Hinweis dafür sein, dass sich die zugrunde liegenden Tumoren aus verschiedenen differenzierten neuronalen Zellen entwickelt haben. Die am robustesten erscheinende Linie MEB-Med 8S würde, von dieser Annahme ausgehend, aus einer sehr primitiven embryonalen Ursprungszelle entstanden sein, die noch wenige Differenzierungsschritte erfahren hat. Ganz im Gegensatz zu Zelllinie MHH-Med 4, die relativ sensibel und wenig aggressiv erschien. Sie könnte somit einer adulten, differenzierten Vorläuferzelle entstammen. Die dritte Zelllinie MHH-Med 2 nahm eine Mittelstellung ein. Weitere Unterschiede der Zelllinien wurden deutlich, wenn man den Trk-Rezeptorbesatz verglich. Die Linie MEB-Med 8S gab in der Immunocytochemie ein schwach positives Signal für TrkB und kein Signal für TrkC. Im Gegensatz dazu erschien MHH-Med 4 als einzige positiv für die Rezeptoren TrkB und C und auch für den p75-Rezeptor. Die Zelllinie MHH-Med 2 zeigte hiernach eindeutig positive Signale für TrkA und B, war jedoch nur gering TrkC-positiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MB-Zellen mit unterschiedlichen neurotrophen Faktoren stimuliert. Um die biologische Aktivität dieser Faktoren nachzuweisen, wurden per Western Blot Phosphorylierungsstufen der MAP-Kinase innerhalb der verschiedenen ZL untersucht. Dies ist einer der wichtigsten Signalwege, über welchen NT ihre Wirkung entfalten. Nach Stimulation mit BDNF konnte sowohl in der ZL MHH-Med 4 als auch MEB-Med 8S die phosphorylierte Form der MAP-Kinase nachgewiesen werden. Zusätzlich war ein eindeutiges Signal bei der ZL MHH-Med 4 unter NT-3 Behandlung zu erkennen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die eingesetzten neurotrophen Faktoren unter anderem über die Signalkaskade der MAP-Kinase wirkten und somit Effekte innerhalb von Versuchsansätzen auslösen konnten. Wie Patti et al. 2000 bereits zeigen konnte, werden über diesen Wirkmechanismus besonders Proliferationsschritte in primitiven neuroektodermalen Tumoren ausgelöst.

Unter dem Einfluss der neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 sowie deren blockierenden Antikörpern und durch Stimulation mit dem Zytokin CNTF konnten bzgl. des **Wachstumsverhaltens** nur geringe Effekte sichtbar gemacht werden. Die ZL MHH-Med 2 und - 4 erfuhren eine Hemmung des Wachstumsverhaltens unter der Behandlung mit BDNF. Genau diese beiden ZL wiesen immunocytochemisch einen TrkB-Rezeptor auf, welcher für die BDNF-Antwort zuständig ist. Allerdings ließ sich auch unter NT-3-Behandlung eine diskrete Wachstumshemmung der ZL MHH-Med 4 erkennen, welche über den TrkC-Rezeptor vermittelt sein könnte. Bei der ZL MEB-Med 8S ließen sich keine Effekte bzgl. des Wachstumsverhaltens aufweisen, was allerdings auch mit dem fehlenden TrkC- und nur gering positiven TrkB-Besatz zu erklären wäre.

Um das unterschiedliche Verhalten im Wachstumsassay zu erklären, wurden Proliferationseigenschaften und auch der Vorgang des programmierten Zelltodes, der im MB eine große Rolle für den Zellverlust spielt, immunhistochemisch untersucht. Durch BDNF-Stimulation konnte lediglich in der ZL MHH-Med 4 die **Apoptoserate** in geringem Umfang gesteigert werden. Weder durch Behandlung mit NT-3 bzw. CNTF noch durch deren blockierende Antikörper veränderte sich die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Generell wird der Vorgang des programmierten Zelltodes als Hauptmechanismus des Zellverlustes in Medulloblastomen beschrieben. Die Verteilung apoptotischer Kerne schien sehr ungleichmäßig zu sein; allerdings fiel eine Häufung in Arealen mit hohem Mitose-Index auf. Das Bcl-2 Protoonkogen schützt vor Apoptose und soll in 30% der MB exprimiert werden. Diese Beziehung korrelierte mit der hohen Zahl zugrunde gegangener Zellen im Medulloblastom (KLEIHUES 1997). Mittlerweile wurde auch erkannt, dass ein Apoptose-Index  $> 1,5\%$  hoch assoziiert ist mit disseminierter Tumorausssaat und einer schlechteren Prognose. Dies könnte nützlich für die individuelle MB-Prognose sein (KORSHUNOV 1999).

Die Untersuchung der **Proliferationsraten** innerhalb der drei MB-ZL mittels Ki-67 Färbung zeigte besonders deutlich eine um ein Vielfaches höhere Ki-67

Rate in der Zelllinie MEB-Med 8S im Vergleich zu den beiden anderen. Da die Proliferation als eines der Kennzeichen für maligne Tumoren gilt, könnte die Ki-67-Rate mit dem im Vergleich zu den anderen ZL aggressiven Verhalten unter Kulturbedingungen von MEB-Med 8S korrelieren. Ansonsten bestanden in der ZL MHH-Med 4 gering erhöhte Ki-67 Indizes nach der Behandlung mit den Antikörpern gegen NT-3 bzw. BDNF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und auch alleiniger Faktorenbehandlung. Dies könnte wiederum durch die Blockade der in diesem Fall proliferationshemmenden – evtl. autokrin produzierten - neurotrophen Faktoren ausgelöst sein und somit die Anzahl der exprimierten nukleären DNA-assoziierten Moleküle erhöhen.

In Bezug auf das **Invasionsverhalten** zeigten sich sehr deutliche Unterschiede innerhalb der drei ZL. Die „aggressive“ ZL MEB-Med 8S wuchs sehr schnell in das Rattenhirnaggregat ein. Bei der ZL MHH-Med 4 ließ sich selbst unter variierten Kultur- und Stimulationsbedingungen keine Invasion auslösen und die Linie MHH-Med 2 nahm wieder eine Mittelstellung ein; indem sie zwar invadierte, allerdings deutlich langsamer als MEB-Med 8S. Hierbei war auffällig, dass dieses Verhalten markant mit dem Trk-Rezeptorbesatz korrelierte! Die TrkC-Expression war bei der Zelllinie 4 am ausgeprägtesten und bei der ZL 8S eindeutig negativ. Weiterhin war die Korrelation mit dem Verhalten der jeweiligen Zellen in Kultur sehr auffallend. Die undifferenziertere Linie MEB-Med 8S invadierte diffus in das BA ein. Die differenziertere ZL MHH-Med 4 invadierte mit schärferer Grenze.

Unter der Stimulation mit neurotrophen Faktoren konnte das beschriebene Invasionsverhalten trotz variierten Versuchsbedingungen allerdings nicht nachweisbar beeinflusst werden. Ursächlich wäre hierfür ein autokriner Loop denkbar, wobei die MB-Zellen durch Eigenproduktion verschiedener Proteine ihr individuelles biologisches Verhalten determinieren. Es wäre somit durchaus möglich, dass die Stimulation mit den verwendeten Faktorkonzentrationen zu gering ausfiel, um einen Einfluss auf diese Regulationsmechanismen ausüben zu können. Oder aber die Invasion ist multikausal bedingt, und daher ist die

Zugabe nur eines Faktors – der *in vivo* beteiligt sein kann – nicht ausreichend, um alleine das Verhalten zu beeinflussen.

Im Migrationsassay, der für die Zelllinien MHH-Med 4 und MEB-Med 8S und auch für die Primärkultur 1913 erfolgreich etabliert werden konnte, fiel zunächst ein scheinbar gerichtetes **Wanderungsverhalten** der Zellen auf. Ausgehend vom eingesetzten Sphäroid schienen sich einzelne Zellen aus dem Sphäroidverband zu lösen und in eine Richtung auszuwandern. Vergleichbar einer Polarisierung folgten weitere Einzelzellen diesem Vorbild und bildeten insgesamt eine Art pyramidenförmigen Schweifs mit Spitze zum Rand der Zellkulturschale. Im Gegensatz hierzu fiel allerdings auf, dass Glioblastomzellsphäroide im gleichen Assay ein völlig differentes Verhalten zeigten. Sie bildeten ein relativ einheitliches Netz aus migrierenden Zellen radiär um den Ausgangssphäroid. Eine gerichtete Bewegung in nur eine Richtung wurde hier nicht erkennbar. Ein Grund für diese unterschiedlichen Verhaltensmuster ist momentan nicht zu determinieren.

Unter Faktorenstimulation fielen einige weitere Verhaltensmuster auf: in der ZL MHH-Med 4 schien die Zellwanderung unter NT-3-Behandlung leicht gehemmt zu sein. Dies bedeutete, dass sowohl die absolute Distanz zwischen Sphäroid und ausgewanderten Einzelzellen im Vergleich zur Kontrolle geringer war, als auch dass sich eine kleinere Gesamtzahl von Zellen aus dem Sphäroidverband gelöst hatte. Die Wirkung von NT-3 könnte somit auch hier über den immuncytochemisch nachgewiesenen TrkC-Rezeptor stattgefunden haben. Diese Beobachtung korrelierte mit dem bereits beschriebenen Verhalten von Körnerzellen. Es wurde gezeigt, dass unter NT-3-Behandlung sowohl der Migrations - Index als auch die Geschwindigkeit der Bewegung der Zellsomata vermindert waren, im Gegensatz zu BDNF, was das Wanderungsverhalten fördern konnte (TANAKA 2000). Umgekehrt fiel bei Stimulation derselben ZL mit dem Antikörper gegen NT-3 eine diskrete Steigerung des Wanderungsverhaltens auf, was auch durch die nun fehlende Wirkung des evtl. migrationshemmenden Neurotrophins am TrkC-Rezeptor zu erklären wäre. Bei

der MB-Zelllinie MEB-Med 8S konnte diese Migrationsbeeinflussung durch NT-3 nicht beobachtet werden, was durch das Fehlen des Rezeptors erklärbar ist. Allerdings fiel bei dieser Zelllinie auf, dass durch Stimulation mit den blockierenden Antikörpern sowohl gegen BDNF als auch gegen NT-3 ein deutlicher Abstand zwischen dem Ausgangssphäroid und dem ausgewanderten Zellschweif entstand.

Ein Erklärungsversuch für diese, nur im Ansatz mit Antikörpern und ausschließlich in der Zelllinie MEB-Med 8S beobachtete Verhaltensauffälligkeit wäre eine Veränderung der Zelladhärenz durch die AK-Zugabe. Dies ist z.B. durch Adsorption bestimmter Proteine im Medium bzw. auf der Beschichtungsgrundlage zu erklären. Es ist durchaus denkbar, dass bestimmte Eiweißkonzentrationen von vornherein nötig sind, um den MB-Sphäroiden überhaupt eine Adhärenz zu ermöglichen. Werden diese neutralisiert (in diesem Falle möglicherweise durch die Antikörperzugabe), so werden die ohnehin, im Vergleich zu Glioblastomen schwach ausgebildeten Anheftungen gelöst und z.B. beim Mediumwechsel ändert sich die Sphäroidposition, sodass ein scheinbares Migrationsloch zwischen Sphäroid und Einzelzellen entsteht. Weitere Versuche zur Klärung dieses Sachverhaltes werden momentan im tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik durchgeführt, unter anderem durch Verlagerung dieses Versuchsansatzes auf eine dreidimensionale Matrix. Dabei wird ein MB-Sphäroid in ein 3-D Kollagen-Gel eingebettet. Dies verhindert die mögliche Verringerung der Sphäroidadhärenz an einem Zellkulturuntergrund bzw. mögliche Veränderungen der kompletten Sphäroidposition im Vergleich zur Ausgangsposition.

Andere Erklärungen für dieses reproduzierbare Verhalten sind unterschiedliche Eigenschaften der Sphäroidzellen. Einige dieser Einzelzellen im Randbereich könnten über differente Verhaltensmuster im Vergleich zu zentraler liegenden Zellen verfügen, sodass nur diesen Zellen ein sich immer weiter entfernendes Auswandern ermöglicht wird. Die anderen Zellen bleiben, wie die ZL MHH-Med 2, als Zellverband bestehen. Sie könnten sich im Sphäroidinneren in einem

hypoxisch-nekrobiotischen Zustand befinden und somit nicht in der Lage sein aus zu migrieren. Allerdings müsste in diesem Fall eine Erklärung für dieses ausschließlich unter AK-Behandlung auftretende Verhalten gesucht werden. Die genauen Mechanismen, die zur Erklärung dieses Sachverhaltes beitragen, dürften interessanter Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Auch im **Invasionsassay** (Boyden Chamber), der für die ZL MHH-Med 4 und MEB-Med 8S unter Zusatz von Humanserum etabliert werden konnte, zeigte sich das bereits mehrfach beschriebene unterschiedliche Verhalten der genannten Medulloblastom-Zelllinien. Die undifferenziertere Linie MEB-Med 8S invadierte sowohl im 10- als auch im 20%-igen Medium in die weiße Hirnsubstanz und schien auch hier sehr früh die Zellgrenzen zu überschreiten. Die Adhärenz war im Vergleich zu der differenzierteren ZL MHH-Med 4 stärker ausgeprägt. Allerdings bleibt zu beachten, dass die Medulloblastome im Gegensatz zu – in früheren Ansätzen durch Herrn Schichor untersuchten – Glioblastomsphäroiden kein so intensives Anheften am Hirnschnitt zeigten. Dies wurde auch daran deutlich, dass die Färbungen unter visueller Kontrolle am Mikroskop durchgeführt werden mussten, um ein Abschwemmen des Sphäroids zu vermeiden. Wenn dies doch geschah, konnten die Zellen, die die Matrix wie bei einem Krater invadiert hatten und deshalb nicht abgeschwemmt wurden, in der Färbung nachgewiesen werden.

Um die **Wirkmechanismen** der bereits beschriebenen Effekte der Neurotrophine genauer zuordnen zu können, blieb noch zu klären, ob die eingesetzten Faktoren über ihre spezifischen Rezeptoren oder aber über unspezifische Regulationsmechanismen ihre biologische Aktivität ausüben. Dies wurde auf mRNA-Ebene für die drei Medulloblastom-Zelllinien MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S mittels Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Mithilfe der Trk-PCR sollte ermöglicht werden, zwischen den verschiedenen Rezeptoranteilen zu unterscheiden. Die Zelllinien wurden je nach Rezeptorbesatz charakterisiert und somit ihre Möglichkeit über diesen Mechanismus auf Neurotrophine reagieren zu können eingeschätzt.

Zunächst war in der PCR-Rezeptoranalyse auffällig, dass nur die Linie MHH-Med 4 sowohl über den intrazellulären Carboxyanteil als auch den extrazellulär gelegenen Aminobereich der Tyrosinkinase-Rezeptoren B und C verfügte. Für die ZL MHH-Med 2 konnte kein Rezeptorprodukt nachgewiesen werden und bei MEB-Med 8S entstand nur für den intrazellulären Rezeptoranteil ein positives Signal. Dies belegte wie von Chiappa et al. 1999 beschrieben, dass Medulloblastome sehr regelmäßig Tyrosinasen exprimieren, allerdings häufig in unvollständiger Form. Dies scheint des öfteren von einer verminderten oder sogar fehlenden BDNF- und NT-3- Expression begleitet zu sein (CHIAPPA 1999).

Diese Variabilität der Rezeptorexpression einerseits und andererseits auch der Expression und Reaktion auf neurotrophe Faktoren, die zusätzlich der unterschiedlichen Nachweisbarkeit in verschiedenen Versuchsansätzen *in vitro* unterliegen, erschwerte eine eindeutige Zuordnung und Interpretation der bisherigen Versuchsergebnisse. Somit wurde die Multikausalität der Interaktion zwischen Neurotrophen, Cytokinen, den entsprechenden Rezeptoren und hierüber ausgelösten Signalkaskaden erneut deutlich. Allerdings korrelierte der hier nachgewiesene positive Rezeptorbesatz der ZL MHH-Med 4 mit den Ergebnissen der immunocytochemischen Charakterisierung (durch die AG Pietsch in Bonn) der Medulloblastom-Zelllinien. Auch hier gab die Linie MHH-Med 4 als einzige positive Signale für die TrkB- und -C-Rezeptoren. Auch die unter 4.3 beschriebenen, für diese Zelllinie nachgewiesenen Wachstumsveränderungen, sowohl durch BDNF als auch durch NT-3, könnten durch die vorhandenen Rezeptoren erklärt werden. Dies fiel besonders dadurch auf, dass in den beiden anderen untersuchten ZL keine so eindeutigen Faktoreinflüsse nachzuweisen waren. Der fehlende bzw. unvollständige Rezeptorbesatz dieser ZL ist hierfür eine mögliche Erklärung. Weiterhin könnte auch das im Kokulturasay beobachtete langsame Invadieren der ZL MHH-Med 4 durch den hier vorhandenen und z.B. in der Linie MEB-Med 8S fehlenden TrkC-Rezeptor erklärt werden. Zusätzlich waren die im Migrationsversuch aufgetretenen

Effekte wiederum bei der rezeptorpositiven ZL 4 am auffälligsten. Unter NT-3-Stimulation erschien das Zellwanderungsverhalten gehemmt und nach entsprechender Antikörperzugabe zeigte sich ein gesteigertes Migrationsverhalten. Somit wurden allein aus den von uns *in vitro* durchgeführten Versuchsansätzen markante Unterschiede zwischen den untersuchten MB-ZL deutlich, die mit dem jeweiligen Rezeptorbesatz korrelierten. Genauere Hinweise auf die Beziehung zwischen Trk- und auch p75- Rezeptorbesatz und biologischem Verhalten sollen durch zurzeit durchgeführte PCR-Analysen der Primärkulturen verfolgt werden.

Zusätzlich zum Rezeptornachweis auf mRNA - Ebene wurde auch ein **Proteinnachweis der Trk-Rezeptoren** mittels immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der ZL MHH-Med 4 für beide untersuchten Rezeptoren (TrkB und TrkC) ein positives Signal. Dies korrelierte sowohl mit den Ergebnissen der PCR-Analysen als auch mit den durchgeführten immunocytochemischen Untersuchungen der AG in Bonn. Somit wurde noch einmal die Vermutung bestätigt, dass diese Zelllinie als einzige - zumindest vom Rezeptorbesatz her - die Möglichkeit hat, in beschriebener Weise auf die in dieser Arbeit eingesetzten Faktoren BDNF und NT-3 sowie deren blockierende Antikörper zu reagieren. Dies ist jedoch nur der Fall, falls die Faktoren ihre biologische Wirkung ausschließlich über ihre jeweiligen Rezeptoren auslösen. Die beobachteten Veränderungen des biologischen Verhaltens in den unter 4.1 bis 4.10 beschriebenen *in vitro* Assays könnten durch diesen Mechanismus erklärt werden, obwohl gleichzeitig an eine multifaktorielle Beeinflussung der Signalmechanismen gedacht werden muss.

Die schwach positiven Signale für die Rezeptoren TrkB und TrkC in der ZL MHH-Med 2 korrelierten auch mit immunocytochemischen Befunden aus der Arbeitsgruppe T. Pietsch und verdeutlichten noch einmal die Mittelstellung dieser Zelllinie zwischen den Linien MHH-Med 4 auf der einen und MEB-Med 8S auf der anderen Seite. Auch die ZL 8 beschrieb in der Trk-Färbung ebenso wie in der Immunocytochemie kein Signal für TrkC und ein schwaches für TrkB. Dies



war eine mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss von NT-3 auf das Migrations- und Proliferationsverhalten dieser ZL im Vergleich zu MHH-Med 4.

Es blieb die Frage nach der Ursache für die unterschiedlichen **Motilitätseigenschaften** der einzelnen Zelllinien. Innerhalb der Zellmotilität spielen besonders die proteolytischen Enzyme eine große Rolle. Unter ihnen sind die Matrixmetalloproteinasen wichtig. Die Zymographie weist die sezernierten Proteinasen in der inaktiven bzw. aktiven Form nach.

Zunächst wurde durch den Versuchsaufbau deutlich, dass Medulloblastome im Vergleich zu Gliomen sehr große Mengen an MMP exprimierten. Dabei war die Expressionsmenge der untersuchten Linien signifikant geringer als die der Primärtumoren. Auffällig war weiterhin, dass ausschließlich der Primärtumor 1913 eine aktive MMP-2-Form exprimierte. Gleichzeitig fiel auf, dass dies auch die einzige der untersuchten Primärkulturen war, welche auf KollagenS – bzw. Laminin-beschichtetem Untergrund migriert ist. Dies wies darauf hin, dass bestimmte individuelle biologische Verhaltensweisen durch die Expression unterschiedlicher Mengen und Arten von Proteinasen in den Tumoren beeinflusst wurden. Durch die Stimulation mit Neurotrophinen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bzgl. der MMP-Expression. Dies könnte wiederum durch eine relativ hohe Eigenproduktion verschiedener Proteinasen durch MB erklärt werden, wodurch eine weitere Faktorenzugabe das Expressionsmuster der untersuchten Proteine nicht weiter verändern konnte. Weitere Möglichkeit zur Erklärung dieses Sachverhaltes wäre ein multifaktorieller Regulationsmechanismus, der durch die alleinige Zugabe nur eines Faktors nicht ausreichend beeinflusst wird.

Durch die Stimulation der untersuchten ZL konnten mehrfach Effekte in Bezug auf das biologische Verhalten der Medulloblastome *in vitro* nachgewiesen werden. Allerdings bleibt weiterhin zu klären, ob für die beobachteten Veränderungen der exogen zugegebene Faktor verantwortlich war oder eine sehr hohe autogene Produktion vorlag, die eventuelle Effekte überdeckte.

Um zusätzlich die Eigenproduktion anderer, Verhaltens-beeinflussender Faktoren auszuschließen, wurden **Proteinnachweise** per ELISA durchgeführt. Im NT-3 ELISA konnte zunächst lediglich eine Stimulation der Produktion nach BDNF-Behandlung nachgewiesen werden. Dies war in allen drei untersuchten ZL feststellbar. Im BDNF ELISA zeigte sich hingegen kein Einfluss durch die Faktorenbehandlung. Allerdings waren hier ausschließlich die mit BDNF vorbehandelten Ansätze innerhalb der Standardkurve messbar. Bei den unbehandelten bzw. mit anderen NT oder Antikörpern stimulierten Ansätzen lagen die BDNF-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze, sodass hier eine sehr geringe Eigenproduktion der Medulloblastomzellen von BDNF angenommen wurde. Eine andere Möglichkeit lag darin, dass produziertes BDNF in überwiegender Form rezeptor-gebunden (spezifisch oder auch unspezifisch) vorlag und somit im ELISA nicht nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt bleibt zu diskutieren, ob durch exogen zugefügte Faktoren die endogenen Signalmechanismen ausreichend beeinflusst wurden und somit die in den Versuchsansätzen verwendeten Neurotrophin-Konzentrationen überhaupt biologische Effekte auslösen konnten. Zumindest muss von einer komplexen Interaktion zwischen den einzelnen neurotrophen Faktoren einerseits und den unterschiedlichen Anpassungen der Funktionszustände der Rezeptoren andererseits ausgegangen werden. Somit sind einzelne Effekte eher als Summenreaktion eines durch verschiedene Mechanismen regulierbaren biologischen Systems zu verstehen. Eine genaue Zuordnung zu einem Faktor bzw. einem Rezeptor ist derzeit nicht möglich; dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das biologische Verhalten von Medulloblastomen unter dem Einfluss neurotropher Faktoren untersucht. Diese verwendeten Neurotrophine wirken innerhalb der untersuchten Medulloblastom-Zelllinien und –Primärkulturen in unterschiedlicher Weise auf Proliferation, Migration und das Invasionsverhalten der Tumorzellen. Dies geschieht in Abhängigkeit der exprimierten Neurotrophin-Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) konnte in den Zelllinien MHH-Med 2 und MHH-Med 4 das Wachstumsverhalten hemmen. Desweiteren wurde die Apoptoserate der ZL 4 unter BDNF-Behandlung gesteigert. Die Wirkung dieses neurotrophen Faktors wird über den Rezeptor Trk B vermittelt. Durch den Nachweis der aktivierten Form der MAP-Kinase unter BDNF-Stimulation, sowohl in der ZL MHH-Med 4 und auch in MEB-Med 8S zeigt, dass BDNF in Medulloblastomen ebenfalls über Trk B wirkt.

Im Gegensatz zu BDNF, welcher die Zellmotilität nicht beeinflusste, konnte das *neurotrophin-3* (NT-3) das Wanderungsverhalten der ZL 4 hemmen. Dieser Effekt ließ sich durch Zugabe des blockierenden Antikörpers gegen NT-3 wieder aufheben. Die für die Vermittlung des Effektes notwendige Rezeptortyrosinkinase Trk C konnte auf der Oberfläche dieser Zelllinie nachgewiesen werden. Über den Nachweis der phosphorylierten Form der MAP-Kinase nach NT-3-Stimulation wurde auch hier die Wirkvermittlung über den zugehörigen Rezeptor bestätigt.

Somit konnte gezeigt werden, dass die neurotrophen Faktoren in Abhängigkeit der zugehörigen Rezeptor-Tyrosinkinasen unterschiedlichste physiologische Zellreaktionen bewirken. Durch den inkonstanten Rezeptorbesatz der untersuchten ZL und auch die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Aktivitätszustände der jeweiligen Rezeptoranteile ebenso wie durch die Hinweise auf autokrine Loops durch die Medulloblastomzellen kann eine einfache Faktor-Wirkung-Beziehung nicht aufgestellt werden und bleibt somit Bestandteil weiterer Untersuchungen.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### A

A	Adenosin
a	aktiviert (bzgl. MMPs)
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AG	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure

### B

BA	brain aggregate (fetales Rattenhirnzellaggregat)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
$\beta$ -ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise

### C

C	Cytosin
ca.	circa

---

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid

**D**

DATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGTP	Desoxy-Guanidintriphosphat
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinacid
DNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DTPP	Desoxy-Thymidintriphosphat

**E**

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

**F**

FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
-----	--

**G**

g	Gramm
---	-------

---

G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

**H**

h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

**I**

IHC	Immunhistochemie
IF	Interfilamentärprotein

**K**

kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

**L**

l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

**M**

M	molar (mol/l)
---	---------------

---

MAB	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MB	Medulloblastom
MetOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
μ	Mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

**N**

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
NGF	nerve-growth-factor
nm	Nanometer (10 <sup>-9</sup> m)
NT	Neurotrophine
NT-3	Neurotrophin-3

**O**

OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt

**P**

P	Passage
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered Saline



---

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor

**R**

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

**S**

s.	siehe
s	sezerniert (bzgl. MMPs)
sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
sfM	serumfreies Medium (= „Medullomedium“ ohne Humanserum)
Sph	Sphäroid

**T**

t	time (Zeitpunkt)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase (körpereigener MMP-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

**U**

ÜLZ	Überlebenszeit
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett

**V**

V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

**W**

WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
-----	---

**X**

XC	Xylencyanol
----	-------------

**Z**

z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZL	Zelllinie

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ansprechraten unterschiedlicher Chemotherapien.....	6
Tabelle 2: Bevorzugte Zielneurone der einzelnen trophischen Faktoren (ZILLES 1994).....	9
Tabelle 3: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (KUMAR 1997). ....	17
Tabelle 4: Eigenschaften der MMPs und zugehörige Substrate (WAGNER 1999).....	19
Tabelle 5: Klinische Daten zu den in dieser Arbeit untersuchten Tumorbiopsien/Patienten. ....	28
Tabelle 6: Zusammenfassung der eingesetzten PCR-Parameter. ....	45
Tabelle 7: Veranschaulichung des Aufbaus der Kokulturrexperimente mit Darstellung der jeweils eingesetzten Sphäroidanzahl. ....	65

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Medulloblastom – MRT (BLASER/HARWOOD-NASH 1996) .....	2
Abbildung 2: Histopathologie von Medulloblastomen: typische Anordnung undifferenzierter Tumorzellen (links), neuroblastische Rosetten als histologisches Kennzeichen (rechts) (KLEIHUES/CAVENEY 1997) .....	3
Abbildung 3: Trk-Rezeptor (SNIDER 1994).....	10
Abbildung 4: p75-Rezeptor der neurotrophen Faktoren (CHAO 1992).....	11
Abbildung 5: Signalkaskade der neurotrophen Faktoren (RASOULY/STEPHANS 1995).....	12
Abbildung 6: Apoptotische Zelle mit Chromatinschollen, umschlossen von einem Makrophagen (KÜHNEL 1995).....	16
Abbildung 7: Medulloblastom-Zelllinie MEB-Med 8S in Kultur.....	59
Abbildung 8: Überleben der Medulloblastomsphäroide in serumfreiem Medium.....	61
Abbildung 9: Wachstumskurven der Zelllinien MHH-Med 2, MHH-Med 4 und MEB-Med 8S unter Faktorenstimulation.....	63
Abbildung 10: Kokultur von Medulloblastomen mit brain aggregates .....	64
Abbildung 11: Kokultur der MB-Primärkultur 1913 mit brain aggregates.....	67
Abbildung 12: Kokultur der MB-Primärkultur 2123 mit brain aggregates.....	67
Abbildung 13: Migration aus einem Medulloblastomsphäroid .....	69
Abbildung 14: Migration der Zelllinie MHH-Med 4 .....	70
Abbildung 15: Migration der Zelllinie MEB-Med 8S .....	71
Abbildung 16: MEB-Med 8S – Sphäroid auf weißer Hirnsubstanz (Schwein) ..	72
Abbildung 17: MHH-Med 4 – Sphäroid auf weißer Hirnsubstanz (Schwein) ....	73

---

Abbildung 18: GAPDH-PCR der Medulloblastom-Zelllinien .....	74
Abbildung 19: Trk – PCR der Medulloblastom-Zelllinien .....	75
Abbildung 20: Gelatine-Zymographien der MB-Zelllinien und –Primärkulturen .	76
Abbildung 21: Apoptosefärbung .....	78
Abbildung 22: Apoptosefärbung der Zelllinie MHH-Med 4 .....	78
Abbildung 23: Apoptosefärbung der Zelllinie MEB-Med 8S .....	79
Abbildung 24: Trk-Färbungen der Medulloblastom-Zelllinien .....	80
Abbildung 25: Western-Blots für die MAP-Kinase .....	81

---

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

Albrecht S., Bayer T.A., Kraus J.A., Pietsch T.: Transthyretin expression in medulloblastomas and medulloblastoma cell lines. *Neuropath Appl Neurobiol* 21:399-409, 1995

Barbacid: Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Op Cell Biol* 7:148-155, 1995

Blaser S.I., Harwood-Nash D.C.F.: Neuroradiology of pediatric fossa medulloblastoma. *J Neurooncol* 29: 23-34, 1996

Burnett M., White E., Sih S., von Haken M., Cogan P., McNamara M.: Chromosome arm 17p deletion analysis reveals molecular genetic heterogeneity in supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 97(1):25-31, 1997

Chao M.V.: Neurotrophin Receptors: a window into neural differentiation. *Neuron* 9:583-593, 1992

Chiappa S., Chin L., Zurawel R., Raffel C.: Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery* 45: No. 5, 1999

Cogan P., McDonald J.: Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J Neuro-oncol* 29:103-112, 1996

---

Conover J.C., Yancopoulos G.D.: Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice. *Rev Neurosci* 8(1): 13-27, 1997

Davies A.M.: The yin and yang of nerve growth factor. *Current Biology* 7:R38-R40, 1997

Davies A.M.: Neurotrophic modulation of neurite growth. *Current Biology* 10: R198-200, 2000

Füller T.: Expression und Regulation von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren natürliche Inhibitoren (TIMP) in malignen Gliomen unter besonderer Berücksichtigung von Endothelzellen. Diplomarbeit an der Neurochirurgischen Universitätsklinik, Würzburg, 1999

Giordana M., Migheli A., Pavanelli E.: Isochromose 17q is a constant finding in medulloblastoma. An interphase cytogenetic study on tissue sections. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(3):233-8, 1998

Goumnerova L.: Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol* 29: 85-89, 1996

Jacobsen P., Jenkyn D., Papadimitriou J.: Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropath Exp Neurol* 44, No.5, 472-485, 1985

Jenkin D.: The radiation treatment of medulloblastoma. *J Neurooncol* 29: 45-54, 1996

Jenkin D., Shabanah M., Shail E., Gray A., Hassounah M., Khafaga Y., Kofide A., Mustafa M., Schultz H.: Prognostic factors for medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(3): 573-84, 2000

Kaplan D., Miller F.: Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr.Op.in Cell Biology* 9: 213-221, 1997

Kellogg D.E., Sninsky J.J., Kowk S.: Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 189:202-208, 1990

Kim J., Sutton M., Lu D., Cho T., Goumnerova L., Goritchenko L., Kaufman J., Lam K., Billet A., Tarbell N., Wu J., Alleln J., Stiles C., Segal R., Pomeroy S.: Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Canc Res* 59:711-719, 1999

Kleihues P., Cavenee W.K.: *Pathology and Genetics: Tumours of the Nervous System*. 1997

Kokunai T., Iguchi H., Tamaki N.: Differentiation and growth inhibition of glioma cells induced by transfer of trk A proto-oncogene. *J Neurooncol* 42: 23-34, 1999

Korshunov A., Golanov A., Ozerov S., Sycheva R.: Prognostic value of tumor-associated antigens immunoreactivity and apoptosis in medulloblastomas. An analysis of 73 cases. *Brain Tumor Pathol* 16(1):37-44,1999

Kühl J.: a) Vortrag über Therapie und Prognose von Medulloblastomen am 09.02.00 im Rahmen der Neurochirurgischen Vortragsreihe der Universitätsklinik Würzburg.

Kühl J.: b) „Kinder mit Hirntumoren“ auf der Internetseite der Würzburger Kinder- und Poliklinik vom 05.01.00.

Kühnel W.: *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 9.Aufl. 1995



---

Kumar, Cotran, Robins: Basic Pathology. 6. Aufl. 1997

Lamballe F., Klein R., Barbacid M.: trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 1991

McAllister K., Katz L., Lo D.: Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18: 767-778, 1997

Muragaki Y., Chou T., Kaplan D., Trojanowski J., Lee V.: Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci* 17(2): 530-542, 1997

Packer R.: Childhood medulloblastoma: progress and future challenges. *Brain Dev* 21(2): 75-81, 1999

Patti R., Reddy C., Georger B., Grotzer M., Raghunath M., Sutton L., Phillips P.: Autocrine secreted insulin-like growth factor-I stimulates MAP kinase-dependent mitogenic effects in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Int J Oncol* 16(3): 577-84, 2000

Pietsch T., Scharmann T., Wiestler O., Zeltzer P., Riehm H.: Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous System. *Canc Res* 54: 3278-3287, 1994

Pietsch T., Koch A., Wiestler O.: Molecular genetic studies in medulloblastomas: evidence for tumor suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13K. *Klin Padiatr* 209(4):150-5, 1997

Pietsch T., Waha A., Koch A., Kraus J., Tonn J., Sörensen N., Wainwright B., Chenevix-Trench G., Wiestler O., Wicking C.: Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of drosophila patched. *Canc Res* 57: 2085-2088, 1997

---

Pomeroy S., Sutton M., Goumnerova L., Segal R.: Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. *J Neuro-onkol* 35(3): 347-52, 1997

Provias J., Becker L.: Cellular and molecular pathology of medulloblastoma. *J Neuro-oncol* 29: 35-43, 1996

Rasouly D., Lazarovici P., Stephens R., Kaplan D.: Signal transduction of neurotrophin receptors: Basic concepts and available pharmacological tools. *Neural Notes* Spring 1995

Reifenberger G.: Vortrag über die Molekulargenetischen Grundlagen von Hirntumoren am 26.01.00 im Rahmen der Neurochirurgischen Vortragsreihe der Universitätsklinik Würzburg.

Rutka J., Hoffman H.: Medulloblastoma: A historical perspective and overview. *J Neuro-oncol* 29:1-7, 1996

Saiki R.K., Gelfang D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1998

Schlegel U., Westphal M.: *Neuroonkologie*. Georg Thieme Verlag, New York, 1998

Segal R., Pomeroy S., Stiles C.: Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT-3 receptors in developing cerebellar granule cells; *J Neurosci* 15(7): 4970-4981, 1995

Serfling: Vorlesung: Molekulare Aspekte der Cancerogenese. WS 1998

Smyth I., Narang M., Heimann C., Pietsch T., Wicking C., Wainwright B.: Isolation and characterization of human patched 2 (*PTCH2*), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* 8(2):291-7, 1999

Snider W.: Functions of the neurotrophins during nervous system development. What the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 1994

Stahl N., Yancopoulos G.: The Tripartite CNTF Receptor Complex. *J Neurobiol* 25: 1454-1466, 1994

Sutton L., Phillips P., Molloy P.: Surgical management of medulloblastoma. *J Neuro-oncol* 29: 9-21, 1996

Tanaka S., Sekino Y., Shirao T.: The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro. *Neurosci* 997(4):727-734, 2000

Tolkowsky A.: Neurotrophic factors in action – new dogs and new tricks. Meeting Report: TINS 20 No. 1, 1997

Ullrich A., Schlessinger J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212, 1990

Vesa J., Kruttgen A., Shooter E.: p75 reduces TrkB Tyrosine Autophosphorylation in response to BDNF and NT-4/5. *J Biol Chem* S0021-9258, 2000

Wagner, S.: Der Einfluss von Interleukin 10 und Matrix-Metalloproteinasen auf die Invasionseigenschaften maligner Tumoren. Promotionsarbeit an der Neurochirurgischen Universitätsklinik, Würzburg. 1999

Wang W., Kumar P., Whalley J., Haworth A., Kumar S.: The mutation status of PAX3 and p53 genes in medulloblastoma. *Anticanc Res* 18(2A): 849-53, 1998

Yuen E., Yiwen L., Mischel R., Mobley W.: Neurotrophins and the neurotrophic factor hypothesis. *Neural Notes* 1 4, 1996

Zilles, Rehkämper: Funktionelle Neuroanatomie. S37f. 2.Aufl.1994

Zurawel R., Allen C., Welcher-Reya R., Scott M., Raffael C.: Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer* 28(1):77-81, 2000

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K. Roosen danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Universitätsklinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.-C. Tonn für die Stellung des Themas und ganz besonders für seine Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. Christian Herbold für die Betreuung während der gesamten Dauer der Arbeit.

Herrn Dr. Sven Wagner danke ich für die intensive Einarbeitung in die einzelnen Themenbereiche und seine konstruktive Kritik.

Die Bereitstellung der Zell-Linien verdanke ich Herrn Dr. T. Pietsch; für die HIT-Studien bzw. klinischen Daten bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. J. Kühl.

Für die stetige Hilfe, Einführung in die Laborarbeit und Unterstützung danke ich allen Mitarbeitern des tumorbiologischen Labors, allen voran Anja Winkler. Weiterhin möchte ich mich bei allen Assistenten, Studenten und Freunden für die gute Zusammenarbeit während dieser Arbeit bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nicole Höhlriegel  
Geburtsdatum: 23. April 1976  
Geburtsort: Schweinfurt

### Schulbildung

1982 – 1986 Körner-Grundschule in Schweinfurt  
1986 – 1995 Alexander-von-Humboldt Gymnasium in Schweinfurt  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung

November 1995 – September 2002 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg  
März 1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  
März 1999 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung  
März 2001 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung  
April 2001 – März 2001 Praktisches Jahr  
1. Tertial Innere Medizin an der Universitätsklinik Würzburg  
2. Tertial Kinderchirurgie an der Universitätsklinik Würzburg  
Allgemeinchirurgie im Goroka Base Hospital in Papua Neuguinea  
3. Tertial Pädiatrie im Royal Children's Hospital von Brisbane/Australien  
Mai 2002 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung